

UPLC-Q-TOF-MS 筛选穿心莲中亲和 Caco-2 细胞的活性成分

焦姣姣¹, 杨园珍², 袁恩², 伍振峰², 王雅琪^{2*}, 杨明^{1,2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要: **目的** 采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF-MS) 技术筛选穿心莲与 Caco-2 细胞亲和的活性成分。**方法** 利用 Caco-2 细胞进行药物摄取结合药物吸收转运实验共同筛选穿心莲的亲合活性成分, 采用 UPLC-Q-TOF-MS 测定亲和前后的细胞样品。根据各化学成分的保留时间、质谱信息, 并结合提取离子流图与对照品、相关文献质谱数据对比鉴定各亲和活性成分。**结果** 从穿心莲中共筛选出 10 种能与 Caco-2 细胞亲和的活性成分, 分别为 12,13-双氢穿心莲内酯(1)、黄芩黄酮 I-2'-O-葡萄糖苷 (2)、穿心莲内酯 (3)、14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯苷 (4)、7-羟基脱水穿心莲内酯 (5)、新穿心莲内酯 (6)、3-去氧脱水穿心莲内酯苷 (7)、去氧穿心莲内酯 (8) 和脱水穿心莲内酯 (9) 和 1 种未知成分。**结论** 结合 UPLC-Q-TOF-MS 技术建立的筛选穿心莲中与 Caco-2 细胞亲和活性成分的方法, 可用于筛选中药复杂体系中的活性成分, 为进一步研究活性成分群间的协同配伍效应奠定基础。

关键词: Caco-2 细胞; UPLC-Q-TOF-MS; 穿心莲; 活性成分; 生物亲和色谱; 12,13-双氢穿心莲内酯; 穿心莲内酯

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)12-2946-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.12.033

Active components from *Andrographis paniculata* with affinity to Caco-2 cells screened by UPLC-Q-TOF-MS

JIAO Jiao-jiao¹, YANG Yuan-zhen², YUAN En², WU Zhen-feng², WANG Ya-qi², YANG Ming^{1,2}

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: **Objective** To identify the active components of *Andrographis paniculata* coupled with Caco-2 cells screened by UPLC-Q-TOF-MS. **Methods** The cell-combining compounds from *A. paniculata* were screened based on drug uptake and transport absorption experiment using Caco-2 cells, then the cell dissociation solution was detected before and after treating with *A. paniculata* by using UPLC-Q-TOF-MS method. The cell-combining compounds from the ethanol extracts of *A. paniculata* were identified based on the retention time and mass spectrometry information of each chemical composition combined with comparing the extracted ion chromatograms and mass spectrometry datas of reference substances and the related articles. **Results** A total of 10 compounds combined with Caco-2 cells in ethanol extract of *A. paniculata*, which were detected and identified as 12,13-dihydroandrographolide (1), skullcapflavone I-2'-O-glucoside (2), andrographolide (3), 14-deoxy-11,12-didehydro andrographiside (4), 7-hydroxy dehydroandrographolide (5), neoandrographolide (6), 3-deoxy dehydroandrographiside (7), deoxyandrographolide (8), dehydroandrographolide (9), and one unidentified component. **Conclusion** This research establishes a method of screening the active components of *A. paniculata* coupled with Caco-2 cells using UPLC-Q-TOF-MS analysis, which can be used to screen out the active components of the complex system on traditional Chinese medicines, as well as to lay the foundation for further study of the synergetic compatibility effects among active ingredients.

Key words: Caco-2 cell; UPLC-Q-TOF-MS; *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees; active components; biological affinity chromatography; 12,13-dihydroandrographolide; andrographolide

收稿日期: 2018-04-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81560649); 江西省教育厅科技项目 (GJJ170734); 江西省卫生厅中医药科技计划项目 (2015B041)

作者简介: 焦姣姣 (1993—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: (0791)87118108 E-mail: jqiao6@163.com

***通信作者** 王雅琪 (1988—), 女, 讲师, 研究方向为中药物质基础及工艺技术研究。Tel: (0791)87118108 E-mail: wangyaqi_3@163.com

杨明 (1962—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: (0791)87118108 E-mail: yangming16@126.com

穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees 为爵床科穿心莲属植物, 性味苦寒, 有清热燥湿、泻火解毒功效, 被誉为“天然抗生素”。穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯等二萜内酯类成分是穿心莲药材中主要有效成分, 具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤等药理作用而备受关注^[1-3]。前期实验及文献调研发现, 穿心莲提取物的抗炎活性优于其单体类成分, 说明组分间可能存在协同配伍效应, 显示出有效部位的优越性^[4-5]。目前关于穿心莲的研究大多针对二萜内酯类成分, 对穿心莲中另一主要成分黄酮类成分关注甚少, 且穿心莲的药效物质基础及组分间的协同配伍效应尚不明确。

