

黄草乌炮制前后生物碱含量及心脏毒性差异研究

黎虽宇, 刘小赞, 唐春萍, 陈艳芬, 王丽苹, 温玉莹, 林小中, 杨超燕*, 沈志滨*

广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要:目的 考察黄草乌炮制前后两种生物碱含量变化及其对心脏的毒性影响。方法 采用 UPLC 法测定黄草乌炮制前后滇乌碱、8-去乙酰滇乌碱的含量; 采用 Bliss 法测定黄草乌生品的大鼠半数致死量 (LD₅₀); 连续 ig 给药 14 d, 观察麻醉大鼠 II 导联心电图变化, 检测血清中肌酸激酶 (CK) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 的水平, 观察心肌病理组织形态学变化等。结果 黄草乌炮制前后滇乌碱的含量分别为 263.96 μg/g、未检出, 8-去乙酰滇乌碱的含量分别为未检出、568.47 μg/g; 生品 LD₅₀ 为生药 4.2 g/kg, 炮制品最大给药量为生药 18.0 g/kg; 连续 ig 给药 14 d, 生品组麻醉大鼠先后出现室性早搏、室性二联律和室颤等, 炮制品组前期出现心动过缓, 60 min 恢复正常; 与对照组比较, 生品组血清 LDH 和 CK 水平均显著升高 ($P < 0.05$), 炮制品组只有 LDH 水平显著升高 ($P < 0.05$); 生品组心肌纤维之间间隙明显扩大, 炎细胞浸润明显; 炮制品组心肌纤维排列较整齐, 间质中可见个别炎细胞浸润。结论 在所给的剂量下, 黄草乌生品对心脏毒性较强, 炮制后毒性明显降低。

关键词: 黄草乌; 生物碱; 心脏毒性; 炮制; 滇乌碱; 8-去乙酰滇乌碱

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)23-5588-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.23.016

Study on content of alkaloid and cardiac toxicity before and after preparation of *Aconitum vilmorinianum*

LI Sui-Yu, LIU Xiao-yun, TANG Chun-ping, CHEN Yan-fen, WANG Li-ping, WEN Yu-ying, LIN Xiao-zhong, YANG Chao-yan, SHEN Zhi-bin

School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To investigate the content changes of two alkaloid before and after the processing of *Aconitum vilmorinianum* and its effect on cardiotoxicity. **Methods** The UPLC method was used to determine the content of yunaconitine and 8-acetylacetanarine before and after the processing of *A. vilmorinianum*. The half lethal dose (LD₅₀) of *A. vilmorinianum* to rats was determined by Bliss method. Rats were ig administrated *A. vilmoriniauum* and its processed products for 14 d. The chages of II lead electrocardiogram of anesthetized rats and myocardial morphology were observed, and the serum levels of lactate kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) were detected. **Results** The content of yunaconitine before and after the preparation of *A. vilmorinianum* was 263.96 μg/g and not detected respectively. The content of 8-acetylacetanarine was not detected and 568.47 μg/g respectively. The LD₅₀ of the raw product was crude drug 4.2 g/kg, and the maximum dose of the processed product was crude drug 18.0 g/kg; In the anesthetized rats of the raw group, ventricular premature beats, ventricular bipolar law, and ventricular fibrillation occurred successively. The processed product group showed bradycardia in the early stage and returned to normal in 60 min; Compared with the blank group, the LDH and CK levels in the raw group were significantly increased ($P < 0.05$), and only the LDH level was significantly increased in the processed product group ($P < 0.05$); The gap between myocardial fibers in the raw group was significantly enlarged, and the infiltration of inflammatory cells was obvious. The myocardial fibers of the product group are arranged neatly, and individual inflammatory cells infiltrated in the interstitial. **Conclusion** At the given dose, *A. vilmorinianum* has greater cardiotoxicity, and the toxicity of *A. vilmorinianum* is obviously reduced after processing.

