木香 HPLC 指纹图谱的建立及其抗氧化、抗辐射作用谱效关系研究

李　硕[1]，王志允[2]，常华杰[2]，侯文彬[3*]，周福军[3]

1. 天津医科大学，天津　300203
2. 天津中医药大学，天津　301617
3. 北京协和医学院 中国医学科学院放射医学研究所，天津市放射医学与分子核医学重点实验室，天津　300192

摘　要：目的　建立木香 *Aucklandia lappa* 的高效液相色谱（HPLC）指纹图谱并对特征峰进行液相色谱串联三重四级杆质谱仪（LC-MS）分析，考察木香抗氧化、抗辐射的谱效关系。**方法**　对 12 批不同产地的木香药材进行 HPLC 分析，建立指纹图谱。采用 LC-MS 技术对指纹图谱中的共有特征峰进行结构分析。以 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（DPPH）自由基清除率为抗氧化作用的药效指标，研究其抗氧化作用。采用 MTT 法检测辐射后的 UC-MSC 细胞活性，以细胞活力值为抗辐射作用的药效指标，研究其抗辐射作用。采用灰色关联分析法建立谱效关系，研究木香抗氧化与抗辐射的物质基础。**结果**　通过指纹图谱的建立，共标定了 12 个共有峰，其中 12 批药材相似度均大于 0.971。通过文献比对和 LC-MS 数据解析，确定了 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、东莨菪内酯、木香烃内脂和去氢木香内酯等 12 个特征峰成分。通过清除 DPPH 自由基结果发现，12 批木香均有抗氧化能力，谱效分析结果显示，去氢木香内酯同分异构体和去氢木香内酯与抗氧化能力有密切关系。通过细胞活力值显示，12 批木香部分批次具有抗辐射能力。根据谱效关系分析，发现木香抗辐射与诱导细胞毒性的物质基础可能均是异木香酸甲酯、木香烃内脂和去氢木香内酯。**结论**　为木香药材的质量控制及研究其抗氧化和抗辐射作用，提供了一种有效、快速地评价方法。

关键词：木香；3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸；东莨菪内酯；木香烃内脂；去氢木香内酯；指纹图谱；质谱；抗氧化；抗辐射；谱效关系

中图分类号：R286.2　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2023)08 - 2580 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.08.025

Establishment of HPLC fingerprint and effects of antioxidant and radioresistance related to its spectrum study of *Aucklandiae Radix*

LI Shuo[1], WANG Zhi-yun[2], CHANG Hua-jie[2], HOU Wen-bin[3], ZHOU Fu-jun[3]

1. Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China
2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China
3. Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecule Nuclear Medicine, Peking Union Medical College & Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

Abstract: Objective　To establish HPLC fingerprint of *Aucklandiae Radix*, identify the compounds of common peaks and study the relationship between effects of antioxidant and radioresistance and spectrum of *Aucklandiae Radix*. **Methods**　Twelve batches of *Aucklandiae Radix* from different areas were analyzed by HPLC and the fingerprint was established. LC-MS technique was used to analyze the structures of common peaks from the fingerprint. The scavenging rate of DPPH was taken as pharmacodynamics indicator of antioxidant effect and MTT method was used to detect the cell viability of UC-MSC cell as pharmacodynamics indicator of radioresistance effect. Grey correlation analysis was used to establish the spectrum-effect relationship and figure out the material basis of antioxidant and radioresistance of *Aucklandiae Radix*. **Results**　Through the establishment of fingerprint, 12 common peaks were picked and the similarity of each sample was higher than 0.971. Through literature comparison and LC-MS data analysis, 12 common peak components such as 3,5-*O*-dicoffeacylquinic acid, scopoletin, costunolide and dehydrocostus were identified. All of 12

收稿日期：2022-10-06

基金项目：中国医学科学院医学与健康科技创新工程国家医学健康科技战略平台与体系建设专项项目资助（2022-I2M-2-003）

作者简介：李　硕（1986—），男，硕士研究生，研究方向为生药学。E-mail: lishuolishuo1002@163.com

***通信作者：**侯文彬（1969—），男，博士，研究员，研究方向为中药学。E-mail: houwenbin@irm-cams.ac.cn

batches had antioxidant ability by the results of scavenging DPPH. According to spectrum-effect relationship, the isomer of dehydrocostus and the dehydrocostus were related to antioxidant ability. By the results of cell viability, some batches had the radioresistance ability. According to spectrum-effect relationship, it was found that the substance of radioresistance ability and induced cytotoxicity might be methyl isocostate, costunolide and dehydrocostus. **Conclusion** The proposed method offered an effective and fast way for quality control and estimating the effects of antioxidant and radioresistance of *Aucklandiae Radix*.

