

佯药益气通络方单药和组方成分对比及急性毒性研究*

海青山¹, 赵杰², 左爱学³, 金亚菊⁴, 李明明⁵,
高磊¹, 李仪杰⁴, 王丽欢⁴, 温伟波^{2Δ}

(1. 云南中医药大学基础医学院, 云南 昆明 650500; 2. 云南中医药大学第一临床医学院, 云南 昆明 650500;
3. 云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500; 4. 云南中医药大学针灸推拿康复学院, 云南 昆明 650500;
5. 云南中医药大学民族医药学院, 云南 昆明 650500)

摘要: 目的 对益气通络方煎煮过程中是否有新的化合物产生进行分析, 并对全方的急性毒性进行研究。
方法 通过高效液相色谱法(HPLC), 将益气通络方混提的样品和单独煎煮的地桃花、鸡根、滇鸡血藤混合后的溶液进行对比, 分析成分差异; 通过LD₅₀和最大给药量实验检查益气通络方的急性毒性。**结果** 1. 分别提取地桃花、鸡根、滇鸡血藤3味药单独进行HPLC检测, 流速1.0 mL/min, 柱温30℃, 分别以210 nm、254 nm、280 nm和320 nm波长进行检测, 254 nm的吸收图谱最理想; 2. 将地桃花、鸡根、滇鸡血藤3味药水提液按比例混匀, 在254 nm波长下与整方混提的HPLC吸收图谱进行比较, 2个谱图的吸收峰紫外光谱对应的位置和形态基本一致, 除少数吸收峰的幅度略有差异外, 波形的拟合度较高; 3. 检测益气通络方LD₅₀, 8个浓度梯度均未见动物死亡和明显的毒性反应; 4. 益气通络方溶解至最大浓度, 一次性给予最大灌胃量, 折合给药量为246.9 g/kg, 仍未见到动物死亡和明显毒性反应。**结论** 1. 益气通络方和地桃花、鸡根、滇鸡血藤单药煎煮后混合相比, 并未出现明显的成分改变; 2. 在急性毒性动物实验中, 益气通络方未见明显的不良反应。

关键词: 佯药; 益气通络方; 地桃花; 鸡根; 滇鸡血藤; 急性毒性

中图分类号: R284.1; R285 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2022)01-0059-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2022.01.012

Comparison of Components of Wa Nationality Medicine Yiqi Tongluo Formula and Every Herb of It and Inspect the Acute Toxicity

HAI Qingshan¹, ZHAO Jie², ZUO Aixue³, JIN Yaju⁴, LI Mingming⁵,
GAO Lei¹, LI Yijie⁴, WANG Lihuan⁴, WEN Weibo²

(1. Department of Basic Medical Sciences, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;
2. First Department of Clinical Medical, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;
3. Department of Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;
4. Department of Acupuncture and Massage and Rehabilitation, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;
5. Department of Ethnomedicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: Objective To analyze whether there are new compounds in the decoction of Yiqi Tongluo formula, and study the acute toxicity of the whole formula. **Methods** Through high performance liquid chromatography (HPLC), compare the samples of Yiqi Tongluo formula with the mixed solution of separately decocted Urena lobata, Polygala arillata and Caulis Kadsurae, and analyze the differences of components; Study the acute toxicity of Yiqi Tongluo formula by examining

收稿日期: 2021-12-08

* 基金项目: 云南省科技厅科技计划项目(2019ZF005); 云南省科学技术厅-云南中医药大学应用基础研究联合专项资金项目(202001AZ070001-026)