生物亲和色谱是以靶细胞、靶分子和活性大分子等为载体, 在中药整体化学成分的基础上, 依据亲和能力, 进行多组分同时分析, 筛选有效的、可能存在整合作用的成分群^[6-7]。生物亲和色谱较之传统分离检测方法, 操作简便, 耗时大大缩短, 适用于复杂、未知、微量的中药组分体系, 越来越多的研究者将其运用到中药提取物的小分子活性物质筛选工作中^[8-11]。

吸收是口服药物起效的起始和关键环节。Caco-2 细胞模型是目前国内外广泛应用的体外吸收模型, 并被美国 FDA 批准作为药物吸收筛选模型。本课题组应用 Caco-2 模型对穿心莲提取物进行亲和色谱筛选, UPLC-Q-TOF-MS 对活性成分群进行结构鉴定, 为进一步研究穿心莲活性成分群之间的协同配伍效应奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

二氧化碳恒温培养箱 (243607-7039, 美国 Thermo Fisher 公司); 台式低速离心机 (19300012070106, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); SW-CJ-ZFD 洁净工作台 (苏净集团苏州安泰空气技术有限公司); 数显恒温水浴锅 (01220, 常州国华电器有限公司); BCD-216SDN 冰箱 (青岛海尔股份有限公司); AE31 倒置生物显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司); EL104 万分之一电子天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; KQ5200B 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); A419-1-1 多功能酶标仪 (美国 Thermo 公司); V 3 S025 漩涡仪 (德国 IKA 公司); Triple TOFTM 5600 型 LC-MS 质谱 [AB SCIEX, 配备 DuoSprayTM 离子源, 30A 型液相色谱系统 (包括 LC-30AD 型输

液泵, SIL-30AC 型自动进样器, CTO-30AC 型柱温箱, DGU-20A3 型真空脱气机, CBM-20A 型自动控制器)]。

1.2 试剂与试药

青链霉素混合液、非必需氨基酸、L-谷氨酰胺、胰酶、DMSO、Hank's 缓冲溶液、MTT、荧光素钠均来自北京索莱宝科技有限公司; 甲醇、乙腈均购自 Tedia 公司; 穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯、新穿心莲内酯对照品均来自北京索莱宝科技有限公司, 且质量分数均大于 98%; DMEM 高糖培养基 (HyClone 公司); 胎牛血清 (ExCell Bio 公司); Transwell 板 (美国康宁公司, 膜直径 12 mm、膜面积 1.12 cm²、膜孔隙 0.4 μm); 无水乙醇 (天津市福晨化学试剂厂); 水为屈臣氏专业蒸馏制法的饮用水; 其他试剂均为分析纯。

穿心莲药材 2017 年购于江西樟树天齐堂中药饮片有限公司, 经江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室杨明教授鉴定为穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees 干燥地上部分。

1.3 细胞株及细胞培养

Caco-2 细胞由上海中乔新舟生物科技有限公司提供, 来源于 ATCC。用含 10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸、1% 青链霉素混合液、1% L-谷氨酰胺的 DMEM 高糖培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。实验所用细胞代数 15~35 代, 均处于对数生长期。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

按照《中国药典》2015 年版一部中穿心莲片的制备工艺^[12], 称取穿心莲药材 50 g, 12 倍量 85% 乙醇, 回流提取 2 次, 每次 2 h, 提取液合并。纱布滤过, 减压浓缩至 100 mL。0.22 μm 微孔滤膜滤过, 于 -20 °C 下保存, 即得质量浓度为生药材 0.5 g/mL 的穿心莲提取原液, 用时将其稀释成不同质量浓度即得。

2.2 MTT 法检测穿心莲提取液对 Caco-2 细胞的抑制作用

取对数生长期 Caco-2 细胞制成 5×10⁴ 个/mL 的单细胞悬液, 接种于 96 孔细胞培养板; 空白孔加等量完全培养基, 以排除培养基的影响; 边缘孔用 Hank's 缓冲溶液填充, 以防止培养基的挥发对细胞的生长产生影响。在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后, Hank's 液润洗 1 次, 实验组 (细胞+培养基+药物) 加入质量浓度分别为

0.375、0.625、0.750、1.250、1.500、2.500、3.000、5.000 mg/mL 的穿心莲药液, 对照组(细胞+培养基+溶剂)和空白组(培养基+溶剂)均加入等量不含穿心莲的相应溶液。每组设6个复孔, 继续培养24 h。Hank's 液清洗2次, 每孔加入1 mg/mL MTT 100 μ L, 再培养4 h。吸弃孔内液体, 每孔加150 μ L DMSO 溶液, 将96孔板置于恒温振荡器中, 以50 r/min 转速振荡10 min, 使结晶物 Formazan 充分溶解。在酶标仪上选择波长490 nm, 测定各孔吸光度(A)值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 细胞亲和