Key words: *Aucklandia lappa* Decne.; 3,5-*O*-dicoffeacylquinic acid; scopoletin; costunolide; dehydrocostus; fingerprint; mass spectrum; antioxidant; radioresistance; spectrum-effect relationship

木香 *Aucklandiae Radix* 为菊科植物木香 *Aucklandia lappa* Decne.的干燥根，别名广木香，云木香，为常用中药，始载于《神农本草经》[1]；其性温，味辛、苦，善于发散行气而止痛，用于行散胸腹气滞常用的要药，以香气浓郁且油性足者为佳品。木香具有多种化学成分，包括萜类、甾体、配糖体、生物碱、糖、氨基酸、脂肪酸及其酯等成分[2-3]。目前，部分文献只是采用指纹图谱阐明木香的化学成分组成，但不能直接对其功效进行评价[4]，具有一定局限性。随着木香药材研究日趋深入，已证明其具有抗炎、抗癌[5-6]、抗氧化[7]、抗辐射[8]等多种生理活性。然而，采用谱-效相关评价模式，将木香中各种活性成分与其抗氧化和抗辐射相结合的研究鲜见报道。

本研究采用高效液相色谱法（HPLC）建立了木香的指纹图谱，并结合聚类分析对不同产地的木香进行了质量评价；同时利用液质联用技术（LC-MS）和文献比对，对木香指纹图谱中的特征峰进行了鉴定；利用 DPPH 法检测木香的体外抗氧化能力[9-10]，以及 MTT 法检测木香在照射前后对于脐带—间充质干细胞（UC-MSC）的细胞活力影响来评价其抗辐射能力[11-12]。通过谱效关系，进一步研究特征峰与抗氧化和抗辐射的相关性，明确其活性物质，为木香的开发研究提供理论支持。

1 材料

1.1 仪器

岛津 LC-16 型高效液相色谱仪，二极管阵列（DAD）检测器；岛津高效液相色谱仪，配紫外检测器与 Sciex 公司 X500R-Q-TOF 型质谱仪联用；KQ2200E 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；SQP 十万分之一天平（赛多利斯公司）；AX124ZH 型万分之一天平（奥豪斯公司）；纯水机（密理博公司）；TD-5M 型低速离心机（四川蜀科仪器有限公司）；HH-ZK-4 型智能数显恒温水浴锅（巩义市予华仪器有限责任公司）；万能粉碎机（天津市泰斯特仪器有限公司）；酶标仪（TECAN 公司）；CO2 细胞培养箱（Thermo 公司）；倒置相差显微镜（ZEISS 公司）；生物安全柜（Baker 公司），铯 137 放射源（剂量率 0.85 Gy/min）。

1.2 试剂

对照品去氢木香内酯（中国食品药品检定研究院，批号 111525-201608），质量分数大于 98%；乙腈（色谱纯）、甲醇（色谱纯）、磷酸（分析纯）、无水乙醇（色谱纯）、二甲基亚砜（色谱纯）均购自天津康科德；甲酸（质谱级）、1,1-二苯基-2-苦基肼自由基（DPPH 试剂）均购自上海梯希爱；脐带间充质干细胞（UC-MSC，ATCC）；DMEM/F12 培养基（Gibco 公司）；胎牛血清（FBS Gibco 公司）；青-链霉素（天津灏洋公司）；0.25%胰蛋白酶（天津灏洋公司）；四甲基偶氮唑蓝（MTT，上海碧云天公司）。

1.3 药材

木香药材（S1～S12）经中国医学科学院放射医学研究所侯文彬研究员鉴定为菊科植物木香 *A. lappa* Decne.的干燥根，其来源信息见表 1。

表 1 12 批木香药材的产地和来源

Table 1 Information of 12 batches of *Aucklandiae Radix*

产地	来源	种植年限/年	品种
云南大理	河北安国药材市场	3	栽培
云南维德	河北安国药材市场	3	栽培
云南缅甸乡	河北安国药材市场	3	栽培
云南鲁甸	河北安国药材市场	3	栽培
云南大理	河北安国药材市场	3	栽培
云南德钦	河北安国药材市场	3	栽培
云南德钦	天津市中药饮片厂	3	栽培
云南大理	天津市中药饮片厂	3	栽培
云南维德	天津市中药饮片厂	3	野生
云南维德	河南周口药材市场	3	野生
云南富源	河南周口药材市场	3	栽培
云南丽江	河南周口药材市场	3	栽培

2　方法与结果

2.1　木香指纹图谱的建立

2.1.1　色谱条件　色谱柱：Ommi C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为甲醇（A）-0.05%磷酸（B），梯度洗脱：0～15 min，5%～40% A；15～30 min，40%～70% A；30～65 min，70%～90% A；65～66 min，90%～5% A；66～70 min，5% A。体积流量为 1 mL/min，柱温为 30 ℃，检测波长为 225 nm，进样量为 20 μL。

2.1.2　对照品溶液的制备　精密称取去氢木香内酯 10 mg，置于 10 mL 量瓶，加甲醇溶解并稀释至刻度。再精密量取 1 mL 取上述溶液至于 10 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，配制成 0.1 mg/mL 的去氢木香内酯对照品溶液。

2.1.3　供试品溶液的制备　取木香粉末（过四号筛）0.3 g，置圆底烧瓶中，加入甲醇 50 mL，称定质量。进行回流提取 30 min，放凉至室温，再次称定质量，用甲醇补足。提取液摇匀，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取滤液即得。

