

变异白色红花总黄酮提取物安全性毒理学评价

童文, 杨晓, 胡尚钦, 叶霄, 张骞方, 孙佩*

四川省农业科学院经济作物育种栽培研究所, 成都 610300

摘要: 本文通过急性毒性试验、三项遗传毒性试验和 30 d 喂养试验, 对变异白色红花总黄酮提取物(TFES) 进行安全性毒理学评价。结果表明, TFES 对小鼠急性毒性试验, $LD_{50} > 10.0 \text{ g/kg} \cdot \text{BW}$, 按急性毒性剂量分级, 属实际无毒物质; 三项遗传毒性试验即 Ames 试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验、小鼠精子畸形试验结果均为阴性; TFES 对大鼠 30 d 喂养试验, 动物未见明显的中毒症状和死亡, TFES 各剂量组大鼠体重、总食物利用率、血清生化指标、血液学指标、脏器系数指标以及病理组织学等指标与对照组比较, 无显著性差异。TFES 在本实验条件下, 未观察到明显毒性作用, 为其进一步开发应用提供了安全依据。

关键词: 变异白色红花; 总黄酮; 急性毒性; 遗传毒性; 30 d 喂养试验

中图分类号: R114

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.2.006

Toxicological Safety Evaluation of Total Flavones Extract from White Safflower Variety

TONG Wen, YANG Xiao, HU Shang-qing, YE Xiao, ZHANG Qian-fang, SUN Pei*

Industrial Crop Research Institute, Sichuan Academy of Agriculture Sciences, Sichuan Chengdu 610300, China

Abstract: Acute toxicity test, three genetic toxicity tests and 30 days oral toxicity test were carried out to evaluate the toxicological safety of total flavones extract from white safflower variety (TFES). Mice acute toxicity test showed the LD_{50} of TFES was higher than $10.0 \text{ g/kg} \cdot \text{BW}$. TFES belonged to actually non-toxic substances according to the acute toxicity dosage classification. Three genetic toxicity tests including Ames, Mice Bone Marrow Cell Micronucleus and Mice Sperm Abnormality showed negative results. Rats 30 days oral toxicity test of TFES showed no evident poisoning symptom and no death. There was no significant difference between different dosage groups of TFES and control group on animal weight, food utility, hematology, bio-chemistry, organ/body weight ratio and several indexes of pathological organization. Therefore, TFES had no toxicity which provided a secure basis for its further development and application.

Key words: white safflower variety; total flavones; acute toxicity; hereditary toxicity; 30 days oral toxicity test

红花是菊科红花属植物栽培种, 学名 *Carthamus tinctorius* L., 以红色花冠入药。红花的主要有效成分为黄酮类化合物, 且黄酮类化合物是花色形成的物质基础^[1]。作者在红花品种选育过程中, 获得了花冠表现为白色的突变体材料, 以下简称白花。花色的变异提示所含黄酮成分发生了变化。经四川大学测定, 白花中总黄酮及山柰酚-3-O-芸香糖苷(一种黄酮单体)的含量分别是红花的 2.7 倍和 33.8 倍^[2]。一般认为植物黄酮作为天然的保健原料对人体几乎有益无害^[3,4]。但也有文献报道一些黄酮

类化合物具有潜在的毒副作用^[5,6]。目前对红花的安全性评价研究主要集中在红花提取物以及以红花为组方的药品的动物毒性试验^[7,8], 均显示红花无毒性作用。且红花列于卫生部规定的可用于保健食品原料名单中, 研究表明红花食用安全。白花和红花花色性状不同, 黄酮类成分组成不同^[9], 含量大幅度提高, 对白花的安全性评价未见报道。本文对白花总黄酮提取物进行了急性毒性试验、三项遗传毒性试验和 30 d 喂养试验, 为合理开发利用白花总黄酮提取物资源以及保健应用提供可靠的理论依据。

收稿日期: 2015-10-09 接受日期: 2015-12-03

基金项目: 四川省“十二五”农作物及畜禽育种攻关(2011NZ0098-12-01); 四川省“十二五”财政(基因)育种工程(2011JYGC02-006); 四川省财政创新能力提升工程青年基金(2013QNJJ-004)

* 通讯作者 E-mail: sunpei210@163.com

1 材料与方法

1.1 受试物制备

作者前期以总黄酮含量为指标, 优选了白花提

取工艺。取白花 1.0 kg, 60% 乙醇 15 kg, 加热回流提取 2 次, 每次 30 min, 过滤, 合并滤液, 减压浓缩, 干燥得白花总黄酮提取物 (TFES) 401 g。经测定提取物中总黄酮含量达 40.25%。参考《中国药典》^[10] 中红花的用法用量为 3~10 g, 按每人每天 8 g 的药材量, 根据收膏率, 暂定 TFES 成人推荐量 3 g/d。实验时称取 TFES 样品加蒸馏水溶解配制所需浓度。

1.2 实验动物

KM 小鼠, 125 只, 其中体重 18~22 g 50 只 (雌雄各半)、体重 25~30 g 50 只 (雌雄各半)、体重 28~35 g 25 只 (雄性), 湖北省实验动物研究中心提供 (许可证号: SCXK < 鄂 > 2008-0005)。SD 大鼠, SPF 级, 80 只, 体重 45~65 g (雌雄各半), 上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供 (许可证号: SCXK < 沪 > 2013-0016)。实验动物饲养于华中科技大学同济医学院实验动物中心 (温度 20~25 °C, 明暗光照交替 12 h/d, 相对湿度 40%~70%, 设施许可证号为 SYXK < 鄂 > 2010-0057), 饲料均由武汉市万千佳兴生物科技有限公司提供, 生产许可证号: SCXK (鄂) 2011-0011。

