

附子乌头草乌及其炮制品的毒效比较*

□柴玉爽 王玉刚 花雷

(清华大学生命科学学院医学院药物药理研究室 北京 100084)

张聿梅 肖新月 (中国食品药品检定研究院中药处 北京 100050)

詹宏磊 雷帆 (清华大学生命科学学院医学院药物药理研究室 北京 100084)

万红娇 (清华大学生命科学学院医学院药物药理研究室 北京 100084)
(江西中医学院 南昌 330004)

林瑞超 (中国食品药品检定研究院中药处 北京 100050)

邢东明 杜力军** (清华大学生命科学学院医学院药物药理研究室 北京 100084)

摘要:目的:从毒效角度出发,比较附子、乌头、草乌不同炮制品及提取物的毒性,为研究和应用这些生药提供相关实验依据。方法:以小鼠为主要研究对象,观察急性死亡率,心电图影响剂量来观察毒性,以镇痛及其抗室颤来观察其药效。结果:从急性毒性看,白附片和黑顺片毒性较小,其最大给药剂量均为 $20.52 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。盐附子毒性较大, LD_{50} 为 $11.301 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。结合相关活性综合考察,临床安全指数由大到小依次为:黑顺片>白附片>盐附子。草乌毒性较大($\text{LD}_{50} 292.38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),经炮制后毒性明显减小,约降低 70.32 倍。结论:附子、乌头炮制后起到了减毒存效的作用,而草乌炮制后则表现为毒效同时降低。

关键词:附子 乌头 草乌 毒性 药效 炮制

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2011.05.021

附子、乌头及其草乌是有毒中药,但以其特有的药效作用又为临床所常用^①。如何在减毒增(存)效方面进行控制,一直是科研人员的工作焦点,但这方面的文章尚未见专门报道。我们在保证所用药材品种清晰的前提下,监控主要成分的含量变化,并对其不同炮制品及其提取物进行了相关毒效的考察。以从

原植物来源、含量测定、毒性、活性等方面综合评价炮制方法对其减毒增效的可行性及其特点,进而为制订有毒生药的标准提供实验依据。

一、材料与方法

1. 实验动物

清洁级 ICR 小鼠,雌雄兼用,体重 18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:

收稿日期: 2010-12-01

修回日期: 2011-09-16

* 科学技术部“十一五”国家科技支撑计划(2006BAI14B01-001):药品安全关键技术研究——常见与重要药品安全标准研究,项目负责人:马双成,子项目负责人:肖新月;科学技术部国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09308-003):中药生产技术与过程控制技术标准平台,负责人:王智民;科学技术部国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-002):与药效相关的中药质量评价关键技术研究,负责人:王峥涛;科学技术部国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-001):中药研究关键技术,负责人:梁爱华。

** 通讯作者:杜力军,本刊编委,主要研究方向:药理学, Tel: 010-62773630, E-mail: lijundu@mail.tsinghua.edu.cn。

SCXK(京)2007-0001。实验中所用试剂均为国产分析纯。SII-2型心电图仪(上海医用仪器厂),RM6240BD四导生理记录仪(成都仪器厂)。

2. 受试药物

川乌(乌头, *Aconitum carmichaeli* Debx.)、草乌(北乌头, *Aconitum kusnezoffii* Reichb.)药材及炮制品制川乌、制草乌、盐附子、白附片、黑顺片及其提取物样品由中国食品药品检定研究院中药室提供,并经中国食品药品检定研究院张继、张南平副主任药师鉴定。按2005年版《中华人民共和国药典》各炮制品制备工艺进行炮制。提取物制备:药材及炮制品经粉碎后,加氨试液润湿,用乙醚冷浸24h,滤过,浓缩滤液,得提取物浸膏,用时以生理盐水配制所需浓度。其中川乌、草乌药材及盐附子含双酯型生物碱以乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的总量计分别为0.10%、0.37%和0.012%;制川乌、制草乌、黑顺片、白附片含单酯型生物碱以苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱总量计分别为0.12%、0.044%、0.028%和0.057%^[2-4]。用时以生理盐水配制成所需浓度。

3. 小鼠急性毒性实验

取小鼠雌雄各半,随机分组。在预试验的基础上确定给药剂量范围。分别灌胃不同剂量的药物,连续观察14d,每天观察小鼠一般体征和状况,记录小鼠死亡数。口服最大给药剂量:给药体积0.4 mL/10g体重,1h内连续给药2次,计算总给药量。口服LD₅₀:给药体积0.2 mL/10g体重。静脉注射LD₅₀:给药体积0.1 mL/10g体重。

