

## 北青龙衣乙醇提取物中成分在大鼠脑组织中的分布研究

霍金海, 王改丽, 刘政, 王伟明\*

黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150036

**摘要:** 目的 利用超高压色谱-四极杆-飞行时间串联质谱技术(UPLC-Q-TOF/MS)对大鼠ig北青龙衣乙醇提取物后在脑组织中成分分布进行分析。方法 将北青龙衣醇提取物按20 mL/kg ig大鼠后,采集脑组织,采用UPLC-Q-TOF/MS法分析;正负离子模式使用ESI源对数据进行采集,并通过数据分析软件进行处理,对入脑成分分子式的鉴别采用精确质量数、同位素峰度比比较进行,进一步将其二级质谱图与对照品或数据库的二级质谱图进行比对、结合已知的文献报道和对化合物的裂解规律分析,确定入脑成分的结构式。结果 从大鼠脑组织中鉴定了11种来源于北青龙衣的成分,包含7个原型成分、4个代谢产物,其中7个萘醌,2个二芳基庚烷,2个酚酸。结论 北青龙衣乙醇提取物在大鼠脑组织中分布的成分以萘醌类为主,为北青龙衣脑毒性的深入研究提供物质基础,也为其体内成分、组织分布研究提供方法学借鉴。

**关键词:** 北青龙衣; 萘醌; 脑组织分布; 超高压液相色谱-四极杆飞行时间质谱

**中图分类号:** R969.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2020)07-1307-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.07.004

## Distribution in brain tissue of components from ethanol extract of *Jugland mandshurica* Maxim

HUO Jin-hai, WANG Gai-li, LIU Zheng, WANG Wei-ming

Heilongjiang Academy of Chinese Medical Sciences, Harbin 150036, China

**Abstract: Objective** To research the components distribution in cerebrum tissue of ethanol extract of *Jugland mandshurica* Maxim based on UPLC-Q-TOF/MS technology. **Methods** After ig 20 mL/kg of alcohol extract from extract of *J. mandshurica* Maxim to rats, and the tissue samples of cerebrum collected from each rat. Using the UPLC-Q-TOF/MS to detect the substance, and the obtained data was processed by data analysis software. According to the accurate mass number and isotope abundance ratio of ion fragments, the secondary mass spectrometry comparison of the database and the analysis of cracking law, the chemical molecular formula of common ions was further confirmed. **Results** Eleven components were obtained, including 7 prototypic components and 4 metabolites, including 7 naphthoquinones, 2 diaryl heptanes, and 2 phenolic acids. **Conclusion** Naphthoquinones are the main components of extract of *J. mandshurica* Maxim in the brain of rats, which laid a foundation for the further study on the toxicity of the brain and the study on the distribution of components and tissues *in vivo*.

**Key words:** *Jugland mandshurica* Maxim; naphthoquinone; distribution of cerebrum tissue; UPLC-Q-TOF/MS

北青龙衣为胡桃科胡桃属植物核桃楸 *Juglans mandshurica* Maxim 的未成熟果实的外果皮<sup>[1]</sup>,民间多年来一直用于治疗恶性肿瘤,并被《黑龙江省中药材标准(2001年版)》收载<sup>[2]</sup>。近些年来,研究人员在北青龙衣抑制肿瘤活性方向开展了大量的工作<sup>[3-5]</sup>。作为抗肿瘤中药,北青龙衣毒性问题一直备受关注。研究表明,北青龙衣的水煎液是安全无

毒的,然而该药的乙醇提取物显示出较强的毒性反应,尤其是醋酸乙酯萃取部位具有十分强烈的毒性<sup>[6-8]</sup>,进一步研究发现该部位中主要成分为萘醌类成分,是抑制肿瘤细胞的重要成分,其中胡桃醌(5-羟基-1,4-萘醌)作为萘醌类成分的典型代表,具有较强的刺激性和对神经系统的抑制作用<sup>[9-11]</sup>。目前,四极杆-飞行时间串联质谱(Q-TOF)已经被广泛

收稿日期: 2020-05-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81503348); 黑龙江省自然科学基金资助项目(H2017044)

