

黑果枸杞红色素毒理学安全性评价

赵晓辉, 陶燕铎, 邵 贇, 梅丽娟*

(中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008)

摘要:目的 对黑果枸杞红色素毒理学安全性进行评价。方法 清洁级昆明种小鼠、SD大鼠以黑果枸杞红色素各按最大耐受量(MTD)等体积灌胃,记录中毒表现及死亡情况;采用平板掺入法,分加与不加S-9混合液两种,选清洁级昆明种小鼠,取胸骨骨髓制片,检查骨髓嗜多染红细胞微核发生率;选雄性小鼠,取附睾制片,查小鼠精子畸形率;90 d喂养实验,观察生长发育、食物利用率、血液学检查、生化检查和组织病理检测。结果 雌雄性小、大鼠均未见明显的中毒症状及死亡;在加与不加S-9的情况下,均未呈现致突变作用;小鼠微核实验、小鼠精子畸形实验均呈阴性;90 d喂养大鼠,全部存活,且发育良好,选定各指标均未见异常。结论 黑果枸杞红色素对两种性别的大、小鼠的MTD均大于30 000 mg/(kg·bw),说明该产品属实际无毒物;三项致突变实验结果阴性;大鼠90 d喂养实验各项指标均无明显异常。

关键词:黑果枸杞红色素; 安全性评价

DOI标识: doi 10.3969/j.issn.1008-0805.2011.02.049

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2011)02-0373-02

Safety Assessment of *Lycium ruthenicum* Murrl Pigment

ZHAO Xiaohui, TAO Yanduo, SHAO Yun, MEI Lijuan*

(Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008)

Abstract Objective To assess the safety of *Lycium ruthenicum* Murrl pigment. **Methods** The experimental animals were Kunming mice and SD rats. Mice and rats were given intragastrically with the same volume of Trollius B average as MTD. Detoxification and death status were recorded. Flat plate incorporating method was used with 2 kinds of mixture solutions which were added S-9 or not. The stemal bone marrow of clean Kunming mice was isolated and the living rate of mouse bone marrow polychromatic erythrocyte micronucleus was checked. The epididymis of the double sides in female clean Kunming mice was actin slices and the rate of sperm teratogenicity was observed. The growth and development, food utilization rate, blood and biochemistry were also observed after the animals were fed for 30 days. **Results** No obvious toxic symptom and death were observed in mice and rats. Without adding S-9 condition, the mutation effect of all the animals didn't appear. The micronucleus test and the sperm teratogenicity test in mice were negative. All rats survived after fed for 90 days. Animal in each group was good and no abnormal phenomenon was observed. **Conclusion** The MTD of *Lycium ruthenicum* Murrl pigment growth in mice and rats was greater than 30 000 mg/(kg·bw) and it has no toxicity. The result of mutagenic test was negative and no abnormal phenomenon was observed after fed for 90 days.

Key words: *Lycium ruthenicum* Murrl pigment; Safety assessment

黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* Murrl 是茄科枸杞属的多年生耐盐、抗旱植物,分布于我国西北地区,是民族医药中的常用药材,据《晶珠草本》《四部医典》记载,藏医以其成熟的果实入药,治疗心热病、心脏病、月经不调、停经等^[1];《维吾尔药志》记载,维吾尔医生常用黑果枸杞果实及根皮治疗尿道结石、癬疥、齿龈出血等,民间用作滋补强壮、明目及降压药^[2-4];分布于陕西、宁夏、甘肃、新疆、西藏等省区。黑果枸杞色素是一种天然的食品着色剂,具有很强的着色能力,同时黑果枸杞色素具有很好的抗氧化、抗疲劳和抗缺氧能力。目前黑果枸杞色素的研究主要集中在结构及理化性质研究^[5,6],对于黑果枸杞色素的毒性研究较少,本文主要是按照食品添加剂安全评价要求对黑果枸杞色素进行毒理学安全评价。

1 材料

1.1 样品 黑果枸杞鲜果经70%乙醇浸提,提取液浓缩经大孔

树脂分离得到黑果枸杞红色素提取物,主要成分为花色苷类物质。置阴凉干燥通风处保存。人口服推荐用量为每人(成人)每日200 mg,成人质量按60 kg计算,折合剂量为3.33 mg/(kg·bw)。

1.2 实验动物及环境 清洁级健康昆明种小鼠,由广西医科大学医学实验动物中心繁殖,实验动物质量合格证号:0001129 SPF级SD种大鼠,由广东省医学实验动物中心繁殖,实验动物质量合格证号:0046674。实验动物使用许可证号:SYXK桂2007-0003。实验动物室温度:22~25℃,相对湿度:55%~70%。

