

天南星科有毒中药毒针晶的组成成分分析^{*}

葛秀允^{1,2}, 吴皓^{1*}

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210029; 2. 山东省中医药研究院, 济南 250014)

摘要 目的: 对天南星科有毒中药半夏、天南星、禹白附及虎掌南星毒针晶的组成成分进行定性分析并进行含量测定。方法: 采用化学鉴别方法检测毒针晶中的组成成分, 滴定法测定毒针晶中草酸钙的含量, 全自动凯氏定氮仪测定毒针晶中蛋白质的含量, 蒽酮-硫酸法测定毒针晶中多糖含量。结果: 半夏、天南星、禹白附及虎掌南星毒针晶主要由草酸钙、蛋白、多糖组成; 上述4种中药毒针晶中的草酸钙含量分别为86.73%, 90.26%, 89.61%, 84.58%; 蛋白含量分别为6.084%, 2.159%, 3.282%, 9.262%; 糖含量分别为0.280%, 0.524%, 0.503%, 0.540%。结论: 天南星科有毒药材的毒针晶主要由草酸钙和蛋白组成, 并含有微量的多糖。

关键词: 天南星科; 毒针晶; 组成分析; 含量测定

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2010)02-0190-04

Analysis of the composition of poisonous raphides in Araceae plant^{*}

GE Xiu-Yun^{1,2}, WU Hao^{1*}

(1. College of Pharmacy Nanjing University of Chinese Traditional Medicine Nanjing 210029 China

2 Shandong Academy of Traditional Chinese Medicine Jinan 250014 China)

Abstract Objective To analyze the composition of poisonous raphides in *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit, *Arisaema amurense* Maxim., *Typhonium giganteum* Engl and *Pinellia pedatisecta* Schott, which all belong to Araceae family and determine their contents. **Methods** Components were identified through chemical reaction. Its polysaccharides were determined by colorimetry of anthrone-sulfuric acid method, proteins were measured with Kjeldahl analyzer, and calcium oxalate was determined by titrimetric method in contents. **Results** The poisonous raphides were composed of calcium oxalate, polysaccharides and proteins. In poisonous raphides from the tubers of *P. ternata*, *A. amurense*, *T. giganteum* and *P. pedatisecta*, polysaccharides contents were 0.280%, 0.524%, 0.503% and 0.540%; proteins contents were 6.084%, 2.159%, 3.282% and 9.262%; and calcium oxalate contents were 86.73%, 90.26%, 89.61% and 84.58%, respectively. **Conclusions** The poisonous raphides in tubers of these Araceae plants are mainly composed of calcium oxalate and proteins and also contain microamount of polysaccharides.

Key words Araceae; poisonous raphides; composition analysis; assay

半夏、天南星、禹白附及虎掌南星均来源于天南星科 (Araceae), 是常用的有毒中药, 临床用药均需采用复制法进行炮制减毒。本课题组的前期研究表明, 4种有毒中药中含有的具有特殊晶体结构的草酸钙针晶是其主要的刺激性毒性成分, 对家兔眼结膜可产生强烈的刺激性毒性, 导致眼睑外翻, 重度水肿起泡, 分泌物增加等炎症反应, 被称之为“毒针晶”^[1-3], 一般观念认为该类植物中的针晶仅有草酸

钙组成, 而本课题组发现天南星科有毒植物中的针晶细长尖锐并具有韧性, 可弯曲达到 90°, 粉碎后不能断裂^[2]。毒针晶是否仅由草酸钙组成还是还含有其他成分则未见报道。本文就天南星科有毒药材毒针晶的组成成分进行了分析。

1 仪器、材料及试剂

TU-1800S紫外-可见分光光度仪 (北京普析通用仪器有限责任公司), TDL-5型离心机 (上海

* 国家十一五支撑计划, 编号 2006BA109B06-10 国家自然科学基金项目: 30772785 30973939

** 通讯作者 Tel (025) 86798163 Fax (025) 86798230 E-mail whao5795@vip.sina.com

安亭科学仪器厂), 101A-1B型电子鼓风干燥箱(上海实验仪器厂), B-324型全自动凯氏定氮仪(瑞典Buchi公司生产), K-437消化炉, K-371进样器, K-370蒸馏仪及排废装置, 样品磨, 电子天平(准确至0.0001 g)。

