DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.03.038

枳术精油化学成分GC-MS分析及其对小鼠急性毒性实验研究

叶祖文[1],林巧红[1],徐焕华[2],白英炎[1],杨明[2],王芳[1,2]
(1.江西中医药大学癌症研究中心,江西 南昌 330004;2.江西中医药大学现代中药制剂重点实验室,江西 南昌 330004)

摘要:目的 分析枳术精油化学成分、含量,探讨不同剂量的枳术精油对小鼠的急性毒性。方法 采用气相色谱-质谱联用仪(Gas chromatography-mass spectrometer,GC-MS)对其化学成分进行分析鉴定,分别给予荷荷巴油和枳术精油灌胃给药后,观察小鼠的活动、饮食、饮水、体质量、死亡等情况,用加权回归法(Weighted regression method,Bliss)计算半数致死量(Median lethal dose,LD_{50})及95%置信区间。结果 经GC-MS检测,共鉴定出枳术精油化学成分主要有10种,其相对百分含量占总精油量的46.41%,分别为苍术酮、D-柠檬烯、β-蒎烯、γ-揽香烯、白术内酯Ⅱ、β-elinene、trans-Caryophyllene。枳术精油对小鼠的毒性实验结果表明枳术精油对存活小鼠饮食、饮水及体质量无明显影响。通过Bliss法计算得枳术精油的LD_{50}为1.681 mL/kg,表现出一定的毒性,LD_{50}的95%置信区间为3.367~7.417 mL/kg;回归方程为Y(Probit)=-1.228+7.612 lgD。结论 苍术酮、D-柠檬烯等为枳术精油的主要成分,枳术精油具有一定的毒性,且脏器指数与病理观察显示毒性主要表现在血液血管方面,主要作用在肝、脾和肾脏,其毒性与给药剂量相关,在一定剂量范围内可安全使用。

关键词:枳实;白术;精油;化学成分;急性毒性;GC-MS
中图分类号:R285.5;R284.1 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)03-0198-13

Analysis on Chemical Constituents of Zhishi(Aurantii Immaturus Fructus)-Baizhu(Atractylodis Macrocephalae Rhizoma) Essential Oil by GC-MS and Their Acute Toxicity in Mice

YE Zuwen[1],LIN Qiaohong[1],XU Huanhua[2],BAI Yingyan[1],YANG Ming[2],WANG Fang[1,2]
(1. Cancer Research Center, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, Jiangxi, China;
2. Key Laboratory of Modern Traditional Chinese Medicine Formulation, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, Jiangxi, China)

基金项目:国家自然科学基金项目(82204627);全国中药特色技术传承骨干项目(1242301703);江西省双高人才项目(12623008);江西省中医药中青年人才培养计划项目(1242301009);江西中医药大学校级科技创新团队发展计划项目(CXTD-22004);江西中医药大学研究生创新专项基金项目(JZYC23S72);江西中医药大学创新创业项目(X202310412227)
作者简介:叶祖文(1998-),女,贵州遵义人,硕士在读,研究方向:中药药理与制剂开发。
通讯作者:王芳(1983-),女,江西赣州人,教授,硕士研究生导师,研究方向:中药药效学。E-mail:cat689apple@163.com。
杨明(1962-),男,四川成都人,教授,博士研究生导师,研究方向:中药新剂型与新技术。E-mail:lab215@163.com。

[30] BAJAJ N S,GUTIÉRREZ O M,ARORA G,et al. Racial differences in plasma levels of n-terminal pro-b-type natriuretic peptide and outcomes: the reasons for geographic and racial differences in stroke(REGARDS) study[J]. JAMA Cardiol,2018,3(1):11-17.
[31] CHANG S N,SUNG K T,HUANG W H,et al. Sex,racial differences and healthy aging in normative reference ranges on diastolic function in Ethnic Asians: 2016 ASE guideline revisited[J]. J Formos Med Assoc,2021,120(12):2160-2175.
[32] 褚颖,李婷婷. 强心益脉汤辅助治疗气虚血瘀型高血压伴射血分数保留心力衰竭患者的疗效[J]. 深圳中西医结合杂志,2022,32(3):60-63.
[33] 杨林,谢钢,吴超,等. 管通汤治疗射血分数保留的心衰患者40例临床观察[J]. 湖南中医杂志,2021,37(5):5-8.
[34] 李刘英,车德亚. 强心益脉汤治疗射血分数保留心力衰竭(气虚水停夹瘀型)临床疗效观察[J]. 四川中医,2020,38(2):76-80.
[35] 陆庆旺,周红海,秦明芳,等. 腰痛中医证候规范化及客观化研究进展[J]. 中国中医急症,2021,30(6):1108-1112.
[36] 白晓晖,李晓娟,陈家旭,等. 微观辨证在现代中医辨证论治体系的发展和应用[J]. 中华中医药杂志,2015,30(3):649-651.
[37] 陈永忠. B型利钠肽、6分钟步行试验及Tei指数与慢性心力衰竭中医证型的关系[D]. 福州:福建中医学院,2008.
[38] 康善平,彭绍杰. 彭绍杰教授治疗高脂血症经验[J]. 时珍国医国药,2014,25(6):1490.
[39] 万智,仝淼. 沈宝藩教授辨治高脂血症思路探析[J]. 新疆中医药,2018,36(1):40-42.
[40] 陈馨浓,葛其卉,赵一璇,等. 从"脉中积"认识动脉粥样硬化[J]. 中医杂志,2022,63(16):1532-1537.
[41] 刘继东,张哲,贾连群,等. 从现代生物学角度探讨动脉粥样硬化"痰浊-痰结-痰瘀"病机演变规律[J]. 中华中医药学刊,2021,39(2):109-112.
[42] 刘子怡,李金双,侯美琪,等. 基于"脾-痰-血脂"相关理论探讨动脉粥样硬化[J]. 中华中医药杂志,2019,34(10):4702-4704.
[43] 高嘉良,何庆勇. 基于19877例文献病例的血脂异常证候要素及靶位研究[J]. 中华中医药杂志,2014,29(2):605-607.
[44] 郭宏昌,牛晓亚,张向东. 痰浊证与血脂水平关系的研究[J]. 河南中医药学刊,1998(6):20-21.
[45] 许凌之,龚少愚. 1264例动脉粥样硬化患者中医证候特征研究[J]. 陕西中医学院学报,2015,38(1):16-19.

Abstract: *Objective* To analyze the chemical composition and contents of Zhishi (Aurantii Immaturus Fructus) - Baizhu (Atractylodis Macrocephalae Rhizoma) essential oil (ZBEO) and explore the acute toxicity of different doses of chemical constituents of ZBEO in mice. *Methods* GC - MS was used to analyze and identify the chemical composition. After oral administration of jojoba oil and ZBEO, the activity, diet, water intake, body weight, mortality and other conditions of the mice were observed. The values of median lethal dose (LD_{50}) and 95% confidence interval were calculated by using the weighted regression method (Bliss). *Results* Through GC - MS analysis, a total of 10 chemical components were identified in ZBEO, accounting for 46.41% of the total oil content. The main components were curzerenone, D - limonene, β - pinene, γ - elemene, atractylenolide Ⅱ, β - elinene and trans - caryophyllene. The toxicity experiment of ZBEO on mice showed no significant effects on the diet, water intake or body weight of the surviving mice. The value of LD_{50} of ZBEO was calculated to be 1.681 mL/kg by using the Bliss method, indicating a certain level of toxicity. The 95% confidence interval for LD_{50} was 3.367 ~ 7.417 mL/kg. The regression equation was Y(Probit) = -1.228 + 7.612 lgD. *Conclusion* Curzerenone and D - limonene are the main components of ZBEO. The essential oil exhibits a certain level of toxicity, mainly affecting the blood vessels as indicated by organ index and pathological observations. The main affected organs are liver, spleen and kidney. The toxicity is dose - dependent, and within a certain dosage range, it can be safely used.

