

◆民族医药◆

广山楂叶水提取物的急性毒性和遗传毒性*

叶志青¹, 卢安根^{2**}, 黎颖², 叶质萍³, 张洁宏⁴, 黎德全², 黄维静²

(1. 广西大学农牧产业发展研究院, 广西南宁 530004; 2. 广西壮族自治区分析测试研究中心, 广西南宁 530022; 3. 广西昭平县林成生态农业专业合作社, 广西贺州 546807; 4. 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 广西南宁 530028)

摘要:本研究对广山楂 *Malus doumeri* (Bois.) A. Chev. 叶水提取物的急性经口毒性和遗传毒性进行试验, 考察山楂叶的食用安全性。按《食品安全国家标准 食品安全性毒理学评价程序》规定的方法, 开展广山楂叶水提取物急性毒性和遗传毒性试验(细菌回复突变试验、哺乳动物红细胞微核试验、小鼠精原细胞染色体畸变试验)。结果表明, 广山楂叶水提取物急性毒性的半数致死量 LD₅₀ 大于 20 000 mg/kg BW; 在 8—5 000 μg/皿剂量范围内, 细菌回复突变试验结果为阴性; 在 2 500—10 000 mg/kg BW 剂量范围内, 小鼠骨髓红细胞染色体未见有损伤, 精原细胞染色体未致畸变。因此, 广山楂叶水提取物属实际无毒级, 未观察到其遗传毒性。

关键词: 广山楂叶; 水提取物; 急性经口毒性; 遗传毒性

中图分类号: Q958.8 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2024)03-0492-08

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20240910.010

广山楂叶为蔷薇科 Rosaceae 苹果属 *Malus* 植物台湾林檎 *Malus doumeri* (Bois.) A. Chev. 或光萼林檎 *M. leiocalyca* S. Z. Huang 的干燥叶子^[1-11]。广山楂也叫大果山楂^[9-12], 目前关于广山楂的公开报道主要集中在台湾林檎, 对光萼林檎的研究几乎没有报道^[6]。广山楂广泛分布于我国中部和南部地区^[11], 以及越南、老挝等东南亚地区^[9]。由于具有耐寒、喜光、耐旱、耐贫瘠、生命力强、适应性广的特性, 广山楂可在土山或石山地区种植^[12, 13]。广山楂叶可作为药材, 收录于《广西中药材标准》^[1]、《广西道地药材》^[2]、

《广西道地药材目录》^[3]、《广西壮瑶等少数民族药材目录》^[3]、《广西壮族自治区壮药质量标准: 第二卷 2011年版》^[4]。广山楂叶性平, 味微甘微苦、微芬芳, 主要功效是开胃、去湿、消滞、活血化瘀等^[6-8]。除了可药用, 广山楂叶中含有蛋氨酸、苏氨酸、维生素 C、维生素 E 等多种营养成分, 此外还含有黄酮类、三萜类、皂苷、甾醇类和有机酸等多种活性成分^[14], 民间常用广山楂叶泡茶作为饮料^[7-10, 14, 15], 因此可将其用作代用绿茶、红茶、黑茶等普通食品和保健食品原料。但目前广山楂叶尚未进入食药同源名录, 对其毒理安

收稿日期: 2023-11-12

修回日期: 2023-12-16

* 广西重点研发计划项目(桂科 AB17292012)和广西壮族自治区分析测试研究中心基本业务费项目(GXAT2022ZZ06)资助。

【第一作者简介】

叶志青(1969—), 男, 讲师, 主要从事农牧产业化与农产品加工研究, E-mail: zhiqingye@vip.sina.com。

【**通信作者简介】

卢安根(1974—), 男, 教授级高级工程师, 主要从事食品安全与质量分析研究, E-mail: 334036432@qq.com。

【引用本文】

叶志青, 卢安根, 黎颖, 等. 广山楂叶水提取物的急性毒性和遗传毒性[J]. 广西科学, 2024, 31(3): 492-499.

YE Z Q, LU A G, LI Y, et al. Acute Toxicity and Genotoxicity of Water Extract from *Malus doumeri* (Bois.) A. Chev. Leaves [J]. Guangxi Sciences, 2024, 31(3): 492-499.