第一作者简介: 海青山(1981-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 中西医结合基础。

Δ通信作者: 温伟波, E-mail: 850923441@qq.com

LD₅₀ and maximum dose experiment. **Results** 1. The three samples of *Urena lobata*, *Polygala arillata* and *Caulis Kadsurae* were tested by HPLC separately, the flow velocity was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 °C, and the wavelengths of 210 nm, 254 nm, 280 nm and 320 nm were detected respectively, the best absorption spectrum was 254 nm. 2. Mix the solutions of *Urena lobata*, *Polygala arillata* and *Caulis Kadsurae* in proportion, and compared with Yiqi Tongluo formula by HPLC in the wavelength of 254 nm. The positions and forms of the absorption peaks of the UV spectra in the two spectrogram were basically the same, except that the amplitudes of minority absorption peaks were slightly different, the fitting degree of the waveform was high. 3. No animal death and none obvious toxic reaction were found in the 8 concentration gradients of Yiqi Tongluo formula when determine LD₅₀. 4. Yiqi Tongluo formula was dissolved to the maximum concentration, and the maximum intragastric dose was given at one time, as high as to 246.9 g/kg, also no animal death and obvious toxic reactions were seen. **Conclusion:** 1. Compared with the mixture of the *Urena lobata*, *Polygala arillata* and *Caulis Kadsurae* which were decocted separately, Yiqi Tongluo recipe had no significant changes in composition. 2. In the animal experiment of acute toxicity, Yiqi Tongluo formula has no obvious adverse reactions.

KEY WORDS: Wa Nationality medicine; Yiqi Tongluo formula; *Urena lobata*; *Polygala arillata*; *Caulis Kadsurae*; acute toxicity

佤族医药是民族医药的重要组成部分,有其独特的用药经验,但由于缺乏文字,没有形成完整的理论体系且多有散失,亟待整理研究^[1]。依据前期调研结果,本课题组选取3味佤族常用药拟成益气通络方。方中以地桃花为君,味甘、辛,性平,具有益气补虚,祛风利湿之功效;鸡根为臣,味甘,性温,具有补气活血,祛风利湿之效;佐以滇鸡血藤,味苦、甘,性温,具有活血补血,舒筋通络之功,3药合用共奏益气活血、通络止痛之功法。全方重用补气药,配伍少量活血药,使祛瘀通络以治标,气旺血行以治本,对气虚血瘀为根本病机的多种风湿痹证达到标本兼顾的效果。前期实验证明,该方可增加糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)模型大鼠坐骨神经LC3-II及Beclin1蛋白的表达,下调p62表达,促进自噬的发生,显著改善DPN大鼠神经元病理表现^[2]。鉴于地桃花、鸡根、滇鸡血藤3味药的化学成分研究较多,本文试着以3味单药为参照,对比混合煎煮和单独煎煮的成分变化,推测益气通络方的化学成分,并对该方的急性毒性进行研究。

1 材料与方

1.1 试剂与仪器 地桃花、鸡根、滇鸡血藤生药采自云南省临沧市沧源佤族自治县,经云南中医药大学药物鉴定教研室鉴定为正品。Agilent-1100高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司)、T-1000型电子天平[美国双杰(兄弟)集团有限公司],AB265-S型分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]、乙腈-磷酸水溶液。

1.2 动物 昆明种小鼠(贝斯福(北京)生物技术有

限公司,动物许可证号:SCXK(京)2019-0010;实验单位使用许可证号:SYXK(滇)K2018-0003),体质量18~22 g。

1.3 方法

1.3.1 药材煎煮 称取地桃花4 g,鸡根3 g,鸡血藤6 g分别放入500 mL烧杯中,另取益气通络方样品13 g(按原方比例,地桃花:鸡根:鸡血藤=4:3:6)也放入500 mL烧杯中。加入10倍量的蒸馏水,将烧杯置于98 °C恒温水浴锅中加热2 h,将提取药液用布氏漏斗抽滤,得到滤液后经旋转蒸发仪蒸干得到各样品的浸膏,各组的浸膏重量分别为鸡血藤0.2 g,鸡根0.1 g,地桃花1.2 g及益气通络方混提样品1.4 g。

1.3.2 益气通络方不同煎煮方式的成分对比 高效液相色谱法检测,色谱条件:Diamonsil C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)进行梯度洗脱,流速1 mL/min,柱温30 °C,检测波长分别为210 nm、254 nm、280 nm和320 nm。

1.3.3 急性毒性实验 小鼠100只,雌雄各半,禁食不禁水12 h后,按性别比例各半随机分为10组。参照人和动物间体表面积折算等效剂量的比值^[3],以体表面积换算成小鼠的等效剂量为每天8.38 g/kg,选择组间比例0.7依次递增,共设计8个剂量组,分别为8.38、11.97、17.1、24.43、34.9、49.86、71.23、101.76 g/kg;溶媒对照组,给予等容积30 mL/kg生理盐水。每组10只,灌胃给药,单次给药后,观察各组动物的急性毒性反应和死亡情况,观察14 d后全部处死。根据动物的死亡情况以Bliss法计算LD₅₀。另有1个最大浓度剂量组,即将浸膏溶至最大浓度,给予最大灌胃量,观