Keywords: Zhishi (Aurantii Immaturus Fructus); Baizhu (Atractylodis Macrocephalae Rhizoma); essential oil; chemical composition; acute toxicity; GC - MS

枳实始载于《神农本草经》[1]，2020 年版《中华人民共和国药典》规定其为芸香科植物酸橙（*Citrus aurantium L.*）及其栽培变种或甜橙（*Citrus sinensis Osbeck*）的干燥幼果[2]。药性苦、寒，入脾、胃经，主治胸腹胀满、胸痹、痞痛、痰癖、水肿、食积、便秘[3]，现代药理学表明，枳实具有调节胃肠运动[4]、强心[5]、抗氧化[5]、镇痛[6]、抗菌[6]、降血糖[7]、抗休克[8]、降血脂[9]等药理作用。白术（Atractylodes macrocephala Koidz）为菊科植物白术的干燥根茎。药性苦甘、温，入脾、胃经，主治脾胃气弱，不思饮食，倦怠少气[10]。也有研究表明白术具有抗肿瘤[11-13]、抗炎[14]、抗动脉粥样硬化[15]、抗抑郁[16]、降糖[17]、调节胃肠功能[18]等药理作用。枳实与白术组成经典药方枳术汤，出自张仲景《金匮要略》[19]，二者配伍有补泻兼施的功效，主治气滞水停、胃脘疼痛、小便不利、舌淡红、苔腻、脉沉等。

本文采用气相色谱 - 质谱联用技术（Gas chromatography - mass spectrometer，GC - MS）分析鉴定枳术精油的有效化学成分及含量。此外，本研究依据《中药、天然药物急性毒性研究指导原则》的要求，以无特定病原体动物（Specific pathogen free，SPF）级小鼠为研究对象，探讨不同剂量枳术精油（枳实与白术精油）对小鼠的急性毒性作用，测定枳术精油半数致死量（Median lethaldose，LD_{50}），观察其对小鼠的毒性反应及对小鼠心、肝、脾、肺和肾脏的损害作用，为进一步进行毒性实验的剂量和毒性观察指标的选择提供依据，并为临床用药安全提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

枳实精油与白术精油均购自绵阳市长生园药材开发有限公司（中国四川绵阳），正己烷（上海阿拉丁生化科技股份有限公司，E2105048），荷荷巴油（上海颇黎医药科技有限公司，0000042245），无水乙醇（国药集团化学试剂有限公司，100092683），正丁醇（国药集团化学试剂有限公司，10005218），二甲苯（国药集团化学试剂有限公司，10023418），苏木素（Solarbio，H8070），多聚甲醛固定液（Solarbio，22385182），蒸馏水。SPF 级 KM 小鼠 180 只，雌雄各半，体质量 18 ~ 22 g，生产许可证号：SYXK（赣）2017 - 0004，质量合格证号：110324231104470056，于江西中医药大学内进行实验，常规分笼喂养，自由摄食，自由饮水。

气相色谱 - 质谱联用仪（GC - MS：安捷伦 7890A 和 5975C，安捷伦科技公司，美国加利福尼亚州圣克拉拉），HP - 5MS 色谱柱（30 m × 0.25 mm，0.25 μm），脱水机（武汉俊杰电子有限公司，JT - 12J），病理切片机（徕卡显微系统有限公司，RM2016），包埋机（武汉俊杰电子有限公司，JB - L5），正置显微镜（徕卡显微系统有限公司，MD1000）。

1.2 GC - MS 分析

1.2.1 分析样本制备 枳实与白术精油收到后，在实验前将产品储存在 4°C 阴凉柜中，以尽量减少精油的化学成分和生物活性的任何变化。精密吸取精油样品 100 μL 至 10 mL 容量瓶中，用正己烷定容，过 0.22 μm 的微孔滤膜，制得供 GC - MS 分析的样品。

1.2.2 分析条件 分析条件如下：气相色谱条件：采用 Agilent HP - 5MS 色谱柱（0.25 mm × 30 m，0.25 μm）毛细管柱。载气为高纯度氦（99.999%），进样量为 1 μL，不分流，流速为 1 mL/min。进样口的温度设置为 250 ℃，升温程序如表 1 所示。质谱条件：EI 离子源，电子能量 70 eV，离子源温度 230 ℃，MS 四极管温度 150 ℃，界面温度 250 ℃，溶剂延迟 3.0 min，质量扫描模式为全扫描，扫描质量范围 m/z 为 30 ~ 650。将各样品中的芳香族化合物以各自峰面积的相对比例（%）表示，方法是将峰面积转换为基于总峰面积的百分比为 100%。

1.3 小鼠急性毒性实验

1.3.1 预实验 药物配制：将枳实 - 白术精油和荷荷巴油分别配制成 7.50、5.00、2.50、1.20、0.60、0.30 mL/kg 浓度，混匀后用于急性毒性预实验。取 SPF 级 KM 小鼠 60 只，雌雄各半，体质量 18 ~ 22 g，随机分为 6 组，每组 10 只。设 7.50、5.00、

2.50、1.20、0.60、0.30 mL/kg 6 个剂量组，按 20.00 mL/kg 单次灌胃给药，给药前禁食 6～12 h，药后观察 14 d。确定 5.00 mL/kg 为最高致死剂量（LD_{100}），0.60 mL/kg 为最小致死剂量（LD_0）。

表 1 GC－MS 梯度升温程序

项目	速率/（℃·min^{-1}）	温度值/（℃）	运行时间/（min）	保持时间/（min）
初始值		40	0	1
梯度 1	5	220	18	0
梯度 2	15	280	2.4	9

1.3.2 正式实验 药物配制：将枳实－白术精油和荷荷巴油分别配制成 5.00、2.50、2.00、1.20 和 0.60 mL/kg 浓度，混匀后用于正式实验。取 KM 小鼠 120 只，SPF 级，雌雄各半，体质量 18～22g，随机分为 6 组，每组 20 只。设 5.00、2.50、2.00、1.20 和 0.60 mL/kg 5 个剂量组，另设溶媒（荷荷巴油）对照组。给药前禁食 6～12 h，按 20.00 mL/kg 单次灌胃给药。给药后 2 h 内禁食不禁水，记录每组小鼠的行为和死亡状况，死亡时间和死亡时的重量，并对死亡动物进行大体解剖观察并记录。2 h 后自由饮食饮水，连续 14 d 观察动物体重、进食量、饮水量、一般行为。

1.3.3 脏器指数测定 小鼠死亡或处死后，取心、肝、脾、肺、肾和脑并称重，计算脏器指数。脏器指数/（%）= A / B × 100%。式中，A：脏器质量（mg）；B：体质量（g）。

1.3.4 脏器组织病理学观察 心、肝、脾、肺、肾和脑用 4% 多聚甲醛固定 24 h。自动脱水机脱水，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，苏木精－伊红染色法（Hematoxylin－Eosin staining，HE）染色后封片，在光学显微镜下观察。

1.3.5 统计学方法 用 SPSS 21.0 软件进行处理和统计分析，几率单位加权回归法（Weighted regression method，Bliss）计算半数致死量（median lethal dose，LD_{50}）及 LD_{50} 的 95% 置信区间。计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，各组间差异用单因素方差分析（one－way ANO－VA），$P<0.05$ 表示差异有统计学意义；$P<0.01$ 表示差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 GC－MS 分析枳术精油成分

经 GC－MS 检测，枳术精油中成分主要有 11 种，其相对百分含量占总精油量的 46.41%，含量最高的成分为苍术酮（Atractylon）、β－蒎烯（β－Panasinsene）、γ－揽香烯（γ－Elemene）、D－柠檬烯（D－limonene）分别为 19.91%、7.27%、6.45%、5.71%，含量向下依次为 β－elinene 4.32%、trans－Caryophyllene 2.03%（表 2 和图 1）。

表 2 枳实－白术精油主要化学式成分信息

序号	化合物名称（英文名称）	化学式	含量/（%）	CAS
1	Atractylon	$C_{15}H_{20}O$	19.91	006989－21－5
2	beta.－Panasinsene	$C_{14}H_{26}O_{11}$	7.27	1000159－39－0
3	gamma.－Elemene	$C_{15}H_{24}$	6.45	029873－99－2
4	D－Limonene	$C_{10}H_{16}$	5.71	005989－27－5
5	beta－selinene	$C_{15}H_{24}$	4.32	017066－67－0
6	trans－Caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	2.03	000087－44－5
7	3,4,5,6,7,8－Hexahydro－3α,8α－dimethyl－5α－(1－methylethenyl) azulene－1(2H)－one	$C_{15}H_{22}O$	1.70	018374－76－0
8	Cyperene	$C_{15}H_{24}$	1.37	002387－78－2
9	Berkheyaradulene	$C_{15}H_{24}$	1.24	065372－78－3
10	(－)－spathulenol	$C_{15}H_{24}O$	1.08	077171－55－2
11	Germacrene D	$C_{15}H_{24}$	1.04	023986－74－5

2.2 枳术精油对小鼠急性毒性测定

2.2.1 一般临床症状观察 枳实－白术精油 5.00 mL/kg 剂量组均在给药后约 20 min 活动增加、小鼠站立；约 50 min 出现步态不稳、摇晃；约 80 min 出现俯卧；约 150 min 出现呼吸频率减慢；约 600 min 出现翻正反射消失，约 24 h 时 5.00 mL/kg 剂量组所有小鼠翻正反射消失，死亡时间集中在 10～24 h。各组小鼠行为详见表 3，其他未见异常，至 14 d 观察期结束，存活小鼠未出现死亡，未见明显临床症状。