1.3 主要仪器与试剂

1.3.1 主要仪器

Microlab 300 半自动生化分析仪, 荷兰威图科学公司; Gen5 多功能酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司 (BioTek); BC2800 血球计数仪, 迈瑞公司; LEICA-1850 切片仪, 德国 TENK; 5810R 低温高速离心机, 德国 Eppendorf; Forma 995 超低温冰箱, 美国 Thermo Fisher; HR40-II A2 生物安全柜, 海尔; 隔水式恒温培养箱; DM500 显微镜, 德国 LEICA; BSA2245S-CW 电子天平, 瑞士 Sartorius。

1.3.2 主要试剂

环磷酰胺 (0.2 g, 江苏恒瑞医药股份有限公司), 血清生化试剂盒 (GPT、GOT、BUN、Glu、Cre、TC、TG、TP、Alb, 北京中生物生物工程高技术公司)。

1.4 试验方法

1.4.1 小鼠急性毒性试验 (Horn's 法)

50 只 KM 小鼠 (雌雄各半, 体重 18~21 g), 按体重随机分为 5 组, 每组 5 雌 5 雄。受试物 (TFES) 剂量设 5 个剂量组: 0.464、1.00、2.15、4.64、10.0 g/kg · BW。各组小鼠灌胃前隔夜停食 16 h 后, 一次性经口灌胃给予受试物, 灌胃容量为 0.4 mL/20 g · BW。灌胃后连续观察 14 d, 记录各组动物的中毒

反应情况和死亡只数, 查表求 LD₅₀; 解剖死亡小鼠, 初步确定死因。

1.4.2 Ames 试验 (平皿掺入法)

以多氯联苯 (PCB) 诱导的大鼠肝微粒体酶 (S9, 经 2-氨基苄鉴定合格) 作为体外代谢活化系统, 鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型突变株 TA97、TA98、TA100、TA102 经 his⁻、ΔuvrB、rfa、R 因子、PAQI 质粒、自发回变等鉴定合格后, 在 37 °C, 120 rpm 的条件下培养 10 h, 菌数达到 1 × 10⁹ CFU/mL 后备用。

受试物 (TFES) 设 5 个剂量组: 5000、2500、1250、625、312 μg/皿。称取 TFES 样品加超纯水溶解定容, 过滤除菌 (Millipore, 0.2 μm) 配制受试物。采用平皿掺入法在顶层培养基中加入加入 0.1 mL 试验菌株增菌液、0.1 mL 不同浓度的受试物溶液和 0.5 mL S9 混合液 (当需要代谢活化时), 混匀后倒入底层培养基上, 37 °C 培养 48 h, 计数每皿菌落数。同时设自发回变、空白对照 (0.1 mL/皿试验菌株增菌液)、溶剂对照 (0.1 mL/皿超纯水) 和 4 个阳性对照 (1.5 μg/皿叠氮钠、50 μg/皿敌克松、10 μg/皿 2-氨基苄、50 μg/皿 1,8-二羟基蒽醌)。各剂量组和对照组均设三个平行皿, 并在相同条件下重复一次。

1.4.3 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验

50 只 KM 小鼠 (雌雄各半, 体重 25~30 g), 按体重随机分为 5 组, 每组 5 雌 5 雄。受试物 (TFES) 设 3 个剂量组: 2.5、5.0、10.0 g/kg · BW, 同时设溶剂对照组 (蒸馏水)、阳性对照组 (40 mg/kg · BW 环磷酰胺)。各组均用 30 h 两次灌胃给受试物法, 即两次给受试物间隔 24 h, 每次灌胃容量为 0.4 mL/20 g · BW。第二次给受试物后 6 h, 颈椎脱臼处死动物, 取胸骨髓涂片, 甲醇固定, Giemsa 染色, 油镜镜检 200 个嗜多染红细胞 (PCE) 计数其与成熟红细胞 (NCE) 的比值 (PCE/NCE), 再观察 1000 个嗜多染红细胞 (PCE) 中的微核数, 计算微核率。

1.4.4 小鼠精子畸形试验

25 只 KM 雄性小鼠 (体重 28~35 g), 按体重随机分为 5 组, 每组 5 只。受试物 (TFES) 设 3 个剂量组: 2.5、5.0、10.0 g/kg · BW, 同时设溶剂对照组 (蒸馏水)、阳性对照组 (40 mg/kg · BW 环磷酰胺)。各组小鼠连续 5 d 经口灌胃给予受试物或对照物, 每天一次, 每次灌胃容量为 0.4 mL/20 g · BW, 再继续喂养 30 d 后颈椎脱臼处死, 取两侧副睾涂片, 甲醇固定, 伊红染色, 高倍镜下镜检每片 1000 个精子

