

天南星炮制减毒机制探讨(I)

唐力英¹,吴宏伟¹,王祝举^{1*},赫炎²,付梅红¹
(1. 中国中医科学院中药研究所,北京 100700;
2. 中国中医科学院中医临床基础医学研究所,北京 100700)

[摘要] 目的:研究天南星炮制减毒机制。方法:通过小鼠急性毒性试验和家兔眼结膜刺激性试验比较天南星生品、炮制品、针晶及其不同提取部位的毒性;采用扫描电镜观察法研究炮制前后天南星饮片中特殊草酸钙针晶的变化情况及明矾中相关离子对针晶的形态变化的影响。结果:急性毒性试验表明天南星针晶组 LD₅₀为 42. 53 mg·kg⁻¹,生天南星粉末组 LD₅₀为 1 062 mg·kg⁻¹,天南星炮制品粉末组 LD₅₀为 2 788 mg·kg⁻¹。家兔眼刺激试验显示生药粉组和针晶组表现出轻度刺激和中度刺激,而其他各种提取物均无刺激性反应。电镜观察发现,天南星炮制前后饮片中的针晶超微结构发生了明显变化,经 KAl(SO₄)₂·12H₂O,AlCl₃ 溶液浸泡 12 h 后,针晶尖端被破坏,而 Na₂SO₄,KCl 溶液浸泡后其形态基本没有太大改变,尖端依然存在。结论:天南星针晶是产生刺激性毒性的主要物质基础,天南星针晶的刺激毒性与其结构形态有关,明矾炮制减毒的机制可能是其 Al³⁺ 加速破坏了草酸钙针晶的形态。

[关键词] 天南星; 针晶; 炮制减毒
[中图分类号] R283. 6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0028-04

Investigation of Attenuating Toxicity Mechanism of Processing
for *Arisaema erubescens* (I)

TANG Li-ying¹, WU Hong-wei¹, WANG Zhu-ju^{1*}, HE Yan², FU Mei-hong¹
(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese
Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective: To investigate attenuating toxicity mechanism of processing for *Arisaema erubescens*. Method: Toxicity of raw products, processed products, raphides and different extraction site of *A. erubescens* were compared by acute toxicity test in mice and rabbit conjunctival irritation test; Change condition of special calcium oxalate raphides and impact of related ion from alum on morphological change of raphides before and after processing of *A. erubescens* were observed by scanning electron microscopy. Result: Acute toxicity test results showed that LD₅₀ of raw products powder group, processed products powder group, raphides group of *A. erubescens* were 1062, 2788, 42. 53 mg · kg⁻¹. Results of rabbit conjunctival irritation test showed that raw powder group and raphides group had low and moderate irritation, but other various extracts had no irritation. Electron microscopy showed that ultrastructure of raphides occurred significantly change before and after processing of *A. erubescens*, and it was destroyed after soaked in KAl(SO₄)₂ · 12H₂O or AlCl₃ solution for 12 h, but no big change after soaked in Na₂SO₄ or KCl solution, the tip still existed. Conclusion: Raphides from *A. erubescens* was main material foundation of irritating toxicity, irritation toxicity of raphides from *A. erubescens* was related with its morphology, mechanism of attenuating toxicity of processed *A. erubescens* by alum was that Al³⁺ may accelerate

[收稿日期] 20120912(009)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30772788); 中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目(ZZ20090210)
[通讯作者] * 王祝举,研究员,硕士,从事中药饮片化学成分、炮制原理及质量标准研究, Tel:010-64014411-2975, E-mail: wangzhuju@sina. com

destruction of calcium oxalate raphides morphology.

[**Key words**] *Arisaema erubescens*; raphides; attenuating toxicity mechanism of processing

天南星始载于《神农本草经》,列为下品,是中医临床用于散结消痰、镇惊祛风的要药,具有燥湿化痰、祛风止痉、散结消肿之功效,主要用于治疗顽痰咳嗽、风痰眩晕、中风痰壅、口眼歪斜等症^[1-2]。历代文献均记载天南星有毒^[3],必须炮制后才能用于临床。新中国成立后历版《中国药典》均要求使用炮制品,且用量一般较小(3~9 g)。国家卫生部也将其列为28种“毒性药品管理品种”之一。目前对于天南星的毒性报道主要为生品口尝有麻舌感,表现为黏膜刺激性,可致口唇肿痛、失音、流涎、痉挛、呼吸困难,甚至窒息死亡。