2.2.2 各组小鼠死亡情况统计 死亡情况见表 4。大多数小

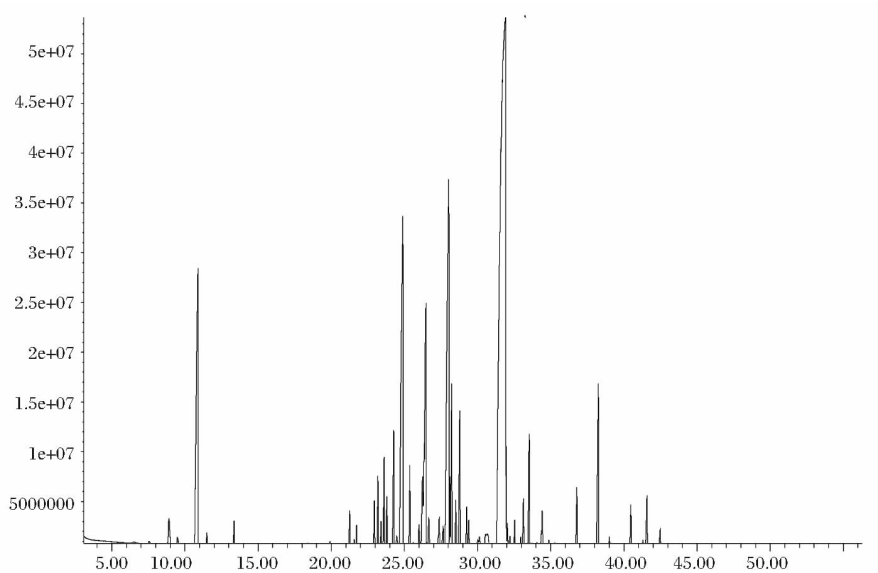


图 1 枳实－白术精油的 GC－MS 图谱

表 3 小鼠急性毒性实验观察

观察项目	0.60 mL/kg 及 5.00 mL/kg 剂量组表现和症状
自发活动	不喜活动或活动增加
肌肉运动	震颤、抽搐
反应	紧张不安、反应迟钝
呼吸	抑制、急促、衰竭
死亡特征	挣扎、蜷缩

表 4 各组小鼠死亡时间分布

剂量/(mL/kg)	n	<6 h		24 h		48 h		3~14 d		死亡率/(%)	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
溶媒对照组	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5.00	10	1	1	7	8	2	1	0	0	100	100
2.50	10	0	0	7	6	2	1	0	0	90	70
2.00	10	0	0	6	5	1	1	0	0	70	60
1.20	10	0	0	2	2	1	0	0	0	30	20
0.60	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

鼠在给药 24 h 内死亡,少数在给药 24~48 h 内死亡。共观察 14 d,在随后的 11 d 内未观察到死亡。从死亡数量的角度来看,动物的性别与死亡无关。

2.2.3 枳术精油对小鼠体质量的影响 表 5 和表 6 显示,与给药前相比,0.60 mL/kg 剂量组雌性小鼠体质量在第 3 天差异有统计学意义($P<0.001$),其余剂量组雌性小鼠在第 14 天差异有统计学意义($P<0.001$)。存活的雌、雄小鼠的体质量均有较好的增长。这表明枳术精油基本上不会影响存活小鼠的体质量增长。

2.2.4 枳术精油对小鼠饮食量的影响 表 7、表 8 中的结果显示,在第 1、7、11 和 14 天,1.20 mL/kg 剂量组雌性小鼠的进食量高于溶媒对照组;在第 1、11 和 14 天,2.50 mL/kg 剂量组雌性小鼠的进食量高于溶媒对照组。其他处理组小鼠的饮食与溶媒对照组没有显著差异。

2.2.5 枳术精油对小鼠饮水量的影响 表 9、表 10 结果显示,与溶媒对照组相比,5.00 mL/kg 雌性小鼠第 1 天、0.60 mL/kg 雌性小鼠第 2、3 天饮水量较高。5.00 mL/kg 雄性小鼠饮水量较高,2.00、1.20 和 0.60 mL/kg 剂量组雄性小鼠在第 14 天饮水量较高。其余饮水量差异不大,说明枳术精油可能会增大存活小鼠饮水量,但总体影响不大。

2.2.6 各组小鼠体质量及心、肝、脾、肺、肾、脑质量统计 对给药后 24 h 内死亡和 14 d 后的存活小鼠进行解剖、称重。脏器指数结果显示(图 2),与溶媒对照组相比,各组心、脑脏器指数差异无统计学意义($P>0.05$);1.20 mL/kg 剂量组肝、肺脏器指数有明显差异($P<0.05$);2.00 mL/kg 剂量组脾、肺脏器指数差异显著($P<0.05$),且肝、肾脏器指数差异有统计学意义($P<0.01$);2.50 mL/kg 剂量组肝、脾脏器指数差异有统计学意义($P<0.05$),脾脏器指数差异有统计学意义($P<0.001$);5.00 mL/kg 剂量组脾、肺脏器指数差异有统计学意义($P<0.01$)。提示过量使用精油可能会对内脏造成不良反应。

表 5 各组雌性小鼠体质量的变化($\bar{x}\pm s$) 单位:g

剂量/(mL/kg)	n	给药前	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天
溶媒对照组	10	22.77±0.71(10)	25.23±1.06(10)	28.78±2.17(10)	29.16±2.21(10)	36.29±3.69(10)
5.00	10	22.91±1.57(10)	22.66±2.84(10)	23.30±0.00(1)	—	—
2.50	10	23.79±0.85(10)	22.00±0.86(10)	20.86±3.38(3)	21.17±4.77(3)	33.06±4.99(3)***
2.00	10	22.93±0.99(10)	21.49±1.06(10)	23.67±2.71(4)	24.45±5.19(4)	36.66±2.63(4)***
1.20	10	23.87±1.42(10)	23.47±1.80(10)	26.26±2.20(8)	27.06±2.66(8)*	39.12±3.47(8)***
0.60	10	24.01±1.08(10)	24.04±1.47(10)	28.46±1.68(10)***	29.44±1.64(10)***	38.75±3.56(10)***

注:"—"表示小鼠全部死亡。*与同组给药前比较,$P<0.05$;***与同组给药前比较,$P<0.001$。

表 6 各组雄性小鼠体质量的变化($\bar{x}\pm s$) 单位:g

剂量/(mL/kg)	n	给药前	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天
溶媒对照组	10	23.80±1.46(10)	25.64±1.64(10)	29.70±1.88(10)***	29.70±2.23(10)***	36.29±3.69(10)***
5.00	10	23.10±0.57(10)	24.04±1.47(10)	—	—	—
2.50	10	24.20±0.92(10)	25.28±1.08(10)	28.02±0.00(3)**	32.43±0.00(1)***	39.54±0.00(1)***
2.00	10	24.22±1.63(10)	23.26±1.42(10)	20.81±2.19(4)**	26.87±1.04(4)*	38.71±1.71(4)***
1.20	10	23.90±0.74(10)	22.80±1.79(10)	28.14±1.35(7)***	27.37±1.48(7)***	39.07±0.97(7)***
0.60	10	23.60±1.07(10)	24.98±2.07(10)	30.22±1.94(10)***	31.45±4.67(10)***	39.78±3.01(10)***

注:"—"表示小鼠全部死亡。*与同组给药前比较,$P<0.05$;**与同组给药前比较,$P<0.01$;***与同组给药前比较,$P<0.001$。

表 7 各组雌性小鼠饮食量的变化($\bar{x}\pm s$) 单位:g

剂量/(mL/kg)	n	给药前	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 7 天	第 11 天	第 14 天
溶媒对照组	10	5.30±0.68	5.32±0.03	5.59±0.47	5.11±0.24	5.29±0.68	5.31±0.24	5.29±0.01
5.00	10	4.61±0.18	4.55±0.07	—	—	—	—	—
2.50	10	5.60±0.57	6.33±3.64	4.35±1.63	3.90±1.56	5.25±0.49	5.78±0.95	5.80±0.42
2.00	10	4.62±0.40	3.65±0.92	2.49±2.58	3.72±1.02	4.15±1.30	4.17±1.14	4.01±1.06
1.20	10	4.92±0.25	5.47±0.47	2.17±0.71	5.73±1.40	7.70±2.07	7.67±1.79	7.53±1.79
0.60	10	4.77±0.01	4.29±0.89	4.25±1.03	4.54±0.91	4.61±0.86	5.06±1.33	5.01±0.07

注:"—"表示小鼠全部死亡。

表 8 各组雄性小鼠饮食量的变化($\bar{x} \pm s$) 单位:g

剂量/(mL/kg)	n	给药前	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 7 天	第 11 天	第 14 天
溶媒对照组	10	4.92 ± 0.25	5.52 ± 0.20	5.06 ± 0.51	5.01 ± 0.30	5.26 ± 0.11	5.14 ± 0.06	5.23 ± 0.04
5.00	10	5.00 ± 0.08	3.35 ± 0.21	—	—	—	—	—
2.50	10	5.67 ± 0.27	3.68 ± 0.18	3.56 ± 0.33	3.49 ± 0.16	3.42 ± 0.00	3.49 ± 0.00	3.53 ± 0.00
2.00	10	5.65 ± 0.89	3.46 ± 0.06	3.58 ± 0.88	4.53 ± 0.52	4.85 ± 0.41	4.77 ± 0.19	4.61 ± 0.84
1.20	10	4.92 ± 0.03	2.68 ± 0.31	3.66 ± 1.55	4.16 ± 1.83	4.37 ± 1.88	4.45 ± 1.28	4.82 ± 1.04
0.60	10	4.92 ± 0.03	4.22 ± 0.06	3.95 ± 0.07	4.24 ± 0.25	4.76 ± 0.31	5.04 ± 0.37	5.03 ± 0.24

