

当归四逆汤中细辛的药效成分及其毒性研究[△]

余玖霞^{1*}, 梅 茜², 许金国², 苏联麟², 毛春芹², 谢 辉², 陆兔林^{2#} (1. 南京市江宁中医院药学部, 南京 211100; 2. 南京中医药大学药学院, 南京 210046)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)08-0915-05
DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.08.005

摘要 目的: 研究当归四逆汤中细辛的药效成分及其毒性。方法: (1) 建立细辛饮片水煎液及当归四逆汤的指纹图谱, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件进行分析。(2) 急性毒性试验。取雄性 ICR 小鼠 42 只, 随机均分为细辛单煎组、复方组。细辛单煎组小鼠以细辛单煎液最大浓度 0.978 4 g/mL, 最大给药剂量 0.5 mL/10 g 灌胃给药; 复方组小鼠以当归四逆汤最大浓度 0.622 8 g/mL, 最大给药剂量 0.5 mL/10 g 灌胃给药, 均 1 日 2 次, 连续观察 2 周, 记录受试小鼠活动、行为及死亡等情况, 观察小鼠心、肝、脾、肺及肾等脏器和组织的体积、颜色和质地等变化, 并拍照称重。结果: (1) 建立了 15 批细辛饮片水煎液和 23 批当归四逆汤的指纹图谱, 相似度均 >0.90, 并指出 7 个共有成分, 分别为 1 号峰、4 号峰、19 号峰、20 号峰、23 号峰、24 号峰和 25 号峰, 采用对照品指出其中 4 号峰为阿魏酸, 23 号峰为细辛脂素。(2) 急性毒性试验结果显示, 两组小鼠 2 周内未见死亡; 经大体解剖, 肉眼见心、肝、脾、肺及肾等脏器和组织在体积、颜色和质地等方面无异常改变; 复方组小鼠的最大给药量为 31.14 g/kg, 细辛单煎组小鼠的最大给药量为 48.92 g/kg。结论: 通过指纹图谱指出当归四逆汤中包括阿魏酸、细辛脂素在内的 7 个细辛有效成分, 为进一步研究当归四逆汤中细辛的作用机制提供了参考, 并对其毒性进行了小鼠急性毒性试验, 初步考察并验证了细辛及其复方用药的安全性。

关键词 细辛; 当归四逆汤; 指纹图谱; 阿魏酸; 细辛脂素; 急性毒性试验

Research on the Pharmacodynamic Components and Its Toxicity of Asarum in Danggui Sini Decoction[△]

YU Jiuxia¹, MEI Qian², XU Jinguo², SU Lianlin², MAO Chunqin², XIE Hui², LU Tulin² (1. Dept. of Pharmacy, Nanjing Jiangning Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 211100, China; 2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the pharmacodynamic components and its toxicity of asarum in Danggui Sini decoction. **METHODS:** (1) The fingerprint spectrum of asarum water decoction and Danggui Sini decoction were established and analyzed by using similarity evaluation system of chromatographic fingerprint spectrum of traditional Chinese medicine. (2) Acute toxicity test. 42 male ICR mice were taken and randomly divided into asarum single decoction group and compound group. The mice in the asarum single decoction group was administered by gavage with a maximum concentration of 0.978 4 g/mL and a maximum dose of 0.5 mL/10 g of the asarum water decoction; while the mice in the compound group were administered by gavage with a maximum concentration of 0.622 8 g/mL and a maximum dose of 0.5 mL/10 g of Danggui Sini decoction, both groups were administrated twice a day and observed for 2 weeks. To record the activity, behavior and death of the mice, to observe the changes of volume, color and texture of the heart, liver, spleen, lungs and kidneys of the mice, and take photos and weigh. **RESULTS:** (1) The fingerprint spectrum of 15 batches of asarum water decpctopm and 23 batches of Danggui Sini decoction were established, with the similarity was >0.90, and seven common components were identified, namely peak 1, peak 4, peak 19, peak 20, peak 23, peak 24 and peak 25, the reference substance was used to identify peak 4 as ferulic acid and peak 23 as asarinin. (2) The results of acute toxicity test showed that mice in both groups did not die within 2 weeks; the organs and tissues including heart, liver, spleen, lung and kidney showed no abnormal changes in volume, color and texture after gross autopsy; the maximum dose for mice in the compound group was 31.14 g/kg, and the maximum dose for mice in the asarum single decoction group was 48.92 g/kg. **CONCLUSIONS:** The fingerprint spectrum has identified seven active ingredients of asarum in Danggui Sini decoction, including ferulic acid and asarinin, which provides reference for further study of the mechanism of asarum in Danggui Sini decoction. The acute

