

闹羊花不同炮制品的“减毒-存效”比较研究

郭小红^{1,2}, 冯靖雯¹, 张小琼², 尤强¹, 陈鸿平¹, 刘友平^{1*}

1. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

2. 重庆市中医院, 重庆 400021

摘要: **目的** 研究古籍记载的闹羊花不同炮制品的毒性和药效的相关性, 确定“减毒-存效”的最佳炮制方法。**方法** 采用分光测色仪、高效液相色谱电雾式检测器法 (HPLC-CAD)、小鼠急性毒性实验、二甲苯致小鼠耳肿胀实验分别对闹羊花生品及不同炮制品的性状 (颜色)、指标性成分含量、毒性、药效进行评价。**结果** 相较于生品, 闹羊花经炮制后饮片颜色由灰黄色变为棕褐色, 指标性成分闹羊花毒素 II、III、V 含量大幅度降低, 3 种毒性成分总量的顺序为生品 (0.340%) > 清蒸 (0.181%) > 酒蒸 (0.178%) > 醋蒸 (0.154%)。小鼠急性毒性实验表明, 闹羊花不同炮制品半数致死量 (median lethal dose, LD₅₀) 的大小顺序为醋蒸 (3.538 g/kg) > 酒蒸 (3.467 g/kg) > 清蒸 (2.725 g/kg) > 生品 (2.172 g/kg), 表明炮制达到了“减毒”的目的。抗炎药效实验表明, 闹羊花炮制前后均能抑制二甲苯致小鼠耳肿胀, 抑制率大小顺序为生品高剂量组 (73.25%) > 生品中剂量组 (58.39%) > 酒蒸高剂量组 (49.63%) > 醋蒸高剂量组 (42.48%) > 清蒸高剂量组 (40.56%), 相较于对照组均有显著性差异 ($P < 0.05, 0.01$), 达到了“存效”的目的。**结论** 闹羊花的多种炮制方法均有“减毒存效”作用, “减毒”以醋制为优, “存效”以酒制为优, 为临床用药提供了依据, 同时建立了毒性中药“外观性状-化学成分-毒性-药效”多元评价模式, 为闹羊花炮制工艺、质量标准、减毒存效机制等研究奠定了理论基础。

关键词: 闹羊花; 炮制; 毒性; 抗炎; 减毒存效

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)05-1411-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.05.022

“Attenuation-preservation effects” of different processed products of *Rhododendri Mollis Flos*

GUO Xiao-hong^{1,2}, FENG Jing-wen¹, ZHANG Xiao-qiong², YOU Qiang¹, CHEN Hong-ping¹, LIU You-ping¹

1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400021, China

Abstract: **Objective** To study the correlation between toxicity and efficacy of different processed *Rhododendri Mollis Flos* according to the ancient processing, in order to define the optimal processing method for “attenuation-preservation effects”. **Methods** The character (color), index content, toxicity, and efficacy of *Rhododendri Mollis Flos* and its processed products were evaluated by spectrophotometer, HPLC-CAD, acute toxicity test in mice, and ear edema method in mice. **Results** It showed that the color of processed slices changed from gray yellow to black brown. The contents of the rhododendrin II, III, and V were significantly reduced, and the sum of the three toxic components was raw (0.340%) > steamed (0.181%) > wine steamed (0.178%) > vinegar steamed (0.154%). The acute toxicity test in mice showed that the order of LD₅₀ was vinegar steamed (3.538 g/kg) > wine steamed (3.467 g/kg) > steamed (2.725 g/kg) > raw (2.172 g/kg). The anti-inflammatory effect test showed that *Rhododendri Mollis Flos* could inhibit the ear swelling in mice induced by xylene before and after processing, inhibition rate was raw high dose group (73.25%) > raw medium dose group (58.39%) > wine steamed high dose group (49.63%) > vinegar steamed high dose group (42.48%) > steamed high dose group (40.56%), achieved the effect of “preservation”. **Conclusion** Various processing methods of *Rhododendri Mollis Flos* have the effect of “attenuation-preservation effects”. Vinegar steamed is the best for “attenuation”, and wine steamed is the best for “preservation”, which provides a basis for clinical drug use. Meanwhile, the combined multi-angle evaluation model of

收稿日期: 2020-08-13

基金项目: 成都中医药大学双一流中药质量保障提升创新科研团队 (030041011); 重庆市自然科学基金面上项目 (cstc2019jcyj-msxmX0552)

作者简介: 郭小红 (1986—), 女, 在读博士, 主管中药师, 从事中药药效物质基础研究。Tel: (023)67063732 E-mail: 472413721@qq.com

*通信作者: 刘友平 (1964—), 女, 博士生导师, 研究员, 从事中药标准化及药效物质基础研究。Tel: (028)61800103 E-mail: liuyouping@126.com

“character-constituent-toxicity-efficacy” was established, which laid a theoretical foundation for the study of processing technology, quality standard and detoxification mechanism.