半夏购自江苏省泰州市, 东北天南星采自江苏省镇江市宝华山, 禹白附购自河南省禹州市, 虎掌南星采自江苏省南京市清凉山。以上药材经南京中医药大学王春根教授分别鉴定为天南星科植物: 三叶半夏 *P. ternata* (Thunb.) Breit、东北天南星 *A. amurensis* Maxim. 独角莲 *T. giganteum* Engl、虎掌南星 *P. pedatisecta* Schott 的块茎。

蒽酮(国药集团化学试剂有限公司)、硫酸(南京化学试剂有限公司)、葡萄糖(中国医药集团上海化学试剂公司)、镁粉(南京化学试剂有限公司)、间苯二酚(南京化学试剂一厂)、一水草酸钙(南京化学试剂有限公司)、钙黄绿素(国药集团化学试剂有限公司)均为分析纯。

混合催化剂: 称取无水硫酸铜(南京化学试剂有限公司, 分析纯)0.4 g与硫酸钠(南京化学试剂有限公司, 分析纯)6 g磨碎混匀, 即得; 40%氢氧化钠溶液: 取氢氧化钠(南京化学试剂有限公司, 分析纯)40 g溶于60 mL水中, 即得; 30%的氢氧化钠溶液: 取氢氧化钠(南京化学试剂有限公司, 分析纯)30 g溶于70 mL水中, 即得; 氢氧化钾试液: 取氢氧化钾(南京化学试剂有限公司, 分析纯)6.5 g加水溶解成100 mL, 即得; 稀盐酸: 取盐酸(上海中试化工总公司, 分析纯)234 mL加水稀释至1000 mL, 即得。1%的硫酸铜溶液: 取硫酸铜(南京化学试剂有限公司, 分析纯)1 g加水溶解成100 mL, 即得; 2%硼酸溶液: 取硼酸(南京化学试剂有限公司, 分析纯)2 g加水溶解至100 mL, 即得; 0.02116 mol·L⁻¹盐酸标准溶液(购自江苏省药检所, 批号20080304); 0.05 mol·L⁻¹EDTA滴定液(购自江苏省药品检验所, 批号20080401); 0.05 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液(购自江苏省药品检验所, 批号20080206); 甲基红指示剂: 取甲基红(南京化学试剂有限公司, 指示剂)0.1 g加0.05 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液5.3 mL使溶解, 再加水稀释至100 mL, 即得; 硫酸铵溶液: 取硫酸铵(南京化学试剂有限公司, 分析纯)2.00 g加水定容至1000 mL, 即得; 6.86和4.00 pH校正溶液(上海雷磁·创益仪器仪表有限公司); 亚铁氰化钾试液: 取亚铁氰化钾(南京化学试剂有限公司, 分析纯)1 g加水溶解成20

mL, 即得; 氯化铵试液: 取氯化铵(南京化学试剂有限公司, 分析纯)10.5 g加水溶解成100 mL, 即得。

其他试剂均为分析纯, 水系蒸馏水。

2 毒针晶的提取

分别取半夏、天南星、禹白附及虎掌南星生品粉末100 g(80目), 加水200 mL研磨混悬后, 按低速分级离心法, 离心速度从500 r·min⁻¹逐级上升到1200 r·min⁻¹, 离心6~8次, 每次5~10 min, 收集离心液和沉淀, 滤过, 以水洗涤数次, 分离得针晶和不含针晶的沉淀粉末, 真空干燥。分离得到的纯针晶呈灰白色粉末, 极细。

镜检: 取从各药材提取出的毒针晶粉末适量, 置载玻片, 滴加1~2滴水, 以细玻棒混匀, 盖上盖玻片, 放置于显微镜下观察并拍照, 结果见图1-A、B、C、D。

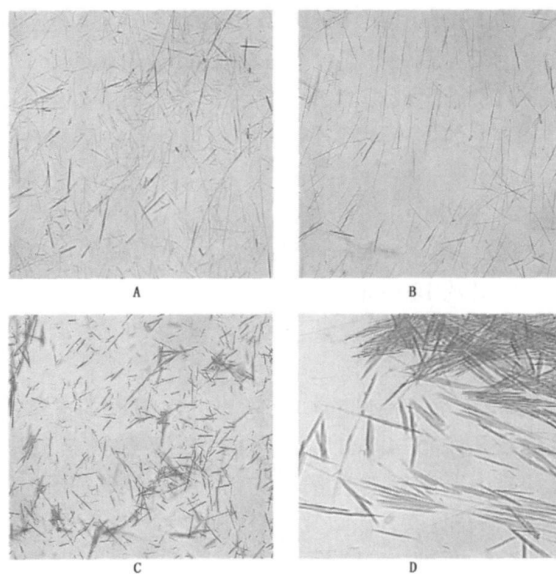


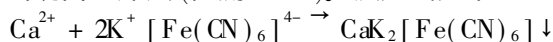
图1 从半夏(A)、东北天南星(B)、禹白附(C)、虎掌南星(D)提取的毒针晶(×400)