察动物死亡和毒性反应情况。实验过程中,死亡动物或观察期满即处死动物,解剖观察它们的器官是否存在异常。

1.4 统计学处理 采用 SPSS14.0 软件对采集到的数据进行分析。 LD_{50} 计算采用 Bliss 法,计量资料的组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 时有统计学意义。

2 结果

2.1 益气通络方不同煎煮方式的成分对比 以醇提

和水提 2 种不同的方法提取鸡血藤、鸡根、地桃花,进样量:10.0 μL 分别以 210 nm、254 nm、280 nm 和 320 nm 波长进行 HPLC 检测,考虑到基线的稳定性、吸收峰的差异性和临床用药习惯等因素,最终选取水提样品以 254 nm 波长测得 HPLC 图谱为主要参考,结果如图 1、图 2、图 3 所示。可见,在相同进样量和检测条件的情况下,鸡根和地桃花的水提取物中化学成分更丰富。

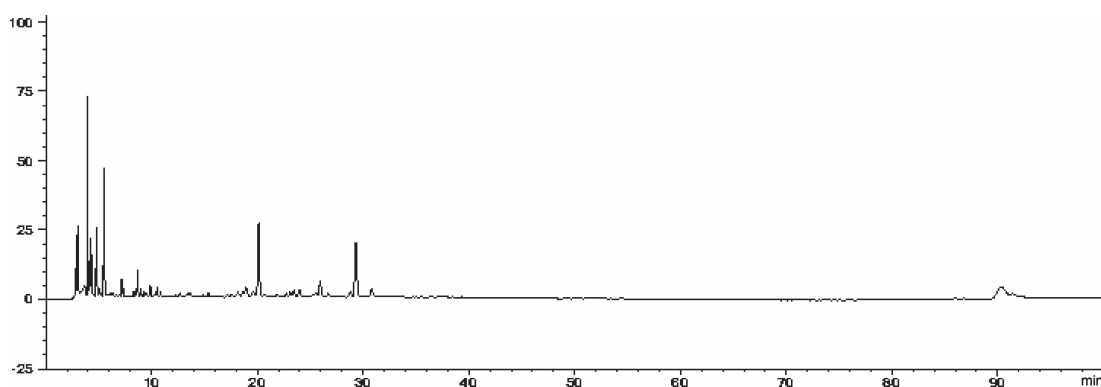


图 1 地桃花水提取物 HPLC 指纹图谱(254 nm)

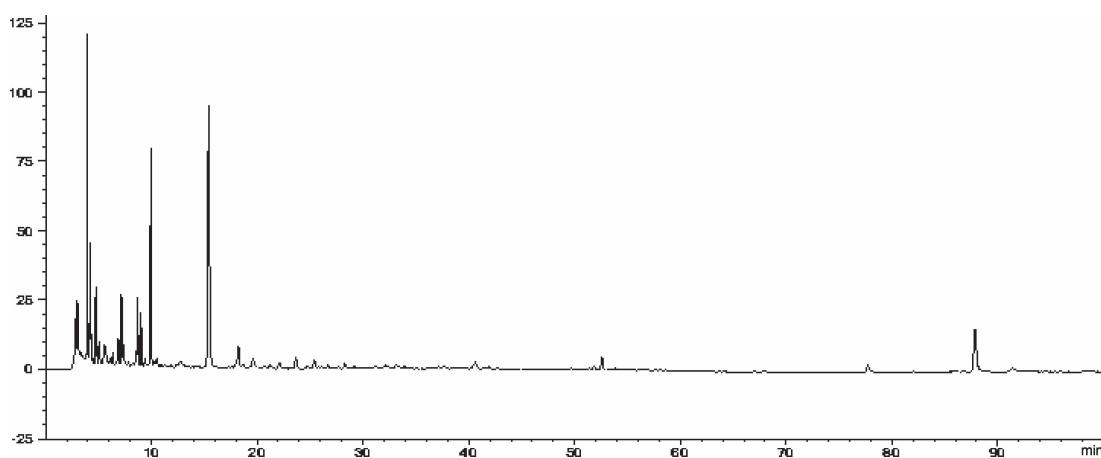


图 2 鸡根水提取物 HPLC 指纹图谱(254 nm)