中各种畸形精子的数量,并计算精子畸形率。

1.4.5 大鼠 30d 喂养试验

80 只 SD 大鼠(40 雌 40 雄)适应性喂养 5 d 后,按体重随机分为 4 组(每组 10 雌 10 雄)。受试物(TFES)设低、中、高 3 个剂量组:1.25、2.50、5.00 g/kg·BW(拟定人体重为 60 kg,分别为人体推荐摄入量的 25、50、100 倍)。受试物以饲料掺入的方式给予(大鼠日摄食量按其体重的 10% 折算,低、中、高三剂量组饲料中受试物掺入的比例分别为 1.25%、2.50% 和 5.00%,即分别将 156.25、312.5、625 g 受试物与 12343.75、12187.5 g 和 11875 g 饲料混合均匀,大鼠自由进食),连续喂养 30 d。同时设基础饲料喂养为对照组。试验期间,各组大鼠单笼饲养,自由进食和饮水,每天观察并记录动物的一般表现、行为、中毒表现和死亡情况,每周称一次体重(包括始重和末重)和 2 次食物摄入量,计算周进食量和食物利用率。试验结束时,各组动物隔夜停食,次日称

重,断头处死后大体解剖,取脏器称重并作为对照组和高剂量组的肝、肾、胃肠、脾、卵巢和睾丸病理切片检查;断头取血作血常规分析和血清生化指标的测定,计算总进食量和总食物利用率。

1.5 试验数据统计

计量资料采用方差分析和 Q 检验(两两比较),计数资料采用 X^2 检验(SAS 软件包)。

2 结果与分析

2.1 急性毒性试验

白花总黄酮提取物(TFES)各剂量组,喂养 14 d 期间,观察均未发现有明显中毒反应,也无一例死亡(表 1)。结果表明,白花总黄酮提取物对雌、雄性小鼠的半数致死剂量(急性毒性)经口 LD_{50} 均大于 10.00 g/kg·BW,超过人体推荐剂量的 100 倍。按急性毒性剂量分级,白花总黄酮提取物属实际无毒物质。

表 1 白花总黄酮提取物对小鼠的急性毒性($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effect of TFES on mice acute toxicity($\bar{x} \pm s, n=5$)

| 性别 Sex | TFES 剂量 TFES dose (g/kg·BW) | 初始体重 Initial body weight | 末期体重 Final body weight | 死亡数 No. of death | LD_{50} (g/kg·BW) |
|-----------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------|------------------------|
| 雌 Female | 0.46 | 19.5 ± 1.4 | 29.7 ± 1.1 | 0 | > 10.00 |
| | 1.00 | 19.6 ± 1.3 | 29.9 ± 1.2 | 0 | |
| | 2.15 | 19.8 ± 1.4 | 29.3 ± 0.6 | 0 | |
| | 4.64 | 19.6 ± 1.4 | 29.3 ± 0.6 | 0 | |
| | 10.00 | 19.7 ± 1.3 | 29.4 ± 1.4 | 0 | |
| 雄 Male | 0.46 | 19.9 ± 1.1 | 35.2 ± 1.4 | 0 | > 10.00 |
| | 1.00 | 20.3 ± 1.5 | 35.2 ± 2.1 | 0 | |
| | 2.15 | 20.1 ± 1.3 | 34.2 ± 2.3 | 0 | |
| | 4.64 | 19.7 ± 1.2 | 35.9 ± 1.6 | 0 | |
| | 10.00 | 20.1 ± 1.2 | 34.9 ± 1.3 | 0 | |

2.2 遗传毒性试验

2.2.1 Ames 试验

白花总黄酮提取物在 Ames 试验平皿掺入法的两次重复检测中(表 2、表 3),各浓度加与不加 S9 活化系统,各平皿内回变菌落数均在正常值范围内,没有超过自发回变菌落数的 2 倍,也没有明显的剂量-效应关系,表明白花总黄酮提取物 Ames 试验结果为阴性,无致突变性。

2.2.2 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验

白花总黄酮提取物三剂量组与溶剂对照组的 PCE/NCE 均在正常值范围内(表 4)。三剂量组微核率与同性别的溶剂对照组微核率相比,无显著性

差异($P > 0.05$),也没有表现出明显的剂量-反应关系;但与同性别的阳性对照组相比,均有极显著性差异($P < 0.001$)。该结果表明,白花总黄酮提取物小鼠骨髓微核试验为阴性。

2.2.3 小鼠精子畸形试验

白花总黄酮提取物三剂量组的小鼠精子畸形率与溶剂对照组相比(表 5),无显著性差异($P > 0.05$),无剂量-反应关系或相对于溶剂对照组的剂量关系;三剂量组和溶剂对照组精子畸形率均极显著低于环磷酸胺对照组($P < 0.001$)。该结果表明受试物对小鼠精子畸形试验为阴性。

