

· 论著 ·

辣木叶和种子的提取及急性毒性评价

陈艳^{1,2}, 张梅¹, 王金萍¹, 杨锋¹ (1. 陆军总医院药理科, 北京 100700; 2. 解放军总医院基础医学研究所, 北京 100853)

[摘要] 目的 测试辣木叶和种子的急性毒性以及安全剂量范围。方法 参照《中药药理研究方法学》设计实验, 确定中药新药的最大耐受量和急性毒性。结果 小鼠对辣木叶超微粉和辣木叶醇提物的最大耐受量分别为0.4 g/20 g、0.8 g/20 g, 辣木叶超微粉和辣木叶醇提物的成人日剂量分别在10 g/50 kg、20 g/50 kg以下为安全剂量。结论 辣木叶为较安全的药食两用植物, 其药理作用值得进一步研究。

[关键词] 辣木; 超微粉化; 急性毒性

[中图分类号] R99

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2017)04-0334-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.04.011

The extraction and acute toxicity testing of *Moringa oleifera* leaves and seeds

CHEN Yan^{1,2}, ZHANG Mei¹, WANG Jinping¹, YANG Feng¹ (1. Department of Pharmacy, Chinese PLA Army General Hospital, Beijing 100700, China; 2. Institute of Basic Medical Science, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

[Abstract] **Objective** To test the acute toxicity and determine the safe dose range of *Moringa oleifera* leaves and seeds. **Methods** Acute toxicity tests were performed based on the documented experimental designs in Research Methods of Pharmacology of Chinese Traditional Medicine. **Results** The maximum tolerated dose of the superfine powder and alcoholic-aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves were 0.4 g/20 g and 0.8 g/20 g for mice. The safe dose for human is under or equal to 10 g/50 kg and 20 g/50 kg. **Conclusion** *Moringa oleifera* leaves were safe for medical and food use. The further research and development is warranted for this plant.

[Key words] *Moringa oleifera*; superfine powder process; acute toxicity testing

辣木 (*Moringa oleifera* Lamarch) 为辣木科 (Moringaceae) 辣木属 (*Moringa*) 落叶乔木, 又名油辣木 (*Moringa*)、辣根树 (Horseradish tree)、鼓槌树 (Drumstick tree) 和观辣树^[1]。2011年, 时任国家副主席的习近平访问古巴, 古巴革命领袖菲德尔·卡斯特罗介绍他种植的辣木, 说辣木的营养成分很高。2011年底, 两国就辣木、粮食等领域合作达成共识。2014年7月, 国家主席习近平再次访问古巴, 给国际友人又带去了5 kg (约1.5万粒) 辣木种子^[2]。

辣木在印度、非洲等地有“素食黄金”之称。根据中国农业部蔬菜品质监督检验测试中心测定表明, 每100 g的辣木中蛋白质含量约为牛奶的2倍、维生素C的含量约为鲜橙的7倍、维生素A约为胡萝卜的4倍、铁约为菠菜的3倍、钙约为牛奶的4倍、钾约为香蕉的3倍。25 g辣木粉末, 含有幼儿每日所需的270%的维生素A, 42%的蛋白质、125%的钙、70%的铁及22%的维生素C, 被当地人

称为“救命丹”。辣木的药用价值突出。目前研究报道的辣木药理作用主要集中在降血脂、降血压 (包括心血管病、肥胖症)、降血糖 (糖尿病)、提高免疫力和机体抗氧化能力、抵抗癌症等^[3]。

毫无疑问, 辣木已成为当今全球热门的高营养多功能植物。但是安全性是食品研究和新药临床前研究的第一步, 而药用辣木叶和种子的提取工艺以及药物的毒理学安全性评价国内未见报道, 本研究采用超微粉化和醇提工艺对辣木叶和种子进行提取, 参照《中药药理研究方法学》(2006年第二版)^[4]进行了急性毒性研究, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 辣木叶和种子的预处理。辣木叶和种子采摘于非洲利比亚某农场, 取新鲜辣木叶和种子的可食部分, 喷淋洗净, 室温自然晾干, 置50℃通风干燥箱干燥至恒重, ⁶⁰Co照射进行灭菌。10 g新鲜辣木叶可制成1 g辣木干叶。