[△] 基金项目: 国家重点研发计划项目 (No. 2018YFC1707000)

* 主管中药师, 硕士。研究方向: 临床中药学。E-mail: yujiuxia@126.com

通信作者: 教授, 博士生导师。研究方向: 中药炮制及中药饮片质量标准研究。E-mail: ltl2021@njucm.edu.cn

toxicity test in mice was carried out for its toxicity, so that the safety of asarum and its compound medication was preliminarily investigated and verified.

KEYWORDS Asarum; Danggui Sini decoction; Fingerprint spectrum; Ferulic acid; Asarinin; Acute toxicity test

当归四逆汤在国家中医药管理局发布的《古代经典名方目录(第一批)》中居第13首^[1]。该方出自《伤寒论》,组成有当归、桂枝、白芍、细辛、甘草、木通和大枣,原文记载,“手足厥寒,脉细欲绝者,当归四逆汤主之”和“下利脉大者,虚也,以强下之故也。设脉浮革,因尔肠鸣者,属当归四逆汤”。该方具有温经散寒、养血通脉等作用,在临床被用于痛经、类风湿关节炎和糖尿病周围神经病变等疾病^[2-8]。现代药理学研究结果表明,当归四逆汤中的细辛除镇痛、抗炎、止咳和平喘等基于传统功效药理活性外,还有抗病毒、抗菌、镇静、抗氧化、抗抑郁、降压和抗肿瘤等作用,其止痛机制可能与热敏通道瞬时感受器电位香草酸受体1(TRPV1)被激活有关^[9-11]。课题组前期研究结果表明,细辛是当归四逆汤中重要的物质基础^[2]。历代部分本草记载细辛“有毒”,现代研究结果认为其毒性与剂量有关^[12-13]。目前尚未见针对当归四逆汤中细辛的药效成分及毒性的相关报道。本研究通过建立细辛饮片的水煎液及当归四逆汤的指纹图谱,指认细辛有效成分,并结合小鼠急性毒性试验验证细辛及其复方的安全性,为进一步研究当归四逆汤中细辛的作用机制及相关制剂开发提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级雄性ICR小鼠,购自南京市青龙山动物养殖场,许可证号为SCXK(浙)2019-0002。

1.2 仪器

Waters e2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司); ZYX0071型超纯水系统(南京汉隆实验器材有限公司); TD5001C型电子天平(天津天马衡基仪器有限公司); MS-105D型十万分之一电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司); H1650-W型台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); KQ-500B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); MG-H21S011型多功能电陶炉(广东美的生活电器制造有限公司); 2.1 L砂锅(江西舒雅陶瓷有限公司)。

1.3 药品与试剂

当归四逆汤的药材均购自道地产区或主产区,每味药收集至少3个产地,总批次至少15批,前期研究^[2]已确定优质产地,并经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定确定基源; 根据《古代经典名方中药复方制剂及其物质基准的申报资料要求(征求意见稿)》,按照《中华人民共和国药典:一部》(2020年版)将药材炮制合格饮片,随机组成当归四逆汤样品23批;原料信息见表1。甲醇(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司);乙腈(色谱纯,默克股份两合公司);磷酸(色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);其他试剂均为分析纯;纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters XBridge C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);