1.3 菌株 鼠伤寒沙门菌突变型菌株TA97a、TA98、TA100和TA102由上海劳动卫生职业病研究所提供。

2 方法

实验方法均按照GB 15193-2003《食品安全性毒理学评价程序和方法》要求进行。

2.1 小鼠急性经口毒性实验 采用最大给药量实验法,选大、小鼠各20只,雌、雄性各10只。实验前动物禁食16 h,不限饮水。称取样品,配成500 mg/ml的混悬液,然后给动物灌胃3次(每次间隔5 h),每次灌胃量为0.2 ml/10 g·bw,合计剂量为30 000 mg/kg·bw。灌胃后观察、记录动物的中毒表现。每周称重1次,观察两周时间,试验结束解剖动物进行大体观察。按毒性分级标准评价受试物的急性毒性强弱。

收稿日期:2010-04-06 修订日期:2010-09-12

基金项目:国家科技部科技支撑计划(Na 2007BA145B00)

作者简介:赵晓辉(1979-),男(汉族),陕西扶风人,现任中国科学院西北高原生物研究所工程师,硕士学位,主要从事天然产物研究工作。

* 通讯作者简介:梅丽娟(1963-),女(汉族),青海西宁人,现任中国科学院西北高原生物研究所副研究员,主要从事天然药物化学研究工作。

2.2 Ames实验 采用“13”项中 4种菌株进行实验。在无菌操作条件下,用 0.1mg/ml的柠檬酸溶液将样品分别配成 50, 10, 2, 0.4, 0.08 mg/ml 5个浓度作为受试溶液,经高压灭菌(0.103 Mpa 20 min)处理。以多氯联苯诱导的大鼠肝微粒体酶(S-9)作为体外代谢活化系统。采用平板掺入法,在保温的顶层培养基中依次加入 0.1 ml实验菌株增菌液、0.1 ml受试物溶液和 0.5 ml S-9混合液(当需要代谢活化时),混匀后倒入底层培养基平板上。5个实验剂量分别为每皿 5 000, 1 000, 200, 40, 8 μ g 同时设自发回变对照、溶剂对照和阳性突变剂对照(2-氨基芴;采用柔毛霉素;采用敌克松;采用叠氮钠;1,8-二羟基萘醌)。每个剂量组的各种菌株均做 3个平行皿。在 37℃下培养 48h 计数每皿的菌落数。整套实验在相同条件下重复两次。如果受试物的回变菌落数增加超过自发回变菌落数的 2倍以上,并具有剂量-反应关系者,即为诱变实验阳性。

2.3 小鼠骨髓细胞微核实验 采用间隔 24 h两次经口灌胃法进行实验。选体质量为 25~30 g的昆明种小鼠 50只,随机分成 5组,每组 10只,雌雄各半。实验组 3个剂量分别设 5 000, 2 500, 1 250 mg/(kg·bw),以 0.1 mg/ml的柠檬酸溶液为阴性对照,40 mg/(kg·bw)剂量的环磷酰胺(ep)作阳性对照。第 2次给样后 6h 颈椎脱臼处死动物,取胸骨骨髓用小牛血清稀释涂片,甲醇固定,吉姆萨染色。在光学显微镜下,每只动物计数 1 000个嗜多染红细胞(PCE),微核率以含微核的 PCE千分率计,同时计数 200个嗜多染红细胞,计算嗜多染红细胞与成熟红细胞的比值(PCE/NCE)。采用泊松分布均数比较法统计处理。如实验组的微核率比阴性对照组增高,并有明显的剂量-反应关系和统计学意义,即为阳性结果。

2.4 小鼠精子畸形实验 选体质量为 25~30 g的昆明种雄性小鼠 50只,随机分成 5组,每组 10只。实验组 3个剂量分别设 10 000, 5 000, 2 500 mg/(kg·bw),以 0.1 mg/ml的柠檬酸溶液为阴性对照,40 mg/(kg·bw)剂量的环磷酰胺(ep)作阳性对照。每天灌胃一次,连续 5 d。末次给样后第 30天处死动物,取副辜的精子涂片,甲醇固定,伊红染色。在光学显微镜下,每只动物计数完整精子 1 000个,计算精子畸形率,采用 χ^2 检验统计处理。如实验组的精子畸形率比阴性对照组增高,并有明显的剂量-反应关系和统计学意义,即为阳性结果。