表 2 第一次 Ames 试验掺入法结果($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 2 Ames test results for the first time($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 Group | 剂量 Dose ($\mu\text{g}/\text{皿}$) | TA97 | | TA98 | | TA100 | | | |
|--|--|---------------|---------------|---------------|--------------|----------------|---------------|---------------|----------------|
| | | -S9 | +S9 | -S9 | +S9 | -S9 | +S9 | -S9 | |
| 白花总黄酮提取物 TFES | 5000 | 148 \pm 4 | 154 \pm 4 | 44 \pm 3 | 42 \pm 2 | 159 \pm 3 | 156 \pm 4 | 262 \pm 2 | 258 \pm 3 |
| | 2500 | 145 \pm 5 | 151 \pm 4 | 42 \pm 3 | 43 \pm 4 | 153 \pm 2 | 152 \pm 2 | 258 \pm 3 | 262 \pm 3 |
| | 1250 | 148 \pm 5 | 149 \pm 2 | 42 \pm 3 | 44 \pm 3 | 152 \pm 3 | 154 \pm 3 | 262 \pm 3 | 257 \pm 2 |
| | 625 | 148 \pm 5 | 154 \pm 3 | 42 \pm 2 | 43 \pm 3 | 153 \pm 6 | 156 \pm 3 | 226 \pm 4 | 260 \pm 3 |
| | 312 | 148 \pm 6 | 151 \pm 3 | 41 \pm 4 | 41 \pm 3 | 154 \pm 4 | 152 \pm 2 | 258 \pm 3 | 260 \pm 4 |
| 空白对照 Blank Control | - | 146 \pm 5 | 150 \pm 4 | 42 \pm 3 | 41 \pm 4 | 152 \pm 2 | 155 \pm 2 | 259 \pm 3 | 263 \pm 3 |
| 溶剂对照 Solvent Control | | 148 \pm 6 | 148 \pm 3 | 42 \pm 5 | 43 \pm 3 | 151 \pm 4 | 154 \pm 4 | 257 \pm 3 | 261 \pm 4 |
| 自发回变 Spontaneous mutation | | 152 \pm 3 | 153 \pm 3 | 44 \pm 3 | 45 \pm 4 | 154 \pm 3 | 155 \pm 4 | 263 \pm 2 | 263 \pm 3 |
| 叠氮钠 NaN ₃ | 1.5 | | | | | 3010 \pm 108 | | | |
| 敌克松 Dexon | 50 | 2629 \pm 98 | | 1059 \pm 76 | | | | 1018 \pm 35 | |
| 2-氨基芴 2-AF | 10 | | 880 \pm 117 | | 182 \pm 14 | | 1048 \pm 81 | | |
| 1,8-二羟基蒽醌 1,8-Dihydroxy anthraquinone | 50 | | | | | | | | 1848 \pm 162 |

表 3 第二次 Ames 试验掺入法结果($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 3 Ames test results for the second time($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 Group | 剂量 Dose ($\mu\text{g}/\text{皿}$) | TA97 | | TA98 | | TA100 | | | |
|--|--|----------------|---------------|---------------|--------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| | | -S9 | +S9 | -S9 | +S9 | -S9 | +S9 | -S9 | |
| 白花总黄酮提取物 TFES | 5000 | 144 \pm 3 | 152 \pm 2 | 40 \pm 2 | 43 \pm 3 | 153 \pm 3 | 152 \pm 2 | 254 \pm 4 | 255 \pm 6 |
| | 2500 | 148 \pm 6 | 151 \pm 3 | 42 \pm 2 | 43 \pm 4 | 151 \pm 2 | 154 \pm 3 | 253 \pm 2 | 254 \pm 3 |
| | 1250 | 150 \pm 7 | 151 \pm 4 | 42 \pm 3 | 45 \pm 1 | 150 \pm 2 | 155 \pm 2 | 256 \pm 3 | 255 \pm 4 |
| | 625 | 153 \pm 5 | 152 \pm 4 | 44 \pm 2 | 47 \pm 2 | 153 \pm 2 | 153 \pm 3 | 252 \pm 3 | 254 \pm 3 |
| | 312 | 151 \pm 2 | 152 \pm 5 | 36 \pm 3 | 43 \pm 4 | 152 \pm 3 | 153 \pm 2 | 252 \pm 2 | 256 \pm 3 |
| 空白对照 Blank Control | - - - | 150 \pm 2 | 152 \pm 3 | 39 \pm 3 | 44 \pm 3 | 149 \pm 2 | 157 \pm 3 | 251 \pm 3 | 254 \pm 3 |
| 溶剂对照 Solvent Control | | 149 \pm 3 | 153 \pm 2 | 41 \pm 1 | 40 \pm 3 | 149 \pm 3 | 154 \pm 3 | 250 \pm 4 | 255 \pm 3 |
| 自发回变 Spontaneous mutation | | 154 \pm 3 | 155 \pm 5 | 44 \pm 2 | 45 \pm 3 | 154 \pm 3 | 154 \pm 3 | 256 \pm 4 | 257 \pm 2 |
| 叠氮钠 NaN ₃ | 1.5 | | | | | 2956 \pm 104 | | | |
| 敌克松 Dexon | 50 | 2663 \pm 100 | | 1052 \pm 97 | | | | 1991 \pm 44 | |
| 2-氨基芴 2-AF | 10 | | 960 \pm 155 | | 171 \pm 18 | | 1042 \pm 51 | | |
| 1,8-二羟基蒽醌 1,8-Dihydroxy anthraquinone | 50 | | | | | | | | 1656 \pm 96 |

2.3 30 d 喂养试验

2.3.1 动物一般表现

试验期间,各组动物没有发现异常的行为表现,也没有出现明显中毒反应,无一例死亡。

2.3.2 对大鼠每周体重、总食物利用率的的影响

白花总黄酮提取物各剂量组大鼠在体重增长、总进食量及食物利用率等指标上与对照组相比(表

6、表 7),无显著性差异($P > 0.05$)。

2.3.3 白花总黄酮提取物对大鼠血清生化指标的影响

白花总黄酮提取物各剂量组和两对照组的各项血清生化指标均在正常值范围内(表 8)。方差分析和两两比较结果表明:各剂量组与相应性别的对照组相比,血清各项生化指标均无显著性差异。