Key words: *Aconitum vilmorinianum* Kom.; alkaloid; cardiotoxicity; processing; yunaconitine; 8-acetylacetanarine

收稿日期: 2018-07-24

基金项目: 国家中医药管理局公益性行业科技专项 (201507004); 广东省应用型科技研发专项 (2015B020234009); 广东药科大学“创新强校工程”资助项目 (2016KZDXM039)

作者简介: 黎虽宇 (1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药提取分离技术与应用。Tel: 13570204750 E-mail: suiyumini@163.com

*通信作者 沈志滨 (1964—), 女, 博士, 教授, 从事中药及复方化学成分研究工作。Tel: (020)39352179 E-mail: szb8113@126.com

杨超燕 (1980—), 女, 硕士, 高级实验师, 从事中药新药开发与研究。Tel: (020)39352180 E-mail: ylc2y@163.com

黄草乌 *Aconitum vilmorinianum* Kom. 为毛茛科 (Ranunculaceae) 乌头属 *aconitum* Kom. 多年生草本植物, 又称草乌、藤草乌、大草乌、昆明堵喇、昆明乌头等, 主要分布于云南中部和北部、四川南部和贵州西部^[1]。其味苦辛麻, 性温, 具有祛风散寒、活血止痛的功效, 临床主要用于医治跌打损伤、风湿关节疼痛、手足厥冷等^[2-3], 目前已收入 2005 年版《云南省药品标准》。乌头类中药材毒性较强, 用药安全范围窄, 主要作用于心脏, 产生异常兴奋, 可致各型心律失常^[4], 大多经炮制后入药。经过炮制, 乌头类中药材中的双酯型乌头碱会水解成毒性较小的单酯型乌头碱^[5], 但与大多数乌头类中药材不同, 黄草乌中主要有效成分及毒性成分为滇乌碱^[6-7], 经过炮制, 滇乌碱会水解成 8-去乙酰滇乌碱^[8], 目前鲜有黄草乌炮制前后滇乌碱和 8-去乙酰滇乌碱含量测定的相关文献报道, 而黄草乌炮制后是否仍具有心脏毒性, 尚未见相关文献报道。本研究通过对黄草乌炮制前后的生物碱含量变化及心脏毒性实验研究, 探讨黄草乌炮制前后对心脏毒性的影响, 为黄草乌临床用药的安全性提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

黄草乌, 购于云南省红河州泸西县, 经广东药科大学中药学院刘基柱副教授鉴定为毛茛科乌头属植物黄草乌 *Aconitum vilmorinianum* Kom. 的干燥块根, 批号 20160705、20160802、20160804; 制黄草乌, 炮制方法为《云南省中药饮片炮制规范》(1986 年) 中的炙草乌“煮蒸炙”法, 批号 20160902、20160910、20160922 (分别对应的生品批号为 20160705、20160802、20160804); 滇乌碱对照品 (质量分数 98.96%, 批号 MUST-17102101)、8-去乙酰滇乌碱对照品 (质量分数 99.21%, 批号 MUST-17112802), 均购自成都曼思特生物科技有限公司; 乙腈为色谱纯, 其他化学试剂均为分析纯。

1.2 动物

SPF 级动物房饲养 SD 大鼠 100 只, 雌雄各半, 日龄 (70~90 d), 体质量 (200±20) g, 由广东省医学实验动物中心提供, 动物许可证号 SCXK (粤) 2013-0002, 质量合格证编号 44007200049984。

1.3 仪器

BL-420 生物信号采集处理系统, 成都泰盟软件有限公司; Waters ACQUITYUPLCH-Class 超高效液相色谱仪 (含 QSM 四元溶剂管理器、SM-FTN

样品管理器、PDA 二极管阵列检测器及 Empower3 工作站, 美国 Waters 公司); XBridgeTMBEHC₁₈ 柱 (100 mm×4.6 mm, 2.5 μm), 美国 Waters 公司; BA310 生物显微镜, 厦门麦克奥迪医疗诊断系统有限公司。

