

木香肝毒性组分筛查与 GC-MS 分析研究

赵筱萍^{1,2}, 陆琳², 胡斌³, 王书芳³

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053;
3. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310058)

[摘要] **目的:** 筛查中药材木香中潜在的肝毒性组分。**方法:** 对木香 25 个化学组分, 采用二乙酸钠荧光素荧光标记法在 HepG2 细胞模型上筛查肝毒性组分, 并使用气相色谱-质谱联用仪分析其化学组成。**结果:** 从木香中筛查出 10 个肝毒性组分, 经气相色谱-质谱联用定性分析, C09 组分的主要成分为去氢木香内酯、santamarine (或 magnolialide) 和 reynosin, 而 C11 组分的主要成分是 α -木香醇和榄香醇。**结论:** 木香所含的去氢木香内酯、santamarine (或 magnolialide)、reynosin、 α -木香醇和榄香醇可能具有肝毒性。

[关键词] 气相色谱-质谱法; 油类, 挥发/分析; 木香/分析; 内酯类/分析; 染色与标记; 荧光素类; 肝炎, 中毒性

[中图分类号] R 917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2012)01-0043-04

Screening and identifying hepatotoxic components in *Aucklandiae Radix* with GC-MS

ZHAO Xiao-ping^{1,2}, LU Lin², HU Bin³, WANG Shu-fang³ (1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China; 3. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

[Abstract] **Objective:** To screen the potential hepatotoxic components in Chinese herb medicine *Aucklandiae Radix*. **Methods:** The potential hepatotoxic components were screened using HepG2 cells labeled with fluorescein diacetate from 25 fractions of *Aucklandiae Radix*, in which the hepatotoxic compounds were further identified with GC-MS. **Results:** Ten potential hepatotoxic fractions were screened. The identification results by GC-MS indicated that the main compounds in C09 were dehydrocostuslactone, santamarine (or magnolialide) and reynosin, and in C11 were α -costol and elemol. **Conclusion:** Dehydrocostuslactone, santamarine (or magnolialide), reynosin, α -costol and elemol are potential hepatotoxic compounds in *Aucklandiae Radix*.

[Key words] Gas chromatography-mass spectrometry; Oils, volatile/analysis; *Aucklandiae Radix*/analysis; Lactones/analysis; Staining and labeling; Fluoresceins; Hepatitis, toxic

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2012, 41(1):43-46.]

收稿日期: 2011-10-17 修回日期: 2011-12-07

基金项目: 浙江省科技计划项目(2008C23065).

作者简介: 赵筱萍(1964-), 女, 硕士, 教授, 主要从事中药药理与毒理研究; E-mail: zhaoxiaoping8686@sina.com

木香是菊科植物木香 (*Aucklandia lappa* Decne.) 的干燥根, 具有调节胃肠运动、抗消化性溃疡、抗炎、扩张血管及抗肿瘤等诸多药理活性^[1-2]。中医认为, 木香的功效是行气止痛、健脾消食等。有报道称, 长期使用木香包合物可引起动物肝和肾毒性^[3]。为此, 有必要对中药材木香中潜在的毒性组分进行筛查, 研究其可能含有的肝和肾毒性物质。本研究采用二乙酸盐荧光素荧光标记的细胞模型, 对木香提取物中 25 个化学组分进行了肝毒性快速筛查, 发现其中 10 个组分对人肝癌细胞 (HepG2) 具有明显的毒性; 经气相色谱-质谱联用定性分析, C09 组分的主要成分为去氢木香内酯、santamarine (或 magnolialide) 和 reynosin, 而 C11 组分的主要成分是 α -木香醇和榄香醇。

1 材料与方 法

1.1 仪器及材料 细胞荧光显微成像平台 (浙江大学药物信息学研究所开发); 酶标仪 (Bio-Tek ELX800, 美国宝特); Agilent 6890N/5973N 气相色谱-质谱联用仪 (美国 Agilent 公司), 另配有 Agilent 7683 自动进样器、NIST 2002 质谱数据库和 Agilent 色谱工作站。

