

炮制对天山假狼毒毒性及化学成分的影响

陈良^{1,2,3}, 徐晓琴^{2,3,4}, 蒋兵^{1*} (1.新疆医科大学附属中医医院, 新疆中药炮制研究重点实验室, 乌鲁木齐 830000; 2.中国科学院新疆理化技术研究所, 乌鲁木齐 830011; 3.中国科学院大学, 北京 100049; 4.新疆维吾尔自治区中药民族药研究所, 乌鲁木齐 830002)

摘要: 目的 研究天山假狼毒炮制前后的急性毒性变化及其体内外组分的改变。方法 将小鼠分为生药组 1(60.6 g·kg⁻¹)、生药组 2(75.75 g·kg⁻¹)、生药组 3(90.9 g·kg⁻¹)、生药组 4(106.05 g·kg⁻¹)、生药组 5(121.1 g·kg⁻¹)、炮制组 1(58.6 g·kg⁻¹)、炮制组 2(73.25 g·kg⁻¹)、炮制组 3(87.9 g·kg⁻¹)、炮制组 4(102.55 g·kg⁻¹)、炮制组 5(117.2 g·kg⁻¹)(均按生药计), 分别灌服不同浓度的天山假狼毒生药及炮制品提取物 1 次, 连续观察 14 d, 记录小鼠急性毒性反应及动物死亡情况, 计算 LD₅₀。利用 UPLC-Q/TOF-MS 测定天山假狼毒生药、炮制品及其含药血清总离子流图, 分析各组组分的化学成分变化。结果 天山假狼毒生药提取物 LD₅₀=91.465 g·kg⁻¹, 95%置信区间为 83.929~98.680 g·kg⁻¹。天山假狼毒炮制品提取物 LD₅₀=104.900 g·kg⁻¹, 95%置信区间为 95.584~122.774 g·kg⁻¹(均按生药计)。死亡动物解剖仅见肝脏颜色变深, 其他脏器肉眼未见明显改变。生药经炮制后 7 个成分峰面积减小, 3 个成分未出现。相较于炮制品, 生药含药血清中的代谢成分或移行成分明显更多, 且炮制品入血成分色谱峰明显小于生药。结论 炮制可明显降低天山假狼毒急性毒性, 这种减毒作用与天山假狼毒部分成分含量的降低或消除有关。

关键词: 天山假狼毒; 中药炮制; 急性毒性试验; UPLC-Q/TOF-MS; 化学成分

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)24-3071-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.24.003

引用本文: 陈良, 徐晓琴, 蒋兵. 炮制对天山假狼毒毒性及化学成分的影响[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(24): 3071-3077.

Effects of Processing on Toxicity and Chemical Components of *Stelleropsis Tianschanica*

CHEN Liang^{1,2,3}, XU Xiaoqin^{2,3,4}, JIANG Bing^{1*} (1.Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Xinjiang Medical University, Xinjiang Key Laboratory of Processing and Research of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000, China; 2. Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China; 3.University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4.Xinjiang Institute of Chinese Materia Medica and Ethnodrug, Urumqi 830002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the changes of the acute toxicity and component *in vitro* and *in vivo* of *Stelleropsis tianschanica* by pre and post processing. **METHODS** The mice were divided into crude drug group 1(60.6 g·kg⁻¹), crude drug group 2(75.75 g·kg⁻¹), crude drug group 3(90.9 g·kg⁻¹), crude drug group 4(106.05 g·kg⁻¹), crude drug group 5(121.1 g·kg⁻¹), processing group 1(58.6 g·kg⁻¹), processing group 2(73.25 g·kg⁻¹), processing group 3(87.9 g·kg⁻¹), processing group 4(102.55 g·kg⁻¹), processing group 5(117.2 g·kg⁻¹)(all calculated by crude drugs). *Stelleropsis tianschanica* crude drug and processed product extracts of different concentrations were administrated once, and observed continuously for 14 d. Acute toxicity reaction in mice and animals' death were recorded, and LD₅₀ was calculated. Analyzed the total ion current of *Stelleropsis tianschanica* crude drug, processed products and drug-containing serum based on UPLC-Q/TOF-MS, and compared the composition changes of each component. **RESULTS** The LD₅₀ of *Stelleropsis tianschanica* crude drug extract was 91.465 g·kg⁻¹, and the 95% confidence interval was 83.929~98.680 g·kg⁻¹. The LD₅₀ of *Stelleropsis tianschanica* processed product extract was 104.900 g·kg⁻¹, and the 95% confidence interval was 95.584~122.774 g·kg⁻¹(all based on crude drugs). Only a darkened liver was observed in the dissection of dead animals, while there was no obvious changes founded in other organs. After processing, the chromatographic peak area of the 7 components was reduced, and the 3 components do not appear. Compared with processed products, there were significantly more metabolic or migrating components in the medicated serum of crude drugs, and the chromatographic peak of the blood components of processed products was significantly smaller than that of crude drugs. **CONCLUSION** Processing can significantly reduce the acute toxicity of *Stelleropsis tianschanica*, and this effect is related to the reduction or elimination of some components of *Stelleropsis tianschanica*.

