

文章编号: 1673-1689(2011)05-0788-05

中药巴豆经炮制与发酵后毒性效应的比较

潘 扬, 吴晓峰, 涂 霞, 蒋亚平

(南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210029)

摘 要: 通过观察巴豆的生种仁、灭菌种仁、生全果实、灭菌全果实及其巴豆壳、巴豆霜、巴豆灵芝菌和白僵菌发酵品(以下分别被称为“灵巴菌质”和“白巴菌质”)的急性毒性及致炎、溶血作用, 比较传统炮制法与固体发酵法对中药巴豆毒性效应的影响。小鼠一次或一日多次灌胃给药后, 半数致死剂量(LD₅₀)按由大到小顺序依次为: 灵巴菌质 1.541 g/kg, 白巴菌质 1.495 g/kg, 灭菌全果实 0.894 g/kg, 巴豆霜 0.787 g/kg, 灭菌种仁 0.728 g/kg, 生全果实 0.38 g/kg, 生种仁 0.308 g/kg; 巴豆壳属于低毒, 8 h 内二次给药的最大给药量为 12.5 g/kg。将醚提取物外涂于小鼠耳壳上, 生种仁、灭菌种仁、生全果实、灭菌全果实、巴豆霜具有明显的致小鼠耳壳肿胀(炎症)作用; 而巴豆壳、灵巴菌质和白巴菌质没有此作用。将生理盐水提取物作用于 2% 红细胞混悬液, 生种仁、生全果实具有明显的溶血作用, 灭菌种仁、灭菌全果实、巴豆霜、巴豆壳、灵巴菌质和白巴菌质则没有此作用。以上结果提示: 中药巴豆经炮制和发酵处理后均可使之毒性下降, 但发酵品毒性更低。

关键词: 巴豆; 巴豆霜; 灵巴菌质; 白巴菌质; 毒性

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Toxicological Comparison between Defatted Croton Seed Powder and Two Fermentation Products of Fructus Crotonis

PAN Yang, WU Xiao-feng, TU Xia, JIANG Ya-ping

(College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Abstract: In order to compare the toxic potency between processed and fermentation products of *Croton tiglium*, the acute oral toxicity, inflammation causing effect and hematoctolysis were observed among raw *Semen crotonis* (seed kernel), sterilized *Semen crotonis*, raw *Fructus crotonis* (whole fruit), sterilized *Fructus crotonis*, *Testa et pericarpium crotonis* (fruit shell and seed coat), *Semen crotonis pulveratum* (defatted croton seed powder) and the two fermentation products of *Fructus crotonis* solid-fermented by *Ganoderma lucidum* and *Beauveria bassiana* (called Lingba Junzhi and Baiba Junzhi in Chinese, respectively). After being administrated by *i. g.* once or many times one day, the order of the median lethal dose (LD₅₀) of mice was Lingba Junzhi as (1.541 g/kg), Baiba Junzhi (1.495 g/kg), sterilized whole fruit (0.894 g/kg), defatted croton seed powder (0.787 g/kg), sterilized seed kernel (0.728 g/kg), raw whole fruit (0.38 g/kg) and raw seed kernel (0.308 g/kg). While the fruit shell and seed coat was low-toxic

收稿日期: 2010-12-09

基金项目: 江苏省中医药局科技项目(LZ 09018); 2008 年青蓝工程项目。

* 通信作者: 潘扬(1964-), 男, 江苏扬州人, 理学博士, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药化学与生物技术方面的研究。Email: ypan@njutcm.edu.cn; y.pan2006@163.com

and its maximum dosage to infuse to mice was about 12.5 g/kg. When applying their ether extracts on the mouse ears, the raw seed kernel, sterilized seed kernel, raw whole fruit, sterilized whole fruit and defatted croton seed powder induced swelling (inflammation) of the mouse ears; but the fruit shell and seed coat, Lingba Junzhi and Baiba Junzhi. Adding their saline extracts to 2% rabbit erythrocyte suspension to investigate hemolysis *in vitro*, only the raw seed kernel and raw whole fruit caused obvious hemolysis; the sterilized seed kernel, sterilized whole fruit, defatted croton seed powder fruit shell and seed coat, Lingba Junzhi and Baiba Junzhi didn't. The experimental results have shown that the toxicity of the both processed and fermented *Croton tiglium* are lower than that of the original crude drug, and the fermentation products of *Fructus crotonis* exhibited a much lower toxicity.

