

丹宁生物活化理论及其应用

I. “丹宁生物活化假设”及其科学依据

史 志 诚*

(兽医系)

摘 要

本文叙述了丹宁毒理机制研究中的主要争论。根据丹宁酸在试管内被稀酸水解为连苯三酚和没食子酸, 栲叶丹宁在试管内经生物发酵产生多种低分子酚类化合物, 提出“高分子水解丹宁经生物降解产生多种低分子酚类化合物引起中毒的假设”, 并定义为“丹宁生物活化假设”, 阐述了建立“假设”的科学依据。

关键词: 丹宁; 丹宁酸; 栲叶丹宁; 生物活化; 毒理机制

丹宁 (Tannin, 亦称单宁, 鞣质) 是分子量在500以上的多元酚类的复杂化合物。早在1662年报道动物采食栲属植物的枝叶、果实 (橡子) 引起中毒^[1]和Cameron^[2]报道应用五倍子丹宁治疗烧伤引起副作用以来, 丹宁的毒理机制一直未能阐明, 处于争论之中。Handler^[3]研究了动物口服丹宁的毒理, 结果表明丹宁不能透过胃肠道吸收, 就像人饮用含丹宁的茶一样无害。而Korpassy et al.^[4]给家兔、狗投服丹宁酸后, 用Kuntzel's法测定血清丹宁酸含量, 结果血清丹宁3小时后达高峰, 而后在24小时内缓慢下降至0, 认为丹宁酸能透过胃肠道被吸收。之后, Pigeon et al.^[5]从哈佛氏栲中分离出可水解丹宁, 用Mose-sson法在光电比色计上测定给予丹宁酸的家兔、羊和给予栲丹宁的家兔血浆中的丹宁, 结果支持了丹宁能透过胃肠道直接进入血液的论点。随着丹宁化学研究的深化, 一些学者从给予丹宁酸的动物尿液中检出没食子酸、连苯三酚等降解产物并认为这些产物是引起中毒的主要因素^[1]。然而, Panciera^[6]认为丹宁酸或其衍生物引起中毒的论点只是推论, 有待证实。Amderson et al.^[7]强调指出: 尽管许多证据表明丹宁或其生物转化产物可能是有毒成份, 但栲属植物中毒的机理仍不清楚, 其原因是没有强有力的证据肯定丹宁, 也就是说丹宁或多酚类就是栲属植物中毒的毒性成分的论点还没有建立起来。以上表明: 争论的焦点是: (1) 在胃肠道内, 丹宁是否能直接被吸收进入血液; (2) 丹宁引起中毒的基本因素是丹宁本身?

本文于1988年8月25日收到。

* 本校兼职副教授, 现在陕西省农牧厅工作。

还是其生物转化产物? 或者二者皆是。

1 丹宁酸的水解试验

1.1 材料与方法

丹宁酸、没食子酸、连苯三酚(均为遵义市第二化工厂出品), 乙醚、5%硫酸溶液、展开剂为特丁醇:冰醋酸:水(6:1:6), 显色剂为1%三氯化铁醇液、层析纸、层析缸。

取丹宁酸0.1g, 置小三角瓶中, 加入5%硫酸25ml, 摇匀, 置水浴(38℃)上4~8h, 取出冷却, 移入250ml分液漏斗中加乙醚摇2~3次, 将乙醚液浓缩点于层析纸上, 同时点上没食子酸、连苯三酚水溶液样品, 在层析缸中展开后显色。

1.2 结果

丹宁酸被酸水解为低分子的没食子酸和连苯三酚(见图1)。

2 栎叶丹宁的生物发酵试验

2.1 材料与方法

牛瘤胃液, 栎叶丹宁采取Mayer氏法从栓皮栎(*Quercus Valiabilis*中)提取获得), 罐头发酵^[8], 挥发酚的测定采用4-AAP法, 低分子酚类化合物的检测采用气相色谱法^[9]。

