

西印度醋栗枝叶提取物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性及安全性评价

侯润庚, 丁 骁, 杨力颖, 张 曼, 张颖君, 赵 平

α -Glucosidase Inhibitory Activity and Safety Evaluation of Branch and Leaf Extracts of *Phyllanthus acidus*

HOU Rungeng, DING Xiao, YANG Liying, ZHANG Man, ZHANG Yingjun, and ZHAO Ping

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022070054>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

红枣色素对小鼠急性毒性作用研究

Study on acute toxicity of jujube pigment in mice

食品工业科技. 2017(09): 349-352 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.09.059>

一氧化碳发色罗非鱼片急性毒性与遗传毒性研究

Study on acute toxicity and genetic toxicity of tilapia fillets treated with carbon monoxide

食品工业科技. 2017(20): 303-306 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.20.055>

霍山石斛茎的食用安全性评价

Food Safety Evaluation of *Dendrobium huoshanense* Stems

食品工业科技. 2019, 40(5): 213-218, 258 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.05.035>

不同品种甘薯叶提取物抗氧化及对 α -葡萄糖苷酶抑制活性的研究

Antioxidant Activity and α -glucosidase Inhibitory Activity of Sweet Potato(*Ipomoea batatas* L.) Leaf Extracts from Different Varieties

食品工业科技. 2019, 40(23): 283-289 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.23.046>

生防菌株洋葱伯克氏菌对草莓果实采后病害控制及安全性评价

Control of strawberry fruit postharvest decay by antagonistic bacterium *Burkholderia contaminans* and its safety evaluation

食品工业科技. 2018, 39(1): 96-101, 106 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.01.018>

发酵食品工业中的生物安全性评价

Biosafety Evaluation in the Fermented Food Industry

食品工业科技. 2020, 41(4): 356-360, 367 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.04.060>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

侯润庚, 丁晓, 杨力颖, 等. 西印度醋栗枝叶提取物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性及安全性评价 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(7): 252–259. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070054

HOU Rungeng, DING Xiao, YANG Liying, et al. α -Glucosidase Inhibitory Activity and Safety Evaluation of Branch and Leaf Extracts of *Phyllanthus acidus*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(7): 252–259. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070054

· 食品安全 ·

西印度醋栗枝叶提取物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性及安全性评价

侯润庚¹, 丁 晓², 杨力颖³, 张 曼², 张颖君², 赵 平^{1,*}

(1.西南林业大学西南地区林业生物质资源高效利用国家林业和草原局重点实验室,
云南昆明 650224;

2.中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南昆明 650201;

3.云南新兴绿化工程有限公司, 云南昆明 650228)

摘 要:对西印度醋栗 (*Phyllanthus acidus* Skeels) 枝叶提取物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性及安全性进行评价, 为该植物的安全食用和药用研发提供参考。采用溶剂回流提取得到西印度醋栗枝叶的全组分样品, 然后按照极性大小进一步对全组分进行分组划段, 分别得到石油醚、乙酸乙酯和正丁醇组分, 以及乙醇洗脱组分和水溶出组分; 以半抑制浓度 (IC_{50}) 为评价指标, 比较不同组分的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。通过经典急毒实验法测定各组分对小鼠的近似最大耐受量 (MTD) 和半数致死量 (LD_{50}), 将全组分样品进行连续灌胃 20 d 评价其亚急性毒性。结果表明, 西印度醋栗枝叶各组分对 α -葡萄糖苷酶均有一定的抑制能力; 全组分的 MTD 为 2.0 g/kg, 不同组分样品的毒性大小为乙醇洗脱组分 > 水溶出组分 > 石油醚组分 > 乙酸乙酯组分 > 正丁醇组分 > 全组分。主要急性毒性症状是惊跳随后怠动、扭体、呼吸急促等。亚急性毒性试验未见明显毒性反应及病变, 表明在口服摄入西印度醋栗全组分 2 g/kg/d (相当于干燥枝叶 8.6 g/kg) 是安全的, 具有开发为降血糖、减肥食品和药品的潜力。

关键词:西印度醋栗, 枝叶, α -葡萄糖苷酶, 急性毒性, 亚急性毒性, 安全性评价

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)07-0252-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070054

本文网刊:



α -Glucosidase Inhibitory Activity and Safety Evaluation of Branch and Leaf Extracts of *Phyllanthus acidus*

HOU Rungeng¹, DING Xiao², YANG Liying³, ZHANG Man², ZHANG Yingjun², ZHAO Ping^{1,*}

(1.Key Laboratory of State Forestry and Grassland Administration on Highly-efficient Utilization of Forestry Biomass Resources in Southwest China, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China;

2.State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China;

3.Yunnan Xinxing Greening Engineering Co., Ltd., Kunming 650228, China)

Abstract: To provide reference for the safety consumption of *Phyllanthus acidus* (PA) as food and its further medicinal development and utilization, a comparative study on acute and short-term toxicity and α -glucosidase inhibitory ability of different components of its branches and leaves was conducted. The crude extract of PA, prepared under aqueous ethanol reflux extraction, was partitioned successively with petroleum ether, ethyl acetate and N-butanol according to the polarity. Furthermore, an alcohol-eluted and water-eluted fractions were obtained from water-soluble residue by column chromatography. The half inhibitory concentration (IC_{50}) of α -glucosidase was used as the evaluation index to compare the

收稿日期: 2022-07-08

基金项目: 云南省基础研究计划重点项目 (202001AS070017); 国家自然科学基金项目 (82074124)。

作者简介: 侯润庚 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: 2981523591@qq.com。

* 通信作者: 赵平 (1965-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: hypzhao2022@163.com。

in vitro hypoglycemic activity of different extracts. The acute toxicity of these fractions was screened by maximum tolerated dose (MTD), median lethal dose (LD_{50}) values, and their subacute toxicity was evaluated by continuous oral administration of samples for 20 days. The results showed that each component of PA had a certain inhibitory ability to α -glucosidase. The MTD of crude extract of PA was 2.0 g/kg, and the order of acute toxicity for different fractions was ethanol-eluted fraction>water-eluted fraction>petroleum ether fraction>ethyl acetate fraction>N-butanol fraction>crude extract. The main acute toxicity symptoms were startle followed by idling, writhing, and shortness of breath. Subacute toxicity test showed no obvious toxicity and lesions. It was indicated that it was safe to take 2 g/kg/d (equivalent to 8.6 g/kg of dried branches and leaves) of the whole component of PA at oral ingestion. Thus, they have the potential to be developed as hypoglycemic, weight-loss food and medicine.

