

甘肃产艾叶挥发油的化学成分及遗传毒性研究

兰美兵, 余永莉, 卢巍, 刘茂生, 郑衍芳, 杨会营, 李啸红*
(遵义医学院珠海校区人体解剖学与组织胚胎学教研室, 广东 珠海 519041)

【摘要】 目的:分析甘肃产艾叶挥发油的主要化学成分,探讨其对小鼠的遗传毒性。**方法:**①成分分析:用气相色谱-质谱法分析艾叶挥发油的化学成分,用归一化法测定各组分的相对百分含量。②微核试验:选用昆明种孕鼠30只,随机分为5组:正常对照组,ig给予等容积花生油;艾叶油2,1,0.5 mL·kg⁻¹组,ig给予艾叶油;阳性对照组,ip给予环磷酰胺(CP)40 mg·kg⁻¹。正常对照组和艾叶油组自孕第12天开始ig给药,连续5 d。阳性对照组于孕第15天ip给予CP,连续2 d。各组孕鼠均于孕第16天用药后处死,取小鼠骨髓细胞和胎鼠肝脏做微核试验。③精子畸形试验:昆明种小鼠雄性40只,随机分为5组,各组用药剂量及给药方式同微核试验,均连续5 d。首次给药后35 d处死,取出其附睾制片,读取精子畸形率。**结果:**从甘肃产艾叶挥发油分离出72个峰,其中鉴定了56个成分,占挥发油色谱峰面积的90.83%。艾叶挥发油灌胃剂量2 mL·kg⁻¹时,孕鼠和雄鼠诱发的骨髓微核率、胚胎肝微核率和精子畸形率均较阴性对照组显著升高($P < 0.05$)。剂量为1 mL·kg⁻¹时,诱发的胚胎肝微核率较阴性对照组显著升高($P < 0.05$),骨髓微核率与精子畸形率与阴性对照组相比,无显著性差异。剂量为0.5 mL·kg⁻¹时,诱发的骨髓微核率、胚胎肝微核率、精子畸形率与阴性对照组相比,均无显著性差异。**结论:**甘肃产艾叶挥发油的主要成分为桉叶素(20.45%)、蒿萜(12.12%)、樟脑(6.99%)、青蒿酮(5.85%)、左旋龙脑(4.27%)等;一定剂量的艾叶挥发油对小鼠具有潜在的遗传毒性,并呈剂量-反应关系。

【关键词】 艾叶挥发油;气相色谱-质谱;微核试验;遗传毒性

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2012)13-0252-04

Study on Chemical Constituents and Genotoxicity of Volatile Oil in *Artemisia argyi* from Gansu

LAN Mei-bing, YU Yong-li, LU Wei, LIU Mao-sheng, ZHENG Yan-fang, YANG Hui-ying, LI Xiao-hong*
(Department of Human Anatomy and Histo-Embryology, Zunyi Medical College
Zhuhai Campus, Zhuhai 519041, China)

【Abstract】 Objective: To analyze the main chemical constituents of volatile oil in *Artemisia argyi* from Gansu, and explore its genotoxicity in mice. **Method:** ① Constituents analysis: the chemical constituents of volatile oil in *A. argyi* were separated and identified by GC-MS, the relative content of each component was determined by area normalization. ② Micronucleus assay: thirty Kunming pregnant mice were randomly divided into 5 groups: normal control group, ig given with peanut oil in equal volume; volatile oil 2, 1, 0.5 mL·kg⁻¹ groups, ig given volatile oil; and positive control group, ip given cyclophosphamide (CP) 40 mg·kg⁻¹. The normal control group and volatile group were ig administrated once a day from the 12th day of pregnancy to the 16th day, for 5 d, while positive control group was ip given CP on the 15th day of pregnancy for 2 d. On the 16th day, the pregnant mice in each group were sacrificed to take out the embryo from mice, micronucleus test of adult mice bone marrow cells and fetal mice hepatocytes were carried out. ③ Sperm abnormality assay: forty male mice were randomly divided into 5 groups, the doses and administration of each group were similar to micronucleus test. The

【收稿日期】 20111024(014)

【基金项目】 遵义医学院中青年科研启动基金(F-0905);遵义医学院珠海校区科研启动基金(F-0603)

