

蒙药“诃子解草乌毒”的配伍比例研究[△]

刘爽^{1*}, 张晓菲², 苗鑫², 邢海燕², 李刚^{2#} (1. 内蒙古医科大学第二附属医院药剂科, 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)11-1519-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.11.16

摘要 目的: 探讨蒙药“诃子解草乌毒”的最佳配伍比例。方法: 将40只大鼠随机分为空白对照组(0.05%羧甲基纤维素钠溶液)、生草乌组(以生药量计0.12 g/kg)和生草乌-诃子(1:3、1:1、3:1, 质量比)组(生草乌给药量以生药计均为0.12 g/kg), 每组8只; 每天灌胃给药1次, 连续给药28 d; 末次给药0.5 h后, 测定大鼠血清中肌钙蛋白(cTn-I)、肌红蛋白(MB)含量, 并观察其心脏病理结构变化, 以考察诃子对草乌致心脏毒性的解毒作用。采用平衡透析法并联合液质联用技术测定草乌中3种乌头碱(乌头碱、新乌头碱和次乌头碱, 质量浓度均为5、10、20、40、80、160、400 ng/mL)与正常人血浆的血浆蛋白结合率; 然后固定3种乌头碱的质量浓度均为100 ng/mL, 考察加入不同比例诃子中主要解毒成分单宁酸后(3种乌头碱与诃子的质量比均分别为1:0.025、1:0.075、1:0.1、1:0.5), 对3种乌头碱血浆蛋白结合率的影响, 以考察诃子解草乌致心脏毒性的可能机制。结果: 在解毒实验中, 与空白对照组比较, 生草乌组大鼠血清中cTn-I、MB含量显著升高($P < 0.05$), 心肌组织出现细胞排列紊乱、细胞固缩、胞浆炎症等明显病理结构改变。与生草乌组比较, 生草乌-诃子(1:3、1:1、3:1)组大鼠血清中cTn-I、MB含量均显著降低($P < 0.05$), 并且生草乌-诃子(3:1、1:1)组含量与空白对照组差异无统计学意义($P > 0.05$); 心肌组织病变都得到不同程度改善, 其中生草乌-诃子(3:1)组大鼠心肌组织结构与空白对照组相似。在机制考察试验中, 在不同质量浓度下, 草乌中3种乌头碱与正常人血浆的血浆蛋白结合率均约为30%, 差异均无统计学意义($P > 0.05$), 且无明显的浓度依赖性; 加入单宁酸后草乌中3种乌头碱的血浆蛋白结合率均不同程度降低, 当3种乌头碱与单宁酸按1:0.1、1:0.075、1:0.5比例配伍时, 血浆蛋白结合率显著降低($P < 0.05$), 且有配伍比例的依赖性。结论: 生草乌-诃子(3:1)配伍使用对草乌致心脏毒性的解毒效果最好; 在此配伍比例下, 草乌中3种乌头碱与正常人血浆的血浆蛋白结合率相对较高, 游离药物浓度相对较低。

关键词 草乌; 诃子; 心脏毒性; 解毒作用; 血浆蛋白结合率; 配伍比例

Study on Compatibility Proportion of Mongolian Medicine “*Terminalia chebula* Decomposing Poison of *Aconitum kusnezoffii*”

LIU Shuang¹, ZHANG Xiaofei², MIAO Xin², XING Haiyan², LI Gang² (1. Dept. of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 2. College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the best compatibility proportion of Mongolian medicine “*Terminalia chebula* decomposing the poison of *Aconitum kusnezoffii*”. METHODS: Totally 40 rats were randomly divided into blank control group (0.05% CMC-Na), raw *A. kusnezoffii* group (0.12 g/kg by crude drug) and raw *A. kusnezoffii*-*T. chebula* (1:3, 1:1, 3:1, mass ratio) group (0.12 g/kg raw *A. kusnezoffii* by raw material), 8 rats in each group. They were given relevant medicine intragastrically once a day, for consecutive 28 d. 0.5 h after last medication, serum contents of cTn-I and MB were determined, and the changes of cardiological structure were observed; the detoxification effects of *T. chebula* on cardiotoxicity induced by *A. kusnezoffii* were investigated. Binding rates of 3 kinds of aconitine (concentrations of aconitine, mesaconitine and hypaconitine were 5, 10, 20, 40, 80, 160, 400 ng/mL) to binding rate of plasma protein with normal human plasma were determined by equilibrium dialysis combined with liquid chromatography-mass spectrometry. The concentrations of 3 kinds of aconitine were fixed as 100 ng/mL. After adding main detoxification component tannic acid in different proportions of *T. chebula* (1:0.025, 1:0.075, 1:0.1, 1:0.5), the effects of them on plasma protein binding rate of 3 kinds of aconitine were investigated; the possible mechanism of *T. chebula* decomposing the poison of *A. kusnezoffii* inducing cardiotoxicity were investigated. RESULTS: In detoxification experiment, compared with blank control group, serum contents of cTn-I and MB were increased significantly in raw *A. kusnezoffii* group ($P < 0.05$). There were obvious pathological changes in myocardial tissue, such as disorder of cell arrangement, cell