Key words: *Rhododendri Mollis Flos*; processing; toxicity; anti-inflammatory effect; attenuation-preservation

闹羊花为杜鹃花科杜鹃属植物羊躑躅 *Rhododendron molle* (Blume) G. Don. 的干燥花, 始载于《神农本草经》, 有大毒, 羊食时踴躅而死, 故以此为名^[1]。其具有祛风除湿、散瘀定痛的功效, 自古广泛应用于风湿痹症^[2-3]。但与此同时其“毒性”问题也备受关注。闹羊花毒性剧烈, 安全窗较窄, 有效剂量接近中毒剂量, 导致临床中毒事件屡有发生, 极大地限制了其临床应用及深度开发。因此, 在确保临床药效前提下, 提出有效的减毒策略, 成为目前研究的关键。

中药炮制技术可降低闹羊花毒性。闹羊花在古代多炮制入药, 最早可追溯到东晋《肘后备急方》^[4]: “清酒二斗渍之”“苦酒渍药一宿”, 《本草纲目》^[5]也有记载“贼风走皮中淫淫痛……酒蒸为末”“酒拌蒸一炊久”。然而, 现今无论是国家标准还是地方标准, 均未收录闹羊花炮制品。闹羊花作为《中国药典》2020 年版^[2]10 种“大毒”中药材之一, 是唯一一味无炮制规格的可供内服的“大毒”中药材, 古代炮制方法均未得到较好的传承和发展。《中国民族药炮制经验集成》^[6]收录了闹羊花酒蒸、炒 2 种炮制方法, 并明确其炮制作用为“生品有毒, 蒸、炒可降低毒性”, 然而对其炮制“减毒”作用, 目前尚缺乏科学依据, 亦未见文献报道。

现代研究表明, 闹羊花主要成分为二萜类、黄酮类、三萜类、木脂素类, 其中二萜类成分为该药材特征性成分, 该类成分具有强烈毒性, 同时也是药效成分, 具有双重生理作用, 低剂量表现为抗炎、镇痛、免疫抑制、降血压等药理作用, 高剂量表现为对神经系统、脏器系统、呼吸系统的毒性^[7]。对毒性成分也是药效成分的闹羊花而言, 炮制减毒技术是降低其毒性的主要目的, 但不是唯一目的, 在降低毒性的同时保存较高的疗效才是最终目标^[8]。因此, 本研究以古籍记载的炮制方法为依据“遵古炮制”, 采用“外观性状-化学成分-毒性-药效”多角度评价模式, 分析闹羊花炮制前后及不同炮制品的差异, 以筛选最佳“减毒存效”的辅料及炮制方法, 为后期闹羊花减毒存效机制、炮制工艺、质量标准等研究奠定理论依据, 以期临床提供“低毒高效”的闹羊花炮制品, 保障临床用药安全有效。

1 材料

1.1 仪器

Thermo Ultimate 3000 液相色谱仪、Coron Veo RS 电雾式检测器 (赛默飞世尔科技有限公司); BN3000 型万分之一电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); CP2000 型十万分之一电子天平 (德国 Sartorius 公司); HX-200k 型高速粉碎机 (浙江省永康市溪岸五金药具厂); UPTUO-I-1000TE 优普系列超纯水机 (成都纯水科技有限公司); DHG-9245A 型电热鼓风干燥箱 (上海一恒科技有限公司); SG8200HDT 型超声波清洗器 (上海冠特超声仪器有限公司); Waters C₁₈ 色谱柱 (Symmetry ShieldTM RP₁₈, 250 mm×4.6 mm, 5 μm); CM-5 型分光测色仪 (日本柯尼卡美能达公司); 实验用鼠耳打孔器 (泽雅科教有限公司)。