Key words: *Croton tiglium*, defatted croton seed powder, Lingba Junzhi, Baiba Junzhi, toxicity

中药巴豆(俗称江子,刚子等)为大戟科乔木巴豆 *Croton tiglium* L. 的干燥成熟果实,有大毒,《神农本草经》列为下品,现被 2005 年版中国药典收载,具有“泻寒积”等功效,主要用于冷积凝滞、胸腹胀满急痛等症。因其药性峻烈,内服须炮制后入药^[1-2]。炮制巴豆分为制霜、炒、熬、煮、烧、炮、煨以及麸制、大麦制、面制、米制、酒制、醋制和油制等多种方法;而药典中巴豆仅有一种炮制品,即巴豆霜^[3-4]。巴豆制品有效剂量与中毒剂量比较接近,用之不当或服用过量还可能引起中毒甚至于有生命危险^[5-6]。

巴豆之毒性主要在于脂肪(巴豆油)和蛋白质(巴豆毒素)。其种仁含巴豆油 40%~60%,是剧烈的泻药;含巴豆毒素约 18%,能溶解红血球,使局部细胞坏死^[5-6]。由于遇热能使这两类毒性物质含量降低或变性失活,因此巴豆常用的炮制方法是取仁制熟(蒸、煮)后去油制霜^[7-8]。但传统炮制法操作较繁琐,含油量凭经验观察,各地结果差距很大,无法保证用药安全^[9],用之不当或服用过量,还可能引起中毒甚至于有生命危险^[10-11]。有鉴于此,有必要寻找新的解决这类问题更好的途径。

作为生物技术的发酵工程为毒性中药减毒开辟了一条崭新道路^[12],它对马钱子的“去毒存效”已取得了一定成效^[13]。作者运用灵芝菌 *Ganoderma lucidum* 和白僵菌 *Beauveria bassiana* 对巴豆进行固体发酵处理,形成“灵巴菌质”和“白巴菌质”,进而发现这两种发酵品的毒力明显下降,且低于传统炮制品——巴豆霜。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 动物与菌种 KM 种小鼠:SPF 级,雌雄各

半,18~22 g;新西兰白兔:普通级,雌雄均可,2 kg 以上,均由南京中医药大学实验动物中心提供;灵芝菌、白僵菌的菌种:由作者所在实验室分离、保藏,并传代复壮,经鉴定分别为多孔菌科真菌赤芝 *Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.) P. Karst. 和丛梗孢科真菌白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

1.1.2 药物与试剂 巴豆药材:2008 年采于云南省,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为大戟科植物 *Croton tiglium* L. 的种子;生种仁:取干燥的巴豆成熟果实,去果壳、种皮(毛重经计算约占全果实的 37.9%),取仁;灭菌种仁:即取上述生种仁,于 121℃ 高压灭菌 50 min;生全果实:取巴豆成熟果实,除去残枝落叶,日光下曝晒或烘干;灭菌全果实,取上述生全果实,于 121℃ 高压灭菌 50 min;种壳:即制备生种仁时的副产品——果壳和种皮;巴豆霜:按药典方法制备,从药房购得;灵巴菌质,巴豆全果实灵芝菌的发酵品;白巴菌质:巴豆全果实白僵菌的发酵品,二者均由作者所在实验室制备。按固体发酵的生产工艺进行操作^[14],将巴豆药材粉碎成粗粒(过 10 目筛),加约药材量 1.8 倍量水湿润, pH 自然,填装试管,混合均匀,扎口,121℃ 高压灭菌 50 min,冷却。从菌种斜面上切取绿豆粒大小的一块上述真菌菌丝体(带培养基),移入发酵基质的表面(使二者须有接触),扎口,置于培养箱中(27±2)℃ 恒温培养,发酵 30 d 后,取出,60℃ 下干燥 4~6 h,即得这两种巴豆发酵品——灵巴菌质和白巴菌质;巴豆油(croton oil):杭州中香化学有限公司生产。

