

UPLC-Q-TOF-MS 法分析大鼠口服芩百清肺浓缩丸后肺组织中的化学成分

魏文峰, 刘 烨, 霍金海, 王伟明*

黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150036

摘要:目的 定性分析大鼠口服芩百清肺浓缩丸后肺组织中的化学成分。方法 ig 给予大鼠芩百清肺浓缩丸, 采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术, 对比供试品、空白组织及给药后肺组织中的化学成分, 结合 Peakview 和 Metabolite Pilot 软件, 根据所提供的保留时间、精确相对分子质量及二级质谱裂解碎片鉴定和表征其肺组织中化学成分。结果 在给药后的大鼠肺组织中分析表征了 25 个化学成分, 其中 17 个原型成分, 8 个代谢产物。结论 借助 UPLC-Q-TOF-MS 方法鉴定了大鼠口服芩百清肺浓缩丸后肺组织中的化学成分, 有助于阐明该方发挥治疗支原体肺炎作用的潜在效应物质基础。

关键词: 芩百清肺浓缩丸; UPLC-Q-TOF-MS; 肺组织; 代谢产物; 支原体肺炎

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)05-1115-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.05.020

Analysis on chemical components in rat lung tissue after oral administration of Qinbai Qingfei Concentrated Pellets based on UPLC-Q-TOF-MS

WEI Wen-feng, LIU Ye, HUO Jin-hai, WANG Wei-ming

Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036, China

Abstract: **Objective** To qualitative analyze the chemical components in rat lung tissues after oral administration Qinbai Qingfei Concentrated Pellets (QQCP). **Methods** The rat lung tissues were collected and analyzed by UPLC-Q-TOF-MS after ig administration of QQCP. The chemical components in control and dose groups were identified and speculated by Peakview and Metabolite Pilot data processing software using retention time, exact relative molecular mass, and cleavage fragments of MS/MS as indexes. **Results** A total of 25 compounds were identified, including 17 prototypes and eight metabolites. **Conclusion** The chemical constituents in the rat lung tissues were identified after oral administration of QQCP based on UPLC-Q-TOF-MS, which will contribute to elucidate the effects of potential pharmacodynamic material basis of QQCP on mycoplasma pneumoniae.

Key words: Qinbai Qingfei Concentrated Pellets; UPLC-Q-TOF-MS; lung tissue; metabolites; mycoplasma pneumonia

芩百清肺浓缩丸(QQCP), 是国家食品药品监督管理局批准的第1个用于临床观察治疗小儿支原体肺炎的中药制剂, 其中黄芩为君药, 百部为臣药, 佐以桔梗、地龙、麦冬、紫苑, 共6味药组方而成, 具有清肺之热毒、苦寒降肺之逆气、保肺之阴津、苦润复金之清肃, 共奏清热解毒、润肺止咳之功效。本课题组前期研究表明, QQCP 具有良好的抗支原体作用^[1-2], 并能明显减轻肺炎支原体感染大鼠肺部炎症, 修复受损肺上皮细胞^[3-4], 但其药效物质基础尚不明确。QQCP 中进入肺组织的化学成分可能是其发挥治疗支原体肺炎作用的效应物质基础。液质联用

技术是近年发展起来的重要的分离和分析方法, 已广泛地应用于药物分析与药效物质基础研究^[5-7]。本实验利用超高压液相色谱-飞行时间质谱联用(UPLC-Q-TOF-MS)技术分析大鼠口服 QQCP 后肺组织中的化学成分, 结合前期研究中 QQCP 的入血成分^[8], 尽可能全面地反映其在体内的药效物质基础。

1 材料

1.1 仪器

Waters ACQUITY™ UPLC 液相色谱仪、Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm,

收稿日期: 2017-09-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81374045); 黑龙江省应用技术与开发计划(PB15F005); 哈尔滨市青年科技创新人才基金项目(2016RAQYJ198)

作者简介: 魏文峰(1984—), 助理研究员, 研究方向为中药化学成分分析及药物代谢研究。Tel: (0451)55653086-6902 E-mail: wenfeng0831@163.com

*通信作者 王伟明(1966—), 研究员, 博士学位, 主要从事中药新药研发工作。Tel: (0451)55665478 E-mail: zyyjy@163.com

1.7 μm) 购于美国 Waters 公司; AB Sciex 5600+型质谱仪(美国 Sciex 公司)。

1.2 药品与试剂

QQCP(哈尔滨天合力制药有限公司, 批号 150901), 为棕褐色的薄膜包衣浓缩水丸, 经检查符合《中国药典》2015 年版丸剂下的各项规定。

甲醇和乙腈(色谱级, Merck 公司); 甲酸(色谱级, Fisher 公司); 蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司); 对照品金刚大碱(实验室自制, 质量分数为 94%); 对照品次黄嘌呤(批号 140661-200903, 质量分数为 99.1%) 购于中国食品药品检定研究院。

1.3 实验动物

健康 SD 雄性大鼠, 体质量(300 ± 20) g, 清洁级, 许可证号 SCXK(京)2012-0001, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。饲养于黑龙江中医药科学院动物实验中心, 环境温度(20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度(50 ± 20) %。

2 方法

2.1 供试品溶液制备

取 QQCP 粉末 1 g(过 40 目筛), 精密称定, 加入 75%甲醇 30 mL, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷至室温, 补足减失质量, 摇匀, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 即得。

2.2 QQCP ig 药液的制备

取 QQCP 粉末, 用 75%甲醇溶液进行超声提取, 以 30 倍量的溶剂提取 30 min, 将提取液减压浓缩, 得浸膏, 加适量蒸馏水配制成质量浓度为 1.15 g/mL 的大鼠 ig 药液, 即得。