[△] 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81560685); 内蒙古自治区科技重大专项课题

* 副主任药师, 硕士。研究方向: 中蒙药药理学。E-mail: 115893503@qq.com

通信作者: 教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 神经药理及新药药理学。E-mail: cnmmligang@hotmail.com

shrinkage and cytoplasm staining. Compared with raw *A. kusnezoffii* group, serum contents of cTn-I and MB in raw *A. kusnezoffii*-*T. chebula* (1:3, 1:1, 3:1) groups were decreased significantly ($P < 0.05$), and there was no significant difference between the raw *A. kusnezoffii*-*T. chebula* (3:1, 1:1) groups and blank control group ($P > 0.05$); myocardial

pathological changes were improved to varying degrees. The structure of myocardial tissue in raw *A. kusnezoffii*-*T. chebula* (3:1) groups were similar to blank control group. In the mechanism investigation experiment under the condition of different concentrations, plasma protein binding rates of 3 kinds of aconitine with normal human plasma were about 30%, without statistical significance ($P>0.05$) and significant concentration-dependent manner. After adding tannic acid, plasma protein binding rate of 3 kinds of aconitine in *A. kusnezoffii* was decreased to different extent; when 3 kinds of aconitine were combined with tannic acid in the ratio of 1:0.1, 1:0.075 and 1:0.5, the plasma protein binding rate decreased significantly ($P<0.05$), in proportion-dependent manner. CONCLUSIONS: Compatible use of raw *A. kusnezoffii*-*T. chebula* (3:1) show that best detoxification effect on *A. kusnezoffii*-induced cardiotoxicity. Under this compatibility ratio, the plasma protein binding rate of 3 kinds of aconitine in *A. kusnezoffii* with normal human plasma is relatively high and the free drug concentration is relatively low.

KEYWORDS *Aconitum kusnezoffii*; *Terminalia chebula*; Cardiotoxicity; Detoxification; Plasma protein binding rate; Compatibility proportion

草乌和诃子均为蒙医药学中的常用药材。其中,草乌为毛茛科植物北乌头(*Aconitum kusnezoffii* Reichb.)的干燥块根,具有治疗关节炎、强心和止痛等功效^[1]。据统计,在蒙医治疗“粘”病和“协日乌素”病的方剂中,有草乌入药的方剂分别占45%和57%,是蒙医临床不可缺少的一味药^[2]。然而,草乌有大毒,且以心脏毒性最强,因此在蒙医学中,草乌多在炮制后或配伍后入药,其中以诃子制草乌或配伍草乌使用较为常见^[3]。诃子蒙医称“阿如拉”,为使君子科植物诃子(*Terminalia chebula* Retz.)的干燥成熟果实,不仅无毒副作用,而且还有解毒功效,临床应用甚广,素有“蒙药之王”之称^[4]。19世纪的《蒙药正典》指出^[5]:“含有草乌的方剂中必须搭配诃子”。因此,草乌与诃子的配伍比例是使用过程中需要关注的问题。在蒙医临床中,生草乌与诃子的常用配伍比例是1:1和3:1^[6]。然而,不同比例诃子对草乌心脏毒性的解毒作用是否有差异,以及增大诃子用量之后其解毒效果是否会增强,还未可知。故本研究首先展开加入不同比例诃子后对生草乌致心脏毒性的解毒效果比较。

乌头碱、新乌头碱和次乌头碱3种双酯型生物碱是草乌中的主要有效成分,也是其主要的毒性成分^[7],具有增加心脏心率、改善心肌收缩等强心作用,但同时也具有引起心率失常等毒性作用^[8]。另外,李建良等^[9]通过网络药理学验证了诃子中大量的鞣质(单宁酸)可以缓解双酯型乌头碱的毒性作用。因此,本研究进一步选取草乌中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱这3种乌头碱以及诃子中的单宁酸作为体外研究对象,并从药动学的主要参数之一血浆蛋白结合率着手,研究诃子解草乌致心脏毒性的可能机制。

1 材料

1.1 仪器

Dionex UltiMate3000 超高效液相色谱(UPLC)仪、Q Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(MS)系统(美国 Thermo-Fisher 公司);HH-6 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);UPHW-II-90T 超纯水机(四川优普超纯科技有限公司);DM IL LED 荧光倒置显微镜(德国

