

苦豆子不同提取物对小鼠急性毒性的“谱-毒”关系研究

刘学楠, 贾娅倩, 华永丽*, 张晓松, 纪鹏, 姚万玲, 魏彦明*

甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070

摘要: 目的 建立苦豆子提取物 HPLC 化学指纹图谱, 测定苦豆子在不同提取物对小鼠的半数致死量 (LD₅₀), 分析其“谱-毒”关系。方法 采用 75%乙醇回流法 (ER)、水煎煮法 (WD)、75%乙醇超声法 (EU) 和水超声法 (WU) 分别制备苦豆子提取物, 并建立其 HPLC 指纹图谱, 测定不同提取物的 LD₅₀; 运用指纹图谱相似度评价系统软件分析不同提取方法下苦豆子提取物化学成分与 LD₅₀ 之间的关系。结果 ER、WD、EU、WU 4 种提取方法制备的苦豆子提取物 LD₅₀ 分别为 38.397、24.994、18.536、19.957 g/kg; 苦豆子提取物对小鼠脏器的眼观病变主要表现在肝、肾, 其中以 ER 提取物毒性最大。苦豆子提取物 HPLC 10 个共有峰可分为 2 类, 第 4、10 号峰及氧化苦参碱、氧化槐果碱与 LD₅₀ 呈显著负相关。结论 构建了苦豆子“谱-毒”关系分析方法, 其未鉴定出的第 4、10 号峰及氧化苦参碱和氧化槐果碱为毒性反应的主要化学成分。

关键词: 苦豆子; 急性毒性; 半数致死量; 提取方法; 指纹图谱; 氧化苦参碱; 氧化槐果碱; 槐定碱

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)11-2656-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.023

“spectral toxicity” relationship of acute toxicity of *Sophora alopecuroides* extracted by different extraction methods to mice

LIU Xue-nan, JIA Ya-qian, HUA Yong-li, ZHANG Xiao-song, JI Peng, YAO Wan-ling, WEI Yan-ming

College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Objective To establish the chemical fingerprint of *Sophora alopecuroides* extracts based on high performance liquid chromatography (HPLC), and determine the LD₅₀ of different extracts of *S. alopecuroides* to analyze its “spectrum toxicity” relationship. **Methods** A series of extracts were prepared by 75% ethanol reflux (ER), water decoction (WD), 75% ethanol ultrasound (EU) and water ultrasound (WU), and their fingerprints were established to determine the acute toxicity LD₅₀ of different extracts. The relationship between chemical composition and acute toxicity LD₅₀ of *S. alopecuroides* extracts were studied by means of fingerprint similarity evaluation system. **Results** The LD₅₀ of ER, WD, EU, and WU extracts were 38.397, 24.994, 18.536, and 19.957 g/kg, respectively. The ocular lesions of mice viscera were mainly manifested in liver and kidney, and the toxicity of ER extracts was the greatest. The 10 common peaks of *S. alopecuroides* extracts can be divided into two categories; Peaks 4 and 10, oxymatrine and sophocarpidine were negatively correlated with acute toxicity LD₅₀. **Conclusion** The spectral toxicity relationship analysis method of *S. alopecuroides* was constructed. The unidentified peaks 4, 10 and oxymatrine and sophocarpidine were the main chemical components of the toxicity reaction, which laid a good foundation for clinical application and scientific and rational development of *S. alopecuroides*.

Key words: *Sophora alopecuroides* L.; acute toxicity; LD₅₀; extraction method; fingerprint; oxymatrine; sophocarpidine; sophoridine

苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 是豆科槐属多年生草本植物^[1], 主要分布在我国甘肃、宁夏、新疆等西北省区^[2]。其味苦性寒, 具有清热解毒、祛风燥湿、杀虫止痛等功效^[3]。苦豆子中含有多种

化学成分, 主要有生物碱、黄酮、多糖等^[4]。其中生物碱类所占的比例最高, 已经分离鉴定出生物碱达 20 多种, 包括槐定碱、槐果碱、苦参碱、异槐果碱、野啶碱和槐胺碱等^[5]。药理学研究表明苦豆

收稿日期: 2019-03-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31560709); 国家自然科学基金项目 (31472234); 国家肉牛/牦牛产业技术体系 (CARS-37); 甘肃农业大学科技创新基金 (青年导师扶持基金) (GAU-QDFC-2018-08)

作者简介: 刘学楠 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中兽医学及中药药理学研究。E-mail: 714656683@qq.com

***通信作者** 魏彦明, 教授, 博士生导师。E-mail: weiyam@gsau.edu.cn

华永丽, 女, 副教授。E-mail: huayongli2004@163.com

子生物碱具有镇静、抗惊厥^[6]、抗炎、抗心律失常、抗菌、抗病毒^[7-8]等作用。但同时也发现苦豆子有毒,不可过量服用^[9]。不同的炮制方法对苦豆子的毒性也有一定的影响^[10]。为科学评价苦豆子毒性,本研究通过不同方法制备苦豆子提取物,建立 HPLC 化学指纹图谱,对苦豆子提取物进行毒性评价,并采用相关性分析其化学成分与毒性之间的关系,从而为分析各化学成分毒性作用机制奠定基础,为苦豆子临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 实验动物

昆明种小鼠,清洁级,4~6 周龄,购自兰州兽医研究所,合格证号 SCXK(甘)2015-0001,雌雄各半,控制温度在 20℃ 环境中适应 3 d。

1.2 药材与试剂

苦豆子采自甘肃武威地区,经甘肃农业大学动物医学院中兽医学教研室魏彦明教授鉴定为豆科植物苦豆子 *Sophora alopecuroides* L.。

无水乙醇(分析纯)、甲醛(分析纯),天津市大茂化学试剂厂;乙腈(色谱纯,默克股份两合公司);氯化钠(分析纯),四川科伦药业股份有限公司;磷酸二氢钾(分析纯),上海展云化工有限公司;水为高纯水;对照品槐定碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱、苦参碱、槐果碱由南京源生物科技有限公司所提供,批号分别为 6882-68-4、16837-52-8、26904-64-3、519-02-8、145572-44-7,质量分数均≥98%。