注:“—”表示小鼠全部死亡。

表 9 各组雌性小鼠饮水量的变化($\bar{x} \pm s$) 单位:g

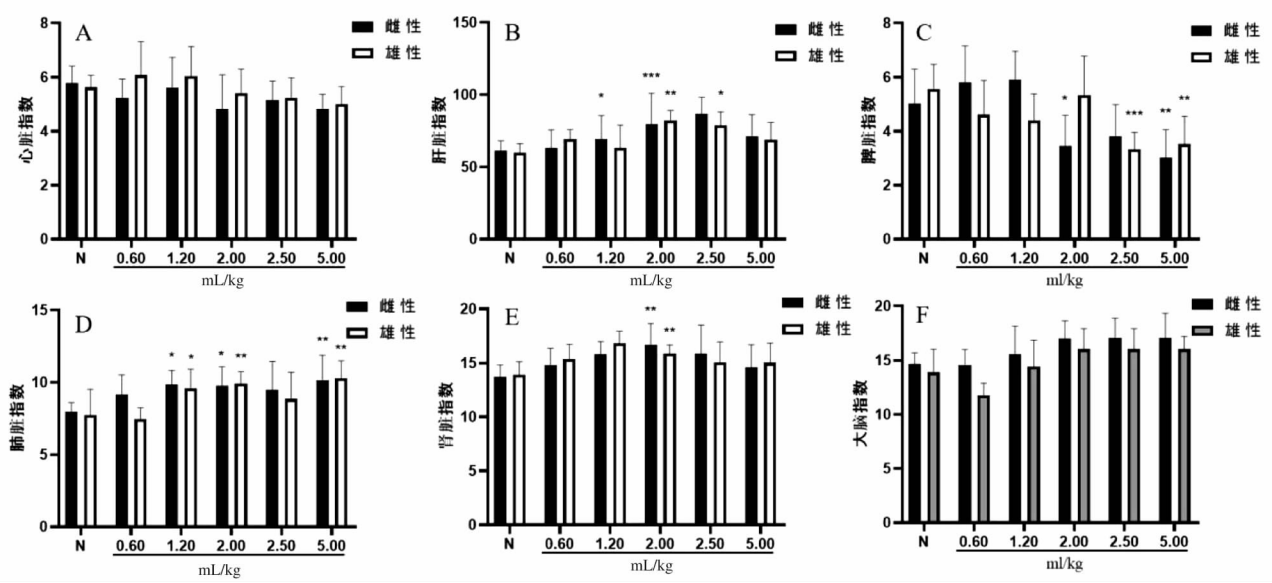
剂量/(mL/kg)	n	给药前	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 7 天	第 11 天	第 14 天
溶媒对照组	10	4.70 ± 0.99	5.30 ± 0.71	4.10 ± 2.12	4.10 ± 2.12	5.50 ± 0.71	5.60 ± 0.57	5.80 ± 0.85
5.00	10	3.47 ± 0.18	9.00 ± 0.00	—	—	—	—	—
2.50	10	4.80 ± 0.00	4.16 ± 1.19	3.75 ± 0.36	3.96 ± 0.06	4.19 ± 0.27	4.74 ± 0.12	5.44 ± 0.80
2.00	10	4.50 ± 0.14	5.17 ± 1.18	3.17 ± 1.18	3.95 ± 1.34	4.48 ± 1.72	5.27 ± 1.46	5.33 ± 1.23
1.20	10	4.70 ± 1.27	2.53 ± 0.19	2.79 ± 0.18	3.26 ± 0.11	3.27 ± 0.34	4.08 ± 0.09	5.07 ± 0.54
0.60	10	4.20 ± 0.28	3.40 ± 0.85	4.70 ± 0.14	4.70 ± 0.14	4.80 ± 0.57	4.80 ± 0.28	5.70 ± 0.71

注:“—”表示小鼠全部死亡。

表 10 各组雄性小鼠饮水量的变化($\bar{x} \pm s$) 单位:g

剂量/(mL/kg)	n	给药前	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 7 天	第 11 天	第 14 天
溶媒对照组	10	4.60 ± 0.00	5.10 ± 0.14	5.20 ± 0.00	5.20 ± 0.00	4.80 ± 0.57	5.10 ± 0.42	5.40 ± 0.28
5.00	10	3.59 ± 0.04	8.20 ± 0.28	—	—	—	—	—
2.50	10	4.80 ± 0.28	1.58 ± 0.12	3.00 ± 0.00	3.50 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.70 ± 0.00	4.50 ± 0.00
2.00	10	4.00 ± 0.00	3.36 ± 0.53	3.96 ± 1.83	3.96 ± 1.83	4.51 ± 1.67	5.05 ± 1.01	6.00 ± 0.00
1.20	10	4.70 ± 1.27	2.60 ± 0.57	2.77 ± 0.24	4.10 ± 0.04	4.13 ± 0.15	4.33 ± 0.03	7.06 ± 1.18
0.60	10	4.20 ± 0.28	3.40 ± 0.85	4.70 ± 0.14	4.70 ± 0.14	4.80 ± 0.57	4.80 ± 0.28	5.70 ± 0.71

注:“—”表示小鼠全部死亡。



注:N:溶媒对照组。* 与溶媒对照组相比,$P<0.05$;* * 与溶媒对照组相比,$P<0.01$;* * * 与溶媒对照组相比,$P<0.001$。

图 2 各组小鼠脏器指数比较

2.2.7 *死亡动物脏器病理分析* 如插页 XXXⅦ图 3 所示,在组织病理学显微镜下观察到,溶媒对照组的心肌纤维颜色均匀,组织内部肌纤维无明显肿胀或断裂,心肌细胞正常,心肌间质没有明显增加,组织中没有明显的肥大细胞。与溶媒对照组比,治疗组心肌组织的整体结构没有明显的异常,而在 5.00 mL/kg 剂量组心脏组织中观察到少量炎症细胞浸润。初步推测枳术精油不对心肌细胞造成损伤。

如插页 XXXⅧ图 4 所示,溶媒对照组肝组织整体结构基本正常。与溶媒对照组比,2.00 mL/kg 和 2.50 mL/kg 剂量组肝组织整体结构轻度异常,组织肝细胞排列紊乱、结构疏松,可见

部分肝细胞明显疏松水肿,组织肝窦结构不清。5.00 mL/kg 剂量组肝组织整体结构异常,组织肝细胞排列紊乱、结构疏松,可见部分肝细胞明显疏松水肿,组织可见较多肝细胞明显脂肪变性(圆形空泡),组织血管可见明显充血扩张。可初步推测枳术精油对小鼠肝脏有一定的损害作用,且呈现出剂量依赖的趋势。

如插页XXXIX图 5 所示,溶媒对照组脾组织整体结构基本正常,组织脾小结结构清晰,未见脾小结明显萎缩变性,淋巴细胞数量丰富,未见明显坏死;黄色箭头所示为脾小结,组织未见明显多核巨细胞浸润。与溶媒对照组比,0.60、2.00、2.50 和 5.00 mL/kg 剂量组白髓与红髓分界不清晰;如图黑色箭头所示,各剂量组脾脏组织可见少量多核巨细胞浸润,淋巴细胞数量明显减少,如图黄色箭头所示,5.00mL/kg 剂量组淋巴细胞明显坏死;未见其他明显病变。可初步推测枳术精油可能会损害脾脏,有一定的剂量依赖性。

如插页XL图 6 所示,溶媒对照组肺组织整体结构基本正常,组织肺泡结构清晰,未见肺泡相互融合形成较大囊腔,组织未见肺泡上皮细胞明显脱落坏死。与溶媒对照组比,2.00 mL/kg 剂量组肺组织整体结构轻度异常,少量炎症细胞浸润。5.00 mL/kg 剂量组肺组织整体结构轻度异常,少量肺泡壁轻微增厚,血管明显充血扩张,少量炎症细胞浸润。可初步推测枳术精油对肺部的影响有一定的剂量依赖趋势但不强。

如插页XLI图 7 所示,溶媒对照组肾组织整体结构基本正常。与溶媒对照组比,0.60 和 2.00 mL/kg 剂量组肾小球明显萎缩坏死,而 5.00 mL/kg 剂量组组织可见大量肾小管上皮细胞脂肪变性,其余给药组未观察到明显异常。推测枳术精油可能影响肾脏的正常功能,但规律性不强。

如插页XLII图 8 所示,溶媒对照组大脑组织整体结构基本正常,未见神经元明显固缩坏死等变性。与溶媒对照组相比,2.00 和 2.50 mL/kg 剂量组脑组织整体结构中度异常,组织可见少量神经元固缩深染。5.00 mL/kg 剂量组海马组织整体结构异常,组织海马区神经元排列紊乱,可见大量神经元固缩坏死。可初步推测枳术精油对脑组织有一定的损伤作用,且有剂量依赖的趋势。