Leica 公司)。

1.2 药品与试剂

诃子(批号:20140121)、生草乌(批号:20140101)均购于呼和浩特市药材市场,分别经内蒙古医科大学药学院渠弼教授、王小琴教授鉴定为使君子科植物诃子的干燥果实和毛茛科植物北乌头的干燥块根;肌钙蛋白(cTn-I)试剂盒(批号:H149-2)、肌红蛋白(MB)试剂盒(批号:H150)均购自南京建成生物工程研究所;乌头碱标准品(批号:110797-201108,纯度:98%)、新乌头碱标准品(批号:110799-201107,纯度:98%)、次乌头碱标准品(批号:110798-201307,纯度:98%)均购自中国食品药品检定研究院;单宁酸标准品(北京盛世康普化工技术研究院,批号:160509,纯度:98%);健康人血浆(购自内蒙古人民医院);利血平标准品(上海源叶生物科技有限公司,批号:XA0813YB14,纯度:98%);乙腈(美国 Fisher 公司,批号:A998-4,色谱纯);磷酸盐缓冲溶液(PBS)粉末(北京酷来博科技有限公司,批号:PM5090-10);其余试剂均为分析纯试剂。

1.3 动物

SD 大鼠 40 只,♂,洁净级,体质量(200±20)g,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验动物生产质量合格证号:SCXK(京)2016-0002。购入后,将大鼠饲养于内蒙古医科大学实验动物中心,控制室温为(20±2)℃、相对湿度为72%,12h昼夜交替。饲养期间自由采食、饮水。

2 方法

2.1 生草乌-诃子不同比例配伍对生草乌致大鼠心脏毒性的解毒作用

2.1.1 药液的制备

(1)生草乌混悬液的制备:精密称定生草乌粉末1.2g,加入0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液100mL,搅拌均匀后,制成质量浓度为0.012g/mL的生草乌混悬液,置于4℃冰箱中保存,待用。(2)生草乌-诃子不同比例配伍的混悬液的制备:分别精密称定生草乌粉末1.2g,按生草乌-诃子(1:3、1:1、3:1)的质量比例,加入不同

质量的诃子混合,加入0.5%CMC-Na溶液100 mL,搅拌均匀后,制备成相应质量浓度生草乌-诃子的混悬液,置于4℃冰箱中保存,待用。

2.1.2 大鼠分组与给药

将40只大鼠随机分为空白对照组、生草乌组和生草乌-诃子(1:3、1:1、3:1)组^[10],每组8只。据文献报道^[11],大鼠出现中毒症状的生草乌给药剂量为0.12 g/kg,所以在本研究中以生草乌剂量为0.12 g/kg计算给药量,即生草乌组大鼠的给药剂量为生草乌0.12 g/kg,生草乌-诃子(1:3)组大鼠的给药剂量为生草乌+0.36 g/kg诃子,生草乌-诃子(1:1)组大鼠的给药剂量为0.12 g/kg生草乌+0.12 g/kg诃子,生草乌-诃子(3:1)组大鼠的给药剂量为0.12 g/kg生草乌+0.04 g/kg诃子,而空白对照组大鼠给予等体积的0.5%CMC-Na溶液。各组大鼠均每天灌胃给药1次,灌胃体积为1 mL/100 g,连续给药28 d。

2.1.3 血清生化指标的检测

大鼠在末次给药30 min后,乙醚麻醉,腹主动脉取血,血液先在冰浴中静置2 h,然后在4℃条件下以3 000 r/min离心10 min,取上清,按试剂盒说明书操作测定大鼠血清中cTn-I、MB含量。

2.1.4 心脏病理切片观察

大鼠麻醉后,腹主动脉取血,处死,迅速取心脏组织,置于4%多聚甲醛溶液中固定24 h,常规脱水、石蜡包埋、切片(5 μm),经苏木精-伊红(HE)染色后,置于荧光倒置显微镜下观察各组大鼠心脏组织的病理学变化。

2.2 平衡透析法联合液质联用技术测定草乌中3种乌头碱的血浆蛋白结合率及诃子中单宁酸对其血浆蛋白结合率的影响

2.2.1 溶液的制备

(1)透析液:透析内液为人血浆,透析外液为PBS(取一袋PBS粉末,用去离子水溶解,定容至1 L,调节pH至7.2,即得PBS)。(2)标准品溶液:分别精密称取1.0 mg的乌头碱、新乌头碱、次乌头碱和单宁酸标准品,各自溶于1 mL的PBS中,得到质量浓度均为1.0 mg/mL的4种物质的单一标准品溶液。(3)内标溶液:精密称取1.0 mg利血平标准品,溶于5 mL甲醇溶液中,得到质量浓度为200.0 μg/mL的利血平内标溶液。