1.1.3 仪器与设备 MP 12001 电子天平:上海市恒平科学仪器有限公司;MELLTER-AE 240 电子天平:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;9 mm

打孔器。

1.2 实验条件与试液配制

1.2.1 实验条件 给药前后,小鼠均雌雄分笼,温度 20~25℃、湿度 40%~70%,用全价颗粒饲料(由江宁青龙山动物繁殖场提供)喂养;家兔在普通环境下饲养,实验前禁食 12 h。

1.2.2 试液配制

1) 生种仁、灭菌种仁、生全果实、灭菌全果实的药液:分别取上述 4 种样品,在 60℃下干燥 4~5 h,先加工成粗粒,然后与不同比例的药用淀粉混合粉碎(或研匀),过 80 目筛,加 0.5% CMG-Na 水溶液配成混悬液。使用前剧烈振摇 1~2 min 使均匀。

2) 壳、霜、灵芝菌和白僵菌发酵品的药液:分别取上述 4 种样品,直接粉碎,过 80 目筛,余同上法制备。

3) 2% 巴豆油溶液:精密量取巴豆油 0.2 mL,加食用麻油配制成 10 mL,即得(密闭低温保存)。

4) 脂肪油的配制:分别称取上述 8 种样品 2 g,粉(研)碎成粗粉,过 20 目筛,置索氏提取器中,加乙醚 100 mL,水浴回流提取至脂肪油提尽(约 8 h),收集提取液,在水浴上低温挥去溶剂,加食用麻油匀兑配制成 40 mL;药渣挥尽残留溶剂,备用(提取蛋白质)。

5) 蛋白质的配制:分别称取上述 8 种样品的药渣 0.5 g,加入 10 mL 生理盐水研磨成浆,室温放置 24 h,离心,取上清液在 6 h 内供溶血实验用。

6) 2% 红细胞混悬液的制备:取新西兰白兔,清醒状态下静脉采血 50 mL,放入含玻璃珠的三角瓶中振摇 10 min,除去纤维蛋白原。加入生理盐水约 10 倍量,摇匀,于 1 000 r/min 下离心 15 min,除去上清液,沉淀的红细胞再用生理盐水按上述方法洗涤 2~3 次,至上清液不显红色为止。将所得红细胞 2 mL,用生理盐水配制成 100 mL 的混悬液(临试验时配制)。

1.3 口服急性毒性^[15]

上述 8 种样品分别进行实验。每个样品取小鼠 50 只,随机分为 5 组,每组 10 只,雌雄各半,以预试验结果选择适当的剂距。除巴豆壳外,其余各样品的剂距如下:生种仁为 1:0.75;灭菌种仁为 1:0.8;生全果实为 1:0.84;灭菌全果实为 1:0.84;巴豆霜为 1:0.75;灵芝菌质为 1:0.8;白巴菌质为 1:0.8。实验前小鼠禁食(不禁水) 12 h 后,以每 10 克用 0.25 mL 容量灌胃给予不同浓度的药物,观察并记录给药后 14 d 内动物精神活动、饮食、饮水、毛色、二便及死亡等情况,死亡动物及

时进行尸检, Bliss 法[LD₅₀ CALC 2.0 版软件]统计半数致死量(LD₅₀);并按下式计算各样品相对于生种仁的毒性下降率(%)。

$$\text{毒性下降率}/\% = \frac{\text{样品 LD}_{50} - \text{生种仁 LD}_{50}}{\text{生种仁 LD}_{50}} \times 100\%$$