作者简介: 霍金海(1981-),男,黑龙江人,研究员,博士,从事中药质量评价及药效物质基础研究。E-mail: jinhaihuo@126.com

\*通信作者 王伟明,研究员,博士生导师,从事中药新产品研发。Tel: (0451)55665478 E-mail: zyyjy@163.com

的应用于对中药及其复方的体内外成分分析研究。本课题组前期采用该技术分析和表征了北青龙衣中 165 个成分的结构<sup>[12-13]</sup>, 并完成了北青龙衣中成分在大鼠肝、肾、胃、肺组织中的分布研究<sup>[14-17]</sup>。本实验利用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对北青龙衣乙醇提取物中成分在大鼠脑组织中的分布进行探究, 旨在揭示北青龙衣脑组织成分分布的特点, 为北青龙衣神经毒性的进一步研究提供物质基础, 也为全面认识北青龙衣成分体内组织分布提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

ExionLC™ 型 UPLC 超高效液相色谱仪, Q-TOF™ 5600+ 型 MS 高分辨质谱, PeakView 2.0、Analyst TF 1.7.1、Metabolitepilot1.5、masterview1.0 软件 (美国 SCIEX 公司); 海尔 DW-86L959 型冰箱 (青岛海尔); BP211D 型电子分析天平 (德国赛多利斯集团); Legend Micro 17R 型离心机 (美国赛默飞世尔公司); CM-12J 型氮吹仪 (北京成萌伟业科技有限公司)。

### 1.2 试剂与试剂

北青龙衣鲜药材在 2016 年 6 月采集于哈尔滨市方正县 (东经 128°92'62.1", 北纬 45°62'82.8"), 经黑龙江省中医药科学院王伟明研究员鉴定为胡桃科胡桃属植物核桃楸 *Juglans mandshurica* Maxim 的果实。取果实的外果皮, 置于通风处阴干。

色谱级甲酸, 赛默飞世尔公司; 甲醇、乙腈均为色谱级, 默克公司; 广州屈臣氏蒸馏水。

### 1.3 实验动物

SPF 级的雄性 Wistar 大鼠, 体质量 270~300 g, 动物许可证号 SCXK (京) 2016-0011, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司; 将 SPF 级动物房的环境控制在室温 (23±2) °C、湿度控制在 60%±10%。

## 2 方法与结果

### 2.1 样品溶液的制备

**2.1.1 乙醇提取物的制备** 取北青龙衣药材 350 g, 加入 8 倍量 75% 乙醇超声提取 2 次, 1 h/次, 减压回收, 得乙醇提取物 56 g (每克提取物相当于生药 6.25 g)。

**2.1.2 药液的制备** 依据 2012 年版《黑龙江省中药饮片炮制规范及标准》, 北青龙衣的每日服用剂量 30 g<sup>[2]</sup>。根据临床常用的等效剂量规则进行换算, 按照人每日剂量的 10 倍, 乙醇提取物加水稀释配

制为含生药 1.25 g/mL, 并将药液储存于 4 °C 冰箱备用。

### 2.2 组织样品制备

按照随机分组方式将 Wistar 大鼠分为对照组、给药组, 每组各 6 只, 禁食 12 h 但不限制饮水, 并对大鼠称定质量、标记。两组大鼠按体质量 20 mL/kg 分别 ig 蒸馏水和药液。给药 0.5 h 后, 使用 10% 水合氯醛对大鼠进行麻醉处理, 采集脑组织。

每只大鼠取 0.2 g 脑组织于 EP 管中, 加入 1 mL 蒸馏水低温匀浆处理, 加入 4 mL 醋酸乙酯混匀, 涡旋处理 60 s, 再超声处理 120 s; 低温静置 10 min 后精密吸取上层清液 2 mL 置于 EP 管中, 4 °C 低温、13 000 r/min 高速离心环境下处理 10 min, 再精密吸取 1 200 μL 上层清液置于 EP 管中, 氮气吹干, 沉淀用 80% 甲醇 0.25 mL 进行复溶, 涡旋处理 60 s 后, 于 4 °C 低温、13 000 r/min 离心 10 min, 精密吸取上层清液, 供 LC-MS 分析。

### 2.3 色谱条件

Waters BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), Waters BEH C<sub>18</sub> 保护柱 (5 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相: 0.1% 甲酸水 (A) - 0.1% 甲酸乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~5 min, 5%~45% B; 5~15 min, 45%~80% B; 15~20 min, 80%~100% B; 20~23 min, 100% B; 23~23.1 min, 100%~5% B; 23.1~25 min, 5%~5% B), 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 35 °C, 进样量为 10 μL。

