

· 毒理 ·

不同配伍比例仙茅-淫羊藿药对的毒性与含量相关性

朱芳芳¹, 杨明华^{2*}, 陈婉姬³, 李晓东³, 胡伟¹

(1. 浙江中医药大学, 杭州 310053; 2. 浙江省中药研究所, 杭州 310023;
3. 浙江省立同德医院, 杭州 310012)

[摘要] 目的:比较探讨二仙药对仙茅-淫羊藿配伍的毒性来源、毒性与含量之间的相关性。方法:在总量恒定的前提下,以仙茅-淫羊藿经典比例 1:1 为基准,向两侧扩展,均匀设计若干配伍方,以水提与醇提方式获得若干配伍方的提取物;将 ICR 小鼠随机分为 10 组,分别为水提和醇提仙茅-淫羊藿 1:0,2:1,1:1,1:2,0:1 组,给小鼠灌胃各配伍方提取物,比较各组毒性大小;用高效液相法测定各配伍方提取物中仙茅苷和淫羊藿苷的含量,分析其毒性与含量的相关性。结果:小鼠急性毒性大小顺序为:(醇提)仙茅-淫羊藿(1:0)组 > (2:1)组 > (1:1)组 > (1:2)组 > (0:1)组 > 各水提组。仙茅苷含量与毒性呈显著性正相关(相关系数 $r = 0.967$,显著性检验 $P < 0.01$);淫羊藿苷含量与毒性呈显著不相关(相关系数 $r = -0.053$,显著性检验 $P > 0.05$)。结论:二仙药对配伍的毒性成分主要来自于仙茅且易富集于醇提物中,毒性大小与仙茅苷含量正相关。

[关键词] 仙茅;淫羊藿;配伍;毒性;含量;相关性

[中图分类号] R284.1;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2015)05-0175-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050175

Correlation Between Toxicity and Content of Curculiginis Rhizoma and Epimedii Folium with Different Compatible Proportion ZHU Fang-fang¹, YANG Ming-hua^{2*}, CHEN Wan-ji³, LI Xiao-dong³, HU Wei¹
(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine of Zhejiang Province, Hangzhou 310023, China; 3. Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the toxicity source of Curculiginis Rhizoma and Epimedii Folium and to study the correlation between their toxicity and the content of curculigoside and icariin with several compatible prescriptions. **Method:** Under the total dosage being constant, several compatible prescriptions were obtained by uniform design with Curculiginis Rhizoma and Epimedii Folium classical proportion 1:1 as a reference. Their extracts were obtained being by water and alcohol. Their toxicity was compared in mice. The contents of curculigoside and icariin in each compatible prescriptions were determineby HPLC, and the correlation between toxicity and content were analyzed. **Result:** The acute toxicity sequence is alcohol extract of Curculiginis Rhizoma-Epimedii Folium (1:0) > alcohol extract of Curculiginis Rhizoma-Epimedii Folium (2:1) > alcohol extract of Curculiginis Rhizoma-Epimedii Folium (1:1) > alcohol extract of Curculiginis Rhizoma-Epimedii Folium (1:2) > alcohol extract of Curculiginis Rhizoma-Epimedii Folium (0:1) > water extract group. There was significantly positive correlation between the content of curculigoside with their toxicity ($r = 0.967$, $P < 0.01$). No correlation was found between the content of Icariin and their toxicity ($r = -0.053$, $P > 0.05$). **Conclusion:** Toxic components of Curculiginis Rhizoma and Epimedii Folium mainly come from Curculiginis Rhizoma, and they can be easily enriched in alcohol extracts. There is positive correlation between the toxicity and the content of curculigoside.

[Key words] Curculiginis Rhizoma; Epimedii Folium; compatibility; toxicity; content; correlation

[收稿日期] 20140415(002)
[基金项目] 浙江省自然科学基金项目(LY13H270001)
[第一作者] 朱芳芳,硕士在读,Tel:15858113757,E-mail:072270305@163.com
[通讯作者] * 杨明华,博士,教授,从事中医药基础与中药新产品研发,Tel:13857181369,E-mail:yymh702@126.com

药对是中医临床常用的相对固定的 2 味药的配伍,是方剂最小的组成单位。仙茅-淫羊藿,是中医常用的温补肾阳药对,也是中医经典方“二仙汤”中的两味主药。仙茅乃温肾补阳之专药,淫羊藿亦能益精气补肾阳,二药配伍,相须为用,相得益彰,其补肾壮阳,强筋健骨,祛风除湿功力益强^[1]。古今对于仙茅的性味记载大同小异,总的来说是味辛或甘,性温或热,有毒。有研究表明,“二仙”配伍可增效减毒,但其增效减毒的配伍比例、与成分含量的相关性、及药理机制等有待阐明^[1]。目前,有关仙茅-淫羊藿药对的研究较少,新近的研究有薛黎明的“基于蛋白质组学淫羊藿苷防治骨质疏松作用机制及药对‘淫羊藿-仙茅’配伍机制研究^[2]”、郭元晖等的“淫羊藿苷和仙茅苷协同抑制破骨细胞的形成、分化和骨吸收功能^[3]”等。本文着重对二仙药对不同配伍方的水提物与醇提物的毒性进行测定比较,并分析其中仙茅苷、淫羊藿苷的含量,探讨毒性与含量之间的相关性及其毒性的可能来源。