2 方法与结果

2.1 黄草乌生品及炮制品中滇乌碱和 8-去乙酰滇乌碱含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 分别取滇乌碱和 8-去乙酰滇乌碱对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成质量浓度为 0.218 8 mg/mL 的滇乌碱对照品溶液和质量浓度为 0.263 2 mg/mL 的 8-去乙酰滇乌碱对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取黄草乌及制黄草乌粉末 (过 3 号筛) 各 2.0 g, 加入 3 mL 氨水润湿, 精密加入 50 mL 异丙醇-甲醇 (1:1) 混合溶液, 35 °C 超声提取 30 min, 滤过, 精密量取滤液 25 mL, 35 °C 减压回收至干。残渣用甲醇定容至 10 mL, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得^[9]。

2.1.3 色谱条件 色谱柱为 XBridgeTMBEHC₁₈ 柱 (100 mm×4.6 mm, 2.5 μm), 流动相为乙腈-40 mmol/L 磷酸二氢钾 [磷酸调 pH (3.0±0.1)]^[10], 梯度洗脱: 0~5 min, 15%~26% 乙腈; 5~7 min, 26%~35% 乙腈; 7~10 min, 35% 乙腈; 10~12 min, 35%~75% 乙腈; 12~15 min, 75%~15% 乙腈^[10]; 柱温为 35 °C; 体积流量为 0.6 mL/min, 进样量为 10 μL, 检测波长为 260 nm。

2.1.4 检测限考察 分别精密吸取滇乌碱和 8-去乙酰滇乌碱对照品备用液进行倍比稀释后, 在“2.1.3”项下色谱条件进样, 在 $S/N=3$ 的条件下, 测得滇乌碱和 8-去乙酰滇乌碱的质量浓度分别为 0.218 8、0.526 4 μg/mL, 表明滇乌碱和 8-去乙酰滇乌碱的检测限分别为 0.218 8、0.526 4 μg/mL。

2.1.5 线性关系考察 分别精密吸取滇乌碱和 8-去乙酰滇乌碱对照品备用液 2、4、6、8、10 μL, 在“2.1.3”项下色谱条件进样, 测定峰面积, 以峰面积积分值为纵坐标 (Y), 对照品溶液进样量为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 得到滇乌碱和 8-去乙酰滇乌碱的回归方程分别为 $Y=233\ 765 X-41\ 521$ ($r^2=0.999\ 9$), $Y=517\ 224 X-4\ 650.1$ ($r^2=0.999\ 9$)。

2.1.6 精密度考察 分别取黄草乌 (批号 20160705) 同一供试品溶液、制黄草乌 (批号 20160902) 同一供试品溶液, 在“2.1.3”项下色谱

条件各连续进样 6 次,测得滇乌碱和 8-去乙酰滇乌碱峰面积 RSD 分别为 0.20%和 0.45%,表明仪器精密度良好。

2.1.7 重复性考察 分别精密称取黄草乌(批号 20160705)和制黄草乌(批号 20160902)各 2.0 g,各平行 6 份样品,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1.3”项下色谱条件进样测定,结果滇乌碱和 8-去乙酰滇乌碱的质量分数的 RSD 分别为 1.35%和 0.83%,表明方法重复性良好。

2.1.8 稳定性考察 分别精密称取黄草乌(批号 20160705)和制黄草乌(批号 20160902)各 2.0 g,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1.3”项下色谱条件分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样,进样体积 10 μ L,以峰面积计算,测得滇乌碱和 8-去乙酰滇乌碱峰面积 RSD 分别为 0.51%和 0.30%,表明样品在 24 h 内稳定。

2.1.9 加样回收率考察 精密称取黄草乌(批号

20160705)和制黄草乌(批号 20160902)各约 1.0 g,分别平行 6 份样品,黄草乌供试品中精密加入滇乌碱对照品 262.56 μ g,制黄草乌供试品中精密加入 8-去乙酰滇乌碱对照品 460.6 μ g,按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1.3”项下色谱条件测定滇乌碱和 8-去乙酰滇乌碱峰面积,计算平均回收率,结果滇乌碱和 8-去乙酰滇乌碱平均加样回收率分别为 99.26%和 97.39%,RSD 分别为 2.32%和 3.49%。