KEYWORDS: *Stelleropsis tianschanica*; Chinese medicinal herbs processing; acute toxicity test; UPLC-Q/TOF-MS; chemical composition

基金项目: 新疆医科大学附属中医医院院级课题(ZYY2019PZ03)

作者简介: 陈良, 男, 硕士, 副主任中医师 Tel: 13579832835 E-mail: 864358450@qq.com *通信作者: 蒋兵, 男, 主管中医师 Tel: 15099371536 E-mail: 250289040@qq.com

天山假狼毒 *Stelleropsis tianschanica* (Pobed.) 是桃金娘目瑞香科假狼毒属的多年生草本, 在中国只有新疆部分地区的 1 700~2 000 m 海拔左右的山坡草地中有分布^[1]。天山假狼毒与瑞香科瑞香狼毒(*Stellera chamaejasme*)同科为亲缘植物, 且共有成分较多, 在新疆当地常用作中药狼毒的伪品使用^[2], 味劣, 不当食用时有毒性。全草初食有汁, 略甜, 临床用于逐水祛痰, 有散结杀虫之效^[3-4]。现代药学研究表明, 该科属植物主要成分为萜类、黄酮、木脂素、挥发油等, 具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗氧化等生理活性^[5-8]。本研究通过动物急性毒性试验及 UPLC-Q-TOF-MS 分析方法, 平行对比天山假狼毒炮制前后的毒性差异和化学成分改变, 明确炮制对其减毒作用, 以及炮制减毒可能的物质基础, 为天山假狼毒的炮制提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 动物

ICR 小鼠 110 只, ♂ ♀ 各半, 体质量 18~22 g; SD 大鼠 8 只, ♂ ♀ 各半, 体质量 180~220 g, 由新疆医科大学实验动物中心提供, 生产许可证号: SCXK(新)2018-0002。由新疆医科大学实验动物伦理委员会审批通过, 审批号: IACUC20201110-52。

1.2 仪器

AcquityUPLC/XevoG2-SQ/TOF 液-质联用系统(美国 Waters 公司); KQ-250DB 数控超声波清洗器(昆山超声波仪器有限公司); BSA-124S-W 型万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); XSE105DU 型十万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; HC-2518 高速离心机(安徽中科中佳仪器有限公司)。

1.3 试剂与药材

天山假狼毒采自新疆伊犁昭苏县, 经新疆维吾尔自治区中医医院李永和主任药师鉴定为瑞香科天山假狼毒 *Stelleropsis tianschanica* (Pobed.)。

炮制天山假狼毒: 取天山假狼毒 1 g, 加食用醋 400 mL 拌匀, 密闭 10 min, 待醋被吸尽后, 用文火炒干取出晾凉, 炒制温度控制在 140 ℃, 炒制时间 10 min。

食用醋(新疆七一酱园精酿, 批号: 202009/22); 色谱级乙腈(美国 Fisher 公司), 其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 动物分组

根据前期预实验结果, 选用检疫合格并筛选合格的 ICR 小鼠 110 只, ♂ ♀ 各半, 随机分为 11 组, 每组 10 只, 分别为空白对照组、生药组 1(60.6 g·kg⁻¹)、生药组 2(75.75 g·kg⁻¹)、生药组 3(90.9 g·kg⁻¹)、生药组 4(106.05 g·kg⁻¹)、生药组 5(121.1 g·kg⁻¹)、炮制组 1(58.6 g·kg⁻¹)、炮制组 2(73.25 g·kg⁻¹)、炮制组 3(87.9 g·kg⁻¹)、炮制组 4(102.55 g·kg⁻¹)、炮制组 5(117.2 g·kg⁻¹)(均按生药计)。给药体积 40 mL·kg⁻¹, 现配现用, 在给药前禁食不禁水 12 h 以上, 当日灌胃给药 1 次。给药后 0~4 h 内密切仔细观察记录各组动物的外观、行为活动、分泌物、排泄物、饮食情况、死亡情况以及中毒反应严重程度、持续时间、是否可逆等。分别于给药前及给药 D4、D7、D10、D14 记录动物体质量变化及死亡情况。死亡动物及时解剖观察, D15 对存活动物行眼眶取血后处死, 进行全面解剖, 对肝脏、肾脏、脾脏、心脏、脑、皮肤的颜色、形状和大小等进行肉眼观察, 记录有异常的脏器。

