

槐果碱及氧化槐果碱对小鼠的急性毒性

钱利武^{1,2}, 戴五好³, 王丽丽⁴, 周国勤¹, 张毅¹, 汪海孙^{1*}

(1. 安徽省药物研究所, 合肥 230022; 2. 安徽省中药研究与开发重点实验室, 合肥 230022;
3. 安徽中医学院, 合肥 230031; 4. 安徽医学高等专科学校, 合肥 230601)

[摘要] 目的: 探讨槐果碱及氧化槐果碱对昆明小鼠的急性毒性反应。方法: 通过向昆明小鼠尾静脉注射不同浓度的槐果碱及氧化槐果碱溶液, 观察并记录槐果碱及氧化槐果碱对小鼠的毒性反应。利用 SPSS 13.0 统计学软件计算其对小鼠的半数致死量(LD₅₀)。结果: 昆明小鼠对槐果碱及氧化槐果碱单次尾静脉注射 LD₅₀ 分别为 63.94, 250.37 mg·kg⁻¹, 二者 95% 可信区间分别为 56.49~73.08 mg·kg⁻¹, 219.05~288.02 mg·kg⁻¹。结论: 槐果碱和氧化槐果碱单次尾静脉注射对昆明小鼠有一定的毒性, 槐果碱的氧化产物毒性明显降低。

[关键词] 槐果碱; 氧化槐果碱; 急性毒性; 半数致死量; 置信区间

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0256-03

Toxicity Study on Sophocarpine and Oxysophocarpine in Mice

QIAN Li-wu^{1,2}, DAI Wu-hao³, WANG Li-li⁴, ZHOU Guo-qin¹, ZHANG Yi¹, WANG Hai-sun^{1*}

(1. Anhui Institute of Materia Medica, Hefei 230022, China; 2. Key Laboratory of Research and Development of Chinese Medicine of Anhui Province, Hefei 230022, China; 3. Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China; 4. Anhui Medical College, Hefei 230601, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the acute toxicity of sophocarpine and oxysophocarpine in Kunming mice. **Method:** The drugs were administered in mice via the tail vein injection. The toxic reactions were recorded and the median lethal dose (LD₅₀) was calculated by spss 13.0. **Result:** The LD₅₀ of sophocarpine and oxysophocarpine was 63.94, 250.37 mg·kg⁻¹, its 95% confidence interval was 56.49-73.08 mg·kg⁻¹ and 219.05-288.02 mg·kg⁻¹, respectively. **Conclusion:** Acute toxicity experiment showed that the sophocarpine and oxysophocarpine have some toxic effects on mice, and the former is more poisonous than the latter.

[Key words] sophocarpine; oxysophocarpine; acute toxicity; median lethal dose; confidence interval

槐果碱(sophocarpine, SC)及氧化槐果碱(oxysophocarpine, OSC)为豆科苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 中提取分离的苦参碱型生物碱(见图 1),此外在豆科槐属植物苦参及山豆根中亦有分布^[1]。药理学研究显示生物碱类化合物为中药苦参、山豆根及苦豆子的主要活性成分,同时也是毒性

组分^[2-6],系统地开展各生物碱组分毒性研究,对于阐明苦参碱类化合物毒效关系,提高临床用药安全具有重要的意义。有关 SC 和 OSC 的毒性研究鲜见报道,本文采用一次性尾静脉给药的方式,研究 SC 和 OSC 对昆明小鼠的急性毒性,为药物的开发和应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,体质量(18±2)g,雌雄各半,购自安徽医科大学动物实验中心普通级,许可证号 SCXK(皖)2011-002。饲养小鼠的室温为 20℃左右,相对湿度为 40%~70%。自然光照,小鼠专用料饲喂,自由采食和饮水。试验前小鼠饲养 7 d,观察其健康状况,选择健康、营养状况良好的小鼠进

[收稿日期] 20111124(008)

[基金项目] 长三角地区科技联合攻关项目(10140702018);
安徽省高层次人才创新创业资金(2009Z064)