4. 对氯仿致小鼠室颤的保护作用

取雌性小鼠随机分组,除对照组给予等体积生理盐水外,其余各组灌胃不同剂量的药物,给药体积0.2 mL/10g体重,连续给药3d,于第4d给药后1h,分别将小鼠置于充满氯仿的密封的玻璃干燥器瓶内,记录从放入小鼠到静卧不动时间(潜伏期)。取出小鼠立即开胸,直视下观察室颤发生情况,记录出现室颤的小鼠,计算室颤发生率。

5. 对小鼠心电图的影响^[5-6]

取小鼠(雌雄各半)以10%乌拉坦腹腔注射麻醉,固定。四肢插电极,稳定15min后,记录正常心电图,尾静脉注射不同剂量药物,观察比较给药前后心电图变化。主要观察指标为:心率,心律等。取6只小鼠心率均出现明显心率明显改变的剂量为最低影响

剂量(每组小鼠6只)。

6. 对小鼠扭体作用

取小鼠随机分组,预先灌胃给药3d,于第4d给药后1h,每只小鼠腹腔注射0.6%醋酸液,记录从注射醋酸液到首次出现扭体的时间(扭体潜伏期),并连续记录15min内小鼠出现扭体的次数。

7. 数据处理

实验数据经Excel软件处理,用SPSS11.0软件进行单因素方差分析,组间t检验。以P<0.05为显著具有显著性。计数资料百分率用X²检验,LD₅₀计算采用序贯法^[7]。

二、结果

1. 各药材粉及其提取物小鼠急性毒性(见表1)

2. 对氯仿致小鼠室颤发生的保护作用

黑顺片提取物的抗氯仿致小鼠室颤的保护作用最强,其最低有效剂量为156 mg·kg⁻¹;其次为白附片,625 mg·kg⁻¹剂量的药效强度相当于黑顺片的156 mg·kg⁻¹药效强度。盐附子药效最弱,其最低有效剂量为625 mg·kg⁻¹,见表2。

3. 对小鼠心电图的最小毒性剂量

小鼠尾静脉注射不同提取物后,其明显表现为心率减慢,严重者出现抑制(图1)。以心率减慢为最小影响阈剂量,各给药组对心电影响剂量见表3。

表1 不同药物不同给药途径的急性毒性

	给药途径	LD ₅₀ (mg·kg ⁻¹)	95%可信限
草乌提取物	静脉注射	1.4055	1.2016~1.6441
制草乌提取物	静脉注射	2209.97	1802.04~2452.46
草乌粉	口服	292.38	211.74~403.64
制草乌粉	口服	20560.0*	
生川乌粉	口服	3300.0	2600~4100
制川乌粉	口服	10000.0	8200~12100
盐附子粉	口服	11301.0	8079~15757
白附片粉	口服	20560.0*	
黑顺片粉	口服	20560.0*	
生川乌提取物	静脉注射	2.8459	2.0331~3.9556
制川乌提取物	静脉注射	46.2992	37.0688~57.8279
盐附子提取物	静脉注射	2.0047	1.6916~2.3758
白附片提取物	静脉注射	10.7232	7.2615~15.8352
黑顺片提取物	静脉注射	40.2054	30.1924~53.5391

注:“*”为最大给药剂量。

4. 草乌炮制前后对镇痛效应的影响

扭体实验结果表明,草乌具有明显的减少扭体次数的作用,制草乌也表现出了明显的活性。对扭体潜伏期有延长趋势,但差异没有统计学意义。阳性药强的松也表现出相同的作用特点(表4)。

5. 不同生药炮制前后临床安全指数的比较

以不同炮制品附子的急性毒性剂量除以室颤最低有效剂量作比值,得出临床安全指数。盐附子、白附子和黑顺片的临床安全指数依次为 18.08 (11301.0/625)、32.89 (20560.0/625)、131.79 (20560.0/156),括号里的参数单位分别为急性毒性($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)/最低有效剂量($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。由于顾忌到药材提取时一些毒性成分会破坏,因此安全指数计算采用各附子生药粉的急毒参数。

以炮制前后草乌的急性毒性剂量除以扭体镇痛最低有效剂量作比值,得出临床安全指数。草乌和制草乌的临床安全指数分别为 11.69(292.38/25),41.12(20560.0/500)。

三、讨论

附子的 3 个炮制品毒性来看,黑顺片与白附子毒性较小,做不出 LD_{50} ,其最大给药剂量为 $20.56\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($n=20$,雌雄各半)。盐附子有一定的毒性, LD_{50} 为 $11.301\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。草乌毒性很大,生草乌 LD_{50} 为 $292.38\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,按体表面积转换为成人,等效量为 $25.06\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,成人(以平均体重 60 kg 计)日用量不超过 $1503.67\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。但草乌炮制后毒性明显降低,口服最大给药剂量为 $20.56\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($n=20$,雌雄各半),其毒性较生草乌降低了约 70.32 倍($20.56/0.29238$)。从表 1 所见,生草乌炮制后毒性成分明显下降,因此使用上安全性较大。