HepG2 (上海细胞库); DMEM 培养基、胎牛血清 (Gibco 公司); 二甲基亚砷、胰蛋白酶 (Sigma 公司); 二乙酸盐荧光素 (Fluorescein diacetate, FDA, 碧云天生物技术研究所); 96 孔细胞培养板 (Corning 公司); 甲醇、无水乙醇、乙酸乙酯为分析醇 (国药集团); 甲醇为色谱纯 (德国默克公司); 高纯水来自 Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司); 去氢木香内酯 (上海融禾医药科技发展有限公司)。

木香化学组分样品共 25 个 (采用标准组分制备法提取分离获得)^[4]。

1.2 方 法

1.2.1 肝毒性组分的筛查 待测组分溶于 DMSO 中, 得 50 mg/ml 储备液, 与细胞孵育的终质量浓度为 50 μ g/ml。取对数生长期的 HepG2 细胞, 以 3 000 个/孔接种于 96 孔板中, 贴壁生长 24 h 后加入待筛查组分, 共孵育 48 h 后采用 FDA 荧光标记法检测细胞活力^[4], 计算细胞的存活率并判定待筛查组分的毒性^[5], 当

细胞存活率低于 20% 时, 表明该组分具有明显毒性。另设溶剂对照组 (0.1% DMSO), 各试验组平行 3 份。

1.2.2 GC-MS 分析 Agilent DB-5MS 毛细管柱 (0.25 mm \times 30 m \times 0.25 μ m); 载气: 高纯氦气, 流速 0.8 ml/min; 升温程序: 柱始温 50 $^{\circ}$ C, 以 10 $^{\circ}$ C/min 程序升温至 150 $^{\circ}$ C 保持 10 min, 以 5 $^{\circ}$ C/min 程序升温至 200 $^{\circ}$ C 保持 10 min, 以 10 $^{\circ}$ C/min 程序升温至 300 $^{\circ}$ C 保持 5 min; 进样口温度 300 $^{\circ}$ C, 不分流进样, 进样量为 2 μ l。质谱为 EI (electron ionization) 离子源, 离子源温度为 230 $^{\circ}$ C; 电离电压: 70 eV; 四级杆温度: 150 $^{\circ}$ C; 扫描模式: 全扫描, 40 ~ 600 m/z。

2 结 果

2.1 肝毒性组分的筛查 将木香药材中分离所得的 25 个组分分别加入 HepG2 细胞中孵育, 采用 FDA 荧光标记法筛查其中的肝毒性组分。图 1 示 A 组分中有 4 个组分具有明显毒性, 分别为 A01、A05、A08 及 A09, 细胞存活率依次为 0.28% \pm 0.11%、0.37% \pm 0.37%、13.50% \pm 2.11% 及 0.29% \pm 0.08%; B 组分中 B12 组分具有明显毒性, 细胞存活率为 8.95% \pm 1.61%; C 组分中有 5 个组分具有明显毒性, 分别为 C05、C06、C08、C09 及 C11, 细胞存活率依次为 7.65% \pm 1.27%、0.26% \pm 0.04%、0.22% \pm 0.14%、0.51% \pm 0.09% 及 0.02% \pm 0.01%。其中溶剂对照、C09 及 C11 组分的细胞荧光显微图像见图 2。

2.2 GC-MS 分析 对木香肝毒性组分中低极性组分 C09、C11 进行 GC-MS 分析, 其中 C09 组分的总离子流图见图 3。化合物 I 的保留时间为 35.39 min, 经质谱数据库检索并与标准品对照, 鉴定为去氢木香内酯 (dehydrocostuslactone)。化合物 II、III 各主要碎片及相对丰度与文献^[6]报道基本一致, 推测化合物 II 为 santamarine (或 magnolialide), 化合物 III 为 reynosin。化合物 IV 经质谱数据库检索, 匹配度较低, 有待进一步分析。采用面积归一化法确定化合物 I、II 和 III 的相对百分含量分别为 39.01%、11.76% 和 9.04%。C11 组分的总离子流图见图 4, 根据化合物 V、VI 质谱图、质谱