2.2　指纹图谱方法学考察

2.2.1　精密度考察　取供试品溶液，按“2.1.3”项下测定，连续进样 6 针，记录 12 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果，12 个共有峰保留时间的 RSD 为 0.02%，相对峰面积的 RSD 为 1.34%，表明精密度良好。

2.2.2　稳定性考察　按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，分别于 0、6、12、18、24 h 按“2.1.1”项下方法测定，色谱图在“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”中对 12 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行相似度匹配，相似度在 0.999 以上，表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.3　重复性考察　按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液 6 份，按“2.1.1”项下测定，色谱图在“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”中对 12 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行相似度匹配，相似度在 0.999 以上，表明重复性良好。

2.3　HPLC 指纹图谱的生成与相似度、共有峰分析

2.3.1　HPLC 指纹图谱生成　取 12 批木香药材样品，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，再按“2.1.1”项下进行测定，采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”对 12 批木香药材的液相色谱图进行分析，并得到对照指纹图谱，详见图 1、2。

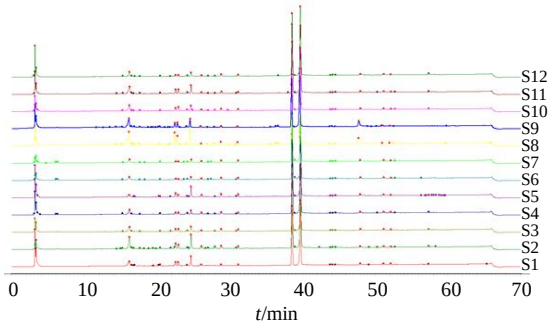

图 1　12 批木香样品的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1　HPLC fingerprints of 12 batches of *Aucklandiae Radix*

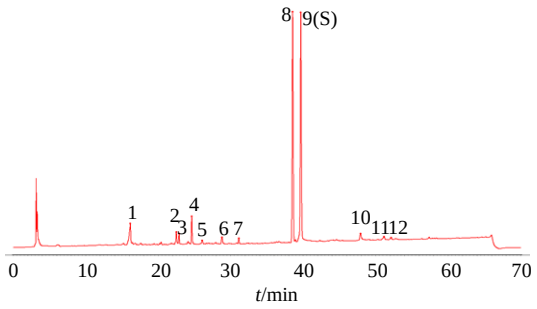

图 2　木香药材样品的 HPLC 对照指纹图谱

Fig. 2　HPLC control fingerprint of *Aucklandiae Radix*

2.3.2　相似度评价　将 12 批木香药材样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”进行相似度评价。结果，12 批木香样品的相似度均大于 0.971，表明不同产地和不同批次的木香药材间化学成分基本一致，无显著性差异，相似度结果见表 2。

2.3.3　共有峰分析　12 批木香药材样品共有 12 个共有峰。以 S1 作为参照图谱，时间窗口为 0.1 min，选择指纹图谱中峰形较好的色谱峰进行多点校正，对共有峰进行数据匹配。因 9 号峰（去氢木香内酯）的分离度良好、峰面积大且稳定，故以其保留时间和峰面积为参照，计算其他峰的相对保留时间和相对峰面积，见表 3、4。

2.4　聚类分析

12 批次木香药材的数据采用系统聚类分析法（HCA）进行分析，结果显示出不同批次间的质量差异。以 12 批样品的 12 个共有峰峰面积为变量，分别将其导入 SPSS 25.0 统计学软件中，选择平方 Euclideam 距离为测度，采用组间均联法进行系统聚类，结果显示，当分类距离约为 10 时，12 份样品可分成 4 类，S2、S4、S8、S5、S10、S12、S1、S9 第 1 类，S11 为第 2 类，S6 和 S7 为第 3 类，S3 第 4 类。12 批不同产地木香的聚类分析树状图见图 3。

表 2 12 批木香药材样品的相似度评价结果

Table 2 Similarity evaluation results of 12 batches of *Aucklandiae Radix*

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	对照指纹图谱
S1	1.000	0.986	0.999	0.994	0.987	0.994	0.989	0.971	0.989	0.996	0.998	0.997	0.999
S2	0.986	1.000	0.984	0.994	0.947	0.992	0.995	0.958	0.97	0.995	0.993	0.983	0.991
S3	0.999	0.984	1.000	0.995	0.988	0.996	0.99	0.965	0.988	0.996	0.998	0.999	0.998
S4	0.994	0.994	0.995	1.000	0.969	1.000	0.999	0.951	0.977	0.999	0.997	0.996	0.997
S5	0.987	0.947	0.988	0.969	1.000	0.971	0.959	0.955	0.979	0.97	0.977	0.986	0.980
S6	0.994	0.992	0.996	1.000	0.971	1.000	0.999	0.95	0.977	0.998	0.996	0.997	0.997
S7	0.989	0.995	0.99	0.999	0.959	0.999	1.000	0.946	0.971	0.998	0.994	0.992	0.994
S8	0.971	0.958	0.965	0.951	0.955	0.95	0.946	1.000	0.989	0.962	0.971	0.955	0.971
S9	0.989	0.970	0.988	0.977	0.979	0.977	0.971	0.989	1.000	0.982	0.987	0.983	0.989
S10	0.996	0.995	0.996	0.999	0.970	0.998	0.998	0.962	0.982	1.000	0.999	0.995	0.999
S11	0.998	0.993	0.998	0.997	0.977	0.996	0.994	0.971	0.987	0.999	1.000	0.996	1.000
S12	0.997	0.983	0.999	0.996	0.986	0.997	0.992	0.955	0.983	0.995	0.996	1.000	0.997