全研究不足, 仅见有尹利君等^[10]、金雪萍^[16]开展的初步试验。急性经口毒性和遗传毒性是《食品安全国家标准 食品安全性毒理学评价程序》^[17]的必要部分, 而国内外迄今未见有广山楂叶遗传毒性试验的公开报道, 因此本研究以广山楂叶水提取物为对象, 进行急性经口毒性和 3 项遗传毒性试验, 为广山楂叶在食品产业中的安全应用提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 样品及处理

将新鲜采摘的成熟广山楂叶[产地: 广西昭平县, 经广西壮族自治区药用植物园余丽莹研究员鉴定为台湾林檎 *M. doumeri* (Bois.) A. Chev.] 杀青、干燥后制成干茶叶, 放在温度不高于 25 °C、相对湿度 45%—75%、无阳光直射处保存备用。称取样品 500 g, 加入 5 000 mL 85 °C 的纯水持续保温浸提 30 min, 过滤得到滤液; 对滤渣重复浸提并再过滤 1 次, 合并滤液, 减压浓缩至 500 mL, 即为 1.0 g/mL 的样品提取液(以干品计, 下同)。将样品提取液置冰箱备用, 试验前用纯水制备成受试液^[18]。

1.2 试验菌种

美国 MOLTOX 公司提供编号为 TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535 的组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium*。使用前各菌株特性经鉴定均符合试验要求。

1.3 试验动物及环境

SPF 级昆明种小鼠(长沙市天勤生物技术有限公司)。动物房环境为屏障系统, 22—25 °C 的室温, 55%—70% 的相对湿度。

1.4 主要仪器与设备

电子天平(型号: SK 5001WP, 日本 A&D 株式会社), 电子分析天平(型号: BS224S, 德国赛多利斯科学仪器有限公司), 全自动血细胞分析仪(型号: Sysmexi XT-2000i, 日本希森美康株式会社), 全自动生化分析仪(型号: OLYMPUS AU400, 日本奥林巴斯株式会社), 荧光倒置显微镜(型号: CX41, 日本奥林巴斯株式会社)。

1.5 主要试剂

动物饲料(长沙市天勤生物技术有限公司)。生化级试剂: 小牛血清(上海远慕生物科技有限公司), 营养琼脂、琼脂粉(北京陆桥技术股份有限公司), 大鼠肝微粒体酶(S_9 , 经多氯联苯诱导, 江苏齐氏生物科技有限公司)。分析纯试剂: 叠氮钠(美国 Sigma-

Aldrich 公司), 二甲基亚砜(DMSO)、环磷酰胺、2-氨基苄芬、敌克松、柔红霉素、1,8-二羟基蒽醌、秋水仙素(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

1.6 方法

参考《食品安全国家标准 食品安全性毒理学评价程序》^[17] 的评价要求进行急性经口毒性和遗传毒性试验, 方法略有修改。

1.6.1 小鼠急性经口毒性试验

采用限量法试验, 选 4 周龄的昆明种小鼠 20 只(18—22 g/只), 雌、雄性各 10 只。试验前动物禁食 6 h, 不限饮水。给动物灌胃 1.0 g/mL 的样品提取液 1 次, 每只动物的最终剂量为 20 000 mg/kg BW。灌胃后观察并记录动物是否有中毒症状表现。连续观察 14 d, 期间每周称重 1 次, 试验结束后立即解剖小鼠, 对动物进行大体观察, 如发现肝、肾等器官出现体积、颜色、质地等明显改变时, 则对改变器官进行组织病理学检查^[19]。

1.6.2 细菌回复突变试验(Ames 试验)

采用平板掺入法。设 8、40、200、1 000、5 000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 5 个剂量组, 另设 4 种对照试验组: 自发回变对照、水对照、DMSO 溶剂对照和阳性突变剂对照^[20]。使用 6 种阳性突变剂: 10 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 的 2-氨基苄[作用于添加大鼠肝微粒体酶(S_9) 的 TA97a、TA98、TA100]、50 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 的 1,8-二羟基蒽醌(作用于添加 S_9 的 TA102)、200 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 的环磷酰胺(作用于添加 S_9 的 TA1535)、6 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 的柔毛霉素(作用于未添加 S_9 的 TA98)、1.5 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 的叠氮钠(作用于未添加 S_9 的 TA100、TA1535)、50 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 的敌克松(作用于未添加 S_9 的 TA97a、TA102)。所有试验组均各做 3 个平行, 统计各组每皿的菌落数。若受试物的回变菌落数多于自发回变菌落数 2 倍以上, 并呈现剂量-反应关系, 则可以判定诱变试验结果为阳性^[20]。

