

“半蒺贝莖及攻乌”反药配伍组合的急性毒性研究

张 腾, 庄朋伟, 赖晓艺, 卢志强, 李丽娟, 张艳军*

天津中医药大学中药学院 天津市中药药理重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 通过对“半蒺贝莖及攻乌”中各单味药、反药组合进行急性毒性实验, 研究“半蒺贝莖及攻乌”反药配伍组合的毒性变化规律。方法 以“半蒺贝莖及攻乌”中各单味药乙醇提取物的半数致死量(LD₅₀)或最大耐受量(MTD)评价各单味药的急性毒性; 各药对组合中生川乌的剂量固定为LD₅₀, 另一单味药的给药剂量随配伍比例的变化而逐渐增加, 以小鼠死亡率为评价指标, 考察反药组合毒性的变化规律。结果 生川乌的LD₅₀为4.4 g/kg, 生半夏、瓜蒌、浙贝母、白蒺、白及的MTD分别为300、37.8、272、167、180 g/kg; 生川乌配伍生半夏无相反现象; 生川乌与瓜蒌配伍比例在4:1~8:1时相反, 在2:1~1:6时不反; 生川乌与浙贝母配伍比例在6:1~16:1时相反, 在1:1~1:13时不反; 生川乌与白蒺配伍比例在3.5:1~16:1时相反, 在1:1~1:13时不反; 白及与生川乌配伍比例没有明显的毒性变化规律。结论 生川乌乙醇提取物急性毒性明显; 生半夏、瓜蒌、浙贝母、白蒺、白及醇提取物急性毒性不明显; 反药组合的配伍比例对“半蒺贝莖及攻乌”相关药物急性毒性的变化具有重要影响。

关键词: 半蒺贝莖及攻乌; 配伍; 急性毒性; 半数致死量; 最大耐受量; 生川乌

中图分类号: R285.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)17-2442-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.17.019

Acute toxicity studies on compatibility of “pinellia, trichosanthes, fritillaria, ampelopsis, bletilla attack aconitum”

ZHANG Teng, ZHUANG Peng-wei, LAI Xiao-yi, LU Zhi-qiang, LI Li-juan, ZHANG Yan-jun

Tianjin Key Laboratory of Chinese Medicine Pharmacology, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To research the toxicity variation principle of “pinellia, trichosanthes, fritillaria, ampelopsis, bletilla attack aconitum” through studying on the acute toxicity for “pinellia, trichosanthes, fritillaria, ampelopsis, bletilla attack aconitum” in the single herb and anti-drug combination. **Methods** Using the median lethal dose (LD₅₀) or maximum tolerate dose (MTD) to evaluate the acute toxicity of single herb, then fix the raw aconitum dose of the compatibility group at LD₅₀, another drug dose increased with the compatibility proportion changed gradually in order to examine the toxicity variation of anti-drug combination with death rate as the index. **Results** The LD₅₀ of raw *Aconiti Radix* (AR) was 4.4 g/kg, the MTD of raw *Pinelliae Rhizoma* (PR), *Trichosanthis Fructus* (TF), *Fritillariae Thunbergii Bulbus* (FTB), *Ampelopsis Radix* (AR), and *Bletillae Rhizoma* (BR) was respective 300, 37.8, 272, 167, and 180 g/kg; raw AR and raw PR showed no antagonism phenomenon; raw AR showed the antagonism effect against TF in 4:1 to 8:1 while without antagonism in 2:1—1:6; the compatibility of raw AR and FTB objected in 6:1—16:1 while without antagonism in 1:1—1:13; the compatibility of raw AR and AR objected in 3.5:1—16:1 while without antagonism in 1:1—1:13; the compatibility of raw AR and BR showed no obvious toxicity variation. **Conclusion** The ethanol extract of raw AR has obvious acute toxicity; the ethanol extract of raw PR, TF, FTB, AR, and BR has no obvious acute toxicity; under the experimental conditions, the proportion of anti-drug compatibility affects the compatibility of the results.

