

王洪云,张毅,钮福祥,等. TSP-1甘薯浓缩口服液的安全性评价[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):396-399.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.116

TSP-1甘薯浓缩口服液的安全性评价

王洪云,张毅,钮福祥,徐飞,孙健,岳瑞雪,朱红

(江苏徐淮地区徐州农业科学研究所/中国农业科学院甘薯研究所,江苏徐州 221131)

摘要:为评价TSP-1甘薯口服液的安全性,开展受试小鼠急性毒性试验、骨髓细胞微核试验、精子致畸试验以及血清生化指标试验等,结果表明,TSP-1甘薯口服液灌胃小鼠的最大耐受剂量达到60 g/kg(人体推荐用量的120倍)时,小鼠的主要脏器均无可见病变出现;对小鼠骨髓细胞微核率无影响,无致突变作用;未引发小鼠精子畸形,无遗传毒性。TSP-1甘薯口服液连续灌胃35 d后,小鼠血清谷草转氨酶(GOT)、谷丙转氨酶(GPT)活性有所增强,表明其对肝脏可能有一定影响,但中、低剂量组均未达到显著水平;高、中剂量组血清乳酸脱氢酶(LDH)活性显著减弱,低剂量组与对照没有显著影响。血清生化检测结果表明,TSP-1甘薯口服液对肌酐含量、尿酸含量、肌酸激酶活性均无显著影响,说明它对肾和心肌无毒性。

关键词:甘薯;浓缩口服液;安全性评价

中图分类号:TS275.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)06-0396-03

甘薯(*Ipomea batatas*)是一种药食同源作物,具有重要的药用保健价值^[1-2]。研究表明,特种甘薯TSP-1具有降低大鼠血液总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、动脉粥样硬化指数(AI)及增加血小板等功能;还对脾气虚症、脾不统血症以及抗栓和提高免疫力等具有良好的效果^[3-4]。近20年来,笔者通过TSP-1甘薯对志愿者的临床试用效果进行观察,发现该品种的叶子提取加工物对原发性和继发性过敏性紫癜具有明显治疗作用。但迄今为止,有关甘薯加工产品的安全性研究却鲜见报道,因此本研究以TSP-1甘薯浓缩口服液为材料,按照相关规范^[5-6],对受试小鼠进行急性毒性试验、骨髓细胞微核试验、精子致畸试验,并测定相关血清生化指标等,旨在为TSP-1甘薯功能食品的研究和开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 受试动物

ICR小鼠,清洁级,18~22 g,85只雄性,35只雌性,共120只,均购自扬州大学比较医学中心。

1.2 TSP-1甘薯浓缩口服液

TSP-1甘薯浓缩口服液,由江苏徐淮地区徐州农业科学研究所(中国农业科学院甘薯研究所)提供,批号为20150105,4℃保存,使用前摇匀。加工流程为:TSP-1甘薯原料→前处理(清洗、去沙、粉碎等)→加水负压煮沸浸提→过滤→真空浓缩→配料→灌装→封口→杀菌→冷却→检验→成品。

1.3 主要仪器设备

冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific Inc, D37520)、

生物显微镜(日本 OLYMPUS, BX51TRF)、酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific Inc, 3001-1227)、灌胃针、解剖器械、培养箱、冰箱等。

1.4 主要试剂

新生牛血清(浙江省杭州四季青生物工程材料有限公司)、快速姬姆萨染液、伊红染液、丙氨酸氨基转移酶(谷丙转氨酶GPT)测试盒、天冬氨酸氨基转移酶(谷草转氨酶GOT)测试盒、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒、肌酐(Cr)测定试剂盒、肌酸激酶(CK)测定试剂盒、尿酸(UA)测试盒(南京建成科技有限公司)、Giemsa应用液、注射用环磷酰胺(含安道生0.2 g)(美国百特国际有限公司)。

1.5 方法

1.5.1 急性毒性试验

1.5.1.1 剂量设置 依据《保健食品检验与评价技术规范(2003版)》第二部分毒理学检验方法第一章急性毒性试验的设置原则,即高剂量组为最大使用浓度和灌胃剂量^[5]。