2.1.10 样品测定结果 分别精密称取黄草乌和制黄草乌粉末各 2.0 g,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1.3”项下色谱条件进样,分别测定 3 批黄草乌和制黄草乌中的滇乌碱和 8-去乙酰滇乌碱,色谱图见图 1,测定结果见表 1。UPLC 法测定黄草乌中的滇乌碱质量分数平均值为 263.96 μ g/g,8-去乙酰滇乌碱低于检测限;制黄草乌中 8-去乙酰滇乌碱的质量分数平均值为 568.47 μ g/g,滇乌碱低于检测限。

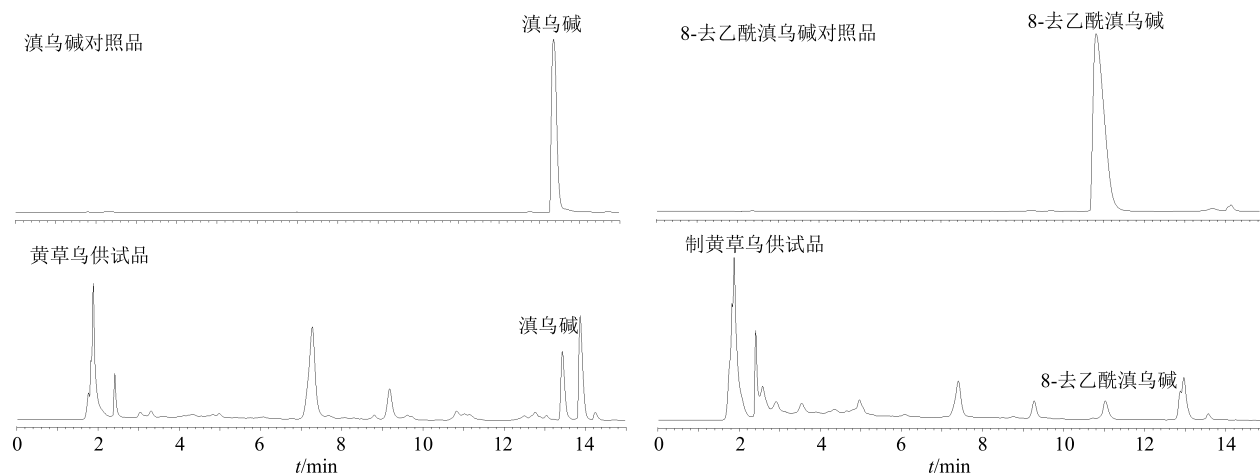


图 1 黄草乌生品及炮制品的 UPLC 图

Fig 1 UPLC of *A. vilmorinianum* and its preparation

表 1 黄草乌中滇乌碱及制黄草乌中 8-去乙酰滇乌碱测定结果 ($n = 6$)

Table 1 Determination of yunnanconitine and 8-deacetylyunnanconitine in raw products ($n = 6$)

样品	批号	滇乌碱/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	样品	批号	8-去乙酰滇乌碱/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
黄草乌	20160705	237.58	制黄草乌	20160902	550.53
	20160802	250.76		20160910	574.25
	20160804	303.55		20160922	580.65

2.2 统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计软件 SPSS 21.0 进行单因素方差分析。

2.3 黄草乌和制黄草乌的制备

分别取黄草乌和制黄草乌粉末(过 3 号筛)20 g,

加入 20 mL 0.5%CMC-Na 溶解,备用。

2.4 急性毒性实验

2.4.1 急性毒性预试验 取禁食 12 h 大鼠,按体重随机分为 3 组,分别为对照组、黄草乌组和制黄草乌组,每组 3 只,雌雄兼用。药物组按 10 mL/kg

ig 给药 1 次, 对照组 ig 等体积的生理盐水。根据大鼠死亡情况调整给药浓度, 分别找出各样品最小全致死量 (Dm) 及最小全活量 (Dn) 和相应的剂量组间距 (r) 值。若经最大给药体积和最大给药浓度 ig 给药后, 大鼠仍无死亡, 则进行最大耐受量 (MTD) 或最大给药量测定^[11]。

