

不同附子炮制品四逆汤化学成分及毒性差异分析

刘 洪, 钟凌云*, 邓延文, 童恒力, 陈 浩, 王 硕, 卢兴美

江西中医药大学, 江西 南昌 330004

摘 要: **目的** 比较生附片、淡附片、阴附片、阳附片 4 种附子炮制品入方四逆汤化学成分以及毒性差异, 为临床安全用药提供科学的依据。 **方法** 分别以阴附片、阳附片、生附片、淡附片制备单味药以及四逆汤汤剂, 经 UPLC 法检测汤剂中乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、甘草苷、甘草酸、6-姜酚含量, 通过系统聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 对 4 种四逆汤进行分类分析, 再经急性毒性试验和长期毒性试验比较 4 种附子炮制品四逆汤毒性差异。 **结果** 4 种四逆汤中成分含量以及毒性大小存在显著性差异。双酯型生物碱: 乌头碱、新乌头碱、次乌头碱含量及其总量高低排序为生附片四逆汤>阴附片四逆汤>阳附片四逆汤>淡附片四逆汤; 单酯型生物碱: 苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱含量及其总量高低排序为阴附片四逆汤>阳附片四逆汤>淡附片四逆汤>生附片四逆汤; 在急性毒性试验中仅有生附片四逆汤可使小鼠产生轻微明显毒性反应, 4 种四逆汤均无致死性。经计算阴附片四逆汤、阳附片四逆汤小鼠最大给药量倍数均相当于人临床每日用药量的 200 倍左右, 和淡附片四逆汤以及生附片四逆汤比较无差异; 在长期毒性试验中, 4 种四逆汤对慢性心衰大鼠均不会致使肝肾损害, 无肝肾毒性。 **结论** 综合分析阴附片四逆汤、阳附片四逆汤、生附片四逆汤、淡附片四逆汤中双酯型生物碱以及单酯型生物碱含量差异, 并结合毒性试验结果, 得出 4 种附子炮制品入方经典名方四逆汤均具有合理性, 其中以阴附片、阳附片入方四逆汤在一定程度上更具优势, 阴附片更佳。

关键词: 四逆汤; 生附片; 淡附片; 阴附片; 阳附片; 毒性差异; 合理性; 双酯型生物碱; 单酯型生物碱; 乌头碱; 新乌头碱; 次乌头碱; 苯甲酰乌头原碱; 苯甲酰新乌头原碱; 苯甲酰次乌头原碱; 系统聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘-判别分析; 急性毒性; 长期毒性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)05-1397-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.05.006

Analysis on chemical constituents and toxicity of Sini Decoction of different *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* processed products

LIU Hong, ZHONG Ling-yun, DENG Yan-wen, TONG Heng-li, CHEN Hao, WANG Shuo, LU Xing-mei
Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To compare the differences in chemical composition and toxicity of four kinds of Fuzi (*Aconiti Lateralis Radix Praeparata*, *Aconite*) processed products of unprocessed *Aconite* piece (UAP), *Glycyrrhiza* cooked *Aconite* piece (GCAP), dried ginger steamed *Aconite* piece (DGSAP) and sand fried *Aconite* piece (SFAP) in Sini Decoction, so as to provide scientific basis for subsequent clinical safe medication. **Methods** Single-flavor *Aconiti* Decoction and Sini Decoction were prepared by UAP, GCAP, DGSAP and SFAP. The contents of aconitine, mesaconitine, hypaconitine, benzoyleaconine, benzoylemesaconine, benzoylehypaconine, liquiritin, glycyrrhizic acid, 6-gingerol in the decoction were detected by UPLC. Hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were used to classify and analyze four kinds of Sini Decoction, which forming unprocessed *Aconite* piece Sini Decoction (UAPSND), *Glycyrrhiza* cooked *Aconite* piece Sini Decoction (GCAPSND), dried ginger steamed *Aconite* piece Sini Decoction (DGSAPSND) and sand fried *Aconite* piece (SFAPSND), and then the toxicity of four kinds of *Aconite* processed products Sini Decoction were compared by acute toxicity test and long term toxicity

收稿日期: 2022-09-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81860703); 中药炮制技术传承创新团队 (CXLD22003)

作者简介: 刘 洪, 硕士研究生, 从事中药炮制机制及其药效研究。Tel: 15270310313 E-mail: 507598522@qq.com

*通信作者: 钟凌云, 博士生导师, 教授, 从事中药炮制机制及其药效研究。Tel: (0791)87118939 E-mail: ly1638163@163.com

test. **Results** There were significant differences in the contents and toxicity of the four kinds of *Aconite* processed products Sini Decoction. Diester alkaloids: The content and total amount of aconitine, mesaconitine, hypaconitine were in the order of UAPSND > DGSAPSND > SFAPSND > GCAPSND. Monoester alkaloids: The content and total amount of benzoylaconine, benzoylmesaconine, benzoylhypaconine were in the order of DGSAPSND > SFAPSND > GCAPSND > UAPSND. In the acute toxicity test, only the UAPSND could cause mild and obvious toxicity in rats, and the four kinds of *Aconite* processed products Sini Decoction were not fatal. According to the calculation, the maximum dosage of DGSAPSND and SFAPSND for rats are equivalent to about 200 times of the clinical daily dosage of human, which is not different from that of GCAPSND and UAPSND. In the long term toxicity test, four kinds of Sini decoction did not cause liver and kidney damage and had no liver and kidney toxicity in chronic heart failure rats. **Conclusion** By comprehensive analysis of the differences in the content of diester alkaloids and monoester alkaloids in DGSAPSND, SFAPSND, GCAPSND and UAPSND, combined with the results of toxicity test, it was concluded that the four kinds of *Aconite* processed products were reasonable in Sini Decoction of classic famous recipe. DGSAP and SFAP apply to the Sini decoction has more advantages to a certain extent, and DGSAP is better.

Key words: Sini Decoction; unprocessed *Aconite* piece; *Glycyrrhiza* cooked *Aconite* piece; dried ginger steamed *Aconite* piece; sand fried *Aconite* piece; differences of toxicity; rationality; diester alkaloids; monoester alkaloids; aconitine; mesaconitine; hypaconitine; benzoylaconine; benzoylmesaconine; benzoylhypaconine; hierarchical cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares discriminant analysis; acute toxicity; long term toxicity

四逆汤为汉代张仲景所著《伤寒论》中用于治疗心肾阳衰寒厥证的主方，由附子、干姜、炙甘草组成。四逆汤原始方以生附片入方^[1]，借生附子的峻烈强心作用发挥回阳救逆的作用，但因其主成分双酯型生物碱过高极易使机体中毒，难以把握其用药剂量，故后续各种校订本中多以炮制品入药^[2]。附子经不同方法炮制后，不仅可以降低其毒性，还能改变其药性，便于临床根据病症发展程度以及个体的差异选择合适的炮制品，体现了中医方剂因病而异、因人而异的治疗特点。

《中国药典》2020 年版^[3]中四逆汤单以淡附片入方，而林美斯等^[4]使用了生附片、淡附片、白附片、黑顺片、炮附片 5 种附子炮制品四逆汤用于急性脑缺氧治疗，结果表明淡附片入方的四逆汤在该病中疗效更佳。同时，吴文笛等^[5]在《伤寒论》《中国药典》和地方名中医使用的四逆汤治疗脓毒症的药效学研究和急性毒性研究中，发现与《伤寒论》和药典法四逆汤处方相比，地方名中医的经验方四逆汤不仅具有更好的治疗脓毒症作用且毒性最小。上述研究说明，临床在使用四逆汤用于不同病症治疗时，应选择合适附子炮制品入方，以最大限度的提高四逆汤的疗效并减少其不良作用。

四逆汤中成分是其发挥疗效和产生不良反应的主要物质基础。在煎煮过程中，四逆汤中不同附子炮制品可能会与方中其他药物发生不同的反应，导致汤剂中效毒成分含量存在差异。同时，课题组前期研究发现江西建昌帮的单味阴附片、阳附片不仅存在效毒差异，且在改善慢性心衰大鼠的心功能时，

还存在一定性别差异^[6]。故以阴附片、阳附片入方四逆汤后可能会对对方中的毒效成分含量产生不同的变化，进而影响该方临床用药的安全性。因此本研究首先分析了建昌帮阴附片、阳附片单药及其入方后的效/毒成分含量差异，同时对比了阴附片四逆汤、阳附片四逆汤、生附片四逆汤和淡附片四逆汤之间的毒性差异，以期为经典名方四逆汤扩大附子用品种及用药安全提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Acquity UPLC 超高效液相色谱仪，美国 Waters 公司；AE240 电子分析天平，十万分之一，梅特勒-托利多仪器上海有限公司；RE-52A/52AA 旋转蒸发器、SZ-93 自动双重纯水蒸馏器，上海亚荣生化仪器厂；多功能煎药壶，潮州市潮安区顺电有限公司；Konelab PRIME 30 全自动生化分析仪，美国 Thermo 公司；小动物超声成像系统，富士胶片（中国）投资有限公司。

1.2 试剂与药品

乙腈、甲醇为色谱纯，澳大利亚 Besto N 公司；水为娃哈哈纯净水；乌头碱（批号 CHB201226）、新乌头碱（批号 CHB201201）、次乌头碱（批号 CHB201109）、苯甲酰乌头原碱（benzoylaconine, BAC, 批号 CHB180309）、苯甲酰新乌头原碱（benzoylmesaconine, BMA, 批号 CHB180310）、苯甲酰次乌头原碱（benzoylhypaconine, BHC, 批号 CHB180307）、甘草酸（批号 CHB201104）、6-姜酚（批号 CHB201111）对照品均购于成都克洛玛生物