1.6.3 小鼠骨髓红细胞微核试验

以经口灌胃方式开展两次试验, 中间间隔 24 h。取 5 周龄的昆明种小鼠 50 只, 雌雄小鼠体质量均为 25—30 g, 按照动物性别随机分为 5 组, 每组雌雄各 5 只。设 2 500、5 000、10 000 mg/kg BW 共 3 个剂量组, 阳性对照是 40 mg/kg BW 环磷酰胺, 阴性对照为纯水^[20,21]。第二次灌胃受试液和对照溶剂 24 h 后, 使用颈椎脱臼法处死小鼠, 取胸骨骨髓, 用小牛血清稀释涂片、甲醇固定、Giemsa 染色后再利用显微镜检查^[20,21], 每只小鼠观察 2 000 个嗜多染红细胞(PCE), 统计含有微核的细胞数, 并计算 PCE 的微核

率;另外观察 200 个 PCE,在同一视野内统计所见的正染红细胞(NCE)数目,PCE 数和 NCE 数的总和即为总红细胞(RBC)数,计算 PCE/RBC 比值^[21]。

1.6.4 小鼠精原细胞染色体畸变试验

选 30 只 7 周龄的 SPF 级雄性昆明种小鼠,体质量 30—35 g,按照随机方式将试验小鼠划分为 5 组,其中高剂量组(10 000 mg/kg BW)的小鼠数量为 10 只,其余 4 组则均为 5 只。受试液剂量组、阳性对照组、阴性对照组的设置和操作同 1.6.3 节,以经口灌胃方式进行。

对于高剂量组,在给受试液后,一批 5 只在 24 h 后处死,另一批 5 只在 48 h 后处死;其他组各 5 只均在 24 h 后处死。各试验组动物处死前 4 h,各小鼠分别经腹腔注射 0.5 mg/mL 的秋水仙素(现配现用)以阻断细胞中期分裂,剂量均为 5 mg/kg BW。颈椎脱臼法处死各组动物,从两侧睾丸取出精子,进行细胞涂片、固定、染色后再使用显微镜鉴别观察^[21]。每只小鼠统计 100 个中期分裂相细胞,油镜下观察精原细胞染色体的数量和结构变化;另外对 1 000 个精原细胞进行观察,分析其有丝分裂指数,记录每只小鼠的染色体结构畸变细胞数,以及每个细胞中的染色体畸变数,进而观察统计各试验组细胞的染色体结构畸变类型及其数量,以及细胞畸变的频率(染色体裂隙

表 1 广山楂叶水提取物对小鼠急性经口毒性试验结果($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Acute toxicity test results of water extract from *M. doumeri* (Bois) A. Chev. leaves($\bar{x} \pm s$)

性别 Gender	动物数/只 Animals	初始体重/g Initial weight/g	第 7 天体重/g Weight on day 7/g	第 14 天体重/g Weight on day 14/g	死亡数/只 Deaths	半数致死量/ (mg/kg BW) LD ₅₀ /(mg/kg BW)
Male	10	20.6±1.2	25.5±1.8	30.4±2.1	0	>20 000
Female	10	20.1±1.4	24.5±2.1	29.3±2.7	0	>20 000

2.2 细菌回复突变试验

经观察发现,所有试验平皿均无杂菌污染,背景菌苔生长正常,无沉淀生成。由表 2 可知,不管是最低剂量(8 μg/皿)还是最高剂量(5 000 μg/皿),同一试验菌株、相同试验条件下,受试液各剂量组之间的菌落数相近;5 个剂量组 5 种试验菌株的菌落数与对应的自发回变组、溶剂对照组(水、DMSO)菌落数也相差不大,但与对应的阳性对照组菌落相差显著

表 2 广山楂叶水提取物的细菌回复突变试验结果($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Ames test results of water extract from *M. doumeri* (Bois) A. Chev. leaves($\bar{x} \pm s$)

试验组 Test group	TA97a		TA98		TA100		TA102		TA1535	
	-S ₉	+S ₉								
5 000 μg/dish	125.3± 15.5*	120.0± 15.5*	37.0± 5.6*	37.7± 6.5*	154.3± 19.4*	150.0± 17.4*	274.7± 24.0*	286.0± 17.7*	20.3± 2.5*	23.3± 4.0*

不计入畸变率)^[21]。畸变细胞率(%)=畸变细胞数/观察细胞数×100%。

1.7 数据处理

采用 SPSS 20.0 软件对试验数据进行统计分析(用 $\bar{x} \pm s$ 表示数据统计结果,骨髓红细胞微核试验用泊松分布均数比较法,精原细胞染色体畸变试验用二项分布统计),显著水平为 0.05,极显著水平为 0.01。

