

多穗石柯叶提取物的急性毒性实验研究

陆武弟¹, 杨仕婷¹, 赵志文¹, 梁耀元², 韦能陆³, 李 津^{4▲}

(右江民族医学院 1.医学检验学院 2014 级本科 2.基础医学院 3.药学院 4.科技处, 百色 533000)

【摘要】 目的 对多穗石柯叶乙醇提取物的急性毒性进行研究,测定 SD 大鼠对多穗石柯叶乙醇提取物的最大耐受量(MTD)。方法 通过预实验得出多穗石柯叶乙醇提取物毒性不明显,无法测定出半数致死量(LD₅₀),故进行最大耐受量(MTD)的测定。将大鼠分为提取物组和空白组,实验前禁食不禁水 12 h;灌胃,定时观察并记录大鼠毒性反应和死亡情况,连续观察 14 d;每天称量体重,第 14 天后将大鼠处死进行解剖,观察心、肺、肝、脾、肾等主要脏器的变化,称量肝、脾重量。结果 提取物组大鼠的自主活动、体重变化以及有关脏器重量的变化情况与空白组大鼠比较差异无统计学意义($P>0.05$),试验期间未出现大鼠死亡。SD 大鼠对多穗石柯叶乙醇提取物的 MTD 为 9.34 g 提取物/kg。结论 多穗石柯叶乙醇提取物毒性较低,具有良好的食用安全性。

【关键词】 多穗石柯叶;急性毒性;最大耐受量

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1003-1383.2017.05.004

Experimental study of acute toxicity of extracts from leaves *Lithocarpus polystachyus*(DC.) Rehd

LU Wudi¹, YANG Shiting¹, ZHAO Zhiwen¹, LIANG Yaoyuan², WEI Nenglu³, LI Jin^{4▲}

(1. Undergraduate Class, Grade 2014 in College of Medical Laboratory, 2. College of Basic Medicine, 3. College of Pharmacy, 4. Science and Technology Department, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

【Abstract】 Objective To study the acute toxicity of the alcohol extracts from leaves of *Lithocarpus polystachyus*(DC.) Rehd, so as to measure the maximum tolerated dose (MTD) of SD rats. **Methods** In preliminary experiment, the alcohol extracts from leaves of *Lithocarpus polystachyus*(DC.) Rehd did not show obvious toxicity and the median lethal dose (LD₅₀) could not be measured. Therefore, the MTD was measured. Rats were divided into extract group and blank group. Before experiment, all rats were being fasted for 12 hours and fed with only water; they were given intragastric administration, then toxic reaction and death were observed and recorded regularly for continuous 14 d; rats were weighed everyday. 14 days later, the rats were killed and dissected, the changes of main organs such as heart, lung, liver, spleen and kidney were observed, and liver and spleen were weighed. **Results** There was no statistically significant difference in autonomic activities, weight change and change of relevant organ weights between the blank group and the extract group ($P>0.05$). No rat died during the experiment. The MTD of the alcohol extracts from leaves of *Lithocarpus polystachyus*(DC.) Rehd in SD rats was 9.34 g extract/kg. **Conclusion** Alcohol extracts from leaves of *Lithocarpus polystachyus*(DC.) Rehd has low toxicity, which is safe for food.

【Key words】 leaves of *Lithocarpus polystachyus*(DC.) Rehd; acute toxicity; MTD

多穗石柯为壳斗科石柯属植物^[1],别名甜茶、甜叶子树、大叶稠子、苕茶、多穗柯等,以野生形式零星

分布于我国长江以南各省区的低山密林中,其中以湖南中西部雪峰山一带洞口、隆回花瑶瑶山地区产

基金项目:广西壮族自治区大学生创新项目(201610599058)