2.2 结果

栎叶丹宁在瘤胃液中发酵开始, 瘤胃液中挥发酚为1.37mg/kg, 发酵后48小时瘤胃液中挥发酚增加为457.72mg/kg, 96小时达701.57mg/kg, 此时气相色谱分析检出苯酚、甲酚、邻苯二酚、间苯二酚和连苯三酚等多种低分子酚类化合物。

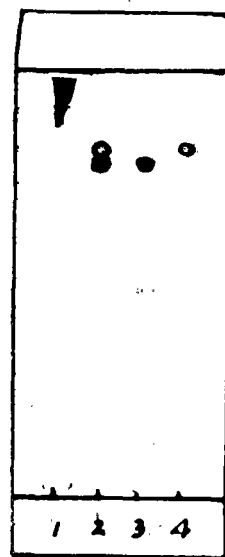


图1 丹宁酸水解纸层析图

1—丹宁酸; 2—丹宁酸水解液;
3—没食子酸; 4—连苯三酚

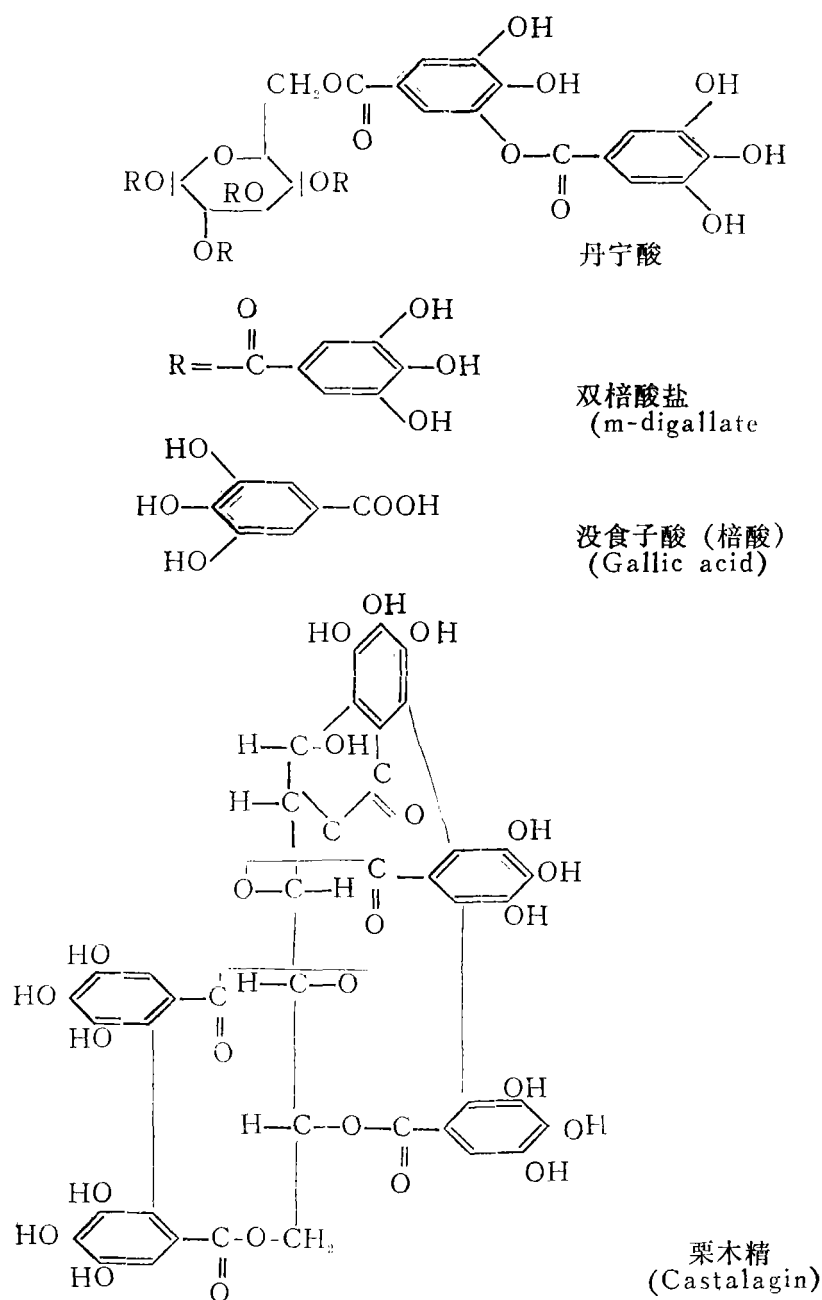
3 “丹宁生物活化假设”的提出

上述两项试验结果给予极大的启示。既然丹宁酸和栎叶丹宁是分子量在500以上的高分子可水解丹宁, 那么当丹宁进入机体的胃肠道内, 就不可能经胃肠粘膜吸收, 而可能在生物条件下经过降解产生没食子酸、连苯三酚等多种低分子酚类化合物。由于这些低分子酚类化合物的分子量小, 极易透过胃肠粘膜吸收进入血液和身体器官组织; 由于它们多是血液毒、原浆毒, 毒性较大; 由于它们属于弱酸性化合物, 经肾脏排出的速度受尿液pH的影响, 当尿液呈弱酸性时, 则被动重吸收加强, 体内酚的积累增加, 因而会产生一系列的毒性作用, 导致动物中毒。为了简明地表达这一见解, 作者提出“高分子水解丹宁经生物降解产生多种低分子酚类化合物引起中毒的假设”, 并定义为“丹宁生物活化假设”。

