

• 化学 •

泽泻中肾毒性成分的辨析研究

赵筱萍^{1,2*}, 陆琳², 张玉峰³, 张伯礼¹

(1. 天津中医药大学, 天津 310192;

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: 研究筛查泽泻中肾毒性成分, 为提升其质量控制标准提供科学依据。方法: 使用高压制备色谱分离和制备泽泻化学组分样品; 基于 LLC-PK1 细胞模型, 用 FDA 荧光标记和 MTT 2 种方法筛查肾毒性组分; 对毒性最明显的化学组分进行液-质联用定性分析。结果: MTT 法与 FDA 荧光标记法检测结果基本一致, FDA 法检测泽泻中 C13 组分呈最明显的毒性, 经液-质联用分析鉴定为泽泻醇 C, 16, 23-环氧泽泻醇 B 和泽泻醇 O。结论: 泽泻中泽泻醇 C, 16, 23-环氧泽泻醇 B 和泽泻醇 O 可能会引起肾毒性, 应注意限量控制。

[关键词] 泽泻; 肾毒性; 中药有毒成分筛查; 荧光标记

泽泻为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎。中医理论认为其性寒, 具有利尿、降糖、降脂、降压及减肥等诸多作用, 在临床实践中得到广泛使用, 并被用于癰清片、五苓散、血脂灵片、山菊降压片及六味地黄丸等中成药。近年出现该药材有肝毒性的报道, 但引起毒性的化学成分不明^[1]。为科学合理使用泽泻, 有必要对其有毒有害成分进行筛查研究, 从而提高泽泻质量控制水平。

本研究采用体外细胞模型对泽泻提取物中 30 个组分进行肾毒性快速筛查, FDA 法发现 C13 组分呈现最为明显的肾毒性; 采用液-质联用法 (LC-MS) 定性分析 C13 组分, 推断出其由泽泻醇 C, 16, 23-环氧泽泻醇 B 和泽泻醇 O 等组成。

1 材料

细胞荧光显微图像获取平台 Fluoin sight Cell (浙江大学药物信息学研究所开发); 酶标仪 (Bio-Tek ELX800, 美国宝特); 冷冻干燥机 (Thermo, Electron Corporation, USA); Agilent 1100 高效液相色谱仪, 包括二元梯度泵, 自动进样器, 柱温箱和二极阵列检测器 (DAD, diode array detector, 美国安捷伦公司); 质

谱为 Finnigan LCQ-Deca XP^{plus} 离子阱, 配有电喷雾离子源 (美国 Finnigan 质谱公司); 高分辨质谱采用热电 LTQ-Orbitrap 质谱仪 (美国热电公司)。

猪肾近曲小管上皮细胞株 (LLC-PK1, 上海细胞库); M199 培养基、胎牛血清 (Gibco 公司); 二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO)、胰蛋白酶 (Sigma 公司); 二乙酸荧光素 (Fluorescein diacetate, FDA, 碧云天生物技术研究所); 四甲基偶氮唑盐 (MTT, 杭州昊天生物技术有限公司); 96 孔细胞培养板 (Corning 公司)。

泽泻 (杭州市中药饮片厂, 经浙江大学中药科学与工程学系陈柳蓉副教授鉴定); 甲醇、无水乙醇、乙酸乙酯为分析纯 (国药集团); 乙腈、甲醇为色谱纯 (德国默克公司); 甲酸为色谱纯 (Tedia 公司), 高纯水来自 Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司)。

2 方法

2.1 泽泻化学组分制备 泽泻粉碎后过 20 目筛, 50 °C 干燥 5 h。称取药材 200 g, 置于 5 L 圆底烧瓶中, 依次加入 8 倍量等体积混合的无水乙醇和乙酸乙酯、70% 乙醇, 各提取 2 次, 每次 1 h。药渣用纯净水 90 °C 提取 1 h, 收集每部分提取滤液。3 部分滤液分别浓缩至干得到样品 A01, A02 和 A03。

A01 用无水乙醇溶解, 上 ODS 中压柱分离。洗脱程序: 30% 乙醇洗脱 5 个柱体积为洗脱液 (1), 95% 乙醇洗脱 5 个柱体积为洗脱液 (2), 无水乙醇洗脱 5 个柱体积为洗脱液 (3); 再分别浓缩得到样

[稿件编号] 20101209013

[基金项目] 浙江省科技计划项目 (2008C23065)