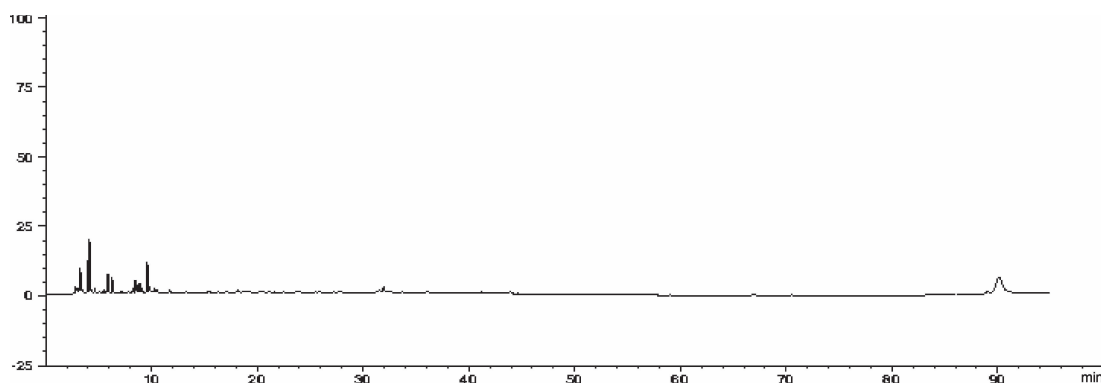


图 3 滇鸡血藤水提取物 HPLC 指纹图谱(254 nm)

按照生药比例地桃花:鸡根:鸡血藤 = 4:3:6 将 3 药水提物混合,得到提取物的混合溶液,以 254 nm 波长进行 HPLC 检测,结果如图 4 所示,其主要

吸收峰基本出现在 30 min 以内,与 3 药单独检测的吸收峰基本对应,只是由于混合比例不同,幅度略有差异。

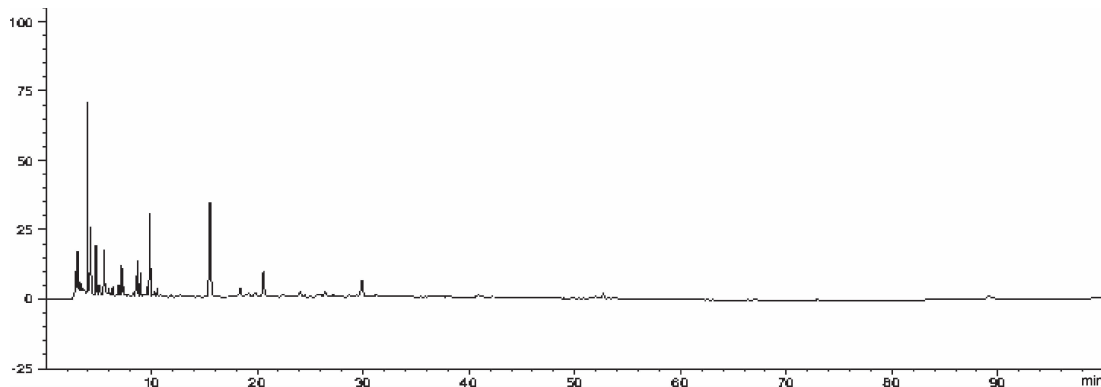


图 4 地桃花、鸡根、鸡血藤水提物混合溶液 HPLC 图谱(254 nm)