由于附子类物质主要为心脏毒性^[9],因此我们选择简便易行的心电为观察指标,评价其药效靶器官毒性。以其在结合 LD_{50} 评价的同时更有针对性。结果表明,生品对心脏毒性最大,以川乌最为明显,甚至强过了生草乌。而这两种生药炮制后其心脏毒性均明显下降。根据对心率影响最低剂量由小到大排列,其心脏毒性依次为:川乌>草乌>盐附子>白附片>黑顺片>制草乌>制川乌。根据心电影响最低剂量按体表面积折算,成人等效剂量再乘以口服与静脉注射 LD_{50} 的比值,得出对心电影响成人最低建议日限量(以 60 kg 为计):生川乌 43.08 mg ,制川乌 1619.55 mg ,

表 2 各生药提取物对氯仿致小鼠室颤发生潜伏期及其发生率($\bar{x}\pm s, n=15$)

	剂量 ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	潜伏期 (s)	室颤发生率 (%)
对照		54.06 ± 21.82	60.0
黑顺片	625	$73.58\pm 23.7^*$	26.67*
黑顺片	156	$77.67\pm 21.21^{**}$	20.0**
白附片	625	$82.44\pm 19.7^{**}$	26.67*
白附片	156	$73.69\pm 16.26^{**}$	33.33*
盐附子	625	$78.99\pm 11.39^{**}$	42.86
盐附子	156	$78.53\pm 20.82^{**}$	40.0*

注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表 3 各生药及其炮制品提取物对小鼠心电图影响的药物剂量

药物	心电最小影响剂量($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)		相当于成人(60kg)日限量(mg)	
	小鼠 (静注)	相当于人用量 (静注)	静注	口服
生川乌	0.0072	0.0000617	0.037	43.08
制川乌	1.458	0.12497	7.4983	1619.55
盐附子	0.0202	0.00173	0.1038	585.63
白附片	0.029	0.002486	0.1491	285.96
黑顺片	0.0996	0.00854	0.5122	261.94
制草乌	1.139	0.09763	5.8577	54.49
草乌	0.0145	0.00124	0.0746	15.51

注:成人口服日限量=成人静注日限量 \times (小鼠口服 LD_{50} /小鼠静注 LD_{50})。

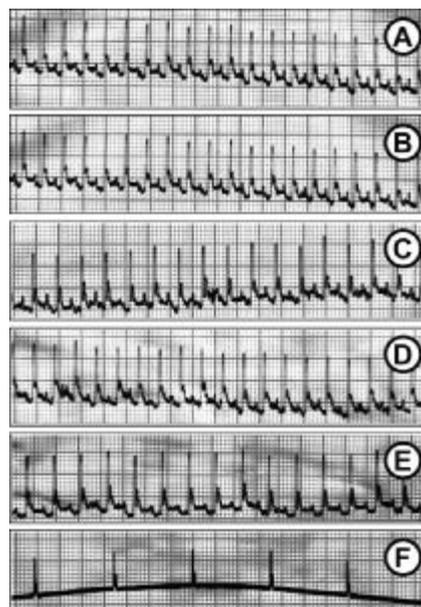


图 1 静脉注射制草乌提取物($2.28\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)后小鼠心电图变化
注:A:给药前,B:给药后 1 min,C:给药后 3 min,D:给药后 5 min,E:给药后 10 min,F:给药后 15 min。

盐附子 585.63 mg, 白附片 285.96 mg, 黑顺片 261.94 mg, 制草乌 54.49 mg, 生草乌 15.51 mg。草乌炮制后其小鼠急性毒性剂量是炮制前的 70.32 倍[20560.0(制草乌)/292.38(生草乌)mg·kg⁻¹], 其对心电图影响最小剂量为 78.62 倍[1.14(制草乌)/0.0145(生草乌)mg·kg⁻¹], 二者较为接近, 提示口服吸收的成分与心电图影响的成分相关性较强。

以氯仿致小鼠室颤为药效指标的实验结果表明, 附子及其炮制品的效价未出现明显差异, 提示炮制后降低了相应的毒性, 但药效并未受到明显影响。由于草乌的毒性较大, 预试验时其对室颤的作用不明显, 因此改用了醋酸扭体的疼痛模型, 并以此来观察草乌及其炮制品的药效。结果表明, 草乌炮制后其镇痛效价明显降低。以上结果与以比较草乌水煎方法的相关结果的趋势基本一致^[9-10]。结合毒效综合分析并计算临床指数表明, 制草乌的临床治疗指数明显升高, 为草乌的 3.52 倍[41.12(制草乌)/11.69(草乌)], 表明草乌炮制后毒性明显降低。虽然其效价有所降低, 但药效仍然保持。由于其毒性的下降, 其临