2.4.2 急性毒性正式实验 ①最大给药量测定: 预试验结果表明, 制黄草乌的毒性较小, 无法测定大鼠的半数致死量 (LD₅₀) 和 MTD, 故进行最大给药量测定。取大鼠 12 只, 雌雄各半, 在预试验的基础上确定给药剂量范围。上、下午各 ig 给予制黄草乌 (生药 24 g/kg) 1 次, 记录大鼠精神状态以及毒性反应情况。②半数致死量测定: 预试验结果表明, 黄草乌的 Dn 和 Dm 分别为生药 2.2 g/kg 和 7.64 g/kg。取大鼠 50 只, 按体质量和性别随机分组, 每组 10 只。依据预试验结果, 将黄草乌按 r 值为 1:0.74 分为 5 个剂量组 (生药 2.30、3.10、4.20、5.68、7.64 g/kg), 各组均 ig 给药, 观察大鼠毒性反应的征状, 统计大鼠死亡率, 采用 Bliss 法计算 LD₅₀ 以及 LD₅₀ 的 95% 可信限。

2.4.3 急性毒性实验结果 给药 8 min 后, 制黄草乌组大鼠出现不同程度活动量减少、呼吸减慢, 运动不协调症状, 制黄草乌在最大给药剂量下并未出现动物死亡情况, 最大给药剂量为生药 24.0 g/kg。

给药 3 min 后, 黄草乌组大鼠均开始出现不同程度的出汗、腹泻、运动不协调症状; 给药 7 min 后出现腹式呼吸、痉挛、抽搐, 直至死亡。黄草乌生药 2.30、3.10、4.20、5.68、7.64 g/kg 各组的大鼠死亡数分别为 0、3、5、8、9, 通过 Bliss 法计算黄

草乌的 LD₅₀ 为生药 4.20 g/kg, 其 LD₅₀ 的 95% 可信限为生药 3.51~5.09 g/kg。

2.5 黄草乌炮制前后对大鼠心脏毒性的影响

2.5.1 黄草乌炮制前后对大鼠心电图的影响 取大鼠 36 只, 雌雄各半, 按体质量随机分为 3 组: 对照组、黄草乌组 (生药 0.21 g/kg) 和制黄草乌组 (生药 0.21 g/kg), 给药剂量依据为 1/20 LD₅₀, 给药体积为 10 mL/kg, 每组 12 只。大鼠每天 ig 给药 1 次, 连续给药 14 d, 末次给药 1 h 后, ip 10% 水合氯醛 (3 mL/kg) 进行麻醉, 数分钟后, 动物仰面固定, 使用生物信号采集系统, 正向电极插入右上肢, 负向电极插入左下肢, 底线接右下肢, 记录各组大鼠不同时间点 (15、30、45、60 min) II 导联心电图, 记录 P 波、T 波、QT 间期、PR 间期、QRS 间期和心率变化情况^[12], QT 间期受心率影响, 因此分析时需要用心率校正为 QTc 间期, 选择使用 Bazett 公式 $QTc = QT/RR^{1/2}$ 校正 QT 间期, RR 为标准化的心率值, 根据 60 除以心率得到。

黄草乌连续给药 14 d, 观察各组麻醉大鼠 15、30、45、60 min II 导联心电图变化。与对照组相比, 黄草乌组 P 波幅度显著升高 ($P < 0.05$), T 波幅度显著性降低 ($P < 0.05$), QRS 波时间在 30 min 和 45 min 显著延长 ($P < 0.05$), QTc 间期显著减小 ($P < 0.05$), 心率明显减慢 ($P < 0.01$); 制黄草乌组各项指标均无明显差异 ($P > 0.05$); 与制黄草乌组相比, 黄草乌组 P 波幅度显著升高 ($P < 0.05$), T 波幅度显著降低 ($P < 0.05$), QRS 波时间在 30 min 和 45 min 显著延长 ($P < 0.05$), QTc 间期显著减小 ($P < 0.05$), 心率明显减慢 ($P < 0.01$)。结果见表 2~5。