表4 白花总黄酮提取物对小鼠骨髓微核发生率的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 4 Effect of TFES on mice bone marrow cell micronucleus rate($\bar{x} \pm s, n=5$)

| 性别 Sex | 组别 Group | 剂量 Dose (g/kg·BW) | PCE/NCE | 受检 PCE 数 Examined PCE | 微核数 No. of micronucleus cell | 微核率 Rate of micronucleus (%) |
|-----------|-----------------------|-------------------------|---------|-----------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 雌 Female | 溶剂对照 Solvent Control | 0 | 1.12 | 1000 × 5 | 12 | 2.0 ± 1.6 |
| | 环磷酰胺 Cyclophosphamide | 0.04 | 0.90 | 1000 × 5 | 190 | 38.0 ± 14.6 |
| | 白花总黄酮提取物 TFES | 2.5 | 1.11 | 1000 × 5 | 13 | 3.0 ± 1.4 |
| | | 5.0 | 1.11 | 1000 × 5 | 11 | 2.0 ± 1.3 |
| | | 10.0 | 1.12 | 1000 × 5 | 13 | 3.0 ± 1.7 |
| 雄 Male | 溶剂对照 Solvent Control | 0 | 1.15 | 1000 × 5 | 14 | 3.0 ± 1.4 |
| | 环磷酰胺 Cyclophosphamide | 0.04 | 0.93 | 1000 × 5 | 199 | 40.0 ± 17.5 |
| | 白花总黄酮提取物 TFES | 2.5 | 1.14 | 1000 × 5 | 15 | 3.0 ± 1.3 |
| | | 5.0 | 1.16 | 1000 × 5 | 15 | 3.0 ± 1.6 |
| | | 10.0 | 1.14 | 1000 × 5 | 15 | 3.0 ± 1.6 |

表5 白花总黄酮提取物对小鼠精子畸形发生率的影响

Table 5 Effect of TFES on mice sperm abnormality rate

| 组别 Group | 剂量 Dose (g/kg·BW) | 受检 精子数 Examined Sperms | 畸形数(个) Sperm abnormality No. | | | | | | | 合计 Total | 畸形率 Rate of sperm abnormality (%) |
|-----------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------|---------------|-------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|-------------|---|
| | | | 无定形 Irregular shape | 无钩 No hook | 香蕉形 Banana | 胖头 Fat head | 尾折叠 Tail overlapped | 双头 Double head | 双尾 Double tail | | |
| 溶剂对照 Solvent Control | 0 | 1000 × 5 | 37 | 30 | 28 | 17 | 2 | 0 | 0 | 114 | 2.28 |
| 环磷酰胺 Cyclophosphamide | 0.04 | 1000 × 5 | 97 | 92 | 40 | 34 | 4 | 0 | 0 | 267 | 5.34 |
| 白花总黄酮提取物 TFES | 2.5 | 1000 × 5 | 38 | 33 | 26 | 17 | 2 | 0 | 0 | 116 | 2.32 |
| | 5.0 | 1000 × 5 | 39 | 30 | 25 | 19 | 0 | 1 | 0 | 114 | 2.28 |
| | 10.0 | 1000 × 5 | 37 | 30 | 28 | 18 | 0 | 0 | 0 | 113 | 2.26 |

表6 白花总黄酮提取物对大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 6 Effect of TFES on rats weight($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 性别 Sex | TFES 剂量 TFES dose (g/kg·BW) | 始重 Initial body weight (g) | 7d (g) | 14d (g) | 21d (g) | 30d (g) | 末期空腹体重 Final body weight (g) |
|-----------|-----------------------------------|----------------------------------|----------|----------|----------|----------|------------------------------------|
| 雌 Female | 0 | 71 ± 6 | 121 ± 8 | 148 ± 6 | 173 ± 5 | 193 ± 10 | 192 ± 10 |
| | 1.25 | 72 ± 6 | 118 ± 7 | 147 ± 10 | 169 ± 7 | 190 ± 6 | 189 ± 6 |
| | 2.50 | 72 ± 6 | 118 ± 10 | 145 ± 10 | 167 ± 15 | 189 ± 13 | 188 ± 12 |
| | 5.00 | 72 ± 6 | 116 ± 6 | 148 ± 7 | 170 ± 7 | 190 ± 10 | 188 ± 10 |
| | 雄 Male | 0 | 78 ± 6 | 140 ± 11 | 180 ± 14 | 213 ± 10 | 254 ± 17 |
| 雌 Female | 1.25 | 78 ± 6 | 137 ± 4 | 176 ± 12 | 214 ± 13 | 252 ± 14 | 251 ± 4 |
| | 2.50 | 78 ± 5 | 133 ± 8 | 170 ± 11 | 210 ± 16 | 254 ± 22 | 255 ± 24 |
| | 5.00 | 78 ± 5 | 132 ± 11 | 171 ± 9 | 208 ± 9 | 253 ± 7 | 253 ± 8 |