1.2 超微粉化 干燥好的辣木叶和种子由陆军总医院制剂中心进行超微粉碎 (CW3-15型慧宝超微

[作者简介] 陈艳, 博士, 主管药师, 研究方向: 分子药理学. Tel: 13811060622; Email: doctercy@sina.com

粉碎机,山东烟台)。辣木叶超微粉为茶绿色细干粉,粒径5 000目,流动性良好。辣木种子超微粉碎过程中,由于种子的含油量较高、韧性大,出现油性物质黏住并堵塞冲头的情况,因此影响粉碎效果,导致种子粉末粒径比干叶粉末粒径大且不均匀,容易凝结成团,分散性差。

1.3 乙醇提取 取超微粉化的辣木叶粉末和种子粉末各100 g,用80%的乙醇浸泡辣木叶粉末,每次1 200 ml,每次浸泡时间为7 d,共浸提3次,浸泡期间经常晃动以混匀粉末和溶媒,使之充分接触。按上述方法,以90%的乙醇浸泡提取辣木种子粉末。过滤后分别收集上述叶和种子的所有醇提溶液,于65℃旋转蒸发仪中减压回收乙醇和水,至无醇味,4℃冷藏。

1.4 实验动物 健康昆明种小鼠,SPF级,雌雄各半,体重18~22 g,小鼠维持饲料(A级),购自北京华阜康生物科技股份有限公司,由中国医学科学院医学实验动物研究所检测合格,实验动物质量合格证号:SCXK(京)2014-0004,饲料生产许可证号:SCXK(京)2014-0008。动物实验室温度:20.0~25.0℃,相对湿度:40%~70%,光照150~200 Lx,噪音<50 dB,纯化水置于经热压灭菌的饮水瓶中,小鼠自由饮用。

1.5 叶、种子超微粉的急性毒性实验 将小鼠随机分为辣木叶超微粉组和空白对照组,每组30只,雌雄各半,给药前1 d晚上小鼠禁食、给水。称取20 g辣木叶超微粉(批号:20151014),加入纯化水至80 ml搅拌均匀,调制成较浓稠的微粉水溶液。小鼠灌胃给药分2次进行(上午8:00和10:00),每次给药量为0.8 ml/20 g小鼠,已达到小鼠的最大给药量,叶超微粉的总给药量为0.4 g/20 g小鼠(相当于成人日剂量10 g/50 kg的100倍),空白对照组给予同等体积的纯化水。灌胃针插入过程中尽量避免损伤动物口腔、咽部及食管黏膜,严密观察并记录给药后4 h内动物的反应,并连续观察14 d,分别于给药后第3、7和14天记录小鼠体重,期间详细记录动物的毒性反应情况。由于种子的油脂性较高,微粉颗粒的粒径不均匀,大粒径颗粒容易堵塞灌胃针头,导致灌胃实验难以进行。将辣木叶超微粉(批号:20151110、20160513)分别按上述方法进行小鼠灌胃实验,每组20只,雌雄各半,空白对照组给予同等体积纯化水,记录14 d内小鼠的毒性反应。

1.6 叶、种子提取物的急性毒性实验 辣木叶醇提物和辣木种子醇提物的批号均为20151218,将小鼠随机分为辣木叶醇提物中剂量组(组一):给药剂量为0.4 g/20 g小鼠(相当于成人日剂量10 g/50 kg

的100倍);叶醇提物高剂量组(组二):给药剂量为0.8 g/20 g小鼠(相当于成人日剂量20 g/50 kg的100倍);种子醇提物中剂量组(组三):给药剂量为0.4 g/20 g小鼠;种子醇提物高剂量组(组四):给药剂量为0.8 g/20 g小鼠;以及空白对照组(以等体积纯化水灌胃)。每组20只,雌雄各半,给药前1 d晚上小鼠禁食、给水。次日8:00,取叶、种子的乙醇提取物,分别用纯化水定容至100 ml,按上述各组剂量分别灌胃给药1次。严密观察并记录给药后4 h内动物的反应,并连续观察14 d,分别于给药后第3、7和14天记录小鼠体重,期间详细记录动物的毒性反应情况。将辣木叶醇提物(批号:20160105、20160607)以0.8 g/20 g小鼠给药剂量,辣木种子醇提物(批号:20160105、20160607)以0.4 g/20 g小鼠给药剂量,分别按上述方法进行小鼠灌胃实验,并观察14 d内的毒性反应情况。