1.3 仪器

RE-6000 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);ZHT-I 型自动恒温电热套(山东省鄄城县永兴仪器厂);手提式分压力蒸汽灭菌器(宁波甬安医疗器械制造有限公司);RM2235 切片机(德国 Leica 公司);HH-S 恒温水浴锅(金坛市恒丰仪器厂);真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);AL104 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);电子天平(上海衡际科学仪器有限公司);Agilent1260 型高效液相色谱仪、Agilent Zorbax SB C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),美国安捷伦公司。

2 方法

2.1 急性毒性实验

2.1.1 样品制备 样品粉碎后过 40 目筛。分别称取 40 g 苦豆子按以下 4 种方法提取:①75%乙醇回流提取(ER),加醇量为 10 倍。②采用水煎煮提取

(WD),加水量为 10 倍。③④均浸泡 1 h,加热煎煮 2 h,滤过。③采用 75%乙醇超声提取(EU),加醇量为 10 倍,浸泡 1 h,超声提取 40 min,滤过,收集滤液。④采用水超声提取(WU),加水量为 10 倍,浸泡 1 h,超声提取 40 min,滤过,收集滤液。将 4 组滤液分别浓缩后定容至 1 g/mL,冷藏,备用。

2.1.2 分组及给药 以 WD 和 ER 提取物进行预试验,每种提取物设置 4 个剂量,每个剂量小鼠各 8 只。ER 提取物剂量分别 14.4、19.2、21.6、28.8 g/kg。WD 提取物剂量分别为 14、21、32、48 g/kg。根据预试验小鼠死亡剂量设置不同提取方法提取物的剂量。正式实验每剂量 10 只小鼠,雌、雄各半,ig 给药,另设对照组,对照组 ig 等体积生理盐水,各组小鼠于相同条件饲养。

2.1.3 形态观察 连续观察 7 d,每天不少于 5 次,每次给药前后检查所有小鼠的行为和状态。观察并记录小鼠的皮毛、皮肤、黏膜、运动姿势、中枢神经系统和死亡率。每天记录 1 次体质量。实验结束时,用水合氯醛麻醉小鼠,采集肝、肺、心、脾、肾,计算这些器官的脏器指数(脏器指数=脏器质量/体质量)。

2.1.4 组织学检查 实验结束后,小鼠颈椎脱臼处死,立刻解剖取各脏器称量并取各组肝肾组织浸于 10%福尔马林缓冲液(pH 7.4)固定,乙醇中脱水,石蜡包埋,苏木精-伊红染色(HE),显微镜观察。

2.1.5 统计方法 数据采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组之间的差异比较进行单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。脏器指数采用单因素样本间的多重比较(LSD)。

2.2 不同提取方法苦豆子提取物 HPLC 指纹图谱建立

2.2.1 混合对照品溶液制备 精密称取槐果碱、氧化槐果碱、苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱各 5 mg,分别加流动相溶解定容至 10 mL。将上述对照品溶液按 1:1:1:1:1 混合,即为混合对照品溶液。混合对照品溶液中槐果碱、氧化槐果碱、苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱质量浓度均为 0.1 mg/mL。

2.2.2 供试品溶液制备 称取 12 份 10 g 苦豆子。分为 4 组,提取方法分别为 WD、WU、ER、EU,每组 3 份。将 4 组提取物分别浓缩定容至 25 mL,用移液枪分别吸取 4 组溶液 1 mL 再定容至 50 mL,即得 8 mg/mL 原药材供试品溶液。

2.2.3 色谱条件 色谱条件 Agilent Zorbax SB C₁₈

色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾水溶液 (三乙胺 2.00 mL/L) (A) - 乙腈 (B), 洗脱梯度: 0~12 min, 6% B; 12~45 min, 6%~10% B; 45~50 min, 10%~6% B, 检测波长 205 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 20 μ L, 柱温 30 $^{\circ}$ C。

2.2.4 精密度试验 EU 提取物连续进样 6 针, 以氧化槐果碱为参照峰, 计算共有峰相对保留时间及相对峰面积, 计算 RSD 值。

2.2.5 重复性试验 将 EU 提取物的 6 份样品按照“2.2.3”项下色谱条件分别进样分析, 以氧化槐果碱为参照峰, 计算共有峰相对保留时间及相对峰面积, 计算 RSD 值。

2.2.6 稳定性试验 取 EU 提取物供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 分别于 0、1、2、4、8、12 h 进样分析, 以氧化槐果碱为参照峰, 计算共有峰保留时间及相对峰面积, 计算 RSD 值。

3 结果

3.1 急性毒性实验

3.1.1 不同提取方法苦豆子提取物半数致死量 (LD_{50}) 的比较 根据预试验结果与《现代药理试验方法》中急性毒性试验剂量设计原则设置 WD、WU、ER、EU 剂量组数分别为 5、4、5、4, 剂量比分别为 0.80、0.77、0.77、0.65。采用改良寇氏法^[11]计算 LD_{50} , 结果见表 1。

3.1.2 形态及体重变化 各提取物给药组小鼠给药后症状相似。高剂量组小鼠活动减少、安静、不食、不饮、蜷缩、不喜运动、精神沉郁、呼吸加快、外界刺激反应迟钝、精神倦怠。低剂量组小鼠给药后 30 min 活动恢复正常。小鼠中毒死亡时表现为突然抽搐、不安, 甚至跳跃, 死亡后呈游泳状姿势。给药后 4 h 测量未死亡小鼠体温, 体温表现为下降且大部分低于正常体温, 第 2 天体温恢复正常, 食欲减弱, 第 3 天食欲恢复正常, 连续观察 7 d。