2 结果与分析

2.1 急性经口毒性试验

从表 1 可见,以 20 000 mg/kg BW 剂量的受试液灌胃小鼠后,小鼠均未出现中毒症状,生长发育良好,连续观察 14 d 均无小鼠死亡现象。试验结束后大体解剖观察动物肝、肾、脾、心等主要脏器均未见明显异常改变。由此可知,受试液对小鼠急性经口毒性半数致死量 LD₅₀ 大于 20 000 mg/kg BW(如按 60 kg 体重的成人推荐食用量即每人每日 5 g,用该半数致死量结果换算后,该剂量相当于人体推荐食用量的 240 倍)。根据《食品安全国家标准 急性经口毒性试验》^[22] 剂量分级标准,该样品的急性经口毒性属实无毒级。

($P < 0.05$),即不管 S₉ 使用与否,本试验系统对致突变物是有效且敏感的,5 个剂量组的回变菌落数均不大于自发回变组菌落数的两倍,而且也没有表现出剂量-反应关系。按《食品安全国家标准 细菌回复突变试验》^[23] 评判,试验结果为阴性。经重复试验验证,结果也为阴性(表 3),即受试液均未引起 5 种组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌基因突变,未出现遗传毒性。

续表

Continued table

试验组 Test group	TA97a		TA98		TA100		TA102		TA1535	
	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉
1 000 μg/ dish	133.3± 15.6*	122.0± 16.6*	34.7± 4.7*	36.7± 3.2*	156.7± 25.2*	162.3± 22.0*	275.7± 24.0*	274.3± 22.5*	22.3± 4.5*	24.0± 6.6*
200 μg/dish	127.3± 15.0*	124.3± 19.1*	38.3± 7.0*	42.0± 2.7*	154.3± 24.0*	155.7± 18.0*	278.3± 22.1*	274.7± 20.6*	22.7± 5.1*	25.7± 2.1*
40 μg/dish	121.7± 21.7*	127.0± 11.5*	35.3± 6.7*	38.3± 7.0*	162.0± 23.9*	147.7± 15.3*	277.3± 20.8*	277.0± 21.9*	23.0± 4.4*	26.7± 5.1*
8 μg/dish	125.0± 16.8*	124.3± 9.5*	39.0± 5.2*	38.3± 4.0*	154.7± 19.1*	147.0± 20.4*	273.7± 21.2*	265.3± 18.9*	23.0± 6.6*	25.3± 3.5*
Spontaneous reversal group	124.7± 20.8	122.3± 17.8	36.3± 4.9	36.7± 4.7	146.7± 22.1	164.7± 20.0	274.3± 21.6	282.3± 18.0	22.7± 5.1	23.3± 4.0
Water con- trol group	129.7± 17.6	128.3± 17.0	40.0± 4.4	41.0± 3.6	152.3± 20.4	158.0± 15.1	272.7± 14.5	274.7± 18.6	22.7± 5.5	24.7± 5.5
DMSO group	119.0± 17.5	130.3± 24.2	35.3± 6.8	37.3± 5.5	162.3± 29.6	146.0± 18.0	285.7± 25.0	279.7± 24.8	23.0± 7.0	22.3± 6.8
Positive con- trol group	2 794.7± 154.8	1 796.3± 16.0	2 837.3± 97.7	4 771.0± 176.7	2 860.0± 42.6	2 937.0± 84.0	913.7± 33.8	901.7± 21.9	283.0± 12.2	144.3± 6.4

Note: -S₉ and +S₉ respectively indicated that S₉ is not added in the test and S₉ is added in the test; * represents significant difference compared with the positive control group (P<0.05).

表3 广山楂叶水提取物的细菌回复突变试验结果($\bar{x} \pm s$, 验证试验)Table 3 Ames test results of water extract from *M. doumeri* (Bois) A. Chev. leaves ($\bar{x} \pm s$, verification test)