表1 当归四逆汤药材来源
Tab 1 Source of the medicinal materials of Danggui Sini decoction

药材	产地	批号	饮片炮制标准
当归	甘肃岷县	TA180071001—TA180075001	《中华人民共和国药典:一部》 (2020年版)
桂枝	广东肇庆	—	
白芍	安徽亳州	BS201810-1—BS201810-5 TA180096001—TA180100001	
细辛	辽宁新宾	TA180142001—TA180146001、 TA180173001—TA180173010	
甘草	甘肃民勤	XELHQC-GC-1—XELHQC-GC-5	
木通	陕西西安	20042011—20042015	
大枣	山东新泰	1807161—1807165	

注:“—”表示无批号
Note:“—” means no batch number

流动相:乙腈-0.05%磷酸水溶液(梯度洗脱,0~3 min,5%乙腈;3~10 min,5%~10%乙腈;10~15 min,10%~12%乙腈;15~30 min,12%~14%乙腈;30~35 min,14%~17%乙腈;35~40 min,17%~19%乙腈;40~50 min,19%~25%乙腈;50~75 min,25%~45%乙腈;75~90 min,45%~70%乙腈;90~92 min,70%~95%乙腈;92~95 min,95%~5%乙腈);体积流量:1.0 mL/min;检测波长:245 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。

2.2 供试品溶液的制备

课题组经前期研究已得15批细辛饮片水煎液、23批当归四逆汤和1批缺细辛阴性水煎液,分别取上述液体3 mL,置于10 mL容量瓶中,加甲醇至刻度,称定重量,超声处理,放冷,用70%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,得细辛饮片供试品溶液、当归四逆汤供试品溶液和阴性对照溶液。

2.3 方法学考察

课题组前期研究已做方法学考察^[2],结果表明,仪器精密度高,该方法重复性良好,供试品溶液在24 h内稳定。

2.4 细辛饮片指纹图谱的建立

取15批细辛饮片供试品溶液按色谱条件进行测定,记录色谱图。通过《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A)软件,以S1为参照峰,采用平均数法,进行多点校正和色谱峰匹配,得到细辛饮片高效液相色谱(HPLC)指纹图谱叠加图,共确认11个色谱峰,见图1—2。

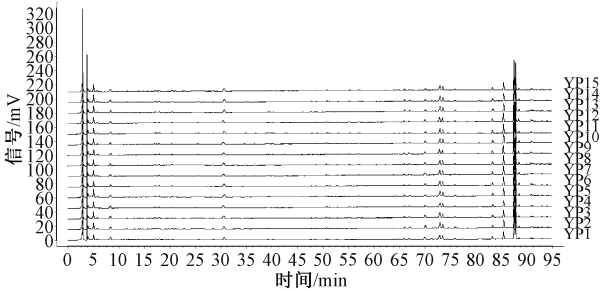


图1 细辛饮片水煎液 HPLC 指纹图谱
Fig 1 HPLC fingerprint spectrum of asarum water decoction

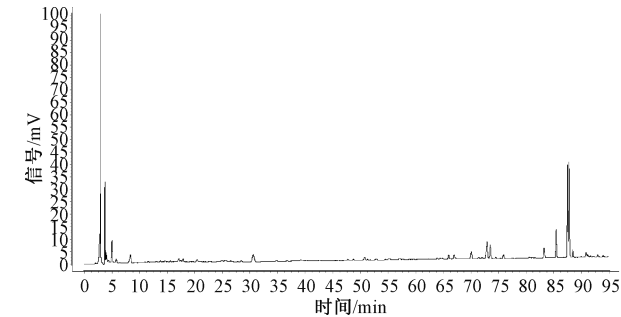


图2 细辛饮片水煎液 HPLC 指纹图谱共有模式图
Fig 2 The common pattern of HPLC fingerprint spectrum of asarum water decoction