1.2 试药

闹羊花药材 (批号 20200103) 购自湖北富饶农业药用植物繁育基地, 经成都中医药大学中药资源与鉴定系严铸云教授鉴定为杜鹃花科杜鹃属植物羊躑躅 *R. molle* (Blume) G. Don. 的干燥花。甲醇 (色谱纯, 美国 MTEDIA 有限公司), 甲醇 (分析纯, 成都市科龙化工试剂厂), 实验用水为超纯水, 醋、黄酒购自永辉超市。闹羊花毒素 III 对照品 (批号 11984-201901)、闹羊花毒素 II 对照品 (批号 11983-201901) 购自中国食品药品检定研究院 (质量分数≥98%), 闹羊花毒素 V 对照品 (批号 DS7190922) 购自德思特生物有限公司 (质量分数≥98%)。

1.3 动物

SPF 级昆明种小鼠 356 只, 雌雄各半, 4~6 周龄, 体质量 18~22 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物许可证号 SCXK (湘) 2019-0004。动物饲养温度为 (20.0±0.5) °C, 湿度 (55±5) %。本研究严格按照中华人民共和国科技部《动物实验管理条例》的要求进行。动物实验规程经重庆市中医院动物实验伦理委员会批准 (批准号为 2019KY-GXH)。

2 方法与结果

2.1 闹羊花不同炮制品的制备

根据古籍记载“遵古炮制”, 具体炮制方法见表 1。

表 1 闹羊花生品及其炮制品信息

Table 1 Information of raw product and processed products of *Rhododendri Mollis Flos*

编号	名称	批号	炮制方法
S1	生品	20200103	净制
S2	清蒸炮制品	20200305	取闹羊花 100 g, 喷洒适量蒸馏水使其润透, 置于蒸笼中隔水蒸 0.5 h, 取出, 50 ℃ 烘干, 即得
S3	酒蒸炮制品	20200306	取闹羊花 100 g, 加黄酒 45 g (用适量蒸馏水稀释), 使药材拌匀润透, 置于蒸笼中隔水蒸 0.5 h, 取出, 50 ℃ 烘干, 即得
S4	醋蒸炮制品	20200307	取闹羊花 100 g, 加醋 45 g (用适量蒸馏水稀释), 使药材拌匀润透, 置于蒸笼中隔水蒸 0.5 h, 取出, 50 ℃ 烘干, 即得

2.2 闹羊花生品及不同炮制品颜色比较

2.2.1 肉眼观察 采用相机 (佳能 Canon IXUS285HS) 对不同样品进行拍摄, 见图 1。结果

可见, 闹羊花生品为灰黄色, 经炮制后均变为棕褐色, 生品与炮制品的颜色差别较大, 易区分, 不同炮制品之间的颜色差异不明显。



图 1 闹羊花生品及其炮制品肉眼观察比较

Fig. 1 Comparison of raw product and processed products of *Rhododendri Mollis Flos* by naked eye observation

2.2.2 颜色的测定 采用分光测色仪对闹羊花生品及其炮制品的颜色指标进行测量并记录。测量条件: 光源 D₆₅; 标准观察角度是 10°; 照明口径 Φ30 mm; 照明系统镜面反射。L*代表明亮度, L*越大, 明亮度越大, 反之越小; a*代表红绿色度, +a*为红色方向, 反之则为绿色方向, +a*越大, 则颜色越红, 反之则颜色越绿; b*代表黄蓝色度, +b*为黄色方向, 反之则为蓝色方向, +b*越大, 则颜色越黄, 反之则颜色越蓝^[6]。

取闹羊花生品及不同炮制品, 粉碎, 过 2 号筛, 取适量粉末放入色差仪粉末测试盒测定, 见图 2。结果表明, 闹羊花炮制前后粉末的颜色存在较大差异, 以 L* (亮度值) 变化最大, 其次是 b* (黄度值); 不同炮制品 (S2~S4) 之间颜色无明显差异。

2.3 闹羊花毒素 II、III、V 的含量测定

2.3.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取闹羊花毒素 II、闹羊花毒素 III、闹羊花毒素 V 对照品适量, 加甲醇溶解, 制成质量浓度分别为 860.09、