试验组 Test group	TA97a		TA98		TA100		TA102		TA1535	
	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉
5 000 μg/ dish	118.0± 19.1*	125.3± 16.2*	37.7± 5.7*	35.0± 5.2*	152.7± 22.7*	161.7± 19.3*	281.0± 25.5*	274.0± 24.3*	22.0± 5.3*	24.0± 3.5*
1 000 μg/ dish	115.7± 19.4*	136.7± 11.0*	39.0± 5.0*	36.0± 6.6*	136.7± 10.0*	155.7± 11.6*	287.0± 16.8*	274.0± 19.1*	25.0± 7.0*	24.3± 5.0*
200 μg/dish	127.0± 19.2*	121.7± 15.3*	38.0± 6.1*	39.7± 5.1*	157.7± 21.8*	142.0± 23.6*	273.3± 20.5*	276.0± 27.2*	27.3± 4.7*	24.0± 4.0*
40 μg/dish	128.7± 21.6*	122.3± 18.0*	37.7± 6.5*	39.0± 2.0*	145.7± 22.9*	145.3± 25.6*	276.7± 22.5*	271.0± 17.5*	22.3± 3.8*	24.3± 4.7*
8 μg/dish	121.3± 15.3*	129.7± 21.2*	37.7± 5.0*	40.7± 4.2*	152.7± 21.1*	147.3± 28.3*	270.3± 20.3*	274.3± 27.5*	20.7± 4.6*	21.0± 3.6*
Spontaneous reversal group	124.7± 16.6	124.0± 21.0	34.3± 2.5	38.3± 4.0	157.7± 20.4	141.3± 26.9	275.3± 23.6	268.7± 13.4	23.3± 5.1	23.0± 5.6
Water con- trol group	127.7± 20.3	125.3± 21.6	39.0± 2.7	40.0± 3.6	128.3± 16.2	142.3± 25.1	280.3± 24.2	282.3± 21.8	23.7± 5.0	23.0± 4.4
DMSO group	119.0± 15.7	129.7± 13.4	37.3± 6.5	38.3± 4.5	151.3± 17.6	152.7± 28.6	275.0± 23.1	284.7± 24.4	22.7± 4.2	22.3± 4.7
Positive con- trol group	2 766.7± 63.2	1 786.3± 41.8	2 811.0± 90.2	4 867.0± 135.3	2 888.7± 99.1	2 983.3± 124.8	954± 37.5	930.0± 41.0	302.7± 9.7	1 32.3± 17.1

Note: -S₉ and +S₉ respectively indicated that S₉ is not added in the test and S₉ is added in the test; * represents significant difference compared with the positive control group (P<0.05).

2.3 小鼠骨髓红细胞微核试验

由表4可知,对比阴性对照组,受试液各剂量组试验动物骨髓嗜多染红细胞微核率均未表现出显著差异(P>0.05),微核率总体上不高于阴性对照组。虽然雌小鼠的低、高两个剂量组的微核率分别略高于

阴性对照组,但是该结果可能是试验的随机误差所致,低、中、高3个剂量组微核率差别很小,且呈随机分布,无剂量-反应关系。阳性对照组的微核率均值(雄、雌小鼠,下同)为21.7%,对比阴性对照组的微核率均值1.5%,两者之间有非常显著的差异(P<

0.01)。另外,各剂量组的PCE/RBC与阴性对照组之间无明显差异,且无剂量-反应关系;各剂量组之间PCE/RBC差别极小,均值为52.4%;与阴性对照组PCE/RBC均值52.7%相比,各剂量组PCE/RBC均

不低于对照组的20%。依据评价标准^[24],试验条件下广山楂叶水提取物对小鼠骨髓红细胞无致损伤和抑制作用。

表4 广山楂叶水提取物对小鼠骨髓嗜多染红细胞的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Micronucleus frequency in mouse polychromatic erythrocytes exposed to water extract from *M. doumeri* (Bois) A. Chev. leaves($\bar{x} \pm s$)

性别 Gender	试验组 Test group	PCE数/个 PCE number	含微核PCE数/个 Number of PCE containing micronucleus	微核率/% Micronucleus rate/%	PCE数/个 PCE number	NCE数/个 NCE number	PCE/RBC/%
Male	10 000 mg/kg BW	5×2 000	16	1.6±0.4	5×200	896	52.8±1.0
	5 000 mg/kg BW	5×2 000	13	1.3±0.6	5×200	920	52.1±1.0
	2 500 mg/kg BW	5×2 000	13	1.3±0.6	5×200	928	51.9±0.8
	Negative control group	5×2 000	16	1.6±0.4	5×200	903	52.6±0.3
	Positive control group	5×2 000	223	22.3±2.4**	5×200	1 003	50.0±0.9
Female	10 000 mg/kg BW	5×2 000	15	1.5±0.5	5×200	914	52.3±0.9
	5 000 mg/kg BW	5×2 000	14	1.4±0.7	5×200	905	52.5±1.3
	2 500 mg/kg BW	5×2 000	16	1.6±0.4	5×200	898	52.7±0.7
	Negative control group	5×2 000	14	1.4±0.5	5×200	896	52.7±0.7
	Positive control group	5×2 000	211	21.1±2.7**	5×200	1 006	49.9±0.9

Note: ** represents extremely significant difference compared with the negative control group($P < 0.01$).