[第一作者] 钱利武,博士,助理研究员,从事天然产物开发研究, Tel: 0551-3658348, E-mail: qianlw@163.com

[通讯作者] *汪海孙,副主任药师,从事药学研究, Tel: 0551-3669820, E-mail: yjswhs@163.com

行试验。

1.2 受试药物 SC, OSC 购自南京泽朗医药科技有限公司,纯度均在 98% 以上。

1.3 仪器与试剂 AEY-210 电子分析天平(湘仪天平设备有限公司)。0.9% 氯化钠注射液(安徽丰原药业股份有限公司,批号 110719k3)。

2 方法

2.1 急性毒性实验 精密称取 417 mg SC 和 1 612 mg OSC,分别溶于一定量的 0.9% 的生理盐水,配制成为 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液备用。取 64 只健康小鼠,随机分成 2 个 4 组,每组 8 只,雌雄各半,实验前对小白鼠进行 7 d 的喂养观察,观察期内小白鼠自由采食、饮水。以 1:0.5 比例设置 4 个剂量组,实验前对小鼠逐只称重,按每 10 g 体质量 0.1 mL 药液 1 次性尾静脉给药,以确定正式试验的剂量范围。根据初步实验结果,确定 SC 的 100%, 0% 致死剂量分别为 100, 25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; OSC 1 次性尾静脉注射 100%, 0% 致死剂量分别为 400, 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。取 140 只小鼠,适应性饲养 7 d 后,按体质量、性别分层随机法分为 2 个 7 组,每组 10 只,雌雄各半。按 Bliss 法设计^[7],受试药物的剂量等比级数为 1:0.76 进行设置。SC 组剂量由高到低分别为 100, 76, 57.76, 43.59, 33.36, 25.35 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; OSC 组剂量为 400, 304, 231.04, 175.59, 133.45, 101.42 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; 同时设置阴性对照组,并给予等容积的生理盐水。给药后记录动物的即时反应并连续观察 7 d,记录动物毒性出现时间及恢复时间、死亡情况(死亡动物及时尸检),观察腹腔内液体状况和实质性器官的病理变化。

2.2 数据分析和统计方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,采用 Probit 概率单位加权回归法计算 SC 和 OSC 对小鼠的半数致死剂量(LD_{50})及置信区间。

3 结果

3.1 中毒表现 SC 组在低剂量时小鼠出现强直性震颤、抖动、双目紧闭、身体蜷缩等症状,小鼠在 30 min 后状态和行动恢复正常,未出现死亡现象;当剂量增加至 43.89 ~ 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,小鼠表现为全身肌肉颤动、抽搐、痉挛和剧烈跳动,多数小鼠在 8 min 内死亡(见表 1),未死亡小鼠表现剧烈抖动,之后自主活动减少,闭目,蜷缩,约 1 h 后缓慢趋于正常。

OSC 组小鼠在低剂量时表现为自主活动减少、贴地爬行、腹部痉挛收缩、小便失禁等现象,中毒小鼠 30 min 后慢慢恢复正常表现;但在 400 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 304 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 高剂量组时,小鼠表现为腹部强烈痉挛,身体收缩扭曲,贴地缓慢爬行,有的出现强直性抖动,多数小鼠在 7 min 内死亡,存活小鼠在 1 h 后缓慢恢复状态。给药后第 1 天所有未死小鼠均能采食、饮水;自主活动和粪便亦可恢复正常。连续观察 7 d,所有小鼠采食、活动均正常。

3.2 LD_{50} 及回归方程 SC 和 OSC 组小鼠死亡数目运用 SPSS 13.0 统计学软件进行 Probit 回归统计分析,SC 组及 OSC 组回归方程为 $\text{Probit} = 10.59482 - 19.13164X$ 和 $\text{Probit} = 9.16873 - 21.99202X$; LD_{50} 分别为 63.94 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 250.37 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。此外,系统还提供了以浓度对数值为自变量 X ,以抑制率为应变量 Y 的回归直线散点图,回归直线拟合良好。见表 1。

表 1 SC 及 OSC 对小鼠的急性毒性($n = 10$)

| 药物 | 组别 | 剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ | 死亡数/只 | $\text{LD}_{50}/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ | 95% 置信区间/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ | $\text{LD}_1/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ | 95% 置信区间/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ |
|-----|----|------------------------------------|-------|---|--|--|--|
| SC | 1 | 100.00 | 10 | | | | |
| | 2 | 76.00 | 8 | | | | |
| | 3 | 57.76 | 2 | | | | |
| | 4 | 43.89 | 1 | 63.937 | 56.485 ~ 73.083 | 38.563 | 24.182 ~ 46.335 |
| | 5 | 33.36 | 0 | | | | |
| | 6 | 25.35 | 0 | | | | |
| OSC | 1 | 400.00 | 10 | | | | |
| | 2 | 304.00 | 7 | | | | |
| | 3 | 231.04 | 4 | | | | |
| | 4 | 175.59 | 1 | 250.374 | 219.048 ~ 288.016 | 139.593 | 82.954 ~ 171.841 |
| | 5 | 133.45 | 0 | | | | |
| | 6 | 101.42 | 0 | | | | |