目前,国内外研究者认为天南星科植物的主要刺激性毒性成分可能是其所含的草酸钙针晶^[4],由于其针晶形状与其他中药所含的针晶针尖处形状不同,密布着细小的毛刺,这种毛刺对机体组织和黏膜能够产生强烈的刺激作用,从而使机体产生麻辣刺激感,导致口唇肿痛、失音、呼吸困难等。早在1924年,Herbert^[5]就在 Science 上报道了一些植物中草酸钙针晶具有刺激作用,并推测了其作用机制;1984年,日本学者 Sakai 也从草酸钙针晶的超微结构,阐述了草酸钙针晶的刺激作用^[6-7]。

针对上述假说,本课题组成员对天南星生品、生品水提物、炮制品及从生品中提取的针晶进行小鼠急性毒性试验,并对天南星生品不同溶剂提取部位和针晶对家兔眼睛的刺激性作用进行比较,初步确定天南星针晶为其刺激性毒性的主要物质基础。为进一步说明天南星明矾炮制减毒的机制,本试验利用扫描电镜,对炮制前后天南星饮片中的针晶及明矾对针晶单体作用前后其微观形态结构的变化进行观察,确定了明矾中 Al^{3+} 在天南星炮制工艺中的重要作用,并初步阐释了其炮制减毒机制。

1 材料

天南星药材2008年购于亳州药材市场,由河南中医学院陈随清教授鉴定为天南星科植物天南星 *Arisaema erubescens* (Wall.) Schott 的干燥块茎。

昆明小鼠,雌雄各半,体重18~22 g;大耳白兔,体重约3 kg,雌雄兼用;购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:昆明小鼠为京动许字 SCXK(京)2007-004号;大耳白兔为京动许字 SCXK(京)2009-0011号。

XS105DU 型电子天平(瑞士 METTLER

TOLEDO 公司), HITACHI S-3400N 型扫描电子显微镜(日本 HITACHI 公司),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品制备

2.1.1 生品 称取天南星药材适量,粉碎,备用。

2.1.2 针晶 采用石油醚法^[8]提取天南星中特殊草酸钙针晶。详细参数正在申请专利保护中。

2.1.3 炮制品^[1] 天南星药材按2010年版《中国药典》方法进行炮制,得制南星饮片,粉碎,备用。

2.1.4 水提物 天南星药材粉碎过60目筛,加适量水加热提取0.5 h,提取2次,弃去滤渣,合并水提液浓缩至最小体积,得天南星水提物,备用。

2.1.5 小鼠急毒试验样品 以上4组样品均过160目筛,以生理盐水配至适当质量浓度。

2.1.6 家兔眼刺激试验样品 生品过160目筛,加生理盐水配制成 $0.5\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 均匀混悬液。针晶过160目筛,生理盐水配制成质量分数1%均匀混悬液。

2.1.7 不同溶剂提取物 取5份生品粉末,过60目筛,各2 g,置于100 mL 锥形瓶中,分别加入不同溶剂(水、乙醇、三氯甲烷、乙酸乙酯、石油)50 mL 回流提取2 h,过滤,滤液置水浴锅上挥至无醇味,加入适量可溶性淀粉,搅拌混匀,干燥,过160目筛,冷藏密封保存,临用前加4 mL 生理盐水配制成 $0.5\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 样品。

2.1.8 提取针晶后的药材残渣 粉碎过160目筛,加生理盐水配制成 $0.5\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 均匀混悬液。

2.1.9 对照品 取食用淀粉过160目筛,加生理盐水配制成 $0.5\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 均匀混悬液。

2.2 急性毒性试验^[9] 昆明种小鼠分成4组,分别为天南星生品粉末、天南星针晶、天南星炮制品粉末、正常对照组,每个剂量组10只,雌雄各半。在预试验所获得的0%,100%致死量的范围内,选用5个剂量,按等比级数增减,生品组剂量为2 000,1 600,1 280,1 024,819.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;针晶组剂量为130,91,63.7,44.6,31.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,炮制品组剂量为8 000,5 600,3 920,2 744,1 921 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。各剂量组动物数为10只。生品水提物组在最大给药剂量 $50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 下,死亡率30%,无法找出最大致死剂量。

比较天南星生品粉末、生品水提物、天南星针晶、天南星炮制品粉末的急性毒性差异。每组腹腔

注射给药,给药体积 0.02 mL·g⁻¹体重,对照组给以相同体积生理盐水,观测 7 d 内小鼠的死亡率,记录死亡动物数量,采用 Bliss 法计算各组 LD₅₀,见表 1。

表 1 天南星针晶、生品、炮制品腹腔注射 LD₅₀

组别	测定的回归方程和可信区间		mg·kg ⁻¹
	LD ₅₀	LD ₉₅ 置信区间	
针晶	42.53	33.660 0~53.744 8	
生品	1 062	991.425 9~1 139.312 8	
炮制品	2 788	2 532.950 4~3 069.947 4	
生品水提取物	-	-	