2.4 小鼠精原细胞染色体畸变试验

如表5所示,高剂量组(24和48h)、中剂量组和低剂量组(24h)的染色体数目改变、结构改变、畸变细胞率和有丝分裂指数基本相同,不随着剂量浓度和作用时间变化。各剂量组与阴性对照组之间的指标也很相近,无显著性差异($P > 0.05$),但阳性对照组

与阴性对照组在畸变细胞率方面则表现出了极显著差异($P < 0.01$)。所以,各剂量组与阴性对照组相比均无显著差异,更无剂量-反应关系。以上结果表明,染色体损伤和致畸作用并非由广山楂叶水提取物对小鼠精原细胞的试验引起。

表5 广山楂叶水提取物对小鼠精原细胞染色体畸变的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Abnormality frequency of mouse spermatogonia exposed to water extract from *M. doumeri* (Bois) A. Chev. Leaves($\bar{x} \pm s$)

试验组 Test group	每只小鼠观察细胞数/个 Observed cell count	染色体数目改变/个 Chromosome number change		染色体结构改变/个 Chromosome structure change						畸变细胞数/个 Aberrant cell number	畸变细胞率/% Aberrant cell rate/%	有丝分裂指数 Mitotic index
		非整倍体 Aneuploidy	多倍体 Polyploid	裂隙 Fissure	断裂 Breakage	断片 Fragment	微小体 Microsome	环形 Ring	其他 Other			
10 000 mg/kg BW(24 h)	100	0	30	5	2	0	0	0	0	32	6.4±0.9	7.2±1.5
10 000 mg/kg BW(48 h)	100	0	28	2	4	0	0	0	0	32	6.4±0.9	7.2±1.6
5 000 mg/kg BW(24 h)	100	0	30	4	3	0	0	0	0	33	6.6±1.9	7.5±1.0
2 500 mg/kg BW(24 h)	100	0	27	3	4	0	0	0	0	31	6.2±1.3	7.2±1.4

续表

Continued table

试验组 Test group	每只小鼠 观察细胞 数/个 Observed cell count	染色体数目 改变/个 Chromosome number change		染色体结构改变/个 Chromosome structure change						畸变细 胞数/个 Aberrant cell number	畸变细 胞率/% Aberrant cell rate/%	有丝分裂 指数 Mitotic index
		非整倍体 Aneu- ploidy	多倍体 Poly- ploid	裂隙 Fissure	断裂 Brea- kage	断片 Frag- ment	微小体 Micro- some	环形 Ring	其他 Other			
Negative control group (24 h)	100	0	29	4	3	0	0	0	0	32	6.4±2.1	7.3±1.3
Positive control group (24 h)	100	0	27	19	17	17	2	1	0	64	12.8±1.8**	4.5±0.7

Note: ** represents extremely significant difference compared with the negative control group ($P < 0.01$).

3 讨论

3.1 广山楂叶的急性经口毒性与提取溶剂、灌胃持续时间等因素关系

金雪萍^[16]采用最大耐受剂量法对林檎叶进行试验,样品分别经纯水、乙醇提取以及经纯水、乙醇提取后再经酸、碱、乙酸乙酯等溶剂提取,提取液分别灌胃7 d后发现纯水提取液、乙醇提取液处理组均未见动物死亡,表现为实际无毒;但是使用乙醇提取后再通过酸溶解的提取物是有毒性的,LD₅₀为2.12 g/mL^[16],按动物体重折算为42 400 mg/kg BW。由于最大耐受剂量法在2014年发布的《食品安全国家标准 急性经口毒性试验》^[22]中已经被删除,本研究采用现行有效的限量法试验,将广山楂叶用纯水浸提后动物灌胃14 d,结果提示样品LD₅₀大于20 000 mg/kg BW,研究所涉及的提取溶剂、灌胃持续时间与金雪萍^[16]不同,但是水提取物试验的结论一致,均没有急性毒性。

3.2 Ames 试验剂量设计

Ames 试验是评价基因突变的一种经典的体外试验方法^[25-27]。本试验样品经过纯水浸提获得,水溶解性好,设计剂量已达到《食品安全国家标准 细菌回复突变试验》^[23]对细菌回复突变试验剂量最高推荐量为5 mg/皿的要求,试验结果并未观察到诱变作用,可能原因是试验样品的剂量浓度不够大,或试验样品不存在诱变物质,或即使试验样品可能存在诱变物质,但是不能被原核生物鼠伤寒沙门氏菌利用^[23]。鉴于此,从食品安全评价的角度考虑不必再提高样品剂量浓度,同时也说明样品无诱变作用,试验设计和结果均满足要求。