2.2 UPLC-Q/TOF-MS 定性分析及含药血清对比

2.2.1 色谱分析供试品的制备 天山假狼毒原药材及炮制品粉碎后过 60 目筛, 称取 1.00 g, 加入 70%乙醇适量, 超声提取 40 min, 过滤, 合并滤液, 定容至 25 mL 量瓶, 0.45 μm 滤膜过滤, 即为色谱分析用供试品溶液。

2.2.2 血清样品制备 取 SD 大鼠 8 只, 雌雄各半, 体质量 180~220 g, 按性别及体质量随机分为 3 组, 分别为空白对照组 2 只, 生药组 3 只, 炮制组 3 只。各组通过灌胃给予纯水、最大浓度的天山假狼毒生药提取物(3.03 g·mL⁻¹ 按生药计)或炮制品提取物(2.93 g·mL⁻¹ 按生药计), 给药量为 15 mL·kg⁻¹, 当日 1 次, 连续 3 d, 末次给药后 1 h, 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 使用肝素钠抗凝管采集血浆, 离心取上清立即冻存待测。分别精密吸取空白大鼠、炮制品提取物给药组大鼠血清、生药组大鼠血清 2 mL, 加 6 倍体积的甲醇, 涡旋震荡 15 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心, 取上清, 氮气吹干, 加 200 μL 甲醇复溶, 12 000 r·min⁻¹ 离心后, 取上清, 待测。

2.2.3 色谱条件 Phenomenex Synergi® C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 4 μm); 柱温: 35 ℃; 流动相

乙腈(A)-0.5 mmol·L⁻¹ 甲酸溶液(B); 梯度洗脱 (0~2 min, 2%A; 2~10.5 min, 2%→16%A; 10.5~21 min, 16%→28%A; 21~23 min, 28%→50%A; 23~23.1 min, 50%→2%A; 23.1~26 min, 2%A); 流速: 0.4 mL·min⁻¹, 对高效液相色谱流出液进行柱后 3 : 1 分流, 1/4 导入质谱进行定性分析; 进样量: 2 μL。

2.2.4 质谱条件 离子源:电喷雾离子源(ESI 源); 检测模式: 负离子化(-3.5 kV); 雾化气: 高纯氮气, 流速 1.5 L·min⁻¹; 干燥气: 氮气, 压力为 140.0 kPa; CID 碰撞气及冷却气为高纯氩气; 氩气压力: 46 kPa; 曲形脱溶剂管温度: 200 °C; 飞行管电压为-7.0 kV; 加热模块温度为 200 °C; 检测器电压为 1.59 kV; 数据采集采用自动收集模式, 每一级质谱自动选取基峰离子作为下一级质谱的母离子实行破碎。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 进行统计分析。多组间比较方差齐时采用单因素方差分析, 两两比较, 采用 LSD-*t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状况

空白对照组动物给药当日未见明显异常。给药组动物于给药约 20~40 min 均出现竖毛、自主活动减少、蜷缩。给药约 1~2 h 时开始出现俯卧不动, 呼吸先加快后减慢。小剂量组持续约 1~1.5 h 开始恢复活动, 大剂量组部分动物于给药 35 min~2 h 后死亡。记录剩余存活动物恢复后直至计划解剖日的状况显示, 其外观体征、一般行为活动、精神状态、腺体分泌、呼吸状态、粪尿性状颜色、生殖器等均未见明显异常改变。

3.2 体质量

试验期间, 空白对照组动物体质量增长未见明显异常。与空白对照组比较, 生药组 1 动物 D4 体质量明显降低(*P*<0.05), 生药组 2~3 动物 D4 体质量均显著降低(*P*<0.01), 炮制组 1~4 动物 D4 体质量均显著降低(*P*<0.01), 其余时段各组差异均无统计学意义, 恢复正常上涨。

3.3 死亡情况

空白对照组、生药组 1、炮制组 1~2 均未出现动物死亡, 其余各组死亡情况见表 1。各组剩余动物均存活至计划解剖日。

表 1 各组小鼠死亡情况

Tab. 1 Death of mice in each group

组别	数量/ 只	死亡数/ 只	死亡率/%	死亡时间/h			
				0.5	1	1.5	2
空白对照组	10	0	0	0	0	0	0
生药组 1	10	0	0	0	0	0	0
生药组 2	10	1	10	0	0	0	1
生药组 3	10	5	50	0	0	1	4
生药组 4	10	8	80	0	3	5	0
生药组 5	10	10	100	1	9	0	0
炮制组 1	10	0	0	0	0	0	0
炮制组 2	10	0	0	0	0	0	0
炮制组 3	10	3	30	0	0	0	3
炮制组 4	10	4	40	0	0	1	3
炮制组 5	10	7	70	0	0	2	5

