

川紫菀水提取物中主要生物碱成分 clivorine 分析及其对大鼠肝毒性初步研究

程 敏¹, 汤 俊^{2*}, 高秋芳¹, 林 鸽³

1. 武汉市食品药品检验所 药理室, 湖北 武汉 430012

2. 组合生物合成与新药发现教育部重点实验室(武汉大学), 武汉大学药学院, 湖北 武汉 430071

3. 香港中文大学 药理学系, 香港

摘要:目的 考察川紫菀水提取物对大鼠的肝毒性, 并探讨其肝毒性与水提取物中吡咯里西啶生物碱成分之间的关系。方法 采用 HPLC 法分析川紫菀水提取物中主要吡咯里西啶生物碱成分, 并结合文献报道设定水提取物的给药剂量。将水提取物 ig 给予 SD 大鼠, 通过测定血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)的活性、肝组织中结合吡咯和还原型谷胱甘肽(GSH)水平及观察肝组织病理改变, 考察水提取物的肝毒性。结果 川紫菀水提取物中主要吡咯里西啶生物碱成分为 clivorine (3.94 mg/g)。单次给予水提取物无论剂量高低, ALT 和 AST 均未见明显改变, 但肝组织 GSH 水平显著下降; 多次给药时水提取物高剂量组 ALT 和 AST 显著升高($P < 0.05$)。各给药组肝组织中均可检出结合吡咯, 其量与给药剂量大小及次数呈正相关。组织病理学观察未见肝组织有明显病变。结论 川紫菀水提取物具有潜在的肝毒性, 大剂量的毒性尤为明显。Clivorine 是水提取物中的主要生物碱成分, 可能是川紫菀肝毒性的主要毒效物质。

关键词: 川紫菀; 吡咯里西啶生物碱; clivorine; 肝毒性; 结合吡咯

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)12-2507-05

Analysis on clivorine from alkaloid in aqueous extract of *Ligularia hodgsonii* and its hepatotoxicity in rats

CHENG Min¹, TANG Jun², GAO Qiu-fang¹, LIN Ge³

1. Wuhan Institute for Food and Drug Control, Wuhan 430012, China

2. Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery (Wuhan University), Ministry of Education, and School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, China

3. Department of Pharmacology, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China

Key words: *Ligularia hodgsonii* Hook.; pyrrolizidine alkaloid; clivorine; hepatotoxicity; tissue-bound pyrroles

紫菀为菊科紫菀属植物紫菀 *Aster tataricus* L. f. 的干燥根和根茎, 而菊科橐吾属 *Ligularia* Cass. 多种植物根及根茎在民间多作紫菀替代品, 习称硬紫菀或山紫菀, 上述紫菀品种均有镇咳祛痰作用^[1-2]。四川、贵州等地所用山紫菀主要来源于鹿蹄橐吾 *Ligularia hodgsonii* Hook., 又名川紫菀^[1-3]。研究表明, 川紫菀含有多种具肝毒性的吡咯里西啶类生物碱, 其中 clivorine (山冈橐吾碱) 为主要成分; 该成分可致雄性大鼠急性肝损伤^[1-7], LD₅₀ 为 91 mg/kg。包括川紫菀在内的许多中药因含吡咯里西

啶类生物碱而引起广泛关注^[1,4-8], 然而, 迄今对这些中药及其制剂的毒性及安全性评价的研究仍较少。吡咯里西啶类生物碱致毒的主要特点为代谢毒性, 其代谢产物通常称为吡咯代谢物, 是反映其体内毒性的重要指标^[4-10]。在前期研究的基础上, 本实验测定了川紫菀水提取物中 clivorine 的量, 并通过检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)活性、肝组织中结合吡咯和还原型谷胱甘肽(GSH)等指标研究川紫菀的肝毒性, 以期为该中药进一步的安全性评价提供参考。

收稿日期: 2011-05-06

基金项目: 武汉大学引进人才科研启动基金项目(306276214)

作者简介: 程 敏, 主管药师, 主要研究方向为中药药理与毒理。Tel: (027)82936859 E-mail: xiaomaocheng2@163.com

*通讯作者 汤 俊 Tel: (027)68759923 E-mail: tangj0205@hotmail.com

1 仪器与材料

1.1 药材、药品与试剂

川紫菀药材购自四川荷花池药材市场, 经笔者通过生药学鉴定及 LC/MSⁿ 联用分析, 证实为菊科橐吾属多种植物, 如鹿蹄橐吾 *Ligularia hodgsonii* Hook.、狭苞橐吾 *L. intermedia* Nakai 等的干燥根及根茎, 且含有吡咯里西啶类生物碱^[7], 与文献报道一致^[3,11]。