1.7 统计学方法 采用SPSS 19.0统计软件进行分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组计量资料比较采用 t 检验,多组计量资料比较采用One Way ANOVA进行分析,检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 动物的一般表现 叶超微粉和叶醇提物各动物灌胃后,小鼠出现毛发竖立、少动、呼吸急促、心跳加速等受惊吓的表现,几秒钟后恢复正常,各组动物毛发整洁,反应敏捷,行动灵活,目光有神,未见呼吸、心跳异常,粪便呈墨绿色、颜色较深、形状正常,排便频率较高,眼球、眼睑正常,眼、鼻、口无分泌物,进食与饮水正常,生长发育良好,均未见明显中毒反应,无死亡。种子醇提物中剂量组(批号:20151218,组三)1只小鼠灌药后因误入气管引起窒息,当场死亡。种子醇提物高剂量组(批号:20151218,组四)中1只雌鼠,给药后精神萎靡,少动,呼吸急促、不均匀,腹部有不规律抽动症状,给药后24 h死亡,解剖尸体发现肺部有充血、水肿现象,原因可能是由于种子提取物较为黏稠,灌胃时有少许受试物误入呼吸道。组内其余小鼠未见明显异常。其余各组未见明显毒性反应。

2.2 对小鼠体重增加的影响 于给药后0.5 h,开始正常给水、喂以维持饲料,计算第3、7和14天小鼠的平均体重,结果见表1。经方差分析,给予辣木叶超微粉后第3天,雌、雄性小鼠的平均体重较对照组显著减轻($P<0.05$),给药后第7和14天,各给药组雌、雄性小鼠体重与对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),说明辣木叶长期对小鼠体重增长无明显影响,短期内对体重的影响可能是由于给

表1 辣木叶超微粉、叶及种子醇提物对小鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 组别 | 批号 | 性别 | 0 d | | 3 d | | 7 d | | 14 d | |
|---------------------|----------|----|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | | 给药组 | 对照组 | 给药组 | 对照组 | 给药组 | 对照组 | 给药组 | 对照组 |
| 叶超微粉 0.4 g/20 g | 20151014 | 雌性 | 17.7±0.40 | 18.1±0.67 | 23.4±0.96* | 25.3±1.23 | 28.3±2.16 | 29.7±2.65 | 30.8±2.76 | 32.2±2.11 |
| | | 雄性 | 19.3±0.54 | 18.9±0.31 | 25.4±1.02* | 27.7±1.65 | 31.6±2.60 | 33.7±3.07 | 37.9±2.36 | 39.3±2.94 |
| 叶醇提物 0.8 g/20 g | 20151218 | 雌性 | 19.2±0.58 | 19.5±0.82 | 25.1±2.45 | 26.0±1.79 | 29.5±2.73 | 30.2±1.96 | 32.6±2.52 | 32.4±2.73 |
| | | 雄性 | 20.5±0.72 | 20.0±0.92 | 26.5±1.58* | 29.6±1.63 | 33.1±2.46 | 34.7±2.05 | 39.6±2.83 | 41.2±3.69 |
| 种子醇提物 0.4 g/20 g | 20151218 | 雌性 | 18.9±0.65 | 19.5±0.82 | 24.3±2.97 | 26.0±1.79 | 27.8±2.67 | 30.2±1.96 | 30.7±2.55 | 32.4±2.73 |
| | | 雄性 | 19.6±0.49 | 20.0±0.92 | 25.7±2.16* | 29.6±1.63 | 32.6±3.51 | 34.7±2.05 | 38.8±3.09 | 41.2±3.69 |

* $P < 0.05$, 与对照组比较

药量及给药体积较大,导致小鼠近3 d内食欲受影响所致。辣木叶醇提物和种子醇提物各组给药后第7和14天,各给药组小鼠的体重较对照组无显著差异($P > 0.05$)。

2.3 组织病理学检查 给药2周后,对辣木叶超微粉、辣木叶醇提物和辣木种子醇提物各剂量组和对照组小鼠进行解剖,对小鼠的心、肝、脾、肾、睾丸等进行组织病理学检查,其外观颜色和脏器大小正常,