Key words: *Phyllanthus acidus*; branches and leaves; α -glucosidase; acute toxicity; subacute toxicity; safety evaluation

西印度醋栗(*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels)为大戟科(Euphorbiaceae)叶下珠属(*Phyllanthus*)常绿乔木,树高 2~5 m,花后结青色小果,为大戟科内少数能食用的树种之一。该植物原产于马达加斯加岛,目前在热带和亚热带地区,如泰国、印度和越南,以及中国云南西双版纳和元江均有种植^[1-2]。研究表明,西印度醋栗枝叶主要含黄酮类^[3]、萜类^[4-9]以及有机酸、核苷、氨基酸衍生物、酚性化合物等^[10-11],其中部分化合物具有抗菌、抗炎、保肝、降血糖等活性^[1-2,10]。在印度传统医学中,西印度醋栗的叶用于治疗发烧、痔疮、天花、瘙痒和牙龈感染^[12-15],还可以制成用于治疗肝病的汤剂、抗高血压的药物等^[16]。在印度尼西亚、泰国和印度等地区,西印度醋栗的叶也被当做一种食用蔬菜^[1-2],表明西印度醋栗枝叶在食品和医药领域具有进一步开发利用的潜力。但在马来西亚人们认为其叶有很强的毒性,而且本课题组前期发现叶的小极性提取物部分对两种正常人体细胞表现了较强的细胞毒活性^[10],目前关于该植物叶研究报道中,缺少毒性和安全性的考察,因此该植物叶作为广泛食用植物尚缺少理论依据。

安全性是确保西印度醋栗枝叶开发利用的前提。不同极性提取物的成分不同,其毒理学安全性也有可能存在差别,针对西印度醋栗枝叶毒理学安全性评价及不同组分 α -葡萄糖苷酶抑制活性筛选的研究至今未见报道。本研究对元江引种西印度醋栗枝叶的不同极性样品进行小鼠毒性反应观察和 20 d 经口毒性试验,同时分析不同组分的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,以期为该植物的食用安全以及进一步药用研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

西印度醋栗枝叶 于 2021 年 8 月采自云南省元江县,由中国科学院昆明研究所刘恩德博士鉴定为西印度醋栗(*P. acidus*)的枝叶,植物标本保存于中国科学院昆明研究所西部植物化学与植物资源国家重点实验室,标本编号(Kib-18-05-22);实验动物 BALB/c 小鼠 体重 18~22 g,雌雄各半,由中国科学院昆明植物研究所动物实验中心提供,许可证号:SYXK(滇)K2018-0005。试验期间,小鼠自由饮食,进食普

通饲料,环境温度 23 ± 3 °C,湿度适宜。动物福利和实验过程均遵循中国科学院昆明植物研究所动物管理委员会的规定;对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷 上海源叶生物科技有限公司;阿卡波糖 成都德思特生物技术有限公司; α -葡萄糖苷酶(70 万 U/mL,酵母来源) 博奥森生物技术有限公司;Diaion HP20 树脂 上海源叶生物科技有限公司;二甲基亚砜(DMSO) Sigma 公司。

R-1005 小型旋转蒸发仪 海道尔夫仪器设备(上海)有限公司;R-1002 型旋转蒸发器 上海申顺生物科技有限公司;ALC 210.3 电子天平 上海第二天平仪器厂;Infinite M200 Pro 多功能酶标仪 长沙市鸿跃实验设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 供试样品的制备 参考文献方法并加以修改^[17],取西印度醋栗干燥枝叶 30 kg,粉碎(60~200 目)后用 70% 乙醇室温下提取 3 次,合并提取液减压浓缩除去有机溶剂得到总提取浓缩液 17 L。总提取浓缩液依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇分别萃取 8 次,得到石油醚组分(1.2 kg)、乙酸乙酯组分(285 g)和正丁醇组分(432 g)。溶剂萃取后的水相部分进一步通过 Diaion HP-20 树脂柱层析,分别用水和乙醇洗脱,得到水洗脱组分(868 g)和乙醇洗脱组分(680 g)。以上组分均经过旋转蒸干挥去有机溶剂。制备流程图如图 1 所示。

1.2.2 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定 参考文献方法建立体系^[18-19],采用 96 微孔板,加入 30 μ L 的 α -葡萄糖苷酶溶液,再加入不同待测样品 30 μ L,浓度分别为 0.5、1、1.5、2、2.5、3 mg/mL,置于 37 °C 的恒温反应 10 min,再加入 40 μ L 浓度 4 mmol/L 对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷溶液,然后恒温孵育 30 min,再加入 120 μ L 浓度 0.2 mol/L 的碳酸钠溶液用于终止反应,利用多功能酶标仪于 405 nm 处检测吸光度值(OD),阳性对照为阿卡波糖,对照为不加抑制剂,对照空白为不加抑制剂和 α -葡萄糖苷酶溶液,按照以下公式计算抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \left[1 - \frac{(\text{样品OD} - \text{样品空白OD})}{(\text{对照OD} - \text{对照空白OD})} \right] \times 100$$