Key words: pinellia, trichosanthes, fritillaria, ampelopsis, bletilla attack aconitum; compatibility; acute toxicity; median lethal dose; maximum tolerated dose; raw *Aconiti Radix*

“十八反”是中药配伍禁忌的重要内容, 存在颇多争议。在中医药配伍理论和中药药性理论指导下, 采用文献回顾、实验评价验证、理论提炼升华等研究手段, 甄别每一对反药组合, 阐明反药配伍“反”

收稿日期: 2013-04-22

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2011CB505300, 2011CB505302)

作者简介: 张 腾(1986—)女, 在读硕士研究生, 研究方向为中药药理。Tel: 15122343484 E-mail: zhangtengfeier@163.com

*通信作者 张艳军 Tel: (022)59596223 E-mail: zyjsunye@163.com

的原因、条件、机制等已成为中医药理论自身发展的必然要求^[1]。“十八反”歌诀中“半蒺藜及攻乌”意为乌头反半夏、瓜蒌、贝母、白蒺藜、白及，是中药配伍禁忌的内容之一^[2]。本研究“半蒺藜及攻乌”中各单味药的急性毒性及反药组合的毒性变化规律，为深入、系统地研究反药配伍组合的毒效规律提供实验依据。

1 材料

1.1 药材与试剂

生川乌为毛茛科多年生草本植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的干燥母根，购于四川江油；生半夏为天南星科草本植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的块茎，购于江苏泰州；瓜蒌为葫芦科植物瓜蒌 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 的干燥成熟果实，购于江苏洪泽；浙贝母为百合科植物浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq. 的鳞茎，购于浙江磐安；白蒺藜为葡萄科植物白蒺藜 *Ampelopsis japonica* (Thunb.) Makino 的干燥块根，购于安徽六安；白及为兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎，购于贵州凯里。以上药材均经天津中医药大学中药鉴定教研室李天祥副教授鉴定符合饮片标准。95%乙醇，天津市风船化学试剂科技有限公司。

1.2 动物

SPF级ICR小鼠，体质量18~22g，雌雄各半，由北京华阜康生物科技股份有限公司提供，许可证号SCXK(京)-2009-0004。

2 方法

2.1 提取物制备

由于“半蒺藜及攻乌”中单味药水提取物毒性较小，实验过程中未能测出急性毒性，因此课题组进一步考察了“半蒺藜及攻乌”中单味药材乙醇提取物的急性毒性。“半蒺藜及攻乌”中各单味药生川乌、生半夏、瓜蒌、浙贝母、白蒺藜、白及，以及生川乌与生半夏、生川乌与浙贝母、生川乌与白蒺藜、生川乌与白及反药组合分别按16:1、13.5:1、11:1、8.5:1、6:1、3.5:1、1:1、1:3、1:5、1:7、1:9、1:11、1:13比例配伍，生川乌与瓜蒌反药组合按15:1、10:1、8:1、6:1、4:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:8、1:10配伍后以70%乙醇回流提取2次。第1次先以10倍量70%乙醇浸泡1h，煎煮1.5h；第2次用8倍量70%乙醇煎煮1.5h；合并2次滤液，55℃下减压浓

缩至浸膏，使乙醇提取物质量浓度为生药2g/mL，置4℃冰箱保存，临用前用无菌水配制。

2.2 “半蒺藜及攻乌”中单味药急性毒性

采用单次最大剂量0.4mL/10g^[3]进行毒性预实验，每味药乙醇提取物用4只小鼠，雌雄各半。当死亡率≥80%进行半数致死剂量(LD₅₀)实验，死亡率<80%进行最大耐受量(MTD)实验，然后进行相关预实验，以确定正式实验的给药剂量。给药前12h小鼠禁食不禁水，ig给药1次，给药体积为0.4mL/10g。