Clivorine 对照品为笔者从鹿蹄橐吾中提取并精制, 经 TLC、HPLC 法分析以及核磁共振波谱鉴定, HPLC 测定其质量分数 $\geq 98\%$ 。乙腈为色谱纯, 水为 Millipore 超纯水, 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Dionex P 680 高效液相色谱仪及 Chromeleon 色谱工作站 (美国 Dionex 公司), 岛津 UV-2100 分光光度计 (日本岛津), Sigma 2K15 低温超速离心机 (德国 Sigma 公司), 80-2 台式电动离心机 (深圳国华仪器厂), Milli-Q Integral 水纯化系统 (美国 Millipore 公司)。

1.3 动物

健康 SD 大鼠, 雄性, 体质量为 180~200 g, 由香港中文大学实验动物中心提供, 动物使用得到香港中文大学动物实验伦理委员会的批准并在香港政府相关规定下执行。在实验前均观察大鼠 1 周。实验室温度为 21~24 °C, 湿度为 55%~70%, 光照为 12 h 的明暗周期。给药前大鼠禁食 12 h, 自由饮水。

2 方法

2.1 川紫菀水提取物的制备

取药材约 2 000 g, 加水煎煮 3 次, 每次 2 h, 第 1 次加水量为药材量的 8~10 倍, 第 2 次为 6~8 倍, 第 3 次为 4 倍。合并药液, 静置, 滤过, 适量浓缩, 加入等倍量的医用酒精, 其间不时搅拌, 然后静置 24 h。取滤过后上清液浓缩至流浸膏, 冷冻干燥, 得干浸膏约 400 g。取干浸膏进行 HPLC 分析, 并用蒸馏水溶解至一定质量浓度 (0.67 g/mL) 的混悬液用于毒性实验。

2.2 溶液制备

精密称取 clivorine 对照品约 12.60 mg, 置 5 mL 量瓶中, 加流动相制成 2.52 mg/mL 溶液, 作为对照品贮备液。

另取川紫菀水提取物干浸膏 0.25 g, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相使溶解, 制得供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱为 BonChrom-C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 Gela Technologies Inc.); 预保护柱为 SafeGuard 保护柱 (上海泉岛公司); 流动相为乙腈-0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (用磷酸调节 pH 值为 3.2) 系统, 以 25:75 等度洗脱; 检测波长 230 nm; 体积流量 1.0 mL/min。在上述色谱条件下, 分别取对照品溶液和供试品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, clivorine 保留时间 12.3 min, 理论塔板数大于 3 000, 与相邻峰的分离度大于 2, 结果见图 1。

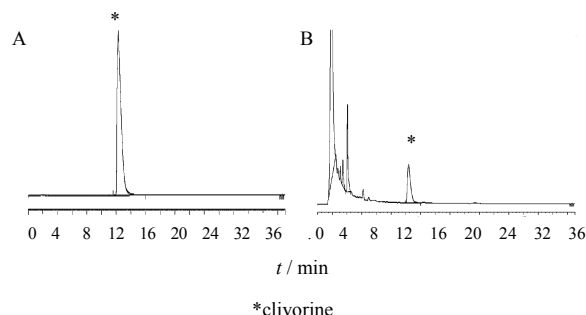


图 1 Clivorine 对照品 (A) 和川紫菀水提取物供试品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatogram of clivorine reference substance (A) and aqueous extract of *L. hodgsonii* (B)

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取 clivorine 对照品贮备液 50、100、200、500、1 000 μL, 分别置 5.0 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 分别吸取 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定。以对照品质量浓度 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程: $Y=441.89 X-4.407$, $r=0.999 7$, 线性范围为 0.025~0.504 mg/mL。

2.4.2 精密度试验 精密吸取 clivorine 对照品贮备液 40 μL, 用流动相稀释至 1 mL, 摇匀, 按上述色谱条件测定, 连续进样 6 次, 以峰面积的相对标准偏差 (RSD) 计算精密度, 测得峰面积的 RSD 为 0.24%。

2.4.3 稳定性试验 精密吸取 clivorine 对照品贮备液 500 μL, 用流动相稀释至 5.0 mL, 摇匀, 按上述色谱条件测定, 分别于 0、2、4、8、12 h 测定峰面积, 得峰面积的 RSD 为 0.47%, 表明样品在 12 h 内稳定。