表 2 各组大鼠 15 min 心电图 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 ECG (15 min) of three groups of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	P 波幅度/mV	T 波幅度/mV	QRS 间期/ms	PR 间期/ms	QT 间期/ms	心率/(次·min ⁻¹)	QTC 间期/ms
对照	0.065±0.016	0.145±0.026	14.792±1.549	46.637±6.106	63.051±6.736	437.11±21.75	166.96±7.26
黄草乌	0.096±0.025 ^{*#}	0.092±0.056 ^{*#}	16.131±3.274	49.881±10.146	66.271±8.670	343.62±31.49 ^{***}	158.06±5.14 ^{***}
制黄草乌	0.083±0.031	0.141±0.046	14.719±2.361	49.408±3.715	64.280±3.135	419.25±35.05	169.93±3.93

与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与制黄草乌组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$, 下同

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs *A. vilmorinianum* preparation group, same as below

表 3 各组大鼠 30 min 心电图 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 ECG (30 min) of three groups of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	P 波幅度/mV	T 波幅度/mV	QRS 间期/ms	PR 间期/ms	QT 间期/ms	心率/(次·min ⁻¹)	QTC 间期/ms
对照	0.064±0.017	0.145±0.026	14.331±1.953	50.604±5.962	61.628±6.449	443.50±26.40	170.78±6.16
黄草乌	0.097±0.036 ^{*#}	0.092±0.055 ^{*#}	17.347±1.559 ^{***}	52.143±4.383	67.021±6.713 [*]	325.89±28.08 ^{***}	159.14±4.95 ^{***}
制黄草乌	0.067±0.019	0.141±0.046	15.467±1.180	51.200±4.530	62.356±2.300	433.75±37.67	167.84±3.40

表 4 各组大鼠 45 min 心电图 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 ECG (45 min) of three groups of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	P 波幅度/mV	T 波幅度/mV	QRS 间期/ms	PR 间期/ms	QT 间期/ms	心率/(次·min ⁻¹)	QTC 间期/ms
对照	0.065±0.017	0.151±0.028	15.285±1.904	49.667±5.206	62.981±5.824	435.90±34.61	170.03±3.50
黄草乌	0.104±0.035 ^{***}	0.105±0.053 ^{*#}	17.929±2.281 ^{**#}	51.917±2.244	68.958±6.519 ^{***}	319.33±21.04 ^{**#}	156.19±6.78 ^{*#}
制黄草乌	0.054±0.029	0.127±0.051	15.644±1.719	52.442±2.849	61.205±3.949	445.29±22.49	167.06±7.77

表 5 各组大鼠 60 min 心电图 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 5 ECG (60 min) of three groups of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	P 波幅度/mV	T 波幅度/mV	QRS 间期/ms	PR 间期/ms	QT 间期/ms	心率/(次·min ⁻¹)	QTC 间期/ms
对照	0.064±0.02	0.131±0.024	16.049±1.705	49.276±9.525	63.909±3.207	431.63±34.29	172.81±3.09
黄草乌	0.093±0.033 ^{*#}	0.098±0.034 ^{***}	16.250±1.276	49.933±4.567	65.988±4.906	308.44±21.49 ^{***}	153.29±8.69 ^{***}
制黄草乌	0.060±0.019	0.143±0.042	15.125±1.363	51.817±6.762	65.090±3.453	430.71±32.52	176.02±4.14