以水提的方法得到益气通络方(地桃花:鸡根:鸡血藤 = 4:3:6 混合)的提取物,分别以 254 nm 波长

进行 HPLC 检测,得到指纹图谱,如图 5 所示,其主要吸收峰也出现在约 30 min 以内。

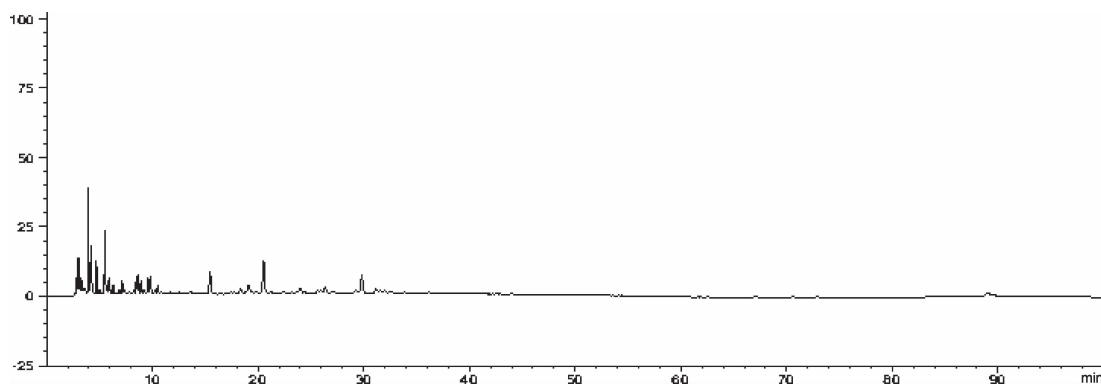


图 5 伍药益气通络方水提物 HPLC 图谱(254 nm)

鉴于以上各谱图的吸收峰均出现在约 30 min 以内,将图 4、图 5 放大对比(如图 6 所示)。除 6、7、8、9、

10 的幅度略有差异外,2 个谱图的吸收峰紫外光谱对应的位置和形态基本一致。

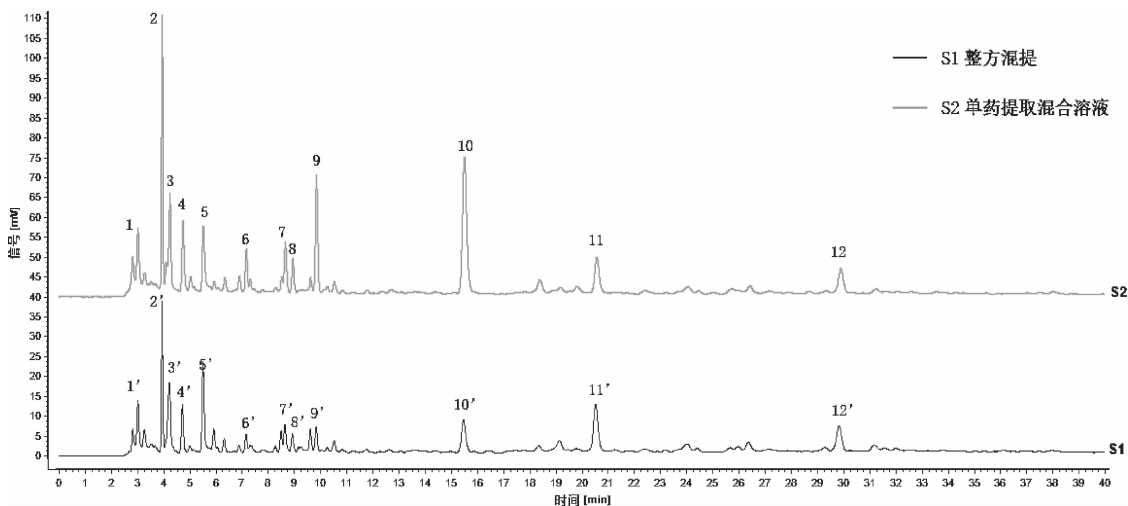


图 6 伍药益气通络方全和 3 药单独提取后混合物的 HPLC 图谱对比(254 nm)

进一步将图 4 和图 5 的 HPLC 图谱进行拟合, 如图 7 所示。与单药提取后的混合溶液相比, 仅 2 处吸收峰混提样品的幅度略升高外, 2 个谱图其余的吸收峰拟合度较高, 或基本低于单药提取后的混合溶液。

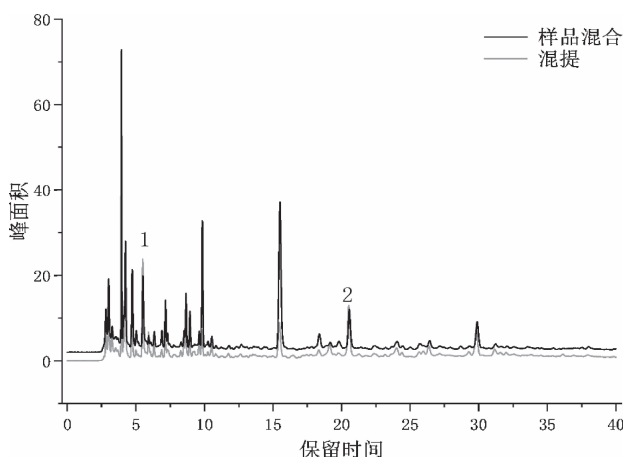


图 7 佹药益气通络方全和 3 药单独提取后混合物的 HPLC 图谱拟合 (254 nm)

