

# 喜树叶主要有毒成分及其对 奶山羊毒性的研究

高巨星 曹光荣 段得贤 李绍君 王 凯

(西北农业大学兽医系)

郑 铭

(四川雅安市畜牧局)

**摘 要** 从喜树叶中分离出一种淡黄色针状结晶,含量约为0.01%,熔点为264~267℃。经TLC, IR, NMR, MS分析证实为喜树碱(camptothecin),毒性试验证明是喜树叶的主要有毒成分。给奶山羊灌服喜树叶(干粉)10g/kg或喜树叶粗提物0.16g/kg体重,每天一次连续3d可引起与自然发病症状相同的急性中毒。主要症状有出血性腹泻、脱水、肌肉震颤、昏迷和死亡;主要病理学变化为WBC减少,PCV升高,出现血尿、蛋白尿、糖尿和尿pH降低。浓缩尿中可检出喜树碱。病理学变化有胃、肠、肝、肾、淋巴结、脊髓充血、出血、变性和坏死。

**主题词** 喜树, 叶, 喜树碱, 乳羊/饲料中毒

喜树(*Camptotheca acuminata* Decne)为珙桐科(*Nyssaceae*)旱莲属多年生落叶乔木,广泛分布于长江流域及西南各省,为我国特有植物。郑铭等首次报道四川雅安地区发生奶山羊喜树叶中毒及其症状<sup>[1]</sup>; Wall *et al.*从中国引种的喜树茎中分离出一种生物碱——喜树碱(*Camptothecin*)<sup>[2]</sup>; Wani *et al.*又从喜树碱母液中获得微量10-羟基喜树碱和甲氧喜树碱,并证实喜树碱对多种移植性肿瘤有明显抑制作用<sup>[3]</sup>; 罗厚尉等先后从喜树根及果实中分离出多种化学成分,包括喜树碱、10-羟基喜树碱、18-羟基喜树碱、甲氧喜树碱、11-羟基喜树碱、去氧喜树碱、喜树次碱<sup>[4-6]</sup>。关于喜树叶的化学成分尚未见有报道。本研究的目的在于分析喜树叶中主要有毒成分,观察对奶山羊的毒性,以及寻找中毒以后的治疗方法,为进一步防治喜树叶中毒提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1987年8月,喜树叶采于四川雅安,自然干燥、粉碎,干燥避光保存备用。

文稿收到日期:1988-12-12。

## 1.2 主要有毒成分分析

喜树叶化学成分预试验, 根据植物化学成分系统预试结果以及前人的研究成果自行设计的提取程序(图1)进行。按提取程序可得提取物一、二、三、四。毒素筛选试验是将50只小白鼠(体重17~23g), 随机分成5组, 1—4组为试验组分别灌服提取物一、二、三、四的10%吐温80混悬液, 第5组为对照组, 仅灌服10%吐温80。每20g体重灌服0.3 ml间隔24 h灌服一次, 每次灌服前小白鼠禁食和禁饮水4 h。