2.2.8 LD_{50} 的计算 根据表 4 结果,通过 Bliss 法计算,枳术精油对雌性 KM 小鼠单次灌胃给药 LD_5 为 0.882 mL/kg,LD_{95} 为 3.799 mL/kg,LD_{50} 为 1.830 mL/kg,95% 置信区间为2.419 ~ 7.955 mL/kg;枳术精油对雄性 KM 小鼠单次灌胃给药 LD_5 为 0.816 mL/kg,LD_{95} 为 3.168 mL/kg,LD_{50} 为 1.608 mL/kg,95% 置信区间为 2.611 ~ 8.563 mL/kg;KM 小鼠的 LD_{50} 雄性小于雌性,存在一定的毒性差异。雌雄合并统计 LD_{50} 为 1.681 mL/kg,回归方程为 Y(Probit) = −1.228 +7.612 lgD 。

3 分析与讨论

GC − MS 是挥发性成分定性定量分析的常用方法,具有快速、简便和应用性强等优点,是天然精油化学成分鉴定的重要方法。精油因其沸点低、易挥发的特点,特别适宜用 GC − MS 法进行分析[20]。本研究采用 GC − MS 法分析枳术精油主要成分,经 GC − MS 检测,鉴定出枳术精油主要成分有 11 种,接近挥发油总量的 50%,其中苍术酮含量最高,为 19.91%。

急性毒性实验结果表明,枳术精油会导致小鼠站立好动,之后出现共济失调、俯卧贴地、呼吸缓慢沉重等症状,雌雄总体上没有症状上的显著差异。停药 24 h 后毒性反应迅速下降甚至消除。单次给药 5.00、2.50、2.00、1.20、0.60 mL/kg 枳术精油,雌性小鼠的死亡率由 100% 依次下降为 70%、60%、20%、0%,雄性小鼠的死亡率由 100% 依次下降为 90%、70%、30%、0%。这些结果表明枳术精油具有一定的药理毒性,对雌雄小鼠的毒性不同,且小鼠的死亡数量与药物浓度呈正相关,毒性与给药剂量呈正相关。

急性毒性实验期间体质量、饮食摄入量和饮水量可评估动物健康状况[21]。本实验中,各组体质量增长差异无统计学意义($P>0.05$),小鼠的进食量和饮水量轻微波动,说明枳术精油基本不影响正常的体重增长和饮食饮水。

脏器指数值降低表示器官萎缩或退化,脏器指数升高表示器官水肿或充血[22]。与溶媒对照组相比,给药组雄性小鼠肝、脾、肺、肾脏的脏器系数差异有统计学意义($P<0.05$),给药组雌性小鼠肝、脾、肺、肾脏的脏器系数差异有统计学意义($P<0.05$),表明枳术精油毒性靶器官可能是肝、脾、肾脏。

组织病理学可通过形态学变化确定药物毒性的靶器官[23]。与溶媒对照组比,2.00、2.50 和 5.00 mL/kg 剂量组肝细胞排列紊乱,肝细胞结构疏松,部分肝细胞明显疏松、水肿,肝窦结构不清,少量炎症细胞浸润,提示急性毒性主要表现在血管上。0.60、1.20、2.00 、2.50、5.00 mL/kg 剂量组白髓与红髓分界不清晰,淋巴细胞减少,少量炎症细胞浸润,表明枳术精油对脾脏可能有损伤作用。0.60、2.00 和 2.50 mL/kg 剂量组肾小球明显萎缩分叶坏死,5.00 mL/kg 剂量组大量肾小管上皮细胞脂肪变性,表明枳术精油急性毒性可能会作用在肾脏;2.00 和 2.50 mL/kg 剂量组大脑神经元固缩深染,5.00 mL/kg 剂量组大脑神经元大量固缩坏死,表明枳术精油急性毒性可能会作用于大脑。

苍术酮是白术精油的主要化学成分之一,是临床常用的抗肿瘤有效成分[24]。已经有研究发现,苍术酮有一定的体内抗肿瘤作用,对肝癌细胞 HepG2 的活性和迁移都有相当的抑制作用,可以影响细胞正常的形态、结构、生长,促进细胞凋亡[25]。唐凌等[26]研究发现,苍术酮可抑制肝癌细胞化疗耐药株细胞增殖,增强 5 − 氟尿嘧啶的化疗敏感性,表明肝脏也是靶器官之一。此外,枳术精油可导致脾缩小,民间认为富含柠檬烯的食物有健脾开胃功效[27],表明脾脏可能是枳术精油的靶器官之一。此外,俞一超等[28]研究发现枳术汤能够改善急性脑梗死大鼠的神经功能。综上,肝、脾、大脑可能是枳术精油主要靶点器官。

急性毒性实验是指在 24 h 内单次或多次给药后,在一定时间内发生的毒性反应,LD_{50} 是急性毒性的关键。实验结果表明,服用枳术精油具有一定的急性毒性,雌雄合并 LD_{50} 为 1.681 mL/kg,95% 置信区间为 3.367 ~ 7.417 mL/kg,相当于

60 kg 的人半数致死量为 11.08 mL,折算为枳实 - 白术生药 24.94 kg,约为临床人体安全用量的 997.6 倍(按枳术汤临床成人用量 25 g,体质量 60 kg),远大于药物的临床一般服用剂量(100 倍以上则较为安全),说明枳术精油相对较为安全。

4 结论

急性毒性实验常用于安全性评价,该实验主要测定半数致死量(浓度),观察急性中毒表现等,以提供受试物质的急性毒性资料,确定毒作用方式、中毒反应,并为亚急性和慢性毒性试验的观察指标及剂量分组提供参考。但急性毒性实验仅 1 次或 24 h 内多次给药,实验日程较短,脏器组织的病理变化是长期积累病变的过程[29],因此实验结果具有一定的局限性。此外,急性毒性实验具有动物消耗量大、获得的信息有限、测得的 LD_{50} 仅为近似值等缺点。在具体操作中,需通过遗传毒性实验、亚慢性及慢性毒性实验,进一步研究其毒性程度及其作用靶器官,全面评价枳术精油的毒理学安全性。多组学技术的联合应用(代谢组学、基因组学、蛋白组学等)可深入探讨枳术精油的毒性机制,为枳术精油的深入研究和临床使用提供更可靠的保证。

