

瑞香狼毒中总黄酮的提取分离 及其毒性研究

宋晓平 曹光荣 李绍君

(西北农业大学动物医学系, 陕西杨陵 712100)

摘要 用醇提取和溶剂分离法从瑞香狼毒根中提得瑞香狼毒总黄酮进行动物毒性试验。结果表明, 小白鼠灌胃 LD_{50} 为 524.81 mg/kg; 家兔耳静脉注射 75 mg/kg 后主要表现为角弓反张, 痉挛抽搐, 呼吸困难, 心电图显示心力衰竭印象; 麻醉家兔耳静脉注射 25 mg/kg 后出现呼吸、脉搏减慢及短暂的脉压增大, 随后脉压消失; 家兔灌胃 700 mg/kg 后出现腹痛、腹泻和体温下降, 血清 GPT、GOT、AKP 活性 24 h 内无变化, 而 BUN 含量显著升高, 病理变化以各脏器瘀血、胃肠道出血、肺气肿及心肌纤维、肝细胞和肾小管上皮细胞颗粒变性为特性; 对家兔离体肠道运动有抑制; 皮肤原发刺激指数为 2.89, 属中等刺激物。

关键词 瑞香狼毒, 总黄酮, 小白鼠, 家兔, 毒性

中图分类号 S856.9

瑞香狼毒 (*Stellera chamaejasme* L.) 系瑞香科狼毒属植物, 又称狼毒、西北狼毒和断肠草等, 根可入药, 具有散结逐水、止痛和杀虫功效, 现代药理学研究证明有抗肿瘤、抗菌和镇痛作用。全草有毒且具异味, 家畜一般不采食, 但在春季幼苗期, 或外地引进的家畜易误食而中毒。1963 年, 黄文魁等从其根中提得一酸性物质, 1977 年确定该物质是两分子柚皮素在 C-3 位的二聚物^[1]。这种 C-3/C-3' 双氢双黄酮是天然植物中较罕见的一种黄酮类化合物, 因而引起了植物化学界的关注。随后, 日本和我国学者先后从瑞香狼毒中分离出 8 种“狼毒素型”化合物, 但多限于化学成分的研究, 极少涉及毒性研究。本试验从瑞香狼毒中提取总黄酮并进行毒性试验, 旨在为进一步深入研究和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

瑞香狼毒 1992 年 8 月采集于陕西省旬邑县境内, 根经干燥, 粉碎后过 60 目筛备用。

1.2 总黄酮的提取分离

瑞香狼毒根粉 5 kg, 加 95% 乙醇 12 L, 室温浸提 21 d, 滤后回收溶剂, 得浸膏 531 g, 取约 400 g, 加无水乙醇 400 mL 溶解, 拌入适量硅藻土, 挥干乙醇, 于索氏提取器内用石油醚和二氯甲烷分别连续萃取 6 h, 凉干残渣, 重上索氏提取器, 用乙酸乙酯再连续提取 12 h, 减压回收溶剂, 得提取物 143 g, 按文献[2]方法测得总黄酮含量为 22.74%。

1.3 动物毒性试验

小白鼠 LD_{50} 测定 小白鼠 100 只, 昆明种, 雌雄各半, 平均体重 22.3 ± 1.9 g, 按综合计算法计算 LD_{50} ^[3]。

收稿日期: 1995-07-17

家兔急性毒性试验 土种成年家兔 28 只,雌雄兼有,平均体重 2.31 ± 0.28 kg,其中 6 只,按 75 mg/kg 剂量,耳静脉注射提取物,观察急性中毒症状,并描记心电图变化;4 只在麻醉状态下,按 25 mg/kg 剂量,耳静脉注射提取物,用二导生理仪记录和观察呼吸、血压的变化;12 只,随机分为试验组和对照组,每组 6 只。试验组按 700 mg/kg 剂量灌服提取物。试验前后心脏采血,测量血清谷丙转氨酶(GPT,赖氏法)、谷草转氨酶(GOT,赖氏法)、碱性磷酸酶(AKP,磷酸苯二钠法)活性和尿素氮含量(BUN,二乙酰二肟法)。试验期间死亡或 24 h 迫杀,观察剖检变化,并采集各脏器组织,常规处理,光镜观察组织病理学变化;6 只,按文献[4]中的方法进行皮肤原发刺激试验。

家兔离体肠道运动试验 按文献[4]的方法,用二导生理仪先描记正常活动曲线,再分别按 1.25×10^{-1} , 2.5×10^{-2} , 2.5×10^{-4} , 1.25×10^{-6} mg/mL 量加入提取物,记录不同浓度下肠的运动情况。