2.3 体内实验样品的制备

取 SD 大鼠 20 只, 随机分成对照组和给药组, 禁食 12 h(自由饮水), 给药组按照 23.085 g/kg(相当于人体临床每日 10 倍剂量) ig 给予 QQCP ig 药液, 对照组按照 20 mL/kg ig 给予蒸馏水。给药 1 h 后, ip 10%水合氯醛麻醉, 取肺组织用生理盐水洗净, 滤纸吸干后 -80°C 冻存备用。

肺组织室温解冻, 精密称取 100 mg, 加 1 mL 水, 匀浆 3 min, 加入 10 μL 磷酸涡旋 1 min 后, 加入 4 mL 乙腈涡旋 2 min, 超声 2 min, 静置 10 min 后取上清液, 4°C 、13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 室温下氮气吹干, 加 200 μL 甲醇复溶, 4°C 、13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进样 3 μL , 供 UPLC-Q-TOF/MS 分析。

2.4 质谱与色谱条件

2.4.1 质谱条件 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 5 500 V/ -4 500 V, 离子源温度为 550°C , 雾化气体为 N_2 , 雾化气压力为 379.2 kPa, 辅助气压力为 379.2 kPa, 气帘气压力为 241.3 kPa, 裂解电压分别为 80 V/ -80 V, 碰撞能量分别为 35 eV/ -35 eV, 碰撞能量扩展均为 15 eV。TOF MS 扫描范围为 100~1 500 Da, IDA 设置响应值超过 100 cps 的 8 个最高峰进行二级质谱扫描, Product Ion 扫描范围为 50~1 500 Da, 开启动态背景扣除(DBS)。数据采集所用软件为 Analyst TF 1.6 software, 数据处理软件为 Peakview 2.0/masterview 1.0。

2.4.2 色谱条件 Waters ACQUITYTM UPLC 液相色谱仪; ACQUITYTM BEH C_{18} 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); ACQUITYTM UPLC BEH C_{18} 保护柱(5 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 柱温 35°C ; 流动相为 0.1%甲酸水(A)-0.1%甲酸乙腈(B); 梯度洗脱, 洗脱程序 0~4 min, 95%~73% A; 4~5 min, 73% A; 5~10 min, 73%~50% A; 10~13 min, 50%~30% A; 13~14 min, 30% A; 14~20 min, 30%~0% A。体积流量 0.3 mL/min; 样品仓温度 4°C ; 进样量 3 μL ; 分析时间 20 min; 色谱仪流出液不分流直接进行正、负离子扫描检测。

2.5 数据分析方法

2.5.1 原型成分分析方法 利用 PeakView 软件, 将已筛选出的最适采血时间点的含药肺组织色谱图输入, 通过对比给药组和对照组大鼠肺组织的质谱图, 扣除内源性成分, 筛选出给药组中含有而对照组中不含有的成分, 并结合供试品中离子峰的保留时间、质荷比及二级质谱图进行比对, 指认 QQCP 中的原型成分。

利用 MarkerView 软件对给药组和对照组大鼠肺组织中的成分进行统计学分析, 用软件自带的主成分分析(PCA)软件包进行分析, 结合 t 检验筛选在 2 组中有显著性差异($P < 0.05$)的离子。在 t 检验得到的火山图及其 Fold 图中设定 $P < 0.05$ 且 Fold Change > 1.5 倍, 筛选出对分型贡献较大且具有显著性差异的离子, 并得到相关离子的质荷比和保留时间, 结合 PeakView 得到精确质量数和保留时间相同的原型成分, 得到的结果为在对照组和给药组大鼠肺组织中同时含有但含量有明显差异的成分, 可认为是从药物中吸收的成分。

2.5.2 代谢产物分析方法 利用 MetabolitePilot 数

据处理软件, 建立 QQCP 的 Compound library, 将对照组及给药组大鼠肺组织中成分的数据导入, 设置 Biotransformation parameters, 选择 I 和 II 相代谢途径, 根据软件数据结果和参考文献资料推测其代谢产物。

