

不同乙醇提取工艺对山豆根急性毒性的影响

孙蓉^{1*}, 李素君², 李晓宇²

(1. 山东省中医药研究院, 济南 250014; 2. 山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的: 比较不同乙醇提取工艺对山豆根急性毒性的影响。方法: 分别制备山豆根乙醇热回流和渗漉提取液, 采用经典急性毒性试验方法进行急性毒性比较研究, 记录其毒性症状谱、累积死亡数和小鼠体重变化, 用 Bliss 法分别计算半数致死量(LD₅₀)及其95%可信度。结果: 小鼠口服山豆根乙醇热回流液和渗漉液的 LD₅₀和95%可信限分别是 27.135(24.869 ~ 29.622 g·kg⁻¹)和 13.399(12.016 ~ 14.899 g·kg⁻¹), 分别相当于人日用量的 316.6 倍和 156.3 倍, 主要毒性症状谱为多动、烦躁、间歇性抽搐、呼吸急促等, 最后因呼吸衰竭而死亡, 成活动物体重与空白对照组相比有差异, 药后 7 d 差异消失。结论: 山豆根乙醇渗漉液的毒性大于热回流液, 说明乙醇提取温度和浓度是影响山豆根急性毒性结果表达的关键因素, 尤以温度为显著。

[关键词] 山豆根; 乙醇提取工艺; 急性毒性

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0193-04

Comparative Research on Acute Toxicity of Different Alcohol Extracted Crafts of Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizome

SUN Rong^{1*}, LI Su-jun², LI Xiao-yu²

(1. Shandong Academy of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China;
2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] Objective: To compare the influence of different alcohol extraction on the acute toxicity of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizome*, caused by different extracted crafts. **Method:** Separately using percolate and reflux extracted methods to prepare the extracts of different processed products. The classical acute toxicity methods were used in this study, the acute toxic symptoms, signs, death time and accumulated death rate were recorded and the LD₅₀ were calculated by Bliss method. **Result:** The LD₅₀ and its 95% confident limit of reflux and percolation extracts on mice were respectively 27.135(24.869-29.622) g·kg⁻¹ and 13.399(12.016-14.899) g·kg⁻¹, which are equal to 316.6 and 156.3 times of the daily dosage in clinical, the main acute toxic symptoms such as: hyperactivity, restlessness, intermittent convulsion, breathlessness and died of respiratory failure eventually. The body weight between survival and normal mice had obvious difference ($P < 0.05$), this difference disappeared after 7 d administration. **Conclusion:** The acute toxicity of different alcohol extraction of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizome* is: percolation extracts > reflux extracts, explaining the key factors are temperature and concentration, especially the temperature, that affect the acute toxicity result expression of different alcohol extraction.

[Key words] *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizome*; alcohol extracted craft; acute toxicity

[收稿日期] 20100823(001)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973)中医基础理论专项资助项目(2009CB522802);山东省科技平台建设项目课题(2008GG2NS02021)

[通讯作者] * 孙蓉, 博士, 研究员, 硕士, 从事中药药理与毒理研究与评价, Tel: 0531-82949843, E-mail: sunrong107@163.com

山豆根为豆科植物越南槐 *Sophora tonkinensis* Gagnep. 的干燥根及根茎^[1], 苦, 寒; 有毒。归肺、胃经。有清热解毒, 消肿利咽之功效, 用于火毒蕴结, 咽喉肿痛, 齿龈肿痛。山豆根的主要化学成分有生物碱、总黄酮、苷类等, 生物碱主要有苦参碱、氧化苦参碱、臭豆碱和甲基金雀花碱等^[2], 其理化特性为亲脂性、热不稳定性、旋光性等^[3], 目前认为生物碱是山豆根的主要药效物质基础和毒性物质基础^[2]; 但作者前期进行了山豆根不同组分小鼠急性毒性比较研究发现^[4], 醇提液的急性毒性小于水提液, 这似乎与生物碱是山豆根的主要毒性物质基础^[2]的报道不符, 分析这一结果, 到底是醇提液在提取过程中毒性物质基础遇到了破坏? 还是水提液中有其他的毒性物质基础? 另外, 中药自身多成分、多靶点的特点, 导致提取方式是毒性的影响因素之一。为了进一步锁定山豆根的主要毒性物质基础, 本试验采用乙醇热回流和渗漉的提取的不同提取工艺制备了 2 个山豆根样品, 平行研究这 2 个样品对小鼠急性毒性的影响, 比较其毒性大小, 探讨不同醇提取工艺对山豆根醇提组分毒性物质基础及毒性表达的影响。