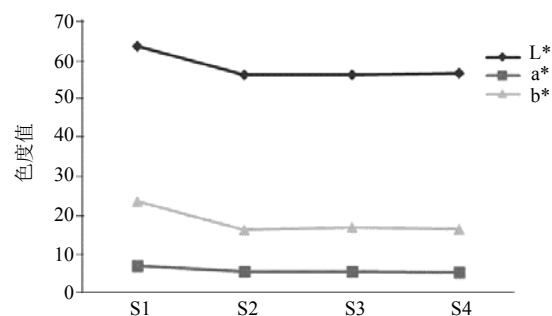


图 2 闹羊花生品及其炮制品颜色测定 (空间法)

Fig. 2 Determination of color of *Rhododendri Mollis Flos* raw product and its processed products (spatial method)

670.06、310.03 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取闹羊花药材粉末 (过 4 号筛) 2.0 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 20 mL, 浸泡 20 min, 称定质量, 超声提取 1 h, 放冷, 再称定质量, 用 80% 甲醇补足, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.3.3 色谱条件 Waters C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6

mm, 5 μ m), 甲醇(A)-流动相水(B)梯度洗脱: 0~10 min, 20%~30% A; 10~30 min, 30%~40% A; 30~50 min, 40%~50% A。体积流量 0.8 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 进样量 20 μ L; 电喷雾检测器以氮气为载气, 雾化温度 35 $^{\circ}$ C, 功能参数 PF (power function) 为 1.0, 采

集频率 10 Hz, 过滤常数 3.6。本实验条件下所测的 3 种成分与相邻色谱峰的分离度均大于 1.5 与其他组分分离完全, 拖尾因子在 0.95~1.05, 理论塔板数大于 6000, 色谱系统适用性实验符合含量测定要求。混合对照品溶液、供试品溶液 (S1~S4) 的色谱图见图 3。

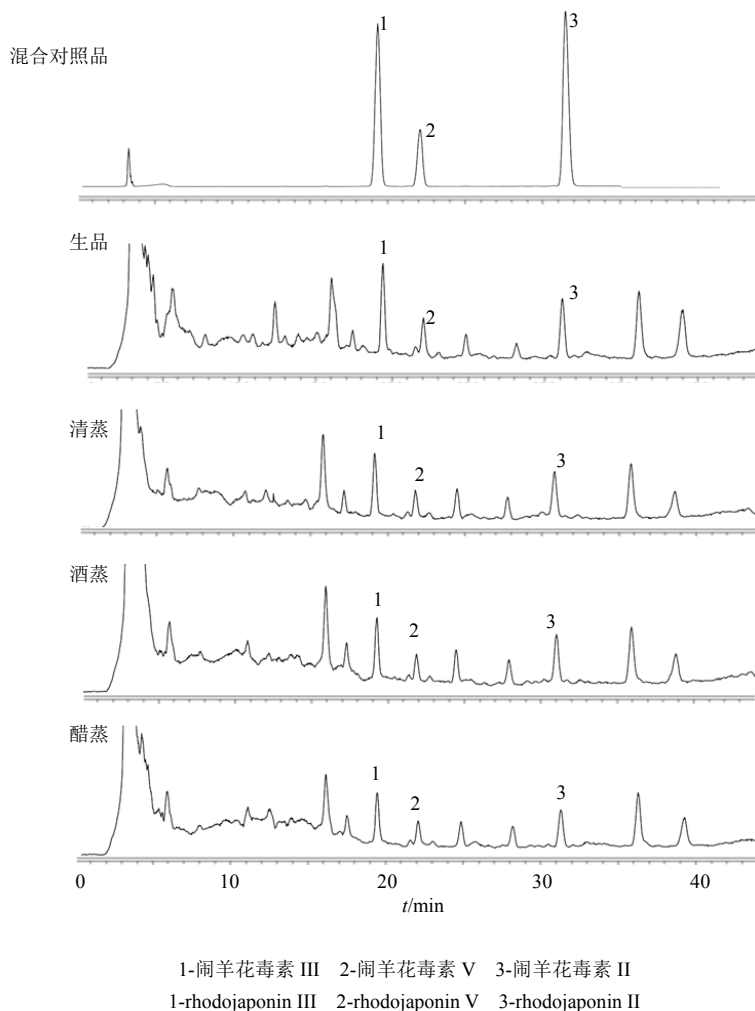


图 3 闹羊花生品及其炮制品的 HPLC-CAD 图谱

Fig. 3 HPLC-CAD chromatograms of raw product and processed products of *Rhododendri Mollis Flos*