Fig 1 Microphotograph of four Araceae medicinal material rhizomes (×400)

3 毒针晶的组成分析

3.1 草酸钙定性鉴别

将“2”项提取得到的毒针晶真空干燥后, 得灰色偏白的粉末, 取该粉末5 mg加盐酸1 mL使其溶解, 再加亚铁氰化钾试液1 mL及氯化铵试液5 mL, 出现白色浑浊(检测Ca²⁺)。反应式如下:



仍取上述粉末5 mg加入盐酸1 mL使溶解, 再加3%硫酸2滴, 镁粉10 mg然后加入间苯二酚颗粒约10 mg振摇使溶解, 冷却后沿管壁加入浓硫酸

5 mL, 顷刻在界面处出现兰色环 (检测为 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$)。

3.2 蛋白质定性鉴别 取“2”项提取的各药材针晶 5 mg 加水 1 mL, 分别加入 40% 氢氧化钠溶液 2 滴, 摇匀, 滴加 1% 硫酸铜溶液 1~2 滴, 摇匀, 显示紫色, 呈阳性反应, 表明毒针晶中含有蛋白类物质。

3.3 糖的定性鉴别 取“2”项提取的毒针晶粉末 5 mg 加水 1 mL, 加 5% α -萘酚乙醇液 1~3 滴, 摇匀后沿试管壁缓缓加入浓硫酸 5 mL, 两液面之间产生紫色环, 表明毒针晶中含有糖类成分。

4 各药材毒针晶中的组成成分含量测定

4.1 草酸钙的含量测定^[4]

4.1.1 测定方法 精密称取 4 种有毒中药毒针晶各约 100 mg 置锥形瓶中, 加稀盐酸 10 mL, 加热使溶解, 加水 100 mL 与甲基红指示剂 1 滴, 滴加氢氧化钾试液至乳白色, 再继续多加 5 mL, 加钙黄绿素指示剂 1 mg 用 EDTA ($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 滴定至溶液黄绿色荧光消失并显橙色。每 1 mL $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EDTA 滴定液相当于草酸钙 5.297 mg 根据消耗的 EDTA 的体积计算各有毒中药毒针晶中草酸钙的含量。

4.1.2 结果

4.1.2.1 精密度试验 取同一批次提取的虎掌南星毒针晶约 100 mg 依照“4.1.1”项下方法, 测定 5 次, 计算草酸钙的含量, 平均含量为 84.69%, RSD 为 0.87%。

4.1.2.2 重复性试验 取同一批次提取的虎掌南星毒针晶按照“4.1.1”项下的方法, 平行测定 5 份, 毒针晶中草酸钙的含量平均值为 84.58%, RSD 为 2.4%。表明该方法重复性良好。

4.1.2.3 回收率试验 精密称取虎掌南星毒针晶约 60 mg 共 5 份, 分别加入基准一水草酸钙约 50 mg 按“4.1.1”项下方法操作, 结果平均回收率 ($n=5$) 为 99.70%, RSD 为 1.9%。

4.1.2.4 草酸钙的含量测定结果 精密称取半夏、天南星、禹白附及虎掌南星的毒针晶各约 100 mg 每个样品平均测定 5 次。结果半夏、虎掌南星、东北天南星及禹白附毒针晶中草酸钙的平均含量分别为: 86.73%, 84.58%, 89.61%, 90.26%; RSD 分别为: 2.4%, 1.9%, 2.1%, 2.2%。结果表明毒针晶并非仅由草酸钙组成, 半夏毒针晶和虎掌南星毒针晶中草酸钙含量相对较低, 分别为 86.73% 和 84.58%。

4.2 蛋白质类成分的含量测定^[5]