2.2.2 液质联用的检测条件

色谱条件:色谱柱为C₁₈(型号:25002-1,美国Thermo公司);流动相为0.1%甲酸水-乙腈(65:35, V/V);流速为0.2 mL/min;柱温为30℃;进样体积为3 μL。质谱条件:采用电喷雾离子源下的正离子扫描模式,离子化源温度为300℃;毛细管电压为3.5 kV;离子通道水平为50;离子传输管温度为300℃;鞘气压力为40 arb;辅助气压压力为2 arb;扫描模式为一级阳离子全扫模式,用于定量的离子为质荷比为[M+H]⁺ 646.322(乌头碱)、[M+H]⁺ 616.311(次乌头碱)、[M+H]⁺ 632.307(新乌头

碱)。

2.2.3 方法学考察

(1)专属性。精密吸取透析内、外液各300 μL,分别加入一定量的3种乌头碱标准品溶液,按“2.2.4”项下方法处理样本后,按“2.2.2”项下条件进样测定。

(2)标准曲线的制备及定量下限。在透析内、外液中分别加入3种乌头碱的标准品溶液,制备其终质量浓度均分别为3.75、7.5、22.5、37.5、75、150、375 ng/mL的样品溶液,按“2.2.4”项下方法处理样本后,按“2.2.2”项下条件进样测定,以样品质量浓度为横坐标(x)、样品峰面积与内标峰面积之比为纵坐标(y),通过线性回归分析得到标准曲线方程,并以信噪比(S/N)=10计算定量下限。

(3)稳定性和精密度。精密吸取透析内、外液各300 μL,分别加入一定量的3种乌头碱标准品溶液,使其在透析内、外溶液中的终质量浓度分别为2、18、280 ng/mL,每个质量浓度平行制备3份样品,按“2.2.4”项下方法处理后,按“2.2.2”项下条件进样测定,检测配制当日和连续3日的样品浓度,考察日内和日间精密度;以及将同一批样品室温放置1、6、24 h和-20℃反复冻融3次后测定样品的浓度,考察3种乌头碱在室温下放置24 h和-20℃条件下冻融3次的稳定性。

(4)回收率。精密吸取透析内、外液各300 μL,加入一定量的3种乌头碱标准品溶液,使其在透析内、外液中的终质量浓度均为2、18、280 ng/mL,每个样本平行制备3份,按“2.2.4”项下方法处理后,按“2.2.2”项下条件进样测定,记录峰面积并计算方法回收率。

2.2.4 透析液的样本处理

透析结束后,吸取透析外液,加入等量3%三氯乙酸溶液观察是否有血浆蛋白渗漏情况。若无渗漏情况,则分别吸取透析内液样本和透析外液样本各300 μL,置于1.5 mL离心管中,加入3倍量的乙腈沉淀蛋白,加入内标溶液(使样品溶液中利血平的终质量浓度为0.25 μg/mL),然后在4℃条件下以12 000 r/min离心10 min,取上清液进样检测。

2.2.5 草乌中3种乌头碱与健康人血浆的血浆蛋白结合率的测定

首先,将透析袋剪成15~20 cm的小段,在煮沸的蒸馏水中煮沸10 min,冷却后,去离子水彻底清洗透析袋内、外侧各3遍,洗净后将其完全浸没在蒸馏水中,待用。用丝线扎住处理好的透析袋的一端,轻轻除去袋中的水,将空白人血浆(透析内液)2 mL加入透析袋中,并将透析袋的另一端固定。然后将透析袋悬浮于分别含3种乌头碱质量浓度为5、10、20、40、80、160、400 ng/mL的40 mL透析外液(PBS)中,密封瓶口,于37℃水浴锅中平衡透析24 h,按“2.2.4”项下方法处理样本后,按“2.2.2”项下条件进样检测,并计算3种乌头碱的血浆蛋白结合率:血浆蛋白结合率(%)=(c_内-c_外)/c_内×100%,

其中 $c_{内}$ 为测得的透析内液中乌头碱的质量浓度, $c_{外}$ 为测得的透析外液中乌头碱的质量浓度。试验重复3次。

2.2.6 诃子中单宁酸对草乌中3种乌头碱血浆蛋白结合率的影响

取处理好的透析袋,按“2.2.5”项下方法操作并测定单宁酸对草乌中3种乌头碱血浆蛋白结合率的影响,40 mL透析外液中3种乌头碱与单宁酸的比例分别为1:0.5、1:0.1、1:0.075和1:0.025(固定3种乌头碱的质量浓度均为100 $\mu\text{g/mL}$),并不加单宁酸为空白对照。试验重复3次。

2.3 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行统计分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 生草乌-诃子不同比例配伍对生草乌致大鼠心脏毒性的解毒作用考察结果

3.1.1 血清中cTn-I、MB的含量变化

与空白对照组比较,生草乌组和生草乌-诃子(1:3)组大鼠血清cTn-I、MB含量显著增加($P < 0.05$)。与生草乌组比较,生草乌-诃子(1:3、1:1、3:1)组大鼠血清中cTn-I、MB含量均显著降低($P < 0.05$),并且生草乌-诃子(1:1、3:1)组大鼠血清中cTn-I、MB含量较空白对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠血清中cTn-I、MB含量测定结果见表1。