2.3.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 0.5、1.0、2.0、2.5、4.0、5.0 mL 分别置 5 mL 量瓶中, 用 80% 甲醇稀释定容至刻度, 摇匀, 即得; 分别精密吸取上述混合对照品溶液各 20 μ L 进样, 测定, 以进样质量浓度 (μ g/mL) 为横坐标 (X), 以峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 结果见表 2, r 均大于 0.999 5, 表明 3 种被测成分在各自线性范围内呈良好线性关系。

2.3.5 方法学考察 取同一批闹羊花的供试品 (S1), 制备供试品溶液, 进样测定, 分别进行精密度试验、重复性试验、稳定性试验, 计算各色谱峰

的相对峰面积与相对保留时间。结果显示各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明方法精密度及重复性良好, 且供试品溶液在 24 h 内稳定, 符合含量测定要求。

2.3.6 样品测定 精密称取闹羊花生品 (S1) 及不同炮制品 (S2~S4), 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 分别精密吸取 20 μ L, 按“2.3.3”项下色谱条件测定, 计算样品含量, 见表 3。结果表明, 经炮制后 3 种成分的含量均有所降低, 总量顺序为生品 (0.340%) > 清蒸 (0.181%) > 酒蒸 (0.178%) > 醋蒸 (0.154%), 其中醋蒸品降低了约 50%。闹羊花

表 2 线性关系考察

Table 2 Linear relationship investigation

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
闹羊花毒素 III	$Y=0.028\ 2\ X+1.335\ 3$	0.999 7	67.006~670.060
闹羊花毒素 V	$Y=0.036\ 6\ X+0.133\ 9$	0.999 8	31.003~310.030
闹羊花毒素 II	$Y=0.03\ X+1.222\ 7$	0.999 5	86.009~860.090

表 3 指标性成分含量测定结果 ($n=3$)

Table 3 Determination results of index components content ($n=3$)

样品	闹羊花毒素 III/%	闹羊花毒素 V/%	闹羊花毒素 II/%	总量/%
生品	0.093	0.178	0.069	0.340
清蒸	0.042	0.103	0.036	0.181
酒蒸	0.040	0.098	0.040	0.178
醋蒸	0.025	0.105	0.024	0.154

毒素 III 以醋蒸品降低最多, 闹羊花毒素 V 以酒蒸品降低最多, 闹羊花毒素 II 以醋蒸品降低最多。

2.4 闹羊花生品及其不同炮制品的急性毒性评价

2.4.1 供试药的制备 分别取闹羊花生品 (S1) 及不同炮制品 (S2~S4) 各 20 g, 加 25 倍量的 60% 乙醇, 加热回流提取 2 次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤液, 50 °C 减压浓缩至 50 mL, 冷藏备用。上述各样品临用前用 CMC-Na 溶液稀释成所需浓度。

2.4.2 急性毒性预试验 参照《中药、天然药物急性毒性研究技术指导原则》^[7] 进行急性毒性实验, 观察各组药物的毒性反应, 测定致死剂量。采用少量动物探索剂量范围, 取小鼠 16 只, 体质量 23~27 g, 雌雄各半, 随机分成闹羊花生品组、清蒸组、酒蒸组、醋蒸组 4 组, 相邻组间剂量比为 0.5, ig 给药, 每次给药容量为 0.02 mL/g, 得出各炮制品的 0~100% 致死量 ($D_n\sim D_m$)。

2.4.3 急性毒性正式实验 根据 D_m (生品为 4.0 g/kg, 炮制品均为 6.0 g/kg) 和 D_n (生品为 1.3 g/kg, 炮制品均为 1.8 g/kg), 每个药物设置 5 个剂量, 相邻组间剂量比为 0.75。取 200 只小鼠, 雌雄各半, 随机分为闹羊花生品组、清蒸组、酒蒸组、醋蒸组, 各组再分为 5 个不同剂量组, 每组 10 只。给药前小鼠禁食不禁水, 次日各组小鼠分别 ig 相应剂量药物, 给药体积为 20 $\mu\text{L/g}$ 。给药后观察每组小鼠的中毒症状、生存状态, 连续观察 14 d, 记录各组小鼠的毒性反应出现时间、死亡时间、死亡数量。

