

藏药齐如巴的急性毒性研究

拉毛草¹, 占堆^{1*}, 陈静¹, 魏荣锐²

(1. 西藏藏医药大学, 西藏 拉萨 850000; 2. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004)

摘要:目的: 藏药齐如巴系唇形科植物密花香薷。通过评价齐如巴的急性毒性, 为临床应用提供理论依据。方法: 昆明小鼠灌胃齐如巴提取物的体内毒理实验。结果: 取昆明种小鼠 60 只, 雌雄各半, 按体质量将其随机均匀分为 6 组, 每组 10 只, 5 组给药组, 1 组空白组。给药前 16 h 开始禁食不禁水, 根据之前预试验设计剂量, 以 120.45、108.40、97.56、87.81、79.03 g/kg 的剂量进行灌胃给药, 空白组灌胃双蒸水。给药后 3 h 内严密观察, 详细观察并记录每组小鼠症状及是否出现耸毛、眯眼、步履蹒跚、肌肉瘫痪、呼吸急促、抽搐及大小便失禁等现象, 之后连续观察 14 d, 每天观察 1 次并记录小鼠外观、行为活动状态、排泄情况、中毒症状、死亡时间, 死亡小鼠主要脏器外观以及死亡只数, 并根据改进寇氏法 $\{LD_{50} = \lg^{-1} [Xm-i (\Sigma P-0.5)]\}$ 计算药物半数致死量 LD_{50} 。藏药齐如巴 $LD_{50} = 96.54$ g/kg, 95% 置信区间为 92.14~101.16 g/kg, 可以认为藏药齐如巴的毒性较低或无毒。结论: 藏药齐如巴作为藏民族常用的药食同源药材, 建议进一步开发出具有多种医学保健功能的食品, 为人民健康服务。

关键词: 藏药齐如巴; 密花香薷; 急性毒性; 半数致死量

DOI: 10.11954/ytctyy.202301009

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

中图分类号: R29; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1673-2197(2023)01-0038-03



Study on Acute Toxicity of Tibetan Medicine Qiruba

La Maocao¹, Zhan Dui^{1*}, Chen Jing¹, Wei Rongrui²

(1. Tibetan Traditional Medicine University, Lhasa 850000, China;

2. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract: **Objective:** To evaluate the acute toxicity of *Elsholtzia Densa* Benth. extract by ingastric administration in Kunming mice, and to provide theoretical basis for clinical application. **Methods:** Toxicological experiment in vivo. **Results:** 60 kunming mice, half male and half female, were randomly and evenly divided into 6 groups according to body weight, 10 mice in each group, 5 groups of administration groups and 1 blank group. 16 h before administration, fasting can not help water, according to the previous pre-test design dose, with 120.45, 108.40, 97.56, 87.81, 79.03 g/kg dose gavage administration, and blank group gavage double distilled water. The symptoms of mice in each group were observed and recorded in detail within 3 h after administration, including shrunken hair, squint, stumbling, muscle paralysis, shortness of breath, convulsions, incontinence of urine and stool. After continuous observation for 14 days, the appearance of the main organs of the dead mice and the number of deaths were observed and recorded once day. LD_{50} of the drug was calculated according to the improved Kohl's method $\{LD_{50} = \lg^{-1} [Xm-i (\Sigma P-0.5)]\}$. **Conclusion:** The LD_{50} is 96.54 g/kg, 95% confidence interval is 92.14~101.16 g/kg. It can be considered that Tibetan medicine *Elsholtzia Densa* Benth. has low toxicity or non-toxic.

Keywords: Tibetan Medicine Qiruba; *Elsholtzia Densa* Benth.; Acute Toxicity; Half of Fatalities

齐如巴(ཅི་རུ་པ་)是香薷的藏文译名,在藏医药中药食同源的历史悠久,最早记载于《月王药诊》(公元7世纪)的创伤治法章节中,云:“齐如巴用于撕裂、损伤、跌打损伤诸症,须迅速剖刺放血,火灸施治。牛尾蒿、雪山贝母、熊胆、银粉背蕨、糖、香薷、紫花苜