3.4 解剖观察

恢复期结束, 对所有存活动物进行大体解剖观察, 各组存活动物主要组织或脏器均未见明显肉眼病变。天山假狼毒生药组及炮制组给药当天死亡小鼠均可见肝脏颜色较深。

3.5 定性分析

按“2.2.3”“2.2.4”项下色谱、质谱条件, 对供试品溶液进行 UPLC-Q/TOF-MS 分析。根据供试品溶液各主要色谱峰的保留时间、紫外吸收特征、一级质谱的准分子离子(加合离子)和二级质谱的特征碎片离子信息, 结合相关文献和 ChemSpider、PubChem 等化合物数据库, 对各主要色谱峰进行定性分析。从天山假狼毒中共鉴定出 17 种化合物, 总离子流图及主要色谱峰的质谱图见图 1, 空白溶剂的总离子流图谱见图 2, 化合物鉴定结果见表 2。峰 1: 在负离子模式下得到母离子 *m/z* 579.193 6[M-H]⁻, 其二级质谱得到 *m/z* 323.098 0, 209.081 4, 194.057 8 的碎片峰; 保留时间为 7.32 min, 根据其分子式和二级碎片, 推断峰 1 为 Excelside A。

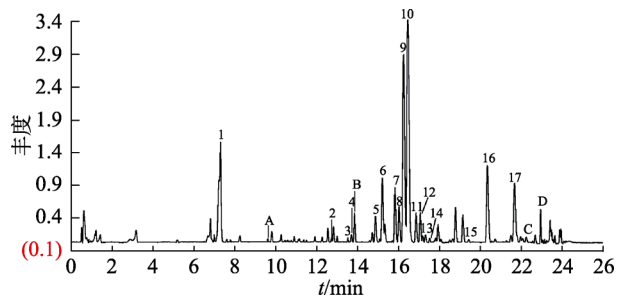


图 1 天山假狼毒加工前总离子流图

Fig. 1 TIC of *Stelleropsis tianschanica* before processing

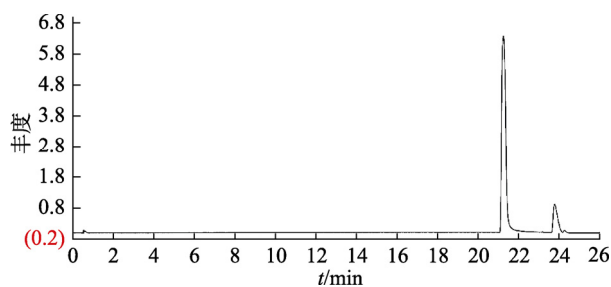


图2 空白溶剂总离子流图

Fig. 2 TIC of blank solvent

峰 2: 在负离子模式下得到母离子 m/z 321.040 2[M-H]⁻, 其二级质谱得到 m/z 277.049 7, 259.039 7, 231.044 5 的碎片峰; 保留时间为 12.73 min, 与文献^[9]对比, 推断峰 2 为 daphnogitin。

峰 3: 在负离子模式下得到母离子 m/z 519.187 0[M-H]⁻, 其二级质谱得到 m/z 417.096 9, 357.133 4, 151.039 8 的碎片峰; 保留时间为 13.54 min, 与文献^[10]对比, 推断峰 3 为松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷。

峰 4: 在负离子模式下得到母离子 m/z 187.097 3[M-H]⁻, 其二级质谱得到 m/z 167.082 0, 151.003 2, 125.024 2 的碎片峰; 保留时间为 13.72 min, 与文献^[2]对比, 推断峰 4 为壬二酸。

峰 5: 在负离子模式下得到母离子 m/z 321.040 6[M-H]⁻, 其二级质谱得到 m/z 277.050 5, 259.040 3, 231.044 7 的碎片峰; 保留时间为 14.89 min, 与文献^[9]对比, 推断峰 5 为 daphnogitin 异构体。

峰 6: 在负离子模式下得到母离子 m/z 541.114 3[M-H]⁻, 其二级质谱得到 m/z 447.072 4, 389.103 2, 151.003 7 的碎片峰; 保留时间为 15.21 min, 与文献^[11]对比, 推断峰 6 为薏花醇 A。

峰 7: 在负离子模式下得到母离子 m/z 541.114 0[M-H]⁻, 其二级质谱得到 m/z 447.071 0, 389.102 1, 151.003 3 的碎片峰; 保留时间为 15.84 min, 与文献^[11-12]对比, 推断峰 7 为薏花醇 B。