科技有限公司;甘草苷(批号 wkq19030708)对照品购于四川维克奇生物科技有限公司;所用对照品质量分数均 $\geq 98\%$ 。盐附子(批号 210315)、干姜(批号 210122)、炙甘草(批号 200826)均购于江西江中中药饮片有限公司,产地分别为四川江油、犍为及内蒙古阿拉善左旗,经江西中医药大学药学院龚千锋教授分别鉴定为毛茛科乌头属植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根的加工品,姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎,豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎炮制加工品,符合《中国药典》2020 年版鉴定标准。

盐酸阿霉素,南京凯基生物科技发展有限公司,批号 20210525;卡托普利,山西振东安欣生物制药有限公司,批号 20211102;生理盐水,江西科伦药业有限公司,批号 D22070306。

1.3 动物

ICR 小鼠雌雄各半共 120 只,SPF 级,体质量 18~22 g,购于河南斯克贝斯生物科技股份有限公司,动物合格证号:SCXK(豫)2020-0005。SD 大鼠雌雄各半共 160 只,SPF 级,体质量 180~200 g,购于江西中医药大学,动物合格证号:SCXK(赣)2018-0003。饲养条件:温度 20~24 °C,相对湿度 40%~70%,人工光照,12 h 明暗周期。动物饲料为大小鼠维持颗粒配合饲料,武汉市万千佳兴生物科技有限公司。本实验获得江西中医药大学实验动物伦理委员会批准,伦理审批号为 JZSYDWLL-20201220。

2 方法与结果

2.1 附子饮片的制备

2.1.1 生附片^[1] 取盐附子,刮去外皮,用清水浸漂,每日换水 2~3 次,至盐分漂尽,取出,切薄片,晒干,即得生附片(unprocessed Aconite piece, UAP)。

2.1.2 淡附片^[3] 取盐附子,用清水浸漂,每日换水 2~3 次,至盐分漂尽,与甘草、黑豆加水共煮透心,至切开后口尝无麻舌感,取出,除去甘草,黑豆,切薄片,晒干,即得淡附片(*Glycyrrhiza* cooked Aconite piece, GCAP)。

2.1.3 阴附片^[7] 取盐附子,用清水浸漂,漂至口尝微咸为度,取出晒干。用生姜汁闷润,以透心为度,取出。入木甑内,待锅中水沸,隔水坐锅,用武火蒸至药材熟透,口尝无或微有麻舌感时,停火取出,日摊夜闷至约七成干,内外水分均匀时,切成薄片,晾晒至干,筛去灰屑,即得阴附片(dried ginger

steamed Aconite piece, DGSAP)。

2.1.4 阳附片^[7] 取盐附子,刮去外皮,切成 3 mm 厚片,用清水浸漂,漂至口尝味淡为度,捞起。摊开翻晒至全干。取净砂至锅内炒至滑利,倒入药片,不断翻炒,至药片断面鼓起,变白黄色为度,取出,筛去砂子及灰屑,摊凉,即得阳附片(sand fried Aconite piece, SFAP)。

2.2 汤剂的制备

2.2.1 附子单煎汤剂的制备^[8] 取单味附子饮片 15 g,加饮片 8 倍质量水浸泡 30 min,武火(170 °C)煮沸后改文火(120 °C)煎煮 30 min,滤出药渣。药渣加饮片 7 倍质量水二次煎煮 20 min,滤出药渣。合并 2 次滤液,抽滤后浓缩定容。

2.2.2 不同附子炮制品四逆汤汤剂的制备 取四逆汤处方饮片(附子 15 g、炙甘草 15 g、干姜 10 g),按上法制备不同附子炮制品四逆汤汤剂(Sini Decoction, SND),分别为生附片四逆汤(UAPSND)、淡附片四逆汤(GCAPSND)、阴附片四逆汤(DGSAPSND)、阳附片四逆汤(SFAPSND)。

2.3 供试品、对照品溶液的制备

2.3.1 供试品溶液的制备 取“2.2”项下所制汤剂 10 mL 于 50 mL 圆底烧瓶中,减压挥干溶剂,乙腈溶解残渣,转移、定容于 10 mL 量瓶,摇匀。0.25 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得各汤剂供试品溶液。

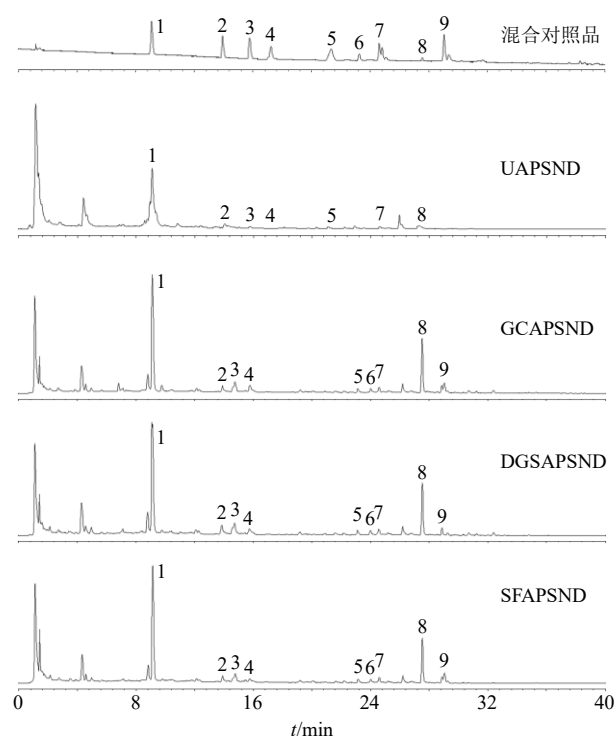
2.3.2 对照品溶液的制备 分别精密称定乌头碱 0.865 mg、新乌头碱 0.345 mg、次乌头碱 2.02 mg、BAC 2.25 mg、BMA 4.50 mg、BHC 1.65 mg、甘草苷 7.26 mg、甘草酸 7.88 mg、6-姜酚 2.32 mg,置于棕色量瓶中,溶于 2 mL 乙腈中,摇匀,即得各对照品母液。

2.4 色谱条件

色谱柱为 Waters BEH C₁₈ (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm);流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液,梯度洗脱:0~8 min, 10%~20%乙腈;8~15 min, 20%~25%乙腈;15~20 min, 25%~30%乙腈;20~30 min, 30%~50%乙腈;30~40 min, 50%~90%乙腈;体积流量 0.2 mL/min;检测波长为 235 nm;柱温为 26 °C;进样量为 2 μL 。混合对照品溶液及 4 种四逆汤供试品溶液的色谱图见图 1。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取“2.3.2”项下各对照品母液适量配成混合对照品溶液,按“2.4”项下色谱条件连续进样测定 6 次,计算得到乌头碱、新乌头碱、



1-甘草苷 2-苯甲酰新乌头原碱 3-苯甲酰乌头原碱 4-苯甲酰次乌头原碱 5-新乌头碱 6-次乌头碱 7-乌头碱 8-甘草酸 9-6-姜酚
1-liquiritin 2-benzoylmesaconine 3-benzoylaconine 4-benzoylhypaconine
5-mesaconitine 6-hypaconitine 7-aconitine 8-glycyrrhizic acid
9-6-gingerol

图 1 混合对照品溶液及 4 种四逆汤供试品溶液的 UPLC 图
Fig. 1 UPLC of mixed reference substances solution and four kinds of Sini Decoction

次乌头碱、BAC、BMA、BHA、甘草苷、甘草酸、6-姜酚峰面积的 RSD 分别为 0.88%、1.67%、0.61%、0.99%、1.42%、0.95%、1.06%、0.72%、0.37%，表明仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 取“2.3.1”项下淡附片四逆汤供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24 h 按“2.4”项下色谱条件重复进样 3 次，计算得到乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、BAC、BMA、BHA、甘草苷、甘草酸、6-姜酚峰面积的 RSD 分别为 0.35%、0.24%、0.43%、0.27%、0.30%、0.24%、0.23%、0.22%、0.27%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性。

2.5.3 重复性试验 取 6 份淡附片四逆汤处方重复制备 6 份淡附片四逆汤供试品溶液，按“2.4”项下色谱条件重复进样 3 次，计算得到乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、BAC、BMA、BHA、甘草苷、甘草酸、6-姜酚质量分数的 RSD 分别为 1.81%、0.71%、1.96%、1.75%、0.90%、1.05%、0.28%、0.88%、1.58%，表明本方法具有可重复性。