2.5.2 黄草乌炮制前后对大鼠血清生化指标和心脏指数的影响 按“2.5.1”方法分组给药, 末次给药 1 h 后, 大鼠麻醉后经腹主动脉采血, 分离血清(4℃, 3 000 r/min, 离心 10 min), 全自动生化分析仪检测血清中肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH 水平), 并立即取出心脏, 用冷生理盐水冲洗心脏表面的血污, 滤纸吸干表面水分, 称量心脏湿质量, 计算心脏指数(心脏指数=心脏质量/体质量)^[13]。

大鼠连续给药 14 d 后, 与对照组相比, 黄草乌组大鼠血清 CK 和 LDH 水平均明显升高($P<0.05$), 制黄草乌组大鼠血清 LDH 和 CK 水平虽有上升趋势, 但只有 LDH 水平差异显著($P<0.05$); 与制黄草乌组相比, 黄草乌组大鼠血清的 CK 和 LDH 水平明显升高($P<0.05$); 与对照组相比, 黄草乌组和

制黄草乌组大鼠心脏指数差异均不显著($P>0.05$)。结果见表 6。

2.5.3 黄草乌炮制前后对心脏病理组织形态学的影响 取部分心脏组织, 用 4%中性甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片(5 μm), HE 染色, 生物显微镜下观察^[14]。结果可见, 对照组大鼠心肌纤维排列整齐, 紧密, 肌丝粗细均匀, 间质个别小血管充血, 未见炎细胞浸润; 黄草乌组大鼠心肌纤维排列紊乱, 心肌纤维之间间隙明显增宽, 肌丝粗细不等, 肌浆融合, 部分区域肌纤维溶解、萎缩, 间质血管扩张, 充血伴少量出血, 并见散在炎细胞浸润; 制黄草乌组大鼠心肌纤维排列较整齐, 心肌纤维间隙和肌丝粗细较均匀, 间质小血管充血, 仅见个别炎细胞浸润。结果见图 2。

表 6 黄草乌炮制前后对大鼠血清生化指标和心脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 6 Effects of *A. vilmorinianum* on serum biochemical parameters and cardiac index in rats before and after processing ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	CK/(U·L ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)	心脏指数/%
对照	832.70±534.49	570.91±147.71	0.313±0.029
黄草乌	2 708.00±501.95 ^{***}	1 150.00±333.94 ^{**#}	0.351±0.043
制黄草乌	1 064.89±486.40	841.33±237.46 [*]	0.336±0.010

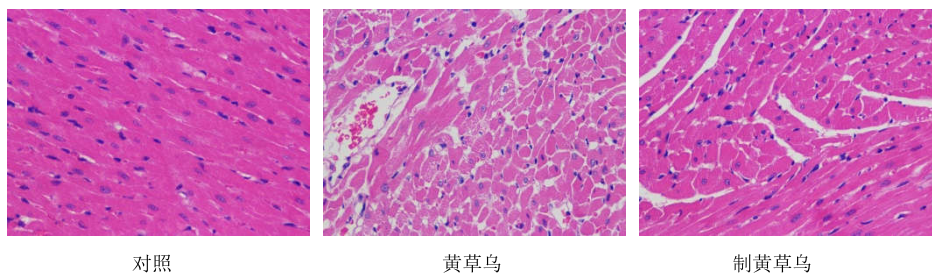


图 2 各组大鼠心肌组织病理观察结果 (HE 染色, ×400)

Fig. 2 Pathological observation of myocardial tissue in each group (HE staining, ×400)

3 讨论

目前对黄草乌的化学成分和心脏毒性作用方面的研究还不够深入,黄草乌炮制前后生物碱的含量变化及其对心脏毒性的影响均未阐明,这些都影响了黄草乌的临床用药安全。现代毒理学研究表明8-去乙酰基滇乌碱比滇乌碱的急性毒性小^[15]。含量测定结果表明,生品中的滇乌碱含量为263.96 μg/g,8-去乙酰基滇乌碱未检出,炮制品中的8-去乙酰基滇乌碱含量为568.47 μg/g,滇乌碱未检出。经过炮制后,黄草乌滇乌碱含量降低,8-去乙酰基滇乌碱含量升高,因此推测黄草乌炮制后毒性降低可能与黄草乌炮制前后成分变化有关。