峰 8: 在负离子模式下得到母离子 m/z 543.129 4[M-H]⁻, 其二级质谱得到 m/z 417.097 7, 283.060 5, 151.003 2, 125.024 1 的碎片峰; 保留时间为 16.04 min, 与文献^[10]对比, 推断峰 8 为 Jiaxiol。

峰 9: 在负离子模式下得到母离子 m/z 543.130 3[M-H]⁻, 其二级质谱得到 m/z 417.098 3,

283.060 9, 151.003 7, 125.024 3 的碎片峰; 保留时间为 16.27 min, 与文献^[10]对比, 推断峰 9 为 Xinranol。

峰 10: 在负离子模式下得到母离子 m/z 543.130 1[M-H]⁻, 其二级质谱得到 m/z 417.097 9, 283.061 0, 151.003 6, 125.024 3 的碎片峰; 保留时间为 16.47 min, 与文献^[10]对比, 推断峰 10 为 Xinranol 异构体。

峰 11: 在负离子模式下得到母离子 m/z 543.129 3[M-H]⁻, 其二级质谱得到 m/z 417.097 3, 283.061 3, 151.003 6, 125.024 1 的碎片峰; 保留时间为 16.87 min, 与文献^[10]对比, 推断峰 11 为 Jiaxiol 异构体。

峰 12: 在负离子模式下得到母离子 m/z 373.129 6[M-H]⁻, 其二级质谱得到 m/z 179.071 0, 164.047 3, 122.036 9 的碎片峰; 保留时间为 17.08 min, 与文献^[13]对比, 推断峰 12 为(-)-nortrachelogenin。

峰 13: 在负离子模式下得到母离子 m/z 541.113 5[M-H]⁻, 其二级质谱得到 m/z 447.072 4, 417.096 4, 189.102 4, 151.003 1, 125.023 9 的碎片峰; 保留时间为 17.34 min, 与文献^[9]对比, 推断峰 13 为狼毒素。

峰 14: 在负离子模式下得到母离子 m/z 541.113 5[M-H]⁻, 其二级质谱得到 m/z 447.070 2, 417.098 0, 389.101 8, 151.003 3, 125.024 0 的碎片峰; 保留时间为 17.53 min, 与文献^[9]对比, 推断峰 14 为狼毒素异构体。

峰 15: 在负离子模式下得到母离子 m/z 271.060 6[M-H]⁻, 其二级质谱得到 m/z 197.807 4, 151.002 9, 125.023 7, 119.049 7 的碎片峰; 保留时间为 19.45 min, 与文献^[10]对比, 推断峰 15 为柚皮素。

峰 16: 在负离子模式下得到母离子 m/z 357.134 2[M-H]⁻, 其二级质谱得到 m/z 342.110 0, 221.081 5, 147.044 7, 137.059 8, 122.036 8 的碎片峰; 保留时间为 20.36 min, 与文献^[10]对比, 推断峰 16 为松脂素。

峰 17: 在负离子模式下得到母离子 m/z 351.050 7[M-H]⁻, 其二级质谱得到 m/z 190.998 1, 163.003 3, 135.008 3 的碎片峰; 保留时间为 21.70 min, 与文献^[14-15]对比, 推断峰 17 为西瑞香素。

表 2 天山假狼毒化学成分 HPLC-Q/TOF-MS/MS 分析

Tab. 2 HPLC-Q/TOF-MS/MS analysis of chemical constituents of *Stelleropsis tianschanica*