1 材料

1.1 药材 仙茅,淫羊藿(均为亳州市京皖中药饮片厂,批号分别为 130501,130301,产地分别为四川,东北),均经浙江省中药研究所徐建中副研究员鉴定确认。

1.2 动物 清洁级 ICR 小鼠,雌雄各半,18~22 g,由浙江省医学科学院动物中心提供,合格证号 SCXK(浙)2008-0033。

1.3 仪器 HK 型不锈钢万能粉碎机(广州旭朗机械设备有限公司),TC-15 型恒温电热套(浙江新华医疗器械厂),SENCO R-501 型旋转蒸发器(上海申顺生物科技有限公司),W501 型升降恒温水浴锅(上海申顺生物科技有限公司),SHB-Ⅲ型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司),METTLER AB204-S 型电子天平(浙江中研检测技术服务有限公司),Agilent 1100 型高效液相色谱仪(浙江中研检测技术服务有限公司),KQ-100DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2 方法

2.1 提取物的制备

2.1.1 二仙提取物中仙茅-淫羊藿配伍比例确定 关于二仙药对方配伍,一般取仙茅、淫羊藿各 10 g,也有取仙茅 10 g,淫羊藿 6 g。为此,本实验将仙茅-淫羊藿配伍进行水提和醇提,2 种提取物中仙茅-淫羊藿配伍比例均设计为 1:0,2:1,1:1,1:2,0:1 5 组,由此得到:醇提仙茅-淫羊藿(1:0)组(下称

醇提 A 组),醇提仙茅-淫羊藿(2:1)组(下称醇提 B 组),醇提仙茅-淫羊藿(1:1)组(下称醇提 C 组),醇提仙茅-淫羊藿(1:2)组(下称醇提 D 组),醇提仙茅-淫羊藿(0:1)组(下称醇提 E 组),水提仙茅-淫羊藿(1:0)组(下称水提 A 组),水提仙茅-淫羊藿(2:1)组(下称水提 B 组),水提仙茅-淫羊藿(1:1)组(下称水提 C 组),水提仙茅-淫羊藿(1:2)组(下称水提 D 组),水提仙茅-淫羊藿(0:1)组(下称水提 E 组)。

2.1.2 水提物制备 仙茅经粉碎,过 10 目筛,二仙汤各配伍组分别精密称取总量为 200 g 的药材,8 倍水回流 2 次,每次沸后 2 h,水浴上浓缩至浸膏,4 ℃冰箱保存待用。

2.1.3 醇提物制备 仙茅经粉碎,过 10 目筛,二仙药对各配伍组分别精密称取总量为 200 g 的药材,10 倍 90% 乙醇回流 2 次,每次沸后 2 h,旋转蒸发器上回收乙醇,水浴上浓缩至浸膏,4 ℃冰箱保存待用。

2.2 提取物急性毒性测定 ICR 小鼠 100 只,雌雄各半,随机分为 10 组,每组 10 只,即水提物 5 组,醇提物 5 组。水提各组药材浸膏配成含生药 1.98 g·mL⁻¹溶液、醇提各组药材浸膏配成含生药 5.71 g·mL⁻¹溶液,2 种提取物均为小鼠最大可给药浓度,保证每组溶液均能通过 16 号小鼠灌胃针。各组小鼠实验前禁食不禁水 18 h,给药剂量为 0.04 mL·g⁻¹。给药后立即观察和记录动物的中毒症状(精神状态、运动功能等)及死亡情况,观察期为 7 d。

2.3 仙茅苷、淫羊藿苷含量检测 按照 2010 年版《中国药典》中仙茅苷、淫羊藿苷含量测定方法进行^[4]。

2.4 统计学分析 相关分析采用 SPSS 17.0 软件双变量直线分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各配伍提取物急性毒性测定 结果表明,醇提各组均出现中毒症状,而水提各组小鼠均未出现明显中毒症状和死亡现象。醇提各组出现中毒症状主要表现为:呼吸困难、急促,困倦,俯卧等,推测可能与其影响了小鼠的呼吸系统有关,各醇提物组出现小鼠死亡数不完全一致,各组毒性大小顺序为:醇提仙茅-淫羊藿(1:0)组 > 醇提仙茅-淫羊藿(2:1)组 > 醇提仙茅-淫羊藿(1:1)组 > 醇提仙茅-淫羊藿(1:2)组 > 醇提仙茅-淫羊藿(0:1)组 > 各水提组。说明二仙汤的毒性成分主要存在于醇提物中。见表 1。