1 材料

健康昆明种小鼠, SPF 级, 体重 18 ~ 22 g, 由山东大学动物试验中心提供, 合格证号 SCXK(鲁) 20090001。动物置于(22 ± 1) 控温和光暗周期为 12 h 环境下, 给予清洁级普通小鼠饲料饲养(山东大学动物试验中心提供)。

山豆根购自四川新荷花中药饮片有限公司(批号 0904280), 经山东省中医药研究院林慧彬老师鉴定为豆科植物越南槐的干燥根, 按 2005 年版《中国药典》山豆根项下检查, 符合各项规定。

2 方法

2.1 受试药物的制备 称取山豆根药材饮片 150 g, 置于 2 000 mL 圆底烧瓶中, 分别加入 10, 8, 8 倍量 90% 乙醇加热回流提取 3 次, 每次 1 h, 合并 3 次滤

液, 回收乙醇至无醇味, 浓缩制得生药量为 3.75 g·mL⁻¹ 的山豆根乙醇回流提取液(以下简称山豆根醇提液), 批号 2009062702。

称取一定量的山豆根粗粉, 70% 乙醇浸泡 24 h, 用脱脂棉垫在渗漉筒的底部铺平, 装筒, 加盖放置 24 h, 以 1 ~ 2 mL·min⁻¹ 的流速渗漉, 收集 10 倍量溶液后, 合并渗漉液, 回收乙醇至无醇味, 浓缩制得生药量为 3.39 g·mL⁻¹ 的山豆根乙醇渗漉液(以下简称山豆根渗漉液), 批号 2009062703。

2.2 小鼠急性毒性预试验^[3] 取小鼠 60 只, 雌雄各半, 禁食 12 h, 自由饮水, 次日以 25 mL·kg⁻¹ 体积灌胃给药山豆根醇提液和渗漉液。给药后连续观察记录小鼠的中毒及死亡情况。如此反复试验, 直到找出 0% 致死剂量和 100% 致死剂量为止。经预试验得出, 山豆根醇提液 0% 致死剂量为 15 g·kg⁻¹, 100% 致死剂量为 46.88 g·kg⁻¹, 确定正式试验分 6 个剂量组, 求出剂量比确定 *r* 值为 0.8, 山豆根渗漉液 0% 致死剂量为 8.48 g·kg⁻¹, 100% 致死剂量为 21.19 g·kg⁻¹, 确定正式试验分 5 个剂量组, 求出剂量比确定 *r* 值为 0.8。

2.3 小鼠急性毒性试验 在预试验基础上, 以蒸馏水将剂量按 1 0.8 的比例依次稀释得相应浓度药液。取小鼠 240 只, 雌雄各半, 按体重随机分为 12 组, 每组 20 只, 分别为山豆根醇提液不同剂量组(1 ~ 6 组), 山豆根渗漉液不同剂量组(1 ~ 5 组) 和水对照组。小鼠禁食不禁水 12 h 后, 按以 25 mL·kg⁻¹ 给予不同浓度的药液, 水对照组给予相同体积的蒸馏水, 观察每组小鼠给药后的反应(包括皮肤、眼睛、皮毛、运动、摄食、饮水、排便、呼吸变化及中毒表现和死亡情况), 连续观察 14 d, 死亡动物及时尸检, 并肉眼观察脏器的变化。

3 结果

3.1 各组小鼠急性毒性症状谱比较 小鼠灌胃给药后, 观察各组小鼠急性毒性症状谱, 见表 1 ~ 2。

表 1 山豆根醇提液小鼠急性毒性症状谱

醇提液	烦躁		多动		呼吸急促		抽搐	
	发生率/%	发生时间	发生率/%	发生时间	发生率/%	发生时间	发生率/%	发生时间
1 组	100	4 ~ 20 min	100	4 ~ 20 min	100	10 ~ 30 min	100	10 ~ 30 min
2 组	100	5 ~ 30 min	100	5 ~ 30 min	60	20 min ~ 12 h	80	14 min ~ 12 h
3 组	80	7 min ~ 1 h	80	7 min ~ 1 h	30	20 min ~ 12 h	40	22 min ~ 12 h
4 组	40	5 ~ 30 min	40	5 ~ 30 min	30	26 min ~ 12 h	20	30 min ~ 12 h
5 组	20	5 min ~ 1 h	20	5 min ~ 1 h	25	10 min ~ 12 h	10	10 min ~ 12 h
6 组	0	-	0	-	-	-	0	-