数据库检索结合文献推测化合物 V 和 VI 分别为 α -木香醇 (α -costol) 和 榄香醇 (elemol)^[6-7], 采

用面积归一化法确定其相对百分含量分别为 42.39% 和 10.40%。

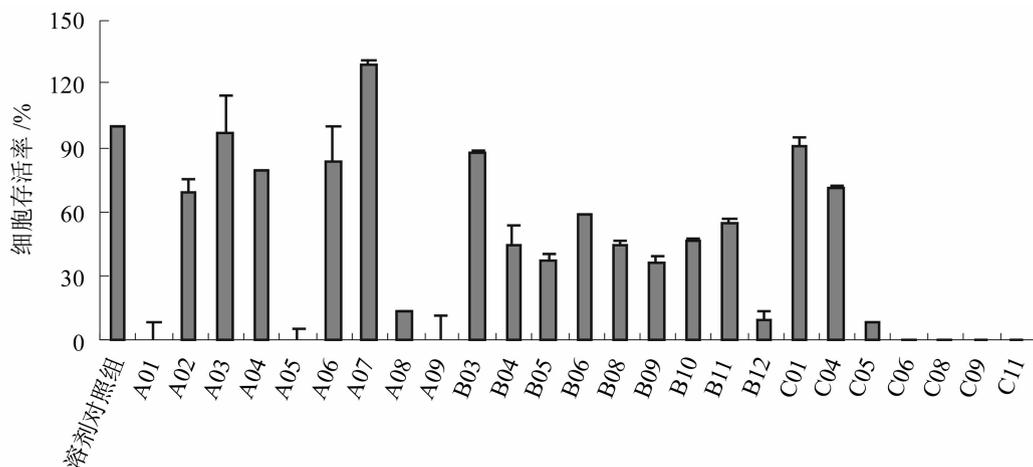


图1 木香中肝毒性组分筛查结果

Fig. 1 Screening hepatotoxic fractions from *Aucklandia Radix*

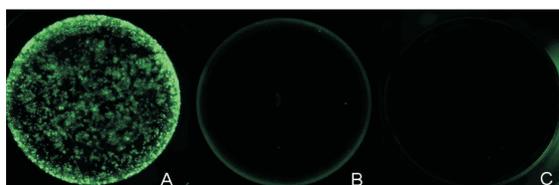


图2 溶剂对照(A)、C09组分(B)和C11组分(C)的细胞荧光显微成像图

Fig. 2 Fluorescence images of cells treated by vehicle control (A), C09 fraction (B) and C11 fraction (C)

3 讨论

对筛查出的 2 个具有明显肝毒性的低极性组分作 GC-MS 分析, 结果表明 C09 组分的主要成分为去氢木香内酯、santamarine (或 magnolialide) 和 reynosin, 而 C11 组分的主要成分是 α -木香醇和榄香醇。这提示上述 5 个化学成分可能引起肝毒性。

去氢木香内酯、santamarine 和 reynosin 都属于倍半萜类化合物, 木香中的此类成分对肿瘤细胞有较强的细胞毒作用, 具有抗肿瘤活性^[8-9], Sun 等证实去氢木香内酯、santamarine 和 reynosin 对 HepG2 细胞有杀伤作用, 半数致

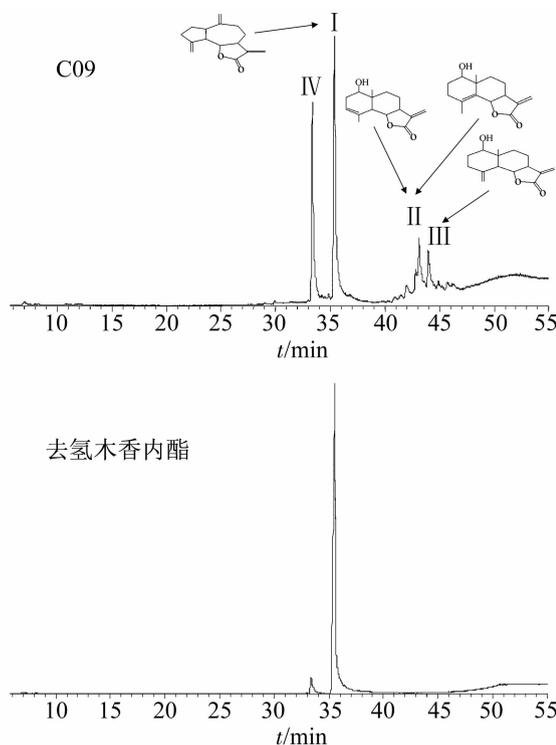


图3 C09 组分和去氢木香内酯的总离子流图
Fig. 3 The total ion chromatogram of C09 fraction and dehydrocostuslactone