3 结果

3.1 UPLC-Q-TOF-MS 色谱图的采集

根据建立的 QQCP 入肺成分分析方法, 在正、负离子模式下采集 QQCP 供试品、对照组和给药组大鼠肺组织的色谱图, 见图 1。

3.2 大鼠肺组织主成分分析 (PCA) 结果

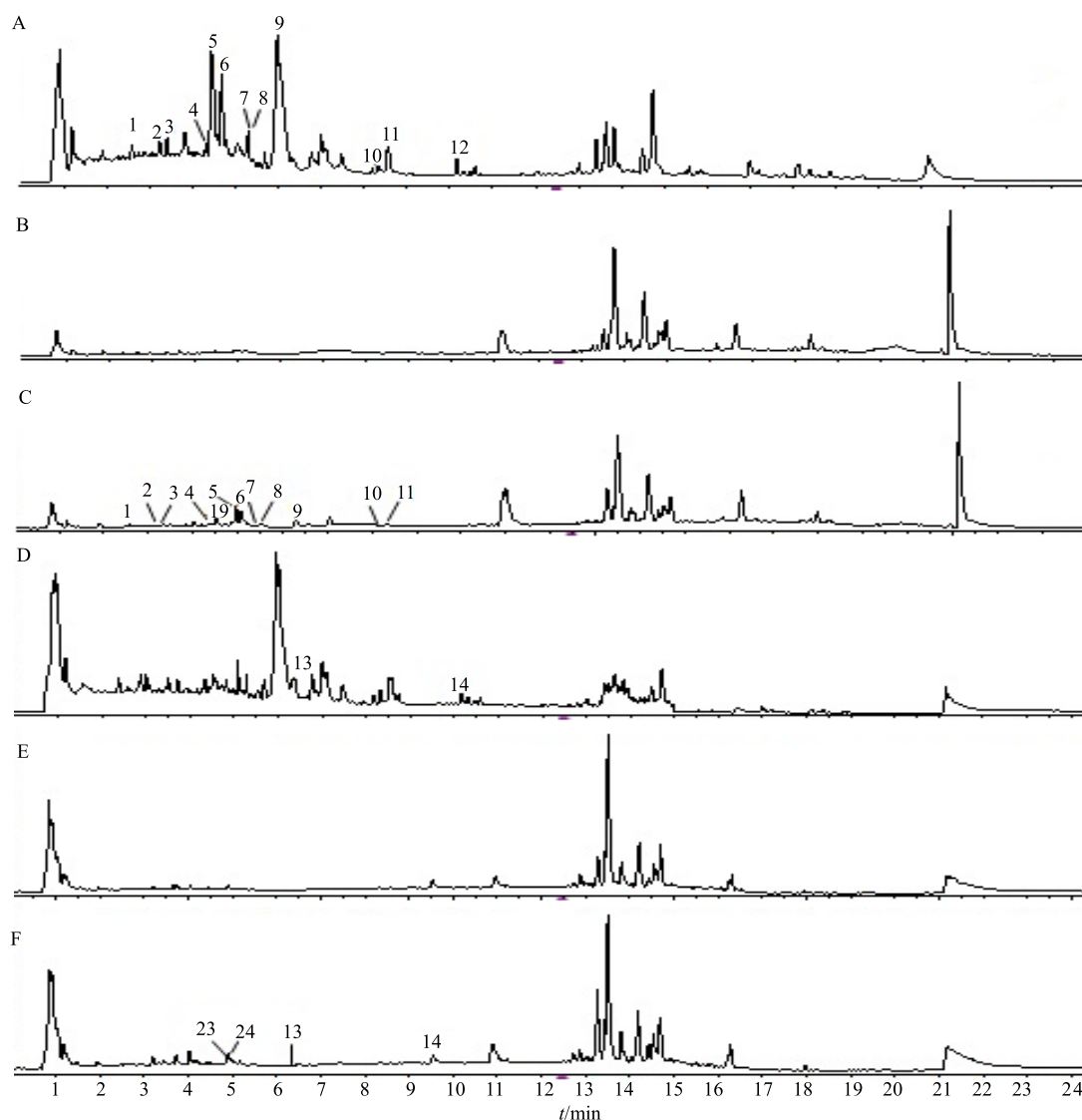
利用 MarkerView 软件对大鼠肺组织中的成分

进行 PCA 分析, 正、负离子模式下的 Score 图见图 2。从样品的得分图可以看出对照组和给药组中 (每组 10 个样品) 的成分在正、负离子模式下都能够明显地区分开。

结合 MarkerView 软件中 t 检验包筛选在 2 组中有显著性差异 ($P < 0.05$) 的离子, 经 t 检验得到的火山图结合 Fold change (差异倍数) 图见图 3。图中红色选中部分为 $P < 0.05$ 且给药组中 Fold Change > 1.5 倍的离子, 利用 “2.5” 项下方法对差异离子进行解析。

3.3 QQCP 入肺成分鉴定

本课题组前期已经应用 UPLC-Q-TOF-MS 技术



A、D-QQCP 供试品 B、E-对照组大鼠肺组织 C、F-给药后大鼠肺组织
A, D-QQCP standard solution B, E-lung tissue of control group C, F-lung tissue of dose group

图 1 正离子 (A~C) 和负离子 (D~E) 模式下的总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatogram in positive (A—C) and negative (D—E) ion mode

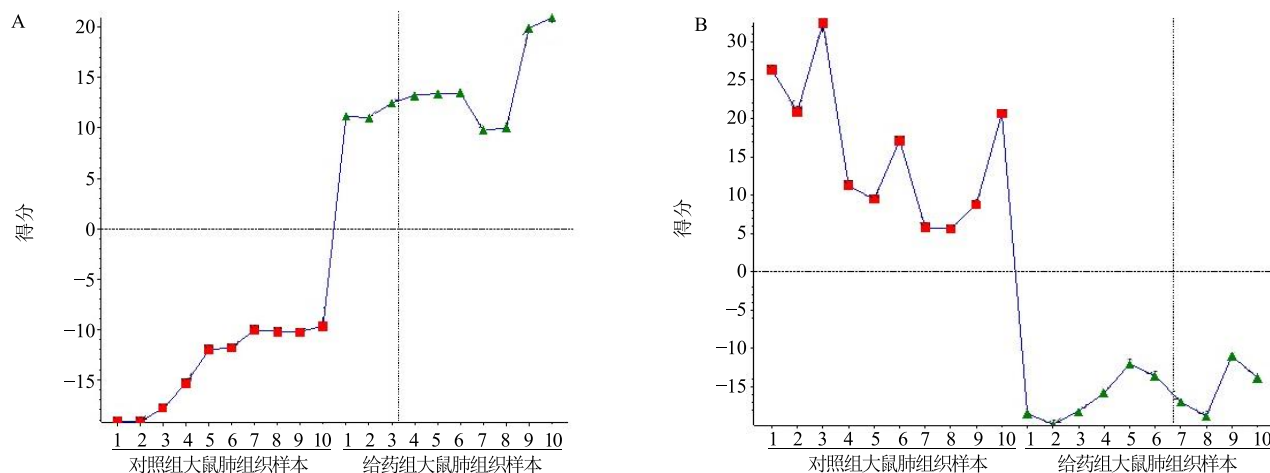
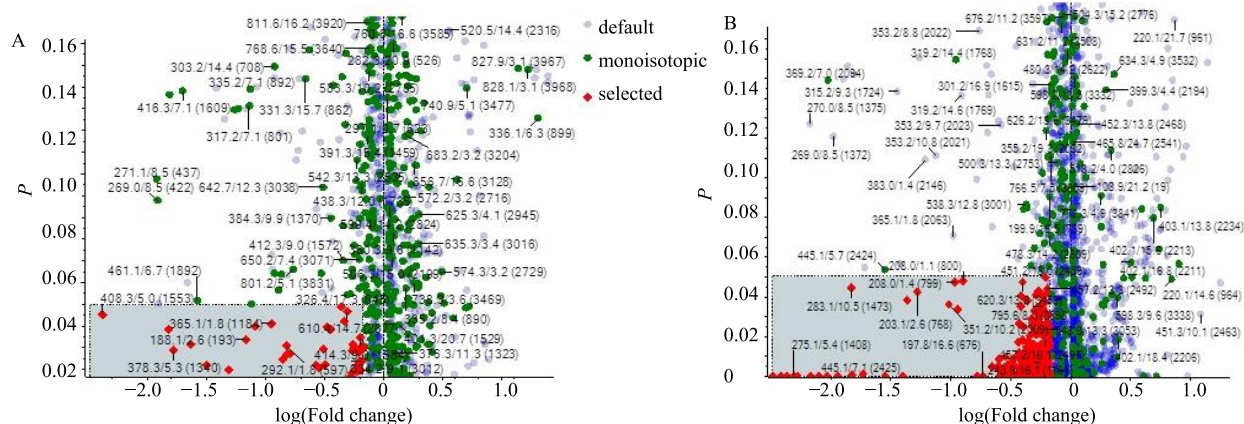