2.5.4 线性关系考察 精密吸取“2.3.2”项下各对照品母液适量，乙腈定容至刻度线，即得系列对照品混合对照品溶液，其中乌头碱质量浓度梯度为 173.0、86.5、51.9、34.6、17.3、4.3 $\mu\text{g/mL}$ ，新乌头碱质量浓度梯度为 172.5、86.3、60.4、43.1、25.9、8.6 $\mu\text{g/mL}$ ，次乌头碱质量浓度梯度为 303.0、202.0、121.2、80.8、40.4、20.2 $\mu\text{g/mL}$ ，BAC 质量浓度梯度为 225.0、112.5、78.8、56.3、33.8、11.3 $\mu\text{g/mL}$ ，BMA 质量浓度梯度为 337.5、225.0、112.5、67.5、45.0、11.3 $\mu\text{g/mL}$ ，BHA 质量浓度梯度为 165.0、82.5、57.8、41.3、33.0、8.3 $\mu\text{g/mL}$ ，甘草苷质量浓度梯度为 2 904.0、1 452.0、726.0、435.6、290.4、145.2 $\mu\text{g/mL}$ ，甘草酸质量浓度梯度为 7 880.0、1 576.0、788.0、472.8、315.2、157.6 $\mu\text{g/mL}$ ，6-姜酚质量浓度梯度为 928.0、464.0、232.0、139.2、92.8、46.4 $\mu\text{g/mL}$ 。分别按“2.4”项下色谱条件下重复进样 3 次，测定峰面积，以对照品质量浓度为横坐标 (X)，峰面积积分为纵坐标 (Y) 进行线性回归，得回归方程：乌头碱 $Y=4\,833\,273\,X-4815$ ， $R^2=0.999\,2$ ，线性范围 4.3~173.0 $\mu\text{g/mL}$ ；新乌头碱 $Y=7\,219\,118\,X-22\,610$ ， $R^2=0.999\,4$ ，线性范围 8.6~172.5 $\mu\text{g/mL}$ ；次乌头碱 $Y=10\,886\,051\,X-969\,865$ ， $R^2=0.999\,1$ ，线性范围 20.2~303.0 $\mu\text{g/mL}$ ；BAC $Y=8\,275\,542\,X-32\,905$ ， $R^2=0.999\,1$ ，线性范围 11.3~225.0 $\mu\text{g/mL}$ ；BMA $Y=8\,377\,833\,X-27\,689$ ， $R^2=1.000\,0$ ，线性范围 11.3~337.5 $\mu\text{g/mL}$ ；BHA $Y=7\,820\,481\,X-32\,430$ ， $R^2=0.999\,2$ ，线性范围 8.3~165.0 $\mu\text{g/mL}$ ；甘草苷 $Y=15\,955\,936\,X+24\,414$ ， $R=0.999\,5$ ，线性范围 145.2~2 904.0 $\mu\text{g/mL}$ ；甘草酸 $Y=3\,574\,140\,X+294\,369$ ， $R^2=0.999\,4$ ，线性范围 157.6~7 880.0 $\mu\text{g/mL}$ ；6-姜酚 $Y=6\,217\,676\,X-5000$ ， $R^2=1.000\,0$ ，线性范围 46.4~928.0 $\mu\text{g/mL}$ ；结果表明 9 个对照品在各自范围内线性关系良好。

2.5.5 加样回收率试验 取半份淡附片四逆汤处方饮片（附子 7.5 g，炙甘草 7.5 g，干姜 5 g），加入各等量对照品粉末，按“2.2.2”项制备淡附片四逆汤加样溶液，并按“2.3.1”项下制备淡附片四逆汤加样供试品溶液，经 0.25 μm 微孔滤膜滤过。按“2.4”项下色谱条件进样测定，计算得到乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、BAC、BMA、BHA、甘草苷、甘草酸、6-姜酚的平均加样回收率分别为 100.18%、93.45%、101.29%、102.89%、101.40%、91.97%、102.80%、94.21%、103.06%，RSD 分别为 1.69%、

0.99%、1.08%、1.73%、1.11%、1.56%、1.28%、1.68%、1.87%，说明本方法具有良好的回收率。

2.6 含量测定结果

4 种附子炮制品单煎汤剂及四逆汤处方汤剂含量测定结果见表 1。在附子单煎汤剂中双酯型生物碱含量方面，乌头碱、新乌头碱、次乌头碱含量及其总量高低排序为生附片>阴附片>阳附片>淡附片；单酯型生物碱含量方面，苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱含量及其总量高低为阴附片>阳附片>淡附片>生附片。在四逆汤全方汤剂中双酯型生物碱含量方面，乌头碱、新乌头碱、次乌头碱含量及其总量高低排序为生附片四逆汤>阴附片四逆汤>阳附片四逆汤>淡附片四逆汤；单酯型生物碱含量方面，苯甲酰乌头原碱、

苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱含量及其总量高低为阴附片四逆汤>阳附片四逆汤>淡附片四逆汤>生附片四逆汤。4 种附子炮制品单煎汤剂和四逆汤全方汤剂含量比较发现，四逆汤全方汤剂中 3 种双酯型生物碱含量要显著性低于相应附子单煎汤剂，单酯型生物碱含量却要显著性高于相应附子单煎汤剂。

2.7 化学计量学分析

2.7.1 系统聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA) 液相可以测定 4 种附子炮制品四逆汤 9 种化学成分含量，进行差异性分析，HCA 分别以双酯型生物碱和单酯型生物碱为分类点，进行宏观类别差异性分析，二者互相补充。

运用 SPSS 21.0 统计软件进行 HCA，其中样本

表 1 不同附子炮制品四逆汤汤剂中含量测定结果

Table 1 Results of content determination of components in different Aconite processed products Sini Decoction

组别	汤剂	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)							
		乌头碱	新乌头碱	次乌头碱	BAC	BMA	BHA	甘草苷	甘草酸
生附片	单味	17.0 $\pm$ 0.6	16.1 $\pm$ 0.5	16.1 $\pm$ 0.0	5.3 $\pm$ 1.3	9.6 $\pm$ 0.5	5.9 $\pm$ 0.7		
	处方	9.9 $\pm$ 0.5*	10.9 $\pm$ 0.6*	11.2 $\pm$ 1.0*	8.1 $\pm$ 0.7*	28.7 $\pm$ 3.5*	9.0 $\pm$ 0.4*	917.1 $\pm$ 15.1	962.4 $\pm$ 40.1
淡附片	单味	5.8 $\pm$ 0.1	6.7 $\pm$ 0.5	11.5 $\pm$ 0.8	9.2 $\pm$ 0.3	68.0 $\pm$ 0.3	10.5 $\pm$ 0.2	206.5 $\pm$ 3.2	425.3 $\pm$ 1.2
	处方	3.2 $\pm$ 0.1*	6.3 $\pm$ 0.3	10.1 $\pm$ 0.5	10.2 $\pm$ 0.2	94.7 $\pm$ 3.3*	12.8 $\pm$ 0.2	1 250.4 $\pm$ 55.7	2 033.9 $\pm$ 23.0
阴附片	单味	7.9 $\pm$ 0.6	8.1 $\pm$ 0.3	13.0 $\pm$ 0.2	10.0 $\pm$ 0.0	115.4 $\pm$ 2.4	16.6 $\pm$ 0.1		
	处方	4.2 $\pm$ 0.0*	7.3 $\pm$ 0.0*	10.6 $\pm$ 0.1*	12.8 $\pm$ 0.4*	119.9 $\pm$ 3.8	17.7 $\pm$ 1.6	1 105.7 $\pm$ 17.7	1 195.3 $\pm$ 53.7
阳附片	单味	7.5 $\pm$ 0.2	7.5 $\pm$ 0.2	11.6 $\pm$ 0.3	10.6 $\pm$ 0.7	96.9 $\pm$ 2.6	12.1 $\pm$ 0.2		
	处方	3.9 $\pm$ 0.2*	6.8 $\pm$ 0.0	10.4 $\pm$ 0.2*	12.1 $\pm$ 0.6*	104.1 $\pm$ 0.5*	13.3 $\pm$ 0.1	1 020.6 $\pm$ 33.3	1 426.7 $\pm$ 97.6

与相应单味附子饮片中相同成分比较：* $P<0.05$

* $P<0.05$ vs same components in the corresponding single Aconite slices

1~3 为生附片四逆汤 3 次数据，4~6 为淡附片四逆汤 3 次数据，7~9 为阴附片四逆汤 3 次数据，10~12 为阳附片四逆汤 3 次数据，共 12 样本量。分别以 12 样本量中双酯型生物碱（乌头碱、新乌头碱、次乌头碱）和单酯型生物碱（苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱）峰面积为变量，采用组间联接法及皮尔逊相关性作为分类依据，进行个案 HCA^[9]，结果分别见图 2、3。结果显示，以双酯型生物碱（乌头碱、新乌头碱、次乌头碱）进行分类时，12 个样本中分为生附片四逆汤 3 个样本可单为一类，淡附片四逆汤、阴附片四逆汤和阳附片四逆汤共 9 个样本可归为同一类。以单酯型生物碱（苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱）进行分类，12 个样本中生附片四逆汤 3 个样本可单为一类，淡附片四逆汤、阴附

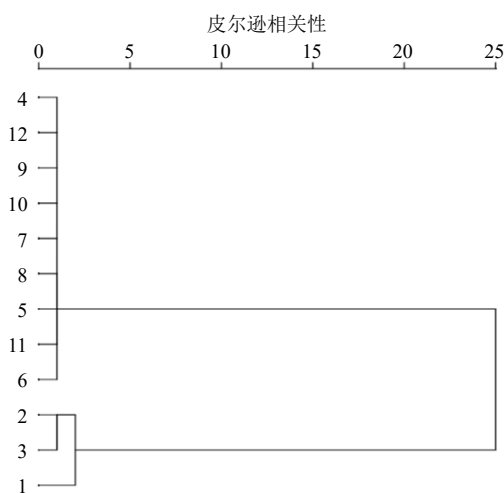


图 2 4 种四逆汤以双酯型生物为变量聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis of four kinds of Sini Decoction with diester alkaloids as variable

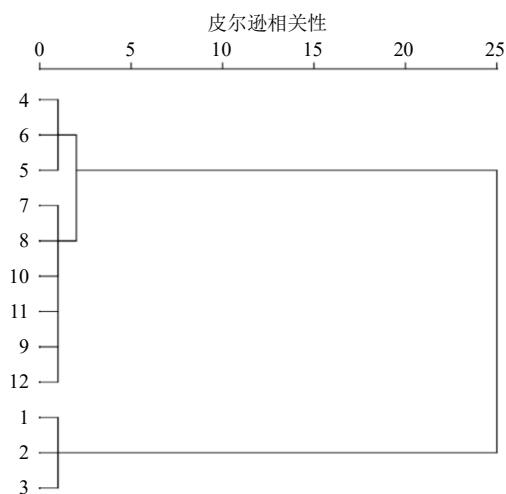


图 3 4 种四逆汤以单酯型生物碱为变量聚类分析树状图

Fig. 3 Dendrogram of cluster analysis of four kinds of Sini Decoction with monoester alkaloids as variables