1.5.1.2 预试验 采用24 h内最大给药量法,试验小鼠在1周内未见明显异常或死亡,说明该受试物毒性较低,可能无法测出其LD₅₀值,所以进行最大耐受量试验^[7-8]。

1.5.1.3 最大耐受量试验 采用最大使用浓度和最大灌胃剂量给予20只动物后,连续观察14 d,未见任何动物死亡时的给药量。20只小鼠,雌雄各半,常规饲养适应1周后24 h内灌胃给药3次,总给药量为60 g/kg(为人体推荐用量的120倍)。给药结束后观察14 d,逐日记录动物的毒性反应和死亡情况,最后一天脱颈椎处死小鼠并解剖,肉眼观察脑、心、肝、脾、肺、肾、胃、肠等主要脏器病理改变。

1.5.2 骨髓细胞微核试验

1.5.2.1 剂量设置及分组 依据《保健食品检验与评价技术规范(2003版)》第二部分毒理学检验方法第三章骨髓细胞微核试验的设置原则^[5],即高剂量组按照10 g/kg以上,或人体推荐摄入量的100倍以上,或一次最大灌胃剂量进行设计,本试验中TSP-1甘薯口服液设共设高、中、低3个剂量组,给

收稿日期:2015-05-13

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-11-B-20)。

作者简介:王洪云(1964—),女,江苏徐州人,主治医师、助理研究员,从事甘薯功能食品研究。E-mail: xzwanghy@163.com。

通信作者:钮福祥,研究员,从事甘薯产后加工。E-mail: niufuxiang@sina.com。

药量分别为60、30、15 g/kg,另设阴性对照组(生理盐水)和阳性对照组(环磷酰胺40 mg/kg)。

1.5.2.2 给药与样本制备 50只小鼠,雌雄各半,常规饲养适应1周,然后分2次给药,间隔时间为24 h,第2次给药6 h后颈椎脱臼处死小鼠,剪下两侧股骨,用注射器吸取1 mL小牛血清将骨髓冲出,移液枪吹打使其均匀,以1 000 r/min离心10 min,弃去上清液,加入0.2 mL小牛血清与沉淀物混匀后,取2 μ L滴在清洁的载玻片上,推片,涂片,写好标签,自然晾干后放入甲醇溶液中固定15 min,晾干后滴加新鲜配制的Giemsa应用液染色10 min,流水冲洗掉载玻片上的染色液,置晾片架上晾干。

1.5.2.3 观察计数 在低倍镜下观察,选择分布均匀、染色较好的区域,100 \times 油镜下观察计数。嗜多染红细胞(PCE)通常为灰蓝色,成熟红细胞(RBC)呈粉红色。微核多呈圆形,边缘光滑整齐,染色与核质一致,呈紫红色或蓝紫色。计数1 000个PCE中含微核的PCE数量(嗜多染红细胞中出现2个或更多个微核,仍按1个微核细胞计算),并且计数200个细胞中PCE与RBC的比值。正常的PCE/RBC比值约为1,如比值<0.1,则表示PCE形成受到严重抑制;如比值<0.05,则表示受试化学毒物的剂量过大,试验结果不可靠。

1.5.3 精子畸形试验

1.5.3.1 剂量设置依据及分组 依据《保健食品检验与评价技术规范(2003版)》第二部分毒理学检验方法第五章小鼠精子畸形试验的设置原则^[5],试验共分5个组(同“1.5.2.1”节)。

1.5.3.2 给药与标本制备 50只雄性小鼠,常规饲养适应1周后连续灌胃35 d。试验结束后,颈椎脱臼处死小鼠,取出两侧附睾,放入生理盐水中,将附睾纵向剪1~2刀,放置于

37 $^{\circ}$ C 孵箱10 min。将大块组织弃去,以1 000 r/min离心10 min,弃去上清,加入0.2 mL生理盐水与沉淀物混匀后,取2 μ L滴在清洁载玻片上,推片。涂片写好标签,自然干燥后放入甲醇溶液中固定15 min,取出晾干,滴加新鲜配制的1%伊红染色1 h,流水冲洗掉载玻片上的染色液,置晾片架上晾干。