### 2.4 质谱条件

使用 ESI 离子源, 正、负离子扫描方式, 选择氮气作为雾化气。正负离子源电压分别为 5 500 V/-4 500 V, 离子源温度为 550 °C, 裂解电压 (DP) 分别为 80 V/-80 V, 碰撞能量 (CE) 分别为 35 eV/-35 eV, 碰撞能量扩展 (CES) 分别为 15 eV/-15 eV。雾化气体为氮气, 辅助气 Gas1 为 55 PSI, 辅助气 Gas2 为 55 PSI, 气帘气 CurGas 为 35 PSI。MS 扫描一级谱的区间设置在 100~1 500, 扫描碎片离子的区间设置在 50~1 500, IDA 设置响应值超过 100 cps 的 8 个最高峰进行二级质谱扫描, 设置扣除背景 (DBS)。使用 Analyst TF 1.7.1 进行数据的采集。

### 2.5 数据分析方法

**2.5.1 原型成分** 使用 Peakview2.0 中嵌合的 Masterview 功能, 将两组大鼠采集得到的 LC-MS 数据导入。设置 Mass Error (质量数偏差) < 5; 权重 30%, Isotope (同位素分布) 差异 < 10%; 权

重 40%，Formula Finderscore (分子式查找) >70%；权重 40%，设置以 3 倍 sample/control 为限，排除掉对数据干扰的空白大鼠脑组织中固有的物质成分对给药组数据的影响，得到原药物体外成分的保留时间 ( $t_R$ )、相对丰度 ( $R$ )、母离子的精确质量数比较，并且将它们之间的二级图谱比较分析，将比较分析之间一致的化合物定性为原型成分。

**2.5.2 代谢产物的分析** 将前期实验得到的北青龙衣药材的成分数据库导入 MetabolitePilot1.5 内，首先通过对数据库的建立，导入物质的分子式，并且将二级谱图共同导入其中；并且对不同的化合物之间设定各自的代谢转化参数，依据不同的化合物代谢途径分析选择可能相关的 I 和 II 代谢途径，设置峰值选择方式 Peak Finding Strategy、通用参数 Generic Parameters 和复合特性参数 Compound-Specific Parameters；将两组数据导入并进行“样本”和“模型”分组，查找相关文章并且根据基于软件分析的  $t_R$ 、二级碎片等分析推断得到代谢产物。

**2.6 UPLC-Q-TOF/MS 的采集**

建立的分析方法，采集正、负离子模式 TIC 图，结果见图 1。

**2.7 脑组织成分分布**

将得到的数据进行处理，鉴别、推测了 7 个原型成分和 4 个代谢产物的 11 个化合物，其中 7 个萘醌，2 个二芳基庚烷，2 个酚酸。北青龙衣乙醇提取物在大鼠脑组织中主要成分为萘醌类，最典型的裂解规律为连续失去  $H_2O$ 、 $CO$ 。以胡桃醌为例，丰度较高的准分子离子  $175 [M+H]^+$  易于丢失  $CO$

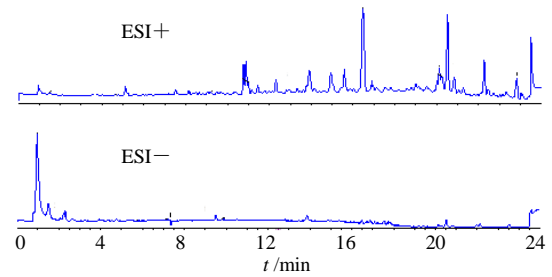


图 1 正、负离子模式下的总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion current chromatogram in positive and negative ion mode

形成丰度最高的  $147 [M+H-CO]^+$  碎片离子，并且还发现  $133 [M+H-CO-CH_2]^+$ 、 $121 [M+H-CO-C_2H_2]^+$  两个丰度较小的碎片离子是在高能碰撞下形成的；丰度较小的  $157 [M+H-H_2O]^+$  离子也是由准分子离子  $175 [M+H]^+$  失去了一个  $H_2O$  形成的，并且接连失去  $CO$  产生  $129 [M+H-H_2O-CO]^+$ 、 $101 [M+H-H_2O-2CO]^+$  两个碎片离子。此裂解途径与胡桃醌对照品二级碎片基本吻合，因此鉴定为胡桃醌，裂解可能途径见图 2。结果见表 3。

**3 讨论**

实验前期考察了相当于临床剂量的 1、5、10 倍给药剂量，发现 10 倍的给药剂量脑组织成分最多且峰强度最大，能更好地检测出北青龙衣脑组织的成分种类和数目，因此将 10 倍量确定为最佳的给药剂量。其次将时间点设置为 0.5、1、2、3、4 h，在此时间点采集大鼠灌胃给药后的脑组织，对不同时间点脑组织检测离子数目、共有离子峰面积对比分析，确定给药后 0.5 h 为最优的采集时间点。考