表 3 12 批木香药材样品 HPLC 图谱共有峰的相对峰面积

Table 3 Relative peak area of common peaks in HPLC chromatograms of 12 batches of *Aucklandiae Radix*

编号	相对峰面积												RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	
1	0.121	0.168	0.106	0.083	0.056	0.072	0.077	0.323	0.221	0.131	0.150	0.077	55.7
2	0.052	0.046	0.034	0.023	0.046	0.016	0.019	0.147	0.064	0.041	0.052	0.020	72.2
3	0.046	0.036	0.028	0.020	0.024	0.011	0.012	0.093	0.059	0.041	0.044	0.015	62.7
4	0.100	0.121	0.063	0.038	0.106	0.031	0.036	0.259	0.103	0.056	0.091	0.039	69.3
5	0.017	0.027	0.019	0.021	0.031	0.020	0.023	0.021	0.022	0.019	0.020	0.015	19.0
6	0.017	0.038	0.041	0.031	0.040	0.037	0.039	0.057	0.035	0.035	0.036	0.032	23.7
7	0.013	0.019	0.022	0.015	0.027	0.020	0.022	0.027	0.014	0.017	0.016	0.015	24.2
8	0.767	1.074	0.753	0.913	0.546	0.891	0.985	0.757	0.712	0.906	0.850	0.759	16.2
9（S）	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.0
10	0.035	0.026	0.037	0.031	0.037	0.040	0.045	0.196	0.179	0.035	0.033	0.031	94.3
11	0.031	0.024	0.025	0.028	0.022	0.027	0.032	0.024	0.026	0.022	0.025	0.021	12.7
12	0.022	0.013	0.011	0.023	0.012	0.012	0.016	0.018	0.020	0.015	0.016	0.012	24.7

表 4 12 批木香药材样品的 HPLC 图谱共有峰的相对保留时间

Table 4 Relative retention time of common peaks in HPLC chromatograms of 12 batches of *Aucklandiae Radix*

编号	相对保留时间												RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	
1	0.407	0.407	0.408	0.408	0.407	0.407	0.408	0.407	0.407	0.407	0.408	0.408	0.063
2	0.567	0.568	0.568	0.568	0.567	0.568	0.568	0.566	0.566	0.568	0.568	0.568	0.128
3	0.577	0.577	0.577	0.577	0.577	0.577	0.577	0.575	0.575	0.577	0.577	0.577	0.124
4	0.621	0.621	0.621	0.621	0.621	0.621	0.621	0.619	0.619	0.621	0.621	0.621	0.123
5	0.657	0.657	0.657	0.657	0.658	0.657	0.658	0.657	0.656	0.657	0.657	0.658	0.088
6	0.725	0.726	0.726	0.726	0.725	0.725	0.726	0.726	0.727	0.725	0.726	0.726	0.062
7	0.784	0.784	0.784	0.785	0.784	0.784	0.784	0.784	0.784	0.784	0.785	0.784	0.026
8	0.971	0.971	0.971	0.971	0.971	0.971	0.971	0.972	0.972	0.971	0.971	0.971	0.012
9（S）	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
10	1.208	1.208	1.208	1.208	1.208	1.208	1.208	1.205	1.206	1.208	1.208	1.208	0.083
11	1.289	1.289	1.290	1.289	1.289	1.289	1.289	1.287	1.288	1.290	1.290	1.290	0.061
12	1.314	1.314	1.314	1.314	1.313	1.314	1.313	1.312	1.312	1.314	1.314	1.314	0.057

2.5 指纹图谱中特征峰的鉴定

2.5.1 液相条件 流动相为甲醇（A）-0.05%甲酸（B），梯度洗脱（0～15 min，5%～40% A；15～30 min，40%～70% A；30～65 min，70%～90% A；65～66 min，90%～5% A；66～76 min，5% A），其余条件均同“2.1.1”项。

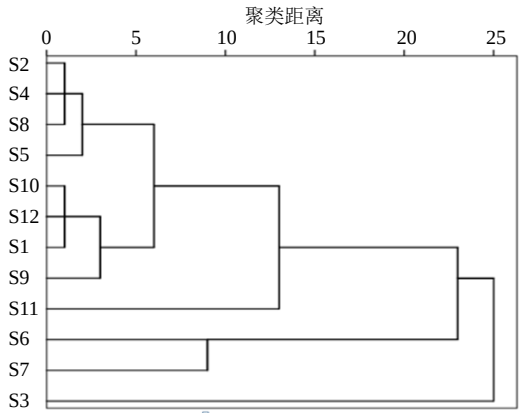

图 3　12 批木香药材聚类分析

Fig. 3　Hierarchical clustering analysis of 12 batches of *Aucklandiae Radix*

2.5.2　质谱　离子化模式为电喷雾正/负离子模式，正负离子源电压分别为 5500 V/−4500 V，离子源温度为 600 ℃，去簇电压分别为 50 V/−80 V，MS 碰撞能量分别为 10 V/−10 V，MSMS 碰撞能量分别为 3 V/−3 V。雾化气体为氮气。准分子离子扫描范围为 *m*/*z* 100～1000，数据采集所用软件为 SCIEX OS。