均未出现与辣木急性毒性试验明显相关的组织病理学改变。对各组实验动物的心、肝、脾、肾、睾丸进行称重,计算脏器系数。各实验组动物的脏器质量及脏器系数(心体比、肝体比、脾体比、肾体比、辜体比)与对照组分别进行比较,均无显著差异($P > 0.05$),见表2。对种子醇提物高剂量组的1只死亡小鼠进行解剖,发现其肺部轻度充血、水肿,有炎性渗出,其余脏器无明显异常。

表2 辣木叶超微粉、叶及种子醇提物对小鼠脏器系数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 组别 | 批号 | 性别 | 心体比 | 肝体比 | 脾体比 | 肾体比 | 辜体比 |
|------------------|----------|----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 叶超微粉 0.4 g/20 g | 20151014 | 雌性 | 0.58±0.04 | 5.17±0.42 | 0.36±0.04 | 1.37±0.08 | — |
| | | 雄性 | 0.64±0.05 | 5.62±0.71 | 0.42±0.08 | 1.43±0.10 | 0.94±0.11 |
| 叶醇提物 0.8 g/20 g | 20151218 | 雌性 | 0.49±0.03 | 4.61±0.53 | 0.35±0.07 | 1.46±0.13 | — |
| | | 雄性 | 0.61±0.06 | 5.33±0.48 | 0.45±0.13 | 1.41±0.09 | 0.81±0.09 |
| 种子醇提物 0.4 g/20 g | 20151218 | 雌性 | 0.56±0.04 | 5.10±0.37 | 0.32±0.09 | 1.48±0.08 | — |
| | | 雄性 | 0.63±0.05 | 5.42±0.59 | 0.38±0.08 | 1.54±0.12 | 0.86±0.09 |

注:脏器系数=(脏器质量/动物体重)×100

2.4 安全剂量评价 辣木叶超微粉的总给药量为0.4 g/20 g小鼠(折合成生药量计算),相当于成人日剂量10 g/50 kg的100倍,经观察2周,未见任何动物死亡,可将0.4 g/20 g小鼠定为受试药物的最大耐受量。根据相关规定,小鼠的最大耐受量为人口服用量的100倍以上为安全,因此,可认为辣木叶超微粉的成人日剂量10 g/50 kg为安全剂量。辣木叶醇提物的高、低剂量组也未见任何异常和动物死亡,可认为辣木叶醇提物的成人日剂量20 g/50 kg以下为安全剂量。但辣木种子醇提物的安全性仍需通过大数据系统分析再得出结论。

3 讨论

我国目前确诊的高血压、糖尿病、癌症患者已达

2.6亿人。而辣木是上述疾病的天然克星,是目前人类所发现的保健功能最多、能同时对抗“三高”和预防癌症的植物。目前有关辣木叶、花、果荚、茎、种子、根等的研究备受追捧,但对于辣木功效评价的研究力度和深度不足,市场经营的辣木产品多达几十种,但以茶叶为主,这与辣木的多功能性相比还远远不够。如果能深入研究辣木的药用价值,将对攻克“三高”、造福人类具有重要意义。本研究对辣木叶和其种子的安全性进行了研究,确定了可推荐的安全剂量,为进一步的新药研究打下基础。

超微粉碎是20世纪90年代兴起的一门新型中药制剂技术,是通过专门的超微粉碎仪将干燥的中药材超微细粉化,使其粒径达到微米级,在保留中药

(下转第370页)

势,此时患者皮疹已得到控制。

此外,患者7月29日出现皮疹时,仅两上肢见散在皮疹,并未蔓延至全身,且无全身症状,初始可不考虑加用糖皮质激素。但7月30日至31日,患者皮疹全身可见并伴瘙痒,部分融合成一团,出现大面积皮疹,有皮疹加重的趋势。根据《原则》建议针对皮疹较多、瘙痒明显时可加用糖皮质激素治疗。结合患者皮疹进展情况,初始在抗组胺药未能很好控制皮疹的情况下,后续加用糖皮质激素是必要的,避免皮疹进一步进展及脏器损伤。

5 小结

药物性皮炎在临床常有发生,但是在选择抗过敏药物时,需具体情况具体分析。在患者未出现脏器功能异常或合并药物较少时,选择任何一种抗过敏药物均可,但在患者存在部分脏器功能异常且伴感染,又合并潜在的药物相互作用时,选用药物需慎重。比如,该例患者肝功能异常,在治疗过程中出现意外的药疹,医师在选择治疗方案时存在疑虑,此时需要药师对疾病和所需选用的药物进行分析,结合自身的专业知识及时准确地给予临床医师建议,避免不良事件出现。

【参考文献】

- [1] 中华医学会.糖皮质激素类药物临床应用指导原则[J].中华内分泌代谢杂志,2012,28(2):增录 2a-28-29.
- [2] 漆军,李恒进.药物性皮炎的治疗[J].中国全科医学,2004,7(12):893-894.
- [3] 葛蒙梁.药疹的临床类型和诊治[J].中国药物警戒,2006,3(1):43-46.