2 结果

2.1 灌胃小白鼠 LD_{50} 测定结果

$\log LD_{50} = 2.72$, 则 $LD_{50} = 524.81$ mg/kg, 其平均可信限 $FL = 524.81 \pm 142.39$ mg/kg。在测定过程中,试验鼠特别是高剂量组,表现精神高度沉郁,解检病变主要为肺瘀血,胃壁浆膜下有出血斑,胃粘膜广泛出血,内容物色红,肝、脾呈暗紫色。

2.2 家兔急性毒性试验结果

2.2.1 静脉注射 先表现精神沉郁,头伏于地,后则角弓反张,呼吸困难,痉挛抽搐,鸣叫,排粪,排尿,约 20 min 后死亡。心电图显示,注射后 3 min,心率减慢,节律不齐,偶见期前收缩,S-T_I降低,P 增宽,P-R 延长,各导程主波 R 振幅略增大;10 min 时,S-T_{I,II,III,avF}明显降低,S-T_{Vk,VI}抬高,同时各导联 S 加深,P 波消失;20 min 时,T_I亦消失;麻醉兔在试验后呼吸和脉搏减慢,脉压短暂增大,随后消失。

2.2.2 灌胃 试验组染毒后出现腹痛、腹泻症状,精神高度沉郁,体温下降,24 h 内死亡 1 只,死前呼吸困难。试验后,试验组与对照组比较,血清 GPT,GOT,AKP 活性差异不显著($P > 0.05$),而 BUN 含量显著升高($P < 0.01$)。

剖检变化 主要为心肌松软,心室心房扩张;肝脏色暗质软,切面有多量液体流出,胆囊充盈,胆汁暗绿色,肺广泛性轻度气肿,瘀血;肾脏色暗紫;胃粘膜有广泛性小米粒大小出血点;十二指肠粘膜呈树枝状瘀血。

病理组织学变化 心肌纤维严重颗粒变性,间质血管扩张,明显瘀血,出血。肝细胞颗粒变性,肝窦隙扩张,枯否氏细胞轻度增生。脾窦高度扩张,内含大量红细胞及少量炎性细胞,脾小体稀少,生发中心扩大;肺动、静脉和肺泡壁毛细血管极度扩张,出血,瘀血,肺泡间隔有较多嗜中性白细胞浸润,甚至形成淋巴小结,有的肺泡膈断裂,肺泡腔扩张,或萎缩;肾小管上皮细胞颗粒变性,近曲小管更为明显,肾小球毛细血管丛扩张、充血、肿胀,间质毛细血管高度扩张,明显瘀血;胃粘膜上皮脱落,组织结构松散,盐酸细胞减少;肠粘膜上皮严重脱落,固有层裸露,毛细血管扩张充血、出血,有多量炎性细胞浸润,粘膜下层腺体上皮细胞溶解,呈细网状和空泡样;淋巴窦扩张,内含多量炎性细胞,淋巴小结生发中心扩张,淋巴细胞增生;肾上腺髓质部血窦扩张瘀血,甚至出血;睾丸间质血管扩张,精曲

小管内精原细胞稀少,精子也很少见。其它组织器官均未见明显变化。

2.2.3 皮肤原发刺激试验结果 求得原发刺激指数为 2.89,属中等刺激物,72 h 时,真皮和皮下组织松散变厚,胶原纤维断裂,真皮与表皮间可见大量嗜酸性细胞浸润。

2.3 家兔离体肠道运动试验结果

在 1.25×10^{-2} , 2.5×10^{-2} , 2.5×10^{-4} mg/mL 浓度下,分别使肠运动在 2,4,15 min 时完全抑制,用台氏液反复冲洗后不易恢复,在 1.25×10^{-6} mg/mL 浓度下,25 min 时,肠运动尚未完全抑制。

3 讨 论

3.1 总黄酮的提取分离

黄酮类化合物多具酚羟基,可用碱性水浸出,也可按结构“相似者相溶”的原则,选醇类溶剂提取。在预试验时,曾用 5% 氢氧化钠溶液浸提^[1],但氢氧化钠浸提液相当粘稠,极难过滤,且氢氧化钠有引起狼毒素和异狼毒素间结构互变的潜在问题^[5],因此试验选用 95% 乙醇提取,收率为 10.62%。黄酮类与非黄酮类分离的经典方法有溶剂法和铅盐沉淀法,试验用溶剂法进行了分离,对醇浸膏曾直接采用两相溶剂简单萃取,浸膏难于分散,效率极差,后拌入惰性填充剂,于索氏提取器中连续萃取而达到了较好的分离效果。总黄酮含量达 22.72% 后,曾试用铅盐沉淀法以期提高黄酮含量,结果反而降低,说明铅盐沉淀法不宜用于“狼毒素型”黄酮类的分离。