4.2.1 样品处理 称取半夏、虎掌南星、东北天南星和禹白附毒针晶各约 200 mg 于消化管中, 加入混合催化剂 3~4 g 混匀, 加入硫酸 10 mL。将消化管置消化炉上, 先在 150~200 °C 下加热 0.5 h 继续升温到 600 °C, 再消化 1.5~2 h 直至溶液呈清亮透明。待溶液冷却后, 可用自动定氮仪进行蒸馏滴定。

4.2.2 样品测定方法 检查仪器及设定参数, 检查各容器中溶液是否足够 (盐酸标准溶液、30% 氢氧化钠溶液、2% 硼酸溶液、水), 打开冷凝水管, 开启电源开关, 预热 30 min 后, 进行 pH 校正。分别用 pH 为 6.86 和 4.00 的 2 种 pH 校正溶液标定电极, 待显示校正值 Slope 95%~105% 以及 Zero Point pH 6.5~7.2 即可进入起步阶段, 进行仪器的初启动 (可进行 1~3 次, 着重在于检查仪器是否稳定)。设定空白溶液 (不加对照品和样品溶液, 其他操作同对照品和样品溶液)、硫酸铵溶液 ($2.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 及待测样品的参数 (重量、方法、组数、编号等), 设定好后进行空白溶液及硫酸铵溶液的测定, 待硫酸铵溶液校正值为 (21.19 ± 0.2)%, 进入样品检测。即放入已消化好的样品, 就可自动蒸馏、滴定。并可根据仪器给出的标准盐酸溶液消耗量进行计算。

4.2.3 结果

4.2.3.1 精密度试验 取浓度为 $2.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的分析纯硫酸铵溶液 (氮含量实际值为 $0.42 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 10 mL 添加于消化管中, 按“4.2.1”和“4.2.2”项下方法处理样品并测定, 分别测定 7 次, 计算测定值的 RSD 为 1.6%。

4.2.3.2 重复性试验 取同一批次提取的虎掌南星毒针晶按照“4.2.2”项下的方法, 平行测定 5 份, 毒针晶中总蛋白质的含量平均值为 9.262%, RSD 为 2.7%。表明该方法重复性良好。

4.2.3.3 回收率的测定 精密称取虎掌南星毒针晶约 100 mg 分别添加浓度为 $2.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸铵溶液 (氮含量实际值为 $0.42 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 5 mL, 按“4.2.1”方法测定, 回收率分别为 100.1%, 99.8%, 99.4%, 100.3%, 99.8%; RSD 为 0.35%。

4.2.3.4 样品测定结果 用 Buchi B-324 全自动凯氏定氮仪分别测定半夏、东北天南星、禹白附及虎掌南星毒针晶 4 个样品中总蛋白质的含量, 每个样品平行测定 5 次, 取平均值, 4 种有毒中药毒针晶中总蛋白的平均含量分别为: 6.084%, 9.262%,

3.282%, 2.159%; RSD 分别为: 1.8%, 0.94%, 1.6%, 1.4%。结果表明 4 种药材毒针晶中含有蛋白类成分, 以虎掌南星和半夏生品中的含量较高。

4.3 糖类成分的含量测定^[6]

4.3.1 线性关系考察 精密称取干燥至恒重的葡萄糖对照品 11.44 mg 置 100 mL 量瓶中, 以水定容至刻度, 配成 $0.1144 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液。精密吸取储备液 1, 2, 3, 4, 5 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 以水定容至刻度, 得到系列对照品溶液。精密吸取上述系列对照品溶液 1 mL, 置于 10 mL 具塞试管中, 冰浴 5 min, 加入 0.2% 蒽酮-硫酸溶液 4 mL, 立即置于沸水浴加热 15 min, 取出用冷水冷却至室温, 静置 10 min 左右, 于 580 nm 处测定吸收度。另精密吸取水 1 mL, 同法操作, 作空白对照。以吸收度 Y 对葡萄糖的浓度 X 回归, 得回归方程:

$$Y = 0.0961X + 0.0451 \quad r = 0.9964$$

表明葡萄糖浓度在 $2.288 \sim 11.44 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与吸收度呈良好的线性关系

4.3.2 精密度试验 平行称取同一批次的虎掌南星毒针晶样品 5 份, 各约 4 mg 加水 1 mL, 分别置于 10 mL 具塞试管中, 按照“4.3.1”项下方法测定吸收度, 根据吸收度计算其多糖含量。结果表明毒针晶中多糖的含量为 0.540%, RSD 为 2.2% ($n = 5$)。