1.2.3 急性毒性试验 LD_{50} 是反映急性毒性的重要

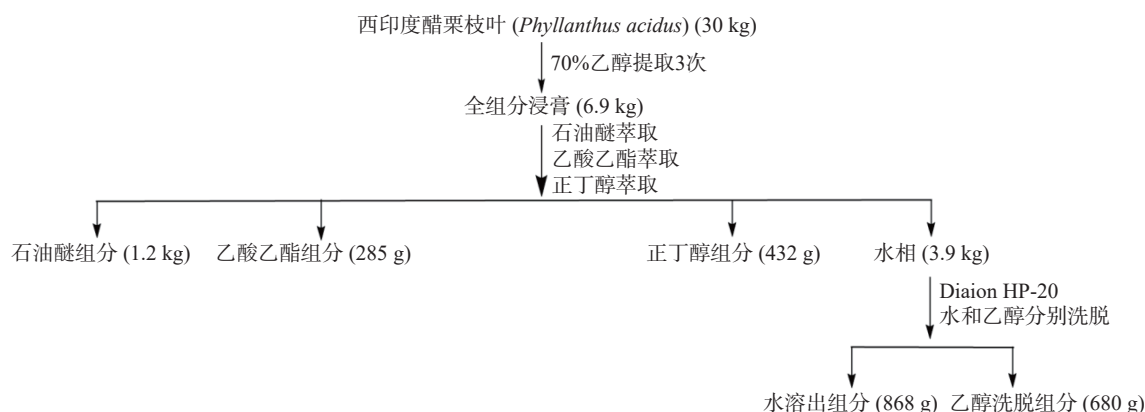


图1 西印度醋栗不同极性提取物制备流程图

Fig.1 Preparation flowing chart of different polar extracts of *Phyllanthus acidus*

指标,按照经典急毒试验方法^[20],先进行预试验,找出 LD_0 值和 LD_{100} 值,并确定组间距 r 值。根据预试验结果,各组分设置六个试验组,包括五个剂量组和一个生理盐水对照组,各组分 60 只小鼠,雌雄各半,随机分组,每组 10 只,以 10 mL/kg 给药一次。石油醚组分、乙酸乙酯组分、正丁醇组分的给药剂量分别为 400、500、625、781、976 mg/kg,水洗脱组分分别为 256、320、400、500、625 mg/kg,乙醇洗脱组分分别为 70、88、109、137、171 mg/kg($r=0.8$),各组分剂量由低到高分别为药物 1 组~药物 5 组,通过统计学软件 SPSS 26.0 概率单位加权回归法 (Bliss) 计算 LD_{50} ^[21]。

1.2.4 全组分 MTD 测定 根据预试验结果,取小鼠 20 只,雌雄各半,体重为 18~22 g 小鼠灌胃生理最大耐受量为按体重 0.4 mL/10 g。因此,最大耐受量试验中以全组分浓度 2.0 g/kg(最大浓度),40 mL/kg(最大体积)连续灌胃小鼠 2 次(每隔 6 h 灌胃一次)。灌胃后着重观察药后 0~12 h 内小鼠急毒反应及死亡情况,每隔 15 min 观察一次,记录 14 d 内存活小鼠的体重以及毒性反应和死亡状况。死亡动物进行解剖,观察死亡小鼠主要脏器有无异常。

1.2.5 亚急性毒性试验 参考文献方法^[22-24],取小鼠 40 只,雌雄各半,分为药物组和空白组,药物组以 250 mg/kg 总提物部分灌胃,空白组以相同比例的 DMSO 灌胃,均灌胃小鼠 20 d,每天灌喂一次,给药后每天注意观察记录小鼠的精神状况、体重变化和死亡情况,实验结束后将小鼠脱颈处死,解剖观察是否有病变^[25],除去多余组织,用 4 ℃ 生理盐水冲洗干净,滤纸吸干水分后称重,计算脏器指数;同时采集肝脏、脾脏、肾脏组织进行固定和制作石蜡切片,用于组织病理学检测。脏器系数计算公式如下:

$$\text{脏器系数}(\%) = \frac{\text{脏器重量(g)}}{\text{小鼠体重(g)}} \times 100$$

1.3 数据处理

试验数据采用 SPSS 26.0 进行统计处理,数据以均数±标准差表示,用单因素方差分析(ANOVA)进

行差异性检验,图表采用 GraphPad Prims 8.0.2 绘制分析。

2 结果与分析

2.1 西印度醋栗枝叶各组分的 α -葡萄糖苷酶抑制活性

为初步判定西印度醋栗枝叶提取物不同组分的体外抗糖活性,选取 α -葡萄糖苷酶作为靶点^[26]。结果如图 2,各组分及阳性对照 IC_{50} 排序为阿卡波糖 (0.34 ± 0.065 mg/mL) < 正丁醇组分 (0.92 ± 0.011 mg/mL) < 乙醇洗脱组分 (1.11 ± 0.055 mg/mL) < 石油醚组分 (1.29 ± 0.031 mg/mL) < 乙酸乙酯组分 (1.35 ± 0.047 mg/mL) < 水溶出组分 (1.49 ± 0.023 mg/mL)。各组分及阳性对照的抑制能力与 IC_{50} 排序相反,各组分均有一定的 α -葡萄糖苷酶抑制能力,但均不及阳性对照阿卡波糖组。

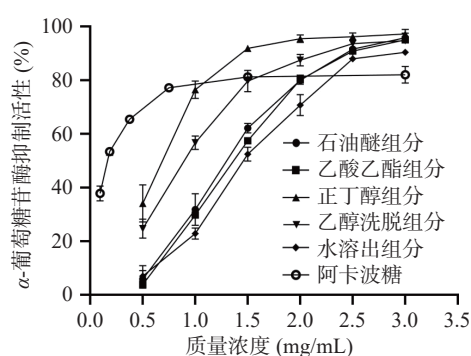


图2 西印度醋栗枝叶各组分的 α -葡萄糖苷酶抑制活性
Fig.2 α -Glucosidase inhibition ability of different fractions from branch and leaf extracts of *P. acidus*

2.2 西印度醋栗枝叶各组分的急性毒性

2.2.1 急性毒性试验中小鼠体重变化情况 由表 1 可见,各剂量组小鼠的初始体重与对照组比较,无显著性差异($P>0.05$)。通过第 3、5、7、10、14 d 小鼠体重与对照组的比较,存在显著性差异($P<0.05$)。说明西印度醋栗枝叶不同组分提取物对小鼠体重有显著影响。