3.2 各配伍提取物中仙茅苷、淫羊藿苷含量与毒性

表 1 仙茅-淫羊藿各配伍提取物组小鼠急性毒性测定 (n = 10)

Table 1 Deter mination of acute toxicity in mice with each compatible extract group

组别	剂量/g·kg ⁻¹	死亡数/只	死亡率/%
醇提 A	228. 4	9	90
醇提 B	228. 4	6	60
醇提 C	228. 4	3	30
醇提 D	228. 4	2	10
醇提 E	228. 4	0	0
水提 A	79. 2	0	0
水提 B	79. 2	0	0
水提 C	79. 2	0	0
水提 D	79. 2	0	0
水提 E	79. 2	0	0

相关性 以仙茅苷含量为自变量 (X), 小鼠死亡率为因变量 (Y), 做线性回归, 得直线方程 $Y = 0. 864\ 7\ X - 0. 041\ 7, R^2 = 0. 976\ 8$ 。通过 SPSS 软件, 对仙茅苷含量和小鼠死亡率做双变量直线相关分析, 结果: 相关系数 $r = 0. 988 > 0. 9$, 接近于完全正相关 $r = 1$, 双侧显著性检验 (t 检验, 0. 01 水平上) 结果 $P < 0. 01$, 接受仙茅苷含量与小鼠死亡率之间有直线相关关系。说明仙茅苷含量与小鼠死亡率呈显著性正相关, 即仙茅苷含量多的组别毒性相对比较大。见表 2。

表 2 仙茅-淫羊藿各配伍提取物中仙茅苷、淫羊藿苷含量与小鼠死亡率

Table 2 Content of curculigo glycosides opimedium glycosides in each compatible extract and mice mortality

组别	仙茅苷 /g·kg ⁻¹	淫羊藿苷 /g·kg ⁻¹	小鼠死亡率 /%
醇提 A	1. 106	0	90
醇提 B	0. 725	4. 599	60
醇提 C	0. 295	6. 469	30
醇提 D	0. 169	8. 539	10
醇提 E	0	9. 866	0
水提 A	0. 135	0	0
水提 B	0. 114	2. 194	0
水提 C	0. 081	3. 420	0
水提 E	0. 054	4. 364	0
水提 D	0	8. 765	0

各组淫羊藿苷含量与小鼠死亡率见表 2。以淫羊藿苷含量为自变量 (X), 小鼠死亡率为因变量 (Y), 做线性回归, 得直线方程: $Y = - 0. 031\ 9X +$

$0. 343\ 7, R^2 = 0. 126\ 5$ 。通过 SPSS 软件对淫羊藿苷含量和小鼠死亡率做双变量直线相关分析, 结果: 相关系数 $r = - 0. 365$, 远离于完全正相关 ($r = 1$) 和完全负相关 ($r = - 1$), 双侧显著性检验 (t 检验, 0. 01 水平上) 结果 $P > 0. 05$, 拒绝淫羊藿苷含量与小鼠死亡率之间有直线相关关系。说明淫羊藿苷含量与小鼠死亡率呈显著不相关, 即淫羊藿苷含量与毒性间无明显相关性。

4 讨论

淫羊藿和仙茅为传统中药, 是临床常用的温肾补阳药对, 2010 年版《中国药典》中均有收录。药对配伍的优势主要体现在相须为用, 相得益彰, 其现代诠释即增效减毒, 表现在配伍后效应强度、作用时间、毒性大小、成分含量的变化上^[1, 5-7]。

本文的研究结果表明: ①相对于水提物, 仙茅淫羊藿醇提物中仙茅苷含量较高, 毒性也较大, 毒性大小与仙茅苷正相关, 与淫羊藿苷高度不相关, 故推测其毒性主要来源于仙茅。②二仙药对的毒性大小虽与淫羊藿苷高度不相关, 但淫羊藿的加入对仙茅的毒性具有制衡作用, 即有减毒作用。至于仙茅与淫羊藿的比例多少最为合适, 即增效减毒达到最佳平衡, 有待下一步深入研究探明。

[参考文献]

[1] 李贵海, 涂晓龙. 常用中药药对分析与应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 320-321.

[2] 薛黎明. 基于蛋白质组学淫羊藿苷防治骨质疏松作用机理及药对“淫羊藿仙茅”配伍机制研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2012.

[3] 郭元晖, 薛黎明, 聂燕, 等. 淫羊藿苷和仙茅苷协同抑制破骨细胞的形成、分化和骨吸收功能[J]. 药学实践杂志, 2013, 31(4): 231-235.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 94, 306.

[5] 解素花, 张广平, 孙桂波, 等. 附子与甘草不同配伍比例配伍减毒的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(15): 2210-2213.

[6] 周思思, 马增春, 梁乾德, 等. 人参附子不同比例配伍对小鼠急性毒性的影响[J]. 天津中医药, 2013, 30(1): 43-46.

[7] 杨海润, 孙建宁, 张广平, 等. 四逆汤组方不同配伍毒效关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(23): 266-269.

[责任编辑 邹晓翠]