2.2.1 生川乌LD₅₀确定 首先将小鼠分成若干组，每组4只，雌雄各半，组间生川乌乙醇提取物给药剂量以10倍递增或递减，找出引起4/4(或0/4)小鼠死亡的剂量，以此剂量为准，设立若干剂量组，每组4只，组间剂量比为0.65~0.85，给药剂量按组间剂量比依次递减，给药体积不变，筛选出0(D_{min})及100%估计致死剂量(D_{max})。以计划分组数(N=6)计算组间剂量比值(K)。

$$\frac{1}{K} = (N-1) \sqrt{\frac{D_{\max}}{D_{\min}}}$$

以D_{max}作为最高剂量组，D_{min}作为最低剂量组，按照K值计算出中间4组(每组10只，雌雄各半)的剂量，给药后连续观察7d，详细记录小鼠毒性反应的症状和死亡数。用Bliss机率单位法计算LD₅₀。

2.2.2 生半夏、瓜蒌、浙贝母、白蒺藜、白及MTD确定 小鼠设若干组，每组4只，雌雄各半，组间各单味药乙醇提取物剂量比为0.65~0.85，ig给药，筛选出单次给药后不产生死亡的最大给药量。小鼠随机分成5组，每组20只，雌雄各半，给药剂量按组间剂量比0.85依次递减，ig给药，记录小鼠的行为、活动及死亡等情况，以不引起实验动物死亡的最大剂量为各单味药的MTD。

2.3 “半蒺藜及攻乌”反药组合急性毒性

小鼠给药前12h禁食不禁水。小鼠随机分成13~14组，每组20~40只，雌雄各半。生川乌乙醇提取物剂量固定为LD₅₀(生药4.4g/kg)，半夏、瓜蒌、贝母、白蒺藜、白及乙醇提取物以一个不为零的剂量开始逐渐增加，单次ig给药，最大给药体积0.4mL/10g，观察给药后7d内小鼠死亡情况。

3 结果

3.1 “半蒺藜及攻乌”中单味药急性毒性

单次最大给药剂量预实验结果显示，生川乌给药剂量为80g/kg，小鼠死亡率为100%。LD₅₀实验

结果显示,生半夏、瓜蒌、浙贝母、白蔹、白及给药剂量为 80 g/kg 时,小鼠死亡率均 <20%,遂对各单味药进行 MTD 实验。

3.1.1 生川乌 LD₅₀ 确定 小鼠分别 ig 不同剂量的单位药材乙醇提取物约 5 min,均出现不同程度的毒性反应,主要表现为运动量减少、困倦,中毒严重者在给药后约 15 min 出现眼球突出、瞳孔扩大、呼吸困难、喘息,直至肌肉持续性收缩、后肢僵硬性伸展、四肢抽搐而死。大部分中毒小鼠死亡时间在给药后 45 min 以内,给药后第 2 天偶有死亡,第 3~7 天基本无死亡。 D_{max} 为 11.04 g/kg, D_{min} 为 2.99 g/kg,比例系数 $K=0.77$,生川乌的 LD₅₀ 为 4.4 g/kg,置信系数 (α) = 0.05 时的置信区间为 2.28~8.48 g/kg。

3.1.2 生半夏、瓜蒌、浙贝母、白蔹、白及 MTD 确定 各给药组中毒反应不明显。生半夏组小鼠随着给药剂量增大至最大给药剂量,偶有中毒现象,主要表现为自主活动明显减少、安静,呼吸缓慢,当给药剂量增至 350 g/kg 时 1 只小鼠死亡;其他各组均未见小鼠死亡,由此确定生半夏的 MTD 为 300 g/kg。瓜蒌剂量增至 43.4 g/kg 时,1 只小鼠当天死亡,增至最大剂量 49.9 g/kg 时,2 只小鼠死亡,之后未见死亡,由此确定瓜蒌的 MTD 为 37.8 g/kg。浙贝母剂量增至 320 g/kg 时,1 只小鼠死亡,其他各组均未见小鼠死亡,由此确定浙贝母的 MTD 为 272 g/kg。白蔹剂量增至 196 g/kg 时,1 只小鼠死亡,其他各组均未见死亡小鼠,由此确定白蔹的 MTD 为 167 g/kg。白及剂量增至 212 g/kg 时,1 只小鼠死亡,其他各组均未见小鼠死亡,由此确定白及的 MTD 为 180 g/kg。