4 种提取物给药后第 1 天小鼠体重均下降, 第 3 天体重开始回升, 并与对照组基本保持同等增长幅度 (图 1~4), 由此可以推测, 苦豆子提取物对小鼠胃肠道损害较小。

3.1.3 不同提取方法苦豆子提取物对小鼠死亡时间的影响 比较苦豆子不同提取物给药后小鼠死亡时间分布发现, WD 组小鼠死亡主要集中于 0~8 h; WU 与 EU 组在 4~8 h 内均没有小鼠死亡, 死亡时间主要集中于 0~4 h, 说明超声提取方法所得提取物毒

表 1 4 种方法苦豆子提取物不同剂量下小鼠死亡率和 LD_{50}
Table 1 Results of death rate and LD_{50} under different doses of four extracts

提取物	剂量/(g·kg ⁻¹)	死亡率/%	LD_{50} /(g·kg ⁻¹)
WD	60.00	100	38.397
	48.00	70	
	38.40	40	
	30.72	30	
	24.58	10	
WU	35.78	100	24.994
	27.70	60	
	21.43	20	
	16.58	10	
ER	27.90	100	18.536
	21.60	80	
	16.74	20	
	12.96	10	
EU	10.04	0	19.957
	42.75	100	
	28.00	80	
	18.33	40	
	12.00	10	

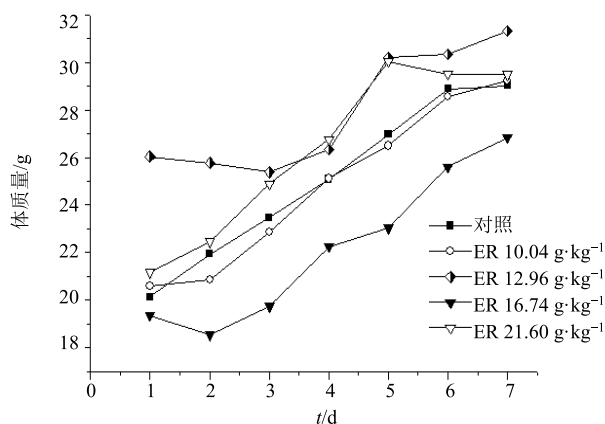


图 1 ER 提取物不同剂量小鼠体重变化 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 1 Weight changes of different doses of ER extracts ($\bar{x} \pm s$)

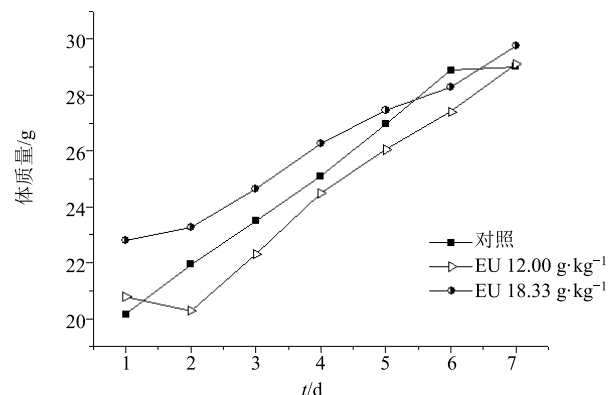


图 2 EU 提取物不同剂量小鼠体重变化 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Weight changes of different doses of ER extracts ($\bar{x} \pm s$)

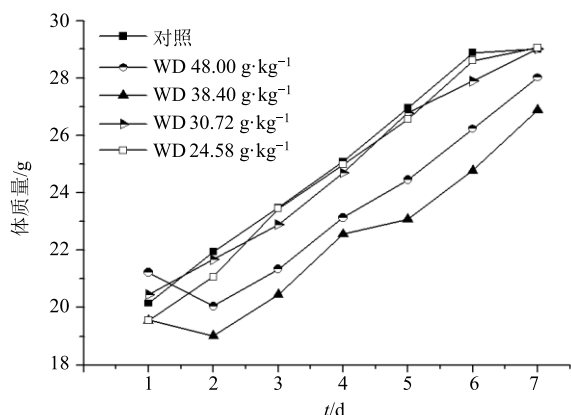


图 3 WD 提取物不同剂量小鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Weight changes of different doses of WD extracts ($\bar{x} \pm s$)

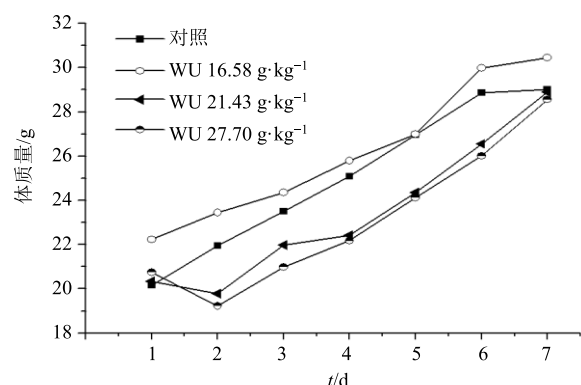


图 4 WU 提取物不同剂量小鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 4 Weight changes of different doses of WU extracts ($\bar{x} \pm s$)

性反应快, 对小鼠的死亡时间有一定的影响。ER 组小鼠死亡时间在 0~4 h 与 8~24 h 分布明显。可以初步得出, 不同的提取方法所制备的苦豆子提取物毒性不同, 且小鼠中毒死亡时间也不同, 见表 2。