2.5.3　特征峰鉴定　按照“2.1.3”制备供试品溶液，进行 LC-MS 检测，采集质谱数据，通过比对精确相对分子质量和特征碎片离子，结合软件推断的分子式及文献报道[13]，鉴定出木香指纹图谱中 12 个共有峰的结构，结果见表 5。

2.6　抗氧化作用考察

2.6.1　供试品制备　取 10 g 粉碎后的木香药材，分别加入 8、6、6 倍 70%乙醇提取 3 次，每次 1.5 h，合并提取液。浓缩提取液质量浓度为 0.2 g/mL（生药浓度），再用 70%的乙醇分别稀释至质量浓度 0.25、0.50、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 mg/mL。按照此方法制备 12 批供试品（S1～S12）。

表 5　木香特征图谱峰的鉴定

Table 5　Identification of characteristic peaks of *Aucklandiae Radix*

峰号	成分	分子式	*m*/*z*	二级碎片
1	ascleposide E	$C_{19}H_{32}O_8$	389.216	389.213, 371.177, 227.163, 209.152, 191.142
2	环氧木香内酯或其同分异构体	$C_{15}H_{20}O_4$	265.143	265.143, 247.132, 229.121, 211.111, 183.116
3	3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸	$C_{25}H_{24}O_{12}$	517.132	517.133, 499.123, 355.102, 337.091, 163.039
4	东莨菪内酯	$C_{10}H_8O_4$	193.049	193.049, 175.111, 147.116, 121.007
5	去氢木香内酯同分异构体	$C_{15}H_{18}O_2$	231.137	231.146, 213.126, 185.132, 175.075, 131.085
6	木香内酯或其同分异构体	$C_{15}H_{20}O_3$	249.148	249.148, 231.142, 213.126, 203.142, 185.131
7	2α-羟基去氢木香内酯或其同分异构体	$C_{15}H_{18}O_3$	247.132	247.139 3, 229.122 5, 211.111 1, 201.127 0, 183.116 0
8	木香烃内酯	$C_{15}H_{20}O_2$	233.153	233.166, 215.142, 205.157, 177.090, 161.131
9	去氢木香内酯	$C_{15}H_{18}O_2$	231.137	231.148, 213.126, 203.141, 195.116, 185.133, 175.074, 131.085
10	二氢木香烃内酯或其同分异构体	$C_{15}H_{22}O_2$	235.169	235.177, 217.158, 199.147, 189.163, 153.090
11	异木香酸甲酯	$C_{16}H_{24}O_2$	249.184	249.184, 231.137, 217.158, 189.163, 161.132
12	蓝桉醇	$C_{15}H_{26}O$	223.205	223.205, 205.194, 165.163, 149.132

2.6.2　DPPH 自由基溶液　精密称取 DPPH 1.97 mg，用 80%乙醇溶解并定容至 25 mL 量瓶，即得质量浓度为 0.2 mmol/L 的 DPPH 自由基溶液。

2.6.3　清除率　取上述批次供试品各 20 μL 与 180 μL DPPH 溶液先后加入同一 96 孔板中，在室温下孵育 30 min，采用酶标仪在 517 nm 波长处测定吸光度（*A*）。按照下面公式计算清除率。

清除率＝A_o−A_S/A_o

A_S 为 DPPH 自由基溶液＋供试品溶液的 *A* 值，A_o 为空白溶液（80%乙醇 200 μL）*A* 值

采用 GraphPad Prism 软件进行非线性回归，结果见图 4。12 批木香药材随着浓度的增加，DPPH 的清除率也在提升。给药质量浓度在 1.2 mg/mL 时，12 批木香对 DPPH 的清除率中最高清除率为 76%是 S7（云南德钦），最低清除率为 33%是 S2（云南维德）。

2.7　抗辐射作用考察

2.7.1　木香提取液制备　按照“2.6.1”项下制备方法得到质量浓度为 0.2 g/mL 母液。用细胞培养基稀释母液至质量浓度为 0.156、0.312、0.625、1.25、2.5 和 5 mg/mL。按照此方法制备 S1 和 S7 批木香提取液。

2.7.2　UC-MSC 细胞的培养　UC-MSC 细胞用含 10%

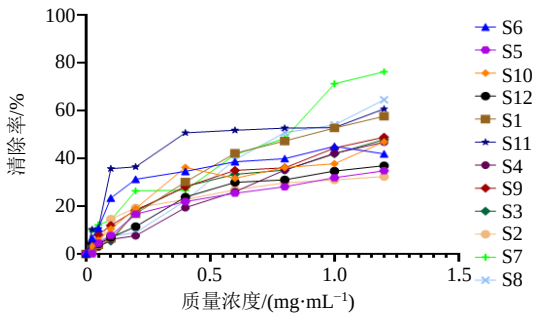

图 4　12 批木香药材给药浓度与 DPPH 自由基清除率关系

Fig. 4　Relative scavenging rate of DPPH for 12 batches of *Aucklandiae Radix*

FBS，1%青霉素-链霉素的 DMEM/F12 培养基，在 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养。