巴豆壳由于受试药物的浓度或体积限制,无法测出 LD₅₀。因此,取小鼠 20 只,雌雄各半,以允许的最大剂量(0.25 mg/mL 给药浓度及 0.25 mL/10 g 给药容量)在 8 h 内分二次给药,连续 14 d 观察动物出现的反应。

1.4 致小鼠耳壳肿胀(炎症)作用

取小鼠 100 只,随机分为 10 组,每组 10 只,雌雄兼用,分组情况如下:食用麻油(空白对照);2% 巴豆油(阳性对照);生种仁(醚提取物,含量按生药计 5%);灭菌种仁(醚提取物,含量按生药计 5%);生全果实(醚提取物,含量按生药计 5%);灭菌全果实(醚提取物,含量按生药计 5%);巴豆壳(醚提取物,含量按生药计 5%);巴豆霜(醚提取物,含量按生药计 5%);灵芝菌质(醚提取物,含量按生药计 5%);白巴菌质(醚提取物,含量按生药计 5%),取上述药液 0.1 mL 涂于小鼠右耳前后两面,在致炎 4 h 后颈椎脱臼处死小鼠,自耳廓剪下左、右两耳,用锋利的打孔器(直径 9 mm)分别在同一部位取下圆形耳片,称质量,计算耳壳肿胀[(右耳片质量-左耳片质量)mg],并按下式得出耳壳肿胀率(%)。

$$\text{耳壳肿胀率}/\% = \frac{\text{右耳片质量} - \text{左耳片质量}}{\text{左耳片质量}} \times 100\%$$

耳壳肿胀度的数据以($\bar{X} \pm s$)表示,统计软件采用 SPSS 13.0 for Windows,组间比较按单因素方程 LSD 法进行分析^[16]。

1.5 对兔红细胞的溶血

取新鲜配制的 2% 兔红细胞混悬液 2.5 mL 置洁净试管内,分别加入下列样品液 2.5 mL:生理盐水(空白对照);蒸馏水(阳性对照);生种仁(生理盐水提取物,含量按生药计 5%);灭菌种仁(生理盐水提取物,含量按生药计 5%);生全果实(生理盐水提取物,含量按生药计 5%);灭菌全果实(生理盐水提取物,含量按生药计 5%);巴豆壳(生理盐水提取物,含量按生药计 5%);巴豆霜(生理盐水提取物,含量按生药计 5%);灵芝菌质(生理盐水提取物,含量按生药计 5%);白巴菌质(生理盐水提取物,含量按生药计 5%),并分别以生理盐水 2.5 mL 加入等量的样品液作为对照管,混匀后,立即置(37±0.5)℃的恒温水浴中进行静置孵育。第 1 小时内每隔 20 分钟观察 1 次(溶血和凝聚反应);

1 h 后, 每隔 1 h 观察 1 次, 连续观察 3 h。若溶液呈澄明红色, 管底无细胞残留或有少量细胞残留, 表明有溶血发生; 如细胞全部下沉, 上清液无色澄明, 表明无溶血发生; 若溶液中有红色或红棕色絮状沉淀, 振摇后不分散, 表明有红细胞凝集发生^[17]。

2 结果与讨论

2.1 急性毒性比较

小鼠灌服生种仁、灭菌种仁、生全果实、灭菌全果实及其巴豆壳、巴豆霜、灵巴菌质和白巴菌质后, 均出现不同程度的中毒现象, 表现为不思饮食、活动减少、行动迟缓, 重者躺卧不起直至死亡, 个别小鼠死前发生抽搐、痉挛。死亡时间一般发生在 30 min 后, 大部分动物在实验当日即死亡, 极少数在 3 d 后才死亡; 有的尾部、后腿部呈现肿胀、发紫(疑为脉管炎症)症状。死亡动物经解剖后可见消化器官(特别是大、小肠)充血肿胀、甚至糜烂、穿孔。未死亡动物尚出现倦怠、毛蓬松、腹泻现象, 大部分小鼠在 24 h 内活动、食量及精神状态逐渐恢复正常, 7 d 后未死亡动物均可存活。与巴豆生种仁(LD₅₀ 为 0.308 g/kg)相比, 巴豆霜的毒性下降率为 155.5%; 而灵巴菌质和白巴菌质的分别为 400.3%、385.4%, 毒性更低, 见表 1。