3.1.4 不同提取方法苦豆子提取物作用不同时间对小鼠脏器指数的影响 不同提取方法苦豆子提取物对小鼠脏器指数的影响主要表现在肝、肾和肺。与对照组比较, WD 组小鼠心脏、肾脏指数在 4~8 h 显著升高, 肝脏指数显著降低 ($P < 0.01$); WU 组小鼠肺、肾脏指数在 0~4 h 显著升高 ($P < 0.01$); EU 组小鼠肝脏指数在 8~24 h 显著升高, ER 组小鼠肺指数在 8~24 h 显著升高 ($P < 0.01$)。WU 与 EU 组小鼠在 4~8 h 无死亡, 故未做比较。不同提取物作用不同时间对小鼠脏器指数的影响见表 3。

3.1.5 组织病理变化 各苦豆子提取物低剂量组小鼠在 0~4 h 内死亡脏器无明显变化, 高剂量组小鼠

表 2 不同提取方法苦豆子提取物小鼠死亡时间分布

Table 2 Distribution of death time in mice with different extracts

提取物	0~4 h 死亡数/ 死亡总数	4~8 h 死亡数/ 死亡总数	8~24 h 死亡/ 死亡总数
WD	10/25	9/25	6/25
WU	15/19	0/19	4/19
ER	19/31	2/31	10/31
EU	17/23	0/23	6/23

表 3 不同提取方法苦豆子提取物作用不同时间对小鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of *S. alopecuroides* extract with different extraction methods on organ index of mice at different time ($\bar{x} \pm s$)

组别	作用时间/h	脏器指数/%				
		心脏	肝脏	脾脏	肺	肾脏
对照	—	0.53 ± 0.07	5.72 ± 0.66	0.52 ± 0.16	0.70 ± 0.09	1.19 ± 0.09
WD	0~4	0.60 ± 0.06	5.12 ± 0.38	0.56 ± 0.19	0.83 ± 0.09	1.27 ± 0.13
	4~8	0.62 ± 0.06**	4.95 ± 0.86**	0.48 ± 0.18	0.82 ± 0.07	1.38 ± 0.12**
	8~24	0.53 ± 0.10	6.21 ± 0.24	0.73 ± 0.29	0.91 ± 0.07**	1.31 ± 0.14
	168	0.56 ± 0.07	5.37 ± 0.39	0.58 ± 0.16	0.78 ± 0.08	1.33 ± 0.10
WU	0~4	0.58 ± 0.06	5.38 ± 0.71	0.49 ± 0.13	0.85 ± 0.16**	1.34 ± 0.11**
	8~24	0.56 ± 0.06	5.94 ± 0.68	0.48 ± 0.14	1.03 ± 0.26**	1.23 ± 0.14
	168	0.54 ± 0.05	5.87 ± 0.58	0.46 ± 0.12	0.76 ± 0.10**	1.37 ± 0.15**
	168	0.51 ± 0.05	5.77 ± 0.36	0.59 ± 0.13	0.72 ± 0.07	1.14 ± 0.12
EU	0~4	0.52 ± 0.05	6.24 ± 0.81	0.60 ± 0.12	0.88 ± 0.12**	1.23 ± 0.13
	8~24	0.46 ± 0.03	6.57 ± 0.66**	0.49 ± 0.10	0.85 ± 0.12	1.16 ± 0.14
	168	0.51 ± 0.05	5.77 ± 0.36	0.59 ± 0.13	0.72 ± 0.07	1.14 ± 0.12
	168	0.48 ± 0.05	5.78 ± 0.52	0.58 ± 0.18	0.73 ± 0.12	1.24 ± 0.17
ER	0~4	0.57 ± 0.04	5.62 ± 0.70	0.56 ± 0.13	0.87 ± 0.14	1.27 ± 0.09
	4~8	0.53 ± 0.12	5.56 ± 0.51	0.69 ± 0.40	0.87 ± 0.23	1.29 ± 0.11
	8~24	0.53 ± 0.05	6.15 ± 0.69	0.44 ± 0.08	1.02 ± 0.16**	1.30 ± 0.15
	168	0.48 ± 0.05	5.78 ± 0.52	0.58 ± 0.18	0.73 ± 0.12	1.24 ± 0.17

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

肝肾颜色加深。8~24 h 死亡小鼠,肝部分布有斑块,肾色深,以 ER 组最为严重。7 d 后解剖所有存活小鼠,各组小鼠肝呈剂量依赖性的布有针尖大小斑点。

对 WD、WU、ER、EU 法苦豆子提取物最低剂量给药 7 d 后小鼠的肝、肾组织切片进行 HE 染色观察。与对照组比较,各苦豆子提取物作用 7 d 后小鼠均出现肝细胞变性,严重者出现细胞坏死,其最大特征是细胞核溶解,尤以 ER 组病变最为显著。EU 组与 ER 组出现肝索界限不清、肝脏瘀血明显。各苦豆子提取物组小鼠肾脏无明显炎症反应,肾小球正常,但实质瘀血严重,肾小管上皮细胞发生肿