表1 各组大鼠血清中cTn-I、MB含量测定结果($\bar{x} \pm s$, $n = 8$, ng/L)

Tab 1 Determination results of serum contents of cTn-I and MB of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$, ng/L)

组别	cTn-I	MB
空白对照组	288.81 \pm 44.94	208.39 \pm 29.46
生草乌组	461.30 \pm 59.10*	261.95 \pm 89.26*
生草乌-诃子(1:3)组	371.92 \pm 75.07**	215.91 \pm 36.47**
生草乌-诃子(1:1)组	297.39 \pm 98.17*	201.54 \pm 45.31*
生草乌-诃子(3:1)组	272.98 \pm 58.40*	194.91 \pm 53.60*

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与生草乌组比较,** $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. raw *A. kusnezoffii* group, ** $P < 0.05$

3.1.2 心脏病理切片观察结果

HE染色结果显示,空白对照组大鼠心肌组织细胞排列整齐,界限清楚,形态正常,胞核明显,未见心肌纤维破坏。与空白对照组比较,生草乌组大鼠心肌组织病理结构明显改变,心肌细胞排列紊乱,细胞固缩,胞浆淡染,部分细胞变形坏死。生草乌-诃子(3:1)组大鼠心肌细胞病理结构与生草乌组比较有明显改善,与空白对照组相近,细胞排列整齐,形态正常;生草乌-诃子(1:1)组和生草乌-诃子(1:3)组大鼠心肌组织病理结构与生草乌组相比有所改善,可见部分细胞排列整齐,界限清晰,

但与空白对照组比较则还是有一定的损伤,并不能完全恢复正常。各组大鼠心脏病理切片图见图1。

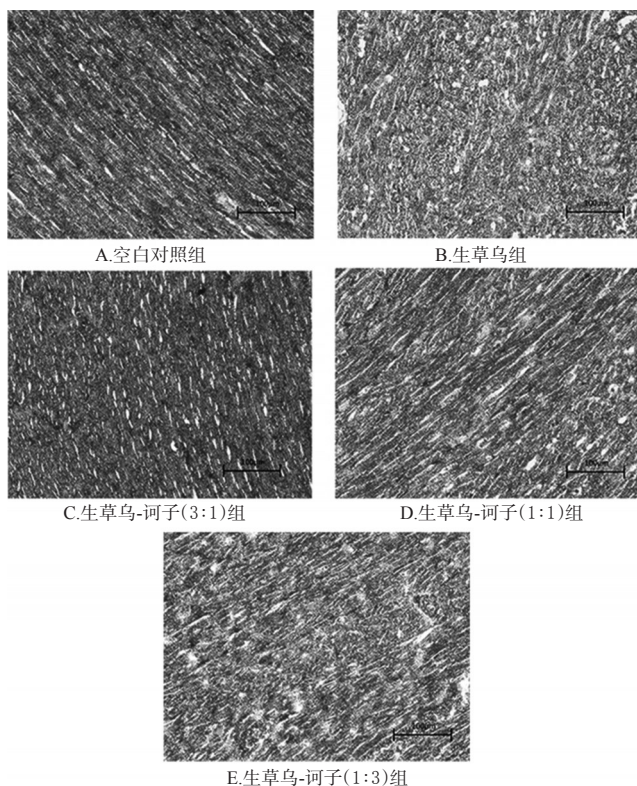


图1 各组大鼠心脏病理切片图($\times 200$)

Fig 1 Pathological section observation of cardiac tissue in each group ($\times 200$)

3.2 草乌中3种乌头碱与人血浆的血浆蛋白结合率测定结果

3.2.1 方法学考察结果

(1)专属性。结果显示,在透析内、外液中,乌头碱、新乌头碱及次乌头碱的保留时间均分别为4.23、3.17、4.18 min,各成分分离良好,未见有杂质峰干扰,提示分析方法可行,色谱图见图2。

(2)标准曲线的制备及定量下限。结果显示,在透析内、外液中,乌头碱、新乌头碱和次乌头碱在测定质量浓度范围内与其峰面积线性关系良好,定量下限均为0.375 ng/mL,结果见表2。

(3)稳定性和精密度。结果显示,在透析内、外液中,3种乌头碱的日内、日间精密度的RSD均小于10% ($n = 3$),符合生物样本含量测定要求;在室温放置1、6、24 h后,3种乌头碱含量的RSD均 $< 10\%$ ($n = 3$),说明样品在24 h内稳定性良好;但在反复冻融3次后,3种乌头碱含量的RSD均 $> 12\%$ ($n = 3$),说明样品的冻融稳定性较差。

(4)回收率。结果表明,3种乌头碱在透析内、外液中的平均方法回收率均在80%~100%之间,RSD均小于10% ($n = 3$),表明该方法的准确度较好,结果见表3。

