

雪上一枝蒿总碱及其主要二萜生物碱的急性毒性研究

苏东雪 庄馨璞 何芳雁 周志宏 马晓霞*
 云南中医药大学 云南昆明 650500

摘要: **目的** 研究雪上一枝蒿总碱及其五个主要二萜生物碱乌头碱、3-去氧乌头碱、尼奥灵、12-表-15-乙酰欧乌头碱、12-表-欧乌头碱对小鼠的急性毒性作用, 为雪上一枝蒿总碱注射液的安全性评价提供参考。**方法** 采用昆明种小鼠, 以肌肉注射单次给药进行急性毒性实验, 雪上一枝蒿总碱、乌头碱、3-去氧乌头碱、尼奥灵用半数致死量(median lethal dose, LD₅₀)进行检测, 12-表-15-乙酰欧乌头碱、12-表-欧乌头碱用最大给药量进行检测。**结果** 雪上一枝蒿总碱、乌头碱、3-去氧乌头碱、尼奥灵小鼠肌肉注射的 LD₅₀ 分别为 6.48、0.32、2.36、300.86mg/kg; 12-表-15-乙酰欧乌头碱、12-表-欧乌头碱小鼠肌肉注射的最大给药量分别为 220、100mg/kg。**结论** 雪上一枝蒿总碱及五个二萜生物碱成分均具有一定毒性, 其中毒性最大的是双酯型生物碱, 其他生物碱毒性较低, 雪上一枝蒿总碱毒性居于两者之间。

关键词: 雪上一枝蒿总碱; 二萜生物碱; 急性毒性; 安全性

The Research on the Acute Toxicity of Total Alkaloid and its Main Diterpenoid Alkaloids Isolated from the *Aconitum brachypodum* Diels

Dongxue Su, Xinying Zhuang, Fangyan He, Zhihong Zhou, Xiaoxia Ma*
 Yunnan University of Chinese Medicine, Yunnan Kunming 650500

Abstract: Objective To evaluate the acute toxicity of total alkaloid of *Aconitum brachypodum* and its five main diterpenoid alkaloids, aconitine, 3-deoxyaconitine, neoline, 12-epi-15-acetylaconitine and 12-epi-aconitine, and to provide reference for the safety evaluation of total alkaloids injection of *Aconitum brachypodum*. **Methods** The acute toxicity were observed on Kunming mice by single intramuscular injection. The median lethal dose (LD₅₀) of total alkaloid, aconitine, 3-deoxyaconitine and neoline was calculated, and the maximum dose of 12-epi-15-acetylaconitine and 12-epi-aconitine was detected. **Results** The LD₅₀ of total alkaloid, aconitine, 3-deoxyaconitine and neoline were 6.48, 0.32, 2.36 and 300.86 mg/kg respectively, and the maximum doses of 12-epi-15-acetylaconitine and 12-epi-aconitine were 220 and 100 mg/kg by intramuscular injection in mice. **Conclusion** The total alkaloids and five diterpenoid alkaloids of *Aconitum brachypodum* have certain toxicity. Aconitine is the most toxic followed by total alkaloids and 3-deoxyaconitine. Neoline, an ethanolamine alkaloid, and two C-20 alkaloids are less toxic.

Keywords: total alkaloid of *Aconitum brachypodum*; diterpenoid alkaloid; acute toxicity; security

雪上一枝蒿为毛茛科乌头属植物短柄乌头 (*Aconitum brachypodum* Diels) 的干燥块根^[1]。药典记载其性温, 味苦、辛, 有大毒, 临床主要用于治疗风湿疼痛、关节炎、跌打损伤等。雪上一枝蒿临床治疗量和中毒量十分接近, 剂量掌握不当极易中毒, 严重者会引起昏迷甚至死亡^[2], 中毒表现主要为神经系统毒性和心脏毒性相关症状。单味制剂雪上一枝蒿片、雪上一枝蒿总碱注射液收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》中药成方制剂第二十册^[3], 制剂的质量控制是以雪上一枝蒿甲素作为对照品, 用紫外分光光度法测定总生物碱含量。显然, 对雪上一枝蒿这种剧毒药品而言, 仅用单一成分作为质量控制的指标是不严谨的, 应对其毒性成分进行全面的评估, 并基于物质基础采用多种成分指标进行质量控制, 这样才是控

制临床用药安全性的关键。因此需要对雪上一枝蒿制剂中化学成分的急性毒性进行全描述, 可以将有效但毒性较低的成分作为制剂提升的控制标准, 从而把控制剂临床使用的有效性和安全性。