【第一作者】 兰美兵,在读硕士,从事中药生殖毒理和骨生物力学研究,Tel:15916262293,E-mail:lanmbin@sina.com

【通讯作者】 *李啸红,教授,Tel:13697789894,E-mail:xiaohl60@sina.com

drugs was administered for 5 days. After 35 d of first medication, the mice were sacrificed to take out the epididymis and produce the sperm smear, and examination of sperm deformity was carried out. **Result:** Seventy-two components were isolated from volatile oil and fifty-six of them were identified, which was about 90.83% of all components. Compared with control group, the micronucleus rates of bone marrow and fetal hepatic cell and teratospermia number were all significantly increased ($P < 0.05$) at a oral dose of $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$; only the micronucleus rate on fetal liver was increased significantly ($P < 0.05$) with the oral dose of $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$; there was no statistic difference in any of the indexes at the dose of $0.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$. **Conclusion:** The main chemical components of volatile oil in *A. argyi* from Gansu are 1, 8-cineole (20.45%), artemisia alcohol (12.12%), camphor (6.99%), Artemisia ketone (5.85%), *L*-borneol (4.27%), et al. A potential dose-related genotoxicity of volatile oil in *A. argyi* has been verified in this research.

[**Key words**] volatile oil from *Artemisia argyi*; GC/MS; micronucleus assay; genotoxicity

艾叶(*Artemisiae Argyi Folium*)为多年生草本菊科植物艾(*Artemisia argyi* Levl. et Vant.)的干燥叶,自汉代医圣张仲景《金匱要略》创胶艾汤,用其治疗经寒不调、胎漏下血证以来,艾叶作为安胎、保胎药,沿用至今。但《图经本草》载:“近世有单服艾者……然亦有毒,其毒发则热气冲上,狂躁不能禁,至攻眼有疮出血者,诚不可妄服也”。因此,其安胎作用受到质疑^[1]。艾叶油是从艾叶中提取出来的挥发油,既是艾叶的功效成分也是其毒性成分^[2],为临床常用的中药制剂,已开发出艾叶油软胶囊、艾叶油滴丸、复方艾叶油软膏等。有关艾叶挥发油成分虽已有文献报道^[3-5],但不同产地,其化学成分较复杂。甘肃亦为艾叶的主要产地之一^[6]。艾叶不良反应多由艾叶挥发油引起,目前已报道的是艾叶挥发油急性和亚急性毒性研究^[7-9],遗传毒性未见报道。本文采用气相色谱-质谱方法对水蒸气蒸馏法提取的艾叶油进行分析和微核试验、精子畸形试验检测遗传毒性,为甘肃产艾叶挥发油在临床上安全、有效、合理的应用提供实验参考依据。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,普通级,购自广东省医学实验动物中心,许可证号 SCXK(粤)2007-0002,雌性体重 25~30 g,雄性体重 30~35 g。饲养条件:室温 26~30 ℃,排风扇通风,相对湿度 70%~80%,自由饮食,进水,适应性饲养 1 周后进行实验。

1.2 受试药物 艾叶挥发油(珠海德信行,采用水蒸气蒸馏提取,纯度 98%。产地甘肃。批号 20081127)。环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 20070310),花生油(金龙鱼食用油有限公司,市售)。

1.3 仪器 HP6890/5975C GC/MS 联用仪(美国安捷伦公司)。

1.4 气相色谱-质谱分析条件 色谱柱为 HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)弹性石英毛细管柱,柱温 4 ℃(保留 2 min),艾叶挥发油以 $3.5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 290 ℃,保持 2 min,汽化室温度 250 ℃,载气为高纯 He (99.999%),柱前压 7.62 psi,载气流量 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量 1 μL,分流比 20:1。离子源为 EI 源,离子源温度 230 ℃,四极杆温度 150 ℃,电子能量 70 eV,发射电流 34.6 μA,倍增器电压 1037 V,接口温度 280 ℃,质量范围 m/z 20~550。