表 2 山豆根渗漉液对小鼠急性毒性症状谱

醇提液	烦躁		多动		呼吸急促		抽搐	
	发生率/%	发生时间	发生率/%	发生时间	发生率/%	发生时间	发生率/%	发生时间
1 组	100	3 ~30 min	100	3 ~30 min	100	8 min ~12 h	100	5 min ~12 h
2 组	100	4 ~30 min	100	4 ~30 min	80	5 min ~12 h	80	5 min ~12 h
3 组	80	5 ~30 min	80	5 ~30 min	40	15 min ~12 h	40	15 min ~12 h
4 组	60	8 ~30 min	70	8 ~30 min	20	20 min ~12 h	20	20 min ~12 h
5 组	0	-	20	10 min ~1 h	0	-	0	-

表 1 可见小鼠灌胃山豆根醇提液 4 min 后即出现烦躁、多动症状, 药后 1 h 内消失; 灌胃 10 min 后即出现呼吸急促、抽搐等症状, 12 h 内全部消失, 且上述毒性症状的发生率呈现一定的剂量相关性。

渗漉液毒性症状谱见表 2, 可见小鼠灌胃山豆根渗漉液 3 min 后即出现烦躁、多动症状, 药后 30 min 内即消失; 灌胃 5 min 后即出现呼吸急促、抽搐等症状, 12 h 内上述症状全部消失, 且上述毒性症状的发生率与给药剂量呈现一定的相关性。与醇提液相比, 渗漉液毒性反应发生时间更早、发生率更高。

3.2 各组小鼠累计死亡情况观察 分别于药后 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 168, 336 h 统计各组小鼠死亡情况, 累计死亡曲线见图 1 ~2。