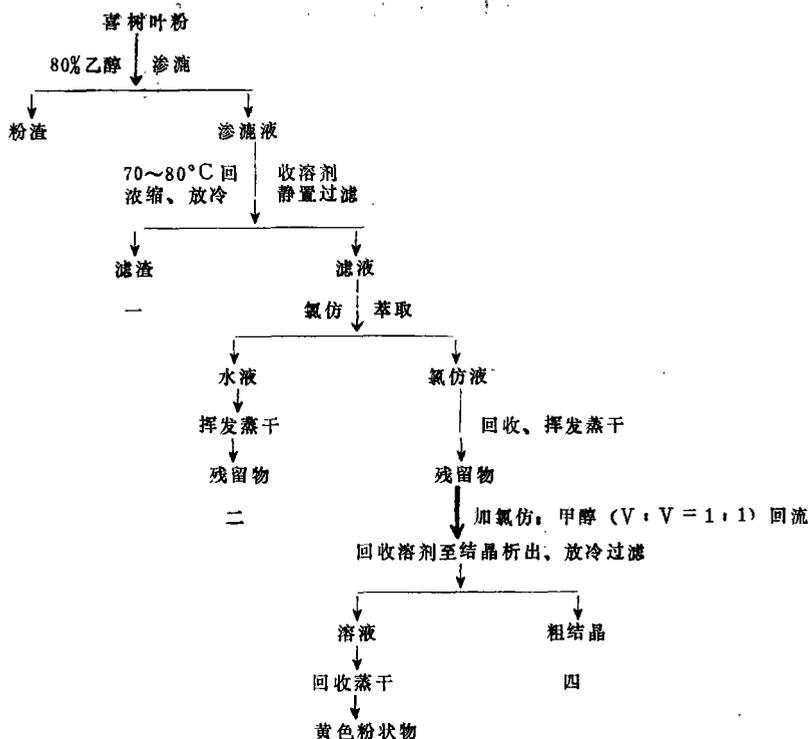


图1 喜树叶有毒成分提取程序

## 1.3 主要有毒成分的分离与鉴定

将有毒性的提取物加热溶解于氯仿, 经硅胶柱层析, 用含1%~5%甲醇氯仿洗脱, 每20 mL收集一份。各收集液用硅胶G和f薄层层析检查(展开剂: 氯仿: 丙酮=7:3, 上行法展开, 紫外灯下观察荧光后, 25%硫酸乙醇显色)合并同类, 回收溶剂纯化获得纯提取物(本实验得到2个结晶即结晶I和结晶II)。将纯提取物进一步作毒性试验(方法同毒性筛选试验), 对毒性强、产量高者测定熔点(显微熔点测定法), 用红外光谱(Model-200-10型衍射光栅红外分光光度仪, 日本产)、质谱(Mat-312型双聚焦质谱仪, 美国产)、核磁共振谱(Fx-90Q核磁共振仪, 日本产)进行结构鉴定。

## 1.4 对奶山羊的毒性试验

西农改良奶山羊12只(平均体重 $28.3 \pm 2.5$  kg), 公母各半, 随机分成三组。第1, 2组为试验组分别灌服喜树叶干粉10 g/kg体重、喜树叶粗提物0.16 g/kg体重(0.16 g粗提物相当于10 g喜树叶), 每天一次共3次; 第3组为对照组, 正常采食和饮水。所有羊只于试验前及试验后的第2, 4天静脉采血并收集尿液进行临床病理学检查。试

验期间仔细观察临床症状,死后立即剖检并采取各脏器组织,10%中性福尔马林保存,切片HE染色,光镜观察。

## 2 结果

### 2.1 主要有毒成分分析结果

2.1.1 喜树叶化学成分系统预试结果 喜树叶可能含有甙类、丹宁、生物碱、酚类、内酯香豆素类、蛋白质,不含皂甙、蒽醌、黄酮类、强心甙甾醇、三萜类有机酸、挥发油、氰甙等。生物碱是植物一种含量小、活性高的次生代谢产物,前人已经从喜树的茎、根、果实中获得多种生物碱,提示喜树叶中生物碱可能是主要有毒成分。

2.1.2 有毒成分的筛选结果 根据提取程序,应得到4种提取物,经小白鼠毒性筛选试验结果见表1。

表1 喜树叶有毒成分的筛选试验

组别	动物号	提取物	每次灌服量(mg/20g)	灌服次数	死亡数(头)
1	1~10	—	40	4	0
2	11~20	二	40	4	1
3	21~30	三	0.8	2	0
4	31~40	四	0.8	2	10
5	41~50	10%吐温80	—	4	0

灌服提取物四的第4组小白鼠于3~5d全部死亡。死前表现腹泻,肛门红肿,全身震颤;死后剖检主要表现为胃肠炎。试验结果表明提取物有较强的毒性。

2.1.3 有毒成分的分离与鉴定结果 柱层析分离纯化获得结晶I和结晶II,分别为提取物四的81%,15%。毒性试验见表2。灌服结晶I的第1组小白鼠于3~6d全部死亡,中毒症状为腹泻、肛门红肿、全身震颤,死后剖检可见出血性胃肠炎。灌服结晶II的第2组小白鼠于第6,7天各死亡一只,中毒症状为精神沉郁,被毛粗乱,采食饮水减少但未见腹泻,死后剖检发现轻度胃肠炎。由此可见结晶I毒性大,产量高,可以认为是喜树叶的主要有毒成分。