2.2 LD_{50} 计算 结果如表 1 所示: 给药浓度从 8.38 g/kg, 以组间比例 0.7 等比设计 8 个剂量组至 101.76 g/kg, 均未见到动物出现死亡的情况, 即 LD_{50} 超过现有浓度的范围, 理论上尚未检测到 LD_{50} 的数值。溶媒对照组 10 只小鼠也未见死亡的情况。

表 1 益气通络方急性毒性试验各组死亡率

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	动物数 /只	死亡动物 数/只	$LD_{50}/95\%$ 可信 区间/(mg·kg ⁻¹)
益气通络方	8.38	10	0	未测到
	11.97	10	0	
	17.1	10	0	
	24.43	10	0	
	34.9	10	0	
	49.86	10	0	
	71.23	10	0	
	101.76	10	0	
溶媒对照	-	10	0	

鉴于以上实验结果, 将益气通络方溶解至最大浓度, 折合生药 8.23 g/mL, 一次性给予最大灌胃量, 即每 10 g 体质量给予 0.3 mL, 折合给药量为 246.9 g/kg。以折合等效剂量 8.38 g/kg 为参照, 最大给药量达

到等效剂量的 29.5 倍, 仍未见到动物出现死亡的情况。结果如表 2 所示。

表 2 益气通络方最大浓度的急性毒性试验死亡率检测

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	动物数 只/	死亡动物数 /只
益气通络方最大剂量	246.9	10	0

2.3 急性毒性一般观察 给药后, 各浓度组动物摄食、饮水、活动、呼吸、探究行为等反应均无明显变化, 各浓度组均无惊厥、抽搐等反应。少数动物出现呕吐、流涎等反应, 由于溶媒对照组也出现类似症状, 考虑到灌胃刺激, 不予纳入毒性表现。观察 14 天后处死动物并解剖, 肉眼检查各组织和脏器的体积、颜色、质地等, 均未见淤血、肿胀、炎症、结节等明显异常。

3 分析

地桃花、鸡根、滇鸡血藤 3 味单药的成分、药理和组方的研究中均有报道。地桃花 (*Urena lobata* L.) 为锦葵科植物肖梵天花的根或全草, 化学成分方面的报道已经较为全面, 已知有 130 多个化合物, 主要包括黄酮类、木脂素类、大柱香波龙烷类、酚酸类等, 是我国佹族、壮族等少数民族常用药, 药理研究显示其具有抗炎、抑菌、抗氧化等作用, 在花红胶囊、花红片、花红颗粒等成药中均有应用, 在广西、湖南等地方标准中已有收录^[4-6]。鸡根 (*Polygala arillata* Buch-Hum) 为远志科植物黄花远志的根茎, 其化学成分包括有三萜皂苷类、香豆素类、生物碱类、黄酮类、挥发油类、酚类、鞣质、糖类、甾醇类及氨基酸类等, 中药材云南地方标准已有收录, 是佹族、白族、彝族、傣族、拉祜族等多个民族的常用药, 广泛用于治疗风湿疼痛、炎症等, 在止咳平喘丸等成药中有应用^[7-9]。滇鸡血藤 (*Kadsura interior* A. C. Smith) 为木兰科植物南五味子的藤茎, 其化学成分主要以木脂素类、三萜类为主要生物活性成分, 此外还含有挥发油、黄酮类等, 是包括佹族在内的云南多个民族的常用药, 中国药典有收录, 药理研究显示其具有免疫调节、抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用, 为复方鸡血藤膏等中成药中的主药^[10-12]。

本文主要对佹药益气通络方的成分和急性毒性进行研究, 即对 3 药混提可能出现的新化合物进行评测, 对其安全性进行评价。首先, 对于 3 药混提和分布提取的成分进行对比, 可以推测, 在混提中和单味药

