

Experimental Research on Acute Toxicity and Anti-Fatigue Function of Wolfberry Maca Capsules

Lianhua Lu

Shandong Center for Disease Control and Prevention, Jinan, Shandong, 250000, China

Abstract

Objective: To study the acute toxic effect of wolfberry maca capsules on experimental mice and alleviate physical fatigue. **Methods:** Healthy mice of the Kunming species were selected, and their safety was evaluated by the acute toxicity maximum tolerance test and their efficacy was evaluated by the physical fatigue relief test, which provided a theoretical basis for their application. **Results:** The maximum tolerable dose of acute toxicity was >15 g/kg.bw, which was equivalent to 300 times of the daily dose in adults; the physical fatigue test could significantly prolong the weight-bearing swimming time, reduce serum urea production, increase hepatic glycogen reserve and decrease the area under the blood lactate curve in mice compared with the blank control. **Conclusion:** Mice gavage adult clinical daily dosage of 300 times the sample, the animal did not show any toxic reaction, indicating that the Chinese wolfberry maca capsule is safe for consumption; alleviate physical fatigue function test, compared with the blank control, the sample has significant alleviation of physical fatigue function.

Keywords

Maca; selenium; traditional Chinese medicine; safety; fatigue

枸杞玛咖胶囊急性毒性和抗疲劳功能实验研究

卢连华

山东省疾病预防控制中心, 中国·山东 济南 250000

摘要

目的: 研究枸杞玛咖胶囊对实验小鼠的急性毒性作用和缓解体力疲劳作用。**方法:** 选择昆明种健康小鼠, 采用急性毒性实验最大耐受量法评价其安全性, 采用缓解体力疲劳试验评价其功效作用, 为其应用提供理论依据。**结果:** 急性毒性实验动物最大耐受量 > 15 g/kg.bw, 相当于成人临床日用量的 300 倍; 缓解体力疲劳试验与空白对照比较, 样品能明显延长小鼠的负重游泳时间、减少小鼠运动时血清尿素生成、增加小鼠肝糖原储备、减少血乳酸曲线下面积。**结论:** 小鼠灌胃成人临床日用量的 300 倍样品, 动物未出现任何毒性反应, 表明枸杞玛咖胶囊食用安全; 缓解体力疲劳功能试验, 与空白对照比较, 样品具有显著的缓解体力疲劳功能。

关键词

玛咖; 硒; 中药; 安全性; 疲劳

1 引言

硒 (Se) 是人体生命活动中所必需的微量元素^[1], 其是人体多种蛋白质、酶的重要组成部分^[2-3]。大量研究表明^[4-7], 硒在维持正常的生命活动中有着极其重要的作用。硒无法通过机体自身合成, 必须从外界摄取。目前, 常用的补硒制剂主要有无机硒化合物和有机硒化合物, 有机硒因其毒性低、生物活性强、生物利用度高、吸收率高而直接提高组织硒含量^[8], 被广泛应用。富硒酵母为最常用的有机硒补充剂。玛咖为十字花科 (Brassicaceae) 独行菜属 (Lepidium) 一年生草本植物, 2011 年被中国批准为新资源食品, 具有抗疲劳、改善性功能、提高

生育力等作用^[9]。中医药认为, 玛咖药性微温, 味甘、辛, 归肾、肝、脾经, 具有补肾益精, 强筋壮骨, 疏肝健脾之效^[10]。现代研究认为^[11], 很多传统中药如枸杞、西洋参、人参、红景天等都具有增强机体运动耐力和促进机体疲劳恢复等作用。论文研究筛选文献报道中缓解体力疲劳作用强的淫羊藿、西洋参、枸杞, 传统工艺提取制成提取物, 再与新资源食品玛咖和硒营养素组方制成胶囊, 观察该胶囊急性毒性及抗疲劳作用。