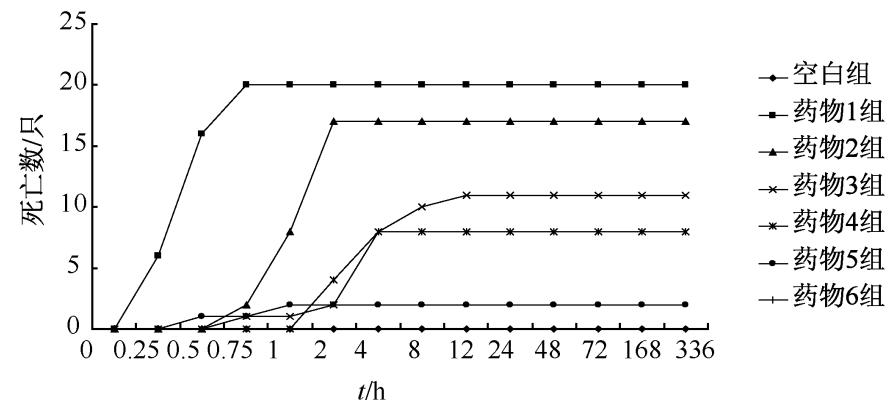


图 1 山豆根醇提液小鼠 LD₅₀ 时间-累积死亡曲线

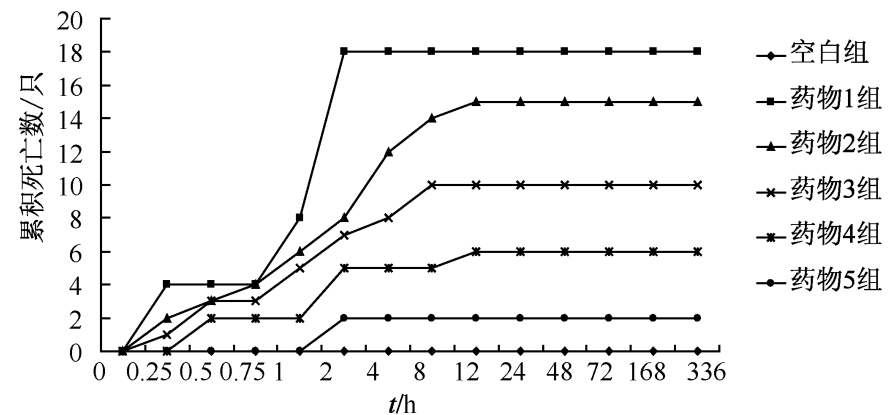


图 2 山豆根渗漉液小鼠 LD₅₀ 时间-累积死亡曲线

由图 1 可见, 小鼠灌胃山豆根醇提组分后 15 min 开始出现死亡, 所有小鼠死亡均发生在药后 7 d 内, 各组小鼠死亡率分别为 100%, 85%, 55%, 40%, 10%, 0%。由图 2 可见, 山豆根渗漉液小鼠急毒 LD₅₀ 试验各药物组小鼠均出现死亡, 且所有小鼠死

亡均发生在药后 15 min ~12 h, 各药物组小鼠死亡率分别为 90%, 75%, 50%, 30%, 10%。

3.3 各组小鼠体重变化 试验期间小鼠自由饮食, 每日记录小鼠体重, 观察主要毒性症状谱及体重变化。各组小鼠 14 d 体重自身差异见图 3, 4。由图 3, 4 可见, 药后 1 d 山豆根醇提 2 组及渗漉液各剂量组体重有不同程度的降低, 且与空白对照组相比有差异; 药后 2 d, 各药物组小鼠体重开始回升, 但与空白对照组相比, 仍有剂量组有差异; 药后 7 d, 各药物组体重与空白对照组相比, 差异消失。

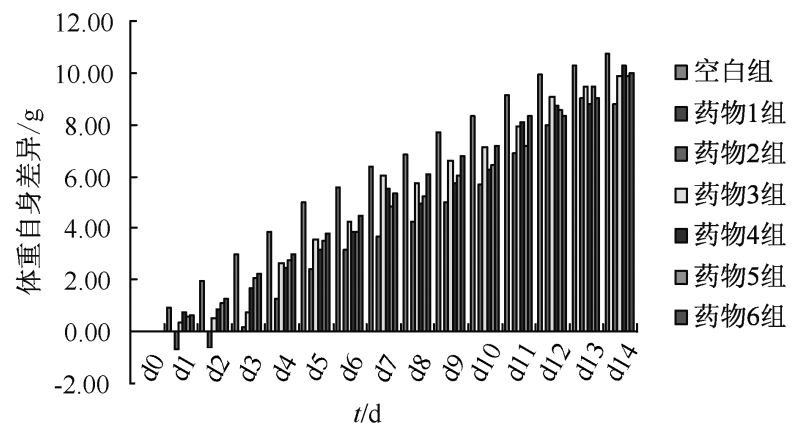


图 3 山豆根醇提液小鼠 LD₅₀ 体重自身差异

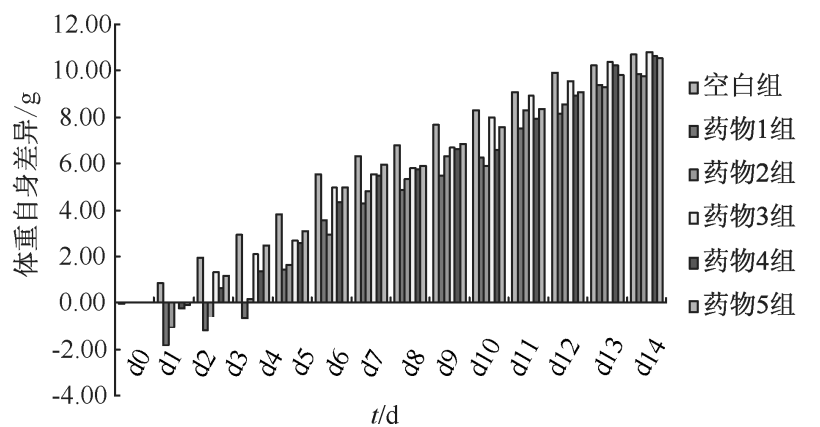


图 4 山豆根渗漉液小鼠 LD₅₀ 体重自身差异

3.4 LD₅₀ 的计算 根据各剂量组小鼠累计死亡数量及给药剂量, 用 Bliss 法计算山豆根醇提液和渗漉液的 LD₅₀ 及 95% 可信限, 结果见表 3。

山豆根醇提液按生药量计算小鼠灌胃给药的 LD₅₀ 为 27.135 g·kg⁻¹, 为人日用量的 316.6 倍; 山豆根渗漉液按生药量计算小鼠灌胃给药的 LD₅₀ 为 13.399 g·kg⁻¹, 为人日用量的 156.3 倍。