片四逆汤和阳附片四逆汤共 9 个样本可归为同一类。表明无论是以双酯型生物碱总量还是以单酯型生物碱总量进行分类分析时，生附片四逆汤与淡附片四逆汤、阴附片四逆汤、阳附片四逆汤三者成分差异较大，淡附片四逆汤、阴附片四逆汤、阳附片四逆汤成分含量差异相对较小。

2.7.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 为了印证 HCA 的结果，进行 PCA。将 3 批 4 种四逆汤汤剂中 9 个指标成分共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件，施行无监督模式的 PCA^[10]，观察样品间自然聚集，结果见图 4。PCA 得分图显示，4 种四逆汤汤剂各自聚集，可分为生附片四逆汤、淡附片四逆汤、阴附片四逆汤和阳附片四逆汤 4 类，其中生附片四逆汤与其他四逆汤相聚较远，可自为一类，淡附片四逆汤、阴附片四逆汤与阳附片四逆汤的点较接近，可归为一类。PCA 与 HCA 结果一致。

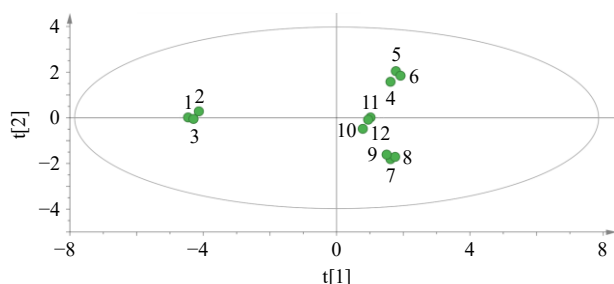


图 4 不同附子炮制品四逆汤 PCA 得分图

Fig. 4 PCA scores of different Aconite processed products Sini Decoction

为了进一步印证 PLS-DA 的结果。在 PCA 的基础上，将 4 种四逆汤 3 次数据结果中 9 个指标成分共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件进行 OPLS-DA^[10]，进一步分析 4 种附子炮制品四逆汤的差异性，样本得分矩阵见图 5。该模型解释率参数 R^2 为 0.969，预测能力参数 Q^2 为 0.959，表明建立的数学模型稳定且预测能力较强。OPLS-DA 得分图显示，4 种四逆汤聚类效果较好，其中阴附片四逆汤和阳附片四逆汤相距较近，生附片四逆汤、淡附片四逆汤相聚较远。与 HCA 和 PCA 距离为 2 时结果一致，进一步印证 HCA 和 PCA 的结果。同时根据变量重要性投影 (variable importance projection, VIP) 值 >1 的原则，筛选差异组分，见图 6。结果显示，共找到了 4 个关键差异成分，VIP 值大小排序依次为 8 (甘草酸)、1 (乌头碱)、2 (新乌头原碱)、9 (6-姜酚) 号峰是引起不同附子炮制品四逆汤成分差异的主要标志性成分。

2.8 毒性实验

2.8.1 小鼠急性毒性实验 4 种附子单煎汤剂小鼠急性毒性预试验显示，小鼠给予 4 种附子单煎生药量梯度 120、100、80、60、40 g/kg 后，发现仅有生附片单煎组中小鼠出现死亡，尤其是给药量为 120 g/kg 时小鼠 100% 死亡。其他单味附子炮制品未见小鼠死亡情况，未找到小鼠 100% 死亡剂量。故

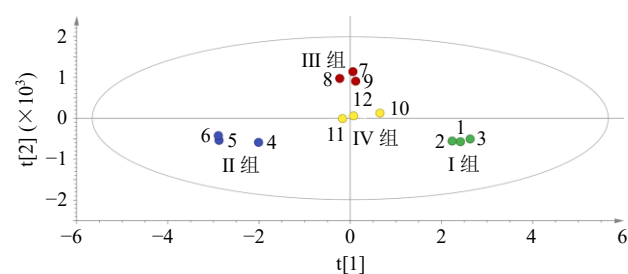


图 5 不同附子炮制品四逆汤 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 OPLS-DA score chart of different Aconite processed products Sini Decoction

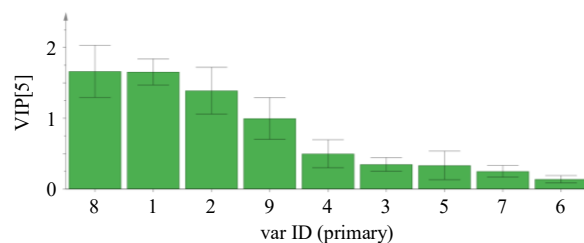


图 6 不同附子炮制品四逆汤 OPLS-DA VIP 图

Fig. 6 OPLS-DA VIP Chart of different Aconite processed products Sini Decoction

只进行生附片半数致死量(median lethal dose, LD₅₀)实验。取健康 ICR 小鼠 50 只,雌雄各半,根据体质和性别随机分为 5 组,每组雌雄各 5 只。实验前小鼠禁食不禁水 16 h,按体质量 ig,各组小鼠分别给予剂量 140.0、98.0、68.8、48.0、33.6 g/kg 生药量生附片汤剂。连续观察 24 h,并记录小鼠死亡数。给药后小鼠自发活动减少,静伏,少动,死亡之前抽搐。死亡时间主要集中在给药后 0.5~1 h 内,4 h 后动物再无死亡。

动物反应及死亡情况见表 2,按 Bliss 法计算生附片单煎汤剂 LD₅₀ 值为 71.3 g/kg 生药量,95%置信区间为 60.0~84.6 g/kg 生药量。

表 2 生附片汤剂小鼠 ig 动物反应及死亡情况

Table 2 Animal response and death of UAP decoction rats by gavage

质量浓度/ (g·kg ⁻¹)	死亡 时间/h	动物 只数	死亡数	毒性症状
140.0	0.5~1.0	10	10	静伏少动,死前抽搐
98.0	0.5~1.5	10	8	静伏少动,死前抽搐
68.8	2.0~3.0	10	3	静伏少动,死前抽搐上
48.0	3.0~4.0	10	1	静伏少动,死前抽搐
33.6	无	10	0	自发活动减少,无死亡

2.8.2 小鼠最大给药量实验 经 4 种四逆汤小鼠急性毒性预试验结果显示,小鼠给予 4 种四逆汤生药量梯度 120、100、80、60、40 g/kg 后,发现 4 种四逆汤小鼠在给药体积最大量,给药梯度达 120 g/kg 时,4 种四逆汤均无小鼠死亡情况发生,仅有生附片四逆汤组小鼠有轻微毒性反应,但均未找到 4 种四逆汤给药后小鼠 100%死亡剂量,无法测出 LD₅₀。故改测 4 种四逆汤小鼠 1 d 最大给药量实验。

当小鼠给药 120 g/kg 时,四逆汤质量浓度为 3.0 g/mL,四逆汤已接近浸膏状态,难以再次浓缩,故以 3.0 g/mL 作为最大质量浓度。

(1) 动物分组及给药:取健康 ICR 小鼠 50 只,雌雄各半,根据体质量和性别随机分为空白组、生附片四逆汤组、淡附片四逆汤组、阴附片四逆汤组、阳附片四逆汤组,每组雌雄各 5 只。取 4 种四逆汤饮片制备四逆汤汤剂,并浓缩至 3.0 g/mL。实验前小鼠禁食不禁水 16 h,按体质量 ig,各组小鼠分别给予剂量 120 g/kg 生药量,空白组给予等体积生理盐水。

(2) 观察及脏器指数:各组小鼠经 ig 后即刻观察小鼠毒性反应情况,包括外观体征、行为活动、

精神状态、食欲、大小便及颜色、被毛、肤色、呼吸,以及鼻、眼、口腔、生殖器等有无异常分泌物。并给药当天记录小鼠恢复自由活动、饮水、饮食时长。此后每天观察 1 次,每日称定质量,记录期间动物死亡情况,并进行尸体解剖,观察心、肝、脾、肺、肾等重要脏器有无病变。实验第 14 天处死、解剖小鼠,观察其心、肝、肾、肺及脾等脏器和组织的体积、颜色和质地等变化,肝脏和肾脏拍照称定质量,计算脏器指数。

(3) 最大给药量测定:按公式计算该剂量下小鼠给药相当于人临床每日推荐用药量的倍数。

小鼠的最大给药量倍数=每只小鼠最大给药量×成人平均体质量/(小鼠平均体质量×成人每日用量)

(4) 结果:给药后 14 d 内各组小鼠均无死亡现象,各组小鼠给药过程具体体况情况见表 3。第 14 天进行小鼠称定质量,4 种附子炮制品四逆汤小鼠在给药 14 d 后和空白组比较雌雄体质量增长均无显著性差异。脏器指数结果显示,第 14 天处死、解剖小鼠,观察其心、肝、肾、肺及脾等脏器,发现 4 种附子炮制品四逆汤均不会引起小鼠肝脏、肾脏肿大以及病理学改变。经计算,4 种四逆汤组小鼠给药后雌雄肝脏、肾脏器指数和空白组比较均无显著性差异,见表 4,说明 4 种附子炮制品四逆汤均系属无毒。

四逆汤人 1 d 用量 36 g 生药量,生附片四逆汤、淡附片四逆汤、阴附片四逆汤、阳附片四逆汤组小鼠最大给药量分别为 2.28、2.28、2.28、2.27 g 生药量,平均体质量分别为 19.0、19.0、19.0、18.9 g。生附片四逆汤、淡附片四逆汤、阴附片四逆汤、阳附片四逆汤小鼠最大给药量倍数经公式计算均相当于人临床每日用药量的 200 倍。