蓿、喜马拉雅紫茉莉、独活根、乳酪诸药调匀贴敷。”^[1]藏民族的生活习俗中以其作灌肠佐料,也作调料使用。

藏医将齐如巴分为黄(赛保)、黑(那保)两类,黑者(那保)又分为紫(木保)、蓝(翁保)两种^[2],其中紫

收稿日期: 2022-07-13

基金项目: 西藏自治区自然科学基金(XZ-zyzbz-ysty-2022)

作者简介: 拉毛草(1997—),女,西藏藏医药大学硕士研究生,研究方向为藏医药学。E-mail: 1574764427@qq.com

通讯作者: 占堆(1970—),男,西藏藏医药大学教授,研究方向为藏医药学。E-mail: zyxyleizhandui@sina.com

色为唇形科密花香薷 *Elsholtzia densa* Benth.。生长于海拔 1 500~4 500m 的林缘、田间、溪边,为一年生草本植物,微香^[3]。《妙音本草》记载:“齐如巴叶片如扇子,果如青金石神树,其味涩而略带苦,藏地田间有生长,煮菜吃时治培根,罨敷疮伤能止血,贴敷牙上能杀虫。”^[4]

查阅文献可知,藏医临床使用和藏医药古籍文献记载的含藏药齐如巴的方剂相对较少,但其功效广泛,资源较丰富,具有一定的临床应用价值。如《四部医典藏药配方大全》中记载的五味小檗眼药膏和两味香薷散治疗眼病,九味酸藤果丸治疗皮肤瘙痒和皮肤虫,十一味香薷散具有驱虫作用,两味香薷散可治疗伤口感染和防虫,十二味香薷散用于医治蛇毒和蜂毒、蝎毒、虫毒,八味香薷散治疗脂肪性疝气、阴道虫病等^[5]。目前,该药在藏医临床用于治疗培根病,具有防止伤口感染、止血、镇痛、呕吐、气喘、驱口臭^[6]、杀虫、治肛门虫、胃虫、鼻炎、喉炎及寄生虫阴道虫病等症^[7],主治疳疮、脓症、皮肤瘙痒^[8]、食物中毒^[9]、消化不良等。现代研究发现,齐如巴具有消炎、抗菌、防腐、生肌、止痒、抗氧化、抗肿瘤、抗病毒等功效^[10-15],有较高的药用价值。基于藏药齐如巴为常用药食同源植物,本文就其急性毒性试验开展研究,为进一步深入研发齐如巴提供毒性数据依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器设备

粉碎机(DE-200g 型,浙江红景天工贸有限公司);超声清洗机(KQ-5200DB 型,昆山市超声波仪器有限公司);十万分之一电子天平(Sartorius BT 124S 型,赛多利斯);电动旋转蒸发仪(瑞士步琪公司);超纯水处理系统(德国默克密理博公司);超低温冰箱(808964-1601 型,美国 ThermoFisher 公司);制冰机(IMS-40 型,中科美菱低温科技有限责任公司);动物体重秤(YP20002 型,上海正光医疗仪器有限公司);移液枪(RAININ Pipet-lite XLS)。

1.2 药材

药材采集于西藏夺底沟,经西藏藏医药大学占堆教授鉴定为藏药齐如巴。

1.3 实验动物

SPF 级昆明种小鼠,体质量 18~22 g,购于江西中医药大学实验动物中心,并饲养于江西中医药大学中药资源与民族药研究中心的动物房。实验前动物于室内适应环境饲养 3 d,室内温度 25~26℃,自由饮水,喂辐射灭菌维持饲料,实验动物许可证编号:SCXK(赣)2018-0003。

2 方法学考察

2.1 齐如巴总提取物制备

取齐如巴干品,粉碎,以 3 倍量的 95%乙醇浸泡,加热回流提取 3 次,每次 3 h,过滤,合并药液,旋转蒸发浓缩至稠膏。取稠膏,用双蒸水配制密花香薷药液,浓度以生药量计算,最大浓度为 0.670 2 g/mL(通过 12 号小鼠灌胃针的最大浓度),存于 4℃ 冰箱备用。实验所用不同浓度药液,以此浓度药液稀释。

2.2 给药量测试

取小鼠 4 只,禁食不禁水 16 h,取“2.1”项下配制的齐如巴总提取物溶液(0.670 2 g/mL),给药体积为小鼠一次给药的极限体积(40 mL/kg),观察并记录小鼠外观毛色、活动状态、大小便、中毒及死亡等情况。