2.2.2 小鼠急性毒性试验症状观察 急性毒性试验不应只关注小鼠死亡数据,也应重视动物的毒性反应^[27],通过中毒的表现分析死因,通过监测过程获得更多有

表 1 急性毒性试验中小鼠体重变化情况
Table 1 Changes of body weight of mice in acute toxicity test

组别	剂量(mg/kg)	始重(g)	第3 d体重(g)	第5 d体重(g)	第7 d体重(g)	第10 d体重(g)	第14 d体重(g)
石油醚组分	400	21.33±0.60	20.04±1.03**	20.41±0.96**	20.90±0.96**	21.16±0.92**	21.83±0.81**
	500	20.87±0.79	19.23±0.97**	19.37±1.01**	19.87±1.15**	20.37±1.11**	20.72±1.05**
	625	20.91±1.06	19.53±0.86**	19.78±0.65**	20.18±0.93**	20.68±0.71**	21.13±0.55**
	781	21.15±0.69	18.73±0.32**	19.37±0.31**	19.70±0.36**	19.97±0.40**	20.33±0.55**
	976	20.66±0.89	—	—	—	—	—
乙酸乙酯组分	400	20.96±0.86	19.89±1.57*	20.02±1.70*	20.28±1.77**	20.78±1.48**	21.51±1.27**
	500	20.73±1.08	19.64±1.05**	20.03±1.04**	20.60±0.69**	21.21±0.68**	22.10±0.59**
	625	20.81±0.77	18.96±0.78**	20.20±0.84**	20.76±0.78*	21.30±0.69**	22.08±0.60**
	781	20.64±0.83	19.30±0.44**	19.87±0.25**	20.30±0.17**	20.97±0.25**	22.13±0.32**
	976	21.12±0.64	—	—	—	—	—
正丁醇组分	400	21.01±0.87	19.89±1.57**	20.02±1.70**	20.28±1.77**	20.78±1.48**	21.51±1.27**
	500	21.01±0.83	19.90±0.86**	20.31±0.99**	20.53±0.96**	20.81±0.85**	21.51±0.85**
	625	20.79±0.70	19.59±0.76**	19.96±1.02**	20.33±1.09**	20.71±0.96**	21.16±0.88**
	781	21.09±0.77	19.26±1.11**	19.70±1.10**	20.13±1.15**	20.50±1.14**	21.34±1.28**
	976	20.77±1.09	18.80±0.42**	19.45±0.21**	20.15±0.35**	20.90±0.07**	21.95±0.07**
水溶出组分	256	21.42±0.53	19.74±0.77**	20.55±0.97**	21.11±1.00*	21.69±0.78*	22.78±0.79
	320	21.14±0.65	19.63±1.11**	20.05±1.10**	20.47±1.13**	20.85±1.23**	21.52±1.27**
	400	21.15±0.69	19.97±0.51**	20.13±0.31**	20.77±0.32**	21.17±0.15**	21.93±0.67**
	500	20.91±1.06	19.95±0.78**	20.15±0.50**	—	—	—
	625	21.33±0.60	17.73±1.01**	—	—	—	—
乙醇洗脱组分	70	20.97±0.84	22.14±0.63*	23.12±1.18**	24.16±0.95**	25.74±0.93**	27.58±0.96**
	88	20.73±0.66	18.95±0.63**	19.33±0.69**	19.97±0.94**	20.00±0.57**	20.44±0.46**
	109	20.95±0.62	18.62±0.77**	19.15±0.85**	19.80±1.29**	20.63±2.23*	21.67±3.65
	137	20.70±0.86	19.05±0.78**	19.75±0.64**	20.10±0.42**	21.40±0.71*	22.85±0.50
	171	20.73±0.77	—	—	—	—	—
对照组	0	20.94±0.63	21.45±0.62	21.77±0.63	22.02±0.62	22.57±0.59	23.16±0.51

注: 与对照组比较, *: 差异显著, $P<0.05$, **: 差异极显著, $P<0.01$; “—”表示小鼠已死亡, 无法测得体重。

关毒理学的信息, 以便有针对性地为找到毒性靶组织提供参考。因此本试验还考察了小鼠急性毒性症状谱, 包括各症状的发生时间和发生频率。如图 3, 经解剖发现部分死亡小鼠胃肠有明显的出血点, 推测西印度醋栗枝叶提取物对胃肠可能有刺激作用。存活小鼠基本在 3 d 时身体状态得到缓解, 毒性反应消失, 后期存活小鼠无异常现象。说明西印度醋栗枝叶不同组分提取物对小鼠有急性毒性。各组分急性症状谱见表 2。5 个组分急性毒性试验小鼠死亡情况见图 4。

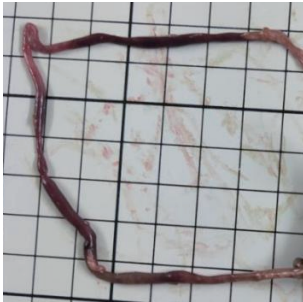


图 3 小鼠肠道病变观察图
Fig.3 Anatomical observation of mice intestine lesions

2.2.3 各组分 LD₅₀ 测定结果 采用经典急性毒性试验方法, 以不同的给药剂量分别对西印度醋栗枝叶的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、水溶出和醇洗脱等各

组分对小鼠的急性毒性进行了研究。由表 3 数据可知, 不同极性部分毒性大小为: 乙醇洗脱组分>水溶出组分>石油醚组分>乙酸乙酯组分>正丁醇组分。小鼠死亡率与剂量浓度大小呈相关性。用 Bliss 法计算西印度醋栗枝叶各组分小鼠腹腔注射的 LD₅₀ 见表 3。