2.8.3 大鼠长期毒性实验 根据《中国药典》2020 年版规定四逆汤人口服量为 30~60 mL/d,剂量范围为 342.9~685.7 mg/(kg·d)。以药典人口服剂量中间值 45 mL 为中剂量,3:6:12 设置低、中、高剂量,按等效体表面积折算大鼠给药低、中、高剂量分别为 1.586 5、3.173 2、6.346 4 g/kg。经预实验发现大鼠给药剂量为 6.346 4 g/kg,大鼠体态恢复及心衰指标恢复效果最佳。故在后续试验中以高剂量作为大鼠给药剂量。

(1) 造模:大鼠适应性喂养 1 周。按课题组前期研究^[6]造模,阿霉素用生理盐水溶液稀释,按体质量进行 ip,大鼠给药梯度剂量及频率分别为

表 3 各组小鼠体态情况
Table 3 Body posture of rats in each group

组别	体态观察				
	精神状态	食欲情况	呼吸状态	粪便颜色	分泌物
UAPSND	精神萎靡, 少动, 0.5 h 后恢复	食欲下降, 0.5 h 后恢复	呼吸微急促, 半小时后恢复	灰褐色, 呈颗粒状	鼻、口腔等无分泌物
GCAPSND	活动自如, 精神状态正常	食欲正常	呼吸正常, 无急促声	灰褐色, 呈颗粒状	鼻、口腔等无分泌物
DGSAPSND	活动自如, 精神状态正常	食欲正常	鼻、口腔等无分泌物	灰褐色, 呈颗粒状	鼻、口腔等无分泌物
SFAPSND	活动自如, 精神状态正常	食欲正常	鼻、口腔等无分泌物	灰褐色, 呈颗粒状	鼻、口腔等无分泌物
空白	活动自如, 精神状态正常	食欲正常	鼻、口腔等无分泌物	灰褐色, 呈颗粒状	鼻、口腔等无分泌物

表 4 各组雌雄小鼠体质量变化及脏器指数
Table 4 Weight change and organ index of male and female rats in each group

组别	性别	体质量/g		脏器质量/g		脏器指数/%	
		给药 0 d	给药 14 d	肝	肾	肝	肾
空白	雌	18.400 0±0.230 2	24.200 0±1.666 4	1.316 8±0.073 8	0.312 1±0.018 0	5.462 2	1.287 0
	雄	19.600 0±0.216 8	31.000 0±1.173 9	1.701 4±0.044 2	0.413 4±0.017 9	5.555 8	1.272 5
UAPSND	雌	18.400 0±0.219 1	25.000 0±1.456 0	1.365 5±0.106 8	0.321 7±0.030 5	5.449 5	1.280 7
	雄	19.700 0±0.305 0	31.300 0±0.503 0	1.741 2±0.165 4	0.398 8±0.032 8	5.444 9	1.295 8
GCAPSND	雌	18.500 0±0.363 3	25.200 0±1.013 4	1.374 4±0.071 9	0.323 0±0.024 1	5.411 8	1.243 2
	雄	19.500 0±0.320 9	31.200 0±1.375 9	1.696 6±0.080 9	0.403 8±0.021 6	5.431 4	1.263 7
DGSAPSND	雌	18.400 0±0.328 6	25.000 0±0.976 2	1.350 8±0.034 0	0.310 3±0.035 8	5.438 5	1.282 7
	雄	19.500 0±0.230 2	31.000 0±0.918 2	1.685 9±0.074 1	0.392 3±0.024 7	5.480 8	1.332 6
SFAPSND	雌	18.300 0±0.268 3	24.900 0±1.851 2	1.355 3±0.091 7	0.319 7±0.019 6	5.436 7	1.288 8
	雄	19.500 0±0.249 0	31.400 0±1.171 8	1.718 8±0.172 6	0.417 9±0.025 5	5.495 5	1.335 3

1 mg/kg 第 1 天, 2 mg/kg 第 4 天, 3 mg/kg 第 7 天, 4 mg/kg 第 11 天, 3 mg/kg 第 15 天, 模型组注射阿霉素, 空白组注射生理盐水, 每次造模后 1 d 应用小动物专用彩色超声影像系统检测各组大鼠心功能。M-Mode 模式测量 3 个心动周期的左室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF), 取均值计算 LVEF≤40%为模型成功。

(2) 分组及给药: 将心衰模型成功的大鼠按体质量随机分为模型组、生附片四逆汤组 (UAPSND)、淡附片四逆汤组 (GCAPSND)、阴附片四逆汤组 (DGSAPSND)、阳附片组四逆汤组 (SFAPSND)、阳性药组 (卡托普利)。每组 12 只, 雌雄各半。各给药组按体质量 6.346 4 g/kg 给予相应汤剂, 阳性药组给予成人临床等效剂量 10 mg/kg 卡托普利, 空白组和模型组给予等体积生理盐水。连续给药 2 周。

(3) 生物样本采集: 最后 1 次给药结束后, 禁食不禁水 12 h, 2%戊巴比妥钠 (3 mL/kg) ip 麻醉, 腹主动脉取血, 室温静置 40 min, 于 3000 r/min 离

心 10 min 取上清液得血清样本, 并置于-80 °C 保存备用。取血结束后取心脏、肾脏和肝脏, 用生理盐水冲洗表面并用滤纸吸干多余的水分, 称定质量后泡于 10%多聚甲醛中, 室温保存。

(4) 肝肾损伤生化指标测定: 采用全自动生化仪测定血清中肝肾功能指标, 包括总胆红素、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、尿素、肌酐。

(5) HE 染色观察组织病理: 肝肾组织经 10%多聚甲醛固定 24 h, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片, 二甲苯 I 和 II 脱蜡, 梯度水化, 苏木素染色, 蒸馏水冲洗, 含 1%盐酸的 70%乙醇水化, 蒸馏水漂洗, 70%和 80%乙醇浸泡后, 90%伊红醇溶液染色, 脱水, 透明, 中性树胶封片, 显微摄影成像系统×200 下拍片, 记录结果。

(6) 大鼠体质量变化: 在造模及给药过程中正常组小鼠体质量呈稳步上升趋势, 而模型组大鼠在第 3 次造模后体质量逐步下降, 直至第 3 天给药后

各给药组大鼠体质量恢复, 雄性大鼠升高趋势更加明显。其中淡附片四逆汤组大鼠体质量上升趋势远低于其他给药组。各组大鼠造模及给药过程体质量见表 5、6。

表 5 大鼠造模期间体质量变化
Table 5 Changes in body weight of rats during modeling

组别	性别	体质量变化/g				
		第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次
空白	雌	186.8±13.2	199.8±10.5	212.8±12.9	219.4±10.2	225.2±12.6*
	雄	205.9±11.7	232.2±14.1	242.6±11.5	261.7±16.2	287.6±23.3*
模型	雌	187.4±11.0	200.4±11.7	210.8±12.2	205.5±13.4	202.4±12.4*#
	雄	206.5±13.6	230.2±21.3	249.1±23.2	244.4±21.4	240.5±17.6*#

末次称定质量与首次称定质量比较: * $P < 0.05$; 末次称定质量时, 与空白组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ represents the comparison between the last weighing and the first weighing; # $P < 0.05$ vs blank group when the last time the mass is weighed

表 6 大鼠给药期间体质量变化
Table 6 Changes in body weight of male rats during administration

组别	性别	体质量变化/g					
		第 1 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 12 天	第 15 天
空白	雌	230.2±15.2	235.1±12.5	239.7±15.9	242.0±14.2	245.1±20.1	248.8±22.5*&
	雄	299.6±23.3	327.5±18.9	339.5±41.9	348.9±32.0	355.0±18.1	365.8±30.5*&
模型	雌	201.2±18.7	200.9±13.1	198.7±20.0	195.5±20.3	194.2±15.9	192.5±15.9*#
	雄	242.1±22.7	239.7±16.8	236.1±21.2	233.5±10.6	230.5±14.7	229.5±10.6*#
UAPSND	雌	202.2±11.9	201.8±12.1	208.0±14.2	212.9±25.6	219.5±21.8	222.1±22.5*#&
	雄	241.9±18.9	237.8±21.6	240.6±16.7	246.6±17.2	251.2±16.1	258.2±20.6*#&
GCAPSND	雌	203.4±16.3	200.7±13.1	207.2±15.2	211.7±12.6	215.9±31.1	223.0±22.7*#&
	雄	242.0±12.9	238.5±18.9	240.3±16.8	247.8±30.9	254.9±20.1	260.2±23.6*#&
DGSAPSND	雌	202.4±13.6	199.5±14.4	204.3±14.3	209.6±31.8	216.4±31.3	230.2±15.9*#&
	雄	242.6±19.1	236.3±19.9	244.2±35.6	254.2±28.0	258.2±12.6	265.2±19.8*#&
SFAPSND	雌	203.2±12.5	197.3±10.2	203.5±13.4	206.5±29.7	213.2±16.1	228.2±23.7*#&
	雄	241.8±20.2	238.6±21.0	245.8±29.9	251.3±25.3	254.7±11.6	261.4±16.0*#
卡托普利	雌	202.2±15.8	199.5±16.3	203.4±21.6	209.8±13.2	216.7±18.1	218.8±17.6*#&
	雄	242.1±28.9	238.8±22.2	242.1±20.8	246.6±27.2	250.1±15.5	255.7±24.3*#&

末次称定质量与首次称定质量比较: * $P < 0.05$; 末次称定质量时, 与空白组比较: # $P < 0.05$, 与模型组比较: & $P < 0.05$

* $P < 0.05$ represents the comparison between the last weighing and the first weighing; When the last time the mass is weighed # $P < 0.05$ vs blank group;