4.3.3 重复性试验 取同批次提取的虎掌南星毒针晶样品 5 mg 按“4.3.1”项下方法平行制备供试品溶液 5 份, 分别测定草酸钙针晶中多糖的含量。结果平均含量为 0.538%, RSD 为 3.3%, 表明该方法重复性好。

4.3.4 稳定性试验 取虎掌南星毒针晶样品 4 mg 按“4.3.1”项下的方法制备溶液, 于室温自然光下放置 3 h 每隔 0.5 h 测定 1 次, 结果表明在 3 h 内吸收度略有下降, RSD 为 0.64%, 其中吸收度在 0.5 h 内几乎不变。

4.3.5 回收率测定 根据“4.3.4”项下的结果计算, 得到虎掌南星毒针晶样品中多糖的含量为 0.540%。精密称取虎掌南星毒针晶约 2 mg 精确加入葡萄糖溶液 ($0.1144 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.5 mL, 按照“4.3.1”项下方法测定吸收度, 计算回收率, 平均回收率为 99.9%, RSD 为 1.8%。

4.3.6 样品含量的测定 精密称取半夏、东北天南星、禹白附及虎掌南星的毒针晶各约 5 mg 分别置于 10 mL 具塞试管中, 按照“4.3.1”项下方法测定

吸收度, 用回归方程计算各样品中多糖的平均含量, 半夏、虎掌南星、东北天南星和禹白附毒针晶中糖类成分的含量分别为: 0.280%, 0.540%, 0.524%, 0.503%; RSD 分别为: 1.2%, 0.48%, 1.1%, 0.97%。结果表明 4 种毒性药材的毒针晶中含有少量的糖类成分。

5 讨论与结论

5.1 研究表明, 4 种天南星科有毒药材中毒针晶并不全部由草酸钙组成, 除草酸钙外还含有蛋白和糖类成分, 其中半夏、虎掌南星针晶中的蛋白含量相对较高, 分别为 6.084% 和 9.262%; 而草酸钙含量较低, 分别为 86.73% 和 84.58%。研究中曾发现 4 种药材的毒针晶以半夏、虎掌南星的毒针晶柔韧性较强, 毒针晶可弯曲不易折断, 可能与其中的蛋白含量较高有关。

5.2 4 种药材中含有微量的多糖类成分, 这类多糖类成分是连接在蛋白上形成糖蛋白, 还是单独的多糖, 有待进一步研究。

5.3 针晶中的蛋白类成分是否对针晶的毒性起到贡献作用, 本课题组正在进行进一步实验。

参考文献

- 1 WU Hao(吴皓), LIW ei(李伟), HAN Hong-tao(韩洪滔), *et al*. Studies on stimulating components of raw Pinellia temata (Thunb.) (Banxia) (半夏刺激性成分的研究). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24(12): 725
- 2 WU Hao(吴皓), ZHONG Ling-yun(钟凌云). Study on irritation of calcium oxalate crystal in Araceae plants (天南星科有毒中药刺激性作用比较研究). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2008, 33(4): 380
- 3 ZHU Tao(朱涛), WU Hao(吴皓), ZHANG Lin(张琳), *et al*. A study on irritant toxicity of Rhizoma Typhonii(禹白附的刺激性毒性成分的初步研究). *J Nanjing TCM Univ* (南京中医药大学学报), 2008, 24(2): 97
- 4 ChP (中国药典). 2005. Vol I (一部): 63
- 5 WANG Kai-hong(王开红), ZHOU Li-rong(周黎榕), FU Hong-yi(傅弘毅). Determination of protein in foodstuffs by using block digestion and Kjeldahl auto analyzer(采用模块式消化、全自动凯氏定氮仪测定食品中蛋白质). *Fujian Instrum Anal* (福建分析测试), 2004, 13(2): 1949
- 6 WENG Xue-cheng(翁雪成), YUAN Hong(袁红). The content of dissolvable polysaccharides in Lychee Seed by colorimetry of anthrone-sulfuric acid method(蒽酮-硫酸法测定荔枝核中可溶性多糖含量). *J Hangzhou Teach Coll (Med Ed)* (杭州师范学院学报医学版), 2007, 27(2): 107

(本文于 2009 年 6 月 14 日修改回)