2 材料与试剂

2.1 试验药物

富硒酵母 (硒含量 1000ppm) 购置于安琪酵母股份有限

公司,玛咖粉购置于沈阳伊人宝生化制品有限公司,淫羊藿提取物、枸杞提取物均为中药水提取物,购自南京泽朗生物工程有限公司,西洋参提取物为乙醇提取,总皂苷含量10%,枸杞宣城城市百草药业有限公司。试验药物以上述原料进行组方制成胶囊,每1000粒配方中富硒酵母10g、淫羊藿提取物22g、西洋参提取物25g、枸杞提取物28.7g、玛咖粉330g,填充剂为微晶纤维素制成枸杞玛咖胶囊,0.5g/粒,人推荐用量每日2次,每次3粒,每人按60kg体重计,相当于每日0.05g/kg.bw。

2.2 动物

SPF级健康小鼠,体重18~22g,由山东大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号SCXK(鲁)20090001。

2.3 主要仪器、试剂

动物天平、电子天平、铅皮、电动玻璃匀浆器、低速离心机、分光光度计、旋转蒸发仪、游泳箱、恒温水浴锅、玻璃器皿、一次性定量取血管、试管、离心管、微量加样器、手术器械。测定尿素氮、肝糖原和血乳酸的试剂盒均由中国南京建成生物公司提供。

3 方法

3.1 毒性实验研究

取样品内容物25g,用蒸馏水溶解,定容至100ml。(1)急性毒性实验:选用昆明种健康小鼠6~8周龄,30只,雌雄各半,体重18~22g。分为3组,每组10只,第1组每天给药2次,间隔8h;第2组每天给药3次,间隔8h;第3组每天给药4次,间隔6h。小鼠每次灌胃量为0.20ml/10g.bw。实验过程中禁食、不禁水12~16h。然后按常规饲养,观察小鼠外观、行为活动、呼吸、分泌物、排便、死亡等情况并连续称体重7天,若死亡数 \geq 30%,则进行半数致死量(LD₅₀)的测定,若不足以引起死亡,则测定最大耐受量,观察7d。(2)最大耐受量(MTD):急性毒性试验选用最大耐受剂量法。选用18~22g昆明种健康小鼠20只,雌雄各半。试验前禁食12h,不禁水。以0.20ml/10g.bw容量灌胃3次,灌胃后,连续观察小鼠14d,记录小鼠中毒表现和死亡情况。

3.2 负重游泳试验

取小鼠40只,雌雄各半,适应性喂养3d,随机分为4组,空白对照,枸杞玛咖胶囊低、中、高剂量,分别相当于人体推荐量的5倍、10倍、30倍,即各组小鼠每日食用量分别为

0.25g/kg.bw、0.5g/kg.bw、1.5g/kg.bw,灌胃体积按0.20ml/10g.bw,空白对照组灌服等体积去离子水。每日灌胃一次,连续给予30d。在末次给予受试样品30min后,将尾根部负荷5%体重铅皮的小鼠分别置于游泳箱中游泳,水深35cm,水温25°C \pm 1.0°C。用秒表记录小鼠自游泳开始至死亡的时间,即小鼠的负重游泳时间。

3.3 血清尿素测定

末次给予受试物后30min后,各组小鼠在温度30°C的水中不负重游泳90min。捞出擦干,休息60min后,摘眼球采血0.5ml,置4°C冰箱约3h,血凝固后2000rpm/min离心15min。取血清按试剂盒说明操作,根据标准管浓度及相应吸光度计算各小鼠血清中尿素氮含量。

$$\text{尿素 (mmol/L)} = \frac{\text{测定管吸光度} - \text{空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}} \times \text{标准管浓度 (10mmol/L)} \times \text{样品测试前的稀释倍数 (1倍)}$$