3.3 染色体畸变异常现象

染色体畸变试验作为致基因突变的有效检测手段,是评价机体或培养细胞被外源性化学物质作用后引发遗传物质损伤的方法,其遗传学终点是染色体分离、完整性改变^[21]。本试验中,低剂量组(2 500 mg/kg BW)出现的畸变细胞率和有丝分裂指数分别低于阴性对照的0.2%和0.1,极有可能是因为精原细胞染色体畸变试验存在一定的随机误差^[28],也可能是秋水仙素有一定毒性导致的染色体变化^[29]。试验同时发现,各剂量组的染色体结构改变主要体现在染色体裂隙和断裂,而微小体、环形、多着丝点、单体互换、非特定形等改变均未发现,这与以纯水作为阴性对照组的表现一致,因此上述变化主要为生物细胞自发突变所致,与受试样品的致突变作用无直接关系。

4 结论

本研究为验证广山楂叶水提取物的急性经口毒性,首次开展了3项遗传毒性试验,包括细菌回复突变、小鼠骨髓红细胞微核试验、精原细胞染色体畸变试验,结果表明广山楂水提取物属实际无毒级,未观察到其遗传毒性。本研究为广山楂叶用作食品、保健食品原料的开发利用提供安全毒理学支撑。

参考文献

- [1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准:1990版[M]. 南宁:广西科学技术出版社,1992:21-22.
- [2] 邓家刚,韦松基. 广西道地药材[M]. 北京:中国中医药出版社,2007:24-31.
- [3] 广西壮族自治区中医药管理局,广西壮族自治区农业农村厅,广西壮族自治区林业局,等. 自治区中医药局等4部门关于发布《广西道地药材目录》和《广西壮瑶等少数民族药材目录》的通知:桂中医药发〔2023〕11号[A/

- OL]. (2023-05-30)[2023-10-24]. <http://zyyj.gxzf.gov.cn/xwdt/gxgg/t16576294.shtml>.
- [4] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准: 第二卷 2011年版[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2011: 17-18.
- [5] 陈勇, 甄汉深, 陆雪梅. 广山楂主要化学成分的定量研究[J]. 中药研究与信息, 2000, 2(11): 18-19, 21.
- [6] 赵帅, 郝二伟, 杜正彩, 等. 广山楂的化学成分、药理作用与质量控制研究进展[J]. 中成药, 2020, 42(1): 169-175.
- [7] 杨海玲, 吴丽丹, 张益, 等. 广山楂质量控制研究进展[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(17): 48-49.
- [8] 张萌, 邓家刚, 韦玮, 等. 广山楂 HPLC 指纹图谱建立及其活血化瘀作用谱效关系研究[J]. 中草药, 2023, 54(2): 601-607.
- [9] 潘莹, 张林丽. 大果山楂的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(12): 2972-2973.
- [10] 尹利君, 陈路, 刘钰, 等. 广西大果山楂叶提取物对大鼠的长期毒性初步研究[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(15): 62-65.
- [11] 孙博, 霍华珍, 蔡爱华, 等. 不同产地大果山楂总黄酮含量及抗氧化活性[J]. 广西科学, 2020, 27(4): 356-361.
- [12] 郝静伟, 蓝金宣, 黄晓露, 等. 大果山楂幼苗生长节律分析[J]. 广西林业科学, 2022, 51(6): 828-835.
- [13] 马瑞丰, 钟进良, 黄静, 等. 大果山楂品种特性及栽培技术[J]. 现代园艺, 2016(13): 45-46.
- [14] 刘岩, 钱关泽. 林檎生物活性功能研究进展及饲用开发价值[J]. 特种经济动植物, 2023, 26(7): 159-164.
- [15] 尚本清, 王融初, 罗军武, 等. 林檎叶的综合利用研究: II. 叶片浸出物的抑菌效应[J]. 湖南农学院学报, 1994, 20(3): 240-243.
- [16] 金雪萍. 林檎叶提取物急性毒性实验研究[J]. 食品与机械, 2004, 20(2): 16-17.
- [17] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品安全性毒理学评价程序: GB 15193. 1-2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [18] 温立香, 张芬, 袁冬寅, 等. 广西虫茶毒理学安全性评价研究[J]. 茶叶通讯, 2022, 49(1): 102-107.
- [19] 付满玲, 黄雨佳, 刘珉甬, 等. 山楂代用茶对大鼠经口急性毒性实验[J]. 医学信息, 2020, 33(1): 77-80.
- [20] 王华晶, 秦华炎, 李怀宇, 等. 三七多糖的安全性评价[J]. 云南中医中药杂志, 2017, 38(12): 56-60.
- [21] 丁小全, 魏琳琳, 冯文燕, 等. 苦水玫瑰急性经口毒性和遗传毒性研究[J]. 甘肃中医药大学学报, 2023, 40(4): 1-7.
- [22] 中华人民共和国国家卫生与健康委员会. 食品安全国家标准 急性经口毒性试验: GB 15193. 3-2014[S/OL]. 北京: 中华人民共和国国家卫生与健康委员会, 2014: 1-21[2020-5-10]. <http://www.nhc.gov.cn/sps/s3593/201412/d9a9f04bc35f42ecac0600e0360f8c89.shtml>.
- [23] 中华人民共和国国家卫生与健康委员会. 食品安全国家标准 细菌回复突变试验: GB 15193. 4-2014[S/OL]. 北京: 中华人民共和国国家卫生与健康委员会, 2014: 1-15[2020-5-10]. <http://www.nhc.gov.cn/sps/s3593/201412/d9a9f04bc35f42ecac0600e0360f8c89.shtml>.
- [24] 中华人民共和国国家卫生与健康委员会. 食品安全国家标准 哺乳动物红细胞微核试验: GB 15193. 5-2014[S/OL]. 北京: 中华人民共和国国家卫生与健康委员会, 2014: 1-4[2020-5-10]. <http://www.nhc.gov.cn/sps/s3593/201412/d9a9f04bc35f42ecac0600e0360f8c89.shtml>.
- [25] 钟文权, 郑联合, 邹易, 等. 琼崖海棠籽油的遗传毒性评价[J]. 中国油脂, 2020, 45(12): 66-70, 104.
- [26] 黄宗锈, 赵康涛, 黄佳宁, 等. 山苍子根提取物遗传毒性及亚急性毒性研究[J]. 毒理学杂志, 2023, 37(3): 241-246.
- [27] 王亚楠, 文海若, 王雪. 遗传毒性基因突变评价方法的研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2019, 31(5): 406-411.
- [28] 郝彬秀, 应剑, 孟庆佳, 等. 螃蟹脚全粉的急性毒性和遗传毒性[J]. 食品科学, 2016, 37(21): 248-251.
- [29] 文海若, 王亚楠, 宋捷, 等. 哺乳动物细胞染色体畸变试验的标准化与背景数据采集[J]. 药物评价研究, 2018, 41(5): 727-733.