胀变性,官腔变小,部分呈星状甚至消失。不同提取方法苦豆子提取物作用 7 d 小鼠肝脏与肾脏 HE 染色见图 5。

3.2 不同提取方法苦豆子提取物 HPLC 指纹图谱的建立

3.2.1 方法学考察

(1) 精密度试验: EU 提取物共有峰相对峰面积与相对保留时间 RSD 均小于 2%,表明仪器精密良好。

(2) 重复性试验: EU 提取物共有峰相对峰面积与相对保留时间 RSD 分别小于 5%、3%,表明该

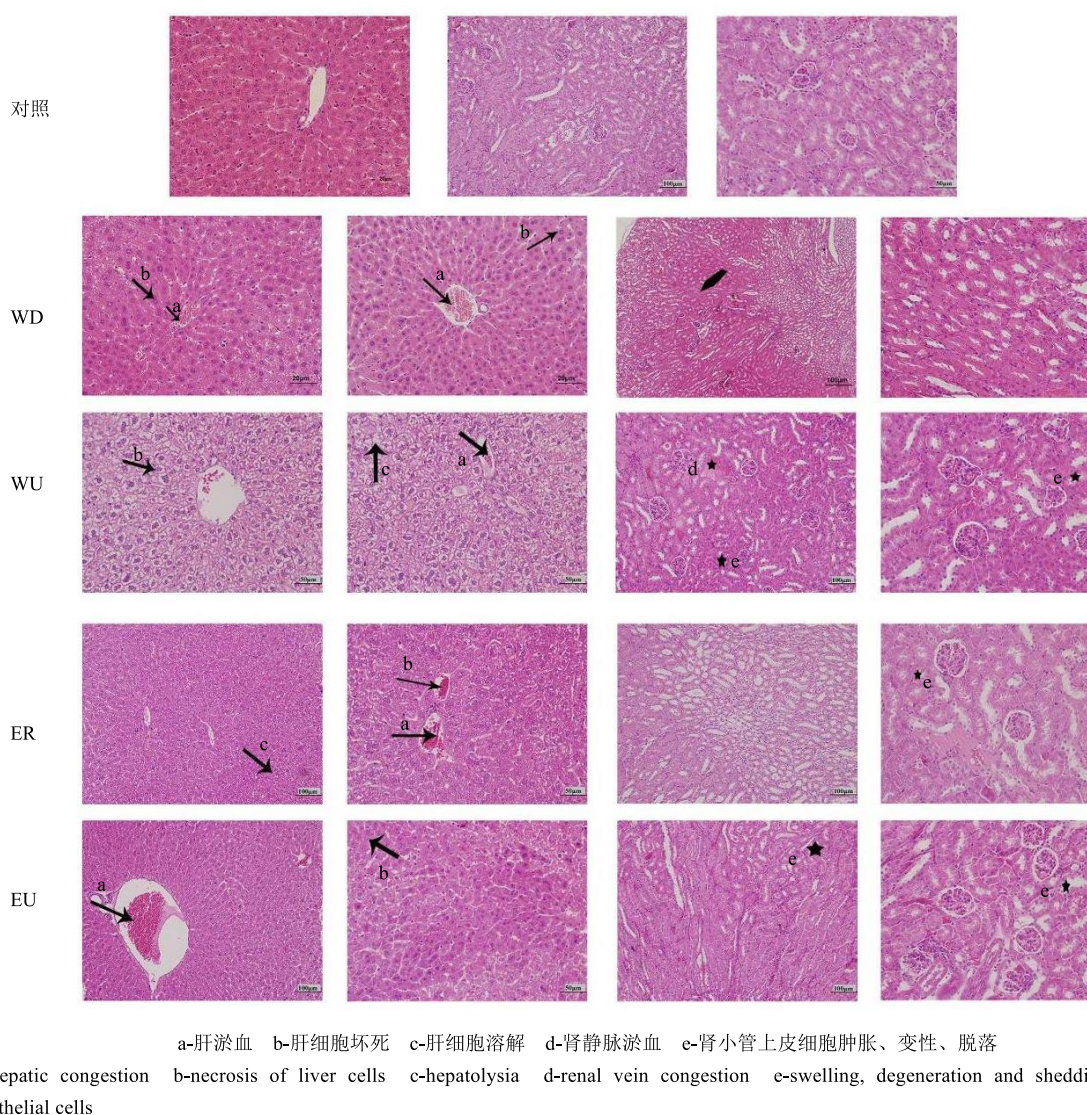


图 5 不同提取方法苦豆子提取物作用 7 d 小鼠肝肾 HE 染色

Fig. 5 HE staining of liver and kidney in mice 7 d after administration of *S. alopecuroides* extracts by different extraction methods

方法重复性良好。

(3) 稳定性试验: 在室温下自然放置 12 h, EU 提取物共有峰相对峰面积与相对保留时间 RSD 分别小于 5%、1%, 表明苦豆子供试品溶液在室温 12 h 内稳定。

3.2.2 HPLC 指纹图谱分析 按“2.2.3”色谱峰条件, 记录 5 个对照品及 12 份样品的 10 个共有峰保留时间和峰面积, 结果显示 ER 组各峰面积均高于其他 3 类提取方法。结果见图 6、7 及表 4。

将 5 种生物碱混合对照品溶液及 12 份供试品 (EU1、EU2、EU3、ER1、ER2、ER3、WU1、WU2、WU3、WD1、WD2、WD3, S1~S12) 色

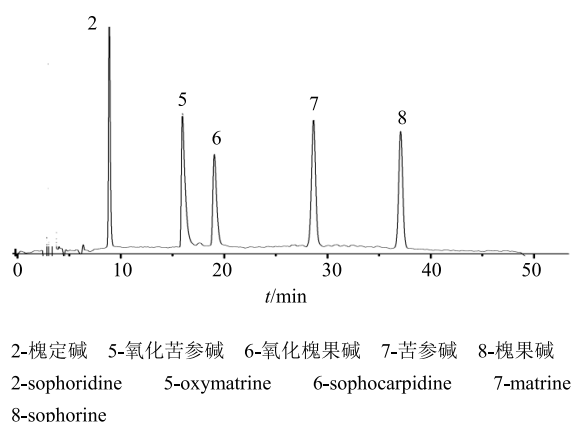
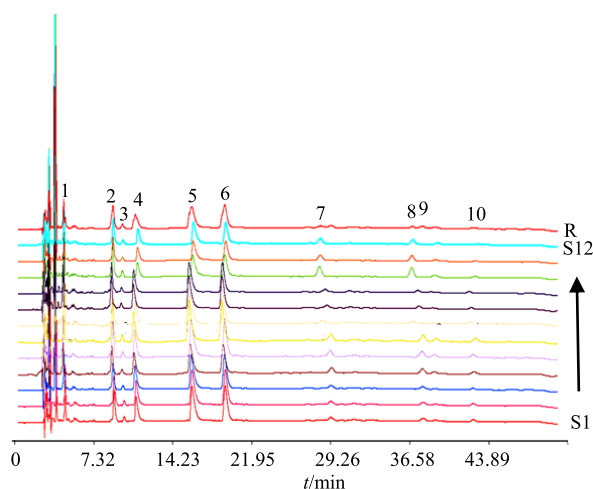