图 2 对照组和给药组大鼠肺组织正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) PCA 得分图

Fig. 2 PCA score plots in positive (A) and negative (B) ion mode of control group and QQCP group in lung tissues

图 3 正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 下 *t*-检验分析结果Fig. 3 Analysis results of *t*-test in positive (A) and negative (B) ion mode

对 QQCP 的化学成分进行了分析, 初步推断了 78 个化合物^[9]。在此基础上根据“2.3”项下的分析方法, 结合对照品比对及以往文献报道^[10-16], 在大鼠肺组织中鉴定了 ig QQCP 后的 25 个成分, 其中 17 个为原型成分, 8 个为代谢产物, 并对其来源进行了归属, 结果见表 1。

3.4 主要色谱峰的质谱分析

3.4.1 原型成分的鉴定 本研究共鉴定和表征了 18 个原型成分, 分别以化合物 **3** 和 **15** 为例说明推测过程。

化合物 **3**: t_R 为 3.36 min, 正离子模式下给出准分子离子 m/z 322 $[M+H]^+$, 在 TOF-MS/MS 中产生碎片离子 m/z 248、230、174 等, 在给药组总离子流中保留时间、质谱行为与 QQCP 供试品总离子流图中金刚大碱的保留时间基本一致, 二级质谱碎片

一致^[9], 并与标准品碎片信息进行比对, 碎片离子吻合, 故鉴定化合物 **3** 为金刚大碱, 二级质谱镜像见图 4, 可能的裂解途径见图 5。

化合物 **15**: t_R 为 1.25 min, 正离子模式下给出准分子离子 m/z 137 $[M+H]^+$, 二级碎片离子 m/z 119、110 分别为失去 1 个 H_2O 和 HCN , 其保留时间、质谱行为与 QQCP 供试品总离子流图中次黄嘌呤的保留时间、二级质谱碎片一致^[9], 并与对照品碎片信息进行比对, 碎片离子吻合, 故鉴定化合物 **15** 为次黄嘌呤, 二级质谱镜像图见图 6, 可能的裂解途径见图 7。

3.4.2 代谢产物的鉴定 根据“2.5”项下的分析方法, 结合 MetabolitePilot 代谢物数据处理软件给出的代谢物最优化峰匹配, 最终推测 8 个代谢产物, 以黄芩苷羟基化产物和绿原酸甲基化产物为例说明