2.4.4 重现性试验 取川紫菀水提取物干浸膏 0.25 g

共5份,分别置10 mL量瓶中,加流动相使溶解,制得供试品溶液,分别过0.45 μm 微孔滤膜后进样测定,得clivorine质量分数的RSD为2.10%。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取川紫菀水提取物约0.125 g,共9份,分别精密加入质量浓度为2.52 mg/mL的clivorine对照品贮备液0.16、0.20、0.24 mL,各3份,置于10 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,振摇使溶解,过0.45 μm 微孔滤膜,进样测定并计算回收率,结果测得平均回收率为99.45%,RSD为3.96%。

2.4.6 样品测定 按“2.3”项下色谱条件,吸取供试品溶液10 μL ,注入液相色谱仪,测定。通过上述回归方程计算,该提取物中clivorine的量以干燥品计为 (3.94 ± 0.08) mg/g ($n=5$)。

2.5 给药时限和剂量的设定

根据中医临床用药经验和紫菀方剂临床用药报道^[2,12],设计单次和多次用药、连续ig给药方式,同时参考文献方法^[10]以及参照川紫菀药材的小鼠药效学剂量10 g/(kg·d)^[2]及clivorine的急性毒性数据^[1,5],经预试后确定川紫菀水提取物给药剂量为5 (以clivorine计约为对大鼠 LD_{50} ^[5]的1/5)、10 g/(kg·d),分别相当于clivorine 19.7、39.4 mg/(kg·d)。末次给药24 h后观察动物毒性反应。

2.6 分组、给药与标本采集

在单次给药实验中,SD大鼠按体质量随机分成对照组、紫菀水提取物5、10 g/(kg·d)组;多次给药实验分组同单次给药实验,每天给药1次,连给3 d,每组均为6只大鼠。给药组大鼠每天ig给予川紫菀水提取物混悬液,对照组给予同体积蒸馏水。末次给药24 h后,大鼠乙醚麻醉,心脏采血约5 mL,并立即摘取肝脏,于0 $^{\circ}\text{C}$ 保存。血样于室温下放置约1 h后离心分离血清。

2.7 血清ALT和AST活性测定^[10]

酶活性用国际单位(U/L)表示,一个国际单位在规定实验条件下(pH 7.5、25 $^{\circ}\text{C}$)每分钟可形成约1 μmol 的谷氨酸。

2.8 肝组织GSH测定^[10]

称取肝组织1 g,匀浆,用Ellman试剂(将5,5'-二巯代-2-硝基苯甲酸溶解于0.5%碳酸氢钠溶液中配成1.5 mg/mL溶液)显色,采用分光光度法于412 nm处进行测定。

2.9 肝组织结合吡咯的测定^[13]

称取肝组织1 g,采用硝酸银乙醇试液处理,并

用Ehrlich试剂(取对二甲基苯甲醛1 g及60%高氯酸0.7 mL溶于50 mL无水乙醇中)显色,然后用分光光度法分别测定562、625 nm处的吸光度(A)值,以空白肝脏样品作对照。计算肝结合吡咯的量。

2.10 组织病理学检查^[10]

肝组织固定于10%中性福尔马林溶液中,24 h后用石蜡包埋切片,HE法染色,在光学显微镜下($\times 100$)观察组织病理学变化。

2.11 统计学处理

数据用GraphPad Prism 4.0软件进行处理,组间比较采用Student's t 检验。

3 结果

3.1 一般毒性观察

在川紫菀水提取物单次及多次给药期间内,大鼠行为、活动和精神状态均无明显异常。

3.2 血清生化指标的检测

在单次给药实验中,川紫菀水提取物10 g/(kg·d)组大鼠的血清转氨酶活性与对照组比较均无统计学差异,但肝组织GSH水平显著下降($P<0.05$);川紫菀水提取物给药组大鼠肝组织中可检出结合吡咯,且其量与给药剂量相关,两个给药组间有显著差异($P<0.01$)。在多次给药实验中,川紫菀水提取物10 g/(kg·d)组ALT和AST水平与对照组比较显著升高($P<0.05$),而川紫菀水提取物5 g/(kg·d)组ALT和AST水平未见明显改变,两个给药组肝组织GSH变化均不显著;在单次和多次给药实验中,川紫菀水提取物不论是高剂量还是低剂量,肝组织中结合吡咯均显著增加($P<0.01$)。结果见表1。

3.3 肝组织病理学检查

川紫菀水提取物各剂量组与对照组大鼠肝组织结构变化基本一致,未见明显器质性病变。

4 讨论

上述结果显示川紫菀水提取物低剂量与高剂量单次给药后大鼠均未出现明显的毒性反应,但高剂量多次给药后大鼠出现明显肝损伤。在本实验中设定川紫菀水提取物的剂量均高于紫菀人拟用最大剂量[33 mg/(kg·d)] 100倍以上,由于川紫菀与紫菀的药效学剂量相当^[2],因此表明民间以川紫菀代紫菀使用具有一定的合理性。由于实验仅考察了给药24 h后的肝毒作用,对毒性反应的发展进程、慢性或肝外损伤反应等尚不清楚。