3.2 总黄酮的毒性

对心肺的作用 当心肌发生严重损伤时,可使心肌收缩力减弱,甚至发生心力衰竭,导致包括心脏在内的各组织器官血管扩张、瘀血等。瑞香狼毒总黄酮可能具有这种病理作用过程。证据有:灌胃家兔心肌松软、心脏扩张、心肌纤维严重颗粒变性,麻醉家兔耳静脉注射后出现短暂的脉压增大,随后脉压消失,心电图显示急性心力衰竭。在左右心衰竭的情况下,肺静脉、右心房和体循环静脉压升高,出现肺和肝、肾、胃、肠道等腹腔脏器瘀血。肺瘀血,进而出现肺泡扩张或萎陷、间隔增宽,导致肺换气、通气功能障碍,临床表现呼吸性呼吸困难,各组织器官内继而缺氧,加剧了血管扩张、瘀血,甚至出血。体循环障碍又可促进心力衰竭过程。因此,瑞香狼毒总黄酮中毒时,心肺为主要的受害器官。

对肝、肾的作用 肝细胞受损或肝功能障碍时可引起血清中某些酶活性的改变。另外,肝脏是肌体内重要的解毒器官,体内氨的代谢主要去路是在肝脏中转变成尿素,通过血液运输至肾脏,随尿排出体外,肾排泄机能降低时,血液尿素氮含量升高。灌胃家兔的肝、肾细胞均发生颗粒变性,但 24 h 内血清 GPT, GOT, AKP 活性无变化,而 BUN 含量显著升高,说明对肝脏的损害较轻,而肾脏可能也是主要受害脏器之一。

对胃肠道的影响 灌胃动物出现腹痛、腹泻等症状,病理变化见胃肠道粘膜上皮脱落、粘膜下血管扩张、瘀血、甚至出血,并出现炎性细胞浸润,对家兔离体肠道运动表现抑制作用,说明瑞香狼毒总黄酮对胃肠道有直接刺激作用,且主要在于对胃肠道组织结构的破坏而使其出现功能异常。

3.3 关于瑞香狼毒的毒性

何成林(1986)报道^[6],马瑞香狼毒中毒时出现精神萎靡、头伏于地,腹痛,腹泻,排尿

困难等症状。此外,中毒时还表现腹胀、便血、呼吸迫促、心悸,全身痉挛,甚至死亡。这与本试验中小鼠和家兔的中毒症状、病理变化等基本相符,可见瑞香狼毒总黄酮中含有瑞香狼毒的主要有毒成分。

致谢:实验过程中得到崔中林教授、薛登民副教授、王秋芳副教授以及周乐和杨鸣琦讲师等的大力协助,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 黄文魁,张振杰.瑞香科狼毒中的双二氢黄酮——狼毒素(Chamaejasmine)的结构.科学通讯,1979(1):24~26
- 2 邢有权,孙志忠,马东升等.瑞香狼毒与大戟狼毒总黄酮成分比较研究.现代应用药学,1992,9(2):60~63
- 3 徐叔云,卞如廉,陈修等.药理实验方法学.北京:人民卫生出版社,1982
- 4 Frank C L C 著,吕伯钦,陈君石译.实验毒理学基础.北京:人民卫生出版社,1987,246~247,302~303
- 5 Niwa M,Otsuji S,Tatematsu H *et al.* Stereostructure of two biflanones from *Stellera chamaejasme* L. Chem Pharm Bull,1986,34(8):3249~3251
- 6 何成林.马狼毒中毒一例.青海畜牧兽医杂志,1986(1):44

Abstraction and Toxicity of Total-Flavonoid in *Stellera Chamaejasme* L

Song Xiaoping Cao Guangrong Li Shaojun

(Department of Veterinary Medicine, Northwestern Agricultural
University, Yangling, Shaanxi, 712100)

Abstract Total-flavonoid with flavonoid compound content of 22.72% was obtained from the roots of *S. chamaejasme* L. by means of ethanol extraction and solvent process. The total-flavonoid toxicity experiments indicated that the LD₅₀ in mice given orally was 524.81 mg/kg, rabbits poisoned by intravenous injection at dosage of 75 mg/kg showed the symptoms of opisthotonus, spasm, dyspnea, and heart failure in ECG; the anesthetized rabbits given by inter-venous injection at the dosage of 25 mg/kg showed the symptoms of reduced respiratory and pulse rate, transiently increased pulse pressure and then disappearance; rabbits given orally at the dosage of 700 mg/kg showed the symptoms of abdominal pain, diarrhea, and body temperature decline; the activities of serum GPT, GOT, AKP had no change, but concentration of BUN elevated significantly in 24 h; pathological finding characterised by intensive extravasation of viscera, gastroenteric hemorrhage, pneumonectasis and the granular degeneration of hepatocytes, epithelial cells of renal tubules and cardiac muscle, the automatic contraction of extracorporeal small intestine of rabbits could be inhibited, primary stimulative of skin was 2.89, belonging to a middle stimulant.

Key words *Stellera chamaejasme* L., total-flavonoid, mice, rabbit, toxicity