图 6 混合对照品溶液色谱图

Fig. 6 Solution chromatogram of mixed reference substance



S1~S12 依次表示 EU1、EU2、EU3、ER1、ER2、ER3、WU1、WU2、WU3、WD1、WD2、WD3, R 为对照图谱
S1—S12 and R were EU1, EU2, EU3, ER1, ER2, ER3, WU1, WU2, WU3, WD1, WD2, WD, and control chromatogram respectively

图 7 4 种方法苦豆子提取物指纹图谱

Fig. 7 Fingerprint of four extracts

谱图 AIA (*cdf) 格式导入“中药色谱指纹图谱”相似度评价系统 (国家药典委员会 2004AB 版), 设定样品 5 为参照图谱, 对保留时间的色谱峰进行多点校正。第 1、2、4~6 号峰的峰面积明显高于其余峰的峰面积, 其中 5 号峰的峰面积最大, 见表 4。通过与对照品比对可知 2、5、6 号峰分别为槐定碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱。计算 12 份样品指纹图谱相似度。数据显示相似度在 0.374~0.959, 且同一方法提取物间相似度较高, 不同方法提取物间相似度较低, 表明不同方法提取物对色谱峰相似度有一定影响。见表 5。将 12 份样品分为 4 组, 分别为 WU、WD、EU、ER, 每组 3 份。对 4 组样品的 10 个共有峰进行方差分析。显示 ER 组与其他 3 种提取物的 10 个共有峰均具有显著差异, 除 3 号峰外, WU 和 WD 组其余 9 个峰均存在显著差异, WD 和 EU 组 4~10 号峰存在显著差异, EU 与 WU 组 4~10 号峰存在显著差异 ($P<0.01$), 见表 6。

3.2.3 HPLC 10 个共有峰主成分分析 主成分分析结果表明, 前 2 种成分累积贡献率为 96.330%。而且第 1 因子的特征值很高, 对变量的贡献率达 72.566%, 结果见表 7。特征值 >1 的主成分有 2 个, 因此可提取前 2 个因子, 结果见图 8。对第 1 主成分贡献率较大的为 1、2、4~6、10 号峰, 对第 2 主成分贡献率较大的有 3、7~9 号峰, 见表 8。

3.3 不同提取方法苦豆子提取物化学成分与 LD₅₀ 相关性分析

苦豆子 LD₅₀ 与上述 10 个共有峰面积均呈负相关, 即峰面积越大, LD₅₀ 越小, 系数越接近 1, 则表明相关性越显著, 数据显示第 4~6、10 号峰与苦豆子 LD₅₀ 关系极其显著, 分别为 -0.942、-0.977、-0.943、-0.900。结果见表 9。与对照品比对后可知第 5 和第 6 号峰分别为氧化苦参碱和氧化槐果碱, 第 4 和 10 号峰为未知峰。

4 讨论

不同提取方法对中药毒性的影响不同, 吕莉莉等^[12]评价了不同提取方式的益母草对小鼠急性毒性及毒靶器官的影响发现, 益母草醇提取物毒性大于水提取物, 且益母草提取物的毒性与总生物碱的含量呈现一定相关性。本研究结果也表明不同的提取方法苦豆子提取物毒性不同, 其中乙醇回流提取物毒性最强, 对小鼠肝损伤也最为严重。

本研究表明, 不同提取方法苦豆子提取物急性毒性不同, 醇回流 $>$ 醇超声 $>$ 水超声 $>$ 水煎煮, 苦

表 4 12 份样品指纹图谱共有峰相对峰面积

Table 4 Common peak relative peak area of fingerprint 12 samples

样品	相对峰面积									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
WU1	1 056.40	1 415.11	175.09	1 281.37	2 503.63	2 428.41	392.98	235.59	53.93	117.495
WU2	1 106.34	1 439.47	187.40	1 316.46	2 671.10	2 456.40	381.60	236.54	53.73	119.889
WU3	1 017.60	1 379.26	174.18	1 217.16	2 530.23	2 314.35	388.54	237.54	57.83	128.699
WD1	835.63	1 147.34	201.82	925.15	1 798.11	1 716.54	533.26	487.68	198.46	160.719
WD2	838.00	1 182.66	201.82	983.48	1 896.50	1 784.31	549.96	476.03	196.04	153.471
WD3	840.34	1 217.98	204.72	983.48	1 994.89	1 852.08	566.66	464.38	193.61	172.743
EU1	972.26	1 376.88	198.01	1 469.47	3 044.34	2 731.17	306.53	284.42	284.42	168.958
EU2	982.63	1 343.67	185.84	1 503.99	3 028.49	2 792.94	300.13	274.69	270.05	154.958
EU3	978.34	1 379.24	199.20	1 452.03	3 055.24	2 781.43	310.47	276.25	274.69	152.555
ER1	1 213.58	1 726.00	316.88	1 774.70	3 345.74	3 358.80	757.37	545.32	528.26	241.277
ER2	1 289.10	1 835.78	300.89	1 855.01	3 464.79	3 394.31	790.58	578.48	545.32	236.421
ER3	1 364.62	1 945.56	284.89	1 935.32	3 583.84	3 429.82	823.80	611.63	578.48	231.565