3.2.2 血浆蛋白结合率测定结果

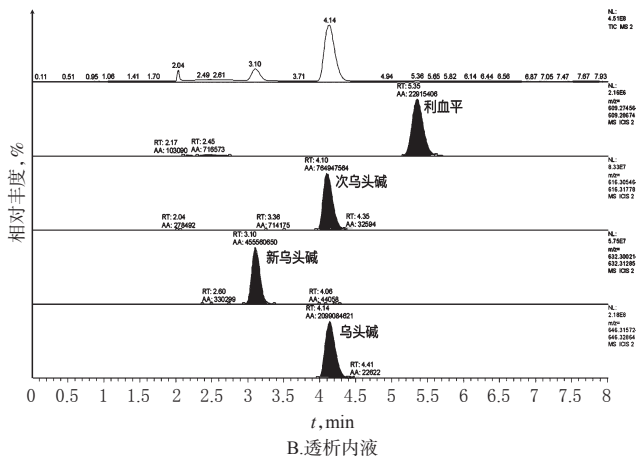
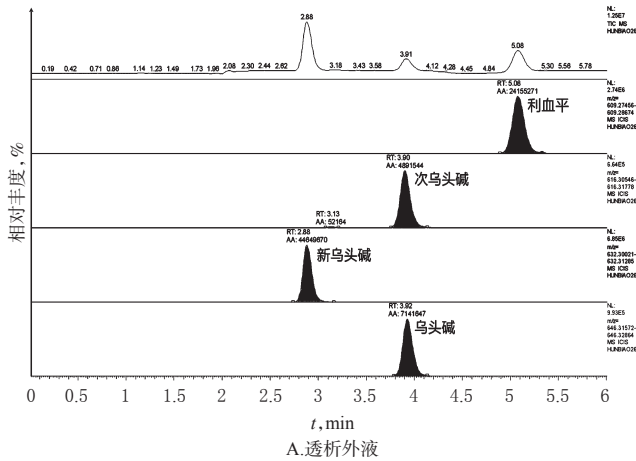


图2 质子流色谱图

Fig 2 Proton flow chromatograms

表2 透析内、外液中乌头碱、新乌头碱、次乌头碱的标准曲线回归方程及定量下限测定结果

Tab 2 Standard curve regression equation and lower quantitation limit of aconitine, mesaconitine and hypaconitine in dialysis tubing inside and outside

化合物	溶液体系	回归方程	R ²	线性范围, ng/mL	定量下限, ng/mL
乌头碱	透析内液	$y=0.0011x+0.0045$	0.9994	3.75~375	0.375
	透析外液	$y=0.005x+0.0033$	0.9997	3.75~375	0.375
新乌头碱	透析内液	$y=0.0003x-0.0023$	0.9995	3.75~375	0.375
	透析外液	$y=0.008x+0.0309$	0.9993	3.75~375	0.375
次乌头碱	透析内液	$y=0.007x-0.0588$	0.9995	3.75~375	0.375
	透析外液	$y=0.008x+0.0072$	0.9997	3.75~375	0.375

3种乌头碱与正常人血浆的血浆蛋白结合率均不高,在27%~35%之间,无明显的浓度依赖性,且同一乌头碱不同质量浓度间的血浆蛋白结合率差异无统计学意义($P>0.05$),结果见表4。

3.2.3 诃子中单宁酸对草乌中3种乌头碱与正常人血浆的血浆蛋白结合率的影响结果

与不加单宁酸的空白对照比较,当3种乌头碱分别与单宁酸以1:0.5、1:0.1和1:0.075的比例配伍时,3种乌头碱与正常人血浆的血浆蛋白结合率均显著降低($P<0.05$);当乌头碱、次乌头碱与单宁酸的配伍比例达

到1:0.025时,3种乌头碱与正常人血浆的血浆蛋白结合率降低不明显($P>0.05$),结果见表5。

表3 不同质量浓度乌头碱、新乌头碱、次乌头碱在透析内、外液中的回收率测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Recovery rates of different concentrations of aconitine, mesaconitine and hypaconitine in dialysis tubing inside and outside($\bar{x} \pm s, n=3$)

化合物	溶液体系	280 ng/mL		18 ng/mL		2 ng/mL	
		回收率, %	RSD, %	回收率, %	RSD, %	回收率, %	RSD, %
乌头碱	透析内液	90.44 ± 3.66	4.1	91.72 ± 6.63	7.2	91.66 ± 6.65	7.3
	透析外液	94.30 ± 8.61	9.1	87.40 ± 4.60	5.3	86.83 ± 4.31	5.0
新乌头碱	透析内液	95.39 ± 3.53	3.7	93.25 ± 2.99	3.2	88.50 ± 6.26	7.1
	透析外液	95.00 ± 2.28	2.4	94.33 ± 2.20	2.3	87.67 ± 2.84	3.2
次乌头碱	透析内液	94.67 ± 2.48	2.6	93.44 ± 4.09	4.4	89.33 ± 3.75	4.2
	透析外液	94.62 ± 2.23	2.4	92.29 ± 3.91	4.2	88.33 ± 5.03	5.7