试验中发现小鼠腹腔注射生品或针晶后,出现行动迟缓、蜷缩、厌食、扭体的现象,尤其是针晶的高

剂量组注射后,有 2 只小鼠 30 min 内死亡,其他小鼠后期有明显的腹部肿大,毛色暗淡等表现。对照组动物摄食、活动、大小便正常、无特殊分泌物。表 1 结果表明各组样品的急性毒性强弱顺序为天南星生品针晶>天南星生品粉末>天南星炮制品粉末>生品水提取物。

2.3 家兔眼刺激性试验^[9] 分别于兔左右眼结膜内滴入受试物和对照品各 1~2 滴。每组 4 只动物,给药后使眼睛被动闭合 5~10 s,2 min 后用 40 mL 生理盐水冲洗,观察 3 h 内兔眼结膜出现水肿反应只数和反应强度,按评分标准给分,并拍照记录。受试物对眼刺激性积分=总分之和/受试动物总数,见表 2。

表 2 天南星不同部位及针晶对家兔眼刺激试验

No.	样品	眼刺激反应累积分数					总分	刺激性积分	刺激程度
		角膜	虹膜	结膜					
				充血	水肿	分泌物			
1	生品粉末	1	4	8	7	4	24	6	轻度刺激
2	针晶	6	4	8	12	5	35	8.75	中度刺激
3	水提取物	0	0	0	0	0	0	0	无刺激
4	乙醇提取物	0	0	2	0	0	2	0.5	无刺激
5	氯仿提取物	0	0	4	1	0	5	1.25	无刺激
6	乙酸乙酯提取物	0	0	4	2	0	6	1.5	无刺激
7	石油醚提取物	0	0	0	0	0	0	0	无刺激
8	提取针晶后残渣	0	0	4	4	4	12	3	无刺激

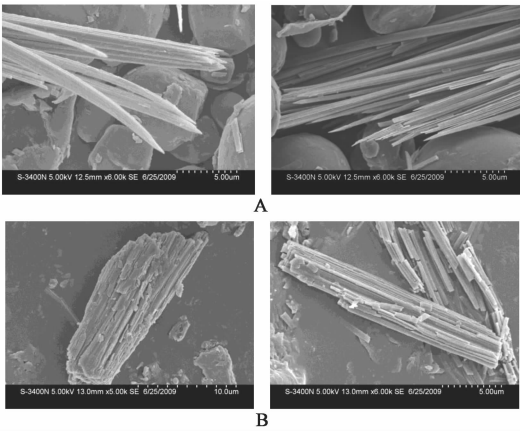
注:无刺激.0~3 分;轻度刺激.4~8 分;中度刺激.9~12 分;强度刺激.13~16 分。

表 2 结果表明生药粉组和针晶组表现出轻度刺激和中度刺激,而其他各组均无刺激性反应,说明天南星针晶为天南星主要的刺激性毒性成分。

2.4 天南星不同炮制品的扫描电镜观察^[1] 天南星药材粉碎,过 60 目筛,备用。天南星药材按 2010 年版《中国药典》中方法炮制,饮片粉碎过 60 目筛,备用。称取天南星针晶 3 份,每份 1 mg,分别用质量分数均 2% 的 KAl(SO₄)₂·12H₂O, AlCl₃, Na₂SO₄, KCl 水溶液 5 mL 浸泡 12 h,干燥,备用。取各样品制片,真空喷金,在扫描电子显微镜下观察,并拍摄照片记录,见图 1,2。

由图 1 可知,天南星炮制前后,针晶的超微结构发生了明显变化。炮制前草酸钙针晶完整,针尖锋利,针晶与针晶之间不黏连,没有“锈蚀”现象。而炮制后针晶断裂比较严重,针晶断裂成没有针尖的小段,且针晶与针晶之间发生黏连,多根针晶黏接在一起,“锈蚀”现象比较严重。

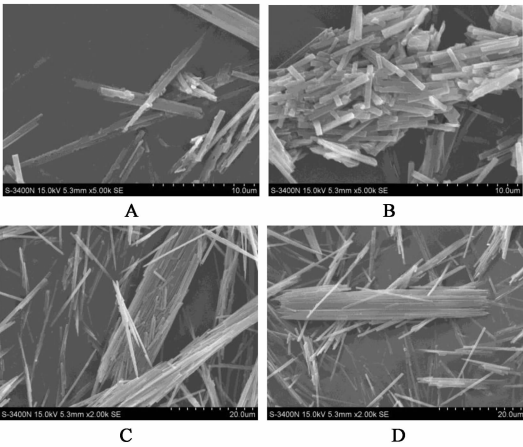
由图 2 可知,经明矾炮制的针晶两端不再尖锐,边缘不整齐,出现断裂、破碎、“锈蚀”的痕迹,整个