2.3 西印度醋栗枝叶全组分的 MTD 试验结果

由于全组分浓度限值, 预实验无法测出使得小鼠全部死亡的 LD₁₀₀ 值, 因此无法测出 LD₅₀, 所以测定最大耐受量来评价全组分的安全性。给小鼠灌胃西印度醋栗枝叶全组分悬浮液(2.5 g/mL, 即流程图中全组分浸膏部分)。个别小鼠给药不久出现蹿跳, 1 h 时观察无强烈毒性反应, 略微怠动, 给药 1 d 后发现小鼠略微有扎堆现象, 给药 3 d 后恢复。用药后 14 d 内毛发颜色、精神状态和粪便都正常, 但药物组小鼠的体重增长较慢, 明显低于空白组, 7 d 后体重增长趋于正常, 与空白组增长趋于一致, 1~6 d 药物组与空白组体重变化组间差异极显著($P<0.01$), 最终小鼠无死亡或强烈毒性反应。可能由于灌胃使小鼠胃里内容物增多食欲减退, 而后逐渐适应灌胃及药物浓度。综上所述, 西印度醋栗枝叶全组分 MTD 值为 2.0 g/kg, 根据急性毒性分级标准, 属于低毒级。西印度醋栗枝叶全组分小鼠急毒 MTD 试验体重自身变化量见图 5。

表 2 西印度醋栗枝叶各组分小鼠急性毒性症状谱

Table 2 Acute toxicity symptom profile of each fraction of *P. acidus* in mice

组分	症状	项目	药物5组	药物4组	药物3组	药物2组	药物1组
石油醚组分	蹿跳	发生率(%)	50	40	20	10	—
		发生时间(h)	0.2~1.0	0.2~1.0	0.2~1.0	0.2~1.0	—
	反应迟钝	发生率(%)	80	70	50	10	—
		发生时间(h)	12~24	12~24	12~24	12~24	—
乙酸乙酯组分	抽搐	发生率(%)	30	20	—	—	—
		发生时间(h)	12~24	12~24	—	—	—
	眼睛分泌粘液	发生率(%)	20	—	—	—	—
		发生时间(h)	12~24	—	—	—	—
正丁醇组分	蹿跳	发生率(%)	60	30	10	—	—
		发生时间(h)	0.2~1.0	0.2~1.0	0.2~1.0	—	—
	反应迟钝	发生率(%)	50	40	20	—	—
		发生时间(h)	12~24	12~24	12~24	—	—
水溶出组分	蹿跳	发生率(%)	50	30	30	10	—
		发生时间(h)	0.2~1.0	0.2~1.0	0.2~1.0	0.2~1.0	—
	呼吸急促	发生率(%)	80	40	—	—	—
		发生时间(h)	0.2~1.0	0.2~1.0	—	—	—
乙醇洗脱组分	反应迟钝	发生率(%)	60	40	20	—	—
		发生时间(h)	12~24	12~24	12~24	—	—
	怠动	发生率(%)	100	90	80	30	20
		发生时间(h)	0.2~2.0	0.20~2.0	0.6~2.0	0.6~3.0	1.0~3.0
	瞳孔缩小	发生率(%)	100	90	80	30	—
		发生时间(h)	0.20~0.25	0.5~3.0	0.5~3.0	0.5~3.0	—
	角膜浑浊	发生率(%)	90	90	80	—	—
		发生时间(h)	0.2~3.0	0.2~3.0	0.2~3.0	—	—
	反应迟钝	发生率(%)	100	90	80	40	—
		发生时间(h)	0.2~3.0	0.2~3.0	0.2~3.0	0.2~3.0	—