3.2 “半蒌贝蔹及攻乌”反药组合急性毒性

各反药组合乙醇提取物给药后,小鼠活动明显减少,口腔分泌物增多,精神萎靡,被毛蓬松,潮湿,呼吸困难,出现惊厥现象,部分小鼠从 15 min 开始出现腹式呼吸,直至呼吸停止。尸检肉眼未观察到小鼠心、肝、脾、肺、肾等重要脏器组织有明显异常。

3.2.1 生川乌与生半夏配伍 与单独给予生川乌乙醇提取物 4.4 g/kg 相比,生川乌乙醇提取物与不同比例的生半夏乙醇提取物配伍后,随着生半夏乙醇提取物比例的增加,小鼠死亡率逐渐降低。结果见图 1。

3.2.2 生川乌与瓜蒌配伍 与单独给予生川乌乙醇

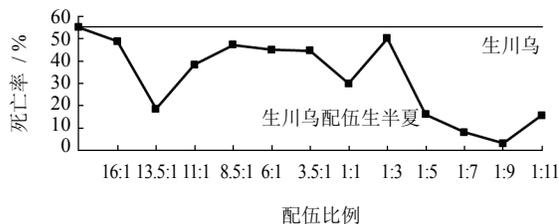


图 1 生川乌配伍生半夏的毒性变化规律

Fig. 1 Toxicity variation of compatible combination of raw AR and raw PR

提取物 4.4 g/kg 相比,生川乌乙醇提取物与不同比例的瓜蒌乙醇提取物配伍后,随着瓜蒌乙醇提取物比例的增加,小鼠死亡率呈先增加后降低的趋势,最后 (1:8~1:10) 又表现为增毒效果,这可能是瓜蒌在大剂量时毒性较强,与生川乌毒性叠加的结果。结果见图 2。

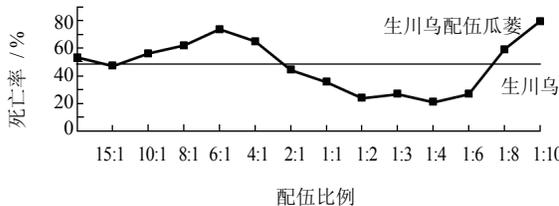


图 2 生川乌配伍瓜蒌的毒性变化规律

Fig. 2 Toxicity variation of compatible combination of raw AR and TF

3.2.3 生川乌与浙贝母配伍 与单独给予生川乌乙醇提取物 4.4 g/kg 相比,生川乌乙醇提取物与不同比例浙贝母乙醇提取物配伍后,随着浙贝母乙醇提取物比例的增加,小鼠死亡率呈先增加后降低的趋势。结果见图 3。

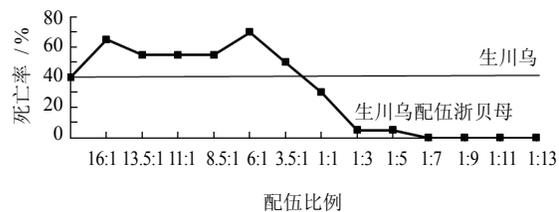


图 3 生川乌配伍浙贝母的毒性变化规律

Fig. 3 Toxicity variation of compatible combination of raw AR and FTB

3.2.4 生川乌与白蔹配伍 与单独给予生川乌乙醇提取物 4.4 g/kg 相比,生川乌乙醇提取物与不同比例白蔹乙醇提取物配伍后,随着白蔹乙醇提取物比例的增加,小鼠死亡率呈先增加后降低的趋势。结

果见图4。

3.2.5 生川乌与白及配伍 与单独给予生川乌乙醇提取物 4.4 g/kg 相比, 生川乌乙醇提取物与不同比例白及乙醇提取物配伍后, 随着白及乙醇提取物比例的增加, 小鼠死亡率未见明显规律。结果见图5。