作者简介:陆武弟,男,本科在读。E-mail:283935905@qq.com

▲通信作者:李 津。E-mail:502632940@qq.com

量最多。如今,我国的茶文化发展迅速,随着人们生活水平的不断提高,越来越多的茶叶在市场上畅销,多穗石柯叶作为一种新兴茶叶正式加入该行业。在以往的研究中,关于多穗石柯叶的研究文献资料甚少。目前的文献资料主要是对多穗石柯根皮苷成分^[2]以及总黄酮测定等方面进行相关报道,据李爱民等^[3]研究发现多穗石柯有生津止渴、消除疲劳之功效,多穗石柯为野生植物,在自然状态下植株高大、散生,采叶不便且产量有限,而多穗石柯叶作为一种新兴茶叶,其在毒理实验方面的研究偏少,有关其急性毒性实验方面的文献资料更是接近于零,这限制了其开发与利用。因此,本研究通过对多穗石柯叶乙醇提取物进行急性毒性实验研究,为其在饮品行业的发展与利用提供进一步参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级昆明种小鼠 10 只,雌雄各半,体重 18~22 g;健康 SD 大鼠 30 只,雌雄各半,体重(160±30)g,均购于右江民族医学院实验动物中心,许可证号:SCXK(桂)2012-0003。

1.1.2 主要仪器 RE-3000A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),FA1104 电子分析天平(上海天平仪器厂),HHS-21-4 电热式恒温水浴锅(江苏金坛宏凯仪器厂)。

1.1.3 实验药材及试剂 多穗石柯叶(购于广西百色德达茶叶有限责任公司),经乙醇提取成浸膏,临用前配置浓度为 0.467 g/ml;99%乙醇(山东济南汇丰达化工有限公司),实验时配置成所需浓度;生理盐水(规格:500 ml:4.5 g)。

1.2 实验方法

1.2.1 多穗石柯叶乙醇提取物的制备^[4] 将干燥的多穗石柯叶粉碎至粉末后,准确称取 200 g 干粉,按照料液比 1:10 加入 85%乙醇溶剂,采用超声波提取法回流提取 3 次,每次 1 h,滤过,合并滤液,经旋转蒸发仪减压浓缩,最后将浓缩液冷冻保存,实验时配置成所需浓度即可。

1.2.2 预实验^[5] 选取 10 只健康 SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,以苦味酸标记后分开称重并记录相应小鼠体重,禁食不禁水 12 h 后,给予灌胃可承受的体积 0.4 ml/10 g 体重,多穗石柯叶乙醇提取物的最

大浓度为 467 g/L 2 次/d,每次间隔 4 h,常规饲养,连续观察 1 周。结果显示:给药后小鼠行动较为迟缓,活动减少,多数处于静卧状态,饮食、饮水量下降,1 h 后恢复正常,观察周期内小鼠未出现死亡。无法测出该提取物的 LD₅₀,故进行多穗石柯叶乙醇提取物的最大耐受量(MTD)的测定。

1.2.3 MTD 的测定^[6] 选取健康 SD 大鼠 30 只,分为两组:多穗石柯叶乙醇提取物组(提取物组)和空白组,每组 15 只,实验前大鼠禁食但不禁水 12 h,提取物组以 467 g/L(最高浓度)的药液浓度,1 ml/100 g 体重灌胃给药 2 次/d,每次间隔 4 h,1 d 内给大鼠灌胃按含生药量计算为 9.34 g/kg 的多穗石柯叶乙醇提取物,给药后常规饲养;空白组给予生理盐水,连续观察 14 d。

1.2.4 观察项目 ①给药前称量大鼠的体重,给药后第 2 天起,每天称量大鼠体重 1 次。②观察给药后大鼠的精神状况、呼吸、食量、饮水量、大小便以及活动和存活情况。③记录各组大鼠的死亡情况,第 14 天后,处死大鼠,解剖观察大鼠心、肝、肺、脾、肾、胃及小肠等器官的变化。④称取大鼠肝、脾等脏器的重量并记录。若有大鼠死亡,则立即解剖观察其心、肝、肺、脾、肾、胃及小肠等器官的变化^[7]。