1.5.3.3 观察计数 在5 \times 倍镜下找到背景清晰、精子重叠较少的部位,用40 \times 倍镜观察计数结构完整的精子。精子有头无尾(轮廓不清)或头部与其他精子或碎片重叠,或明显是人为剪碎者,均不计算,每只小鼠检查1 000个精子。精子畸形,主要表现为头部,其次为尾部。畸形类型可分为无钩、香蕉形、无定形、尾折叠、双头双尾、胖头等。

1.5.4 血清生化检测 在连续灌胃35 d后(见“1.5.3.2”节),小鼠摘眼球取血清,分装保存在-20 $^{\circ}$ C冰箱以备后续检测。按照Liu等的方法测定谷草转氨酶(GOT)、谷丙转氨酶(GPT)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酐(CRE)、尿酸(UA)以及肌酸激酶(CK)的活性^[9-10]。

2 结果与分析

2.1 急性毒性

给药后当天,小鼠毛色光泽,对外反应和活动正常,但饮水、采食减少,粪便呈深褐色或黑色,略不成形,尿液正常。给药后连续观察14 d,小鼠存活状况良好,毛色均较为光泽,活动、饮水、采食以及对外反应均正常,尿液、粪便无异常。给药2周内雄鼠和雌鼠的体质量均明显增加(表1),未见异常或死亡小鼠。解剖结果显示脑、心、肝、脾、肺、肾、胃、肠等主要脏器无肉眼可见病理改变。由于给药量已达到60 g/kg,是人推荐用量的120倍,因此小鼠灌服TSP-1甘薯浓缩口服液无毒性反应。

表1 TSP-1甘薯口服液对不同性别小鼠体质量的影响

组别	剂量(g/kg)	总数(只)	死亡数(只)	给药前体质量(g)	给药后体质量(g)	
					1周	2周
♂	60	10	0	24.87 \pm 0.82	30.89 \pm 1.50	33.62 \pm 1.78
♀	60	10	0	22.87 \pm 1.07	26.40 \pm 0.98	27.58 \pm 1.55

2.2 骨髓细胞微核试验

各组PCE与RBC的比值均处于0.89~1.2的正常范围内,表明试验结果可靠。TSP-1甘薯口服液3个剂量组微核数、微核率均与生理盐水对照组相近,没有显著差异,而阳性对照环磷酰胺组小鼠骨髓微核率极显著高于对照组($P < 0.01$),表明TSP-1甘薯口服液对小鼠染色体完整性与染色体分离无影响(表2)。

2.3 精子畸形试验

试验期间各组小鼠进食情况良好,活动未见异常,体质量增加正常。根据小鼠正常精子与畸形精子的对比与计数(图

1),TSP-1甘薯口服液3个剂量组精子畸形数、畸形率均与阴性对照组(生理盐水)相近,相互之间均没有显著差异,而阳性对照环磷酰胺组小鼠精子畸形数、畸形率极显著高于生理盐水对照组($P < 0.01$),表明TSP-1甘薯口服液对小鼠生殖细胞的形成无影响(表3)。

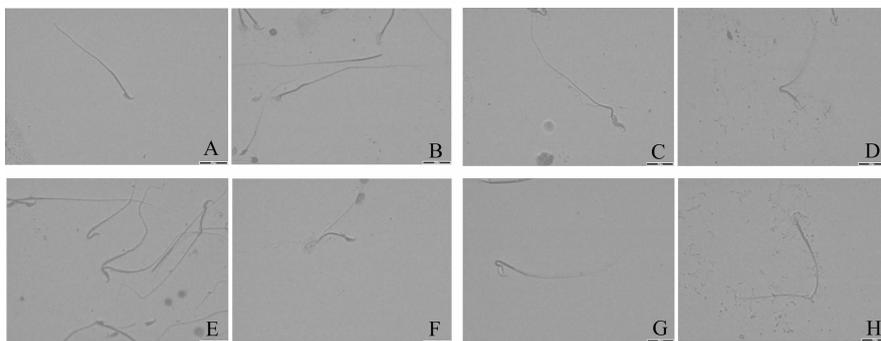
2.4 血清生化指标影响

血清生化指标检测结果表明,TSP-1甘薯口服液3个剂量组谷草转氨酶(GOT)、谷丙转氨酶(GPT)活力均高于阴性对照组,其中高剂量组谷草转氨酶活力与对照组之间差异显著($P < 0.05$),其余组与对照之间差异不显著,说明TSP-1