2.5 细辛饮片指纹图谱的相似度评价

通过评价系统软件,计算指纹图谱相似度,结果显示,

表2 15批细辛饮片水煎液 HPLC 指纹图谱相似度

序号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	对照指纹图谱
S1	1.000															
S2	0.997	1.000														
S3	0.995	1.000	1.000													
S4	0.995	0.995	0.995	1.000												
S5	0.994	0.995	0.995	0.999	1.000											
S6	0.979	0.986	0.987	0.987	0.990	1.000										
S7	0.980	0.987	0.987	0.987	0.990	1.000	1.000									
S8	0.980	0.987	0.987	0.987	0.990	1.000	1.000	1.000								
S9	0.980	0.987	0.987	0.987	0.990	1.000	1.000	1.000	1.000							
S10	0.980	0.987	0.987	0.987	0.990	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000						
S11	0.980	0.987	0.987	0.987	0.990	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000					
S12	0.980	0.987	0.987	0.987	0.990	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000				
S13	0.994	0.995	0.995	0.999	1.000	0.990	0.990	0.990	0.990	0.990	0.990	0.990	1.000			
S14	0.994	0.995	0.995	0.999	1.000	0.990	0.990	0.990	0.990	0.990	0.990	0.990	1.000	1.000		
S15	0.994	0.995	0.995	0.999	1.000	0.990	0.990	0.989	0.990	0.990	0.990	0.990	1.000	1.000	1.000	
对照指纹图谱	0.991	0.995	0.995	0.996	0.998	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.998	0.998	0.998	1.000

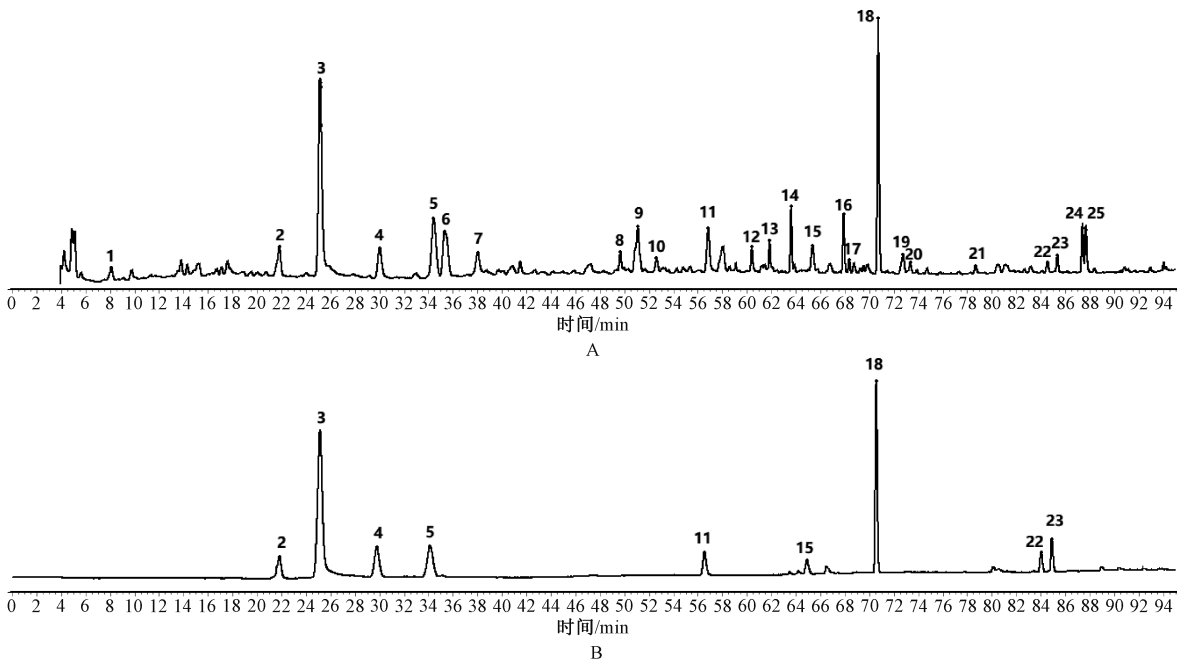
15批细辛饮片指纹图谱相似度均>0.90,表明同产地不同批次细辛药材炮制得到的细辛饮片主要物质群相似度较高,细辛饮片质量稳定均一,见表2。