注: “—”表示小鼠无以上症状, 药物 1~5 组代表各组分给药剂量由低到高。

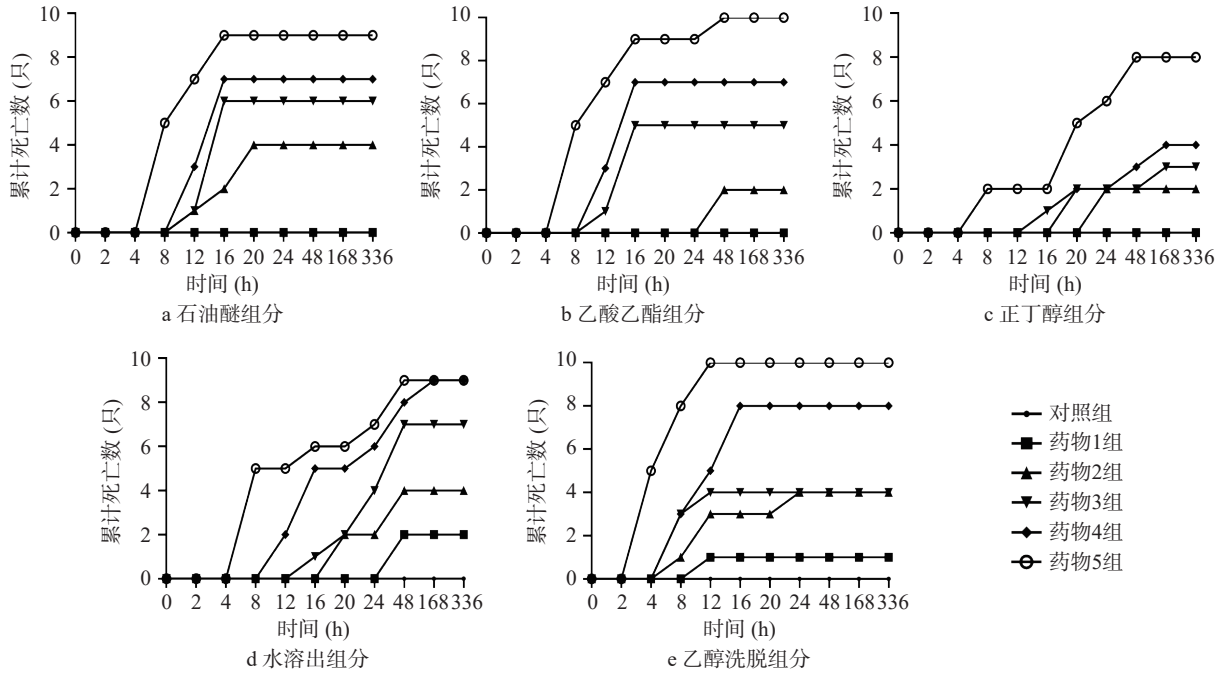


图 4 西印度醋栗枝叶各组分 LD₅₀ 测定死亡-时间曲线

Fig.4 Death-time curve for LD₅₀ determination of each fraction of *P. acidus*

注: 药物 1~5 组代表各组分给药剂量由低到高。

2.4 西印度醋栗枝叶全组分的亚急性毒性试验结果

2.4.1 全组分对小鼠日常状态和体重增长的影响

为探究西印度醋栗枝叶较低剂量(250 mg/kg)下是否有亚急性毒性,进行为期 20 d 的灌胃实验。由图 6

表 3 西印度醋栗枝叶不同组分 LD₅₀ 比较

组别	剂量 (mg/kg)	动物数 (只)	死亡数 (只)	死亡百分 率(%)	LD ₅₀ 及95%可信 限(mg/kg)
石油醚组分	400	10	0	0	614.899 (521.806~716.199)
	500	10	4	40	
	625	10	6	60	
	781	10	7	70	
	976	10	9	90	
乙酸乙酯组分	400	10	0	0	652.061 (580.414~737.162)
	500	10	2	20	
	625	10	5	50	
	781	10	7	70	
	976	10	10	100	
正丁醇组分	400	10	0	0	767.755 (661.36~981.621)
	500	10	2	20	
	625	10	3	30	
	781	10	4	40	
	976	10	8	80	
水溶出组分	256	10	2	20	368.516 (309.15~430.148)
	320	10	4	40	
	400	10	7	70	
	500	10	9	90	
	625	10	9	90	
乙醇洗脱组分	70	10	1	10	103.887 (89.718~119.486)
	88	10	4	40	
	109	10	4	40	
	137	10	8	80	
	171	10	10	100	

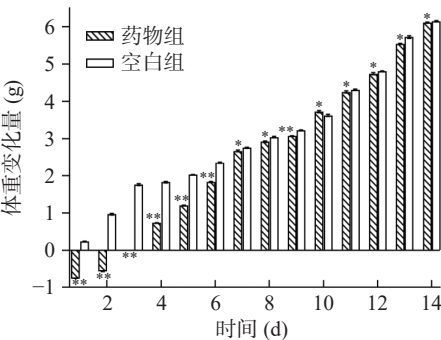


图 5 西印度醋栗枝叶全组分小鼠急毒 MTD 试验体重自身变化量

Fig.5 Body weight self-change in the all-component of *P. acidus* mouse acute MTD test

注: 与空白组比较, *: 差异显著, $P<0.05$, **: 差异极显著, $P<0.01$; 图 6 同。

可知, 给药第 2 d 空白组和药物组小鼠体重均有小幅下降, 后空白组小鼠又恢复正常并呈上升趋势。小鼠体重轻微减小, 没有超过体重 10% 属于正常范围, 背毛较顺, 行动正常, 无死亡。空白组小鼠体重下降的原因可能是由于初次灌胃对小鼠产生一定的刺激, 从而导致小鼠第 2 d 采食量较低, 第 4 d 开始小鼠逐渐适应灌胃过程, 体重有所上升。药物组与空白组组间差异性极显著($P<0.01$)。Chongsa 等^[13]的研究也证实西印度醋栗枝叶在安全剂量下灌胃大鼠, 可观察到大鼠体重减轻, 但进食量未减少, 最终可导致中年大鼠内脏和皮下脂肪以及血清、肝脏脂质的减少。说明西印度醋栗枝叶提取物实验剂量下食用较为安

全, 可能是开发减肥食品或保健品的一种有效材料。

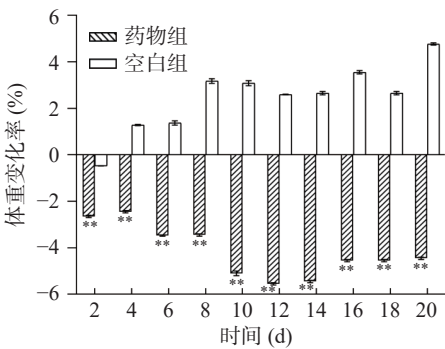


图 6 亚急性毒性试验小鼠体重自身变化率
Fig.6 Self-change rate in body weight of mice in sub-acute toxicity test

2.4.2 全组分对小鼠脏器系数的影响 由表 4 可知, 实验结束对小鼠进行解剖, 将各脏器称重。药物组 (250 mg/kg) 小鼠的脏器比与空白组小鼠相比无显著性差异($P>0.05$), 表明西印度醋栗枝叶全组分对小鼠的脏器无显著影响。结合 2.4.1 可见, 西印度醋栗枝叶在 250 mg/kg 低剂量下无亚急性毒性。

表 4 西印度醋栗枝叶全组分对小鼠脏/体比值的影响
Table 4 Effects of all-component of *P. acidus* on liver/body weight ratio of mice

性别	组别	肝/体比值(%)	脾/体比值(%)	肾/体比值(%)
雄	药物组	4.91±0.18	0.34±0.05	0.86±0.04
	空白组	4.77±0.11	0.33±0.05	0.84±0.03
雌	药物组	4.88±0.21	0.32±0.03	0.85±0.03
	空白组	4.76±0.09	0.32±0.05	0.84±0.04

注: 相同性别组间比较, 同列数据无肩标表示差异不显著($P>0.05$)。

2.4.3 组织病理学检查结果 试验结束后剖检小鼠, 经肉眼观察主要从脏器的颜色、形态、结构、体积及质地观察, 均未见明显的异常(图 7)。采集西印度醋栗枝叶药物组(250 mg/kg)和空白组小鼠的肝脏、脾脏、肾脏组织进行组织病理学检查^[28-30]。a. 肝脏: 药物组肝组织中见有片状或散在肝细胞坏死(五角星), 表现为肝细胞胞核固缩、核消失, 胞浆嗜酸性增强。空白组肝组织胞浆嗜酸性增强, 程度较药物组轻。未见其他明显病变; b. 肾脏: 药物组皮质和髓质结构清楚, 见皮质区少量肾小管上皮细胞轻微空泡变性, 间质轻微充血。空白组皮质、髓质结构清晰, 肾单位形态结构正常。两者间未见明显差异; c. 脾脏: 药物组与空白组的白髓、红髓结构清楚, 未见淤血及纤维组织增生, 均未见明显病变。药物组脾脏结构看起来比空白组的松散, 跟制片出现裂痕有关。由此可知, 在实验剂量内, 西印度醋栗提取物灌胃小鼠, 未见有明显毒性意义的病理变化, 但提示更高剂量或长期使用下需注意肝毒性。