2.1.4 有毒成分结晶I的结构鉴定 结晶I为淡黄针状结晶,TLC经显色可见黄色斑点, $R_f$ 值为0.56,在紫外灯下可见蓝绿色荧光。熔点(m.p)264~267℃。红外光谱(IR)(KBr): $\text{cm}^{-1}$ ,3440,2930,1745,1658,1605,1585,1440,1160(见图2)。质谱(MS): $m/e$ 348( $M^+$ ),320,319,304,219,209,180(见图3)。核磁共振谱(NMR): $\sigma$ (TMS为内标,三氯醋酸为溶剂)0.69(3H,三重峰, $J=7\text{Hz}$ ,18位H),1.70(2H,四重峰, $J=7\text{Hz}$ ,19位H),5.30(2H,单峰,5位H),

表2 结晶I、结晶II对小白鼠的毒性试验

组别	动物号	受试物	每次灌服量(mg/20g)	死亡数(头)
1	1~10	结晶I	0.6	10
2	11~20	结晶II	0.6	2
3	21~30	10%吐温80	—	0

注:均灌服2次。

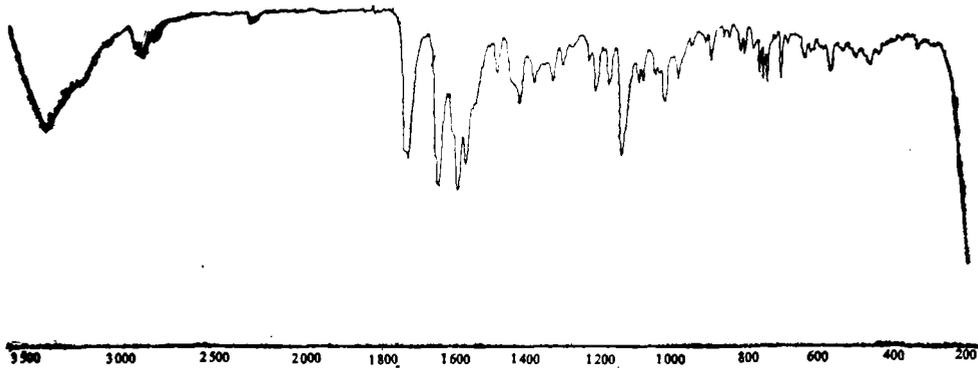


图2 喜树叶中喜树碱红外光谱图 (IR)

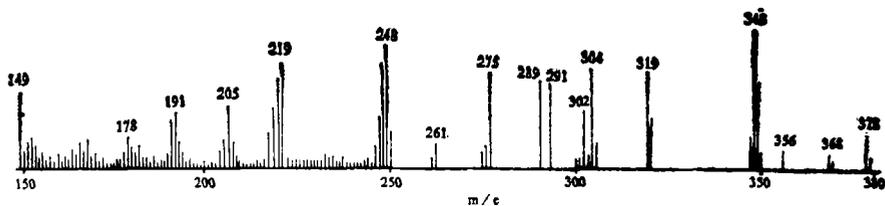


图3 喜树叶中喜树碱质谱图 (MS)

5.00, 5.50 (2H, AB型, 四重峰,  $J = 16\text{Hz}$ , 17位H), 7.60~8.10 (5H, 多重峰, 9~12位H, 14位H), 8.90 (1H, 单峰, 7位H) 见图4)。

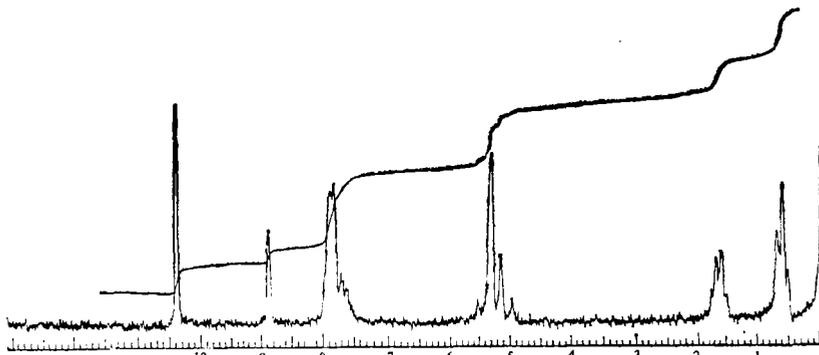


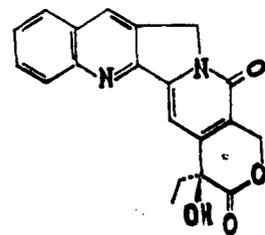
图4 喜树叶中喜树碱的核磁共振谱图 (NMR)