3.4 肝糖原测定

末次给予受试物30min后处死动物,取肝脏经生理盐水漂洗后用滤纸吸干,精确称取肝脏100mg。按试剂盒说明取碱液300 μ L,加入试管中,沸水浴煮20min,流水冷却,制成糖原水解液。在糖原水解液中加入9.6ml蒸馏水,制成1%肝糖原检测液,按照试剂盒说明书操作进行肝糖原测定。

$$\text{肝糖原含量 (mg/100g)} = \frac{\text{测定管吸光度}}{\text{标准管吸光度}} \times \text{标准管含量 (0.01mg)} \times \text{样本测试前稀释倍数 (100倍)} \times 10 \div 1.11 \times 100$$

3.5 血乳酸测定

末次给予受试样品30min后,用经抗凝剂肝素处理过的毛细管从小鼠眼内眦采血20 μ L,放入EP管,各管加入120 μ L蛋白沉淀剂,轻轻颠倒混匀,静置10min,3500r/min离心8min,取上清液进行乳酸测定。第一次取血后,让小鼠在温度为30°C的水中不负重游泳10min,取出小鼠后立即从内眦采血20 μ L,小鼠安静休息20min后再采血20 μ L,操作同上。按照试剂盒说明书操作,根据标准管浓度和吸光度值按下式计算不同时间血乳酸含量:

$$\text{血乳酸含量 (mg/L)} = \frac{\text{测定管吸光度} - \text{空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}} \times \text{标准浓度 (3mmol/L)} \times \text{样本测试前稀释倍数 (7倍)} \times 90.08$$

血乳酸曲线下面积 = 5 × (游泳前血乳酸值 + 3 × 游泳后 0min 血乳酸值 + 2 × 游泳后休息 20min 血乳酸值)

3.6 实验数据统计

实验所得数据均为数值变量资料。所有数据均经 SPSS 统计软件进行方差分析。方差齐用方差分析，方差不齐用秩和检验。

4 结果

4.1 枸杞玛咖胶囊急性毒性

4.1.1 小鼠一般情况及主要脏器情况观察

表 1 急性毒性实验小鼠一般情况观察

组别	饮食	外观	行为	分泌物	排泄物	死亡
空白组	正常	正常	正常	正常	正常	0
给药组	正常	正常	正常	正常	正常	0

枸杞玛咖胶囊一次性口服给药后 24h 内未见小鼠死亡，连续观察 7d 无异常情况，未测算出半数致死量 (LD₅₀)。最大耐受剂量 (MTD) 实验测定枸杞玛咖胶囊剂量分级标准属无毒级。肉眼连续观察 14d，小鼠未出现不良反应情况和死亡，将小鼠脱颈椎处死，解剖并仔细观察心、肝、脾、肺、肾等主要脏器，结果未见脏器肿大、萎缩、坏死等异常现象。小鼠的进食、饮水、外表行动，分泌物，排泄物情况均正常。

4.1.2 实验小鼠体重变化情况

表 2 MTD 实验小鼠体重变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	性别	动物数 (只)	给药后体重 (g)			
			0d	3d	7d	14d
空白组	雄性	10	20.4 ±1.66	23.4 ±1.22	26.2 ±1.22	32.1 ±1.81
	雌性	10	20.2 ±2.33	23.4 ±1.85	26.4 ±2.20	30.4 ±1.95
给药组	雄性	10	21.2 ±1.40	23.6 ±1.52	26.4 ±1.84	31.4 ±1.89
	雌性	10	21.4 ±1.88	24.2 ±1.45	27.0 ±1.70	33.2 ±1.56

由表 2 可见，给药后的第 0、3、7、14 天，分别称量小鼠体重，体重均有不同程度的增长，两组小鼠体重差异无统计学意义 (P > 0.05)。

枸杞玛咖胶囊急性毒性在测不出 LD₅₀ 的情况下，进行了最大耐受量研究，每天给药 3 次的最大给药剂量，体重均有不同程度的增长，实验结束后对小鼠进行大体病理学观察，未发现有明显病理改变，实验过程动物无死亡。枸杞玛咖胶囊对小鼠的 MTD > 15g/kg.bw，相当于成人临床日用量的 300 倍，结果证明动物完全能耐受，未出现任何毒性反应，