提取物的混合溶液相比,提取的化学成分在结构方面相同或非常相似,说明在混提的过程中并无新的化合物生成,即在组方过程中并未明显增加其安全性的不确定因素。益气通络方的安全性可以参照单药或其他现有成药的安全性。在LD₅₀的检测过程中,8个梯度浓度均无动物死亡。以最大浓度和最大灌胃量给药,给药量为246.9 g/kg,折合生药给药量达到等效剂量的29.5倍,接近动物体重的四分之一,仍未见动物死亡,且生存状态良好,说明全方的配伍合理,安全性较好。

4 结论

地桃花、鸡根、滇鸡血藤为佤族常用药,当地佤族草医常用这3味药,以改善患者肢体麻、凉、胀、痛等临床症状。但佤医没有经络、气血津液、方剂配伍等理论体系,以对症治疗为主。在民族药深度开发的过程中,应该在少数民族用药经验的基础上,参照中医药性味归经理论,开展组方研究。

益气通络方取地桃花、鸡根、滇鸡血藤3药益气、通络、止痛的共同作用为基础,地桃花益气补虚作用更强;鸡根温补气血作用平和;滇鸡血藤活血补血作用突出。3味药各具特点,各有侧重,全方通中寓补,补中寓通,使补气而不壅滞,活血又不伤正,针对痹证日久,气虚血瘀的病机作用较好,这与DPN即消渴痹证患者的病证相似。DPN患者由于组织缺血缺氧导致神经细胞节段性脱髓鞘、轴突变性等病理损伤,进而出现四肢末端对称性麻木、蚁行、温度觉和痛觉减退、针刺样疼痛等症状^[13]。可以对益气通络方治疗DPN进行深入研究,但需要进行必要的药理研究和安全性研究。

实验证明,益气通络方中3药混合煎煮后并未出现明显的成分改变,或生成大量新的化合物,未知的毒性反应基本可控。在急性毒性实验中,益气通络方表现出安全性较好,这一方面是由于具有较好的佤族用药经验基础,另一方面参照中医性味归经理论,配伍合理也可以有效降低毒性。

通过本实验的研究,证明族医药的用药习惯与中医药相类似,运用中医药理论体系阐释佤医药的用药

经验,并开展相关机制研究的可行性较高。佤药的开发可以更多地借鉴中医配伍组方经验:形成新的方剂,拓展应用范围,明确治理指征,揭示作用机制。形成民族医药用药经验,加中医药理论体系,加现代医学药理研究的研究思路和模式。益气通络方的研究,在现代安全性评价标准的前提下,尚需要进一步深入化学成分、临床适应证等相关研究。

参考文献:

- [1] 《佤族简史》修订本编写组. 佤族简史(修订本)[M]. 北京:民族出版社,2016:78-80.
- [2] ZHAO J, LI Z X, XIE X H, et al. Effector mechanism of Yunnan medicine "Yiqi Tongluo soup" in alleviating diabetic peripheral neuropathy by promoting autophagy [J]. TMR Pharmacol Res, 2021(2):19-24.
- [3] 郑先科, 李国华. 机能实验科学[M]. 北京:北京大学医学出版社,2005:20.
- [4] 陈贵, 夏稷子, 史娟, 等. 地桃花化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J]. 中成药, 2020, 42(7):1858-1864.
- [5] 李彬. 白芷化学成分分析及地桃花质量标准研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2014.
- [6] 刘毅. 地桃花[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(22):119.
- [7] 张灿坤, 刘昆云. 民族药:鸡根的质量标准研究[J]. 中国民族民间医药杂志, 1994(3):24-27.
- [8] 毛士龙, 廖时萱, 张灿坤. 民间药黄花远志化学成分研究[J]. 中国民族民间医药杂志, 1994(3):35-36.
- [9] 云南省卫生局药检所. 止咳平喘丸[J]. 中草药通讯, 1977(1):27.
- [10] 熊瑶, 金晨, 王晓云, 等. 鸡血藤及其混伪品的DNA条形码分子鉴定研究[J]. 中草药, 2020, 51(12):3274-3283.
- [11] 吴融, 卢燕, 陈道峰. 复方鸡血藤膏的质量标准研究[J]. 中成药, 2010, 32(9):1529-1533.
- [12] 张进, 高石曼, 贾晓光, 等. 内南五味子化学成分和药理活性的研究进展[J]. 中国现代中药, 2017, 19(7):1045-1050.
- [13] 中华中医药学会糖尿病分会. 糖尿病周围神经病变中医临床诊疗指南(2016年版)[J]. 中医杂志, 2017, 58(7):625-630.