表 1 大鼠 ig 芩百肺组织中化学成分分析结果

Table 1 Analysis of chemical constituents in rat lung tissue after ig QQCP

序号	t_R /min	化合物	来源	离子模式	相对分子质量	误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	碎片离子 (m/z)	成分类型
1	2.63	tuberospironine	BB	+	338.196 2	0.4	$C_{18}H_{27}NO_5$	338 [M+H] ⁺ , 320 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 264 [M+H-C ₃ H ₆ O ₂] ⁺ , 246 [M+H-H ₂ O-C ₃ H ₆ O ₂] ⁺	原型
2	3.11	tuberostemonol	BB	+	390.227 2	3.3	$C_{22}H_{31}NO_5$	390 [M+H] ⁺ , 372 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 316 [M+H-C ₃ H ₆ O ₂] ⁺ , 272 [M+H-H ₂ O-C ₃ H ₈ O ₂] ⁺	原型
3	3.36	金刚大碱	BB	+	322.201 3	1.3	$C_{18}H_{27}NO_4$	322 [M+H] ⁺ , 248 [M+H-C ₃ H ₆ O ₂] ⁺ , 230 [M+H-C ₃ H ₆ O ₂ -H ₂ O] ⁺ , 174 [M+H-C ₃ H ₆ O ₂ -C ₃ H ₆ O ₂] ⁺	原型
4	4.11	百部次碱	BB	+	278.211 5	1.4	$C_{17}H_{27}NO_2$	278 [M+H] ⁺ , 250 [M+H-C ₂ H ₄] ⁺ , 204 [M+H-C ₃ H ₆ O ₂] ⁺ , 136 [M+H-C ₈ H ₁₄ O ₂] ⁺	原型
5	4.21	sessilifoliamide B	BB	+	294.206 4	1.1	$C_{17}H_{27}NO_3$	294 [M+H] ⁺ , 276 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 248 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ , 220 [M+H-C ₃ H ₆ O ₂] ⁺	原型
6	4.55	tuberostemoninol B	BB	+	406.222 4	0.4	$C_{22}H_{31}NO_6$	406 [M+H] ⁺ , 388 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 332 [M+H-C ₃ H ₆ O ₂] ⁺ , 306 [M+H-C ₃ H ₈ O ₂] ⁺	原型
7	5.52	astin F	ZW	+	536.226 8	0.9	$C_{25}H_{34}O_6N_5Cl$	536 [M+H] ⁺ , 518 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 451 [M+H-C ₄ H ₇ NO] ⁺ , 304 [M+H-C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂] ⁺ , 217 [M+H-C ₁₆ H ₂₁ N ₃ O ₄] ⁺	原型
8	5.56	sessillistemonamine A	BB	+	392.243 1	0.1	$C_{22}H_{33}NO_5$	392 [M+H] ⁺ , 374 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 336 [M+H-H ₂ O-C ₂ H ₄] ⁺ , 300 [M+H-H ₂ O-C ₃ H ₆ O ₂] ⁺ , 262 [M+H-H ₂ O-C ₂ H ₄ -C ₃ H ₆ O ₂] ⁺	原型
9	5.68	黄芩苷	HQ	+	447.092 7	1.2	$C_{21}H_{18}O_{11}$	447 [M+H] ⁺ , 271 [M+H-C ₆ H ₈ O ₆] ⁺ , 253 [M+H-C ₆ H ₈ O ₆ -H ₂ O] ⁺ , 169 [M+H-C ₆ H ₈ O ₆ -C ₈ H ₆] ⁺	原型
10	8.16	黄芩素	HQ	+	271.060 1	0	$C_{15}H_{10}O_5$	271 [M+H] ⁺ , 253 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 169 [M+H-C ₈ H ₆] ⁺ , 123 [M+H-C ₉ H ₈ O ₂] ⁺	原型
11	8.59	tuberostemoninol	BB	+	406.222 4	1.7	$C_{22}H_{31}NO_6$	406 [M+H] ⁺ , 388 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 332 [M+H-C ₃ H ₆ O ₂] ⁺ , 306 [M+H-C ₃ H ₈ O ₂] ⁺	原型
12	10.00	木蝴蝶素 A	HQ	+	285.075 8	0.7	$C_{16}H_{12}O_5$	285 [M+H] ⁺ , 270 [M+H-CH ₃] ⁺ , 242 [M+H-CH ₃ -CO] ⁺ , 168 [M+H-CH ₃ -C ₈ H ₆] ⁺	原型
13	6.48	shionoside A	ZW	-	447.223 3	1.2	$C_{21}H_{36}O_{10}$	447 [M-H] ⁻ , 315 [M-H-C ₃ H ₈ O ₄] ⁻ , 271 [M-H-C ₇ H ₁₂ O ₅] ⁻ , 161 [M-H-C ₁₅ H ₂₆ O ₅] ⁻	原型
14	9.63	汉黄芩素	HQ	-	283.061 2	2.5	$C_{16}H_{12}O_5$	283 [M-H] ⁻ , 268 [M-H-CH ₃] ⁻ , 163 [M-H-C ₈ H ₈ O] ⁻	原型
15	1.25	次黄嘌呤	DL	+	137.045 8	1.0	$C_5H_4N_4O$	137 [M+H] ⁺ , 119 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 110 [M+H-CHN] ⁺	差异原型
16	1.28	肌苷	DL	+	269.088 3	1.1	$C_{10}H_{12}N_4O_5$	269 [M+H] ⁺ , 137 [M-C ₅ H ₇ O ₄] ⁺	差异原型
17	2.78	色氨酸	DL	+	205.097 1	-0.4	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	205 [M+H] ⁺ , 188 [M+H-NH ₃] ⁺ , 170 [M+H-NH ₃ -OH] ⁺ , 159 [M-COOH] ⁺ , 142 [M+H-COOH-NH ₃] ⁺ , 132 [M-C ₂ H ₂ NO ₂] ⁺ , 130 [M-C ₂ H ₄ NO ₂] ⁺ , 118 [M-C ₃ H ₄ NO ₂] ⁺	差异原型
18	4.72	黄芩苷羟基化产物	HQ	+	463.108 34	1.5	$C_{21}H_{18}O_{12}$	463 [M+H] ⁺ , 287 [M+H-C ₆ H ₈ O ₆] ⁺ , 270 [M+H-C ₆ H ₈ O ₆ -O] ⁺ , 169 [M+H-C ₆ H ₈ O ₆ -O-C ₈ H ₆] ⁺	代谢物
19	5.65	白杨素氧化葡萄糖醛酸化产物	HQ	+	447.093 5	3.0	$C_{21}H_{18}O_{11}$	447 [M+H] ⁺ , 431 [M+H-O] ⁺ , 271 [M+H-C ₆ H ₈ O ₆] ⁺ , 176 [M+H-C ₁₂ H ₁₁ O ₅] ⁺	代谢物
20	8.48	木蝴蝶素 A 脱甲基化产物	HQ	+	271.060 0	-0.4	$C_{15}H_{10}O_5$	271 [M+H] ⁺ , 253 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 169 [M+H-C ₈ H ₆] ⁺ , 123 [M+H-C ₉ H ₈ O ₂] ⁺	代谢物
21	9.56	槲皮素甲基化产物	ZW	+	317.070 8	2.8	$C_{16}H_{12}O_7$	317 [M+H] ⁺ , 303 [M+H-CH ₂] ⁺ , 169 [M+H-CH ₂ -C ₆ H ₈ O ₂] ⁺	代谢物
22	5.82	野黄芩苷脱氧化产物	HQ	+	447.093 5	3.0	$C_{21}H_{18}O_{11}$	447 [M+H] ⁺ , 431 [M+H-O] ⁺ , 271 [M+H-C ₆ H ₈ O ₆] ⁺	代谢物
23	4.82	绿原酸甲基化产物	ZW	-	367.103 5	-1.3	$C_{17}H_{20}O_9$	367 [M-H] ⁻ , 191 [M-H-C ₁₀ H ₈ O ₃] ⁻ , 193 [M-H-C ₇ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 173 [M-H-C ₁₀ H ₈ O ₃] ⁻ , 134 [M-H-C ₇ H ₁₀ O ₅ -CO ₂ -CH ₃] ⁻	代谢物
24	4.82	绿原酸甲基化产物的同分异构体	ZW	-	367.103 5	-1.3	$C_{17}H_{20}O_9$	367 [M-H] ⁻ , 191 [M-H-C ₁₀ H ₈ O ₃] ⁻ , 193 [M-H-C ₇ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 173 [M-H-C ₁₀ H ₈ O ₃] ⁻ , 134 [M-H-C ₇ H ₁₀ O ₅ -CO ₂ -CH ₃] ⁻	代谢物
25	13.27	麦冬黄烷酮 F 脱甲基化产物	MD	-	359.113 6	-0.2	$C_{19}H_{20}O_7$	359 [M-H] ⁻ , 315 [M-H-CHO ₂] ⁻ , 287 [M-H-CHO ₂ -CO] ⁻ , 243 [M-H-CHO ₂ -CO-C ₂ H ₄ O] ⁻ , 215 [M-H-CHO ₂ -CO-C ₂ H ₄ O-CO] ⁻	代谢物