2.5 大鼠 90天喂养实验 SD种大鼠 80只,雌雄各半,雄鼠体质量(78.2±4.3)g,雌鼠体质量(72.5±4.1)g,将动物随机分为 4组,即阴性对照组和 3个实验组,每组 20只,雌雄各半。3个实验组剂量分别设为 1 000, 667, 333 mg/(kg·bw)。按 1.0 ml/100 g·bw的体积给相应剂量组动物灌胃,阴性对照组灌给等体积的 0.1 mg/ml的柠檬酸溶液,每天灌胃 1次,连续灌胃 90 d。实验期间所有动物给予普通饲料,单笼饲养,自由摄食饮水。每天观察动物的活动和生长情况,每周加食 2次,记录给食量和剩食量,每周称 1次体质量,计算每周进食量和食物利用率。实验中期从大鼠的眼静脉丛采血,抗凝处理后用血球计数仪检测 Hb, RBC, WBC 及其分类, PLT 等。第 90天动物禁食过夜,第 91天称动物空腹称重,然后处死大鼠,采两份血样,一份血抗凝用血球计数仪检测血常规指标(项目同上);另一份血不抗凝分离血清,用试剂盒和半自动生化分析仪检测血清 AST, ALT, BUN, Cr, TC, TG, Glu, TP, Alb 等项目。采血后解剖动物,进行大体观察,取肝脏、肾脏、脾脏和睾丸等脏器进行称重,计算脏/体比值,取肝脏、肾脏、脾脏、胃、十二指肠、睾丸和卵巢等脏器进行病理组织学检查。在对各剂量组动物作大体检查未发现明显病变和生化指标改变时,只进行高剂量组和对照组动物的主要脏器的组织病理学检查,如发现病变则对较中、剂量组相应器官及组织进行检查。

2.6 实验数据统计 应用 SPSS统计软件进行单因素方差分析。在统计分析时,先对数据进行方差齐性检验,若方差齐,采用单因

素方差分析进行总体比较,发现差异再用 Dunnett检验进行多个剂量组与对照组均数间的两两比较。若方差不齐则对数据进行适当的变量转换,满足方差齐性检验后,用转换后的数据进行统计;若转换数据仍未达到方差齐要求,改用秩和检验进行统计分析。

3 结果与讨论

3.1 急性经口毒性实验 以最大给药量[剂量为 30 000 mg/(kg·bw)]的样品给予小鼠灌胃后,动物生长良好,未见体质量受到影响。受试小鼠均未见有中毒症状,观察 14 d无动物死亡。实验结束解剖动物,大体观察,肝、肾、脾、心、肺、胃、肠等主要脏器均未见明显异常改变,根据《保健食品检验与评价技术规范》(2003年版)中的急性毒性分级标准,该样品的急性经口毒性属无毒级。

3.2 Ames实验 对 TA97a, TA98, TA100, TA102 4种实验菌株,无论是否加入 S-9,样品各剂量组的回变菌落数均未超过自发回变菌落数的两倍,亦无剂量-反应关系,表明该受试物诱变实验结果为阴性。

3.3 小鼠骨髓微核实验 样品各剂量组的微核率与阴性对照组比较,差异均无显著性($P > 0.05$),而环磷酰胺阳性对照组与阴性对照组比较差异有极显著性($P < 0.01$)。未见该样品对小鼠的骨髓细胞有损伤作用。

3.4 小鼠精子畸形实验 样品对小鼠精子畸形发生率未产生明显改变,样品各剂量组的精子畸形率与阴性对照组比较,差异均无显著性($P > 0.05$),而环磷酰胺阳性对照组与阴性对照组比较差异有极显著性($P < 0.01$)。未见该样品对小鼠精子产生畸变作用。

3.5 大鼠 90 d 喂养实验

3.5.1 动物一般表现 实验期间,各组动物生长发育良好,未见动物有异常行为和中毒表现,各组动物均无死亡。

3.5.2 样品对大鼠体质量及食物利用率的影响 黑果枸杞红色素给大鼠灌胃 90 d 实验期间,样品各剂量组雌、雄鼠每周的体质量、增重量、每周进食量及总进食量、每周及总食物利用率与对照组比较,差异均无显著性($P > 0.05$),表明该样品对大鼠的体质量增长和食物利用率无明显影响。