2 方法

2.1 分析方法 艾叶挥发油 1 μL,用气相色谱-质谱联用仪分析,通过 HPMSD 化学工作站检索 Nist 库和 WILLEY 库进行图谱解析。

2.2 小鼠骨髓微核试验和胚胎肝转移微核试验

2.2.1 动物及给药 昆明种小鼠 60 只,雌性 40 只,雄性 20 只。将雌鼠与雄鼠每晚 2:1 合笼,次日晨查见阴栓者为孕 0 d,取孕鼠 30 只,随机分成 5 组,每组 6 只。受试药物分为艾叶挥发油 2, 1, 0.5 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3 个剂量组,阳性对照组腹腔注射 CP (40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),阴性对照组灌胃生理盐水(0.4 mL/只)。受试药物组及阴性对照组小鼠于其孕 12 d 开始灌胃,每天 1 次,连续 5 d。阳性对照组于处死前 1 d 开始腹腔注射环磷酰胺,连续 2 d。

2.2.2 取材与制片 各组孕鼠于孕 16 d 用药 2 h 后脱颈椎处死,打开孕鼠腹腔,记录活胎、死胎与吸收胎情况。每只孕鼠取其两侧股骨骨髓和 2 只胚胎的肝脏,按照李啸红等^[10]实验方法制片。

2.2.3 观察及数据处理方法 细胞涂片置显微镜油镜下观察,每只胚胎鼠肝涂片计数 500 个嗜多染红细胞,每只成年鼠骨髓涂片计数 1 000 个骨髓嗜多染红细胞,微核率以含微核的嗜多染红细胞数的

千分率计。

2.3 小鼠精子畸形试验 雄性昆明种小鼠 40 只, 随机分为 5 组, 每组 8 只。各组用药剂量同微核试验。受试药物组及阴性对照组小鼠每天 ig 给药 1 次, 阳性对照组每天 ip 环磷酰胺 1 次, 均连续 5 d。各组小鼠于第 1 次给药后 35 d, 脱颈椎处死, 取出其双侧附睾放入盛有生理盐水的离心管中, 按胡怡秀等^[11]方法制片、镜检。每只小鼠观察 1 000 个精子, 记录畸形(折尾、镰刀形、双尾、胖头、无钩、无定形等)数目并统计畸形千分率。

2.4 统计分析 小鼠骨髓、胚胎肝转移微核试验和小鼠精子畸形试验结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS 19.0 统计软件处理, 组间用单因素方差分析比较, 以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 化学成分 分离出 72 个峰, 其中鉴定了 (*Z*)-3-己烯醇 0.13%, 1-己醇 0.40%, 檀紫三烯 0.33%, 三环烯 0.05%, α -侧柏烯 0.23%, α -蒎烯 1.89%, 樟脑萜 1.17%, 马鞭草烯 0.03%, 冬青油烯 1.03%, β -蒎烯 0.88%, 11-辛烯-3-醇 0.99%, 3-辛酮 0.13%, 桉叶素醇 0.21%, 3-辛醇 0.08%, 艾醇 2.44%, α -水芹烯 0.14%, α -松油烯 0.481%, 对-伞花烃 3.07%, 柠檬烯 0.511%, 1,8-桉叶素 20.45%, 2,7-二甲基-

4-辛烯-2,7-二醇 0.087%, (*Z*)-罗勒烯 0.059%, γ -松油烯 0.64%, 青蒿酮 5.85%, (*Z*)-水合冬青油烯 3.22%, 蒿醇 12.12%, γ -萜品油烯 0.45%, (*E*)-水合冬青油烯 1.421%, α -侧柏酮 2.575%, β -侧柏酮 0.401%, p- Δ 2-薄荷醇 1.194%, 菊油环酮 0.85%, 1-松油醇 0.99%, 樟脑 6.99%, 异环柠檬醛 0.94%, 左旋龙脑 4.27%, 4-松油醇 1.37%, α -松油醇 2.45%, (*Z*)-薄荷烯醇 0.88%, (*E*)-香茅醇 0.62%, (*Z*)-香茅醇 0.10%, 左旋香芹酮 0.11%, 薄荷烯酮 0.16%, 乙酸菊烯酯 0.12%, 乙酸冰片酯 0.29%, α -乙酸松油醇酯 0.24%, 丁香酚 0.42%, 胡椒烯 0.19%, α -古芸烯 0.12%, β -丁香烯 3.14%, α -蛇麻烯 0.35%, 吉玛烯 0.58%, β -芹子烯 0.79%, 匙叶桉油烯醇 0.29%, 氧化石竹烯 0.85%, 蓝桉醇 1.05% 等 56 个成分, 占挥发油色谱峰面积的 90.83%。