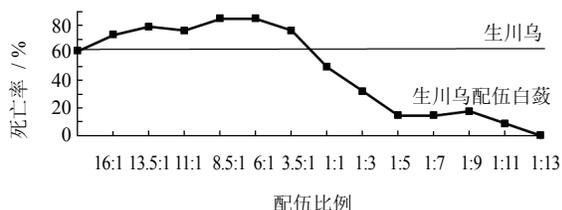


图4 生川乌配伍白及的毒性变化规律

Fig. 4 Toxicity variation of compatible combination of raw AR and AR

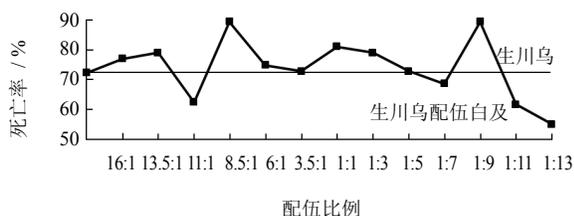


图5 生川乌配伍白及的毒性变化规律

Fig. 5 Toxicity variation of compatible combination of raw AR and BR

4 讨论

本实验通过对“半夏贝母及攻乌”中各单味药、反药组合进行急性毒性实验, 研究和评价“半夏贝母及攻乌”反药配伍组合的毒性及其变化规律。结果表明, 生川乌与生半夏配伍无相反现象; 生川乌与白及配伍未见明显的毒性变化规律; 生川乌与瓜蒌、浙贝母、白贝母配伍, 在特定配比范围内表现为相反和相反, 即生川乌与瓜蒌配伍比例在 4 : 1~10 : 1 时相反, 在 2 : 1~1 : 6 时相反; 生川乌与浙贝母配伍配伍比例在 6 : 1~16 : 1 时相反, 在 1 : 1~1 : 13 时相反; 生川乌与白贝母配伍比例在 3.5 :

1~16 : 1 时相反, 在 1 : 1~1 : 13 时相反。提示配伍比例对“半夏贝母及攻乌”中药材配伍的相反与相反有重要影响。

本实验所用药材均为道地药材, 质量优良, 保证了实验结果的可重复性; 所用药材经 70%乙醇提取, 能有效暴露药物的急性毒性^[4]; Bliss 机率单位法是严谨的计算 LD₅₀ 的方法, 最大优点是可以用少数动物求得 LD₅₀, 特别适用于可引起动物迅速死亡的受试物^[5-6], 因此本实验采用 Bliss 机率单位法计算 LD₅₀; 本实验采用多个分散的配伍比例进行反药配伍进行急性毒性实验, 更具说服力。

“半夏贝母及攻乌”是中药配伍禁忌的内容, 其中药材的相反与相反一直是中医药界颇有争论的课题。建立系统、规范的研究方法, 辩证地看待和探讨禁忌配伍, 去粗取精, 去伪存真, 真正揭示配伍禁忌的科学内涵, 将为中药临床上安全、合理用药提供依据^[7]。

参考文献

- [1] 段金廛, 张伯礼, 范欣生, 等. 中药配伍禁忌研究思路与技术体系框架 [M]. 世界科学技术—中医药现代化, 2012, 14(3): 1538-1546.
- [2] 张 腾, 庄朋伟, 张艳军, 等. 乌头与白贝母反药组合研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 612-616.
- [3] 李怡文, 钟赣生, 柳海艳, 等. 海藻、甘草配伍组合及其复方海藻玉壶汤的急性毒性实验比较研究 [J]. 科技导报, 2012, 30(34): 18-23.
- [4] 梁泽华, 尹丽娜, 杨 燕, 等. 不同炮制方法对川乌双酯型生物碱含量的影响 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(4): 288-291.
- [5] 宋传新, 徐旭东. LD₅₀ 的 Bliss、Finney 求算法的再评价 [J]. 海军医高专学报, 1996, 18(3): 186.
- [6] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006.
- [7] 周 鹏, 张艳军, 金 华, 等. 中药配伍禁忌研究的关键问题与对策 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(12): 1931-1933.