表明枸杞玛咖胶囊食用是安全的。

4.2 枸杞玛咖胶囊对小鼠负重游泳时间的影响

表 3 对小鼠负重游泳时间、运动时血清尿素、运动后肝糖原含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	剂量 (g/kg)	负重游泳时间 (s)	血清尿素 (mmol/L)	肝糖原 (mg/100g)
空白对照组	10	/	770.4 ±359.4	9.85 ±0.94	1207.58 ±94.53
枸杞玛咖胶囊	10	0.25	1000.8 ±442.8	9.01 ±1.14	1284.53 ±92.00
枸杞玛咖胶囊	10	0.5	1220.4 ±492*	9.04 ±1.17	1294.67 ±115.93
枸杞玛咖胶囊	10	1.5	1517.4 ±577.2**	8.69 ±1.25*	1480.86 ±133.37**

与空白组比较，*P < 0.05，**P < 0.01 (下同)

由表 3 可见，经口给予小鼠不同剂量样品 30 天，与空白对照比较，0.5、1.5g/kg 剂量组小鼠的负重游泳时间明显延长 (P > 0.05、P > 0.01)，1.5g/kg 剂量组小鼠血清尿素含量显著降低 (P > 0.05)，肝糖原含量显著升高 (P > 0.01)。

4.3 枸杞玛咖胶囊对小鼠运动后血乳酸水平的影响

表 4 对小鼠三个时间点血乳酸含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	剂量 (g/kg)	游泳前 (mg/L)	游泳后 0min (mg/L)	游泳后休息 20min (mg/L)
空白对照组	10	/	422.81 ±55.81	960.87 ±47.72	907.63 ±57.75
枸杞玛咖胶囊	10	0.25	402.34 ±56.14	917.17 ±42.05*	863.54 ±47.30*
枸杞玛咖胶囊	10	0.5	420.30 ±52.94	915.77 ±55.70*	850.63 ±59.56*
枸杞玛咖胶囊	10	1.5	399.01 ±54.69	912.02 ±34.21*	845.62 ±22.68**

由表 4 可见，经口给予小鼠不同剂量样品 30 天，小鼠游泳前血乳酸含量无显著性差异 (P > 0.05)。与空白对照比较，小鼠游泳后 0min 和休息 20min 的血乳酸含量 0.25、0.5、1.5g/kg 剂量组均有显著性差异 (P > 0.05、P > 0.01)。

表 5 对小鼠三个时间点血乳酸曲线下面积的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	剂量 (g/kg)	血乳酸曲线下面积
空白对照组	10	/	25603.45 ±1294.30
枸杞玛咖胶囊	10	0.25	24404.67 ±958.17*
枸杞玛咖胶囊	10	0.5	24344.42 ±1499.11*
枸杞玛咖胶囊	10	1.5	24131.42 ±796.47**

由表 5 可见，经口给予小鼠不同剂量样品 30 天，与空白对照比较，小鼠三个时间点血乳酸曲线下面积 0.25、0.5、1.5g/kg 剂量组均有显著性差异 (P > 0.05、P > 0.01)。

5 讨论

硒是谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的组成物质和维持酶活性的重要组成成分^[12]。1973年世界卫生组织确认,硒是人和动物活动必需的微量元素,适量补充硒可有效预防多种疾病的发生^[13]。富硒酵母是利用生物工程技术将无机硒与酵母细胞中的蛋白质和糖类等大分子物质结合起来得到有机态的硒,具有高效和低毒的优点^[14]。玛咖为近年来缓解体力疲劳功能研究的热点品种,其原产于海拔3000~4000m的自然环境较为恶劣的南美安第斯山区,含有丰富的蛋白质、氨基酸、矿物质、多糖等营养物质和生物碱活性成分,具有较好地缓解体力疲劳的作用^[15]。中药在运动疲劳中具有独特的优势,其通过调节身体的阴阳脏腑平衡达到提高抗运动疲劳作用,具有促进疲劳恢复的功效。复方中药用于缓解体力疲劳的种类比较集中,包括补气类、补血类、补阳类、补阴类、理气活血类,使用频次较高的药物是人参、西洋参、当归、枸杞、淫羊藿等^[16]。