表1 川紫菀水提取物单次与多次给药后对大鼠血清 ALT、AST 及肝组织中 GSH、结合吡咯的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 1 Effects of aqueous extract of *L. hodgsonii* on ALT and AST in serum, and GSH and tissue-bound pyrroles in liver tissue of rats after single or repeated administrations ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	ALT/ (U·L ⁻¹)	AST/ (U·L ⁻¹)	GSH/ (μmol·g ⁻¹)	结合吡咯 (μmol·g ⁻¹)
单次给药 对照	—	14.5±1.0	33.6±2.5	4.8±0.6	0
川紫菀水提取物	5	12.3±0.4	33.4±4.5	2.0±0.1*	0.70±0.05
	10	10.9±1.7	33.8±5.8	3.9±0.5*	1.04±0.08 ^{△△}
多次给药 对照	—	15.1±1.6	37.5±4.1	4.9±0.6	0
川紫菀水提取物	5	14.9±2.6	36.9±5.1	5.1±0.8	1.14±0.09 ^{##}
	10	39.6±14.4 ^{*##△}	84.4±19.8 ^{*##△}	4.3±0.4	1.41±0.12 ^{##△}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与单次给药组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与低剂量组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ * $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs single group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs low dose group

有研究显示,吡咯里西啶类生物碱类作用于肝脏时,体液和肝组织中一些生化指标,如血清 ALT 和 AST 活性及肝组织 GSH 和结合吡咯的量发生变化^[1,10],特别是组织结合吡咯与吡咯里西啶类生物碱成分在体内的代谢活化密切相关,其机制是吡咯里西啶类生物碱由肝 P450s 代谢活化形成了初级代谢吡咯,进而与细胞亲核大分子(如蛋白质)发生不可逆反应并形成共价结合物,最终造成细胞和组织损伤^[1,5-8]。川紫菀药材中含吡咯里西啶类生物碱 clivorine 量较高,且具有较强的肝毒性^[1-6],但其安全性研究较少,为此本实验对该味药材水提取物毒性及其与 clivorine 的关系进行研究。首先用 HPLC 对该水提取物中 clivorine 进行了分析,建立了快速、准确和可靠的该成分测定方法,结果表明 clivorine 为该提取物中主要吡咯里西啶类生物碱类成分,量达 3.94 mg/g。尽管其单次给药或低剂量多次给药后大鼠血清相关酶学指标未见明显改变,但组织结合吡咯水平却以剂量和给药次数依赖方式递增,而且其高剂量多次给药后大鼠血清转氨酶活性显著上升,由此可见,川紫菀的肝毒性在其剂量较大且反复给药后较为明显,且与组织结合吡咯水平有一定的相关性。当然肝组织结合吡咯的形成与肝毒性的产生并非绝对的因果关系,两者之间的关联也不是简单的对应关系,其中涉及定量评价的问题,值得进一步探讨。

此外,本研究还提示川紫菀的毒性作用可能受到其他不同成分的干预,即通过改变吡咯里西啶类生物碱代谢酶的活性及代谢过程,从而影响其最终毒性。本实验结果显示,单次给药后肝组织内源性抗氧化剂 GSH 有耗竭现象,说明机体的防御机制

在起作用,即通过捕获代谢吡咯以消解对细胞重要大分子的攻击^[1,10,13],同时也间接反映该提取物潜在的毒性。值得注意的是 GSH 的变化并不规律,多次给药时肝组织 GSH 水平恢复正常,这可能与机体对 clivorine 等有毒成分暴露的适应,或水提取物中不同组分间相互作用及其对致(解)毒过程的影响有关,其内在机制有待于进一步阐明。