表2 TSP-1甘薯口服液对小鼠骨髓微核率的影响

剂量(g/kg)	小鼠数(只)	PCE数(个)	PCE/RBC	微核率(%)
生理盐水(阴性对照组)	10	1 000 \times 10	1.00 \pm 0.10	0.12 \pm 0.11
环磷酰胺0.04(阳性对照组)	10	1 000 \times 10	1.02 \pm 0.16	1.79 \pm 0.55**
TSP-1甘薯口服液15(低剂量组)	10	1 000 \times 10	0.89 \pm 0.04	0.11 \pm 0.12
TSP-1甘薯口服液30(中剂量组)	10	1 000 \times 10	1.04 \pm 0.08	0.13 \pm 0.13
TSP-1甘薯口服液60(高剂量组)	10	1 000 \times 10	1.04 \pm 0.11	0.15 \pm 0.11

注:**表示差异达极显著水平($P < 0.01$)。



A—正常; B—无钩; C—双头; D—香蕉形; E—双尾; F—尾折叠; G—胖头; H—无定形
图1 小鼠正常精子与畸形精子对比结果

表3 TSP-1甘薯口服液对小鼠精子畸形率的影响

剂量 (g/kg)	精子数 (条)	精子畸形类型					精子畸形数 (条)	精子畸形率 (%)
		无钩	香蕉	无定形	尾折叠	双头双尾		
生理盐水	1 000 × 5	4	9	22	59	0	98	1.98
环磷酰胺 0.04	1 000 × 5	32	15	183	467	17	727 **	14.54 **
TSP-1甘薯口服液 15	1 000 × 5	6	4	26	76	0	122	2.44
TSP-1甘薯口服液 30	1 000 × 5	4	2	31	80	0	121	2.42
TSP-1甘薯口服液 60	1 000 × 5	2	0	17	83	0	104	2.08

注: ** 表示差异达极显著水平($P < 0.01$)。

甘薯口服液除最高剂量组有一定影响外,其余组对肝脏均没有显著影响;但3个剂量组乳酸脱氢酶(LDH)活力均低于对照组,其中高、中剂量组与对照之间有显著($P < 0.05$)、极显著

($P < 0.01$)差异。3个剂量组肌酐、尿酸含量以及肌酸激酶活力与阴性对照组相近,没有显著差异,表明TSP-1甘薯口服液无肾毒性和心肌毒性(表4)。

表4 TSP-1甘薯口服液对小鼠血清生化指标的影响

剂量 (g/kg)	谷草转氨酶 活性(U/L)	谷丙转氨酶 活性(U/L)	乳酸脱氢酶 活性(U/L)	肌酐 ($\mu\text{mol/L}$)	尿酸 (mg/L)	肌酸激酶活性 (U/L)
生理盐水	26.92 ± 6.92	6.43 ± 3.43	4 511.72 ± 288.01	13.90 ± 2.39	24.44 ± 6.44	0.85 ± 0.35
TSP-1甘薯口服液 15	34.98 ± 9.93	9.58 ± 4.53	4 269.97 ± 1 373.89	11.55 ± 2.90	24.43 ± 9.08	1.28 ± 0.47
TSP-1甘薯口服液 30	47.78 ± 29.87	32.46 ± 37.75	3 989.55 ± 330.52 **	10.30 ± 5.33	21.20 ± 11.94	1.05 ± 0.27
TSP-1甘薯口服液 60	45.80 ± 20.93 *	15.13 ± 14.36	4 196.51 ± 296.45 *	10.23 ± 4.42	31.50 ± 7.92	1.00 ± 0.49