本课题组前期研究工作以及文献报道表明, 雪上一枝蒿中主要成分为乌头烷型二萜生物碱^[4,5,6,7], 这类成分的活性和毒性特点是乌头烷 8 位、14 位如果被酯化 (双酯型生物碱), 其活性迅速提高, 但其毒性也随之增大, 导致用药安全窗变窄, 而 8 位、14 位不被酯化 (醇胺型生物碱), 其活性虽然没有那么强烈, 但其毒性也低, 且给临床用药留下了足够宽的安全窗范围。前者以乌头碱为代表, 后者以雪上一枝蒿甲素、尼奥灵等为代表。作者研究表明^[8], 根据所含生物碱中双酯型和醇胺型成分比例的不同, 雪上一枝蒿药材可分为双

酯型、醇胺型和混合型: 双酯型药材中含双酯型生物碱为主, 醇胺型含量少; 醇胺型药材中含醇胺型生物碱为主, 双酯型含量较少; 混合型药材中则双酯型和醇胺型生物碱均有, 且含量基本相当。

本文对云南昆明市东川区雪上一枝蒿栽培药材(混合型)中分离到的总生物碱、双酯型生物碱(乌头碱、3-去氧乌头碱)、醇胺型生物碱(尼奥灵、12-表-15-乙酰欧乌头碱、12-表-欧乌头碱)进行了急性毒行比较研究, 进一步验证雪上一枝蒿药材主要毒性的成分来源, 为更好控制雪上一枝蒿临床用药安全性提供科学支撑。

一、仪器和材料

1.1 药品和试剂

乌头碱、3-去氧乌头碱、尼奥灵、12-表-15-乙酰欧乌头碱、12-表-欧乌头碱均为本课题组从雪上一枝蒿总碱中分离得到; 0.9%氯化钠注射液(双鹤药业); 化学试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

JA-20001 电子天平(广州玉治仪器有限公司); AB265-S 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); 4℃冰箱(BCD-290W, 青岛海尔股份有限公司)。

1.3 实验动物

SPF 级昆明种小鼠, 由昆明医科大学实验动物学部提供, 生产许可证号: SCXK(滇)K2020-0004, 体重 18-22g, 雌雄兼用, 于实验条件下适应性饲养 3~5 天。

二、实验方法

2.1 药物配制

各取雪上一枝蒿总碱、乌头碱、3-去氧乌头碱、尼奥灵、12-表-15-乙酰欧乌头碱、12-表-欧乌头碱, 加浓盐酸和无水乙醇(浓盐酸: 无水乙醇=1:20)溶解, 再加 0.9%氯化钠注射液配制成所需浓度的溶液, 置 4℃冰箱中保存备用。

2.2 半数致死量实验^[9,10,11]

经预实验, 雪上一枝蒿总碱、乌头碱、3-去氧乌头碱、尼奥灵以最大浓度、最大体积肌肉注射给药, 5min 后小鼠自发活动减少, 呼吸急促, 俯卧不动, 抽搐, 15min 后开始出现死亡, 动物死亡率均为 100%。调整给药浓度进行预试, 得出 100%小鼠死亡的剂量 D_m 和 0%小鼠死亡的剂量 D_n , 在这两个剂量之间, 按比例各

设置 5 个剂量组, 另设空白对照组, 每组 12 只。给药后每日上、下午各观察 1 次, 连续观察 14 天, 记录所有小鼠出现的症状及死亡情况, 对实验期内死亡的小鼠和实验结束后处死的小鼠进行尸体解剖, 观察各脏器的病理变化。以 Bliss 法计算小鼠 LD_{50} 及 95%置信区间。

2.3 最大给药量实验^[9,10,11]

经预实验, 12-表-15-乙酰欧乌头碱和 12-表-欧乌头碱以最大浓度、最大体积肌肉注射给药后动物无死亡, 无法测定其对小鼠的 LD_{50} 和最大耐受剂量, 因此对最大给药量进行测定。取昆明种小鼠 36 只, 雌雄各半, 分 3 组, 12-表-15-乙酰欧乌头碱组、12-表-欧乌头碱组和空白对照组, 每组 12 只。根据预实验确定的最大给药量, 12-表-15-乙酰欧乌头碱组和 12-表-欧乌头碱组分别肌肉注射相应溶液, 空白对照组肌肉注射空白溶剂体系。给药后连续观察 14 天, 期间正常饮食。记录所有小鼠出现的症状, 定时测定进食量和动物体重, 实验结束后解剖并观察动物各脏器的病理变化。