综上,本实验对枳术精油的急性毒性进行初步研究,有助于明确枳术精油临床用药的安全剂量,该实验结果为枳术精油健康产品研究和临床用药安全提供参考。

参考文献

[1] 吴普,述. 神农本草经:三卷[M]. 孙星衍,孙冯翼,辑. 北京:人民卫生出版社, 1963.
[2] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典:一九八五年版增补本[S]. 北京:人民卫生出版社, 1988.
[3] 杨思雨, 史汶龙, 路平, 等. 枳实化学成分及药理作用研究进展[J]. 中成药, 2023, 45(7): 2292 - 2299.
[4] 张惠勤, 张荣斌, 庞剑锋, 等. 枳实对经产家兔离体阴道和子宫平滑肌收缩作用的实验研究[J]. 华夏医学, 2007, 20(1): 8 - 9.
[5] 焦士蓉, 马力, 黄承钰, 等. 枳实提取物的体外抗氧化作用研究[J]. 中药材, 2008(1): 113 - 116.
[6] 孙文基, 绳金房. 天然活性成分简明手册[M]. 北京:中国医药科技出版社, 1998.
[7] 焦士蓉, 黄承钰, 王波, 等. 枳实提取物对实验性糖尿病小鼠肝脏抗氧化防御功能的影响[J]. 卫生研究, 2007(6): 689 - 692.
[8] 方芳,董敏,朱红,等. 枳实提取液对豚鼠心室肌细胞 L 型钙电流的影响[J]. 湖南医科大学学报, 2003(4):353 - 356.
[9] 吉中强, 纪文岩, 宋鲁卿, 等. 枳实对血瘀模型大鼠血栓前状态的影响[J]. 山东中医杂志, 2003, 22(6): 360 - 362.
[10] 张晓娟, 左冬冬. 白术化学成分及药理作用研究新进展[J]. 中医药信息, 2018, 35(6): 101 - 106.
[11] FU X Q, CHOU J Y, LI T, et al. The JAK2/STAT3 pathway is involved in the anti - melanoma effects of atractylenolide I[J]. Exp Dermatol, 2018, 27(2): 201 - 204.
[12] HUANG H L, LIN T W, HUANG Y L, et al. Induction of apoptosis and differentiation by atractylenolide - 1 isolated from *Atractylodes macrocephala* in human leukemia cells[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2016, 26(8): 1905 - 1909.
[13] LIU H Y, ZHU Y J, ZHANG T, et al. Anti - tumor effects of atractylenolide I isolated from *Atractylodes macrocephala* in human lung carcinoma cell lines[J]. Molecules, 2013, 18(11): 13357 - 13368.
[14] WANG A M, XIAO Z M, ZHOU L P, et al. The protective effect of atractylenolide I on systemic inflammation in the mouse model of sepsis created by cecal ligation and puncture[J]. Pharm Biol, 2016, 54(1): 146 - 150.
[15] LI W F, ZHI W B, LIU F, et al. Atractylenolide I restores HO - 1 expression and inhibits Ox - LDL - induced VSMCs proliferation, migration and inflammatory responses *in vitro*[J]. Exp Cell Res, 2017, 353(1): 26 - 34.
[16] GAO H Y, ZHU X H, XI Y, et al. Anti - depressant - like effect of atractylenolide I in a mouse model of depression induced by chronic unpredictable mild stress[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(2): 1574 - 1579.
[17] CHAO C L, HUANG H C, LIN H C, et al. Sesquiterpenes from Baizhu stimulate glucose uptake by activating AMPK and PI3K[J]. Am J Chin Med, 2016, 44(5): 963 - 979.
[18] SONG H P, HOU X Q, LI R Y, et al. Atractylenolide I stimulates intestinal epithelial repair through polyamine - mediated Ca^{2+} signaling pathway[J]. Phytomedicine, 2017, 28: 27 - 35.
[19] 张仲景. 金匮要略[M]. 何任, 何若苹,整理. 北京:人民卫生出版社, 2005.
[20] 国金玲, 张朔生. 气相色谱 - 质谱联用技术在药品及食品分析中的应用[J]. 中国药事, 2016, 30(6): 560 - 563.
[21] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2011.
[22] 朱家丽, 贾占荣, 曹佳红, 等. 松萝对小鼠急性毒性作用的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(5): 1319 - 1321, 后插 4 - 后插 5.
[23] 李建华, 赵良友, 张娜, 等. 白桦茸不同提取物对小鼠急性毒性实验研究[J]. 长春中医药大学学报, 2021, 37(1): 71 - 75.
[24] 麦静愔, 陈澍, 柯碧莲, 等. 苍术酮对肝癌荷瘤小鼠肿瘤生长、上皮 - 间充质转化和凋亡标志物表达的影响[J]. 中医药信息, 2022, 39(6): 28 - 32.
[25] 杨雪丽, 薛建华, 陈天阳, 等. 苍术酮对肝癌 HepG2 细胞活性、凋亡的影响及其相关机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(11):2589 - 2594.
[26] 唐凌, 陈莉, 张聪. 基于 Notch1 通路探讨苍术酮对肝癌细胞化疗耐药的作用机制研究[J]. 中医药导报, 2023, 29(4): 11 - 16.
[27] 宋莎娜, 米娜, 许立拔, 等. 金桔精油化学成分 GC - MS 分析及其对小鼠急性毒性[J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44(5): 461 - 465.
[28] 俞一超, 邓玉, 徐绍卿, 等. 枳术汤对急性脑梗死大鼠神经功能及海马组织 Nogo - A 及 LPA 蛋白表达的影响[J]. 新中医, 2022, 54(7): 33 - 37.
[29] 郑安然, 邵佩兰, 张丽芬, 等. 红枣色素对小鼠急性毒性作用研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(9): 349 - 352.