2.3 LD₅₀(半数致死量)测试

2.3.1 预实验 取小鼠 12 只,雌雄各半,随机均匀分为 3 组。禁食不禁水 12 h。第 1 组(试药浓度 0.670 2 g/mL,给药量按体质量计 0.4 mL/10 g)给药 1 h 内全部死亡;第 2 组(试药浓度 0.536 1 g/mL,给药量按体质量计 0.4 mL/10 g)给药 1 h 内死亡 2 只;第 3 组(试药浓度 0.428 9 g/mL,给药量按体质量计 0.4 mL/10 g)给药后无死亡,观察 14 d 无死亡。对死亡小鼠进行解剖发现:胃壁完整,胃内容物和胃壁为药液颜色,心肺正常,未见出血点、坏死灶;肝颜色暗红呈颗粒状,无明显肿胀;肾脏颜色正常,呈颗粒状;其他脏器未见明显异常。死亡小鼠的解剖情况大致相同。

表 1 藏药齐如巴 LD₅₀预实验结果

给药浓度 (g/mL)	灌胃量(按体质量计 mL/10 g)	总提取物给 药量(g/kg)	生药量 (g/kg)	结果
0.670 2	0.4	26.81	120.45	1 h 内,全部死亡
0.536 1	0.4	21.45	96.36	1 h 内,半数死亡
0.428 9	0.4	17.16	77.09	无死亡

2.3.2 急性毒性实验 取小鼠 60 只,雌雄各半,称定体质量,按体质量随机均匀分为 6 组,每组 10 只(雌雄各半)。给药 5 组,1 组空白组。给药前 16 h 禁食不禁水,以 120.45、108.40、97.56、87.81、79.03 g/kg(以生药量计)的剂量分别灌胃给药,空白组灌胃双蒸水。给药 3 h 内严密观察,记录每组小鼠症状及是否出现耸毛、眯眼、步履蹒跚、肌肉瘫痪、呼吸急促、抽搐、大小便失禁、中毒症状、死亡时间、死亡只数、死亡小鼠主要脏器外观等现象,连续观察 14 d。根据改进寇氏法 $[LD_{50} = \lg^{-1}[Xm-i(\Sigma P-0.5)]]$ 计算药物半数致死量 LD₅₀。

2.4 实验结果

2.4.1 齐如巴总提取物给药量的测定 以浓度120.45 g/kg的齐如巴总提取物溶液灌胃,1 h内小鼠精神萎靡,行动迟缓,全部死亡;解剖观察小鼠心脏、脾脏、肺脏、胃、肠系、睾丸、卵巢等脏器的外观大小、颜色、质地等均无明显改变,但肝脏、肾脏均呈颗粒状改变。故可对密花香薷提取物做后续 LD_{50} 测试。

预实验中测出引起小鼠100%死亡的最小给药剂量(D_m 为120.45 g/kg),0死亡率的最大给药剂量77.09 g/kg。据以上结果,以120.45 g/kg为最高剂量组,以下各组以1.00:0.9剂量递减至79.03 g/kg,设计5个剂量组,分别为79.03、87.81、97.56、108.40、120.45 g/kg的生药给药量。

表2 藏药齐如巴 LD_{50} 测试剂量 (g/kg)

组别	总提物给药量	需生药给药量
1	17.59	79.03
2	19.54	87.81
3	21.71	97.56
4	24.13	108.40
5	26.81	120.45

2.4.2 齐如巴总提取物 LD_{50} 测试 (1)小鼠毒性反应症状。小鼠出现症状如下:灌胃给药后,各剂量组小鼠均表现为行动迟缓、卧伏、双目微闭、自发性活动减少、精神萎靡等,且剂量越大,情况越严重。高剂量组在30~60 min开始出现死亡现象,且死亡前均出现四肢无力、瘫卧不动、呼吸急促且微弱症状,随药物剂量增大,死亡数量增多。

(2)小鼠死亡数目及时间。灌胃给药后,最高剂量组小鼠全部死亡,死亡时间集中在灌胃1 h内;最低剂量组未出现死亡。用改进寇氏法计算小鼠灌胃齐如巴总提取物的 LD_{50} =96.54 g/kg(以生药量计),95%置信区间为92.14~101.16 g/kg。