2.4.4 急性毒性结果 从 ig 后 5 min, 各组小鼠均出现不同程度的中毒症状, 表现为出汗、腹泻、口吐白沫、运动不协调、呼吸急促、痉挛、僵直、大

小便失禁等, 抽搐, 直至死亡, 死亡时间集中在给药后 2 h 内。解剖死亡小鼠可见肺部有不同程度水肿, 胃胀、部分肠管充盈, 心肌肥大, 肝脏发黑。根据各组小鼠死亡数计算出死亡率, 见表 4。半数致死量 (median lethal dose, LD_{50}) 是判断中药有无毒性及毒性大小的依据, 毒性与 LD_{50} 呈负相关, 一般认为大毒中药 $LD_{50}<5\text{ g/kg}$, 有毒中药 LD_{50} 介于 5~15 g/kg, 采用 Bliss 法计算 LD_{50} 及 LD_{50} 的 95% 可信限, 见表 5。急性毒性结果表明, 闹羊花经炮制后急性毒性均有所降低, 尤以醋蒸品毒性最低, LD_{50} 的大小顺序为醋蒸>酒蒸>清蒸>生品。

2.5 闹羊花生品及其不同炮制品的抗炎作用评价

2.5.1 分组及给药 取 140 只小鼠, 体质量 28~32 g, 雌雄各半, 随机分为 14 组, 分别为模型组, 阳性对照组 (雷公藤多苷片 120 mg/kg), 闹羊花生品及其炮制品 (清蒸、酒蒸、醋蒸) 的高、中、低剂量 (1200、600、300 mg/kg) 组, 每组 10 只, 各剂量设置参考人的临床给药量及小鼠的 LD_{50} 。各组小鼠 ig 相应剂量的药物, 模型组小鼠 ig 等体积纯水, 给药体积均为 0.2 mL/10 g, 1 次/d, 连续 7 d。

2.5.2 小鼠耳肿胀抑制率的测定 末次给药 60 min 后, 在小鼠单侧耳朵 (右耳) 的前后两面涂抹 30 μL 二甲苯致炎, 干预 30 min 后沿耳廓基线剪下双耳, 用直径 8 mm 的打孔器分别在两耳片同一部位 (沿耳缘) 打孔, 置于天平精密称质量。计算小鼠耳肿胀度、耳肿胀抑制率^[8]。

肿胀度=右耳质量-左耳质量

肿胀抑制率=(模型组肿胀度-给药组肿胀度)/模型组肿胀度

表 4 各组小鼠死亡率比较

Table 4 Comparison of mortality rates of mice in each group

组别	剂量/(g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	死亡数	死亡率 (P)	P ²	组别	剂量/(g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	死亡数	死亡率 (P)	P ²
生品	4.00	10	1.0	1.00	酒蒸	6.00	10	1.0	1.00
	3.00	6	0.6	0.36		4.50	8	0.8	0.64
	2.25	5	0.5	0.35		3.38	5	0.5	0.25
	1.69	4	0.4	0.14		2.53	1	0.1	0.01
	1.27	1	0.1	0.01		1.90	0	0	0
清蒸	6.00	10	1.0	1.00	醋蒸	6.00	9	0.9	0.81
	4.50	7	0.7	0.49		4.50	7	0.7	0.49
	3.38	6	0.6	0.36		3.38	5	0.5	0.25
	2.53	5	0.5	0.25		2.53	2	0.2	0.04
	1.90	1	0.1	0.01		1.90	0	0	0

表 5 LD₅₀测定及毒性分级Table 5 Determination of LD₅₀ and toxicity classification

组别	LD ₅₀ /(g·kg ⁻¹)	95%可信限	毒性分级
生品	2.172	1.749~2.674	大毒
清蒸	2.725	1.963~3.457	大毒
酒蒸	3.467	2.959~3.990	大毒
醋蒸	3.538	2.835~4.287	大毒

2.5.3 抗炎作用结果 闹羊花炮制前后对二甲苯致炎模型小鼠都有很好的抗炎作用,尤以生品抗炎作用最强,抗炎作用强度为生品高剂量组(73.25%)>生品中剂量组(58.39%)>酒蒸高剂量组(49.63%)>醋蒸高剂量组(42.48%)>清蒸高剂量组(40.56%),炮制后抗炎药效均有所降低,但相较模型组,各炮制组高剂量均有明显抗炎作用($P<0.05$ 、 0.01),起到了很好的炮制“存效”目的。结果见表 6。