4 建立“丹宁生物活化假设”的科学依据

4.1 依据丹宁的理化特性

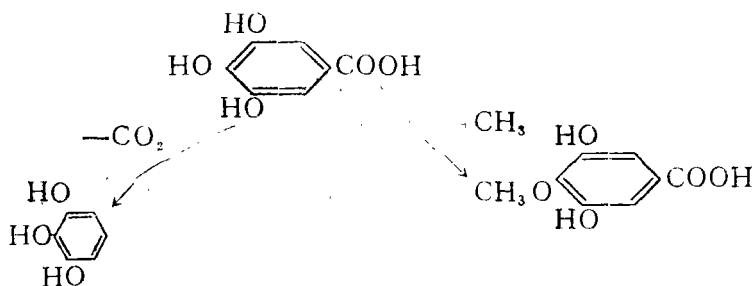
1894年，普罗克特发现丹宁加热有的生成连苯三酚，有的生成邻苯二酚。1920年弗罗顿堡把丹宁分为用酸或酶容易水解的水解丹宁 (Hydrolysable Tannins) 和难以水解的缩合



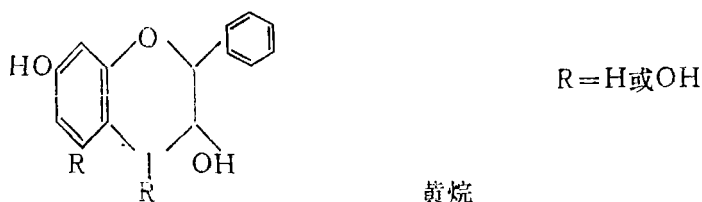
丹宁 (Condensed Tannins) 两类。连苯三酚类多属前者, 邻苯二酚类多属后者, 但也有两种类型丹宁混合存在的。

可水解丹宁的结构中有糖酯键, 其反应基有 $-OH$, $-COOH$ 及其酯, 易被酸、碱、酶或水煮沸所水解, 并失去丹宁的特性, 水解产物主要是酚酸类和糖或多元醇。丹宁酸 (Tannic acid, 鞣酸) 是水解丹宁类, 水解产物是糖和鞣酸体, 每个糖带有7个或少于7个鞣酸体。栲丹宁 (Oak tannin) 亦属于水解丹宁类, Mayer等从橡碗粗丹宁中分离获得栗木精、甜栗精, 栗木橡碗酸、甜栗橡碗酸、异橡碗精酸、橡碗精酸和甜栗素等7个组分^[10]。