表3 各组小鼠死亡数及死亡时间

组别	剂量 (g/kg)	鼠数 (只)	死亡数 (只)	死亡率 (%)	死亡时间				
					1h	2h	3h	12h	24h
1	79.03	10	0	0	0	0	0	0	0
2	87.81	10	1	10	0	0	1	0	0
3	97.56	10	7	70	2	2	0	3	0
4	108.40	10	8	80	7	0	1	0	0
5	120.45	10	10	100	4	5	1	0	0

(3)小鼠剖检结果。小鼠死亡后,立即对其进行解剖检查:胃壁完整,胃内容物和胃壁为黑青色,心肺正常,未见出血点、坏死灶;肝颜色暗红呈颗粒状,无明显肿胀;肾脏颜色正常;肠内容物与药液颜色同;其他脏器未见明显异常。各组死亡小鼠的解剖情况大致相同。观察到第14天,各组成活小鼠均活跃、饮食正常,且脱颈椎处死后解剖观察,肝、肾颜色

均正常,但各组均出现个别小鼠的肝、肾呈轻微颗粒状,其他脏器未发现异常。

3 讨论

本文对藏药齐如巴提取物进行急性毒性试验研究。分析实验数据,采用改进寇氏法得出齐如巴 LD_{50} 为96.54 g/kg(以生药量计算),95%置信区间为92.14~101.16 g/kg。目前对中药毒性的分级尚无统一规定,李建华在《中药类急性毒性技术与 LD_{50} 值的分级》中国际上分级一般为剧毒、高毒、中毒、低毒、微毒(实际无毒)等5种,美国以 $LD_{50}>15\ 000$ mg/kg为微毒或无毒物质^[16]。本研究中的齐如巴 $LD_{50}>15\ 000$ mg/kg,依上述依据可认为藏药齐如巴为微毒或无毒物质,即该藏药浸膏口服安全可靠。研究结论可为藏药齐如巴在药食两用的开发提供一定数据支持,为课题组后期拟开展相关的功能性食品研发奠定数据基础。

参考文献:

- [1] 马世林,毛续祖.月王药疹[M].上海:上海科学技术出版社,2012:133.
- [2] 蒂玛尔·丹增彭措.晶珠本草[M].北京:民族出版社,2005:341.
- [3] 嘎务.藏药晶镜本草[M].北京:民族出版社,2018:277.
- [4] 白若杂纳.妙音本草[M].西宁:青海人民出版社,2016:81.
- [5] 康萨·索朗其美.四部医典藏药配方大全[M].拉萨:西藏人民出版社,2010:205,295,538,544,651.
- [6] 卡其·达瓦昂嘎.月光[M].北京:民族出版社,2019:182.
- [7] 中国科学院西北高原生物研究所.藏药志[M].西宁:青海人民出版社,1991:229.
- [8] 杨竞生.迪庆藏药[M].昆明:云南民族出版社,1987:459.
- [9] 前然诺布.金穗本草[M].北京:人民出版社,2005:399.
- [10] 邵亚洲.密花香薷挥发油对当归害虫防治的活性物质研究[D].兰州:西北师范大学,2021.
- [11] 王发春,苏旭,韩鸿萍,等.青海密花香薷挥发油化学成分及其抗菌活性研究[J].青海师范大学学报(自然科学版),2020,36(3):63-68,799.
- [12] 张彦,李小峰,张寒,等.密花香薷挥发油抗菌与抗氧化活性研究[J].国际中医中药杂志,2018,40(7):645-648.
- [13] 石子林,李军乔,王雅琼,等.密花香薷多糖提取工艺优化及抗氧化活性研究[J].食品科技,2020,45(2):231-236.
- [14] 任秋蓉,王亚男,王玥,等.密花香薷总黄酮体外抗氧化及抗肿瘤活性研究[J].天然产物研究与开发,2017,29(1):231-236.
- [15] 刘艺,斯建勇,曹丽,等.密花香薷挥发油化学成分及其抗菌、抗病毒活性的研究[J].天然产物研究与开发,2012,24(8):1070-1074.
- [16] 李建华.中药类急性毒性技术与 LD_{50} 值的分级[J].中草药,1994,25(5):388-389.

(编辑:张 吟)