表 7 白花总黄酮提取物对大鼠总食物利用率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 7 Effect of TFES on rats total food utilization rate ($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 性别 Sex | TFES 剂量 TFES dose (g/kg · BW) | 体重增重 Rat weight growth (g) | 总进食量 Total food intake (g) | 每周食物利用率 Food utilization in each week (%) | | | | 总食物利用率 Total food utilization (%) |
|-----------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--|-------------|------------|------------|---|
| | | | | 1-7 d | 8-14 d | 15-21 d | 22-30 d | |
| 雌 Female | 0 | 122 ± 9 | 590 ± 30 | 36.7 ± 2.5 | 21.0 ± 4.4 | 16.2 ± 4.7 | 11.7 ± 5.1 | 20.6 ± 1.1 |
| | 1.25 | 118 ± 10 | 588 ± 20 | 36.5 ± 4.2 | 20.5 ± 9.7 | 14.6 ± 6.2 | 12.6 ± 3.2 | 20.0 ± 1.7 |
| | 2.50 | 117 ± 12 | 593 ± 36 | 37.7 ± 7.4 | 20.8 ± 10.3 | 15.2 ± 9.7 | 12.4 ± 2.4 | 19.7 ± 2.2 |
| | 5.00 | 118 ± 8 | 583 ± 25 | 38.4 ± 7.6 | 21.1 ± 5.5 | 13.9 ± 4.7 | 12.7 ± 4.2 | 20.2 ± 1.6 |
| 雄 Male | 0 | 177 ± 15 | 702 ± 25 | 43.2 ± 4.9 | 23.8 ± 4.5 | 20.2 ± 5.8 | 18.4 ± 6.1 | 25.2 ± 2.7 |
| | 1.25 | 174 ± 10 | 707 ± 33 | 45.0 ± 4.4 | 22.4 ± 5.0 | 21.9 ± 9.9 | 16.9 ± 4.2 | 24.7 ± 1.9 |
| | 2.50 | 176 ± 21 | 698 ± 16 | 46.9 ± 5.3 | 23.0 ± 4.1 | 21.6 ± 7.9 | 19.1 ± 5.5 | 25.2 ± 3.2 |
| | 5.00 | 175 ± 5 | 706 ± 32 | 45.4 ± 9.6 | 22.9 ± 6.5 | 20.5 ± 3.2 | 19.8 ± 2.4 | 24.9 ± 1.7 |

表 8 白花总黄酮提取物对大鼠血生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 8 Effect of TFES on rats serum biochemical indexes ($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 性别 Sex | TFES 剂量 TFES dose (g/kg · BW) | GPT (U/L) | GOT (U/L) | BUN (mmol/L) | Glu (mmol/L) | TG (mmol/L) | TC (mmol/L) | TP (g/L) | Alb (g/L) | Cre (μmol/L) |
|-----------|-------------------------------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|-------------|--------------|-----------------|
| 雌 Female | 0 | 51.9 ± 3.8 | 216.4 ± 23.9 | 5.76 ± 1.48 | 4.72 ± 0.52 | 0.60 ± 0.07 | 2.18 ± 0.25 | 61.9 ± 6.6 | 47.5 ± 2.3 | 54.5 ± 12.2 |
| | 1.25 | 48.5 ± 8.9 | 216.4 ± 23.8 | 6.00 ± 1.50 | 4.92 ± 0.27 | 0.66 ± 0.07 | 2.04 ± 0.24 | 64.4 ± 9.4 | 46.9 ± 2.9 | 38.1 ± 5.2 |
| | 2.50 | 48.3 ± 6.1 | 219.7 ± 25.8 | 5.48 ± 1.24 | 4.81 ± 0.38 | 0.70 ± 0.10 | 2.24 ± 0.25 | 60.4 ± 7.2 | 45.7 ± 4.4 | 38.0 ± 6.3 |
| | 5.00 | 49.7 ± 7.1 | 212.1 ± 25.8 | 5.80 ± 1.88 | 4.79 ± 0.50 | 0.64 ± 0.13 | 2.13 ± 0.34 | 65.5 ± 10.3 | 48.1 ± 3.3 | 56.9 ± 5.3 |
| 雄 Male | 0 | 48.5 ± 4.3 | 202.1 ± 15.0 | 6.48 ± 1.45 | 4.72 ± 0.41 | 0.66 ± 0.12 | 2.12 ± 0.27 | 72.7 ± 7.1 | 48.8 ± 2.2 | 47.5 ± 7.0 |
| | 1.25 | 50.6 ± 4.1 | 206.4 ± 30.7 | 6.06 ± 1.81 | 4.86 ± 0.51 | 0.62 ± 0.12 | 2.16 ± 0.22 | 74.0 ± 7.1 | 49.3 ± 2.5 | 45.4 ± 13.5 |
| | 2.50 | 50.2 ± 7.5 | 205.8 ± 19.4 | 5.89 ± 0.95 | 4.79 ± 0.45 | 0.60 ± 0.10 | 2.07 ± 0.27 | 70.5 ± 7.9 | 48.1 ± 2.8 | 50.7 ± 2.9 |
| | 5.00 | 49.0 ± 5.4 | 209.3 ± 5.1 | 6.61 ± 1.41 | 4.60 ± 0.49 | 0.70 ± 0.09 | 2.01 ± 0.35 | 72.8 ± 7.5 | 47.6 ± 5.1 | 48.9 ± 11.0 |