表4 不同质量浓度乌头碱、新乌头碱、次乌头碱与正常人血浆的血浆蛋白结合率测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 4 Plasma protein binding rate of different concentrations of aconitine, mesaconitine and hypaconitine with normal human plasma($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

质量浓度, ng/mL	乌头碱	新乌头碱	次乌头碱
5	33.04 ± 2.54	27.57 ± 6.80	28.08 ± 1.20
10	27.21 ± 0.55	30.47 ± 2.77	26.06 ± 2.35
20	25.58 ± 5.10	33.99 ± 6.53	26.22 ± 4.81
40	30.48 ± 8.51	28.44 ± 0.94	28.02 ± 2.71
80	28.06 ± 3.11	26.64 ± 4.24	26.06 ± 2.35
160	31.82 ± 9.09	31.67 ± 4.88	29.89 ± 8.02
400	36.18 ± 2.75	31.26 ± 2.5	31.18 ± 2.21

表5 单宁酸对乌头碱、新乌头碱、次乌头碱与正常人血的血浆蛋白结合率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 5 Effects of tannic acid on plasma protein binding rate of aconitine, mesaconitine and hypaconitine with normal human plasma($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	空白对照	单宁酸:3种乌头碱			
		1:0.025	1:0.075	1:0.1	1:0.5
单宁酸:乌头碱	34.56 ± 3.52	36.15 ± 1.21	18.60 ± 0.52*	14.71 ± 2.83*	10.16 ± 1.32*
单宁酸:新乌头碱	32.19 ± 4.33	33.00 ± 1.18	16.97 ± 0.76*	11.22 ± 5.25*	8.72 ± 0.98*
单宁酸:次乌头碱	34.02 ± 3.21	33.68 ± 2.68	17.38 ± 1.39*	10.74 ± 2.71*	7.33 ± 1.09*

注:与空白对照比较, * $P<0.05$

Note: vs. blank control, * $P<0.05$

4 讨论

乌头碱类药物中毒后主要引起恶心、心率失常及组织缺氧,而缺氧组织灌溉不足会引发多脏器功能衰竭^[12],其中的心脏毒性作用是主要致死原因,并且无特效解毒药,在蒙医学中草乌常用于外用,内服多与诃子配伍使用达到“解毒存效”的作用^[13-14]。血清cTn-I属于心肌重要的结构蛋白,是一种复合物,可作为心肌损伤的血清学标志物之一^[15]。另有研究发现,血清中MB对于心肌梗死诊断的灵敏度较高^[16]。因此,本研究选用cTn-I和

MB 这 2 个常见的心肌损害标志物来评价实验动物的心肌损伤情况。本研究结果显示,生草乌有明显的心脏毒性,其可显著提高大鼠血清中 cTn-I、MB 含量,并且对大鼠的心脏组织有明显损伤,出现胞浆淡染,部分细胞变形坏死等情况,这与之前的报道一致^[17-18]。而诃子表现出明显的解毒效果,其中以生草乌-诃子(3:1、1:1)组解毒效果为好。

测定药物血浆蛋白结合率的方法有超滤法、平衡透析法和微透析法等。其中平衡透析法和超滤法较为常用^[19]。目前,尚未见平衡透析法测定 3 种乌头碱的血浆蛋白结合率及单宁酸对其血浆蛋白结合率影响的相关文献报道。本研究通过预试验最后确定了 24 h 的平衡透析时间和 37 ℃ 的透析温度,设置 3 种乌头碱质量浓度均为 5、10、20、40、80、160、400 ng/mL,采用平衡透析法测定人血浆中 3 种乌头碱的蛋白结合率。研究结果表明,3 种乌头碱与人血浆蛋白结合强度低,即在人体内的游离药物浓度均较高。这提示,3 种乌头碱毒副作用较大,治疗窗较窄,血浆中 3 种乌头碱的游离药物的较小波动即会引起药效和毒副作用的变化。