2.6 当归四逆汤样品指纹图谱的建立

取23批当归四逆汤供试品溶液按色谱条件进行测定,记录色谱图。通过《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A)软件,以S1为参照峰,采用平均数法,进行多点校正和色谱峰匹配,得到当归四逆汤指纹图谱叠加图相似度均>0.90,可见其主要物质群相似度高、稳定性好,其中细辛的药效成分也在复方中有所体现,可进一步对细辛饮片和当归四逆汤的相关性进行研究确定。23批当归四逆汤样品共有模式图结果见图3。

2.7 细辛饮片、细辛饮片阴性制剂与当归四逆汤样品相关性研究

取细辛饮片供试品溶液、当归四逆汤供试品溶液和阴性



A. 共有模式;B. 混合对照品;4号峰为阿魏酸;23号峰为细辛脂素
A. common pattern; B. mixed reference substance; peak 4 was ferulic acid; peak 23 was asarinin

图3 当归四逆汤样品指纹图谱色谱图
Fig 3 Chromatogram of fingerprint spectrum of sample of Danggui Sini decoction

对照溶液进行测定,记录色谱图。分别将上述供试品溶液的色谱图进行叠加比较,分析当归四逆汤样品指纹图谱的色谱峰归属。当归四逆汤样品指纹图谱中共有 7 个峰来自细辛饮片,采

用混合对照品指认了其中 2 个成分:4 号峰阿魏酸、23 号峰细辛脂素,见图 4。推测包括阿魏酸、细辛脂素在内的这 7 个成分

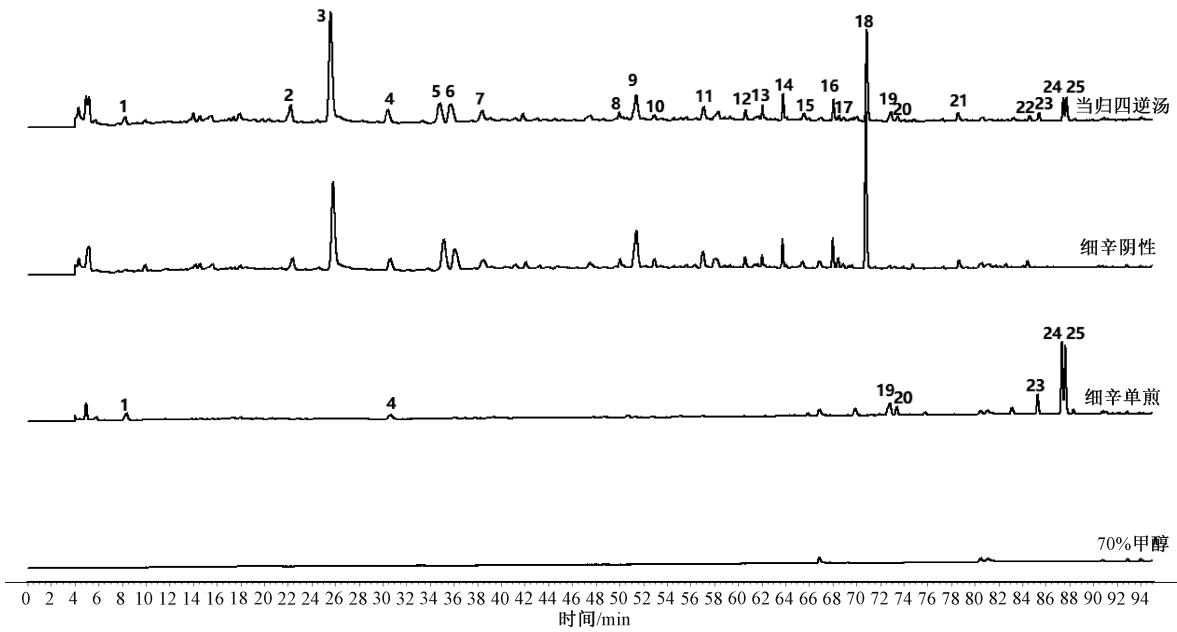


图 4 当归四逆汤样品、细辛饮片水煎液和细辛饮片阴性水煎液色谱图

Fig 4 Chromatograms of sample of Danggui Sini decoction, asarum water decoction and negative asarum water decoction