1.3 数据处理及统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件统计分析处理各组数据,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用两独立样本 *t* 检验,组内比较采用配对 *t* 检验,检验水准: $\alpha=0.05$,双侧检验。

2 结果

2.1 大鼠的一般反应情况 大鼠灌胃多穗石柯叶乙醇提取物药液后观察时间为 14 d,给药后 1 h 内多数大鼠活动减少,多数处于静卧状态,个别偶有觅食及饮水现象,其余大鼠并未出现异常现象。给药后第 2 天起,所有大鼠饮食、饮水皆正常,精神状态正常,活动并未出现异常,大小便也未见异常,14 d 的观察周期内大鼠无死亡,皮毛光泽,体重增长正常,空白组大鼠在观察周期内,饮食以及大小便等皆正常,体重增长也正常。

2.2 大鼠体重的变化 提取物组大鼠在灌服多穗石柯叶乙醇提取液后,其体重变化与空白组大鼠比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见表 1。

表 1 两组大鼠给药后体重的变化($n=15 \bar{x}\pm s$)

组别	灌胃剂量 ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	给药前体重(g)	给药后体重(g)			
			第 3 天	第 7 天	第 10 天	第 14 天
提取物组	9.34	127.90 $\pm$ 2.63	135.57 $\pm$ 2.49	140.25 $\pm$ 2.46	140.56 $\pm$ 4.17	154.10 $\pm$ 4.66
空白组	0.216	122.78 $\pm$ 3.93	136.01 $\pm$ 4.47	140.10 $\pm$ 3.98	142.11 $\pm$ 5.68	157.15 $\pm$ 6.29

2.3 组内不同时间大鼠体重变化的比较 空白组与提取物组内不同时间大鼠体重两两比较的结果如表 2 所示 在空白组的两两比较中 第 3、7、10、14 天与第 1 天 第 3、7、10 天与第 14 天 第 7 天与第 10 天 差异均有统计学意义。在提取物组的两两比较中 第 14 天与第 1、3、7、10 天 第 1 天与第 3 天 第 3 天与第 7 天 第 1 天与第 7、10 天 差异有统计学意义。

表 2 空白组与提取物组内不同时间大鼠体重比较的 P 值情况($n=15$)

空白组	第 14 天	第 10 天	第 7 天	第 3 天	提取物组	第 14 天	第 10 天	第 7 天	第 3 天
第 1 天	<0.001	0.002	0.004	<0.001	1 d	0.001	0.024	0.026	0.001
第 3 天	0.001	0.591	0.077		3 d	0.007	0.923	<0.001	
第 7 天	0.001	0.040			7 d	<0.001	0.075		
第 10 天	<0.001				10 d	<0.001			

2.4 大鼠有关脏器的重量变化 第 14 天解剖大鼠并肉眼观察脏器 其肝、肺、脾、肾的大小、形状、质地、表面均正常 胃及小肠内容物皆正常 其余未发

现异常 且提取物组大鼠与空白组大鼠的脏器重量比较 差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 两组大鼠给药后脏器质量的变化($n=15 \bar{x}\pm s$)

组别	灌胃剂量($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	肝	脾
提取物组	9.34	6.14 $\pm$ 0.23	0.44 $\pm$ 0.02
空白组	0.216	6.43 $\pm$ 0.46	0.47 $\pm$ 0.04

2.5 最大耐受量 SD 大鼠对多穗石柯叶乙醇提取物的最大耐受量为 9.34 g/kg。最大耐受量=药液最大浓度 $\times$ 灌胃体积 $\times$ 灌胃次数 即 0.467 g/ml $\times$ 0.01 ml $\times$ 2=0.00934 g;按含生药量折算 大鼠的最大耐受量为 9.34 g/kg。)

3 讨 论

3.1 实验动物体重以及脏器重量变化结果分析 多穗石柯主要分布在长江以南各省地区 野生自然状态下采叶量有限 现如今 多穗石柯叶作为一种茶叶加入市场行业 目前的文献资料^[8~9] 主要是对多穗石柯进行相关报道:多穗石柯具有滋养肝肾和胃降逆、润肺止咳、解困醒酒等作用 但现代药理学方