3.5.3 样品对大鼠血常规指标的影响 黑果枸杞红色素给大鼠灌胃 90 d 实验中期和实验结束样品各剂量组雌、雄性大鼠的血红蛋白、红细胞总数、白细胞总数及其分类、血小板数与对照组比较,差异均无显著性($P > 0.05$),表明该样品对大鼠的血常规指标无明显影响。

3.5.4 样品对大鼠血液生化指标的影响 黑果枸杞红色素给大鼠灌胃 90 d 样品各剂量组雌、雄性大鼠的血清谷草转氨酶、谷丙转氨酶、尿素氮、肌酐、胆固醇、甘油三酯、总蛋白、白蛋白、血糖与对照组比较,差异均无显著性($P > 0.05$),表明该样品对大鼠的血液生化指标无明显影响。

3.5.5 样品对大鼠脏器重量及脏器/体质量比值的影响 黑果枸杞红色素给大鼠灌胃 90 d 样品各剂量组大鼠的肝、肾、脾、雄鼠睾丸重量和肝/体、肾/体、脾/体、雄鼠睾丸/体比值与对照组比较,差异均无显著性($P > 0.05$),表明该样品对大鼠的脏器重量及脏器/体质量比值无明显影响。

3.5.6 解剖大体观察及组织学检查结果 大体解剖各组大鼠各脏器未见异常。病理组织学检查各组大鼠的肝小叶结构正常,肝细胞无变化、坏死,小叶间无炎细胞浸润和纤维组织增生;肾小球、肾小管结构正常,肾小管肾上皮细胞无变性、坏死,管腔内无异常物质,间质无炎细胞浸润、出血和纤维组织增生;胃壁及十二指肠壁结构清晰完整,无出血、炎细胞浸润,胃上皮细胞及肠黏膜上皮细胞无变性、坏死、缺损。未见金莲花露对受试物组动物肝、肾、胃及肠产生特异性的病理改变。

4 结论

我们对茶多酚进行了急性毒性实验、Ames实验、小鼠骨髓PCE微核实验、小鼠精子畸形实验和90d喂养实验。结果急性毒性实验中动物无明显中毒反应,无死亡,雌雄大、小鼠经口 LD_{50} 均大于300g/kg,根据急性毒性分级标准,判定其属实际无毒物;3项遗传毒性实验中,通过Ames实验可推断样品是否为致突变物,通过微核实验可检测样品对染色体的损伤情况,通过精子畸形实验可评价样品在体内对生殖细胞的遗传毒性作用,该色素3项遗传毒性实验结果均为阴性,提示该样品对哺乳类动物体细胞染色体及生殖细胞无损伤作用;90d喂养实验结果表明茶多酚对动物未产生明显毒性作用,病理组织学检查发现个别大鼠肝脏有零星的点状炎细胞浸润灶。表明该色素无毒无害,能够作为食品着色剂使用。

参考文献:

- [1] 甘青梅. 浅谈藏药的研究[J]. 中草药, 2001, 32(4): 371
- [2] 刘永民. 维吾尔药志(下)[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999: 478
- [3] 中国科学院西北高原生物研究所. 青海经济植物志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1996: 175
- [4] 甘青梅, 骆桂法, 李曾衍, 等. 藏药黑果枸杞开发利用的研究[J]. 青海科技, 1997, 4(1): 17
- [5] 李进, 瞿伟菁, 吕海英, 等. 黑果枸杞色素的提取和精制工艺研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 650
- [6] 李进, 赵红艳, 原惠, 等. 黑果枸杞色素性质研究[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 146

芳香新塔花中黄酮类成分的研究

杨伟俊^{1,2}, 顾政^{1,2}, 满尔哈巴¹, 赵军¹, 石峰¹, 何江¹

(1 新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830004

2 新疆维吾尔药重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830004)

摘要:目的 研究新疆维吾尔传统药物芳香新塔花 *Ziziphora clinopodioides* Lam. 中的黄酮类化学成分。方法 采用硅胶 Sephadex LH-20 柱色谱和制备高效液相等色谱方法分离纯化, 依据理化性质和波谱数据分析进行结构鉴定。结果 从芳香新塔花的甲醇提取物中分离得到 6 个化合物, 分别鉴定为金合欢素①、芹菜素②、柯伊利素③、山茶酚④、金丝桃苷⑤、槲皮素⑥共 6 个黄酮类成分。结论 化合物 1~5 为首次从该属植物中分离得到。