2.4 统计学分析

用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据比较用单因素方差分析, 组间两两比较用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 具有统计学差异。

三、结果

3.1 半数致死量实验

小鼠急性毒性实验结果见表 1, 从死亡情况看, 雌雄动物死亡没有大的偏差, 说明毒性与动物的性别不相关。死亡动物立即进行解剖, 检查肝、肾、肺、心脏、脾、胃等脏器, 肉眼观察均未发现明显异常。给药 14 天后解剖所有存活小鼠并观察主要脏器, 存活的给药组小鼠与对照组小鼠均未见明显异常。采用 Bliss 法计算得出雪上一枝蒿总碱小鼠肌肉注射的 LD_{50} 值为 6.48mg/kg, 95%置信区间为 5.69-7.37mg/kg; 乌头碱小鼠肌肉注射的 LD_{50} 值为 0.32mg/kg, 95%置信区间为 0.26-0.42mg/kg; 3-去氧乌头碱小鼠肌肉注射的 LD_{50} 值为 2.36mg/kg, 95%置信区间为 1.90-2.94mg/kg; 尼奥灵小鼠肌肉注射的 LD_{50} 值为 300.86mg/kg, 95%置信区间为 257.51-351.90mg/kg。毒性大小依次为乌头碱 > 3-去氧乌头碱 > 雪上一枝蒿总碱 > 尼奥灵。

表 1 小鼠急性毒性实验结果

组别	剂 量 /mg·kg ⁻¹	动 物 数/只	死 亡 数/只	死 亡 率 /%	毒 性 起 效 时 间	毒 性 反 应 症 状	
空白对照组	雌	6	0	0	-	-	
	雄	6	0	0	-	-	
雪上一枝蒿总碱	雌	6	0	0	-	-	
	雄	6	0	0	-	-	
	雌	3.36	6	0	0	-	
	雄	3.36	6	0	0	-	
	雌	4.84	6	1	16.67	30min-24h	自发活动减少
	雄	4.84	6	0	0	-	-
	雌	6.90	6	5	83.33	15min-24h	自发活动减少, 俯卧
	雄	6.90	6	3	50	15min-24h	自发活动减少, 俯卧
乌头碱	雌	6	6	100	3min-24h	干呕, 俯卧, 叫声异常, 抽搐, 死亡	
	雄	6	6	100	3min-24h	干呕, 俯卧, 叫声异常, 抽搐, 死亡	
	雌	9.86	6	6	100	3min-24h	干呕, 俯卧, 叫声异常, 抽搐, 死亡
	雄	9.86	6	6	100	3min-24h	干呕, 俯卧, 叫声异常, 抽搐, 死亡
	雌	14.04	6	6	100	3-60min	俯卧, 叫声异常, 抽搐, 死亡
	雄	14.04	6	6	100	3-60min	俯卧, 叫声异常, 抽搐, 死亡
	雌	0.09	6	0	0	15min-8h	自发活动减少
	雄	0.09	6	0	0	15min-8h	自发活动减少
3-去氧乌头碱	雌	6	0	0	10min-12h	自发活动减少, 俯卧	
	雄	6	0	0	10min-12h	自发活动减少, 俯卧	
	雌	0.14	6	0	0	10min-12h	自发活动减少, 俯卧
	雄	0.14	6	0	0	10min-12h	自发活动减少, 俯卧
	雌	0.22	6	1	16.67	10min-24h	俯卧, 叫声异常, 干呕
	雄	0.22	6	2	33.33	10min-24h	俯卧, 叫声异常, 干呕
	雌	0.34	6	3	50	5-30min	出汗, 俯卧, 叫声异常, 抽搐, 死亡
	雄	0.34	6	5	83.33	5-30min	出汗, 俯卧, 叫声异常, 抽搐, 死亡
尼奥灵	雌	6	5	83.33	2-10min	俯卧, 叫声异常, 抽搐, 死亡	
	雄	6	4	66.67	2-10min	俯卧, 叫声异常, 抽搐, 死亡	
	雌	0.52	6	0	0	-	-
	雄	0.52	6	0	0	-	-
	雌	0.86	6	0	0	30min-4h	自发活动减少
	雄	0.86	6	0	0	30min-4h	自发活动减少
	雌	1.44	6	1	16.67	10min-24h	自发活动减少, 腹泻
	雄	1.44	6	0	0	10min-24h	自发活动减少, 腹泻
乌头碱	雌	6	3	50	10min-24h	干呕, 俯卧, 叫声异常, 抽搐, 死亡	
	雄	6	2	33.33	10min-24h	干呕, 俯卧, 叫声异常, 抽搐, 死亡	
	雌	4.00	6	6	100	5-20min	俯卧, 叫声异常, 抽搐, 死亡
	雄	4.00	6	6	100	5-20min	俯卧, 叫声异常, 抽搐, 死亡
	雌	89.25	6	0	0	-	-
	雄	89.25	6	0	0	-	-
	雌	137.31	6	0	0	20min-4h	自发活动减少
	雄	137.31	6	0	0	20min-4h	自发活动减少
尼奥灵	雌	6	0	0	10min-24h	自发活动减少, 俯卧	
	雄	6	1	16.67	10min-24h	自发活动减少, 俯卧	
	雌	325.00	6	3	50	5min-24h	干呕, 俯卧, 叫声异常, 抽搐, 死亡
	雄	325.00	6	4	66.67	5min-24h	干呕, 俯卧, 叫声异常, 抽搐, 死亡
	雌	500.00	6	6	100	5-30min	俯卧, 叫声异常, 抽搐, 死亡
	雄	500.00	6	6	100	5-30min	俯卧, 叫声异常, 抽搐, 死亡