临床上的心脏毒性评价主要有功能学和形态学两方面。功能学主要有心电图,心电向量图、心阻抗血流图等,形态学主要包括心肌组织形态学及心肌细胞超微结构观察^[16]。本研究从心电图,CK,LDH血清水平及心肌组织病理切片3个方面来观察黄草乌炮制前后连续给药14 d对大鼠心脏毒性的影响。实验结果显示,末次给药1 h后连续观察60 min,在相同剂量情况下,与对照组相比,生品组心电图心率明显下降,先后出现室性早搏、室性二联律和室颤等心律失常现象,炮制品组心率无显著性差异,生品组血清CK和LDH水平均高于对照组和炮制品组,炮制品组只有LDH水平高于对照组($P<0.05$),同时,心肌组织病理形态学结果显示,生品组有明显病理改变,部分区域肌纤维溶解、萎缩,间质血管扩张,并见散在炎细胞浸润,炮制品组未见明显的心肌损伤病理改变,以上结果表明生品的心脏毒性较大,经过炮制,黄草乌滇乌碱含量降低,8-去乙酰基滇乌碱含量升高,黄草乌炮制前后的心脏毒性变化可能与滇乌碱及8-去乙酰基滇乌碱的含量变化有关。

乌头类药物中毒事件时有发生^[17],本研究通过对黄草乌炮制前后的生物碱含量测定和心脏毒性效应的实验研究,发现炮制对黄草乌具有减毒作用,本研究对黄草乌临床安全用药具有一定参考价值。

参考文献

- [1] 王文采. 中国植物志 (第27卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] 吴征镒, 周太炎, 肖培根. 新华本草纲要 (第一册)

[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983.

- [3] Li M, He J, Jiang L L, et al. The anti-arthritis effects of *Aconitum vilmorinianum*, a folk herbal medicine in Southwestern China [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 147(1/2): 122-127.
- [4] 汪星, 孙卫, 张铁军. 乌头类有毒中药配伍减毒增效的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18): 327-331.
- [5] 邓广海. 川乌、草乌炮制工艺及指纹图谱的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.
- [6] Lai C K, Poon W T, Chan Y W. Hidden aconite poisoning, identification of Yunaconitine and related Aconitum alkaloids in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Anal Toxicol*, 2006, 30(7): 426-433.
- [7] Kawing C K, Paklam C S, Ng S W, et al. Measurement of yunaconitine and crassicauline A in small-volume blood serum samples by LC-MS/MS, tracing of aconite poisoning in clinical diagnosis [J]. *Talanta*, 2012, 97: 491-497.
- [8] 郭志俊. 基于物质基础的制黄草乌质量标准研究 [D]. 昆明: 云南中医学院, 2015.
- [9] 徐怡, 秦波, 曹红云, 等. HPLC法同时测定黄草乌中滇乌碱和草乌甲素的含量 [J]. 云南中医中药杂志, 2017, 38(9): 70-72.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [11] 刘帅, 刘晓艳, 李妍, 等. 草乌及其炮制品的急性毒性实验研究 [J]. 中国药物警戒, 2015, 12(9): 513-516.
- [12] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 [M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [13] 刘萍, 黄川锋, 李玲, 等. 附子配伍贝母对大鼠心、肝、肾脏毒性的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7): 1801-1803.
- [14] 黄海, 高鑫, 周颖, 等. 朱砂与万氏牛黄清心丸致大鼠亚急性肝毒性的比较研究 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1825-1828.
- [15] 郭志俊, 段小花, 陈翠玲, 等. 制黄草乌中滇乌碱及其转化产物8-去乙酰基滇乌头碱药效和毒性的初步研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(10): 60-63.
- [16] 谢晓芳. 附子心脏毒作用机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.
- [17] Chan T Y. Causes and prevention of herb-induced aconite poisonings in Asia [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2011, 30(12): 2023-2026.