关键词: 新塔花属; 芳香新塔花; 黄酮类成分

DOI 标识: doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2011.02.050

中图分类号: R284.1 文献标识码: B 文章编号: 1008-0805(2011)02-0375-02

芳香新塔花 *Ziziphora clinopodioides* Lam. 为唇形科 (Labiatae) 新塔花属植物, 我国仅分布在新疆地区^[1]。芳香新塔花作为传统维吾尔药材, 在新疆民间被广泛用于治疗高血压病、冠心病等心脑血管疾病^[2,3]。芳香新塔花属芳香药用植物, 课题组前期研究了芳香新塔花挥发性成分^[4], 还对不同提取部位的药理活性进行了研究, 发现芳香新塔花总黄酮具有显著的抗心肌缺血作用。因此, 为了进一步阐明其发挥药理作用的物质基础, 本文对芳香新塔花的甲醇提取物进行了系统的化学成分研究。通过硅胶、制备薄层, Sephadex LH-20 和制备高效液相等色谱方法从中分离得到了 6 个黄酮类化合物, 其中 5 个为首次从该属植物中分离得到。

1 仪器与材料

半自动熔点测定仪 (YANAGIMOTO MFG CO.); JEOL ECP-500 核磁共振波谱测定仪; NOVA-600 型和 NOVA-400 型核磁共振测定仪 (美国 VARIAN 公司); 电子天平 (塞多利斯 BS124S); Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech); 柱色谱 (200~300 目) 及薄层色谱用硅胶均为青岛海洋化工有限公司生产。芳香新塔花药材采收于新疆乌鲁木齐南山天文台, 海拔 2 076.55 m, 经度 87°10'40", 纬度 43°28'14", 经新疆药物研究所张彦福研究员鉴定为唇形科芳香新塔花 *Ziziphora clinopodioides*

Lam., 标本贮存于新疆药物研究所标本库。

2 方法与结果

2.1 提取和分离 芳香新塔花的干燥全草 10 kg 用水提取后, 药渣用甲醇回流提取, 得浸膏 236.0 g 加水混悬后, 分别以三氯甲烷、醋酸乙酯萃取, 减压浓缩, 分别得三氯甲烷部位 142.5 g 和醋酸乙酯部位 138.5 g。醋酸乙酯部位以三氯甲烷-甲醇梯度洗脱, TLC 示踪合并相同组分, 在三氯甲烷-甲醇 (97:3) 洗脱下, 经反复重结晶, 得到化合物 1 (320 mg); 三氯甲烷-甲醇 (99:1) 洗脱流分, 经硅胶柱反复柱层析, 结合制备薄层, 得到化合物 2 (18 mg)。三氯甲烷部位以三氯甲烷-甲醇梯度洗脱, 其中三氯甲烷-甲醇 (7:1) 洗脱流份, 经反复硅胶柱层析, 得到化合物 3 (10 mg); 其中三氯甲烷-甲醇 (5:1) 洗脱流份, 经反复硅胶层析, 结合凝胶及 HPLC 等方法进行分离纯化, 得到化合物 4 (55 mg), 5 (22 mg), 6 (155 mg)。

2.2 结构鉴定

2.2.1 化合物 1 黄色针状结晶, 三氯化铁-铁氰化钾反应阳性; ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ: 12.93 (1H, s, 5-OH), 10.87 (1H, br s, 7-OH), 8.05 (2H, d, J = 9.0 Hz, H-2', 6'), 7.11 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3', 5'), 6.89 (1H, s, H-3), 6.51 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, H-3, J = 2.4 Hz, H-6); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150 MHz) δ: 181.8 (C-4), 164.2 (C-7), 163.3 (C-2), 162.3 (C-4'), 161.4 (C-5), 157.3 (C-9), 128.3 (C-2', 6'), 122.8 (C-1'), 114.5 (C-3', 5'), 103.8 (C-10), 103.5 (C-3), 98.9 (C-6), 94.0 (C-8)。以上数据与文献 [5,6] 报道一致, 故鉴定该化合物为金合欢素。

2.2.2 化合物 2 黄色结晶, 盐酸-镁粉反应阳性, 三氯化铁-铁氰化钾反应阳性; ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ: 12.82

收稿日期: 2010-01-11; 修订日期: 2010-09-22

基金项目: 新疆维吾尔药重点实验室项目 (Na xj50207-2008-03);

新疆维吾尔自治区科技基础条件平台项目 (Na PT0708)

作者简介: 杨伟俊 (1973-), 男 (汉族), 甘肃定西人, 现任新疆维吾尔自治区药物研究所副研究员, 博士学位, 主要从事维吾尔药资源研究工作。