2.3.4 白花总黄酮提取物对大鼠血常规指标的影响

白花总黄酮提取物各剂量组和两对照组的各项

血液学指标均在正常值范围(表9),且各组间各项指标均无显著性差异,表明白花总黄酮提取物对大鼠的血常规指标没有影响。

表 9 白花总黄酮提取物对大鼠血常规指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 9 Effect of TFES on rats hematology indexes ($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 性别 Sex | TFES 剂量 TFES dose (g/kg · BW) | RBC ($10^{12}/L$) | Hb (g/L) | WBC ($10^9/L$) | LY (%) | NE (%) | MO (%) |
|-----------|-------------------------------------|------------------------|-------------|---------------------|------------|------------|------------|
| 雌 Female | 0 | 7.29 ± 0.15 | 152.0 ± 5.0 | 10.5 ± 1.8 | 74.6 ± 2.5 | 22.6 ± 1.5 | 2.8 ± 1.5 |
| | 1.25 | 7.42 ± 0.33 | 151.0 ± 6.0 | 10.6 ± 3.6 | 70.2 ± 5.2 | 26.6 ± 4.9 | 3.2 ± 1.4 |
| | 2.50 | 7.35 ± 0.52 | 149.0 ± 7.0 | 9.1 ± 1.6 | 71.6 ± 3.8 | 25.8 ± 3.8 | 2.57 ± 0.4 |
| | 5.00 | 7.23 ± 0.58 | 148.0 ± 7.0 | 11.6 ± 2.3 | 70.8 ± 6.2 | 26.0 ± 6.3 | 3.0 ± 0.7 |
| 雄 Male | 0 | 7.12 ± 0.38 | 148.0 ± 7.0 | 11.3 ± 2.8 | 74.8 ± 2.9 | 22.6 ± 2.4 | 2.7 ± 0.8 |
| | 1.25 | 6.82 ± 0.69 | 154.0 ± 7.0 | 10.6 ± 2.3 | 74.2 ± 2.5 | 23.2 ± 2.4 | 2.6 ± 0.3 |
| | 2.50 | 7.17 ± 0.29 | 149.0 ± 6.0 | 10.1 ± 2.0 | 74.1 ± 4.5 | 23.4 ± 4.0 | 2.6 ± 0.5 |
| | 5.00 | 7.36 ± 0.60 | 149.0 ± 8.0 | 10.5 ± 3.2 | 77.1 ± 5.8 | 20.4 ± 5.3 | 2.5 ± 0.7 |

2.3.5 白花总黄酮提取物对大鼠脏器系数的影响

白花总黄酮提取物各剂量组和两对照组的各项脏器比指标均在正常值范围(表 10),且各组间无显

著性差异,表明白花总黄酮提取物对大鼠的脏器系数没有影响。

表 10 白花总黄酮提取物对大鼠脏器系数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 10 Effect of TFES on rats organ/body weight ratio($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 性别 sex | TFES 剂量 TFES Dose (g/kgBW) | 心/体 Heart/body weight(%) | 肝/体 liver/body weight(%) | 肾/体 Kidney/body weight(%) | 脾/体 Spleen/body weight(%) | 睾丸或卵巢/体 Testes or ovaries/ body weight(%) |
|-----------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---|
| 雌 Female | 0 | 0.40 ± 0.03 | 2.95 ± 0.12 | 0.85 ± 0.06 | 0.24 ± 0.03 | 0.52 ± 0.06 |
| | 1.25 | 0.41 ± 0.04 | 2.95 ± 0.15 | 0.83 ± 0.06 | 0.26 ± 0.04 | 0.53 ± 0.12 |
| | 2.50 | 0.40 ± 0.04 | 2.93 ± 0.17 | 0.82 ± 0.06 | 0.27 ± 0.04 | 0.51 ± 0.12 |
| | 5.00 | 0.41 ± 0.04 | 3.02 ± 0.22 | 0.83 ± 0.07 | 0.25 ± 0.02 | 0.51 ± 0.08 |
| 雄 Male | 0 | 0.44 ± 0.03 | 3.25 ± 0.44 | 0.88 ± 0.10 | 0.31 ± 0.08 | 10.23 ± 0.58 |
| | 1.25 | 0.42 ± 0.03 | 3.40 ± 0.38 | 0.90 ± 0.05 | 0.31 ± 0.06 | 10.33 ± 0.85 |
| | 2.50 | 0.43 ± 0.08 | 3.25 ± 0.31 | 0.86 ± 0.07 | 0.32 ± 0.15 | 10.12 ± 0.83 |
| | 5.00 | 0.41 ± 0.02 | 3.31 ± 0.16 | 0.88 ± 0.04 | 0.31 ± 0.10 | 10.04 ± 0.54 |

2.3.6 解剖和组织病理学检查

两对照组和各剂量组脏器外观颜色和大小没有发现异常,也没有发现明显的渗出、增生、水肿或萎缩等病变。

显微镜下肝细胞呈多角形,以中央静脉为中心呈放射状排列,细胞胞膜清晰,核内有 1~2 个核仁。正常对照组 1 例肝轻度炎性细胞浸润(雄性 1 例),2 例肝轻度脂变性(雌性、雄性各 1 例);高剂量组轻度炎性细胞浸润有 2 例(雌性),另有肝细胞轻度脂肪变性 1 例(雄性)。

肾脏在显微镜下包膜完整,肾小球毛细血管丛未见出血或萎缩,基底膜正常。肾近曲小管上皮细胞嗜酸而丰满,核圆清晰;远曲小管细胞染色较淡,管腔整齐。肾间质没有发现炎性细胞浸润或纤维结缔组织的增生。

显微镜下胃肠没有发现粘膜、粘膜下、肌层和浆膜层的出血、坏死或炎性细胞的浸润等病变。脾红髓、白髓(脾小体)在显微镜下清晰可见,没有发现包膜肿胀、脾小体萎缩及造血灶被抑制等病理性改变。卵巢病检中可发现各级卵泡的存在,没有发现萎缩等病变;睾丸曲细精管内各级生精细胞依层次排列,并可见成熟精子。

解剖和组织病理学检查结果表明,两对照组与高剂量组肝脏均出现基本相同的病理改变,但病变均较轻微,且组间没有显著性差异,表明这种病理改变并非由受试物引起。因此,在试验期间,红花白色突变体黄酮提取物没有引起试验大鼠肝、肾、脾、胃