表 4 草乌炮制前后对醋酸致小鼠扭体的作用($\bar{x}\pm s$, n=11)

药物	剂量 (mg·kg ⁻¹)	扭体潜伏期 (s)	扭体次数/15 min
对照		268±115.4	54.2±8.44
醋酸强的松	5.5	337.6±139.16	30.2±21.42*
草乌	50	414.2±179.51	18.6±11.5**
草乌	25	385.4±98.91	25.2±12.46**
制草乌	1000	311.2±90.29	31.6±14.22*
制草乌	500	466.4±271.42	26.0±12.98**

注: 与对照组相比, *P<0.05, **P<0.01。

床使用安全范围增大, 达到了减毒存效的目的。

需要说明的是, 本实验结果仅是对各种生药粉及其提取物在小鼠体内进行的评价。由于附子乌头以及草乌煎煮后其毒性成分降解, 可以明显降低其毒性^[11]。因此上述实验结果仅为参考, 其所测算的使用限量仅限于生药粉服用, 其临床毒效的真正结果尚有待于临床资料的积累和研究。

参考文献

- 1 Singhuber J, Zhu M, Prinz S, et al. Aconitum in Traditional Chinese Medicine—A valuable drug or an unpredictable risk. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 126:18-30.
- 2 张聿梅, 谢黔锋, 鲁静, 等. 草乌药材标准修订研究. *药物分析杂志*, 2010, 30(5):940-944.
- 3 聂黎行, 张聿梅, 鲁静, 等. 附子和附片质量标准研究. *中国药理学杂志*, 2010, 45(15):1182-1186.
- 4 程显隆, 白宗利, 肖新月, 等. 乌头类制品中 3 个双酯型生物碱的 RRLC-MS/MS 法分析. *药物分析杂志*, 2010, 30(9):1646-1649.
- 5 郑瑞凤, 杜丽红, 洪梅. 草乌中毒致心房颤动伴 3 相右束支传导阻滞 1 例. *心电图学杂志*, 1999, 18(3):178.
- 6 庞巍, 王进忠, 覃小兰. 误服外用川乌草乌煎剂致心脏毒性. *药物不良反应杂志*, 2009, 11(1):40-41.
- 7 杨树勤. *中国百科全书-医学统计学*. 第 1 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1992:205-206.
- 8 Tai YT, Lau CP, Young K, et al. Cardiotoxicity after accidental herb-induced aconite poisoning. *Lancet*, 1992, 340:1254-1256.
- 9 刘瑶, 彭成. 草乌煎煮时间、给药剂量与毒性的相关性研究. *成都中医药大学学报*, 2008, 31(1):50-54.
- 10 张宏, 余成浩, 彭成. 草乌煎煮时间、给药剂量与抗炎镇痛功效的相关性研究. *中药材*, 2006, 29(12):1318-1322.
- 11 罗昌国, 张瑞贤. 近 20 年附子超大剂量应用概况. *中国中药杂志*, 2005, 30(2):96-99.

Comparison of Toxic and Pharmacological Action among Radix Aconiti with Different Preparations

Chai Yushuang¹, Wang Yugang¹, Hua Lei¹, Zhang Yumei², Xiao Xinyue², Zhan Honglei¹, Lei Fan¹,
Wan Hongjiao^{1,3}, Lin Ruichao², Xing Dongming¹, Du Lijun¹

(1. Laboratory of Pharmaceutical Sciences, School of Life Sciences and School of Medicine,
Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China;

3. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract: The study is aimed to compare toxicity of aconite roots in different preparations from the point of both toxic and pharmacological action. Related experiment basis was presented in the study and research of Chinese medicinal. Toxicity, morbidity and minimum cardiac toxic dose were assessed. Effects on acetic acid-induced ab-

dominal constriction and trichloromethane-induced ventricular fibrillation of mice were observed. The results showed that from the morbidity of acute toxicity, the toxicity of refined aconite roots is reduced with the maximum tolerance dosage of 20.52 g/kg, except the aconite root prepared by salt (LD_{50} 11.301 g/kg). Base on the clinic index (toxic dose/effective dose), the safety index of the root by different preparation were, from big to small, by boiling plus steaming was more than only by boiling preparation, which is more than only salt preparation without boiling and steaming, respectively. The toxicity of *Aconitum kusnezoffii* Reichb. (Cao Wu) was more than LD_{50} 292.38 mg/kg. But, its toxicity was apparently reduced to 70.32 times through preparation. It is concluded that by the process of refining aconites, the result of toxicity-reducing and action-maintaining was for refined *Aconitum carmichaeli* Debx. Actions were attenuated in both toxicity and pharmacology in refined *Aconitum kusnezoffii* Reichb.

Keywords: Aconite root, toxicity, pharmacological effect, preparation

(责任编辑:李沙沙,责任译审:王 晶)