2.8 当归四逆汤及细辛饮片单煎急性毒性试验

取禁食(不禁水)12 h 的雄性 ICR 小鼠 42 只,体重 20~22 g,随机均分为细辛单煎组、复方组,每组 21 只。单煎组小鼠以最大浓度 0.978 4 g/mL,最大给药剂量 0.5 mL/10 g 灌胃给药;复方组小鼠以最大浓度 0.622 8 g/mL,最大给药剂量 0.5 mL/10 g 灌胃给药,均 1 日 2 次。连续观察 2 周,记录受试小鼠活动、行为及死亡等情况,死亡小鼠及时进行尸检。实验结束后,对所有小鼠进行大体解剖,观察心、肝、脾、肺及肾等脏器和组织的体积、颜色和质地等变化,并拍照称重。

按上述剂量灌胃给药的小鼠,在给药后当日均见活动减少,粪便棕褐色、质地较软但成形,次日恢复正常。小鼠体重增长正常,毛色、肤色和呼吸正常,鼻、眼及口腔未出现异常分泌物,2 周内未见死亡。实验结束后经大体解剖,肉眼见心、肝、脾、肺及肾等脏器和组织在体积、颜色和质地等方面无异常改变,小鼠体重见图 5—6。故当归四逆汤 1 日 2 次灌胃给药的小鼠最大给药量为 31.14 g/kg,细辛单煎组 1 日 2 次灌胃给药的小鼠最大给药量为 48.92 g/kg。

3 讨论

经典名方的开发研究要求从药材源头对其进行质量控制及溯源分析,本实验通过对当归四逆汤中细辛饮片、当归四逆汤样品指纹图谱进行研究,从饮片到当归四逆汤样品的物质群进行分析,对当归四逆汤中细辛的药效成分进行初步确定,通过相关性研究,对其进行整体化、过程化的质量控制。HPLC 指纹图谱符合中医药整体性的特点,能较全面地反映所含成分信息,尤其适用于多成分、多靶点的中药分析,可较好地体现中药成分的复杂性和相关性,在中药质量控制、有效成分研究和

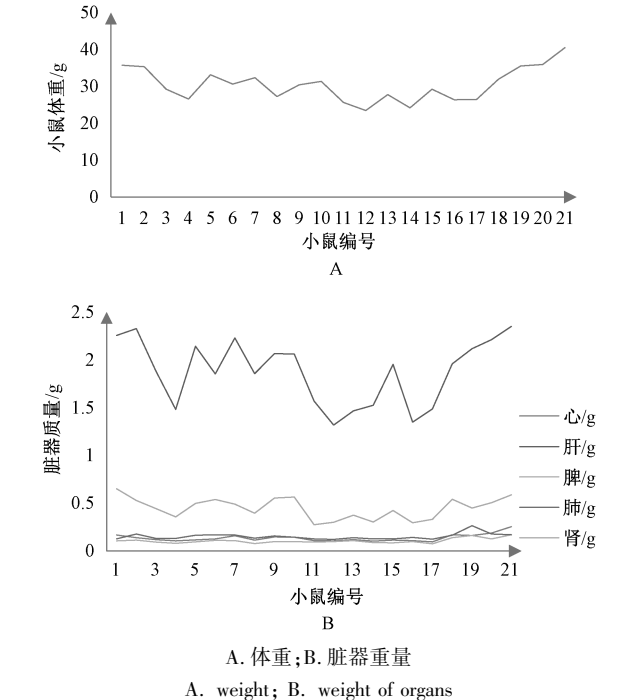
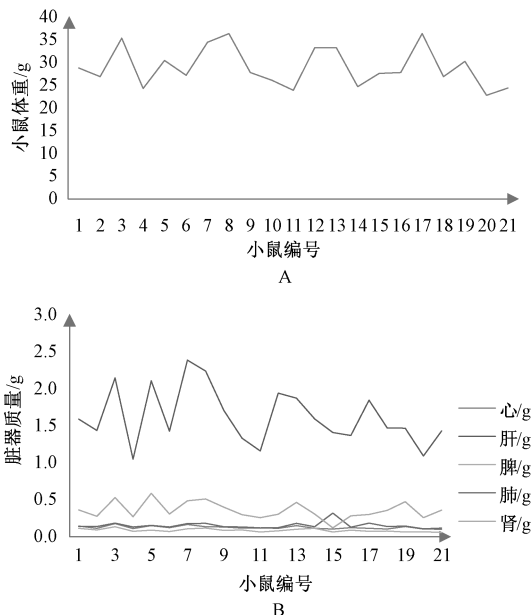