从丹宁酸与栲丹宁结构上分析, 糖与酚酸均以酯键相连, 糖与芳香核以 $-C-C-$ 键相连。根据可水解丹宁的定义, 酯键和 $-C-C-$ 键一旦被水解, 低分子的酚酸就会游离出来, 其中没食子酸在动物体内经脱羧作用和甲基化作用产生连苯三酚和3-O-甲基没食子酸, 从尿中排出 (Booth, 1959)。



缩合丹宁是以黄烷结构为骨干, 其反应只有一 $-OH$, 用酸处理或久置不但不能水解, 反而缩合为高分子不溶于水的“鞣红”, 如茶叶丹宁、儿茶等。



4.2 依据动物消化系统的解剖生理特点

单胃动物的消化主要在胃、小肠和盲肠。胃内分泌胃液, pH0.5~1.5, 酸性强, 水分多, 其主要成分有胃蛋白酶、脂肪酶和盐酸。小肠内有胰液、胆汁及小肠液等, 未消化的残渣在盲肠内借助微生物而消化, 具有重要的发酵作用和腐败作用。若水解丹宁进入胃内则会经酸水解产生酚化物和糖, 在盲肠内亦会产生明显的降解作用。

反刍动物的前胃具有生物发酵的条件。牛的瘤胃、网胃好似一个大发酵罐, 容积30~60L。瘤胃高度缺氧, pH波动在5.5~7.5, 温度恒定在38~41℃之间。1g瘤胃内容物约含细菌150~250亿, 纤毛虫60~180万, 有各种酶类。这样一个生物环境为高分子水解丹宁的降

解创造了条件。据鞠大钧(1979)报道,使用橡碗栲胶处理锅炉水垢后,发现炉水中挥发酚含量超过饮用水的标准(0.002mg/L)。如果将锅炉与瘤胃环境作一比较(如附表),就不难看出栲丹宁在瘤胃生物条件下降解出酚的可能性。

附表 锅炉与瘤胃环境的比较

条 件	锅 炉	瘤 胃
环 境 条 件	密封的大水罐	似密封的生物发酵罐
pH	8—9	5.5—7.5
温 度	100℃左右	38—41℃
压 力	高压	?
酶	—	+
栲 丹 宁	0.25kg/t	+/-
加 碱 量	约为丹宁的1/3	不断进入唾液
产生挥发酚含量	0.042mg/L(对照0.00034mg/L)	?/-

4.3 依据丹宁中毒与酚中毒的相似程度

牛栲叶丹宁中毒在临床上以便秘、水肿、体温渐降以及尿液pH下降、比重下降、出现尿蛋白为主征,在病理学方面以消化道炎症,实质器官出血,肾小管坏死,肾功衰竭为主要特征。人们饮用受丹宁废水污染的井水而患肝炎、肾炎。而酚中毒在临床上的表现特征是:胃肠炎、体温下降、蛋白尿和肾功衰竭。二者的病理特点相似。

就毒性而言,低分子酚类化合物的毒性比高分子的酚类化合物——丹宁的毒性大得多。苯酚和甲酚是挥发酚,易吸收,极毒,能引起中枢神经麻痹和肾病而致死。邻苯二酚在体内被解毒而形成有机硫酸盐随尿排出体外。间苯二酚刺激粘膜,引起昏睡和致命的肾损伤。对苯二酚可引起急性黄色肝萎缩和严重的肾损伤。连苯三酚属于三元酚,为血液毒和代谢毒,口服后引起消化器官、肝、肾的损伤,破坏正常的物质代谢,溶血、昏睡、虚脱死亡。间苯三酚的毒性为连苯三酚的1/2,毒性作用相似。