峰号	t/min	UV $\lambda_{\max}$ /nm	准分子离子峰	碎片峰[偏差($\times 10^{-6}$)]二级质谱	分子式	偏差($\times 10^{-6}$)	鉴定结果
1	7.32	264	579.193 6	323.098 0, 209.081 4, 194.057 8	C ₂₄ H ₃₆ O ₁₆	1.9	Excelside A
2	12.73	282	321.040 2	277.049 7, 259.039 7, 231.044 5	C ₁₈ H ₁₀ O ₆	0.9	daphnogitin
3	13.54	281	519.187 0	417.096 9, 357.133 4, 151.039 8	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	0.8	松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷
4	13.72	274	187.097 3	167.082 0, 151.003 2, 125.024 2	C ₉ H ₁₆ O ₄	1.6	壬二酸
5	14.89	323	321.040 6	277.050 5, 259.040 3, 231.044 7	C ₁₈ H ₁₀ O ₆	2.2	daphnogitin 异构体
6	15.21	265	541.114 3	447.072 4, 389.103 2, 151.003 7	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀	1.5	堇花醇 A
7	15.84	265	541.114 0	447.071 0, 389.102 1, 151.003 3	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀	0.9	堇花醇 B
8	16.04	283	543.129 4	417.097 7, 283.060 5, 151.003 2, 125.024 1	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₀	0.6	Jiaxiol
9	16.27	283	543.130 3	417.098 3, 283.060 9, 151.0037, 125.024 3	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₀	2.2	Xinranol
10	16.47	283	543.130 1	417.097 9, 283.061 0, 151.003 6, 125.024 3	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₀	1.8	Xinranol 异构体
11	16.87	283	543.129 3	417.097 3, 283.061 3, 151.003 6, 125.024 1	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₀	0.4	Jiaxiol 异构体
12	17.08	281	373.129 6	179.071 0, 164.047 3, 122.036 9	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	2.4	(-)-nortrachelogenin
13	17.34	267	541.113 5	447.072 4, 417.096 4, 189.102 4, 151.003 1, 125.023 9	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀	0.0	狼毒素
14	17.53	269	541.113 5	447.070 2, 417.098 0, 389.101 8, 151.003 3, 125.024 0	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀	0.0	狼毒素异构体
15	19.45	282	271.060 6	197.807 4, 151.002 9, 125.023 7, 119.049 7	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	-0.4	柚皮素
16	20.36	236; 281	357.134 2	342.110 0, 221.081 5, 147.044 7, 137.059 8, 122.036 8	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	1.1	松脂素
17	21.70	324	351.050 7	190.998 1, 163.003 3, 135.008 3	C ₁₉ H ₁₂ O ₇	0.6	西瑞香素

3.6 天山假狼毒炮制前后总离子流图比较

按“3.5”项下方法对天山假狼毒炮制品进行 UPLC-Q/TOF-MS 分析,将炮制前后的总离子流图进行比较分析,炮制后总离子流图见图 3。

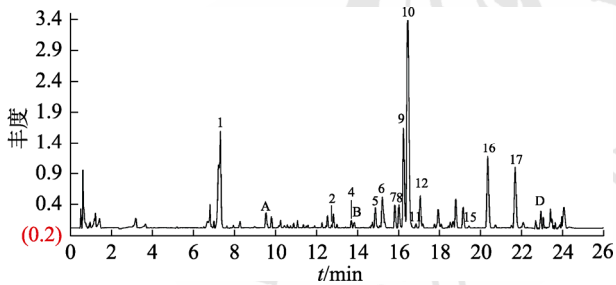


图 3 天山假狼毒炮制后总离子流图
Fig. 3 TIC of *Stelleropsis tianschanica* after processing

比较天山假狼毒生药和炮制品总离子流图,可知生药中 6~9、11 和 B、D 号峰在炮制品中峰面积明显减小;13、14、C 号峰在炮制品总离子流图中未出现;A 号峰相比于生药峰面积增加。

3.7 天山假狼毒生药及炮制品血清药化分析研究

按“3.5”项下方法对含药血清进行 UPLC-Q/TOF-MS 分析。根据供试品溶液各主要色谱峰的保留时间、紫外吸收特征、一级质谱的准分子离子(加合离子)和二级质谱的特征碎片离子信息,对天山假狼毒经口服给予大鼠后,其主要化学成分是否吸收入血进行分析。空白血清及含药血清总离子

流图见图 4~6。

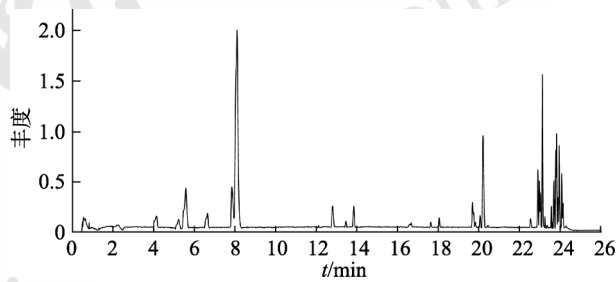


图 4 大鼠空白血清总离子流图
Fig. 4 TIC of rat's blank serum

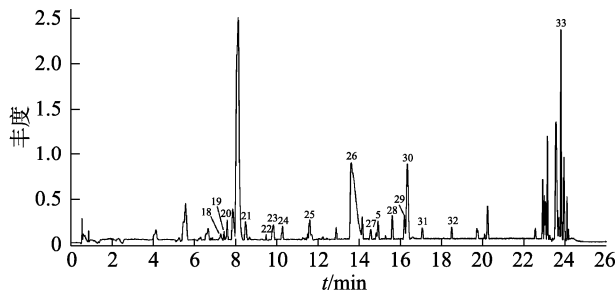


图 5 天山假狼毒生药含药血清总离子流图
Fig. 5 TIC of medicated serum of *Stelleropsis tianschanica* crude drug