中医认为,疲劳属于“劳”“虚劳”的范畴,表现为运动中的气虚、阴虚之症;运动后的气虚血瘀、阴虚内热之症。《内经·素问·举痛论》言:“劳则气耗”,即劳动或运动可导致机体阳气不足而引发肢软乏力、神疲倦怠。现代研究认为,疲劳是人体神经系统对缺氧及其它分泌物质的堆积较为敏感,加之能量物质的消耗和内脏器官功能的下降,所以脑细胞指挥协调工作的能力也在不断下降,疲劳也就因此而产生^[17]。

本品以富硒酵母、玛咖粉、枸杞提取物、淫羊藿提取物、西洋参提取物为原料进行组方,急性毒性实验结果表明,该制剂小鼠MTD大于15g/kg.bw,相当于成人临床日用量的300倍,动物未出现任何毒性反应,表明枸杞玛咖胶囊食用是安全的。缓解体力疲劳动物实验,经口给予小鼠不同剂量枸杞玛咖胶囊30天,能明显延长小鼠的负重游泳时间、减少小鼠运动时血清尿素生成、增加小鼠肝糖原储备、减少血乳酸曲线下面积,表明样品具有缓解体力疲劳功能。

参考文献

[1] 熊婵,黎庆,马庆伟.人体微量元素检测方法及临床应用的研究进

展[J].中国全科医学,2018(08):888-895.

- [2] Combs G F.Selenium in global food systems[J].Br.J.Nutr,2001(85):517-547.
- [3] Carey A M,Lombi E,Donner E,et al. A review of recent developments in the speciation and location of arsenic and selenium in rice grain [J].Anal.Bioanal.Chem,2012(402):3275-3286.
- [4] 常海波,孙凤春,楚玉彪.微量元素硒与人体健康的研究[J].世界元素医学,2006(02):22-23.
- [5] 文志高.元素与人体免疫力[J].世界元素医学,2007(01):41-42.
- [6] 史丽英.人体必需微量元素—硒[J].微量元素与健康研究,2005(04):61-63.
- [7] 孟惠平,吕明.微量元素硒的抗衰老作用研究[J].微量元素与健康研究,2008(05):62-64.
- [8] 王海娜.有机硒对小鼠生殖生理功能影响的研究[D].贵阳:贵州大学,2009.
- [9] 沈维治,邹宇晓,林光月,等.玛咖抗疲劳作用及活性组分研究[J].食品与生物技术学报,2014(07):721-726.
- [10] 费文婷,侯燕,王玉杰,等.玛咖性温健脾及对脾虚小鼠线粒体能量代谢酶的影响[J].北京中医药大学学报,2018(07):559-566.
- [11] 顿耀山,石月,彭晓庐,等.中药运动营养补剂作用机制的研究进展[J].食品科学,2013(15):415-423.
- [12] 周敦激.浅析微量元素硒对运动性疲劳的影响[J].安徽体育科技,2005(04):75-76+79.
- [13] 朱慧,邵雷,陈代杰,等.富硒酵母中硒赋态的研究[J].工业微生物,2016(06):59-64.
- [14] 晏传奇,张彦,李咏.富硒酵母的药理作用研究进展[J].微量元素与健康研究,2011(01):56-59.
- [15] 邱良武,王路,王丽,等.玛咖对一次力竭运动小鼠抗疲劳作用及T-SOD、肝糖原的影响[J].昆明医科大学学报,2016(06):18-20.
- [16] 顿耀山,石月,彭晓庐,等.中药运动营养补剂作用机制的研究进展[J].食品科学,2013(15):415-423.
- [17] 陈补林.运动性疲劳的产生机理及其恢复[J].科技资讯,2017(23):207-208+210.