酚是有机弱酸,低分子酚化物的 pK_a 为:苯酚9.86,邻甲酚10.20,邻苯二酚9.4,对苯二酚10.0,连苯三酚7.0。无论是肾小球滤过的或肾小球主动分泌的(结合酚部分),它在尿中的排泄最终受尿液pH及本身酸度强弱的影响,尿pH愈低,则愈抑制酚性物质的解离,而被动重吸收增强。当尿pH下降到6左右时,酚的排出受阻,致使酚在体内蓄积。同时,酚在酸性条件下不能解离而成分子状态,故脂溶性增大,易与肾小管管壁上皮细胞的蛋白质结合,损害上皮细胞引起坏死、脱落。一部分酚与蛋白质结合,则排出的游离酚减少。这些特点与牛栲叶丹宁中毒时尿液的特殊变化(pH下降时铁反应呈阴性)极为相似。

4.4 依据“生物活化”原理

外来物质(包括毒物)在机体内生物转化的机理表明:一些物质在体内被吸收后以原形排出,或发生生物转化(如降解、结合反应)而失活。而有些物质经某种生物转化产生活性产物(如引起药理作用或毒理作用),这种产生活性产物的过程称之为“生物活化”,如果活性产物是有毒的,则这种产生活性毒物的过程称之为“生物毒化(Biotoxification)”^[11]。

作者认为, 高分子的丹宁难以透过生物膜吸收, 如果丹宁经降解产生活性产物的话, 则首先注意酚的毒性及其弱酸性质, 其次要注意糖的酵解产物对尿pH的影响, 第三考虑到动物种属与个体之间的差异性和对酚的敏感程度。

本研究在段得贤教授指导下完成。本文承蒙北京农业大学王洪章、王志教授, 束蓓蕾副教授, 安徽农学院倪有煌教授, 东北农学院史官、李涛、徐忠宝教授, 中国人民解放军兽医大学刘应义教授, 华南农业大学冯洪辉教授, 西北农业大学王建辰、王建元教授, 唐文杰、曹光荣副教授审阅, 特此致谢。

参 考 文 献

- 1 史志诚. 国外畜牧科技, 1984 (1): 20-23
- 2 Cameron G R, Milton R F. The Lancet Aug 1943 (14): 179-186
- 3 Handler P, Baker R D. Science 1944 (99): 393 (2576)
- 4 Korpassy B R, Horval R, Koltay M. Biol Abstr 1952; 26 (1): 625
- 5 Pigeon R F et al. J Vet Res 1962; 23 (97): 1268-1270
- 6 Panciera R J. Oak Poisoning in cattle. In: Keeler R F et al ed. Effects of Poisonous Plants on Livestock Academic Prees, 1978: 499-505
- 7 Anderson G A et al. J AVMA 1983; 182 (10). 1105-1110
- 8 史志诚. 畜牧兽医杂志, 1983 (3): 1-7
- 9 陈凡、史志诚. 西北农学院学报, 1981 (8): 61-66
- 10 张文德. 林业科学, 1980 (2): 115-123
- 11 艾里恩等著. 普通毒理学导论. 人民卫生出版社, 1980: 62-64

THEORY OF TANNIN BIOACTIVATION AND ITS APPLICATION

1. Tannin Bioactivation Hypothesis and Its Scientific Basis

Shi Zhicheng

(Department of Veterinary Medicine)

Abstract

This paper deals with main disputatin on the mechanism of Tannin Toxicosis. Based on Tannic acid and in vitro was hydrolized into gallic acid and pyrogallol by dilute acid; oak leaf Tannin in vitro produced many kinds of phenotic compounds with low molecular weights through biofermentation. The author proposes the hypothesis that Tannins can be hydrolized by high moleculars of oak leaves through biodegradation from which phenolic compounds with low moleculars cause toxicosis. Also, the author defines the hypothesis of bioactivation by Tannin, and deals with the scientific basis of forming the hypothesis.

Key words: Tannin; Tannic acid; oak leaf Tannin; bioactivation; pathogenesis