在血浆蛋白结合率的测定试验中,单宁酸与 3 种乌头碱的配伍比例是依据草乌-诃子不同比例配伍中生药含量,与生药中各成分的含量换算成 3 种乌头碱与单宁酸的比例来设置的,其中 3 种乌头碱与单宁酸的配伍比例为 1:0.025 是低于生草乌-诃子(3:1)的配伍比例,1:0.075、1:0.1 的配伍比例则相当于生草乌-诃子(3:1 和 1:1)的配伍比例,1:0.5 的配伍比例则接近与生草乌-诃子(1:3)的配伍比例(严格换算是 1:0.065)。本研究结果表明,当 3 种乌头碱与单宁酸的配伍比例为 1:0.025 时,3 种乌头碱的血浆蛋白结合率与空白对照比较没有明显变化;当比例为 1:0.1 和 1:0.075 时,3 种乌头碱的血浆蛋白结合率降低($P < 0.05$);而当比例达到 1:0.5 时,3 种乌头碱的血浆蛋白结合率进一步降低($P < 0.05$),约为空白对照血浆蛋白结合率的 30%,游离药物浓度进一步升高,在药效增加的同时毒副作用也随之增强。这也初步解释了前述动物实验中出现的生草乌-诃子(1:3)组的解毒效果没有生草乌-诃子(3:1)组的效果好。

综上所述,本研究结果证实了生草乌-诃子以 3:1 的比例配伍对草乌致大鼠心脏毒性的解毒效果最好,其次是生草乌-诃子以 1:1 配伍,而诃子量最大的组即生草乌-诃子按 1:3 配伍后的解毒效果不及前两者好。结合血浆蛋白结合率的结果来看,原因可能是诃子可以降低草乌的血浆蛋白结合率,随着诃子用量的增加,草乌中 3 种乌头碱的血浆蛋白结合率降低,使游离药物浓度超过安全血药浓度从而产生了毒副作用。可知,生草乌-诃子在本研究中解毒作用最佳配伍比例为 3:1,该结果为“诃子解草乌毒”临床应用提供了一定的实验依据。

参考文献

[1] 刘帅,刘晓艳,林森,等.诃子制草乌模拟炮制品在人工胃

液与肠液中的水解行为研究[J].中国药房,2015,26(13):1752-1754.

- [2] 包勒朝鲁,阿润,乌仁高娃,等.蒙医用药草乌适宜采收期的研究[J].中国药理学杂志,2018,53(1):20-24.
- [3] 巴音德力格尔.蒙药诃子的临床价值[J].中国民族医药杂志,2007,13(7):46.
- [4] 曲龙.诃子在中蒙医药中使用的异同及展望[J].中外医疗,2008,27(10):52-53.
- [5] 李志勇,李彦文,图雅,等.乌头属植物在少数民族医药中的应用[J].中央民族大学学报(自然科学版),2010,19(2):72-74.
- [6] 李琴.川乌、草乌的临床应用[C]//首届中国中西医结合风湿病西北学术会议暨培训班论文集.兰州:中国中西医结合学会 甘肃省中西医结合学会,2011:52-55.
- [7] 沈映君.中药药理学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2011:435.
- [8] 张硕峰,吴金英,贾占红,等.附子中乌头碱对大鼠心功能-毒剂量关系测定[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(19):222-225.
- [9] 李建良,梁慧,蔡淑珍,等.基于网络药理学探讨蒙药诃子解草乌心脏毒的机制研究[J].药学报,2018,53(10):1670-1679.
- [10] 刘丹丹,马子兴,张晓菲,等.蒙药“诃子解草乌毒”减毒存效机理的代谢组学[J].中国医院药学杂志,2018,38(15):38-43.
- [11] 林岫,张良玉,林守香.制川乌、制草乌防治化疗后外周神经毒性的经验总结[J].齐齐哈尔医学院学报,2014,35(8):1157-1158.
- [12] 张晓菲,崔雅婷,苗鑫,等.蒙药诃子对草乌致大鼠心脏毒性的保护作用研究[J].中药材,2017,37(4):210-213.
- [13] 高元庆.草乌中毒原因分析和预防措施[J].中国民族民间医药,2013,22(1):37,40.
- [14] 何晓娟,王莉,王冲,等.生草乌对小鼠精神神经系统的毒性作用研究[J].现代预防医学,2007,34(7):1218-1220.
- [15] SOBHY NM, BAYOUMI YH, MOR SK, et al. Outbreaks of foot and mouth disease in Egypt: Molecular epidemiology, evolution and cardiac biomarkers prognostic significance[J]. *J Vet Sci*, 2018. DOI:10.1016/j.jvsm.2018.02.001.
- [16] 黄宁,黄钰莹,马恺.血清超敏 C-反应蛋白、肌红蛋白对急性心肌梗死的诊断价值[J].临床医学研究与实践,2017,2(7):52-53.
- [17] 王亚旭,王嘉伦,王聿成,等.诃子对草乌毒性生物碱含量影响的研究进展[J].现代中药研究与实践,2015,29(2):70-72.
- [18] 风云.蒙药草乌的中毒分析和安全合理用药[J].中国民族医药杂志,2014,20(8):77.
- [19] 林晓彤,郭娜,周翎,等.草乌花总生物碱的纯化工艺研究[J].中国药房,2015,26(31):4396-4398.

(收稿日期:2018-12-17 修回日期:2019-04-09)

(编辑:林 静)