A. 炮制前;B. 炮制后

图 1 天南星炮制前后针晶形态变化(×6 000)

晶体结构遭到很大破坏;用 AlCl₃ 溶液浸泡的针晶,也相应地出现尖端被破坏,原本细长的晶体破碎成短棒状;而用 Na₂SO₄, KCl 溶液浸泡 12 h 后,针晶形态基本无太大改变,尖端依然存在。说明对草酸钙针晶形态有破坏作用的离子不是溶液中氯离子、钠离子、钾离子和硫酸根离子,而是铝离子,由于铝离



A. $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶液浸泡(5 000 倍); B. AlCl_3 溶液浸泡(5 000 倍); C. Na_2SO_4 溶液浸泡(2 000 倍); D. KCl 溶液浸泡(2 000 倍)

图2 明矾相关离子对天南星针晶形态的影响

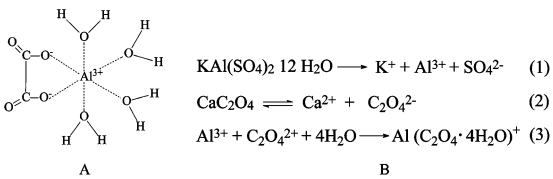
子的作用使草酸钙针晶形态发生改变,从而达到了减毒的目的。

3 讨论

本试验结果表明,天南星针晶的毒性明显强于生天南星粉末、天南星炮制品粉末和生天南星水提取物,针晶的毒性是相应生品的20倍以上。水提取物在最大给药剂量下不能测算 LD_{50} ,提示刺激性物质在天南星水提取物中含量较少,或经煎煮后,其毒性大大降低了。

天南星毒性的最直接表现是刺激性,无论是人或动物口服或咀嚼后,轻者产生强烈的麻辣刺激感,重者出现红肿、水肿、甚至死亡。家兔眼结膜刺激性试验表明,天南星药材粉末组及针晶组刺激性非常明显,兔眼均出现充血及水肿等现象,不同溶剂提取物的刺激性均不明显,基本属于无刺激,而且提取过草酸钙针晶后的药材粉末(电镜下观察仍有少部分针晶存在),其刺激性则大大降低。说明天南星草酸钙针晶是其产生刺激作用,导致黏膜组织发炎、红肿、疼痛等的主要物质基础。

天南星药材浸泡在明矾水溶液中,存在着如下反应(图3)。明矾在水中可解离出 K^+ , Al^{3+} 和 SO_4^{2-} (1);草酸钙在水中存在如下平衡(2),此时溶液中 Al^{3+} 和 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 结合生成稳定的草酸铝络合物^[10]。在药材炮制过程中,明矾水溶液过量,即 Al^{3+} 浓度基本恒定,会促使反应(3)不断进行,从而使(2)的平衡向右移动,草酸钙针晶就慢慢溶解而破坏了原来形态。



A. 草酸铝络合离子的结构; B. 溶液中明矾与针晶间的化学反应动力学方程

图3 明矾中铝离子对针晶的作用机制

天南星用明矾炮制后,能降低或消除其毒性,其机制是明矾具有加速破坏草酸钙针晶形态的功能。当天南星药材在明矾水溶液中浸泡时,由于明矾的作用,使草酸钙针晶断裂、破碎、黏连、锈蚀,完全改变了原来针晶的形态,从而失去刺激黏膜的作用,达到减毒的目的。明矾对天南星针晶的作用,并不是其中的钾离子和硫酸根离子产生的,而是铝离子产生的,由于铝离子的作用使草酸钙针晶形态发生了改变,失去了原有功能,从而达到减毒的目的。

[参考文献]

[1] 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,2010:53.

[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第8册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:7652.

[3] 赫炎,刘垲,唐力英,等. 天南星炮制历史沿革研究[J]. 中国中药杂志,2007,32 (23):2577.

[4] 钟凌云,吴皓. 天南星科植物中黏膜刺激性成分的研究现状与分析[J]. 中国中药杂志,2006,31 (18):1561.

[5] Hebert D A. Stinging crystals in plants[J]. Sci, 1924 (1548):204.

[6] Sakai W S, Shiroma S S, Nagao M A. A study of raphide microstructure in relation to irritation[J]. Scan Electron Microsc, 1984, 2: 979.

[7] Sakai W S, Hanson M, Jones R C. Raphides with barbs and grooves in Xanthosoma sagittifolium (Araceae) [J]. Science, 1972, 178: 314.

[8] Robert E P, Tang C S, Ken Gross, et al. The nature of the taro acidity factor[J]. Postharvest Biol Technol, 1999, 16: 71.

[9] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:1001,1026.

[10] 中国科学院矿床地球化学开放研究实验室. 矿床地球化学[M]. 北京:地质出版社,1997:323.

[责任编辑 仝燕]