& $P < 0.05$ vs blank group

(7) 脏器指数: 与空白组比较, 模型组肝、肾脏器指数显著增加; 与模型组相比, 4 种四逆汤可显著降低肝、肾脏器指数, 其中雌性大鼠中以阴附片四逆汤作用效果最为显著, 雄性大鼠中以淡附片四逆汤和阳附片四逆汤作用效果更为显著。各组雌雄大鼠脏器指数见表 7。

(8) 大鼠血清肝、肾功能指标的影响: 与空白组比较, 模型组大鼠血清中总胆红素、ALT、AST、尿素、肌酐指标有升高趋势。与模型组相比, 4 种四逆汤大鼠血清中总胆红素、ALT、AST、尿素、肌

酐有下降趋势, 总体与空白组相比没有显著性差异。见表 8。

(9) 对大鼠肝、肾组织病理的影响: 各组大鼠肝脏组织 HE 染色并无明显区别, 见图 7。其中各组肝组织整体结构均基本正常, 组织肝细胞结构饱满, 未见肝细胞明显疏松水肿坏死等变性, 肝细胞如黄色箭头所示, 组织中央静脉清晰, 肝窦沿着中央静脉呈放射状排列, 红色箭头所示为肝窦巨噬细胞, 组织未见明显炎症细胞浸润。

各组大鼠肾脏组织 HE 染色并无明显区别, 见

表 7 各组雌雄大鼠脏器指数

Table 7 Organ index of male and female rats in each group

组别	性别	质量/g			脏器指数/%		
		心	肝	肾	心	肝	肾
空白	雌	0.761 9±0.178 2	7.066 4±3.237 9	1.664 6±0.149 4	0.306 3	2.840 7	0.669 2
	雄	1.026 0±0.076 0	10.572 5±1.849 1	2.516 1±0.270 1	0.280 5	2.890 5	0.687 9
模型	雌	0.634 5±0.107 3	8.309 7±0.681 7	1.607 4±0.141 4	0.308 8	4.044 3*	0.782 3*
	雄	0.664 3±0.057 3	11.236 5±0.057 3	1.821 9±0.114 2	0.289 4	4.895 4*	0.793 7*
UAPSND	雌	0.708 1±0.060 5	7.613 0±0.748 7	1.682 0±0.198 7	0.318 9	3.428 5*#	0.757 5*#
	雄	0.799 4±0.061 6	10.092 2±1.536 1	2.103 4±0.163 2	0.295 1	3.725 7*#	0.776 5*#
GCAPSND	雌	0.862 4±0.384 5	8.127 4±1.697 8	1.560 3±0.177 7	0.425 0	4.005 3*#	0.769 0*
	雄	0.775 6±0.045 6	9.103 2±1.508 6	2.033 2±0.220 3	0.292 7	3.436 1*#	0.767 5*
DGSAPSND	雌	0.720 2±0.055 9	8.006 3±0.301 3	1.664 8±0.112 5	0.312 8	3.478 0*#	0.723 2*#
	雄	0.920 5±0.078 0	11.599 1±1.524 2	2.366 9±0.237 6	0.303 7	3.827 0*#	0.780 9*
SFAPSND	雌	0.707 0±0.038 1	8.075 3±1.089 3	1.754 3±0.092 8	0.309 8	3.538 7*#	0.768 7*#
	雄	0.791 9±0.140 6	10.180 6±1.684 9	2.346 9±0.265 9	0.281 4	3.618 5*#	0.834 1*#
卡托普利	雌	0.677 8±0.077 7	7.400 3±0.712 0	1.621 3±0.137 4	0.309 9	3.383 0*#	0.741 2*#
	雄	0.825 3±0.068 4	10.387 2±0.815 6	2.106 1±0.091 0	0.326 6	4.110 2*#	0.833 4*#

与空白组相同性别比较: * $P<0.05$; 与模型组相同性别比较: # $P<0.05$, 表 8 同* $P<0.05$ vs the same sex of the blank group; # $P<0.05$ vs the same sex of the model group, same as table 8

表 8 各组雌雄大鼠血清肝肾功能指标含量

Table 8 Indexes of liver and kidney function in serum of male and female rats in each group

组别	性别	总胆红素/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	ALT/($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	AST/($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	尿素/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	CTEA/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
空白	雌	1.77±0.15	28.73±1.96	126.60±6.94	6.12±0.75	73.75±2.03
	雄	1.46±0.23	31.95±0.47	119.27±13.70	5.62±0.42	66.32±4.04
模型	雌	1.80±0.22	29.23±5.76	138.60±11.32*	6.59±0.28	62.18±1.00*
	雄	1.55±0.53	38.98±10.53	115.03±13.06	6.01±1.00	61.43±8.05
UAPSND	雌	1.87±0.10	37.33±4.27*#	140.45±31.16*	6.66±1.10*	72.42±7.82#
	雄	1.50±0.32	30.23±3.68#	121.55±17.20	5.75±1.17	60.50±5.26
GCAPSND	雌	1.69±0.27#	30.79±6.01	136.30±18.24*	6.30±1.84	64.81±8.99
	雄	1.50±0.20	26.80±3.10#	120.15±28.07	4.99±0.42*#	56.25±3.43*
DGSAPSND	雌	1.90±0.34*	29.17±7.91	159.83±49.20*#	6.66±1.52*	69.38±5.06
	雄	1.60±0.33*	28.98±2.37#	118.63±26.24	5.04±0.68#	60.75±4.10
SFAPSND	雌	1.90±0.18*	28.20±3.14	150.18±14.75*#	6.19±0.97	68.95±4.45
	雄	1.57±0.06	31.40±3.42	115.93±23.12*	6.47±1.56	64.76±9.15
卡托普利	雌	1.88±0.13	24.58±5.14*#	129.97±14.66#	7.20±0.68*#	72.28±7.03#
	雄	1.53±0.51	26.53±4.19*#	95.58±12.31*#	5.69±0.44	64.68±5.99

图 8。其中各组肾组织整体结构均基本正常, 肾小球结构清晰未见明显萎缩坏死等变性, 黄色箭头所示为肾小球, 组织肾小管上皮细胞未见明显水肿脱落坏死, 肾小管未见明显扩张管型等变性, 红色箭头所示为肾小管, 组织未见明显炎症细胞浸润。

2.9 统计方法

采用 SPSS 25.0 统计软件对数据进行单因素方差分析和系统聚类分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P<0.05$ 表示有显著性差异; 采用 SIMCA 14.1 软件对数据进行 PCA 和 OPLS-DA。

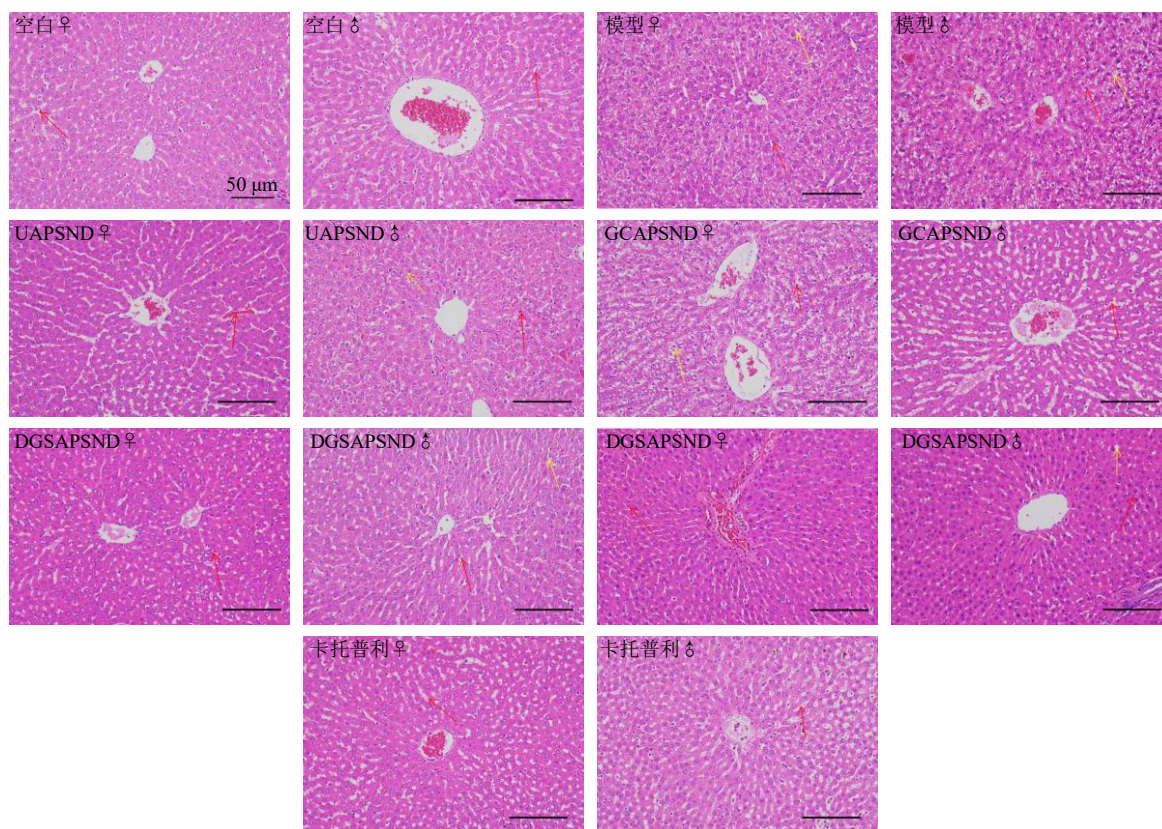


图 7 各组雌雄大鼠肝脏 HE 染色图 (♀雌性, ♂雄性, ×200)

Fig. 7 HE staining of liver of male and female rats in each group (♀ female, ♂ male, × 200)