表 5 12 份样品相似度评价结果

Table 5 Similarity evaluation results of 12 samples

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	R
S1	1.000	0.764	1.00	0.813	0.869	0.822	0.489	0.821	0.649	0.504	0.738	0.691	0.891
S2	0.764	1.000	0.762	0.822	0.831	0.910	0.422	0.850	0.610	0.452	0.753	0.627	0.839
S3	1.000	0.762	1.000	0.813	0.871	0.821	0.491	0.819	0.653	0.504	0.741	0.689	0.889
S4	0.813	0.823	0.813	1.000	0.884	0.901	0.404	0.919	0.624	0.483	0.713	0.722	0.871
S5	0.869	0.831	0.871	0.884	1.000	0.901	0.389	0.961	0.663	0.532	0.753	0.741	0.959
S6	0.822	0.910	0.821	0.901	0.901	1.000	0.414	0.877	0.643	0.479	0.812	0.653	0.921
S7	0.489	0.422	0.491	0.404	0.389	0.414	1.000	0.413	0.664	0.521	0.453	0.374	0.438
S8	0.821	0.850	0.819	0.919	0.961	0.877	0.413	1.000	0.672	0.533	0.759	0.751	0.943
S9	0.649	0.610	0.653	0.624	0.663	0.643	0.664	0.672	1.000	0.584	0.589	0.574	0.701
S10	0.504	0.452	0.504	0.483	0.532	0.479	0.521	0.533	0.584	1.000	0.534	0.518	0.544
S11	0.738	0.753	0.741	0.713	0.753	0.812	0.453	0.759	0.589	0.534	1.000	0.704	0.809
S12	0.691	0.627	0.689	0.722	0.741	0.653	0.374	0.751	0.574	0.518	0.704	1.000	0.767
R	0.891	0.839	0.889	0.871	0.959	0.921	0.438	0.943	0.701	0.544	0.809	0.767	1.000

表 6 10 个共有峰方差分析结果 ($\bar{x} \pm s$)Table 6 Variance analysis results of 10 common peaks ($\bar{x} \pm s$)

组别	平均峰面积				
	1	2	3	4	5
WU	1 060.10 ± 44.49 ^{bd}	1 411.28 ± 30.29 ^{bd}	178.89 ± 7.38 ^d	1 271.66 ± 50.36 ^{bcd}	2 568.32 ± 90.00 ^{bcd}
WD	839.17 ± 1.67 ^{ad}	1 200.32 ± 24.98 ^{ad}	203.27 ± 2.05 ^d	983.48 ± 41.24 ^{acd}	1 945.70 ± 69.57 ^{acd}
EU	977.44 ± 7.34 ^d	1 360.28 ± 23.48 ^d	191.92 ± 8.61 ^d	1 486.73 ± 24.41 ^{abd}	3 036.42 ± 11.21 ^{abd}
ER	1 251.30 ± 53.40 ^{abc}	1 780.89 ± 77.63 ^{abc}	308.89 ± 11.31 ^{abc}	1 814.86 ± 56.79 ^{abc}	3 405.27 ± 84.18 ^{abc}

组别	平均峰面积				
	6	7	8	9	10
WU	2 399.72 ± 75.25 ^{bcd}	387.71 ± 5.74 ^{bcd}	236.56 ± 0.98 ^{bcd}	55.16 ± 2.31 ^{bcd}	122.03 ± 5.90 ^{bcd}
WD	1 818.20 ± 47.92 ^{acd}	558.31 ± 11.81 ^{acd}	470.21 ± 8.24 ^{acd}	194.82 ± 1.71 ^{acd}	64.63 ± 11.48 ^{acd}
EU	2 762.06 ± 43.68 ^{abd}	303.33 ± 4.53 ^{abd}	279.55 ± 6.88 ^{abd}	87.46 ± 10.15 ^{abd}	151.90 ± 0.92 ^{abd}
ER	3 376.56 ± 25.11 ^{abc}	773.98 ± 23.49 ^{abc}	561.90 ± 23.44 ^{abc}	274.91 ± 1.13 ^{abc}	238.85 ± 3.43 ^{abc}

a、b、c、d 分别表示与 WU、WD、EU、ER 有显著差异 ($P < 0.01$)a, b, c, d showed significant differences with WU, WD, EU, ER, respectively ($P < 0.01$)

表 7 特征值与贡献率

Table 7 Eigen values and contribution rate

成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	7.257	72.566	72.566
2	2.376	23.765	96.330
3	0.316	3.156	99.486
4	0.028	0.284	99.770
5	0.014	0.140	99.910
6	0.006	0.064	99.974
7	0.002	0.022	99.996
8	0	0.004	100.000
9	8.482×10^{-16}	8.482×10^{-15}	100.000
10	3.897×10^{-17}	3.897×10^{-16}	100.000

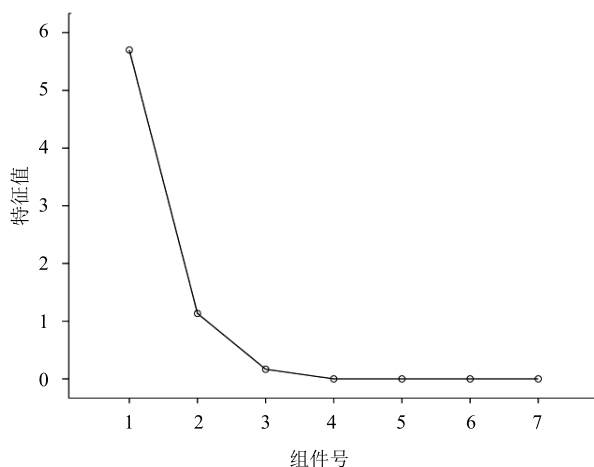


图 8 10 个共有峰碎石图

Fig. 8 Gravel maps of 10 common peaks

表 8 10 个共有峰成分得分系数矩阵

Table 8 Components score coefficient matrix of 10 common peaks

峰号	得分系数	
	主成分 1	主成分 2
1	0.175	-0.047
2	0.148	0.015
3	0.026	0.194
4	0.187	-0.054
5	0.209	-0.105
6	0.192	-0.062
7	-0.068	0.286
8	-0.107	0.319
9	-0.088	0.306
10	0.173	-0.024