2.7.3　毒性实验　取对数生长期，状态良好的 UC-MSC 细胞，消化后进行细胞计数，500 个/孔接种于 96 孔板，每组 3 个复孔。培养 24 h 细胞贴壁，形态恢复后，分别加入 S1 和 S7 批次木香（外观差异大）提取液，给药质量浓度分别为 15.6、31.2、62.5、125、250 和 500 μg/mL。对照组加入相同体积的培养液，继续培养 7 d 后，每孔加 10 μL MTT，在培养箱中孵育 4 h 后取出，弃掉培养基，每孔加 150 μL 的 DMSO，在微量振荡器上振荡 10 min，于 570 nm 波长测定 *A*。按照公式计算细胞活力值

细胞活力值＝(加药组 *A* 值－空白 *A* 值)/(对照 *A* 值－空白 *A* 值)

如图 5 所示，随着给药浓度的增加，细胞活力值下降较为明显，说明木香对于该细胞存在一定的毒性，即抑制细胞生长。为了最大限度的降低木香毒性对于其本身抗辐射能力的影响，故选用 20 μg/mL 进行下面抗辐射实验。12 批木香提取液在 20 μg/mL 浓度下的细胞活力值如图 6 所示。

2.7.4　抗辐射实验　取对数生长期，状态良好的 UC-MSC 细胞，消化后进行细胞计数，500 个/孔接种于 96 孔板，每组 3 个复孔。培养 24 h 细胞贴壁，形态恢复后，加入 12 批木香提取液 20 μg/mL，对照组加入等体积培养基，培养 24 h 后进行辐照，照射剂量分别为 4、6 Gy。继续培养 7 d 后，每孔加 10 mL MTT，在培养箱中孵育 4 h 后取出，弃掉培养基，每孔加 150 μL 的 DMSO，在微量振荡器上振荡 10 min，于 570 nm 波长的 *A* 值，计算细胞活力值。

如图 7 所示，在 12 批木香药材中，其细胞活力值差异较大，在 4 Gy 和 6 Gy 辐照强度下，S1、S4、

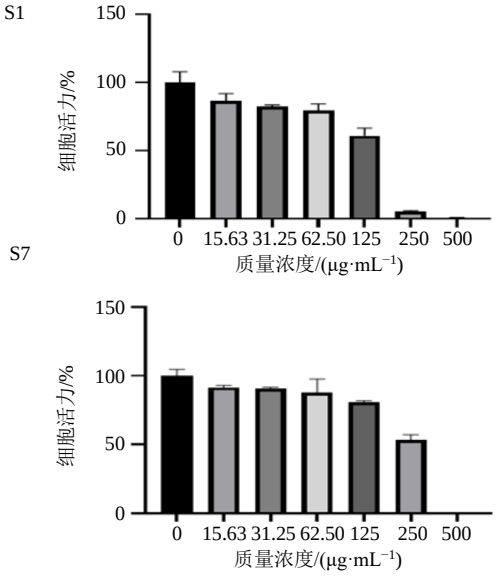

图 5　S1 和 S7 批木香在不同给药浓度下的 UC-MSC 细胞活力值

Fig. 5　UC-MSC cell viability under different concentrations of S1 and S7

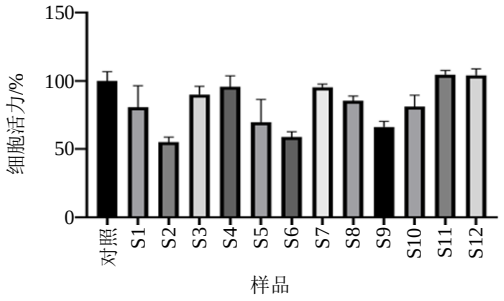

图 6　12 批木香在 20 μg·mL⁻¹ 下的 UC-MSC 细胞活力值

Fig. 6　UC-MSC cell viability at 20 μg·mL⁻¹concentration of 12 batches of *Aucklandiae Radix*

S7、S10、S11、S12 细胞活力值均显著大于对照组的活力值，其余批次均等于或小于对照活力值（本身毒性影响）。

2.8　谱效关系分析

2.8.1　木香指纹图谱与抗氧化作用的灰色关联分析　根据 12 批木香提取液在的不同浓度下的 DPPH 清除率，以 SPSS（v22.0）的概率回归方法预测清除率为 50%时的药物浓度（IC_{50}），结果如表 6 所示。

以各批提取液的 IC_{50} 值作为参考序列，以各批木香药材 HPLC 指纹图谱共有峰峰面积数据为比较序列进行灰度关联分析。原始序列的无量纲化处理采用均值化法，计算参考序列与比较序列的灰色关联系数[14]。关联度计算结果见表 7。