DL-地龙 BB-百部 ZW-紫菀 HQ-黄芩 JG-桔梗 MD-麦冬

DL-*Pheretima* BB-*Stemona Radix* ZW-*Aster Radix et Rhizoma* HQ-*Scutellariae Radix* JG-*Platycodi Radix* MD-*Ophiopogonis Radix*

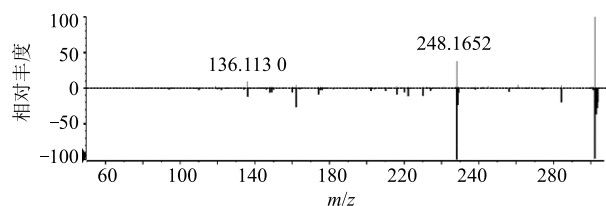


图 4 正离子模式下金刚碱二级质谱镜像图

Fig. 4 MS/MS spectra of croomine in positive ion mode (sample and reference)

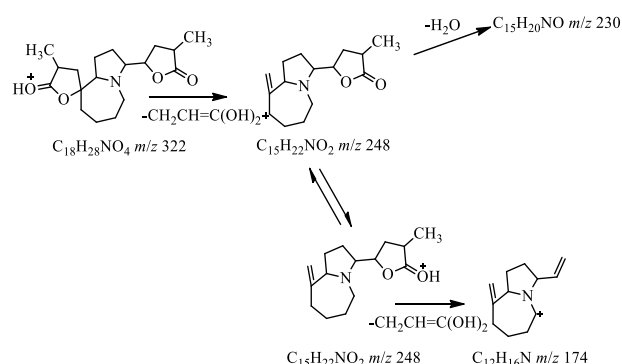


图 5 正离子模式下金刚碱可能的裂解途径

Fig. 5 Possible fragmentation pathway of croomine in positive ion mode

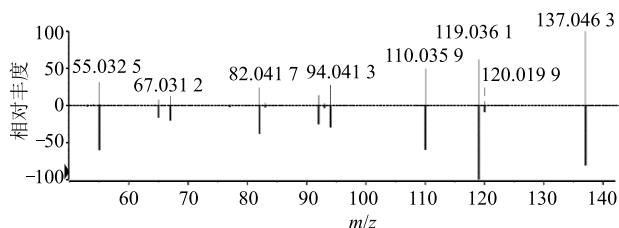


图 6 正离子模式下次黄嘌呤二级质谱镜像图

Fig. 6 MS/MS spectra of Hypoxanthine in positive mode (sample and reference)

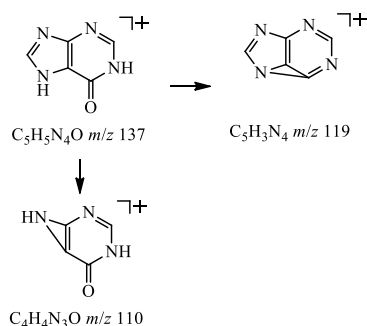


图 7 正离子模式下次黄嘌呤可能的裂解途径

Fig. 7 Possible fragmentation pathway of hypoxanthine in positive ion mode

推测过程。

化合物 **18**: t_R 为 4.72 min, 正离子模式下给出准分子离子 m/z 463 $[M+H]^+$, 比黄芩苷准分子离子峰 m/z 447 $[M+H]^+$ 多 16, 提示增加 1 个 OH。黄芩苷的代谢主要为 II 相代谢, 其 7 位上葡萄糖醛酸基可脱去, 也可重新结合至 6 位或 7 位, 因此在体代谢的时间较长, 另外 B 环的苯环性质也比较活泼, 可发生甲基化、羟基化等 I 相反应^[17]。化合物 **18** 产生特征碎片 m/z 342 和 285, 与黄芩苷二级碎片比较, 符合其羟基化过程, 结合文献报道^[17]黄芩苷羟基化产物代谢位点可能在 B 环的 4 号位, 推测化合物 **18** 为黄芩苷羟基化代谢产物。二级质谱图见图 8, 可能的裂解途径见图 9。

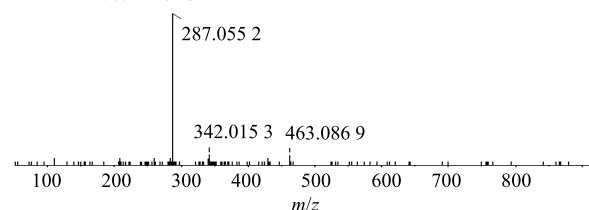


图 8 正离子模式下黄芩苷羟基化产物质谱图

Fig. 8 Mass spectra of hydroxylated products of baicalin in positive ion mode

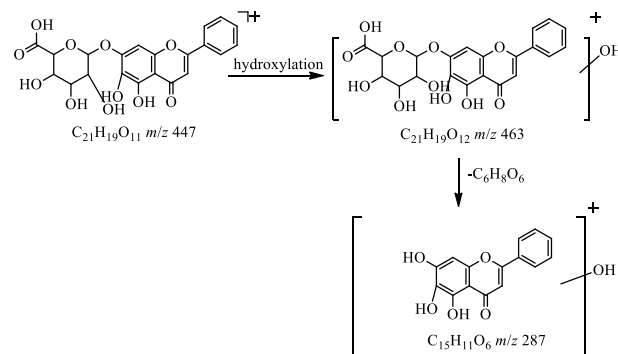


图 9 正离子模式下黄芩苷羟基化产物可能的裂解途径

Fig. 9 Possible fragmentation pathway of hydroxylated products of baicalin in positive ion mode