[通信作者] * 赵筱萍, 教授, Tel: (0571) 86613774, E-mail: zhaoxi-aoping8686@sina.com

品 A04, A05, A06。A02 用 50% 甲醇溶解上 ODS 中压柱分离。洗脱程序: 5% 乙醇洗脱 5 个柱体积为洗脱液(4), 50% 乙醇洗脱 5 个柱体积为洗脱液(5), 95% 乙醇洗脱 5 个柱体积为洗脱液(6), 浓缩得到样品 A07, A08 和 A09。

A05 样品 2 g 溶于 20 mL 95% 乙醇中, A08 样品 2 g 溶于 20 mL 50% 乙醇中, 分别过滤。制备条件: 流动相为水(A)和乙腈(B); A05 洗脱梯度为 5(B%, 0 min), 5(B%, 4 min), 50(% B, 54 min), 95(% B, 64 min); A08 的液相梯度: 20(B%, 0 min), 20(B%, 4 min), 50(% B, 19 min), 95(% B, 54 min), 95(% B, 64 min); 柱温 30 °C, 流速 10 mL · min⁻¹, 检测波长为 203, 230, 254, 280 和 320 nm。4 min 开始收集, 每 4 min 收集成一份, 共 15 份, 冷冻干燥得小极性成分 C01 ~ C15(来自 A05)和大极性成分 B01 ~ B15(来自 A08)。

2.2 肾毒性组分筛查 将待测组分溶于 DMSO 中, 得到 50 g · L⁻¹ 储备液, 与细胞孵育的终浓度为 50 mg · L⁻¹。选择标记活细胞的荧光染料 FDA 溶于 DMSO 中得 10 g · L⁻¹ 储备液, 工作质量液浓度 10 mg · L⁻¹。选用取对数生长期的 LLC-PK1 细胞, 用 0.25% 胰酶消化, 离心收集细胞, 用培养液配成每毫升 3 万个细胞的细胞悬液; LLC-PK1 以 3 000 个/孔接种于 96 孔板中, 贴壁完全后与待筛查组分置于细胞培养箱中共孵育 48 h。设定溶剂对照组(0.1% DMSO)及阳性对照组(马兜铃酸 A, 终浓度 100 μmol · L⁻¹), 各试验组平行 3 份。

FDA 荧光法^[2]: 细胞与待筛组分共孵育 48 h 后, 弃去每孔中培养液, 再与含有 10 mg · L⁻¹ FDA 的 PBS 孵育, 室温下暗处 15 min, 用 PBS 漂洗每孔, 吸干液体, 将 96 孔板置于荧光显微镜扫描平台上自动获取每孔荧光强度信息。用下式计算存活率: 存活率(%) = (筛查组荧光强度值/溶剂对照组荧光强度值) × 100%。

MTT 法: 细胞与待筛组分共孵育 48 h 后, 弃去每孔中培养液, 加入 MTT。4 h 后, 去除培养液, 加入 DMSO, 振荡后在酶标仪 550 nm 波长下测定吸光度。用下式计算存活率: 存活率(%) = (A_{筛查组} / A_{溶剂对照组}) × 100%。

当细胞存活率低于 20% 时, 判定为具有明显毒性组分。

2.3 LC-MS 分析 色谱条件: 色谱柱 Zorbax SB-

C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 0.1% 甲酸(A)-乙腈(B); 流速 0.8 mL · min⁻¹; 洗脱梯度 0 min(30% B), 60 min(95% B), 70 min(95% B); 进样量 10 μL。

质谱条件: 电喷雾电离(ESI), 正离子模式; 毛细管温度 350 °C; 鞘气 5250 KPa; 辅助气 1750 KPa; 源电压 4.5 kV; 毛细管电压 19 V; 管透镜偏压 25 V; 扫描范围 m/z 140 ~ 1 000。