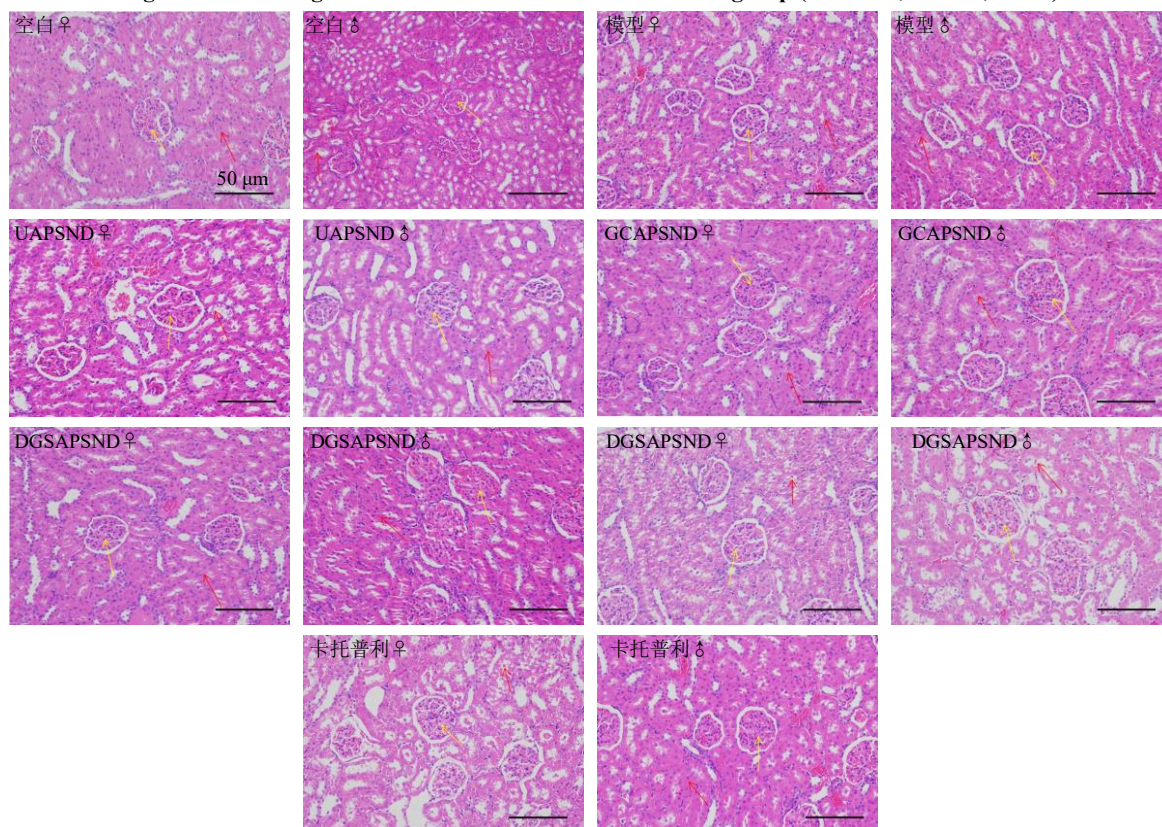


图 8 各组大鼠肾脏 HE 染色图 (♀雌性, ♂雄性, ×200)

Fig. 8 HE staining of kidney of male and female rats in each group (♀ female, ♂ male, × 200)

3 讨论

3.1 成分差异性分析

研究认为 4 种附子炮制品四逆汤其化学成分差异性的原因主要与附子的炮制方法有关。一方面 4 种四逆汤在仅改变附子饮片种类的前提下, 其汤剂中 9 个指标成分含量高低顺序与 4 种附子炮制品单煎汤剂一致; 另一方面, 4 种附子炮制品由同一批盐附子炮制而成, 4 种附子因其炮制方法的不同而致使 4 种附子炮制品单煎汤剂中 9 个指标成分存在差异。

4 种附子炮制品均有浸漂流程, 不同的是生附片仅浸漂流程, 淡附片经浸漂后有加甘草黑豆的煮制过程, 阴附片有浸漂后加干姜的蒸制过程, 阳附片则是浸漂后加砂的炒制过程。在本实验中控制 4 种附子炮制品的浸漂时间一致, 浸漂过程对附子中双酯型生物碱影响程度相当。而淡附片、阴附片和阳附片的后续煮制、蒸制、炒制过程均可促使附子中双酯型生物碱酯键水解断裂使其含量下降^[7,11-12], 故阴附片、阳附片、淡附片中的双酯型生物碱均要显著性低于生附片。

同时由于生附片仅有浸漂过程, 对单酯型生物碱的生成影响较小, 难以促使双酯型生物碱转化为单酯型生物碱, 所以生附片中单酯型生物碱含量极低; 阳附片的高温炒制环境易使附子中的双酯型生物碱转化为中间产物焦乌头碱类^[12], 再进一步酯键断裂转化为单酯型生物碱量和胺醇型生物碱^[13], 进而提高单酯型生物碱含量作用; 阴附片的高温蒸制环境在促进双酯型生物碱水解为单酯型生物碱的同时, 干姜中 6-姜烯酚、6-姜酚等成分还具有增加单酯型生物碱溶出的作用^[7], 进而提高单酯型生物碱含量作用; 而淡附片在其炮制过程中辅料甘草中含有大量甘草酸、甘草次酸等酸性成分, 营造一个酸性环境, 使附子中 6 种生物碱指标成分断裂酯键, 还通过生成络合物或“酸碱中和成盐”沉淀的形式降低附子生物碱含量作用^[14], 同时高温煮制环境也可促进双酯型生物碱的水解转化, 在水解双酯型生物碱的同时, 单酯型生物碱也会被水解为毒性最低的胺醇型生物碱^[15], 所以淡附片中双酯型生物碱和单酯型生物碱均要低于其他炮制品。故在本研究单味附子煎剂比较部分, 阴附片中单酯型生物碱苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱含量及其总量>阳附片>淡附片>生附片。

当四种附子炮制品应用于四逆汤时, 因 4 种附

子四逆汤仅改变附子种类, 煎煮过程以及方剂处方对指标成分的影响程度一致, 故 4 种附子炮制品四逆汤汤剂中指标成分含量高低与 4 种附子单味煎液中指标成分含量高低一致。表现为双酯型生物碱含量在生附片四逆汤中最高, 单酯型生物碱含量在阴附片四逆汤中最高。

3.2 分类差异性分析

4 种附子炮制品四逆汤在进行 HCA、PCA 和 PLS-DA 时, 虽分析方法不同, 但结果一致。无论是以双酯型生物碱进行分类分析, 还是以双酯型生物碱进行分类分析, 亦或者以全体指标成分含量进行分析, 生附片四逆汤与其他 3 种四逆汤差异较大, 常单为一类; 淡附片四逆汤、阴附片四逆汤、阳附片四逆汤差异较小, 可归为同一类。导致 4 种四逆汤主要分为两类的原因可能与 4 种四逆汤 9 个指标成分含量有关, 尤其是双酯型生物碱和单酯型生物碱。因生附片仅有浸漂流程, 对双酯型生物碱和单酯型生物碱影响相对较小, 而淡附片、阴附片、阳附片在浸漂后还有后续加工炮制过程, 对双酯型生物碱和单酯型生物碱影响较大, 故生附片单为一类。同时与生附片相比, 淡附片、阴附片、阳附片此三种炮制品影响程度相差无几, 故在本研究中淡附片、阴附片、阳附片可归为同一类。

同时研究发现甘草酸、乌头碱、新乌头原碱和 6-姜酚是引起不同附子炮制品四逆汤成分差异的主要标志性成分。分析其原因主要为甘草酸在四逆汤中主要发挥解毒作用, 常水解为 2 分子葡萄糖醛酸与 1 分子甘草次酸, 营造一个酸性环境, 可以和双酯型生物碱过生成络合物或“酸碱中和成盐”沉淀的形式降低附子生物碱含量作用, 降低其含量以达解毒作用^[16], 同时甘草中甘草次酸具有肾上腺皮质激素样作用, 可降低机体对各种有毒物质的反应, 提高机体对毒性物质的耐受能力^[17], 在体内也可发挥拮抗乌头碱所致心律失常作用^[18], 同时甘草次酸亦可减少由附子生物碱所致的氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 蓄积, 增强机体清除自由基的能力, 降低氧化损伤^[19], 降低四逆汤中附子毒性作用, 可作为四逆汤中解毒标志物; 而乌头碱、新乌头碱为四逆汤中主要引起毒性反应的成分, 通过抑制机体细胞色素 P450 2J3 (cytochrome P450 2J3, CYP2J3) 的表达水平, 使心肌细胞钠钙交换异常^[20], 改变细胞中钠、钾、钙离子浓度进而影响细胞内环境稳态, 脂质过氧化反应致细胞能量代谢障碍^[21],

诱导心肌细胞凋亡^[22]，从而致使机体出现中毒反应，甚至心律不齐导致死亡，其含量高低与四逆汤致死性息息相关，二者可作为四逆汤中毒性标志物；6-姜酚在四逆汤中主要发挥增效作用，通过提高四逆汤中主要功效成分单酯型生物碱的含量，与单味附子煎剂能显著增加实验心衰大鼠的心输出量、增强心肌舒缩力、改善其血液动力学^[23]，增强四逆汤中附子强心作用，其可作为四逆汤中增效标志物。