表 1 巴豆经炮制和发酵后小鼠急性毒性
Tab. 1 Acute toxicity of the processed and fermentation products of *Croton tiglium* on mice

组别	LD ₅₀ / (g/kg)	95% 可信限/ (g/kg)	毒性下降 率/%
生种仁	0.308	0.262~ 0.362	-
灭菌种仁	0.728	0.6~ 0.884	136.4
生全果实	0.38	0.335~ 0.431	23.4
灭菌全果实	0.894	0.798~ 1.002	190.3
巴豆壳	12.5*	-	> 3 958
巴豆霜	0.787	0.642~ 0.964	155.5
灵巴菌质	1.541	1.333~ 1.782	400.3
白巴菌质	1.495	1.303~ 1.715	385.4

注: * 为最大给药量

2.2 致炎作用比较

同 2% 巴豆油(阳性对照)一样, 生种仁、灭菌种仁、生全果实、灭菌全果实、巴豆霜(醚提取物)可引起小鼠被涂右耳明显肿胀, 使两侧耳壳质量差增大(炎症反应), 所致耳壳肿胀度(mg)与空白对照相比具有极显著性差异($P < 0.01$); 但生全果实、灭菌全果实和巴豆霜的致肿胀作用有所减弱, 不如阳性

对照($P < 0.05$)。而巴豆壳、灵巴菌质和白巴菌质没有致耳壳肿胀(炎)作用, 见表 2。

表 2 巴豆经炮制和发酵后致小鼠耳壳肿胀作用
Tab. 2 Ear edema induced effect of the processed and fermentation products of *Croton tiglium* in mice

组别	动物 数/ n	耳壳肿 胀度/ mg	肿胀 率/%
芝麻油	10	- 0.05±4.44	2
巴豆油	10	17.36±6.55**	81.3
生种仁	10	12.59±5.93**	65.3
灭菌种仁	10	12.44±4.55**	65.1
生全果实	10	10.36±6.23** #	61.1
灭菌全果实	10	8.88±7.8** #	50.3
巴豆壳	10	1±5.22# #	5.5
巴豆霜	10	9.29±6.41** #	47.6
灵巴菌质	10	3.4±5.52# #	17
白巴菌质	10	2.33±7.01# #	14.2

注: 与空白对照相比, ** $P < 0.01$; 与阳性对照相比, # $P < 0.05$, # # $P < 0.01$ 。

2.3 溶血效应比较

同蒸馏水(阳性对照)一样, 生种仁、生全果实(生理盐水提取物)可导致兔红细胞明显破裂、溶解(溶血反应); 而灭菌种仁、灭菌全果实、巴豆霜、巴豆壳、灵巴菌质和白巴菌质则没有溶血作用, 见表 3。

表 3 巴豆经炮制和发酵后体外溶血效应
Tab. 3 Effect of hemolysis in vitro of the processed and fermentation products of *Croton tiglium*

组别	2% 红细 胞/ mL	加样 量/ mL	溶血 时间/ min
生理盐水	2.5	2.5	-
蒸馏水	2.5	2.5	40
生种仁	2.5	2.5	60
灭菌种仁	2.5	2.5	-
生全果实	2.5	2.5	60
灭菌全果实	2.5	2.5	-
巴豆壳	2.5	2.5	-
巴豆霜	2.5	2.5	-
灵巴菌质	2.5	2.5	-
白巴菌质	2.5	2.5	-