肠及卵巢和睾丸明显的病理改变。

3 结论

白花总黄酮提取物急性毒性试验结果表明其 $LD_{50} > 10.0 \text{ g/kg} \cdot \text{BW}$,属实际无毒物质,Ames 试验、小鼠微核试验与精子畸形试验结果均为阴性。大鼠 30 d 喂养试验中,测定结果显示各项生理、生化指标均在正常值范围内波动,病理切片中也没有发现有与受试物有关的毒性问题,未发现该受试物有明显的毒性。据文献报道白花中的高含量黄酮成分—山柰酚-3-O-芸香糖苷具有改善痴呆症状和记忆保护的作用,并对脑细胞缺血性损伤具有保护作用^[11,12]。白花总黄酮提取物开发具有“辅助改善记忆”功能的保健食品有一定的潜力。

致谢:华中科技大学同济医学院保健食品功能学检测中心协助完成该研究。

参考文献

- 1 Tong W (童文), Sun P (孙佩), Yang X (杨晓), *et al.* Study on relativity of safflower color and hydroxysafflor yellow A. *Southwest China J Agric Sci* (西南农业学报), 2011, 24: 101-104.
- 2 Yu D (于丹), Cheng YS (成禹杉), Hu SQ (胡尚钦), *et al.* Determination of total flavonoids and kaempferol-3-O-rutinoside in Safflower produced in Sichuan and Safflower variety named white flower. *West China J Pharm Sci* (华西药学杂志), 2010, 25: 751-753.
- 3 Wu YL (吴雨龙), Hua C (华春), Fu QQ (扶庆权), *et al.*

- Acute and genetic toxicity of total flavonoids extract of *Artemisia selengensis*. *Food Sci* (食品科学), 2014, 7:206-210.
- 4 Chen T(陈涛), Song HP(宋红萍), Chen JL(陈镜楼). Studies on the optimization purity conditions and oral toxicity of total flavonoids in *Rosa rugosa* Thunb. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2014, 25:2105-2107.
 - 5 Lu BY(陆柏益), Zhang Y(张英), Wu XQ(吴晓琴). Advances in studies on potential toxicity of flavonoids. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2006, 31:533-537.
 - 6 Yang Y(杨阳), Zhou GQ(周桂琼), Wang ZY(王再勇), et al. Comparison in protective effects of six flavonoids against hepatotoxins-induced cytotoxicity. *Chin J New Drugs Chin Rem*(中国新药与临床杂志), 2011, 30:289-293.
 - 7 Yang Q(杨庆), Liang RX(梁日欣), Ye JX(叶锦霞), et al. Experimental study on function of decreasing blood-Lipid in hyperlipidemia rats and safety by extract of *Flos Carthami*. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2007, 13(11):30-33.
 - 8 Xu CY(徐彩云), Zhang DW(张大维), Bing GQ(邢国强), et al. Lipid-lowering effect and safety assessment of the compound safflower buck capsule in laboratory rats. *Lab Animal Sci*(实验动物科学), 2010, 27(5):29-32.
 - 9 Sun P(孙佩), Zhao CY(赵春艳), Tong W(童文), et al. Study on HPLC fingerprint of white safflower variety extract. *Southwest China J Agric Sci*(西南农业学报). Accepted.
 - 10 Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 142.
 - 11 Zhang L(张磊). Protective effect and mechanism of nicotiflorin on vascular dementia. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University(沈阳药科大学), MSc. 2005.
 - 12 Huang JL(黄金灵). Protective effect and mechanism of nicotiflorin on multi-infarct dementia. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University(沈阳药科大学), MSc. 2006.
-
- (上接第 246 页)
- 3 Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2013. 93-94.
 - 4 Zhang WF(张旺凡), Yu ZW(喻祖文). The main active ingredient comparison of *Ganoderma lucidum* carpophore and mycelium and broken-down wall hypha. *Acta Chin Med and Pha*(中医学), 2008, 36(5):39.
 - 5 Zheng LY(郑林用), Wei W(魏巍), Xu XY(许晓燕), et al. Preliminary study of fermentation technology of Ling Dan fungal substance. *Lishizhen Med and Mat Med Res*(时珍国医国药), 2011, 22:653-656.
 - 6 Zhang ZL(张志良), Qu WJ(瞿伟菁), Li XF(李小方). Test Instruction of Plant Physiology(植物生理学试验指导). Beijing: Higher Education Press, 2009. 102.
 - 7 Cai JX(蔡建秀). Total antioxidant flavonoids extract research of different types *Eriobotrya japonica*, stem, fruit. *J Quanzhou Nor Uni*(泉州师范学院学报), 2010, 28(4):55-59.
 - 8 Luo MH(罗美红), Lv H(吕寒), Li WL(李维林). Determination of triterpenoid acid in loquat leaves. *Jiangsu Agric Sci*(江苏农业科学), 2011, 39:549-550.
 - 9 Ministry of Health, People's Republic of China(中华人民共和国卫生部). National standard of food safety-the determination of protein in foods. GB 5009.5-2010, 2010, 3.
 - 10 Li N(李楠). Study on the stability of flavonoids from gold lotus. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2011, 32(11):76-77.
 - 11 Wang HX(王贺祥). Edible Mycology(食用菌学). Beijing: China Agricultural University Press, 2004. 41.
 - 12 Li WT(李文涛), Yu MY(余梦瑶), Wei W(魏巍), et al. Variation of substance content during growth cycle of cultured *Ganoderma lucidum* and its mechanism. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2014, 45:552-557.
 - 13 Zhou XW(周选围), Lin J(林娟), Li QZ(李奇璋), et al. Study progress on bioactive proteins from *Ganoderma* spp. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2007, 19:917-924.