化合物 **23**: t_R 为 4.82 min, 负离子模式下给出准分子离子 m/z 376 $[M-H]^-$ 。绿原酸与咖啡酸的母核结构一致, 是由咖啡酸和奎尼酸缩合而成的羟基肉桂酸类化合物, 苯环上有 2 个邻位酚羟基, 对位上有共轭双键并连接 1 个羧基, 整体结构为长共轭体系, 化学性质较活泼, 在共轭双键、羧基及酚羟基上均可发生加成、取代、酯化等反应, 可形成加羟基、甲基、乙酰基等 I 相反应产物, 而且在体内各种辅酶的作用下, 还易于生成葡萄糖醛酸化、硫

酸酯化、甘氨酸化等 II 相反应产物^[17]。化合物 **23** 准分子离子峰比绿原酸准分子离子峰 m/z 353 $[M-H]^-$ 多 14, 提示增加 1 个 CH_2 , 发生甲基化反应, 结合其特征碎片 m/z 191 和 134 与绿原酸二级碎片比较, 符合其甲基化过程, 但无法确定其准确的代谢位点, 推测化合物 **23** 为绿原酸甲基化代谢产物。二级质谱图见图 10, 可能的裂解途径见图 11。

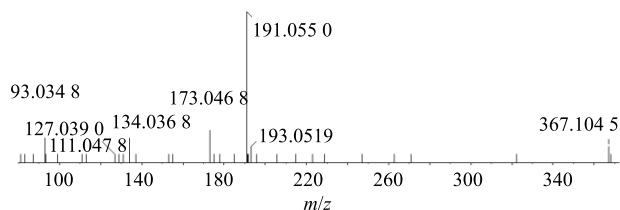


图 10 绿原酸甲基化产物负离子模式下的质谱图

Fig. 10 Mass spectra of methylated products of chlorogenic acid in negative ion mode

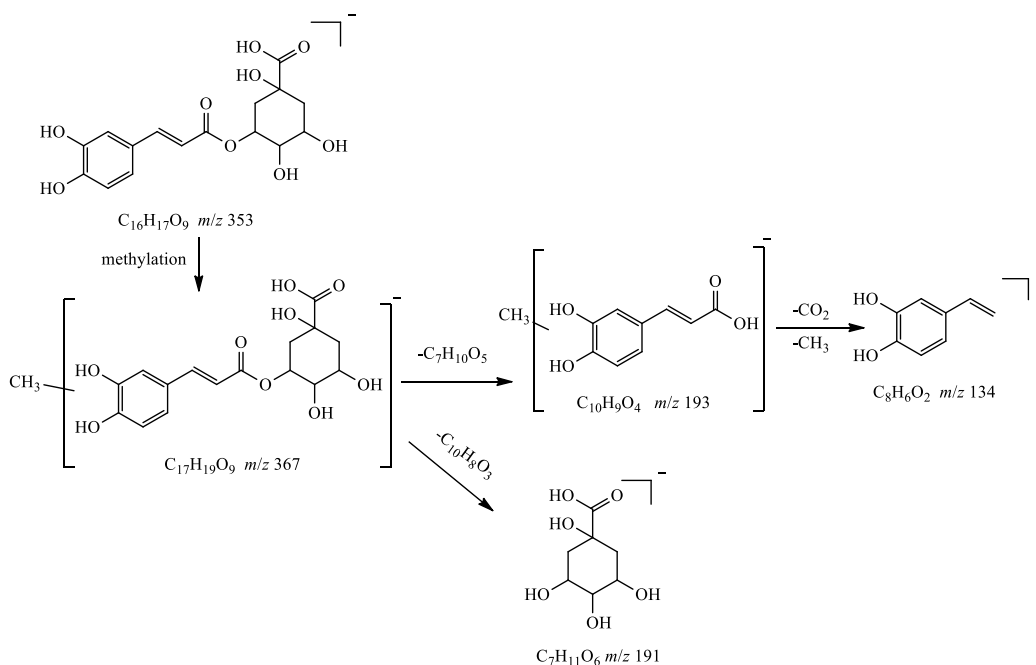


图 11 绿原酸甲基化产物可能的裂解途径 (负离子模式)

Fig. 11 Possible fragmentation pathway of methylated products of chlorogenic acid (negative ion mode)

含有, 但是含量差异显著, 可以看做是 QQCP 的入肺成分。这 2 种方法互相结合, 能够更加全面地找出其入肺的原型成分。

在大鼠 ig QQCP 溶液后的含药肺组织中共鉴定出 17 个原型成分, 其中来自百部的多为生物碱类成分, 具有止咳、平喘作用, 为百部的主要化学成分^[18-19]。黄芩中的主要成分是黄酮及其苷类, 其具有解热抗炎、抗微生物的药理作用。本研究检测到的黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素能够通过抑制细胞

4 讨论

肺组织样品前处理时考察了甲醇、乙腈、甲醇乙腈 (1:1) 及二氯甲烷等多种有机溶剂沉淀, 结果表明用乙腈沉淀后的样品色谱图的背景较低且离子峰数目较多, 故选择乙腈沉淀方法。同时对有机溶剂的沉淀倍数进行了考察, 分别采用 4、6、8 倍量进行沉淀, 结果表明采用 4 倍量乙腈进行沉淀后离子峰数目较多且响应值更强。