3.2 最大给药量实验

给药后连续观察 14 天, 未发现小鼠出现中毒症状及死亡情况, 小鼠自主活动、毛色、摄食等一般生理特征也未发现异常。14 天后解剖观察主要脏器, 给药组小鼠与对照组小鼠均未见明显异常。与各自的空白对照组比较, 雌、

雄给药组小鼠的进食量、体重均无显著性差异($P>0.05$), 且给药组雌、雄小鼠的体重在观察期间均不断增长, 增长趋势与对照组相近, 见表 2-3。最终得出 12-表-15-乙酰欧乌头碱小鼠肌肉注射最大给药量为 220mg/kg, 12-表-欧乌头碱小鼠肌肉注射最大给药量为 100mg/kg。

表 2 急性毒性实验 14 天药物对小鼠进食量的影响(x)

组别	动物数/只	给药后进食量/g·只 ⁻¹ ·天 ⁻¹														
		1 天	2 天	3 天	4 天	5 天	6 天	7 天	8 天	9 天	10 天	11 天	12 天	13 天	14 天	
对照组	雌	6	2.94	3.66	3.54	3.70	3.76	3.70	4.04	4.48	4.34	4.42	4.70	4.20	4.54	3.96
	雄	6	3.16	3.52	3.68	4.34	4.38	4.30	4.78	4.86	4.76	4.76	5.40	5.50	5.70	5.78
12-表-15-乙酰欧乌头碱	雌	6	2.98	4.02	3.70	4.32	4.52	3.90	4.58	4.90	4.48	4.44	5.00	4.78	5.24	4.72
	雄	6	3.08	3.62	4.26	4.04	4.46	3.84	5.16	5.16	4.68	5.10	5.24	5.34	5.68	5.54
12-表-欧乌头碱	雌	6	2.36	3.52	3.52	4.12	4.04	3.80	4.08	4.32	4.28	4.06	4.90	4.56	4.66	4.36
	雄	6	2.50	3.04	3.82	3.80	3.88	3.70	4.02	4.72	4.26	4.82	5.48	5.04	5.86	5.88

表 3 急性毒性实验 14 天药物对小鼠体重的影响(x±s)

组别	动物数/只	给药前体重/g	给药后体重/g							
			第 2 天	第 4 天	第 6 天	第 8 天	第 10 天	第 12 天	第 14 天	
对照组	雌	6	19.64±0.94	23.26±1.15	25.52±1.27	28.62±1.32	30.92±1.36	33.22±2.01	34.44±2.06	34.40±2.22
	雄	6	19.98±1.46	24.28±2.08	27.16±2.36	30.56±2.05	33.78±2.11	36.80±1.92	38.90±2.47	41.24±2.72
12-表-15-乙酰欧乌头碱	雌	6	19.66±1.07	23.92±1.36	26.16±1.52	28.82±1.41	31.58±1.17	33.10±1.18	34.96±1.32	36.04±0.80
	雄	6	19.90±0.82	23.94±1.19	27.20±1.10	30.30±1.04	34.28±1.23	37.62±2.08	39.82±2.74	42.06±3.68
12-表-欧乌头碱	雌	6	19.64±1.13	22.92±1.07	25.52±1.11	28.24±1.40	30.34±1.49	32.14±2.45	33.94±3.12	34.38±2.89
	雄	6	19.32±1.53	22.90±2.59	26.06±2.45	29.18±2.50	32.84±2.54	35.68±2.56	38.14±2.52	40.70±3.00