表 3 山豆根醇提液、渗漉液 LD₅₀比较($\bar{x} \pm s, n=20$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	对数剂量 /X	死亡数 /只	死亡率 /%	试验概率 /Y	回归概率 /Y	LD ₅₀	95% 可信限 /g·kg ⁻¹
醇提液	46.88	1.671 0	20	100.00	-	6.950 8	27.135	24.869 ~29.622
	37.50	1.574 0	17	85.00	6.036 4	6.154 3		
	30.00	1.477 1	11	55.00	5.125 4	5.358 1		
	23.44	1.370 0	8	40.00	4.747 1	4.477 7		
	18.75	1.273 0	2	10.00	3.718 3	3.681 2		
	15.00	1.176 1	0	0.00	-	2.885 0		
渗漉液	21.19	1.326 1	18	90.00	6.281 7	6.281 1	13.399	12.016 ~14.899
	16.95	1.229 2	15	75.00	5.674 2	5.657 0		
	13.56	1.132 3	10	50.00	5.000 0	5.033 3		
	11.02	1.042 2	6	30.00	4.476 0	4.453 6		
	8.48	0.928 4	2	10.00	3.718 3	3.721 3		

4 讨论

山豆根是一味传统中药, 临床常用于治疗咽喉肿痛、牙龈肿痛, 近年来又用于治疗心律失常、急性乙型肝炎、肿瘤等病, 随着临床应用的拓宽, 其毒副作用已屡见报道并引起中医药界的广泛关注。临床 ADR 报道, 主要不良反应为恶心呕吐, 腹痛腹泻, 头痛头晕, 四肢无力; 重者四肢麻木, 大汗淋漓, 心跳加快, 血压升高, 步态不稳, 继则呼吸急促、浅表, 四肢抽搐, 口唇青紫, 瞳孔散大, 最终致中枢性呼吸衰竭而死亡^[6]。我们的前期研究和本试验观察小鼠的主要毒性症状谱为烦躁、多动、呼吸急促、抽搐, 最后因呼吸衰竭而死亡, 这亦与临床 ADR 报道中的症状和体征基本吻合。

中药的多成分、多靶点的特点导致了中药毒性表达的复杂性, 而除了基源、炮制、以外, 提取方式也是中药毒性表达的关键因素之一。由于生物碱的理化特性具有热不稳定性, 不同提取方式导致了毒性物质基础的不同, 而成为中药毒性表达强弱的主要影响因素。本试验也表明渗漉液比醇提液毒性反应发生时间更早、发生率更多、死亡率更高, 尤其是 LD₅₀ 值的差异更显著。根据生物碱的理化特性, 醇浓度越大, 越易于溶出生物碱, 但乙醇热回流提取所

用乙醇浓度较渗漉液大, 却破坏了山豆根中的生物碱, 提示乙醇渗漉保证了生物碱不遇热受破坏; 综上所述结果进一步提示生物碱是山豆根的主要毒性物质基础, 这也与文献研究相一致。本试验已证明毒性物质基础与中药毒性表达密切相关, 但如何正确的毒性表达下去锁定物质基础? 这个毒性作用基础在体内毒性的定性、定量、定位表达, 需要我们做进一步探索。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 25.
- [2] 范健, 吕建峰. 山豆根的化学成分与药理研究进展[J]. 实用医技杂志, 2003, 10(11): 1254.
- [3] 康志英, 禹春平. 山豆根的提取工艺研究与探讨[J]. 中药材, 2007, 30(1): 101.
- [4] 孙蓉, 杨倩. 山豆根不同组分小鼠急性毒性比较研究[J]. 中国药物警戒, 2010, 7(5): 257.
- [5] 徐叔云. 药理试验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992: 201.
- [6] 公素琴, 朱孟国. 山豆根毒副反应综述[J]. 云南中医中药杂志, 2004, 25(2): 48.

[责任编辑 邹晓翠]