图 5 当归四逆汤急性毒性试验小鼠情况

Fig 5 Experimental mice in acute toxicity test of Danggui Sini decoction

作用机制研究等多方面发挥重要作用^[14-15];能够全面表征中药及制剂的整体化学信息,适用于阐释经典名方“药材-饮片-方剂”传递规律。课题组前期研究结果发现,当归四逆汤原料药材细辛及其饮片均指认 14 个色谱峰,根据色谱峰峰形及位置



A. 体重; B. 脏器重量
A. weight; B. weight of organs

图6 细辛单煎急性毒性试验小鼠情况

Fig 6 Experimental mice in acute toxicity test of asarum single decoction

可知细辛主要药效物质群在炮制过程中未造成丢失,其药效物质群可以较好地药材传递到饮片。本研究结果表明,当归四逆汤细辛饮片的煎液指纹图谱与对照指纹图谱相似度 >0.90 ,表明同产地不同批次细辛饮片的主要物质群相似度较高。当归四逆汤样品指纹图谱共确认 25 个色谱峰,其中 1 号峰、4 号峰、19 号峰、20 号峰、23 号峰、24 号峰和 25 号峰归属于细辛饮片,经对照品指认出 4 号峰为阿魏酸、23 号峰为细辛脂素,说明当归四逆汤中细辛的物质群可追溯到饮片。结合当归四逆汤饮片、样品指纹图谱研究和共有峰归属研究,7 个色谱峰归属于细辛,占当归四逆汤样品总峰面积的 14.61%。综上所述,当归四逆汤制备工艺较合理,其中细辛饮片的主要药效物质群能够从“药材-饮片-方剂”逐级进行传递,且物质群归属关系清晰明确。

自古有“细辛不过钱”的说法。现代研究结果证明,细辛含有的马兜铃酸 I 具有肾毒性、致癌和致肝损伤等作用,因此使用前需对马兜铃酸 I 进行限量检测,检查合格后的细辛药材经炮制加工成饮片。历代关于细辛的炮制方法有净制、切制、加热炮制及加辅料炮制等,而现代炮制方法相对单一。近年来研究结果表明,炒制、碱制、酒制和低温超微粉碎等方法可有效降低细辛毒性,增强临床应用安全性^[16]。利用小鼠进行急性毒性试验能够确定中毒作用方式及反应,为急性毒性试验观察指标、剂量分组等提供参考^[17-18];至今仍被广泛用于测试各种毒性中药的作用,如钩藤碱^[19]、新鲜唐古特大黄茎^[20]和枸杞子^[21]等。本研究对小鼠进行了 1 日 2 次灌胃给药的最大给药量试验(当归四逆汤组为 31.14 g/kg、细辛单煎组为 48.92 g/kg),给药后 2 周内均未见小鼠有明显异常情况和死亡,实验结束后经大体解剖,肉眼见心、肝、脾、肺及肾等脏器和组织在体积、颜色和质地等方面无异常改变。若当归四逆汤按 1 868.4 g 细辛生药量/60 kg(即 31.14 g/kg)计算,则小鼠剂量