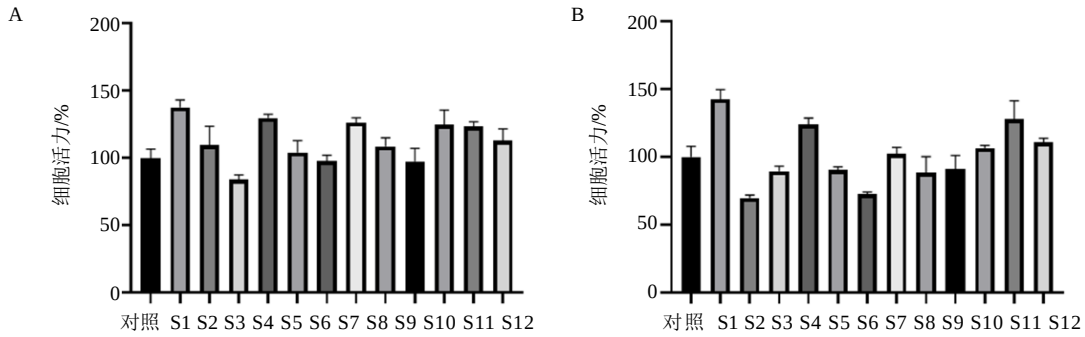

图 7　12 批木香和空白对照分别在 4 Gy (A) 和 6 Gy (B) 照度下的细胞活力值

Fig. 7　Cell viability at 4 Gy (A) and 6 Gy (B) radiation for 12 batches of *Aucklandiae Radix*

表 6　12 批木香药材抗氧化的 IC_{50}

Table 6　IC_{50} for 12 batches of *Aucklandiae Radix*

样品	IC_{50}/(mg·mL^{-1})	95%置信限度	
		下限/(mg·mL^{-1})	上限/(mg·mL^{-1})
S1	0.898	0.753	1.109
S2	3.315	2.059	6.956
S3	1.394	1.092	1.925
S4	1.563	1.229	2.160
S5	2.712	1.832	4.869
S6	1.556	1.058	2.731
S7	0.622	0.392	1.225
S8	0.860	0.676	1.180
S9	1.482	1.104	2.210
S10	1.577	1.166	2.387
S11	0.565	0.388	0.925
S12	2.500	1.709	4.358

表 7　各共有峰与抗氧化活性间的灰色关联度

Table 7　Relevancy between each common peak and antioxidant effect

峰号	关联度	排名	峰号	关联度	排名
1	0.732 2	7	7	0.798 5	5
2	0.710 1	10	8	0.807 4	3
3	0.695 8	11	9	0.814 3	2
4	0.729 8	8	10	0.686 3	12
5	0.832 1	1	11	0.784 7	6
6	0.840 9	4	12	0.728 5	9

关联度结果显示，木香抗氧化作用是多种成分共同作用的结果，各峰所代表的化学成分对其抗氧化活性的影响程度有所区别，其中 5 号峰（去氢木香内酯同分异构体）的影响最大，其次是 9 号峰（去氢木香内酯），而 10 号峰和 3 号峰对抗氧化活性的关联度较小。

2.8.2　木香指纹图谱与抗辐射作用的灰色关联分析　以 12 批木香对 UC-MSC 细胞在 4 Gy 和 6 Gy 下的辐射防护作用（细胞活力）作为参考序列，以各批木香药材 HPLC 指纹图谱共有峰峰面积数据为比较序列进行灰度关联分析。

关联度计算结果如表 8 所示：从关联度结果（表 8）可知，各共有峰对木香在不同辐照强度下细胞保护作用的影响趋势比较接近，仅个别峰的活性贡献程度略有不同。总的来看，11 号峰（异木香酸甲酯）的影响最大，其次是 8 号峰（木香烃内酯）、9 号峰（去氢木香内酯），其余各峰中，10 号峰的抗辐射活性的影响最小。

2.8.3　木香指纹图谱与细胞毒性作用的灰色关联分析　与抗辐射作用的谱效关系研究方法类似，以 12 批木香在 20 μg/mL 下对 UC-MSC 细胞的毒性（细胞活力）作为参考序列，以各批木香药材的 HPLC 指纹图谱共有峰峰面积数据为比较序列进行灰度关联分析。结果见表 9。各共有峰对 20 μg/mL 木香提取物细胞毒性的灰色相关度分布与其在抗辐射活性呈现的趋势存在相似性。例如，8 号（木香烃内酯）、

表 8　4 Gy 和 6 Gy 下各共有峰与抗辐射活性间的灰色关联度

Table 8　Relevancy between each common peak and cell viability of radiation at 4 Gy and 6 Gy

峰号	4 Gy		6 Gy	
	关联度	排名	关联度	排名
1	0.737	10	0.732	10
2	0.757	9	0.736	9
3	0.757	8	0.751	8
4	0.723	11	0.708	11
5	0.845	5	0.824	5
6	0.831	6	0.810	6
7	0.800	7	0.783	7
8	0.882	3	0.878	2
9	0.905	2	0.878	3
10	0.663	12	0.687	12
11	0.912	1	0.895	1
12	0.865	4	0.860	4