3.2 小鼠骨髓微核试验和胚胎肝转移微核试验 艾叶挥发油 2 mL·kg⁻¹ 剂量组诱发的小鼠骨髓和胚胎肝微核率均较阴性对照组显著升高 ($P < 0.05$)。艾叶挥发油 1 mL·kg⁻¹ 剂量组诱发的胚胎肝微核率较阴性对照组显著升高 ($P < 0.05$), 骨髓微核率与阴性对照组比较无显著性差异。艾叶挥发油 0.5 mL·kg⁻¹ 剂量组诱发的骨髓与胚胎肝微核率与阴性对照组比较, 均无显著性差异。见表 1。

表 1 艾叶挥发油诱发小鼠骨髓与胚胎肝嗜多染红细胞微核率变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mL·kg ⁻¹	小鼠骨髓				小鼠胚胎肝			
		动物数	观察细胞数	微核数	微核率/ $\times 10^{-3}$	动物数	观察细胞数	微核数	微核率/ $\times 10^{-3}$
阴性	-	6	6 000	15	2.5 ± 0.55	12	6 000	20	3.33 ± 0.52
CP ²⁾	0.04	6	6 000	110	18.33 ± 2.73 ¹⁾	12	6 000	121	20.17 ± 1.47 ¹⁾
艾叶挥发油	2	6	6 000	40	6.67 ± 0.82 ¹⁾	12	6 000	58	9.67 ± 0.82 ¹⁾
	1	6	6 000	26	4.33 ± 0.52	12	6 000	40	6.67 ± 0.82 ¹⁾
	0.5	6	6 000	20	3.33 ± 0.52	12	6 000	32	4.33 ± 0.82

注: 与阴性对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ 孕鼠于孕 15 d 开始腹腔注射环磷酰胺 40 mg·kg⁻¹, 连续 2 d (表 2 同)。

3.3 小鼠精子畸形试验 阳性对照组发生畸变的精子数目较其他各组显著升高 ($P < 0.05$)。艾叶油 2 mL·kg⁻¹ 剂量组诱发的精子畸形率与阴性对照组比较显著升高 ($P < 0.05$), 艾叶挥发油 1, 0.5 mL·kg⁻¹ 剂量组诱发的畸形率与阴性对照组比较无显著性差异。结果见表 2。

4 讨论

现代药理学研究表明, 艾叶挥发油具有镇咳平喘、利胆止血、抗菌抗病毒抗肿瘤等多种生物学效应^[12], 但是不同的产地、品种以及提取方法等因素可造成其成分差异较大。化学成分是生物学效应的

表 2 艾叶挥发油诱发小鼠精子畸形率变化 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mL·kg ⁻¹	精子数	畸变精子数	畸变率
		/个	/个	/ $\times 10^{-3}$
阴性	-	8 000	32	4.00 ± 0.75
CP ²⁾	0.04	8 000	137	17.12 ± 1.13 ¹⁾
艾叶挥发油	2	8 000	48	6.00 ± 0.76 ¹⁾
	1	8 000	37	4.63 ± 0.52
	0.5	8 000	35	4.37 ± 0.74

基础, 对其成分的研究有利于建立鉴别艾品种标准、建立评价艾品质优劣标准、建立临床艾安全性使用

标准以及提纯艾的有效成分及研发艾相关新产品^[13]。由成分分析结果可知,甘肃产艾叶挥发油的成分多为单萜类、倍半萜类及其含氧衍生物,其中具有止咳作用的桉叶素含量最高(20.45%),其次为具有平喘作用的蒿醇(12.12%)。具有杀菌、消炎作用的樟脑(6.99%)。还首次检出具有较强抗疟作用的青蒿酮(5.85%)。具有防潮防湿,杀菌等作用的左旋龙脑(4.27%)。但同时也含有毒性成分,如侧柏酮(2.575%)。经本课题组的初步研究,相同剂量下对小鼠胚胎骨骼发育未发现毒性作用^[14]。提示甘肃产艾叶挥发油具有较高的医药开发价值。