3.7.1 天山假狼毒生药血清药化分析 由图 1, 4, 5 比后,可知图 5 中 18~33 号色谱峰为代谢成分或移行成分,5 为入血成分,对应的化合物为 daphnogitin 异构体。

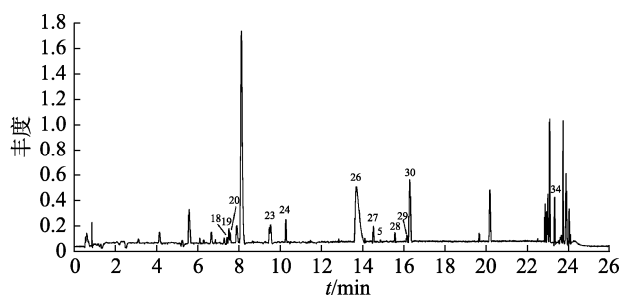


图6 天山假狼毒炮制品含药血清总离子流图

Fig. 6 TIC of processing *Stelleropsis tianschanica* medicated serum

3.7.2 天山假狼毒炮制品血清药化分析 比较分析图3, 4, 6后, 可知图6中18~20、23~24、26~30和34号峰为代谢成分; 5号峰为入血成分, 对应的化合物为daphnogitin异构体; 图5中的21, 22, 25, 31, 32未出现。

4 讨论

炮制是中草药在应用前利用各类方法加工处理的过程, 其主要目的是减轻药材原有毒性, 提高药效^[16]。中药炮制的经验和方法在古今典籍中有大量记载, 但药材炮制前后药效毒性物质基础的变化和炮制机理还亟待明确^[17]。秦昆明等^[18]认为, 中药炮制前后其药性、作用的改变, 可以看作是药材中组分配伍及比重发生变化的过程。

本研究首先对天山假狼毒生药提取物及其炮制品开展急性毒性试验。综合小鼠中毒症状、体质量变化及当天死亡小鼠的解剖结果, 天山假狼毒毒性可能涉及心脏、肺脏、中枢神经、胃肠等器官组织^[3, 19-20], 与文献报道一致^[21-22], 推测其主要毒性物质可能为黄酮类成分^[23]。但由于解剖观察时未出现肉眼可见的明显病变, 且此次试验未对脏器进行组织病理学检查, 无法观察具体组织损伤情况。由实验结果可得, 天山假狼毒生药提取物 $LD_{50}=91.465\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 95% CI为83.929~98.680 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。天山假狼毒炮制品提取物 $LD_{50}=104.900\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 95% CI为95.584~122.774 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (均按生药计)。虽至今未提出公认的毒性分级标准, 但诸多学者认为, 小鼠 $LD_{50}>50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 即可认为是实际无毒^[24-25]。且天山假狼毒经炮制后毒性作用明显降低, 确实达到了降低毒性, 提高用药安全性的作用。

本研究采用UPLC-Q/TOF-MS对天山假狼毒的生药、炮制品及其相应含药血清的成分进行研究。总离子流图测定结果表明, 炮制品中主要成分含量均有不同程度下降, 3个成分经炮制后消失, 且有1个成分炮制后增加。生药含药血清中

的代谢成分或移行成分明显比炮制血清中的多, 且炮制品入血成分的色谱峰明显比生药入血成分的色谱峰小。结合急性毒性试验结果, 提示天山假狼毒炮制减毒作用客观存在, 减毒机制主要是降低了天山假狼毒主要化学成分含量及去除少量化学成分。由于中草药成分的复杂性, 尚有4个成分未鉴别出, 其毒性与药效成分的关系及炮制后去除成分对毒性作用的贡献程度还有待进一步深入研究。

综上, 通过天山假狼毒的急性毒性试验和含药血清成分分析, 首次明确了天山假狼毒的 LD_{50} , 确定天山假狼毒炮制的有效性和必要性。同时, 对天山假狼毒炮制减毒机制的物质基础进行了初步探索, 对进一步研究天山假狼毒炮制机理具有重要意义。农林界已认为天山假狼毒会影响草场生物多样性, 破坏生态^[26-27], 对天山假狼毒的深入研究, 既能控制其生长面积增加, 又能为天山假狼毒的合理利用提供科学理论依据, 具有较强的实际意义。