3 结果与分析

3.1 FDA 荧光法与 MTT 法检测 两种方法检测结果(图 1)。经配对 T 检验表明, 这两种方法不存在统计学上的显著性差异。检测结果表明, C10 ~ C15 组分呈明显毒性, 用 FDA 法检测出 C13 组分毒性最大。

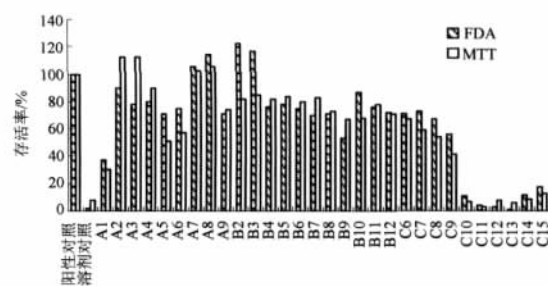


图 1 泽泻肾毒性组分筛选

3.2 肾毒性组分的定性分析 对 C13 组分进行 LC-MS 分析。从 C13 的 HPLC 色谱图(图 2)分析可知, 该组分中存在 3 个紫外吸收的化合物, 且这 3 个化合物在质谱正离子模式下均有响应(图 2); 对其正离子扫描下的分子离子峰进行二级质谱分析(图 3 ~ 5), 3 个化合物的高分辨质谱分析和紫外扫描数据(表 1)。

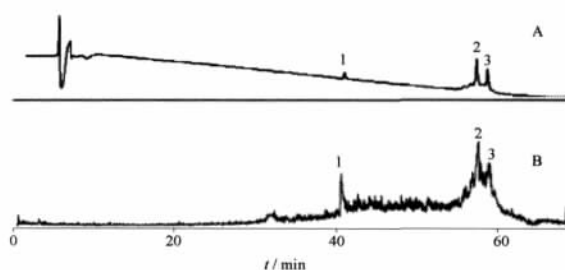


图 2 泽泻 C13 组分的 HPLC 色谱图(A)与总离子流图(B)

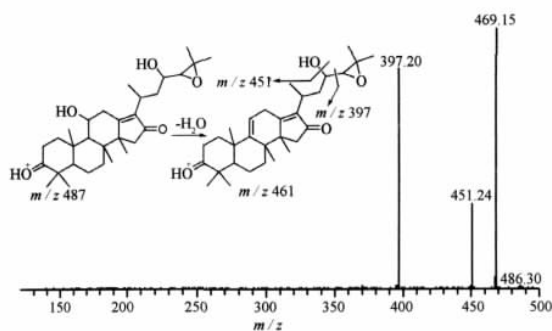


图3 泽泻醇C的二级质谱图及其
主要裂解途径

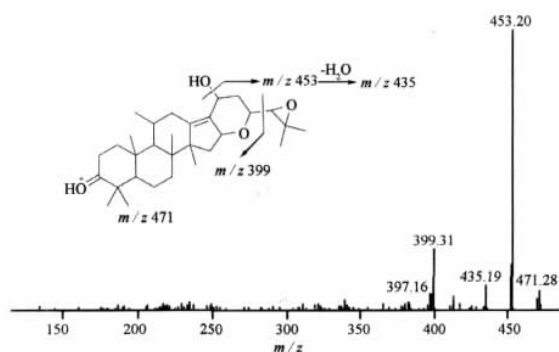


图4 16,23-环氧泽泻醇B二级质谱图
及主要裂解途径

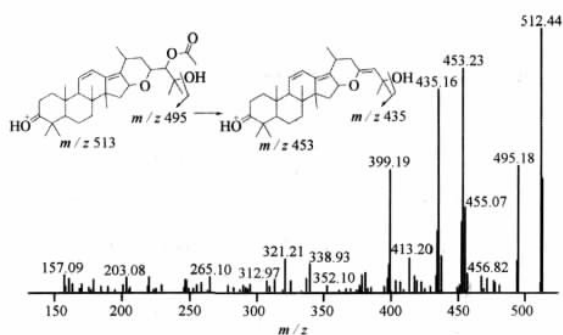


图5 泽泻醇O二级质谱图及主要裂解途径

表1 C13组分中化合物的精确质量和紫外光谱数据

No.	t_R /min	$[M+H]^+$	分子式	化合物	λ_{max} /nm
1	41.21	487.341 08	$C_{30}H_{46}O_5$	泽泻醇C	290
2	58.22	471.346 42	$C_{30}H_{46}O_4$	16, 23-环氧 泽泻醇B	251
3	59.60	513.356 80	$C_{32}H_{48}O_5$	泽泻醇O	251

化合物1的最大吸收在290 nm,与文献[3]报道的不饱和萜酮的紫外最大吸收峰一致;经高分辨质谱分析获得其准分子离子峰的精确分子质量为487.341 08,由于萜酮类化合物仅含有碳、氢、氧3种元素,故推断其分子式为 $C_{30}H_{46}O_5$,与文献中报道的泽泻醇C一致^[4]。如图3所示,化合物1在二级质谱图中,主要顺次失去2分子水,然后丢失含有环氧基的侧链,这些特征与泽泻醇C的结构一致,因此,化合物1推定为泽泻醇C。用同样方法,可推测化合物2和3分别为16,23-环氧泽泻醇B和泽泻醇O^[5-6]。