3 结论

本实验通过比较西印度醋栗枝叶急性毒性数据发现, 不同极性部分毒性大小为: 乙醇洗脱组分>水

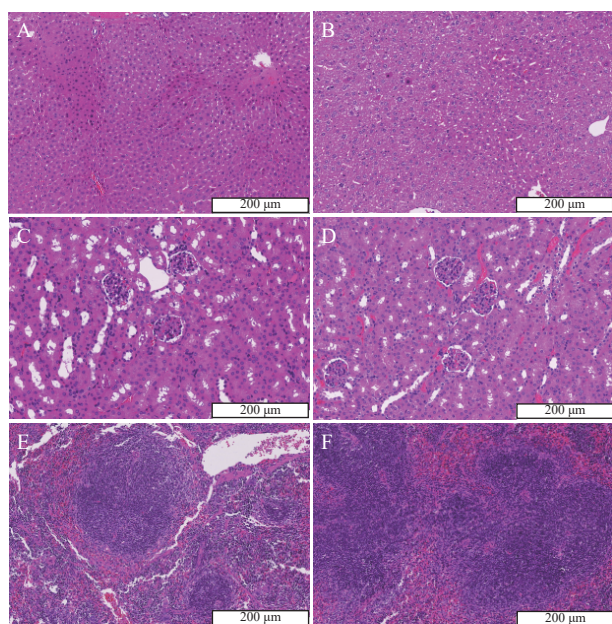


图7 口服剂量组 and 对照组小鼠的肝、肾、脾组织 HE 染色病理学观察结果

Fig.7 Pathological observation results of HE staining of liver, kidney and spleen tissue of mice in oral dose group and control group

注: A: 药物组肝脏; B: 空白组肝脏; C: 药物组肾脏; D: 空白组肾脏; E: 药物组脾脏; F: 空白组脾脏(HE 染色, 100 倍)。

溶出组分>石油醚组分>乙酸乙酯组分>正丁醇组分>全组分。经观察亚急性毒性实验中元江引种西印度醋栗枝叶全组分的小鼠毒性反应,发现全组分低剂量(250 mg/kg/d)下安全,无亚急性毒性,这符合民间常用药理用途。但是高剂量下有低毒,高于 2.0 g/kg/d(相当于干燥枝叶 8.6 g/kg)时有毒性危害。同时不同组分萃取物均有一定的 α -葡萄糖苷酶抑制能力,具有体外抗糖尿病活性,因此西印度醋栗枝叶具有抗糖尿病药物开发潜力。后续拟在体外抗糖活性测定的基础上,进一步通过建立糖尿病小鼠模型,测定小鼠生理生化指标评价其体内降血糖能力。这一结论可为初步估计人群允许接触水平提供有价值的信息,为西印度醋栗枝叶的食用和药用开发提供参考。但是否可以根据毒性特征来分离出毒性物质以及毒性机制尚待探究,以期开发安全高效药物提供实验和理论依据。

参考文献

- [1] 胥佳,李娜,朱宏涛,等.西印度醋栗的化学成分及药理活性研究进展[J].广西植物,2021,41(11):1784-1793. [XU J, LI N, ZHU H T, et al. Progress on chemical components and pharmacological activity of *Phyllanthus acidus*[J]. Guihaia, 2021, 41(11): 1784-1793.]
- [2] TANS P, TAN E Y, LIM Q Y, et al. *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels: A review of its traditional uses, phytochemistry, and pharmacological properties[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 253: 112610.
- [3] GENG H C, ZHU H T, WANG D, et al. Phyllanacidins A-C, three new cleistanthane diterpenoids from *Phyllanthus acidus* and

their cytotoxicities[J]. *Fitoterapia*, 2020, 148: 104793.

[4] SICHAE M J, VO H C, NHA-TRAN T, et al. 29-Norlupane-1 β -hydroxy-3, 20-dione, a new norlupane triterpenoid from the twigs and leaves of *Phyllanthus acidus*[J]. *Natural Product Research*, 2019, 35(20): 3384-3389.

[5] 李杰,李振麟,贾瑞芳,等.西印度醋栗叶中 1 种新三萜的分离与鉴定[J]. *中草药*, 2020, 51(3): 571-575. [LI J, LI Z L, JIA R F, et al. A new triterpenes isolated from leaves of *Phyllanthus acidus* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2020, 51(3): 571-575.]

[6] DUONG T H, TRUNG N T, PHAN D C T, et al. A new diterpenoid from the leaves of *Phyllanthus acidus*[J]. *Natural Product Research*, 2022, 36(2): 539-545.

[7] XIN Y, XU M, WANG Y F, et al. Phyllanthacidoid U: A new N-glycosyl norbisabolane sesquiterpene from *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels[J]. *Natural Product Research*, 2021, 35(21): 3540-3547.

[8] GENG H C, ZHU H T, YAGN W N, et al. Phyllaciduloids E and F, two new cleistanthane diterpenoids from the leaves of *Phyllanthus acidus*[J]. *Natural Product Research*, 2021, doi:10.1080/14786419.2021.1929971.

[9] XIN Y, XU J, LV J J, et al. New ent-kaurane and cleistanthane diterpenoids with potential cytotoxicity from *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels[J]. *Fitoterapia*, 2022, 157: 105133.

[10] GENG H C, ZHU H T, WANG D, et al. New cytotoxic dichapetalins in the leaves of *Phyllanthus acidus*: Identification, quantitative analysis, and preliminary toxicity assessment[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2021, 114: 105125.