面对于多穗石柯叶的研究文献资料较少 对于其深层次的药理作用缺乏更深的研究。近年来茶叶销售量大幅增加 多穗石柯叶作为新兴茶叶 容易引发公众对其食用安全性的关注。本次实验研究结果显示 SD 大鼠灌胃给药前后体重与空白组比较 差异无统计学意义 说明给药 14 d 内多穗石柯叶乙醇提取物对实验动物体重无影响;在不同时间点组内体重的比较中 给药前的体重与给药后 4 个不同时间点的体重相比差异显著 可能是由于实验实施的条件(例如足够的食物和饮水)、时间以及 SD 大鼠自身条件等差异而导致大鼠的体重增长较快。给药 14 d 后处死大鼠并解剖观察其肝、脾等脏器 比较结果显示 给药前后 SD 大鼠肝、脾重量与空白组比较 差异均无统计学意义 肉眼观察未见明显病理学改

变,显示给药 14 d 内多穗石柯叶乙醇提取物对实验动物脏器无影响。

3.2 药物最大耐受量 根据我国现行的食品安全性毒理学评价程序对多穗石柯叶乙醇提取物的急性毒性作用进行研究,了解其可能的毒性作用机制,确定其急性毒性的最大耐受量,从而为其合理使用提供安全性评价依据。本次实验研究结果显示 SD 大鼠对多穗石柯叶乙醇提取物的最大耐受量为 9.34 g/kg,大于 5 g/kg,按照中国食品毒理学急性毒性分级法标准,多穗石柯叶毒性较低,实验结果与相关文献^[10]报道一致,表明多穗石柯叶具有较好的食用安全性。

参 考 文 献

- [1] 伍贤进,李胜华,曾军英,等.药食兼用多穗柯甜茶规范化栽培技术规程[J].农学学报,2014,4(9):68-71.
- [2] 秦 昱,丰金玉,段继春,等.大孔吸附树脂分离纯化多穗石柯根皮苷[J].中国农学通报,2015,31(36):269-275.
- [3] 李爱民,李胜华,张 元,等.超声波提取-树脂纯化多穗柯叶中甜味剂的工艺研究[J].中国野生植物资源,2014,33(5):1-7.
- [4] 陆宏浩,卫智权,阎 莉,等.番茄叶醇提物急性毒性

及其抗氧化应激损伤研究[J].中国民族民间医药,2017,26(2):52-56.

- [5] 李华南,陈 浩,王 力,等.痛风清消颗粒急性毒性实验研究[J].中国中医药现代远程教育,2017,15(6):132-133.
- [6] 布鲁根,常占瑛,刘 盟,等.石榴皮多酚提取物亚急性毒性实验研究[J].新疆医科大学学报,2017,40(4):498-502.
- [7] 李 津,覃永长,李桂勇,等.薏苡茎、叶提取物的急性毒性实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(5):178-181.
- [8] 张 俭,曾军英,唐 铭.多穗柯不同液相提取物对糖尿病小鼠 MDA/CAT 活性的影响[J].湖北农业科学,2012,51(2):354-357.
- [9] 赵 亚,黄 松,赖小平,等.HPLC 法同时测定多穗柯提取物中 4 种黄酮苷类成分的含量[J].中药新药与临床药理,2013,24(1):88-91.
- [10] 何春年,彭 勇,肖 伟,等.RSLC 快速测定多穗柯甜茶中 5 种甜味成分[J].中国中药杂志,2012,37(7):961-965.

(收稿日期:2017-06-01 修回日期:2017-07-19)

(编辑:潘明志)

信 息

郑重声明

本刊对所发表的论文拥有出版电子版、网络版版权的权利或授权其他网站或数据库及其系列数据库产品中以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文的权利。上述各种著作权使用费与本刊稿酬已在收取论文发表费时适当扣除,本刊不再另行支付。作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意我社上述声明。

• 本刊编辑部 •