表 9 在 20 μg·mL^{-1} 下，各共有峰与细胞毒性的灰色关联度

Table 9 Relevancy between each common peak and cytotoxicity at 20 μg/mL concentration

峰号	关联度	排名	峰号	关联度	排名
1	0.731	8	7	0.805	7
2	0.714	9	8	0.860	2
3	0.713	10	9	0.876	1
4	0.680	11	10	0.676	12
5	0.816	6	11	0.856	3
6	0.824	4	12	0.817	5

9 号（去氢木香内酯）和 11 号峰（异木香酸甲酯）对细胞的毒性影响有较大影响，而 10 号峰对毒性的影响最小；上述趋势的一致性意味着木香抗辐射活性与诱导细胞毒性的物质基础可能是相同的。

3 讨论

本研究对不同提取溶剂、不同提取方式及不同提取时间进行了考察，以色谱峰信息量最大化，提取效率最高，方法稳定为指标，最终确定提取溶剂为甲醇，回流提取 30 min 的提取方式。同时，本研究前期分别考察了乙腈-水、甲醇-水以及在水相下分别加入 0.05%磷酸和 0.1%甲酸流动相系统的分离效果，同时对不同柱温、体积流量、波长均进行了研究。最终确定了分离度、峰形最优的色谱条件。

本研究采用 HPLC 法建立了木香药材的指纹图谱，该方法精密度高、稳定性好、重复性好，能够同时检测木香药材的多种有效成分。12 批木香药材与对照指纹图谱之间的相似度在 0.97 以上，说明 12 批木香其组成及含量相对一致。采用聚类分析，把 12 批云南不同产地、批次的木香分成 4 类，云南缅甸乡为一类，云南富源为一类，云南德钦为一类，剩下的为一类。其中云南德钦的木香抗氧化能力最强，云南富源的次之，可见木香的抗氧化性与其聚类分析结果有一定的相关性。

通过对 12 批木香的抗氧化能力和抗辐射能力的谱效关系分析。我们发现，木香中抗氧化活性最高的成分是去氢木香内酯及其同分异构体，抗辐射活性最高的成分是木香烃内脂、去氢木香烃内脂和异木香酸甲酯。这一发现，对今后木香药材的含量控制提供了新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 郑加梅, 尚明越, 王嘉乐, 等. 木香的化学成分、药理作用、临床应用研究进展及质量标志物预测 [J]. 中草药, 2022, 53(13): 4198-4213.

[2] Talwar K K, Singh I P, Kalsi P S. A sesquiterpenoid with plant growth regulatory activity from *Saussurea lappa* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(1): 336-338.

[3] 林明侠. 木香的药理及临床研究概况 [J]. 中医药信息, 2005, 22(3): 18-19.

[4] 黎晓丽, 孙冬梅, 罗宇琴, 等. 基于主成分分析及聚类判别模式的木香 UPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2019, 50(20): 5040-5046.

[5] Pandey M M, Rastogi S, Rawat A K S. *Saussurea costus*: Botanical, chemical and pharmacological review of an ayurvedic medicinal plant [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 110(3): 379-390.

[6] Bocca C, Gabriel L, Bozzo F, *et al*. A sesquiterpene lactone, costunolide, interacts with microtubule protein and inhibits the growth of MCF-7 cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2004, 147(1): 79-86.

[7] Jeong G S, Pae H O, Jeong S O, *et al*. The alpha-methylene-gamma-butyrolactone moiety in dehydrocostus lactone is responsible for cytoprotective heme oxygenase-1 expression through activation of the nuclear factor E2-related factor 2 in HepG2 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 565(1/2/3): 37-44.

[8] Yuuya S, Hagiwara H, Suzuki T, *et al*. Guaianolides as immunomodulators. synthesis and biological activities of dehydrocostus lactone, mokko lactone, eremanthin, and their derivatives [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(1): 22-30.

[9] 刘晓燕, 蒋益萍, 张嘉宝, 等. 啤酒花的 HPLC 指纹图谱建立及其抗氧化作用谱效关系研究 [J]. 中国药房, 2020, 31(2): 138-143.

[10] Gülçin İ. Antioxidant activity of food constituents: An overview [J]. *Arch Toxicol*, 2012, 86(3): 345-391.

[11] 周妮娜, 张利英, 刘永琦, 等. 不同 X 线剂量照射对骨髓间充质干细胞的增殖及 DNA 损伤的影响 [J]. 医学研究生学报, 2016, 29(9): 923-927.

[12] 徐春华. MTT 法检测大豆异黄酮对癌细胞的生长抑制作用 [J]. 中央民族大学学报：自然科学版, 2012, 21(1): 58-62.

[13] 吕露阳, 张吉仲, 张志锋, 等. 木香川木香药材 UPLC 特征指纹图谱建立及鉴别研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(14): 2699-2703.

[14] 刘婧, 黄潇, 付小梅, 等. 基于主成分因子加权和灰色关联分析法的栀子利胆作用谱效关系分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(14): 135-142.

[责任编辑 时圣明]