注: *、** 分别表示差异达显著($P < 0.05$)、极显著($P < 0.01$)水平。

3 结论与讨论

急性毒性试验结果表明,当TSP-1甘薯口服液灌胃小鼠的最大耐受剂量达到60 g/kg(人体推荐用量的120倍)时,小鼠的主要脏器均无可见病变出现;骨髓细胞微核试验证明它无致突变作用;精子致畸试验结果显示它不会引发小鼠精子畸形,无遗传毒性。血清生化试验结果表明,TSP-1甘薯口服液连续灌胃35 d后,小鼠血清谷草转氨酶、谷丙转氨酶有所升高,但除了高剂量组的谷草转氨酶达到显著水平外,其余组与对照均无显著差异,表明中、低剂量TSP-1甘薯口服液对肝脏均没有显著影响;高、中剂量组乳酸脱氢酶水平显著下降,低剂量组与对照没有显著差异,表明60倍以上TSP-1甘薯口服液用量可能会对肾脏有一定的影响;但各剂量组TSP-1甘薯口服液对肌酐、尿酸、肌酸激酶水平无显著影响,表明它对肾和心肌无毒性。

谷草转氨酶和谷丙转氨酶是医学临床上肝功能检查的主要指标之一^[9],本试验高剂量组谷草转氨酶和谷丙转氨酶检测值显著高于阴性对照,说明当用量达到推荐量的120倍时对肝脏产生一定的影响,其机理有待进一步研究,但在60倍

以下用量时均属于安全。乳酸脱氢酶广泛存在于动物细胞的可溶性部分中^[10],它是检查肾功能的主要指标之一^[11],乳酸脱氢酶偏低通常由内分泌失调、过于劳累、睡眠不好、心情不好等引起,一般经过调理即可恢复,但如果乳酸脱氢酶明显偏高则要引起重视了,临床证明凡患有肝炎、心肌梗塞症、肺梗塞症、充血性心力衰竭及某些恶性肿瘤等,此酶活性水平较正常值高6~10倍^[10]。本研究结果表明,TSP-1甘薯口服液各剂量组均未使小鼠血清乳酸脱氢酶值升高,相反,高、中剂量组乳酸脱氢酶指标显著偏低,具体如何影响及其机理也有待研究,但通过肌酐、尿酸、肌酸激酶的检测结果表明,它对肾和心肌并无毒性。综上所述,TSP-1甘薯口服液除用量达到正常剂量120倍时对肝、60倍时对肾可能有一定影响外,其余情况下对主要脏器均无毒无害,是安全的,考虑到正常情况下使用量不可能到达推荐量的120倍或60倍,因此TSP-1甘薯口服液的安全性是可靠的。

参考文献:

- [1]王洪云,孙健,钮福祥,等.甘薯的功能成分及其药用价值[J].中国食物与营养,2013,19(12):59-62.

于加平. 长白山野生香薷中挥发油的提取及抗氧化性[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(6): 399-400.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.117

长白山野生香薷中挥发油的提取及抗氧化性

于加平

(吉林农业科技学院生物工程学院, 吉林吉林 132101)

摘要:对长白山野生香薷中挥发油的抗氧化活性进行研究。以水蒸气蒸馏法提取香薷中的挥发油,通过分光光度法测定挥发油对 DPPH 自由基、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的清除能力,从而判定挥发油的抗氧化活性。结果表明,不同浓度的挥发油清除自由基的能力不同,相同浓度下的挥发油对不同自由基的清除能力也各有差异。结果表明,野生香薷挥发油具有较强的抗氧化性,广泛应用于医药、食品、化学工业等领域。研究为进一步开发香薷挥发油的药用价值提供了良好的数据支持。

关键词:长白山野生香薷;水蒸气蒸馏;抗氧化性;挥发油

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0399-02

香薷 [*Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyland] 是唇形科芳香草本植物,别称小叶苏子、香草、臭粥芥等,其香味极浓,是东北地区传统的调料。香薷主要分布于江西、陕西、山东、甘肃、吉林等地,在中国资源丰富,其中以江西省产量大、品质佳,又称“江香薷”^[1]。根据药典记载,香薷是一种常见的中草药,具有发汗解表、和中化湿、利尿消肿的功效,可治疗风寒、感冒、胸闷气喘、呕吐腹泻等^[2-3]。据相关报道,目前主要是对“江香薷”中的黄酮、多糖、挥发油等方面进行的研究,而对长白山野生香薷挥发油的研究却鲜见报道。挥发油具有镇痛、抗菌、抗病毒、解热、缓解肠痉挛等功效^[4-5]。为了更好地研究、利用香薷,本研究以长白山野生香薷为原料,采用水蒸气蒸馏法对其中的挥发油进行提取,并利用其对 DPPH 自由基、羟基自由基以及对超氧阴离子的清除能力来研究挥发油的抗氧化性能,研究结果可为长白山野生香薷食药价值的开发和利用奠定理论基础。