参考文献

- [1] 汤俊, 服部征雄. 《中国药典》含吡咯里西啶生物碱的中药品种与用药安全 [J]. 药学报, 2011, 46(7): 1-6.
- [2] 赵显国, 王峥涛, 马继元, 等. 中药山紫菀类研究 III 川紫菀与紫菀祛痰镇咳药理作用比较 [J]. 中草药, 1999, 30(1): 35-36.
- [3] 张勉, 赵显国, 王峥涛, 等. 山紫菀类药材的性状与显微鉴别 (一) [J]. 中国药科大学学报, 1997, 28(1): 11-16.
- [4] Roeder E. Medicinal plants in China containing pyrrolizidine alkaloids [J]. *Pharmazie*, 2000, 55(10): 711-726.
- [5] Lin G, Tang J, Liu X Q, et al. Deacetylclivorine: a gender-selective metabolite of clivorine formed in female Sprague-Dawley rat liver microsomes [J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35(4): 607-613.
- [6] Tang J, Akao T, Nakamura N, et al. In vitro metabolism of isoline, a pyrrolizidine alkaloid from *Ligularia duciformis*, by rodent liver microsomal esterase and enhanced hepatotoxicity by esterase inhibitors [J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35(10): 1832-1839.
- [7] Tang J, Hattori M. Pyrrolizidine alkaloid profile of the aqueous extract of *Ligularia hodgsonii* and its toxic implication [A]. *Final Programme & Abstracts of 2010 China-Japan-Korea Symposium on Analytical Chemistry*,

- [C]. Wuhan: Wuhan University Press, 2010.
- [8] Mattocks A R. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids [J]. *Nature*, 1968, 217: 723-728.
- [9] Fu P P, Xia Q S, Lin G, *et al.* Pyrrolizidine alkaloids-genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms [J]. *Drug Metab Rev*, 2004, 36(1): 1-55.
- [10] Lin G, Nnane I P, Cheng T Y. The effects of pretreatment with glycyrrhizin and glycyrrhetinic acid on the retrorsine-induced hepatotoxicity in rats [J]. *Toxicol*, 1999, 37(9): 1259-1270.
- [11] 濮社班, 徐德然, 张 勉, 等. 橐吾属植物中肝毒吡咯里西啶生物碱的 LC/MSⁿ 检测 [J]. *药学报*, 2004, 39(10): 831-835.
- [12] 高学敏. 中药学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [13] Yan C C, Huxtable R J. The effect of pyrrolizidine alkaloids, monocrotaline and trichodesmine on tissue pyrrole binding and glutathione metabolism in the rat [J]. *Toxicol*, 1995, 33(5): 627-634.

欢迎订阅《中草药》杂志 1996—2009 年增刊

为了扩大学术交流, 提高新药研究水平, 经国家新闻出版主管部门批准, 我部从1996年起, 每年出版增刊一册。

1996年增刊: 特邀了国内知名专家就中药新药研究的方向、法规及如何与国际接轨等热点问题撰文阐述。

1997年增刊: 包括紫杉醇的化学成分、提取工艺及组织培养等方面的科研论文, 并特邀国内从事紫杉醇研究的知名专家撰写综述文章, 充分反映了紫杉醇研究方面的新成果、新进展和新动态。

1998年增刊: 以当今国际研究的热点银杏叶为专论重点, 包括银杏叶的化学成分、提取工艺、质量控制、药理作用及临床应用等方面, 充分反映了国内银杏叶开发研究方面的新成果、新进展和新动态。

1999年增刊: 为“庆祝《中草药》杂志创刊30周年”会议论文集, 特邀中国工程院院士、国家药品监督管理局药品评审中心及知名专家就中药新药研究热点问题撰写了综述文章。

2000年增刊: 以“中药新理论、新剂型、新工艺和新技术”为主要内容。

2001年增刊: 特邀了中国工程院院士、专家就加快中药现代化的进程, 我国入世后中药产业的发展新对策及西部药用植物资源的保护、开发和利用等撰写综述文章。

2002年增刊: 以“中药现代化”和“中药指纹图谱”为主要内容。

2003—2008年增刊: 包括中药创新药物开发的思路和方法、中药现代化研究、中药知识产权保护、中药专利的申请及中药走向国际等热点内容。

2009年增刊: 为庆祝“《中草药》杂志创刊40周年”和“《中草药》英文版(*Chinese Herbal Medicines*, CHM)创刊”, 以中药创新药物开发的思路和方法、活性天然产物的发现及其作用机制研究、中药代谢组学研究、生药学研究、中药的安全性评价和不良反应监控、中药新药审评法规的最新进展、中药知识产权保护和专利的申请、民族药研究为主要内容; 学术水平高, 内容丰富, 信息量大。

以上各卷增刊选题广泛、内容新颖、学术水平高、科学性强, 欢迎广大读者订阅。以上增刊为我部自办发行, 邮局订阅《中草药》不含增刊, 但能提供订阅凭证者, 购买增刊7折优惠, 款到寄刊。

地址: 天津市南开区鞍山西道308号

邮编: 300193

网址: www.tiprpress.com; www.中草药杂志社.中国

电话: (022)27474913 23006821

传真: (022)23006821

E-mail: zcy@tiprpress.com

《中草药》杂志编辑部