枳术精油化学成分 GC－MS 分析及其对小鼠急性毒性实验研究

（正文见 198－207 页）

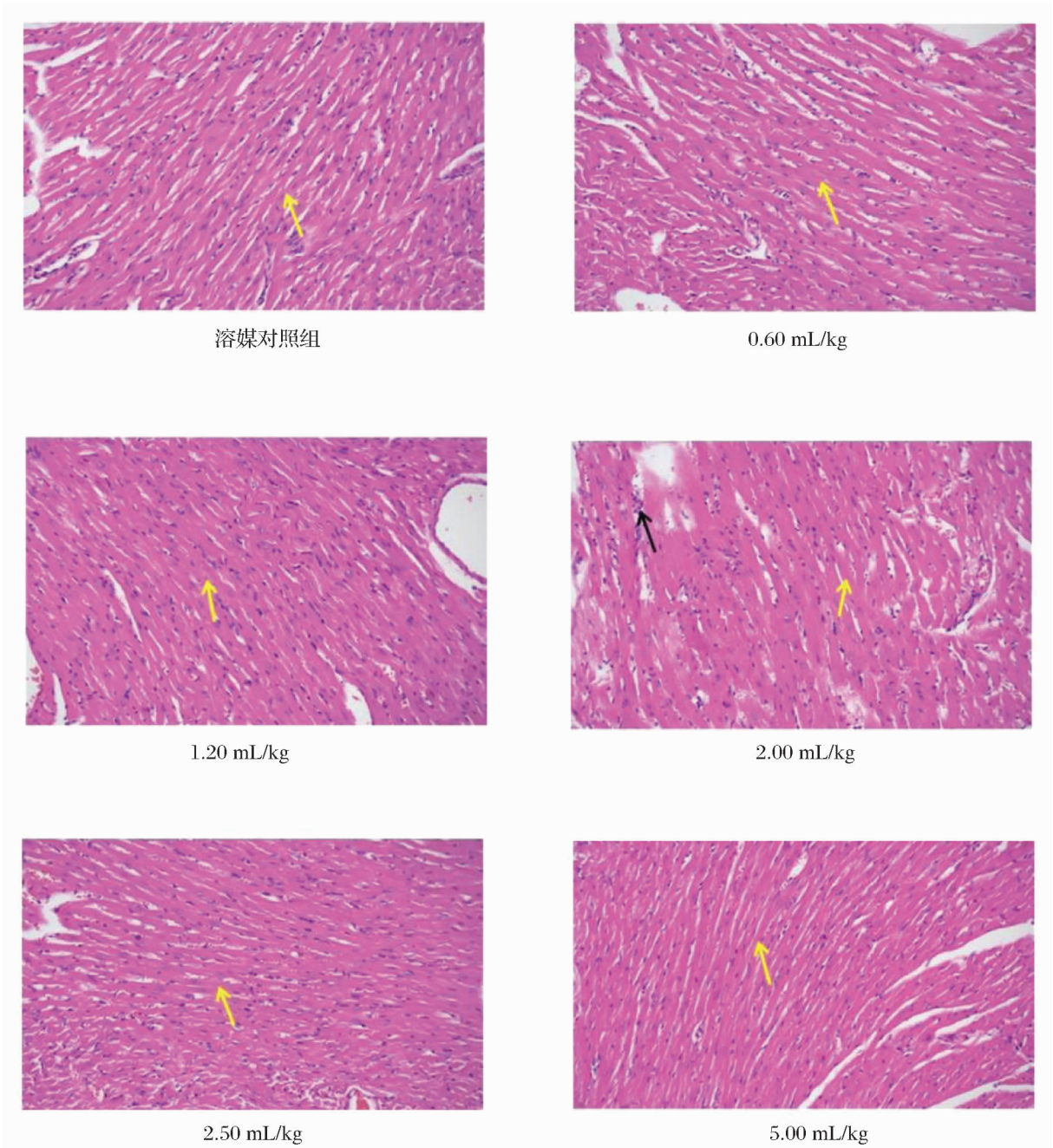


图 3　枳实－白术精油各剂量组对小鼠心脏组织病理变化的影响

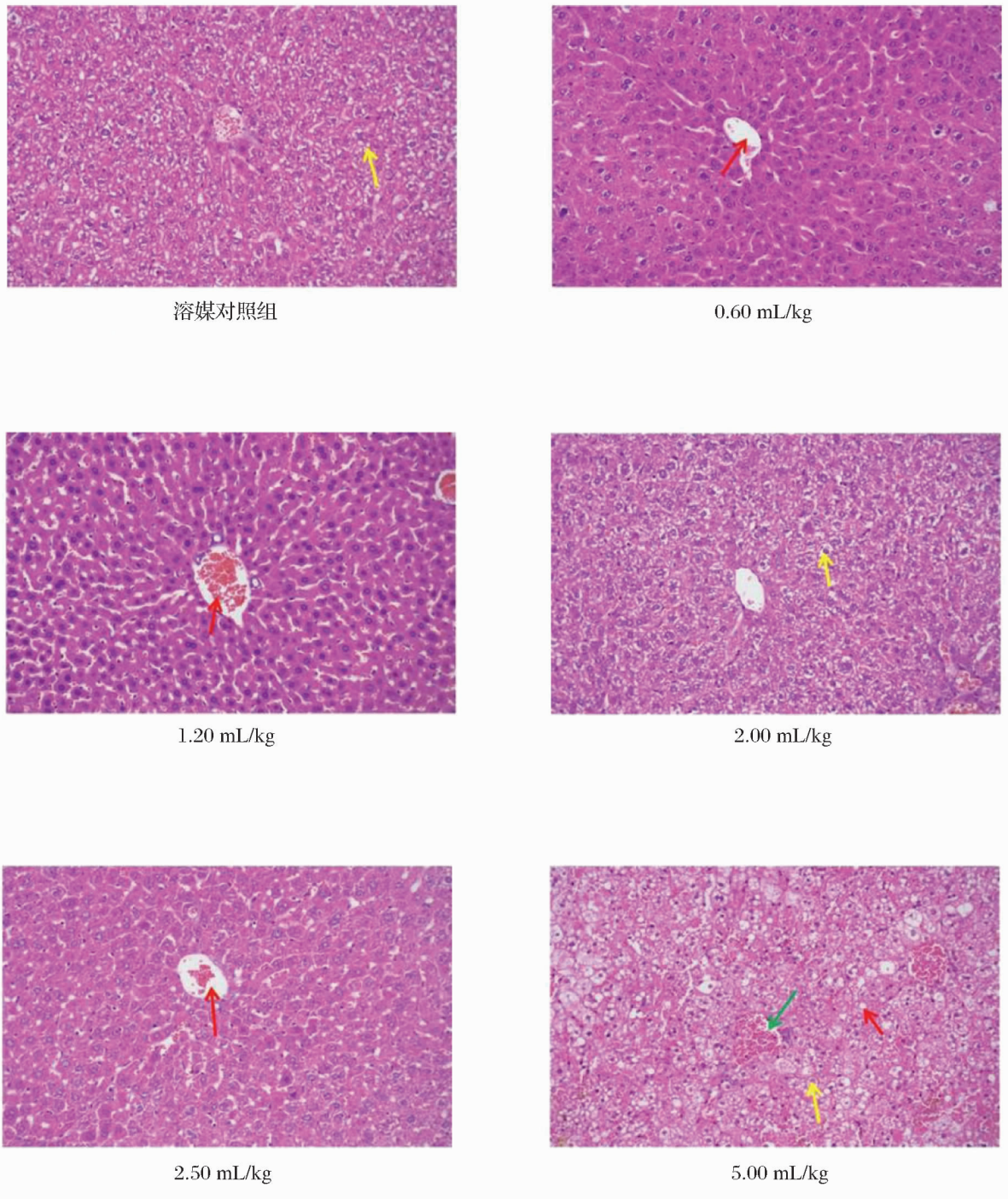


图 4 枳实 - 白术精油各剂量组对小鼠肝脏组织病理变化的影响

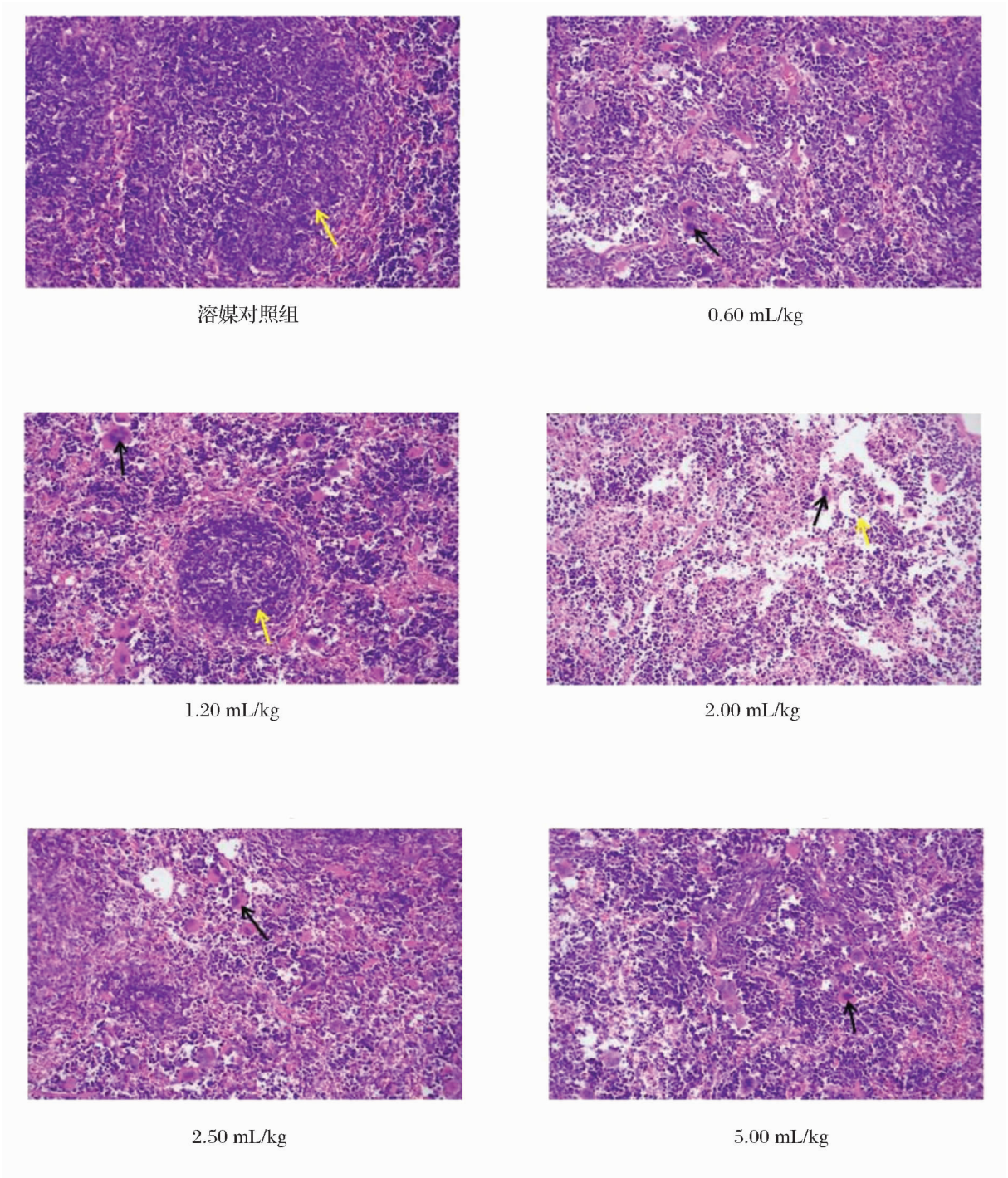