上述各项光谱数据及熔点均与已发表的喜树碱各项数据相同, 由此可知结晶 I 为喜树碱, 其结构式见右图。

## 2.2 奶山羊中毒试验结果

1组 (灌服喜树叶) 和 2组 (灌服喜树叶粗提物) 试验羊全部中毒死亡, 3组 (对照组) 羊只全部健康。

中毒症状 初期精神沉郁, 目光发呆, 食欲减少, 腹泻。随后病情加重, 食欲废绝, 瘤胃蠕动消失, 反刍停止, 血样腹泻, 呻吟, 常作排尿姿势, 但仅排出少量黄色尿液。



后期体温降低，呼吸困难，全身震颤，颈项强直，卧地不起，于5~6d死亡。

临床病理学检查 白细胞明显减少，红细胞压积升高，血清 GOT 增高，尿蛋白和葡萄糖增加并出现血尿，浓缩尿可检出喜树碱。

病理学变化 瘤胃粘膜脱落，皱胃和肠道呈现出血性炎症和粘膜脱落；小肠固有层和粘膜下层充血出血，呈现淋巴细胞、嗜酸性细胞、巨噬细胞以及少量的嗜中性细胞和浆细胞浸润。肝脏质地变硬，边缘钝圆，胆囊肿大并充满胆汁，肝细胞发生颗粒变性、空泡变性，有的细胞的胞浆溶解、胞膜破裂、核浓缩。肾脏出血，皮质与髓质界限不清；肾小管上皮细胞发生颗粒变性，肾小管腔可见均质红染，部分近曲小管上皮细胞的胞浆溶解，胞膜破裂，核浓缩，肾小球包裹扩张。心内外膜有出血；心肌纤维肿胀，肌浆出现异常红染颗粒，间质毛细血管扩张、充血并有出血现象。淋巴结充血，淋巴结扩张含多量巨噬细胞，淋巴结消失，淋巴细胞减少，呈现单纯淋巴结炎变化。大脑毛细血管扩张，神经细胞变性、多深染并有卫星现象和噬神经现象。脊髓明显充血、出血，神经细胞变性，部分神经细胞核溶解。

### 3 结论与讨论

1) 本试验从喜树叶中分离出一种淡黄色结晶，经熔点、红外光谱、质谱、核磁共振谱分析鉴定为喜树碱，经动物毒性试验证实喜树碱是喜树叶的主要有毒成分。至于喜树叶是否像喜树茎、根和果实一样也含有其它微量生物碱，还有待研究，但已有的研究表明其他微量生物碱在喜树根及果实中含量低，仅为喜树碱的1%~10%，而且毒性小，即便喜树叶含有其他微量生物碱也不大可能是主要有毒成分。本研究从喜树叶中分离结晶 II，因含量少，毒性小，没有作进一步分析和鉴定。

2) 给奶山羊每天一次灌服喜树叶 10g/kg 体重，或喜树叶粗提物 0.16g/kg 体重，连续 3d 可引起和自然发病相同的急性中毒和死亡。奶山羊急性中毒主要临床症状以出血性腹泻，脱水，少尿，肌肉震颤为特征；主要临床病理学变化为白细胞减少，红细胞压积升高，血尿以及尿液 pH 降低，浓缩尿中可检出喜树碱；主要病理学变化包括出血性胃肠炎，心、肝、肾、脑、脊髓充血、出血和变性等可以作为诊断的依据。

3) 喜树中毒尚无有效治疗方法，中毒羊只多数死亡。为了减少损失，我们根据喜树碱的代谢和毒性特点，用活性炭作了试验性治疗，效果甚为满意。当奶山羊中毒后，立即用活性炭 10g/kg 体重混悬于 2L 复合电解质溶液中一次灌服，隔日重复一次，共 2 次。经治疗的 8 只羊全部痊愈，而未经治疗的羊全部死亡。活性炭是强吸附剂，大剂量应用足可以吸附胃肠道的有毒生物碱包括经胆汁排泄进入肠道的喜树碱，阻止其形成肝肠循环，从而降低其毒性作用。灌服大量的复合电解质溶液，可以解除机体的脱水使电解质紊乱得以恢复。在实际工作中对中毒动物应尽早采用活性炭治疗，并增加辅助治疗措施，动物可能恢复得更快。