3.3 毒性差异性分析

在 4 种附子炮制品小鼠急性毒性试验中：生附片单味煎液 LD₅₀ 值为 71.3 g/kg 生药量，95%可信区间为 60.0~84.6 g/kg 生药量。其他 3 种炮制品单味煎液未发现 100%死亡率，无法计算 LD₅₀ 值。双酯型生物碱为附子中主要毒性成分，单酯型生物碱为附子中主要功效成分^[21]，当小鼠给予生附片 LD₅₀ 值时，双酯型生物碱摄入含量为 28.8 μg/mL。生附片单味煎液中毒性成分双酯型生物碱含量为 48.5 μg/mL，远高于生附片 LD₅₀ 值，表现出生附片的毒性和致死性。而淡附片、阴附片、阳附片中双酯型生物碱总量与生附片 LD₅₀ 双酯型生物碱含量相近，小鼠理应有毒性反应和死亡现象，但在观察中淡附片、阴附片、阳附片组小鼠仅有轻微毒性反应但却无死亡现象，推断其原因为淡附片、阴附片、阳附片中双酯型生物碱含量虽和生附片 LD₅₀ 值双酯型生物碱含量相近，但淡附片中甘草酸、阴附片中 6-姜酚等在体内也发挥着减毒作用，故淡附片、阴附片、阳附片组小鼠仅有轻微毒性反应，却无致死性，很好的体现炮制减毒特性。

在 4 种附子炮制品四逆汤最大给药量试验中：当 4 种四逆汤给予最大给药体积和最高浓度时，4 种四逆汤均不会对小鼠产生致死性，有且仅有生附片四逆汤组小鼠产生轻微毒性反应。出现这一结果的原因可能是淡附片四逆汤、阴附片四逆汤和阳附片四逆汤中双酯型生物碱总量均要低至 19.6 μg/mL，毒性成分含量很低，使得小鼠无毒性反应，更无致死性。而生附片四逆汤中毒性成分双酯型生物碱总量为 31.9 μg/mL，毒性成分含量相对较高，小鼠理应有毒性反应和死亡现象。但四逆汤是一种处方汤剂，汤剂中除含有毒性成分双酯型生物碱外，还含有一些解毒成分，各成分之间相互影响，相互制约，可以制约降低生附片四逆汤的毒性，如 6-姜酚可以减少附子次乌头碱的吸收^[24]，甘草次酸可以上调核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid

2-related factor 2, Nrf2) 和血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 信号通路抑制氧化应激、线粒体功能障碍和细胞凋亡^[25]，上调细胞色素 P450 酶 3A (cytochrome P450 3A, CYP3A) 的表达，促进乌头类成分的代谢，降低脑利钠肽 (b-type natriuretic peptide, BNP)、血管紧张素 II (angiotensin II, AngII)、醛固酮 (aldosterone, ALD) 的含量^[26]，减少机体心脏毒性，使得生附片四逆汤仅表现出轻微毒性反应，没有死亡现象发生。同时受试物浓度和体积限制，当小鼠给予相当于人临床每日用药量的 200 倍四逆汤剂量时，小鼠仍均无明显毒性反应和致死性。表明古籍和现代四逆汤处方中以生附片和淡附片入方具有合理性和可行性，同时也表明阴附片、阳附片入方四逆汤也具有合理性和可行性。

在 4 种附子炮制品四逆汤长期毒性试验中：4 种四逆汤可恢复因造模而致体质量下降，与模型组相比，4 种四逆汤给药组多可显著降低肝肾脏器指数，其中雌性大鼠中以阴附片四逆汤作用效果最为显著，雄性大鼠中以淡附片四逆汤和阳附片四逆汤作用效果更为显著。同时与模型组和空白组相比，4 种四逆汤有降低肝肾功能指标总胆红素、ALT、AST、尿素、肌酐含量趋势，4 种四逆汤组大鼠 HE 染色肝组织整体结构均基本正常，组织肝细胞结构饱满，未见肝细胞明显疏松水肿坏死等变性，组织未见明显炎症细胞浸润；肾组织整体结构均基本正常，肾小球结构清晰未见明显萎缩坏死等变性，组织肾小管上皮细胞未见明显水肿脱落坏死，肾小管未见明显扩张管型等变性，组织未见明显炎症细胞浸润。说明慢性心衰大鼠长期给药 4 种四逆汤后不会引起肝肾损伤，无肝肾毒性，甚至在脏器指数方面有一定的保肝护肾作用。

4 结论

毒性实验是评价临床用药安全性的重要方法之一。归纳急性毒性试验、最大给药量试验、长期肝肾毒性试验结果，证实阴附片和阳附片入方四逆汤均系安全无毒，可行，可安全开展后续阴附片四逆汤和阳附片四逆汤对慢性心衰大鼠的药效学研究。

含量测定是 4 种附子炮制品四逆汤研究基础，毒性实验是评价临床用药安全性的重要方法。综合分析 4 种附子炮制品四逆汤成分差异性、分类差异性以及急性毒性试验、最大给药量试验、长期肝肾毒性差异性，证明《伤寒论》中四逆汤原始方选择生附片以及《中国药典》四逆汤选择淡附片入方四

逆汤的合理可行性,证实在以建昌帮法阴附片、阳附片入方四逆汤亦具有合理可行性,甚至相比淡附片和生附片在降低毒性成分含量、增加功效成分含量上要更具优势,其中阴附片最佳,可安全开展后续阴附片四逆汤和阳附片四逆汤对慢性心衰大鼠的药效学研究。因此下一阶段将开展不同附子炮制品四逆汤的抗心衰药效学研究,为阴附片、阳附片入方四逆汤用于慢性心衰治疗提供一定的科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张仲景. 伤寒论 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1980: 53-54.
- [2] 刘渡洲, 傅士垣. 伤寒论论解 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1983: 29.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 829.
- [4] 林美斯, 周菲, 陈雅兰, 等. 附子不同炮制品对四逆汤质效影响的研究 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(1): 24-28.
- [5] 吴文笛, 姜莉云, 李立纪, 等. 3 种四逆汤抗脓毒症药效学差异及急性毒性研究 [J]. 中国民族民间医药, 2019, 28(8): 12-16.
- [6] 于武华, 钟凌云, 叶协滔, 等. 附子不同炮制品对慢性心力衰竭大鼠 β_1 、 β_2 肾上腺素受体表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(6): 3138-3141.
- [7] 凡若楠, 钟凌云, 于武华, 等. 江西建昌帮阴附片和阳附片对阳虚小鼠棕色脂肪组织的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(14): 72-77.
- [8] 陈士林, 刘昌孝, 张铁军, 等. 基于中药质量标志物 and 传统用法的中药饮片标准剂传承发展研究思路与建议 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4519-4528.
- [9] 孙梦梅, 王瑞生, 张振凌, 等. 基于指纹图谱及化学计量学研究不同发酵程度建曲中成分变化 [J]. 中草药, 2022, 53(14): 4340-4349.
- [10] 裴科, 宁燕, 蔡皓, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别的川芎炮制前后对比研究 [J]. 中草药, 2021, 52(5): 1274-1283.
- [11] 国伟, 谭鹏, 费淑琳, 等. 炮制对淡附子中 3 种双酯型生物碱及其水解产物的影响 [J]. 河南中医, 2016, 36(6): 1096-1099.
- [12] 张晓晨, 郑清阁, 杨菁华, 等. 附子 C_{19} 二萜生物碱结构及活性研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 531-541.
- [13] 代珊, 朱红梅, 李帅, 等. UPLC-MS/MS 法测定不同附子炮制品中 14 种生物碱 [J]. 中成药, 2022, 44(4): 1198-1203.
- [14] You G J, Li H H, Zheng F X, *et al.* Characteristic profiling of *Aconiti Lateralis Radix* for distinguishing it from compatible herbal pair using UPLC-Q-TOF-MS coupled with chemometrics [J]. *Biomed Chromatogr*, 2021, 36(1): 5256-5266.
- [15] 蓝鲜艳, 周畅均, 毛敏, 等. 附子不同炮制品的相关差异及临床合理选用探讨 [J]. 中成药, 2021, 43(4): 994-997.
- [16] 庄开颜, 高硕, 柳晴, 等. 基于斑马鱼模型和网络药理学的甘草酸拮抗乌头碱心脏毒性作用与机制研究 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(7): 1368-1376.
- [17] 毛莹莹, 栗焕焕, 任晓亮. 附子-甘草药对配伍研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2021, 40(1): 119-127.
- [18] 陈长勋, 徐珊珊. 甘草、干姜与附子配伍减毒的物质基础与作用环节研究进展 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2006.
- [19] 刘巧云, 张宇燕, 万海同, 等. 次乌头碱与甘草苷、甘草次酸配伍的减毒作用 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(9): 2601-2604.
- [20] Li M T, Xie X F, Chen H M, *et al.* Aconitine induces cardiotoxicity through regulation of calcium signaling pathway in zebrafish embryos and in H9c2 cells [J]. *J Appl Toxicol*, 2020, 40(6): 780-793.
- [21] 姜波, 常晶晶, 张春蕾, 等. 附子心脏毒性及配伍减毒增效机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(6): 1346-1353.
- [22] Gao X T, Zhang X C, Hu J, *et al.* Aconitine induces apoptosis in H9c2 cardiac cells via mitochondria-mediated pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 284-292.
- [23] 杨辉, 吴伟康. 四逆汤全方及拆方对心衰大鼠血液动力学影响的实验研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2001.
- [24] Zhang M, Peng Y, Wang M Y, *et al.* The influence of compatibility of Si-Ni Decoction with metabolism in intestinal bacteria on transports of toxic diterpenoid alkaloids from processed aconite root across Caco-2 monolayers [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 228(2019): 164-178.
- [25] Cheng Y F, Wu X P, Nie X, *et al.* Natural compound glycyrrhetic acid protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2022, 106(2022): 154407-154419.
- [26] Ni L L, Miao P, Jiang J, *et al.* Glycyrrhiza uralensis promote the metabolism of toxic components of *Aconitum carmichaeli* by CYP3A and alleviate the development of chronic heart failure [J]. *PloS One*, 2022, 17(6): 115869-115881.

[责任编辑 郑礼胜]