实验结束时处死小鼠并解剖,肉眼观察给药组和对照组小鼠的皮下、心、肝、脾、肺、肾和胃肠道等器官,未发现明显眼观异常变化。

4 讨论

现代药理学研究发现生物碱类成分既是传统中药苦参、山豆根及苦豆子的有效成分,同时又是其毒性的物质基础。在毒性研究方面已有的文献多以总碱为对象,如李生虎等^[2]研究表明苦豆子生物碱氯仿萃取组分对小鼠的 LD_{50} 178.89 $mg \cdot kg^{-1}$; 正丁醇萃取部分 LD_{50} 209.06 $mg \cdot kg^{-1}$, 苦豆子生物碱毒性的靶器官主要为肝脏、肾脏和肺。焦河玲^[8-9]等观察了苦豆子总碱对肝癌肿瘤株 QGY7703、鼠肝癌肿瘤株 CBRH7919、人胃癌肿瘤株 BGC823 和人结肠癌肿瘤株 SW480 的毒性,其 IC_{50} 分别为 2.49, 2.37, 0.88, 0.78 $g \cdot L^{-1}$, 显示出一定的细胞毒活性。彭百承等^[10-11]研究了山豆根水煎液对小鼠的急性毒性,经 ig LD_{50} 35.05 $g \cdot kg^{-1}$; SD 大鼠经长期大剂量给药表现为肝毒性反应。苦参碱注射液(含苦参总碱以氧化苦参碱计不少于 10 $g \cdot L^{-1}$)尾 iv 对小鼠的 LD_{50} (5.29 \pm 0.36) $mL \cdot kg^{-1}$, ip LD_{50} (15.21 \pm 2.05) $mL \cdot kg^{-1}$ 。

植物化学研究表明 SC 和 OSC 在苦参、山豆根及苦豆子总碱中均有分布,但有关其毒性研究的文献较少。杨清娥等^[12]采用灌胃法发现 OSC 对小鼠的 LD_{50} 81 $mg \cdot kg^{-1}$, 根据小鼠的中毒症状推测其毒性可能作用于拟交感神经、中枢神经和自主神经系统。本研究一次性尾 iv , 发现 SC 和 OSC 对昆明小鼠的 LD_{50} 分别为 63.937, 250.374 $mg \cdot kg^{-1}$, 提示 SC 和 OSC 对小鼠具有一定的毒性。从结构上看, OSC 为 SC 的 *N*-氧化物, 但两者的 LD_{50} 相差很大, OSC 对小鼠的毒性要明显弱于 SC, 提示可能与 SC 环上的叔胺结构被氧化成季胺有关。本课题组在前期研究中以氧化苦参碱和苦参碱为受试药物, 观察其对小鼠的急性毒性也发现了同样的结果, 说明苦参碱型生物碱的 *N*-氧化物能有效地降低药物的毒性。在

今后的研究中应加强苦豆子、苦参及山豆根生物碱的毒-效和量-效关系研究, 在确保疗效的情况下降低药物的毒副作用; 同时借助不同方法对生物碱类化合物进行结构修饰, 探讨结构与活性之间的相关性, 为苦参碱型生物碱的新药创制奠定基础。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 632, 636, 653.
- [2] 李生虎, 何生虎. 苦豆子生物碱的毒性研究[J]. 农业科学研究, 2009, 30(1): 27.
- [3] 王君明, 崔瑛. 山豆根化学成分、药理作用及毒性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 229.
- [4] 盛云华, 李峰杰, 周绮, 等. 山豆根对小鼠急性肝毒性及其病理形态学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 144.
- [5] 杨巧丽, 黄华, 王雪, 等. 苦豆子提取物急性毒性的测定及对实验性肝损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(12): 68.
- [6] 孙蓉, 李素君, 李晓宇. 不同乙醇提取工艺对山豆根急性毒性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 193.
- [7] 李寅超, 王随华, 郭琰, 等. 冬凌草二萜类成分半数致死量的测定[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(2): 163.
- [8] 焦河玲, 姚锐, 邓虹珠, 等. 苦豆子总碱抗肿瘤作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(9): 2168.
- [9] 王铁军, 李绍平, 简家荣, 等. 苦参碱抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(4): 52.
- [10] 彭百承, 李萍, 江海燕, 等. 山豆根水煎液急性毒性及抗炎作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(7): 1616.
- [11] 李峰杰, 姚广涛, 金若敏, 等. 山豆根致大鼠肝毒性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 190.
- [12] 杨清娥, 张宏利, 韩崇选, 等. 氧化槐果碱的提取分离工艺及其毒性研究[J]. 西北林学院学报, 2006, 21(3): 111.

[责任编辑 聂淑琴]