## 参 考 文 献

- 1 郑铭, 黎云贵, 宁守荣等. 奶山羊喜树叶中毒. 中国兽医杂志, 1986, 12 (3): 17~1
- 2 Wall M E, Wani M C, Cook C E *et al.* plant Antitumor Agents, I, The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1966, 88: 3888~3890
- 3 Wani M C, Wall M E. Plant Antitumor Agents II, The Structure of Two New Alkaloids from *Camptotheca acuminata.* *J. Org. Chem.*, 1969, 34: 1364~1367
- 4 徐任生, 赵志达, 林隆泽等. 抗癌植物喜树化学成分的研究 II, 喜树果中的化学成分. 化学学报, 1977, 35 (3, 4): 193~199
- 5 罗蔚厚. 从喜树果中分离出一种微量生物碱——去氧喜树碱. 中草药通讯, 1975, (1): 25~29
- 6 林隆泽, 赵志远, 徐任生. 抗癌植物喜树化学成分研究 I, 喜树根的化学成分. 化学学报, 1977, 35 (3, 4), 227~231
- 7 林隆泽, 宋纯洁, 徐任生. 抗癌植物喜树化学成分研究 V, 喜树果中的其他化学成分. 化学通报, 1978, 327 (6): 7
- 8 林隆泽, 张金生, 沈积慧等. 新生物碱-18-羟基喜树碱. 药学学报, 1988, 23 (3): 186~188
- 9 Guarino A M, Anderson J B, Starkweather D K *et al.* Pharmacologic studies of Camptothecin (NSC-100880); Distribution, Plasma Protein Binding, and Biliary Excretion. *Cancer Chemotherapy Report*, part I, 1966, 57 (2): 125~146
- 10 Sieber S M, Mead J A R, Adams R H. Pharmacology of Antitumor Agents from Higher Plants. *Cancer Treatment Report*, 1976, 60 (8): 1127~1139
- 11 罗金德, 马竹卿, 顾学凌. 喜树碱多相脂质体 (PL-CSA) 的研究. 药学学报, 1984, 19 (1): 63~67
- 12 上海市南昌制药厂等. 喜树碱生产工艺. 中草药通讯, 1971, (1): 38~40
- 13 Schaeppi U, Fleischman R W, Cooney D A. Toxicity of Camptothecin (NSC-100880). *Cancer Chemotherapy Reports*, Part 3, 1974, 5 (1): 25~36

Research on Main Toxic Components of the Leaves  
of *Camptotheca acuminata* and Its Toxicity  
to Milk Goats

Gao Juxing Cao Guangrong Duan Dexian Li Shaojun Wang Kai

(Department of Veterinary Medicine)

Zheng Mine

(Animal Husbandry Bureau of Ya'an Municipality, Sichuan)

**Abstract** A kind of light yellow needles shaped crystal has been isolated from the leaves of *Camptotheca acuminata*. The amount of the extracted product was about 0.01%, and its melting point was 264~267°C. The analysis by using TLC, IR, NMR, MS proved that it is alkaloid (*Camptothecin*). The toxicity test proved that *Camptothecin* is the main toxic element in the leaves of *Camptotheca acuminata*. Acute poisoning in milk goats induced by administrating the leaves of 10g/kg (D. W.) or its crude extract of 0.16/kg per day for 3 days showed similar signs as natural poisoning. The primary clinical signs included hemorrhagic diarrhea, dehydration, muscle tremor, coma and death. Main histopathologic lesions showed congestion, hemorrhage, metaplasia and necrosis in most of organs such as gastrointestinal tract, kidney, liver, lymph, and spinal cord. Clinical pathologic examination showed leukopenia, high PCV, hematuria, low urinary pH, proteinuria, and glycosuria. At the same time *Camptothecin* can be determined in concentrated urine.

**Subject words** *Camptotheca acuminata*, leaves, *camptothecin*, milk goat/feed poisoning