1 材料与方 法

收稿日期:2015-05-15

基金项目:吉林农业科技学院微生物重点学科培育项目(编号:吉农院合字[2013]第 X005 号)。

作者简介:于加平(1973—),男,吉林大安人,副教授,从事分析化学和天然产物的教学与科研。E-mail:542646746@qq.com。

1.1 材 料

1.1.1 材料 长白山野生香薷,采自吉林省长白山区内,经专家鉴定为长白山野生香薷,经阴干、粉碎,得香薷粉末备用。

1.1.2 仪器 FZ102 型微型植物粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;挥发油提取器、FA2004N 型天平,上海精密科学仪器有限公司;ATC-15A 型电子恒温电热套,海市市华星仪器厂;RE3000A 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器公司;UV2300 紫外分光光度计,上海天美科学仪器有限公司。

1.1.3 试剂 乙醚、NaCl、 Na_2SO_4 、95% 乙醇溶液、0.1 mol/L DPPH 无水乙醇溶液、16.0 mmol/L FeSO_4 、0.04 mmol/L H_2O_2 、6.0 mmol/L 水杨酸、0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液、50 mmol/L 邻苯三酚、8 mol/L HCl 0.1 mL。

1.2 试 验 方 法

1.2.1 长白山野生香薷中挥发油的提取 利用水蒸气蒸馏法提取挥发油^[6-7]。精确称取 20 g 干燥野生香薷粉末,置于烧瓶内,连接水蒸气蒸馏装置后开始提取;收集馏出液,向馏出液中加入 NaCl,静置后用乙醚萃取(20 mL×3 次),合并萃取液;向萃取液中加入适量无水 Na_2SO_4 后,低温干燥 24 h 后再进行过滤,旋蒸回收乙醚,收集挥发油,置于冰箱内备用。

1.2.2 长白山野生香薷中挥发油抗氧化性研究

1.2.2.1 羟基自由基的清除率测定 待测样品用无水乙醇稀释成 0、20、40、60、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。取若干 10 mL 离心管,依次加入 16.0 mmol/L FeSO_4 、0.04 mmol/L H_2O_2 、6.0 mmol/L 水

[2] 钮福祥. 甘薯主张[M]. 青岛:青岛出版社,2006.

[3] 台建祥,华希新,王家万,等. 特白一号薯叶制品功能性实验及临床应用研究[J]. 作物学报,1998,24(2):161-167.

[4] 王洪云,张毅,孙健,等. 特种甘薯 TSP-1 水提物对 II 型糖尿病大鼠血脂和血小板的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):289-291.

[5] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范(2003 版)(卫法监发[2003]42 号)[S].

[6] 中华人民共和国卫生部. GB/T 15193—2003 食品安全毒理学评价程序和方法[S]. 北京:中国标准出版社,2004.

[7] Shoji T, Akazome Y, Kanda T, et al. The toxicology and safety of apple polyphenol extract[J]. Food Chem Toxicol, 2004, 42(6): 959-967.

[8] 沈继红,张爱军. 葡萄多酚的毒性试验[J]. 毒理学杂志,2006, 20(2): 96-97.

[9] Liu C M, Zheng Y L, Lu J, et al. Quercetin protects rat liver against lead-induced oxidative stress and apoptosis[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2010, 29(2): 158-166.

[10] 刘江燕,苏国钧,雷衡毅,等. 稀土对大鼠 6 种组织中乳酸脱氢酶同工酶谱的影响[J]. 中山大学学报:自然科学版,1997, 36(增刊 2): 68-71.

[11] Liu C M, Ma J Q, Sun Y Z. Puerarin protects rat kidney from lead-induced apoptosis by modulating the PI3K/Akt/eNOS pathway[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2012, 258(3): 330-342.