Acute Toxicity and Genotoxicity of Water Extract from *Malus doumeri* (Bois.) A. Chev. Leaves

YE Zhiqing¹, LU Angen^{2**}, LI Ying², YE Zhiping³, ZHANG Jiehong⁴, LI Dequan², HUANG Weijing²

(1. Institute of Agriculture and Animal Husbandry Industry Development, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 2. Guangxi Zhuang Autonomous Region Center for Analysis and Test Research, Nanning, Guangxi, 530022, China; 3. Guangxi Zhaoping County Lincheng Ecological Agriculture Professional Cooperatives, Hezhou, Guangxi, 546807, China; 4. Guangxi Zhuang Autonomons Recion Center for Disease Control and Prevention, Nanning, Guangxi, 530028, China)

Abstract: The edible safety of the water extract from *Malus doumeri* (Bois.) A. Chev. leaves was examined by acute oral toxicity and genotoxicity tests. According to the experimental method of *National Food Safety Standard-Procedure for Toxicological Evaluation of Food Safety*, the toxicity of *M. doumeri* (Bois.) A. Chev. leaves was evaluated by acute toxicity and genotoxicity tests (including Ames test, mammalian erythrocyte micronucleus test, and chromosome aberration test of mouse spermatogonia). The results showed that the median lethal dose (LD₅₀) of the water extract from *M. doumeri* (Bois.) A. Chev. leaves was greater than 20 000 mg/kg BW. In the range of 8–5 000 μg/dish, the water extract showed a negative result in the Ames test. Within the dose range of 2 500–10 000 mg/kg BW, the water extract did not cause damage to mouse bone marrow erythrocytes or lead to chromosome aberration of mouse spermatogonia. According to the results, the water extract of *M. doumeri* (Bois.) A. Chev. leaves was non-toxic and demonstrated no genotoxicity under the test conditions.

Key words: *Malus doumeri* (Bois.) A. Chev. leaves; water extract; acute oral toxicity; genotoxicity

责任编辑:米慧芝



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxkx@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxkx.ijournal.cn/gxkx/ch>