3 讨论

近年来报道多例闹羊花中毒事件^[9-13],引起社会舆论热点,当务之急是如何在中医药理论指导下降低用药风险,减少毒性事件发生。中药炮制技术可降低闹羊花的毒性,经课题组前期闹羊花炮制历史沿革考证,古代方书中闹羊花多经炮制后入药,所采用的炮制辅料以酒、醋为主流,故本研究选取酒、醋为辅料。本研究在挖掘古籍的基础上,采取“遵古炮制”制备闹羊花的不同炮制品,古籍中关于闹羊花的辅料用量和润药时间的记载不明,只简单提及“拌匀”“拌令湿润”^[14-15],即指适量的辅

表 6 各组小鼠耳肿胀抑制率

Table 6 Inhibitory rates of ear swelling of mice in each group

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肿胀度/mg	肿胀抑制率/%
模型	—	12.45±4.09	—
阳性对照	0.12	5.97±3.44**	52.04
生品	1.20	3.33±0.70**	73.25
	0.60	5.18±2.27**	58.39
	0.30	11.52±4.45	7.46
清蒸	1.20	7.40±3.04*	40.56
	0.60	8.84±2.55*	28.99
	0.30	11.55±3.51	7.22
酒蒸	1.20	6.27±2.33*	49.63
	0.60	9.22±4.01	25.94
	0.30	10.04±3.57	19.35
醋蒸	1.20	7.16±2.74*	42.48
	0.60	10.50±2.36	15.66
	0.30	11.35±5.31	8.83

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

料以拌匀润透为宜。关于闹羊花蒸制时间为“一炊久”，如宋代《集验方》^[16]“如炊一斗米许顷”；《普济方》^[17]“酒拌蒸一炊久”，并一直延续到明代《本草纲目》^[5]“酒拌蒸一炊久”。经考证，古代“一炊久”就是做一顿晚饭所用时间，大致在 0.5~1.0 h。《中国民族药炮制集成》^[6]记载“酒蒸：取闹羊花用酒喷湿后，拌匀，蒸半个小时，取出，晒干”，可见古今描述基本一致。因此，本研究“遵古炮制”：取闹羊花 100 g，辅料用量 45 g 拌匀润透，置于蒸笼中隔水蒸 0.5 h，取出，50 ℃烘干，即得。

据报道二萜类成分是闹羊花的毒效物质，闹羊花毒素 II、III、V 是其二萜类代表性成分^[18-21]，课题组前期采用 HPLC-CAD 法建立了闹羊花中闹羊花毒素 II、III、V 的含量测定方法。本研究在此基础上，采用该方法测定闹羊花生品及其不同炮制品含量差异，结果表明经炮制后毒性指标性成分含量明显降低，但是 3 种炮制品的差异不明显，可见炮制辅料醋、酒对 3 种成分影响较小，成分含量降低的原因可能是受加热过程的影响。参考其他物质基础为萜类的毒性中药炮制机制，芫花经醋制后毒性成分二萜原酸酯类成分发生酯键水解而含量降低^[22]，甘遂经醋制后毒性成分巨大戟二醇型二萜类酯键水解而含量降低^[23]；川楝子中毒性成分三萜类成分炒制加热过程中发生醚环开环或酯键水解反应进一步裂解导致其含量降低^[24]。闹羊花中毒性成分二萜类含量降低也可能发生了化学成分转化，但反应机制有待进一步研究。

采取小鼠急性毒性实验测定致死率和 LD₅₀，探讨减毒效果，结果发现闹羊花炮制后 LD₅₀ 明显升高，表明临床使用安全性提高，达到了“减毒”的目的，尤以醋制为优，这可能跟辅料醋本身药效作用有关。醋，性温，味酸、苦，具有引药入肝、活血止痛、降低毒性、缓和药性的作用，毒性中药大戟、甘遂、芫花等醋制后降低了毒性又缓和了浚泄作用^[25]。闹羊花毒性成分也是主要有效成分，“减毒”的同时更大的“存效”才是炮制的目的，因此进一步采用小鼠耳肿胀实验评价闹羊花炮制的“存效”作用，结果表明闹羊花生品和炮制品均能很好地抑制二甲苯所致小鼠耳肿胀，具有很好的抗炎作用，起到了炮制“存效”目的，尤以酒制为优，可能与辅料酒的协同作用有关。酒，性大热，能宣通血脉、御寒气、行药势，可治疗风湿痹痛，引导药物作用到达治疗部位，用于制药能起到协同作用，增强疗效，