死量分别为 $3.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $7.5 \mu\text{g/ml}$ 和 $11.0 \mu\text{g/ml}$ ^[9]。构效关系研究认为, 该类成分结构中存

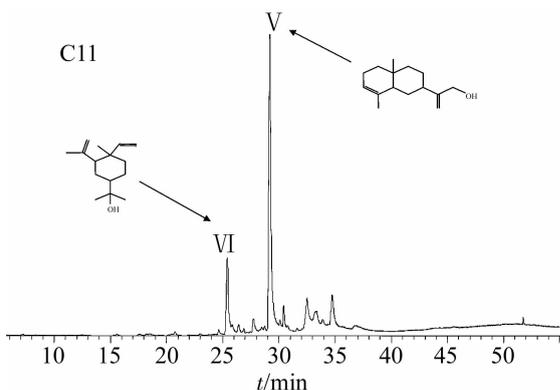


图4 C11 组分的总离子流图

Fig. 4 The total ion chromatogram of C11 fraction

在 α 、 β 不饱和的 γ -内酯环,能与巯基发生快速迈克尔加成反应,降低细胞内 GSH 含量,并对细胞内含巯基的蛋白产生氧化损伤作用^[10-11]。这可以解释 C09 组分产生明显毒性的原因。而 C11 组分中的 α -木香醇和榄香醇也是倍半萜类化合物,但不含有 α 、 β 不饱和的 γ -内酯环样结构,其可能引起肝毒性的作用机制还有待进一步研究。

References:

- [1] LIN Ming-xia (林明侠). Pharmacological and clinical research survey on Radix Aucklandiae [J]. (中医药信息), 2005(3): 18-19. (in Chinese)
- [2] WANG Xu-ying, JIA Xiao-bin, CHEN Yan (王绪颖, 贾晓斌, 陈彦). Research advances of the several muxiang raw materials [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials* (中药材), 2010, 33(1): 153-157. (in Chinese)
- [3] FENG Guo-zheng, WANG Chun-hua, MA Xiu-jun, et al (封国峥, 王春华, 马秀军, 等). Effects of CLA-ALD on long-term text in rats and beagle-dogs [J]. (辽宁中医杂志), 2007(6): 847-850. (in Chinese)
- [4] JINY C, ZHAO X P, ZHANG Y F, et al. A three-stage-integrative approach for the identification of potential hepatotoxic compounds from botanical products [J]. *Int J Toxicol*, 2011, 30(3): 287-299.
- [5] ZHAO Xiao-ping, LU Lin, ZHANG Yu-feng, et al (赵筱萍, 陆琳, 张玉峰, 等). Study on discriminating nephrotoxic components in zexie [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药杂志), 2011, 36(6): 758-761. (in Chinese)
- [6] YANG Hui, XIE Jin-lun, SUN Han-dong (杨辉, 谢金伦, 孙汉董). Study on chemical constituents of saussurea lappa [J]. (云南植物研究), 1997, 19(1): 85-91. (in Chinese)
- [7] YANG Hui, XIE Jin-lun, SUN Han-dong (杨辉, 谢金伦, 孙汉董). Research progress on the medicinal plant- Saussurea lappa [J]. *Natural Product Research and Development* (天然产物研究与开发), 1998, 10(2): 90-98. (in Chinese)
- [8] WANG Lu, ZHAO Feng, HE En-qi, et al (王潞, 赵烽, 何恩其). Effects of eighteen sesquiterpenes from Saussurea lappa on the proliferation of six human cancer cell lines [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008, 20(5): 808-812.
- [9] SUN C M, SYU W J, DON M J, et al. Cytotoxic sesquiterpene lactones from the root of Saussurea lappa [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66(9): 1175-1180.
- [10] BUTTURINI E, CAVALIERI E, DE PRATI A C, et al. Two naturally occurring terpenes, dehydrocostuslactone and costunolide, decrease intracellular GSH content and inhibit STAT3 activation [J]. *PloS One*, 2011, 6(5): e20174.
- [11] DEVDUTT C. *Opportunity, challenge and scope of natural products in medicinal chemistry* [M]. India: Research Signpost, 2011: 313-334.

[责任编辑 黄晓花]