四、讨论

本文对雪上一枝蒿总碱及其主要二萜生物碱组分的小鼠急性毒性进行了初步探究,根据研究结果,得出如下结论:

(1) 雪上一枝蒿总碱毒性来源于药材所含的二萜生物碱,其中双酯型生物碱是毒性的主要提供者,其毒性指数是醇胺型生物碱的 100 倍以上,比如乌头碱、3-去氧乌头碱小鼠肌肉注射的 LD₅₀ 值依次为 0.32、2.36mg/kg,而尼奥灵则为 300.86mg/kg,即可初步认为乌头碱、3-去氧乌头碱的毒性是尼奥灵的 940 倍和 127 倍。

(2) 从化学结构可看出,乌头碱、3-去氧乌头碱均为双酯型生物碱,但 3-去氧乌头碱 3 位上没有羟基取代,其 LD₅₀ 是乌头碱的 7.31 倍,说明 3 位脱去羟基可降低毒性。12-表-15-乙酰欧乌头碱、12-表-欧乌头碱为 C-20 型生物碱,区别在 15 位上,12-表-15-乙酰欧乌头碱为乙酰基,12-表-欧乌头碱为羟基,实验发现两者的毒性相差不大,说明 15 位乙酰化后对毒性影响较小。

(3) 性别可能会影响毒性表现,动物的进食量和体重的变化在一定程度上可以反映出动物的中毒情况。本实验结果表明,所有检测的生物碱在致死情况、体重和

进食量上都没有表现出雌雄的差异,且体重变化和进食量均与各自的对照组接近,说明乌头类生物碱引发的毒性与性别没有相关性。

(4) 雪上一枝蒿总生物碱毒性介于双酯型和醇胺型生物碱之间,但显然其毒性大小取决于总生物碱中不同的双酯型~醇胺型生物碱比例,即总生物碱中双酯型生物碱所占比例高,其毒性就大;反之,则毒性变小。控制雪上一枝蒿药材、制剂的安全性,主要就是控制其中双酯型生物碱的含量及比例。从现有研究数据来看,在总生物碱中完全去除乌头烷型双酯型生物碱,则临床用药中可基本杜绝中毒反应,这为雪上一枝蒿基于安全性提升的产品和工艺开发提供了方向。

参考文献:

- [1] 云南省卫生厅,云南省药品标准(1996年版)[M].昆明:云南大学出版社,1996:95-96.
- [2] 唐红艳,陈晓兰,吴玉梅,等.雪上一枝蒿甲素微透析探针体外回收率研究[J].中国中药杂志,2016,41(13):2538-2542.
- [3] WS3-B-4005-98-1998,中华人民共和国卫生部药品标准[S].

[4] 彭海燕,张彬若,周志宏,等. 云南东川雪上一枝蒿栽培品的化学成分研究[J]. 中药材,2022,45(12):2863.

[5] 韩东铁. 雪上一枝蒿的化学成分与药理作用研究概况[J]. 延边大学医学学报,2007,30(3):223.

[6] 吴玉梅,陈晓兰,魏文珍,等. 雪上一枝蒿的研究进展[J]. 黔南民族医专学报,2015,28(2):98.

[7] 杨立国,夏伟军,唐梦云,等. 雪上一枝蒿化学成分和药理作用研究概况 [J]. 云南中医学院学报,2016,39(6):95.

[8] 彭海燕,马晓霞,周志宏,等. 雪上一枝蒿药材化学型鉴别研究[J]. 中国民族民间医药,2023:接收发表待刊.

[9] 中华人民共和国卫生部药政管理局. 中药新药研究指南(药学、药理学、毒理学) [M].北京:中华人民共和国药

政管理局,1994:203.

[10] 陈奇.中药药理研究方法学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:107-110.

[11] 段小花,马晓霞,陈艳林,等.不同剂量和煎煮时间的附子煎剂对小鼠非特异性免疫和毒性的影响[J].时珍国医国药,2019,30(02):345-347.

作者简介: 苏东雪(1997-),女,云南宣威人,正在攻读中药学专业的硕士学位。

*通讯作者: 马晓霞(1980-),女,云南大理人,副研究员。研究方向: 中药质量控制。

基金项目: 昆明市科技计划项目(No.2019-1-N-25318000002197); 云南省科技计划项目(No.2019ZF003)