[11] TRAM N C T, SON N T, NGA N T, et al. The hepatoprotective activity of a new derivative kaempferol glycoside from the leaves of Vietnamese *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels[J]. *Medicinal Chemistry Research*, 2017, 26(2): 2057-2064.

[12] JAIN N K, SINGHAI A K. Protective effects of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels leaf extracts on acetaminophen and thioacetamide induced hepatic injuries in Wistar rats[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2011, 4(6): 470-474.

[13] CHONGSA W, RADENAHMAD N, JANSAKUL C. Six weeks oral gavage of a *Phyllanthus acidus* leaf water extract decreased visceral fat, the serum lipid profile and liver lipid accumulation in middle-aged male rats[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 155(1): 396-404.

[14] LV J J, YU S, WANG Y F, et al. Anti-hepatitis B virus norbisabolane sesquiterpenoids from *Phyllanthus acidus* and the establishment of their absolute configurations using theoretical calculations[J]. *Journal of Organic Chemistry*, 2014, 79(12): 5432-5447.

[15] ZHENG X H, YANG J, LYU J J, et al. Phyllaciduloids A-D: Four new cleistanthane diterpenoids from *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels[J]. *Fitoterapia*, 2018, 125: 89-93.

[16] LEEYA Y, MULYANY M J, QUEIROZ E F, et al. Hypotensive activity of an n-butanol extract and their purified compounds from leaves of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels in rats[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 649(1): 301-313.

[17] 权博文,吴桐,刘庆,等.蒙古扁桃种仁不同极性部位对博来霉素致大鼠肺纤维化的保护作用[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(22): 5. [QUAN B W, WU T, LIU Q, et al. Protective effect of

different polar parts of *Amygdalus mongolica* on pulmonary fibrosis rat models induced by bleomycin[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(22): 5.]

[18] SUTJIATMO A B, SUKANDAR E Y, RIYANTI S, et al. Sub chronic toxicity studies of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels leaves extract in experimental animals[J]. *Medicinal Plants-International Journal of Phytomedicines and Related Industries*, 2019, 11(3): 237.

[19] GHANI U, NUR-E-ALAM M, YOUSAF M, et al. Natural flavonoid α -glucosidase inhibitors from *Retama raetam*: Enzyme inhibition and molecular docking reveal important interactions with the enzyme active site[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2019, 87: 736–742.

[20] HUANG Y F, HE F, CUI H, et al. Systematic investigation on the distribution of four hidden toxic *Aconitum* alkaloids in commonly used *Aconitum* herbs and their acute toxicity[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2022, 208: 114471.

[21] 周一平. 用 SPSS 软件计算新药的 LD_{50} [J]. *药学进展*, 2003, 27(5): 314–316. [ZHOU Y P. The calculation of LD_{50} in new drugs with software SPSS[J]. *Progress in Pharmaceutical Sciences*, 2003, 27(5): 314–316.]

[22] ADOLOR O E, ONYESOM I, OPAJOBI A O, et al. Evaluation of median lethal dose and subchronic oral toxicity assessment of ethanolic leaf extract of *Phyllanthus amarus* [J]. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 2019, 26(4): 1–8.

[23] CHAIMUM-AOM N, CHOMKO S, TALUBMOOK C. Toxicology and oral glucose tolerance test (OGTT) of Thai medicinal plant used for diabetes controls, *Phyllanthus acidus* L. (Euphorbiaceae) [J]. *Pharmacognosy Journal*, 2017, 9(1): 58–61.

[24] KIM Y, JAJA-CHIMEDZA A, MERRILL D, et al. A 14-day repeated-dose oral toxicological evaluation of an isothiocyanate-enriched hydro-alcoholic extract from *Moringa oleifera* Lam. seeds in

rats [J]. *Toxicology Reports*, 2018, 5: 418–426.

[25] VEERAPPAN A, MIYAZAKI S, KADARKARISAMY M, et al. Acute and subacute toxicity studies of *Aegle marmelos* Corr, an Indian medicinal plant [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(2-3): 209–215.

[26] WANG D H, WANG M Y, SHEN W H, et al. Analysis of chemical compounds and toxicological evaluation of *Forsythia suspensa* leaves tea [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2021, 30(2): 305–314.

[27] 孙蓉, 王会, 黄伟, 等. 艾叶不同组分对小鼠急性毒性实验比较研究 [J]. *中国药物警戒*, 2010, 7(7): 392–396. [SUN R, WANG H, HUANG W, et al. Experimental comparison study on mice's acute toxicity of different composition in *Folium Artemisiae Argyi* [J]. *Chinese Journal of Pharmacovigilance*, 2010, 7(7): 392–396.]

[28] 康绍龙, 王慧铃, 李冬梅, 等. 紫红獐牙菜对四氧嘧啶性糖尿病小鼠的降糖作用 [J]. *昆明医科大学学报*, 2021, 42(8): 11–16.

[KANG S L, WANG H L, LI D M, et al. Hypoglycemic effects of *Swertia punicea* Hemsl on alloxan-induced diabetic mice [J]. *Journal of Kunming Medical University*, 2021, 42(8): 11–16.]

[29] 黄凤玲, 邢珂慧, 谢惠, 等. 红枣色素对四氧嘧啶糖尿病小鼠的降血糖作用 [J]. *食品科技*, 2020, 45(7): 293–297. [HUANG F L, XING K H, XIE H, et al. Hypoglycemic effect of jujube pigment on alloxan-induced diabetic mice [J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(7): 293–297.]

[30] 庄远杯, 魏爱红, 陈堪彬, 等. 番石榴不同部位乙醇提取物的抗氧化、降血糖及酪氨酸酶抑制活性 [J]. *食品工业科技*, 2022, 43(8): 365–371. [ZHUANG Y H, WEI A H, CHEN K B, et al. Antioxidant, hypoglycemic activities and inhibitory effect on tyrosinase of ethanol extracts of different parts from *Psidium guajava* L. [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(8): 365–371.]