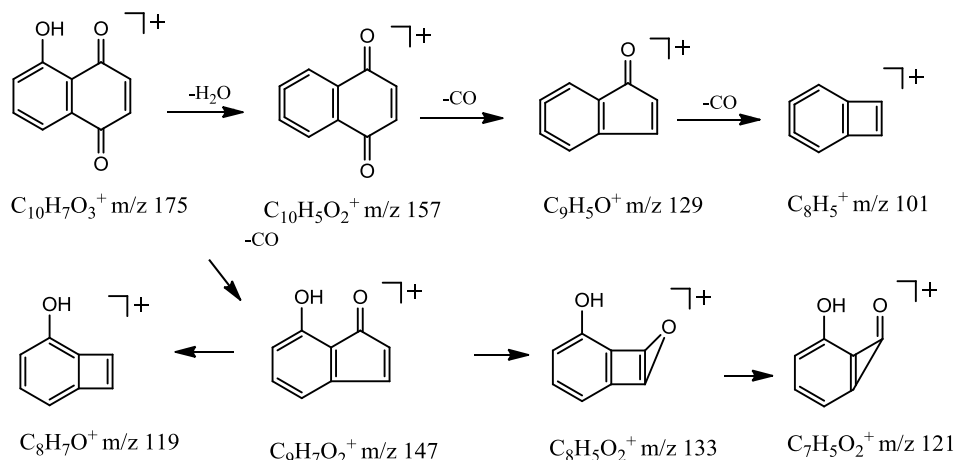


图 2 胡桃醌结构解析图

Fig. 2 Chemical structure and fragmentation pathway for juglone

表 3 北青龙衣在大鼠脑组织中化合物的结构信息

Table 3 Distribution of liver tissue composition results

$t_R/min$	选择离子	测定值	分子式	主要二级碎片离子(MS/MS)及来源	鉴定结果	来源
7.9	M+H	175.038 1	$C_{10}H_6O_3$	175[M+H] <sup>+</sup> ,157[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,147[M+H-CO] <sup>+</sup> ,129[M+H-CO-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,121[M+H-C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,119[M+H-2CO] <sup>+</sup> ,101[M+H-H <sub>2</sub> O-2CO] <sup>+</sup>	胡桃醌	原型
9.9	M+H	343.154 3	$C_{20}H_{22}O_5$	343[M+H] <sup>+</sup> ,325[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,245[M+H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O] <sup>+</sup> ,163[M+H-C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ,147[M+H-C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	1-(4-羟基苯基)-7-(2"-羟基-3"-甲氧基苯基)-3,4"-环氧-3-庚酮	原型
2.4	M+H	166.085 6	$C_9H_{11}NO_2$	166[M+H] <sup>+</sup> ,149[M+H-NH <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ,120[M+H-CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ,103[M+H-CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	苯丙氨酸	原型
6.4	M-H	177.055 9	$C_{10}H_{10}O_3$	177[M-H] <sup>-</sup> ,159[M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,131[M-H-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>-</sup> ,115[M-H-H <sub>2</sub> O-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	4,5-二羟基- $\alpha$ -四氢萘醌	原型
5.1	M+H	179.069 6	$C_{10}H_{10}O_3$	179[M+H] <sup>+</sup> ,161[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,143[M+H-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,133[M+H-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup> ,115[M+H-2H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup> ,105[M+H-H <sub>2</sub> O-2CO] <sup>+</sup>	核桃酮	原型
4.4	M+H	195.064 6	$C_{10}H_{10}O_4$	195[M+H] <sup>+</sup> ,177[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,159[M+H-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,149[M+H-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup> ,131[M+H-2H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup> ,107[M+H-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ,103[M+H-2H <sub>2</sub> O-2CO] <sup>+</sup>	2,5-二羟基-1,4-萘醌双加氢产物	代谢物
3.7	M-H	193.050 9	$C_{10}H_{10}O_4$	193[M-H] <sup>-</sup> ,175[M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,157[M-H-2H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,129[M-H-2H <sub>2</sub> O-CO] <sup>-</sup>	4,5,8-三羟基- $\alpha$ -四氢萘醌	原型
4.1	M+H	161.059 0	$C_{10}H_8O_2$	161[M+H] <sup>+</sup> ,143[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,133[M+H-CO] <sup>+</sup> ,115[M+H-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup> ,105[M+H-2CO] <sup>+</sup> ,103[M+H-CO-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	1,5-萘二酚	原型
10.2	M+H	343.154 3	$C_{20}H_{22}O_5$	343[M+H] <sup>+</sup> ,325[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,245[M+H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O] <sup>+</sup> ,189[M+H-C <sub>8</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ,163[M+H-C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ,147[M+H-C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ,137[M+H-C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	胡桃宁 A 去甲基化产物	代谢物
4.4	M-H	273.009 2	$C_{10}H_{10}O_7S$	273[M-H] <sup>-</sup> ,193[M-H-SO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> ,175[M-H-SO <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,157[M-H-SO <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O-CO] <sup>-</sup>	核桃酮氧化硫酸化产物	代谢物
4.8	M-H	193.051 2	$C_{10}H_{10}O_4$	193[M-H] <sup>-</sup> ,145[M-H-CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> ,131[M-H-CO <sub>2</sub> -O] <sup>-</sup> ,129[M-H-CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -O] <sup>-</sup>	对羟基肉桂酸氧化甲基化产物	代谢物