对于育龄期用药,除应关注其一般安全性外,还应关注其特殊安全性,如生殖毒性、遗传毒性^[15]。微核试验是用来检测染色体断裂剂和非整倍体诱导剂对染色体的损伤作用^[16-17],微核的形成是细胞受遗传毒物作用后的一种遗传学终点,因此,微核试验在对外来化合物遗传毒性检测方面,得到了广泛应用^[18]。精子形态分析是评价化学物质对精子遗传物质产生不良的潜在性影响的间接指标。精子畸形率的高低,可反映该化学毒物的生殖毒性和对生殖细胞潜在的致突变性。两者都具有操作方便、经济实用和快速等特点,是药物安全性评价的重要检测内容。本实验结果研究显示,艾叶油灌胃剂量为 $2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,对成年小鼠及胚胎鼠的遗传物质有潜在的损伤作用,灌胃剂量为 $1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,仅对胎鼠有潜在的遗传毒性,灌胃剂量为 $0.5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,对孕鼠、成年雄鼠及胚胎鼠均无遗传毒性。且同等剂量下,各剂量组胚胎肝微核率均高于孕鼠骨髓微核率,可见艾叶油对胚胎肝转移微核试验的敏感度高于孕鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验。小鼠胚肝脏作为造血器官之一,其细胞分裂增殖比成年鼠骨髓细胞更加活跃更容易受到药物毒性成分影响。按相关剂量折算公式,小鼠 $0.5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量约相当于人 $0.06\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量。根据本实验结果提示,一定剂量的艾叶挥发油对小鼠具有潜在的遗传毒性,并呈剂量-反应关系,故在临床对于用药剂量及不同人群,特别是育龄期人群应予以重视。

[参考文献]

- [1] 龚玉英. 堕胎的机理及艾叶的安胎作用[J]. 河南中医, 2003, 12(23): 63.
- [2] 孙蓉, 黄伟, 王会. 与功效、毒性相关的艾叶化学成分

- 研究进展[J]. 中国药物警戒, 2009, 6(11): 676.
- [3] 兰美兵, 余永莉, 李啸红. 贵州产艾叶挥发油的化学成分分析[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(8): 1305.
- [4] 金华, 马驰骁. 气相色谱-质谱法测定艾叶挥发油化学成分[J]. 理化检验: 化学分册, 2011, 27(3): 350.
- [5] 姜平川, 李嘉, 梁江昌. 广西产艾叶挥发油成分 GC-MS 研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(12): 25.
- [6] 宋平顺, 卫玉玲, 张伯崇. 甘肃产艾叶的原植物调查及生药鉴定[J]. 中草药, 1994, 25(7): 372.
- [7] 蒋涵, 侯安继, 项志学. 蕲艾挥发油的毒理学研究[J]. 中药药理与临床, 2004, 20(5): 43.
- [8] 孙蓉, 王会, 黄伟, 等. 艾叶不同组分对小鼠急性毒性实验比较研究[J]. 中国药物警戒, 2010, 7(7): 392.
- [9] 刘红杰, 白杨, 洪燕龙, 等. 不同提取方法制备的艾叶挥发油化学成分分析与急性肝毒性比较[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(11): 1439.
- [10] 李啸红, 杨柳, 姬可平, 等. 中药紫草的遗传毒性实验研究[J]. 中国生育健康杂志, 2003, 14(3): 167.
- [11] 胡怡秀, 刘秀英, 易传祝, 等. 苦瓜水提取物对小鼠的急性经口毒性和遗传毒性实验研究[J]. 中国预防医学杂志, 2008, 9(2): 101.
- [12] 周英栋, 费新应. 艾叶的药理作用研究[J]. 湖北中医杂志, 2010, 32(11): 75.
- [13] 周次利, 谭琳莹, 王晓梅, 等. 艾叶化学成分的生物学作用与影响因素探讨[J]. 上海针灸杂志, 2010, 29(2): 74.
- [14] 兰美兵, 李啸红, 江惠彩, 等. 艾叶油对小鼠胚胎骨骼发育的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2010, 24(6): 521.
- [15] 裴小静, 尤昭玲. 中药妇科用药生殖毒性、遗传毒性研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(6): 86.
- [16] International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH) S2 (R1): guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use, 2008.
- [17] 《药物遗传毒性研究技术指导原则》课题研究组. 药物遗传毒性研究技术指导原则: 第二稿[S]. 2006: 10.
- [18] 胡建平, 刘春芳, 林娜. 现代实验技术在中药遗传毒理学研究中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(8): 66.

[责任编辑 聂淑琴]