REFERENCES

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第27卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] SHI L L, MA Y J, GULINAR S, et al. GC-MS analysis the chemical components of volatile oil from the leaf of *Stelleropsis tianschanica* and *Stellera chamaejasme* Linn[J]. J Xinjiang Med Univ(新疆医科大学学报), 2017, 40(1): 82-85, 90.
- [3] 崔乃然. 新疆主要饲用植物志(第二册)[M]. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 1990.
- [4] 江苏新医学院. 中药大辞典-下册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [5] YE Y Y, HAN L, WEI P, et al. Advances on chemical constituents and bioactivities of genus stellera[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40(22): 4324-4332.
- [6] 国家中医药管理局. 中华本草(第5卷)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998.
- [7] YAO C H, WEI H Y, CHEN G, et al. Chemical constituents from the flowers of *Stelleropsis tianschanica*[J]. Chin Med Mat(中药材), 2021, 44(3): 593-597.
- [8] 白丽, 浩特拉·特克斯, 石磊岭, 等. 天山假狼毒提取物体外抗氧化活性的研究[J]. 新疆中医药, 2016, 34(5): 56-57.
- [9] SHI L L, MA G X, YANG J S, et al. Chemical constituents from plant of *Stelleropsis tianschanica*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47(2): 223-226.
- [10] 王芦笛. 基于液质联用技术的瑞香狼毒化学成分及药代动力学研究[D]. 保定: 河北大学, 2017.
- [11] LI J, ZHANG J J, PANG X X, et al. Biflavanones with anti-proliferative activity against eight human solid tumor cell

- lines from *Stellera chamaejasme*[J]. Fitoterapia, 2014(93): 163-167.
- [12] FENG B M, PEI Y H, HAN B. Flavonoids from root of *Stellera chamaejasme*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2001, 32(1): 16-17.
- [13] JANG S W, SUH W S, KIM C S, et al. A new phenolic glycoside from *Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora* twigs[J]. Arch Pharm Res, 2015, 38(11): 1943-1951.
- [14] ZHU Y H, YANG C X. Study on chemical constituents in extraction of *Stellera chamaejasme* L. roots by ethyl acetate[J]. Food Drug(食品与药品), 2013, 15(5): 323-325.
- [15] YANG C X, WEI B, WANG F P, et al. Flavonoids from the roots of *Stellera chamaejasme* L.[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2012, 24(10): 1374-1376, 1428.
- [16] MA C J, WANG X, XIN Y Z, et al. Advances of modern research on processing theory of Chinese materia medica[J]. Chin Tradit Herbal Drugs(中草药), 2018, 49(3): 512-520.
- [17] ZHONG L Y, CUI M N, YANG M, et al. Modern researches on effect of processing of Chinese herb medicine on Chinese medical properties[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44(23): 5109-5113.
- [18] QIN K M, CAO G, YANG B, et al. Research progress of traditional Chinese medicine processing based on component structure theory[J]. Sci Sin: Vitae(中国科学: 生命科学), 2019, 49(2): 129-139.
- [19] LIN M X, RAO C L. Comparative research on acute toxicity and gastrointestinal kinetics of *Zanthoxylum armatum* DC. and its dried products[J]. J Chengdu Univ Chin Med(成都中医药大学学报), 2021, 44(2): 42-48.
- [20] LIU L, YU H L, WANG K L, et al. Effects of toxic fractions of *Euphorbiae Ebracteolatae* Radix on toxicity of mice intestinal tract and colon aquaporins expression level before and after vinegar processing[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43(12): 2516-2521.
- [21] CHANG J J, MO C H, DAI Z Y, et al. Abstration and Toxicity of poisoning composition in *Stellera chamaejasme* L.[J]. Heilongjiang J Animal Sci Vet Med(黑龙江畜牧兽医), 2002(12): 1-2.
- [22] WANG X G, MO C H. Histopathological observations on sheep poisoning of *Stellera chamaejasme*[J]. Prog Vet Med(动物医学进展), 2018, 39(10): 126-129.
- [23] HONG H, DU W F, ZHU W H, et al. Research progress on organ toxicity of traditional Chinese medicine[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2021, 36(2): 943-946.
- [24] WEI X P, BAI L, MIAO M S. Thinking on the grading change of toxic Chinese medicine[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2021, 36(4): 2158-2161.
- [25] ZHANG G P, YE Z G. Toxicity and its grading method of toxic Chinese materia medica[J]. World Chin Med(世界中医药), 2014, 9(2): 175-177.
- [26] CHEN W M, XU L L, CHEN T, et al. Observation on biological characteristics of *stelleropsis tianschanica*[J]. J Weed Sci(杂草学报), 2017, 35(4): 1-7.
- [27] ZHAO D. Chemical constituents from plant of *stelleropsis tianschanica*[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2018.

收稿日期: 2021-08-11
(本文责编: 沈倩)