察了 4 倍量甲醇、乙腈、甲醇 - 乙腈 (1 : 1)、醋酸乙酯对脑组织蛋白处理效果,结果醋酸乙酯法能较好地去除杂质,检测到的成分多,峰强度较高,确定醋酸乙酯法为样品脑组织预处理方法。

本研究结果表明,大鼠灌胃北青龙衣乙醇提取物后在脑组织中共鉴别出 11 种成分,包括 7 个原型成分和 4 个代谢产物,其中 7 个萘醌,2 个二芳基庚烷,2 个酚酸。可见脑组织中的成分主要以萘醌类为主,为北青龙衣神经毒性的进一步研究奠定物质基础。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1975: 1152.
- [2] 黑龙江省药品监督管理局. 黑龙江省中药材标准 (2001 年版) [M]. 哈尔滨: 黑龙江省科学技术出版社, 2001: 69-70.
- [3] 俞文婕, 添敏, 翟延君. 胡桃楸抗肿瘤作用及其机制研究概况 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 329-332.
- [4] Ji C F, Yue L, Ji Y B. Effect of qinglongyi polysaccharides on complex mobility of erythrocytes in S180 mice [J].

- Chin Herb Med*, 2013, 5(1): 58-61.
- [5] 孟繁钦, 雷涛, 才玉婷, 等. 核桃楸皮水提物的急性毒理研究 [J]. 中国医药导报, 2010, 7(16): 56-68.
- [6] 雷涛, 梁启超, 林峰, 等. 核桃楸皮甲醇提取物的急性毒理研究 [J]. 中国医药导报, 2012, 9(2): 113-117.
- [7] 刘薇, 林文翰, 季宇彬. 青龙衣毒性作用及体外抗肿瘤作用的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(9): 887-890.
- [8] 许绍惠, 唐婉屏, 韩忠环. 核桃楸毒性成分研究 [J]. 沈阳农业大学学报, 1986, 17(2): 34-39.
- [9] Westfall B A, Russell R L, Auyong T K. Depressant agent from Walnut Hulls [J]. *Science*, 1961, 3490: 1617.
- [10] Auyong T K, Westfall B A, Russell R L. Pharmacological aspects of juglone [J]. *Toxicon*, 1963, 1(4): 235-239.
- [11] 霍金海, 都晓伟, 孙国东, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 分析北青龙衣成分 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3379-3388.
- [12] Huo J H, Du X W, Sun G D, et al. Identification and characterization of major constituents in *Juglans mandshurica* using ultra performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry (UPLC-ESI-Q-TOF/MS) [J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16(7): 525-545.
- [13] 王改丽, 程团, 霍金海, 等. 北青龙衣醇提物在大鼠肝组织中的成分分布研究 [J]. 中南药学, 2018, 16(4): 451-458.
- [14] 王改丽, 程团, 霍金海, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的北青龙衣大鼠肾组织化学成分分析 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3763-3769.
- [15] 程团, 王改丽, 霍金海, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的北青龙衣肺组织成分分布研究 [J]. 中国中医药科技, 2018, 25(2): 216-221.
- [16] 程团, 王改丽, 霍金海, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的北青龙衣成分在大鼠胃组织中的分布研究 [J]. 中草药, 2018, 49(11): 2527-2539.