为临床用量的 622.8 倍 $[(1\ 868.4\ \text{g/kg})/(3\ \text{g/60 kg})]$;细辛单煎按 2 935.2 g 生药量/60 kg(即 48.92 g/kg)计算,则小鼠剂量为临床用量的 978.4 倍 $[(2\ 935.2\ \text{g/60 kg})/(3\ \text{g/60 kg})]$,表明当归四逆汤、细辛临床应用安全性较高。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局. 国家中医药管理局关于发布《古代经典方目录(第一批)》的通知[EB/OL]. (2018-04-16)[2021-10-27]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [2] 许金国, 夏鑫鑫, 梅茜, 等. 经典名方当归四逆汤指纹图谱及功效关联物质预测分析[J]. 中草药, 2021, 52(15): 4507-4518.
- [3] 陈琦, 尹仁芳, 张君冬, 等. 当归四逆汤治疗原发性痛经疗效的 Meta 分析[J]. 中国中医药图书情报杂志, 2021, 45(3): 25-30.
- [4] 卻丹华, 陈王焕, 姜飞鹏, 等. 基于网络药理学和分子对接研究当归四逆汤治疗原发性痛经的机制[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(4): 855-864.
- [5] 钱凯, 杨学文, 严士海. 基于网络药理学探究当归四逆汤在类风湿性关节炎中的作用机制[J]. 中国药物经济学, 2021, 16(11): 34-41.
- [6] 周开立, 李敏, 秦茂, 等. 当归四逆汤加减治疗类风湿性关节炎的 Meta 分析[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2019, 3(24): 10-13.
- [7] 田瑛, 邓小敏, 苏冬, 等. 当归四逆汤治疗糖尿病周围神经病变研究进展[J]. 中医临床杂志, 2020, 32(7): 1392-1395.
- [8] 程思宇. 基于 NF- κ B 信号通路探究当归四逆汤对糖尿病大鼠周围神经病变保护作用机制[D]. 长春: 长春中医药大学, 2019.
- [9] 吴昊, 温晓茵, 颜鹏, 等. 细辛的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4): 186-195.
- [10] 余娟娟. 细辛调节 TRPV1 离子通道镇痛机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [11] 刘甜甜, 赵红霞, 高蔚, 等. 细辛醇提物对瞬时感受器电位香草素受体 1 的干预作用及改善小鼠神经性疼痛的机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(8): 4998-5001.
- [12] 赵佳琛, 王艺涵, 翁倩倩, 等. 经典名方中细辛的本草考证[J]. 中国现代中药, 2020, 22(8): 1303-1319, 1330.
- [13] 李瑞林. 浅议细辛的用量问题[J]. 新疆中医药, 2021, 39(2): 62-64.
- [14] 谢彦, 曾和平, 李红, 等. 色谱指纹图谱在中药质量控制中的应用研究[J]. 现代食品与药品杂志, 2007, 17(1): 6-10.
- [15] 刘渊, 陈正君, 梁云, 等. 中药制剂质量控制方法研究进展[J]. 甘肃中医药大学学报, 2018, 35(5): 101-104.
- [16] 强小娟, 尹珂, 朱智慧. 细辛炮制历史沿革和研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(10): 130-132.
- [17] 中华人民共和国卫生部药政管理局. 中药新药研究指南(药理学 毒理学)[M]. 北京: 中华人民共和国卫生部药政管理局, 1994: 203-204.
- [18] 国家食品药品监督管理局. 药物研究技术指导原则(2005 年)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2006: 209-216.
- [19] HU L L, ZHANG H J, ZHANG L, et al. Acute oral toxicity test and assessment of rhynchophylline in mice[J]. J Chin Pharm Sci, 2021, 30(8): 657-665.
- [20] 张云鹤, 帖晓燕, 冯银平, 等. 新鲜唐古特大黄茎急性毒性及泻下作用研究[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(4): 110-115.
- [21] 刘舵, 杨永利, 雷婷, 等. 枸杞子乙酸乙酯提取物急性毒性及对切除卵巢大鼠骨质疏松的防治作用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(4): 396-401.

(收稿日期:2021-11-23 修回日期:2021-12-24)