- [4] 赵广.药疹的识别与治疗[J].中华全科医师杂志,2010,9(5):362-363.
- [5] 中华医学会外科学分会胆道外科学组.急性胆道系统感染的诊断和治疗指南(2011版)[J].中华消化外科杂志,2011,10(1):9-13.
- [6] 葛均波,徐永健.内科学[M].8版.北京:人民卫生出版社,2013:439-445.
- [7] 崔福德.药剂学[M].6版.北京:人民卫生出版社,2007:26-27.
- [8] 沈丽芳,马淑媚.几种抗组胺药物的作用特点及应用[J].中外医疗,2009,28(7):176.
- [9] 刘保国,李志英,李宗珊,等.抗组胺药临床应用[J].临床合理用药杂志,2015,8(8):85-86.
- [10] 程淑锋,林滔,程丽雪.几种第二代抗组胺药的对比和临床应用[J].海峡药学,2005,17(5):108-110.
- [11] 任耘,崔琳.西替利嗪的临床应用进展及安全性[J].中国医院用药评价与分析,2003,3(6):369-371.
- [12] 孙平华,姚志红,孙铁民.抗组胺药的药物相互作用[J].中国新药杂志,2006,15(10):769-772.
- [13] 曾丽宁.奥美拉唑致不良反应研究进展[J].医学理论与实践,2015,28(10):1305-1306.
- [14] 彭彦孟.氯雷他定致肝功能异常1例[J].人民军医,2007,50(12):720.
- [15] 毕真真,杭小锋,徐文胜.氯雷他定诱发严重淤胆型肝炎1例[J].肝脏,2009,14(4):353.
- [16] Tillement JP. The advantages for an H₁ antihistamine of a low volume of distribution[J].Allergy,2000,55(Suppl 60):17-21.
- [17] 马满玲,刘璐.第2代抗组胺药物心脏毒性研究进展[J].中国药业,2005,14(4):75-76.
- [18] 孙会仙,刘丽萍.第二代抗组胺药的研究进展[J].国外医学(药学分册),2001,28(5):263-266.

[收稿日期] 2016-03-24 [修回日期] 2017-01-10

[本文编辑] 李睿旻

(上接第336页)

原有成分的同时,减小粒子半径,提高细胞破壁率,增大表面积和溶出率,从而提高药物的生物利用度,降低用药剂量^[5]。本实验采取超微粉碎技术粉碎辣木叶,为下一步制成合理剂型,充分发挥药理药效做好了准备。

由于辣木叶和其种子的毒性较低,按照半数致死量(LD₅₀)试验,由于给药剂量受限,无法测出LD₅₀,因此采用测定最大给药量的方法研究该受试药的急性毒性,给药浓度达到便于灌胃的最大浓度,同时采用动物能耐受的最大体积,对药物安全性进行评估。本实验采用小鼠灌胃给药途径,以动物能耐受的最大药物浓度、最大体积,连续两次给药,作为辣木叶超微粉急性毒性评价的最高剂量。同时,考察了辣木叶、种子提取物在该剂量和剂量加倍情

况下的急性毒性反应情况。

【参考文献】

- [1] 中国科学院《中国植物》志编辑委员会.中国植物志(第34卷)[M].北京:科学出版社,1999:6.
- [2] 庄杏枚.辣木,三大杀手的天然克星[J].健康之路,2015(1):53-61.
- [3] 苏科巧,陶亮,黄艾祥.辣木食品研究进展[J].农产品加工·综合刊,2015(1):72-74.
- [4] 陈奇.中药药理研究方法学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:2.
- [5] 闫荟,孙晓迪,刘守成,等.海金护卫散微粉对小鼠抗炎及镇痛作用[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):157-159.

[收稿日期] 2016-03-15 [修回日期] 2017-04-20

[本文编辑] 李睿旻