图 5 枳实 - 白术精油各剂量组对小鼠脾脏组织病理变化的影响

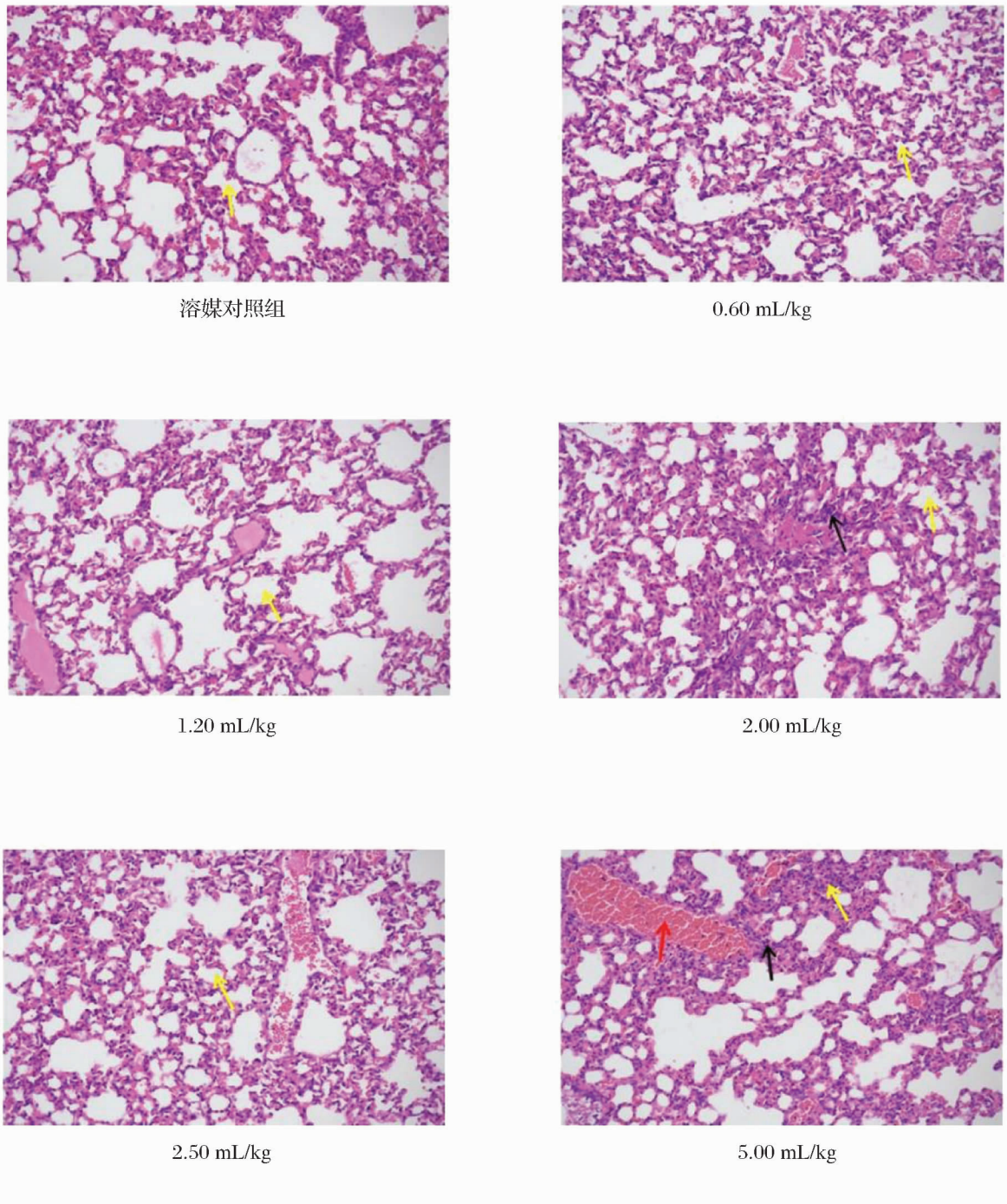


图 6 枳实 – 白术精油各剂量组对小鼠肺脏组织病理变化的影响

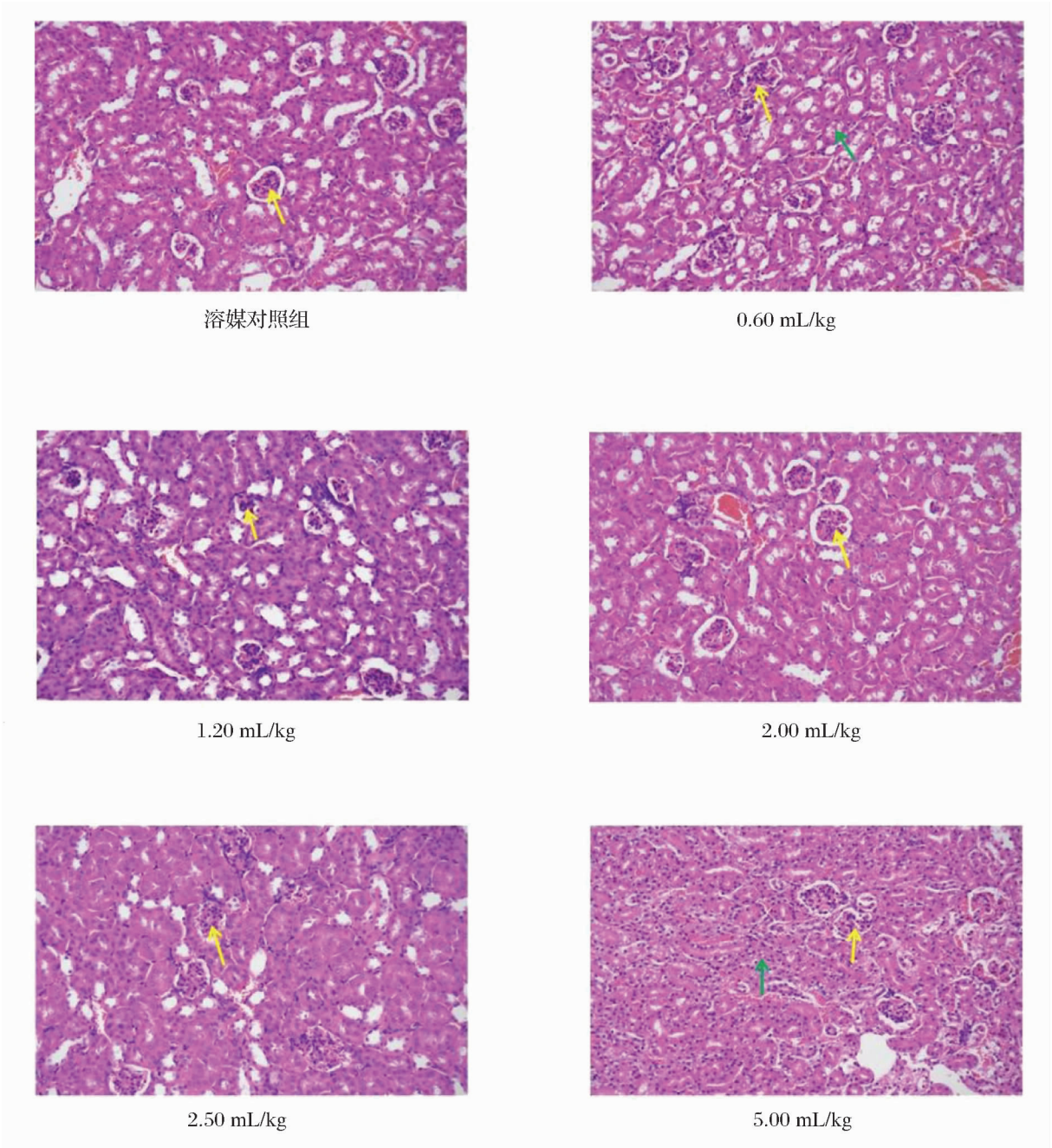


图 7 枳实 - 白术精油各剂量组对小鼠肾脏组织病理变化的影响

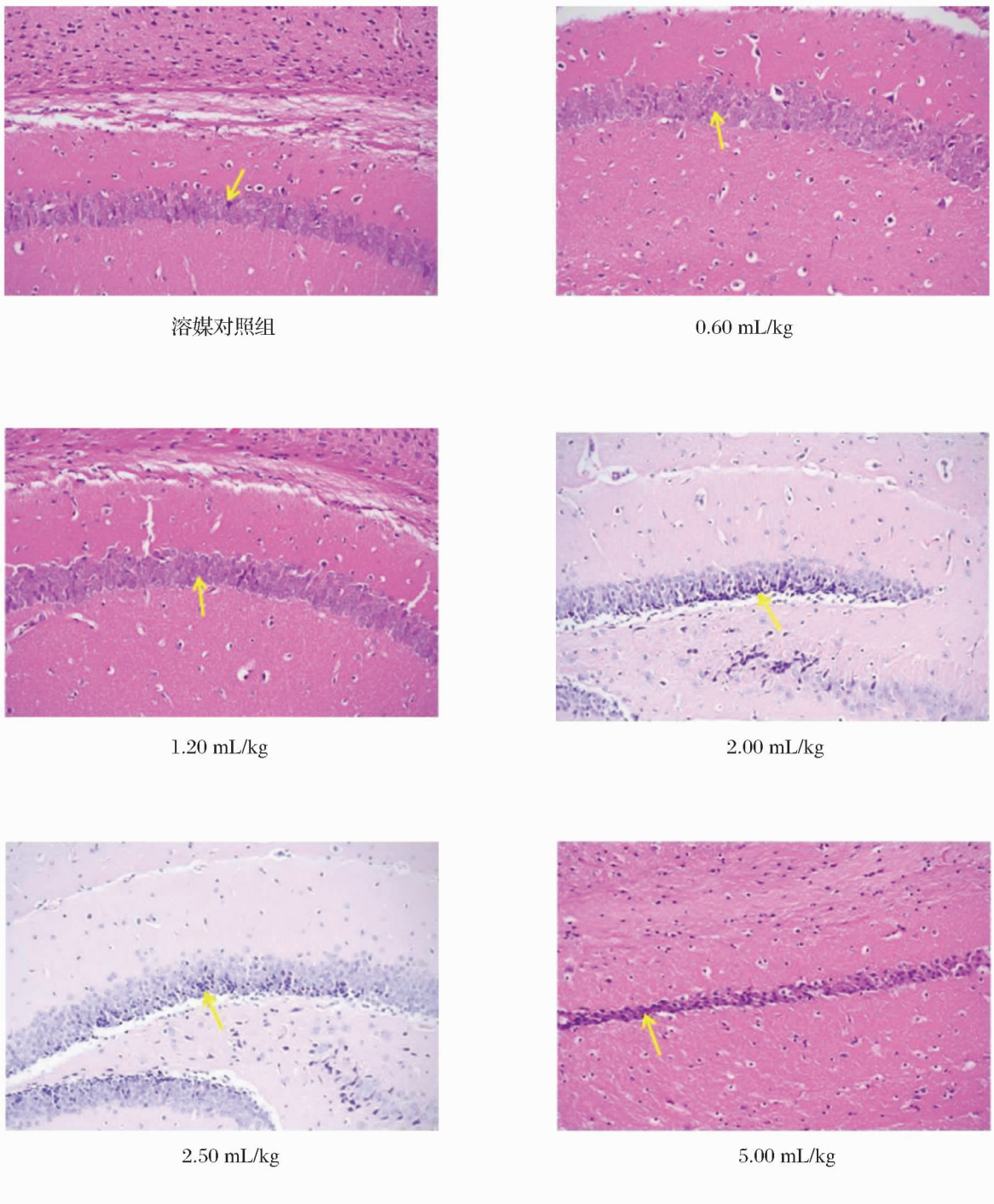


图 8 枳实 - 白术精油各剂量组对小鼠脑组织病理变化的影响