豆子经过超声提取, 毒性反应较快。超声提取的原理与特点主要是通过空化效应、机械效应、热效应等^[13-14], 超声波能够破坏细胞壁和细胞膜, 使溶剂渗透于药材的细胞内或使细胞内的化学成分扩散到

表 9 10 个共有峰皮尔逊相关性分析及系数

Table 9 Pearson correlation analysis and coefficients of 10 common peaks

峰号	皮尔逊相关系数	显著性
1	-0.717	0.030*
2	-0.740	0.023*
3	-0.528	0.144*
4	-0.942	0**
5	-0.977	0**
6	-0.943	0**
7	-0.127	0.745*
8	-0.092	0.813*
9	-0.171	0.659*
10	-0.900	0.001**

**在 0.01 级别 (双尾), 相关性显著; *在 0.05 级别 (双尾), 相关性显著

** at level 0.01 (double tail), correlation was significant; * at level 0.05 (double tail), correlation was significant

细胞外, 从而使更多的细胞内成分溶解于溶剂中。

本研究对不同提取方法苦豆子提取物毒性进行比较, 并建立苦豆子提取物 HPLC 指纹图谱, 对苦豆子化学成分与毒性进行相关性分析。指纹图谱能够检测中药化学成分及含量, 能作为中药材质量的评价模式之一, 但由于其所反映的化学成分信息未能体现与毒性的关联度, 因此将指纹图谱所体现的化学成分与毒性建立相关性的谱毒关系研究是对指纹图谱的有效补充。谱毒关系能够有效确定出与毒性有关的化学成分, 从而有效控制中药质量^[15-16]。生物碱是苦豆子的主要活性成分, 同时也是苦豆子产生毒性的重要成分。本研究采取 4 种不同提取方法对苦豆子提取物进行毒性实验, 发现以肝肾毒性表现为主, 检测出可能的毒性成分, 并分析谱毒关系, 对苦豆子毒性机制的进一步研究和全面评价提供基础。

陈申等^[17]进行苦豆子总碱的急性毒性实验时小鼠出现精神萎靡、拱背、全身抽搐、前爪挠口, 并有间断性兴奋, 濒死期多呈现出跳跃动作, 继而四肢呈游泳状, 随即死亡, 毒性临床表现与本研究结果一致。说明 4 种提取方法苦豆子提取物中苦豆子生物碱发挥了毒性作用。本研究通过对不同提取方法苦豆子提取物中主要生物碱成分的指纹图谱与 LD₅₀ 进行谱毒关系分析, 确定了苦豆子急性毒性成分, 主要有氧化槐果碱和氧化苦参碱。聚类分析、主成分分析以及皮尔逊相关性分析表明, 10 个共有峰中有 2 种主成分, 第 1 主成分累积贡献率高达 72.566%, 与苦豆子 LD₅₀ 呈显著负相关的是氧化苦参

碱、氧化槐果碱及4、10号未知色谱峰。氧化苦参碱、氧化槐果碱是苦豆子主要毒性成分之一。4、10号峰所代表的化合物还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 木胡牙提, 刘志强, 马依彤, 等. 临床型医学硕士研究生培养中面临的难点及解决对策 [J]. 新疆医学, 2008, 38(5): 129-131.
- [2] 李艳艳, 冯俊涛, 张 兴, 等. 苦豆子化学成分及其生物活性研究进展 [J]. 西北农业学报, 2005, 14(2): 133-136.
- [3] 郝伟亮, 孟根达来, 解红霞. 苦豆子的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国药房, 2016, 27(13): 1848-1850.
- [4] 曹楠楠, 陈香荣, 吴 艳. 苦豆子多糖的超声波提取工艺优化及理化性质研究 [J]. 现代食品科技, 2014, 30(2): 209-215.
- [5] 刘 军, 熊元君, 李 勇, 等. 苦豆子研究近况 [J]. 新疆中医药, 2006, 24(6): 60-63.
- [6] 蔡 艳. 苦参素药理作用研究进展 [J]. 实用中医药杂志, 2016, 32(4): 387-389.
- [7] 王新峰, 李 磊, 韩国柱. 苦参素药理作用的研究进展 [J]. 医药导报, 2005, 24(6): 483-485.
- [8] 吴芳妮, 张 芊, 张春雷. 苦参在T细胞介导的皮肤良恶性疾病中的应用进展 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2016, 30(8): 847-849.
- [9] 新疆维吾尔自治区维吾尔药材标准 [S]. 2010.
- [10] 杨舒淳, 钟晓铃, 刘姝君, 等. 不同炮制方法对苦豆子毒性的影响 [J]. 新疆中医药, 2008, 26(5): 34-35.
- [11] 孙瑞元. 简捷实用的半数致死量综合计算法 [J]. 药学报, 1963(2): 65-74.
- [12] 吕莉莉, 赵 红, 李世民, 等. 不同提取方式对益母草小鼠急性毒性及毒靶器官的影响 [J]. 中国药物警戒, 2015, 12(12): 705-710.
- [13] 薛 峰, 李春娜, 李朋收, 等. 超声提取在中药化学成分提取中的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(18): 231-234.
- [14] 万水昌, 王志祥, 乐 龙, 等. 超声提取技术在中药及天然产物提取中的应用 [J]. 西北药学杂志, 2008, 23(1): 60-62.
- [15] 张立军, 李 芸, 戴海蓉, 等. 高乌头不同溶剂萃取部分急性毒性的谱-毒关系研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(4): 470-474.
- [16] 林 艳, 肖 榕, 尹林子, 等. 基于粗糙集理论构建“谱毒”关系研究何首乌特异质肝毒性物质基础 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(3): 509-517.
- [17] 陈 申, 刘 宇, 强 哲, 等. 苦豆子总碱对小鼠急性毒性试验研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2013, 32(2): 34-36.