本研究在原型成分分析时采用了 2 种方法, 第一种是采用 Peakview 软件对对照组和给药组数据进行直观比对, 通过给药前后大鼠肺组织总离子流图的对比, 扣除对照组背景, 得到的成分是给药组中含有而对照组中没有的成分; 第二种是采用统计学软件对 2 组数据进行 PCA 并采用 t 检验的方法进行差异性分析, 得到的成分是对照组和给药组中都

黏附分子 (CAM) 的表达和白细胞的黏附和迁移而具有抗炎功能^[20], 主要成分黄芩苷更有直接诱杀支原体的作用^[20], 在《中国药典》2015 年版中也是黄芩的质量控制标志性成分。地龙具有止咳平喘作用, 其中的嘌呤类成分具有舒张支气管平滑肌、抑制气道炎症、调节免疫作用^[21]。紫菀中所含有的琥珀酸、山柰酚、槲皮素等均具有镇咳祛痰作用^[22]。

本课题组前期应用 UPLC-Q-TOF-MS 技术和血清药物化学理论对 QQCP 入血成分进行了分析, 在

给药后的大鼠血清中分析鉴定了 28 个血中移行成分, 其中 18 个原型成分, 10 个代谢产物^[8]。其中既入血又入肺的成分有 9 个, 包括 tuberospironine、tuberostemonol、金刚大碱、百部次碱、sessilifoliamide B、sessillistemonamine A、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素。研究表明, 药物进入体内后, 有的化学成分进入机体后直接具有生物活性, 有的则在各种生物代谢酶的作用下, 产生各种代谢产物而间接发挥其生物活性, 这些入血、入肺成分或代谢产物在体内的发挥药理作用的形式及机制需要进一步的研究。

本研究应用 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析了 QQCP 在大鼠肺组织中的化学成分, 结合前期课题研究, 初步推断出 QQCP 在体内发挥作用的药效物质基础, 为芩百清肺浓缩丸的深入研究提供了理论依据。

参考文献

- [1] 王伟明, 张俊威, 许庆瑞, 等. 芩百清肺浓缩丸体内外抗肺炎支原体作用的实验研究 [J]. 中草药, 2008, 39(5): 742-745.
- [2] 蒙艳丽, 王 欣, 王伟明. 芩百清肺浓缩丸对肺炎支原体作用 [J]. 中成药, 2014, 36(1): 36-39.
- [3] Meng Y, Huo J, Lu W, *et al.* Modulation of p1 and EGF expression by baicalin [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 14(1): 146-57.
- [4] 姚 琳, 张俊威, 王 博, 等. 芩百清肺浓缩丸对肺炎支原体感染大鼠肺泡 II 型上皮细胞修复作用的研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(8): 1493-1497.
- [5] 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.
- [6] 白 璐, 许晓双, 张福生, 等. 基于 UPLC/Q-TOFMS 代谢组学技术研究远志不同品种间的化学差异性 [J]. 中药材, 2015, 38(9): 1819-1824.
- [7] 闫利利, 史家文, 王金芳, 等. 基于 UPLC/Q-TOF-MS^E 方法分析半夏泻心汤的化学成分 [J]. 药学学报, 2013, 48(4): 526-531.
- [8] 刘 烨, 魏文峰, 霍金海, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的芩百清肺浓缩丸血清药物化学初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(3): 572-579.
- [9] 褚衍涛, 魏文峰, 霍金海, 等. UPLC-Q-TOF-MS 分析芩百清肺浓缩丸中的化学成分 [J]. 中成药, 2016, 38(6): 1303-1310.
- [10] 夏宏军, 朱 珊, 梁健谋, 等. 大鼠灌胃灯盏花素后血浆、胆汁、尿液以及粪便中代谢产物的鉴定 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1362-1366.
- [11] 庞丽琼, 梁琼麟, 刘清飞, 等. 大鼠体内复方清开灵代谢物的分析 [J]. 分析化学, 2007, 35(10): 1421-1424.
- [12] 邢 杰. 黄芩苷在动物体内的吸收和代谢研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2005.
- [13] Matsui Y, Nakamura S, Kondou N, *et al.* Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of chlorogenic acids and their metabolites in human plasma [J]. *Chromatogr B*, 2007, 858(1/2): 96-105.
- [14] 谢 岑, 钟大放, 陈笑艳. 鉴定大鼠注射绿原酸后体内的代谢产物 [J]. 药学学报, 2011, 46(1): 88-95.
- [15] 李 哲, 宋 瑞, 许凤国, 等. 大鼠灌服枳实提取液后体内黄酮类代谢产物的 LC-MS-MS 分析 [J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(6): 539-547.
- [16] 邢萌萌, 朱科学, 聂少平. UPLC-Q-TOF-MS 检测槲皮素代谢产物在大鼠血清及组织中的分布 [J]. 食品科学, 2013, 34(24): 158-162.
- [17] 孙 亮. 痰热清注射液体内代谢与相互作用研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2013.
- [18] 朱建育, 燕惠芬. 百部生物碱的研究进展及其药理作用 [J]. 上海应用技术学院学报: 自然科学版, 2010, 10(1): 26-33.
- [19] Zhou X, Leng P, Li N, *et al.* Oral absorption and antitussive activity of tuberostemonine alkaloids from the roots of *Stemona tuberosa* [J]. *Planta Med*, 2009, 75(6): 575-580.
- [20] Wonhwa L, Sae-Kwang K, Jong-Sup B. Anti-inflammatory effects of baicalin, baicalein, and wogonin *in vitro* and *in vivo* [J]. *Inflammation*, 2015, 38(1): 110-125.
- [21] 张晓晨. 地龙药理与临床研究进展 [J]. 中成药, 2011, 33(9): 1574-1578.
- [22] 库尔班江, 欧阳艳, 努尔买买提. 紫菀属植物化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国野生植物资源杂志, 2010, 29(2): 1-4.