3 结 语

中药巴豆适用范围主要是“急腹症”类的顽症,

治则“以通为用”。传统中医认为巴豆:“有斩关夺门之功”,性迅猛药效专著,广泛应用于临床各科^[18]。但因其大毒,临床安全性问题一直倍受关注。

本试验结果证明,巴豆的炮制品巴豆霜的口服急性毒性下降率为 155.5%,而发酵品灵巴菌质和白巴菌质的分别为 400.3%、385.4%,后两者毒性

更低;巴豆霜具有致炎作用而没有溶血现象,而灵巴菌质和白巴菌质既不致炎也不致溶血。提示中药巴豆经炮制和发酵处理后均可使之毒性下降,但发酵的减毒效果更佳。作为生物技术的发酵工程绿色环保、专属性强、条件温和,必定将为有毒中药巴豆的减毒提供新的思路和方法。

参考文献(References):

- [1] 国家中医药管理局. 中华本草(精选本). 上册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998: 938- 949.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 54- 55.
- [3] 沈明谦. 巴豆炮制的历史沿革[J]. 甘肃中医学院学报, 1998, 15 (4): 56- 58.
SHEN Ming-qian. The history of *Fructus crotonis* processing[J]. **J Gansu College Traditional Chinese Medicine**, 1998, 15 (4): 56- 58. (in Chinese)
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 55.
- [5] 夏丽英. 现代中药毒理学[M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 2005: 204.
- [6] 江苏新医学院. 中药大辞典上册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977: 503.
- [7] 徐楚江, 叶定江. 中药炮制学(供中药专业用)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 176.
- [8] 张静修, 王毅. 生、熟巴豆对比实验[J]. 中药材, 1992, 15 (9): 29- 30.
ZHANG Jing-xiu, WANG Yi. Comparison of between crude croton seed kernel and processed one[J]. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, 1992, 15 (9): 29- 30. (in Chinese)
- [9] 天津市药材公司中药研究室. 巴豆霜制法的研究[J]. 中草药通讯, 1974, (3): 27.
Pharmaceutical Research Institute of Tianjin Traditional Chinese Medicine Company. Study on preparation of defatted croton seed powder[J]. **China Traditional Herbal Drugs**, 1974, (3): 27. (in Chinese)
- [10] 时霄霄. 巴豆过敏性休克 1 例[J]. 中国中药杂志, 1994, 19 (9): 569.
SHI Xiao-xiao. One case of hypersensitive shock caused by croton seed[J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 1994, 19 (9): 569. (in Chinese)
- [11] 孙云成. 腹腔注入巴豆冰片液致死 1 例[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 1994, (2): 4.
SUN Yun-cheng. One case died of intra-peritoneal injection of mixed solution made from croton seed and borneol[J]. **Journal of Baihua University: Nat Sci**, 1994, (2): 4. (in Chinese)
- [12] 涂霞, 潘扬. 双向发酵——毒性中药炮制减毒的新途径[J]. 菌物研究, 2010, 8 (1): 52- 56.
TU Xia, PAN Yang. The bi-directional fermentation technology, a new approach to attenuate the toxicity of toxic Chinese materia medica[J]. **Journal of Fungal Research**, 2010, 8 (1): 52- 56. (in Chinese)
- [13] 陈龙, 施铮, 曹亮, 等. 六种真菌发酵对马钱子“降毒保效”作用的初步研究[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29 (3): 476- 480.
CHEN Long, SHI Zheng, CAO Liang, et al. Pilot study on effects of Semen strychni fermented by six different fungi on toxicity, analgesia and anti-Inflammation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29 (3): 476- 480. (in Chinese)
- [14] 徐锦堂. 中国药用真菌学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997: 230- 232.
- [15] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学(第 2 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 700- 701.
- [16] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学(第 2 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 719.
- [17] 国家药典委员会. 中国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 118.
- [18] 李庆铎. 巴豆临床应用综述[J]. 甘肃中医, 1991, (4): 43- 46.
LI Qing-duo. A review of clinical application of *Fructus crotonis*[J]. **Gansu Journal of Traditional Chinese Medicine**, 1991, (4): 43- 46. (in Chinese)