如当归、川芎、白芍、白花蛇舌草等活血化瘀药多酒制^[26]。

综上所述，本研究通过综合分析闹羊花炮制前后的性状、指标性成分、毒性、药效之间的关系，发现闹羊花经炮制后（清蒸、酒蒸、醋蒸）均能达到“减毒存效”的目的，“减毒”效果以醋制为优，“存效（抗炎）”效果以酒制为优，为临床用药炮制品的选择提供了科学依据。同时，本研究构建了以“外观性状-化学成分-毒性-药效”多角度联合评价，为毒性中药饮片新型质量评价模式提供研究思路。本研究仍存在一些不足，毒性成分变化仅选取了 3 个代表性成分进行定量测定，炮制前后全面化学信息有待进一步分析，炮制“减毒存效”机制尚不明确。因此，课题组已展开了闹羊花炮制的物质基础及作用机制的系统研究，以阐释其“炮制减毒”的科学内涵。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 尚志钧校. 神农本草经 [M]. 北京: 学苑出版社, 1998: 356.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 236.
- [3] 薛秋雯, 梁爽. 羊躑躅化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(5): 1350-1360.
- [4] 东晋·葛洪. 肘后备急方 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1956: 487.
- [5] 明·李时珍. 本草纲目 [M]. 昆明: 云南人民出版社, 2014: 557.
- [6] 田华咏. 中国民族药炮制集成 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2000: 306.
- [7] 张枝润. 两种杜鹃花属植物化学成分及质量标准研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2012.
- [8] 王芳静, 杨紫莹, 金传山, 等. 产业化生产中草乌不同炮制品的“减毒-存效”研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(8): 1901-1908.
- [9] 徐淑岗, 杨海东. 闹羊花中毒存在明显个体差异 [J]. 罕少疾病杂志, 2019, 26(3): 109-110.
- [10] 刘春霞. 闹羊花中毒致 II 度窦房传导阻滞 1 例 [J]. 浙江中医杂志, 2012, 47(2): 84.
- [11] 梁天英, 蔡雪美. 1 例血液灌流联合连续静脉血液滤过救治闹羊花中毒患者的护理 [J]. 当代护士: 专科版, 2011(12): 136-137.
- [12] 池锐彬, 刘力新. 血液净化成功救治闹羊花中毒 1 例 [J]. 中国血液净化, 2010, 9(7): 406.
- [13] 杨冬梅. 1 例闹羊花中毒患者的急救护理 [J]. 护理学杂志, 2010, 25(11): 37.

- [14] 宋·王怀隐. 太平圣惠方 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1958: 289.
- [15] 宋·赵佶敕, 编. 郑金生, 汪惟刚, 犬卷太一校点. 圣济总录: 校点本 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 306.
- [16] 北周·姚僧垣撰, 范行准辑, 佚梁峻整理. 集验方 (影印本) [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2019: 413.
- [17] 许叔微. 普济方 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2018: 285.
- [18] 姚禹民, 房鑫, 李俊, 等. 羊躑躅二萜类成分和各极性部位的体内外抗炎活性研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2019, 33(4): 84-88.
- [19] Li Y, Liu Y B, Yu S S. Grayanoids from the Ericaceae family: Structures, biological activities and mechanism of action [J]. *Phytochem Rev*, 2013, 12(2): 305-325.
- [20] Li Y, Zhu Y X, Zhang Z X, *et al.* Antinociceptive grayanane-derived diterpenoids from flowers of *Rhododendron molle* [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(6): 1073-1082.
- [21] Li C H, Zhang J Y, Zhang X Y, *et al.* An overview of grayanane diterpenoids and their biological activities from the Ericaceae family in the last seven years [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 166: 400-416.
- [22] 吴春娥. 芫花不同炮制品中芫花素含量的研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(10): 1054-1055.
- [23] 何美菁. 醋甘遂炮制工艺与醋制减毒增效相关性的研究 [D]. 太原: 山西中医药大学, 2019.
- [24] 崔乃华, 夏林波, 唐爽, 等. 中药川楝子炮制前后总三萜的含量变化研究 [J]. 药学研究, 2019, 38(8): 471-473.
- [25] 彭新, 陈晓辉, 周浩, 等. 中药醋制入肝减毒、增效现代研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(9): 190-194.
- [26] 盛政, 赵焕君, 何紫涵, 等. 酒制升提理论的形成发展和临床应用 [J]. 亚太传统医药, 2020, 16(11): 198-201.

[责任编辑 潘明佳]