4 讨论

FDA是一个非极性酯类化合物,能通过完整的细胞膜,在活细胞内被酯酶水解而产生极性的绿色荧光物质,该荧光物质不能通过完整的细胞膜,能在活细胞内保留;而死细胞则缺乏水解FDA的酯酶和完整的细胞膜,因此,可用绿色荧光的强度来表征活细胞量。本研究用猪肾近曲小管上皮细胞(LLC-PK1)作为肾毒性筛选的细胞模型^[7-8],并用荧光染料FDA标记活细胞^[9-10]。实验结果表明,FDA荧光标记法与传统的MTT法测定结果基本一致。某些组分筛选试验的细胞存活率高于溶剂对照组,可能是所含的化学物质具有促进细胞增殖作用或具有还原性或激活酯酶等。

有文献报道泽泻中的三萜类成分具有较强细胞毒和诱导细胞凋亡的作用,这可从一个侧面说明本文体外实验细胞死亡的原因。综上,泽泻中泽泻醇C、16,23-环氧泽泻醇B和泽泻醇O可能会引起肾毒性,应对其含量进行限量控制。

[参考文献]

- [1] Yune M F, Tam S, Fung J, et al. Traditional Chinese medicine causing hepatotoxicity in patients with chronic hepatitis B infection: 1-year prospective study [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2006, 24(8): 1179
- [2] Jin Y 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, doi: 10.1177/10915818
- [3] Chen L L, Qi J, Chang Y X, et al. Identification and determination of the major constituents in traditional chinese medicinal formula Danggui-san by HPLC-DAD-MS/MS [J]. Pharm Biomed Anal, 2009, 50: 127.
- [4] 赵新峰,孙毓庆. 高效液相色谱-电喷雾-质谱法分析泽泻中的活性成分[J]. 中成药, 2007, 29(12): 1805.

- [5] Yoshijiro N, Yohko S, Masumi K, et al. Terpenoids of *Alisma orientate* Rhizome and the crude drug *Alismatis rhizome* [J]. *Pytochemistry*, 1994, 36(1): 119.
- [6] Jiang Z Y, Zhang X M, Zhang F X, et al. A new triterpene and anti-hepatitis B virus active compounds from *Alisma orientalis* [J]. *Planta Med*, 2006, 72(10): 951.
- [7] Steinmassl D, Pfaller W, Gstraunthaler G, et al. LLC-PK1 epithelia as a model for *in vitro* assessment of proximal tubular nephrotoxicity [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1995, 31: 94.
- [8] L'Eplattenier H F, Zhao J M, Pfannkuch F, et al. Cell culture in nephrotoxicity testing [J]. *Toxicol Lett*, 1990, 53(1/2): 227.
- [9] Jones K H, Senft J A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide [J]. *J Histochem Cytochem*, 1985, 33(1): 77.
- [10] Ross D D, Joneckis C C, Ordóñez J V, et al. Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide viable cell number [J]. *Cancer Res*, 1989, 49: 3776.

Study on discriminating nephrotoxic components in zexie

ZHAO Xiaoping^{1,2*}, LU Lin², ZHANG Yufeng³, ZHANG Boli¹

(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 sift and identify the nephrotoxic components in Zexie for controlling the quality of the herb. **Method:** The fractions of zexie were prepared by Pre-HPLC, then the nephrotoxicity of the fraction was sifted using LLC-PK1 labelled with fluorescein diacetate and MTT assay. Finally, the compounds in the most obvious nephrotoxic fraction were identified with LC-MS. **Result:** Using MTT and FDA assay, similar results were obtained. Fraction C13 was found to be the most toxic with FDA assay, in which three compounds, alisol C, 16, 23-oxido-alisol B and alisol O, were detected and characterized by multi-stage mass spectrometric analysis. **Conclusion:** Alisol C, 16, 23-oxido-alisol B and alisol O in Zexie may cause nephrotoxicity.

[Key words] Zexie; nephrotoxicity; identification of toxic components in Chinese medicine; fluorescence label

doi: 10.4268/cjcmm20110624

[责任编辑 丁广治]