取对数生长期 Caco-2 细胞, 调整细胞密度为 1×10^5 个/mL, 接种于6孔板中, 24 h后更换细胞培养液, 以后隔天更换培养液, 1周后每天换液, 培养至14 d后用于药物的摄取实验。另以 1×10^5 个/mL 接种于 Transwell 板中, 培养21 d后, 满足跨膜电阻值达到 $1\,000\ \Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上及荧光素钠透过率小于5%的膜用于药物跨膜转运实验。细胞培养至符合实验要求后, 均用37 $^{\circ}\text{C}$ 的 Hank's 缓冲溶液在培养箱中孵育30 min后弃去, 再用 Hank's 轻轻冲洗2遍, 洗去细胞单分子层表面的杂质, 然后加药进行后续细胞亲和实验。

2.3.1 药物摄取实验 考察培养时间(1、2、4、6 h)对穿心莲提取液摄取的影响。按摄取时间取出后, 用4 $^{\circ}\text{C}$ 的 Hank's 缓冲溶液快速冲洗4遍, 加无水乙醇刮出细胞, 于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱反复冻融3次裂解细胞, 取出超声1 h, 得细胞悬液。离心(4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 000 r/min) 10 min, 取上清液氮吹至干, 加无水乙醇复溶。

2.3.2 药物转运实验 若为顶端膜侧(AP) $\rightarrow$ 基底膜侧(BL)转运, 将高、中、低质量浓度(3.00、1.50、0.75 mg/mL) 药物0.5 mL 分别加到AP侧作为供侧, 同时加1.5 mL 空白 Hank's 作为受侧。反之, BL $\rightarrow$ AP 侧转运, 倒过来处理(即BL侧加1.5 mL 不同质量浓度的药物, AP侧加0.5 mL 空白 Hank's)。将 Transwell 板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育, 分别于0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 从受侧吸转运液200 μ L, 同时补加空白 Hank's 200 μ L, 每组设4个平行孔。

2.4 样品处理

各亲和样品, 分别加等量甲醇沉淀蛋白, 涡混5 min, 离心(4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 000 r/min) 10 min, 取上清

液过0.22 μm 滤膜后进样分析。另分别以不含穿心莲的空白溶液与 Caco-2 细胞相互作用, 并进行空白溶液的 UPLC-Q-TOF-MS 分析。

2.5 UPLC-Q-TOF-MS 色谱分析

2.5.1 色谱条件 Phenomenex Kinetex C₁₈ (100 mm $\times$ 3 mm, 2.6 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱: 0~3 min, 10%~30% A; 3~5 min, 30% A; 5~15 min, 30%~45% A; 15~25 min, 45%~95% A; 25~27 min, 95% A。体积流量0.3 mL/min; 柱温40 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积10 μ L。

2.5.2 质谱条件 质谱仪器为 AB Sciex Triple TOF 5600+。离子化模式为电喷雾正离子模式, 离子源电压5 500 V, 离子源温度500 $^{\circ}\text{C}$, 去簇电压(DP) 100 V, 碰撞能量(CE)为35 eV, 碰撞能量扩展(CES)为15 eV。雾化气体为氮气, 辅助气1为344.75 kPa, 辅助气2为344.75 kPa, 气帘气为275.80 kPa。一级质谱母离子扫描范围为 m/z 50~1 000, IDA 设置响应值超过100 cps 的峰优先进行二级质谱扫描, 子离子扫描范围为 m/z 50~1 000, 开启动态背景扣除(DBS)。

3 结果

3.1 穿心莲提取液对 Caco-2 细胞的毒性影响

穿心莲提取液在质量浓度0.375~5.000 mg/mL, Caco-2 细胞的存活率随着药物质量浓度的增加逐渐降低(表1), 其半数抑制浓度(IC₅₀)值为3.150 mg/mL。为了同时保障细胞与药物充分亲和及细胞存活率, 后续实验给药质量浓度确定在0~3.150 mg/mL。

表1 不同质量浓度穿心莲提取液对 Caco-2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effects of different concentrations of *A. paniculata* extracts on survival rate of Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	存活率/%
对照	—	100.00 $\pm$ 12.51
穿心莲提取液	0.375	104.48 $\pm$ 11.87
	0.625	99.54 $\pm$ 14.70
	0.750	92.69 $\pm$ 12.98
	1.250	90.78 $\pm$ 10.32
	1.500	84.64 $\pm$ 11.26
	2.500	72.21 $\pm$ 10.45
	3.000	55.30 $\pm$ 4.25
	5.000	3.08 $\pm$ 0.29

3.2 UPLC-Q-TOF-MS 亲和成分鉴定

分别用 UPLC-Q-TOF-MS 对 Caco-2 细胞摄取和转运的穿心莲成分进行定性分析。结果发现药物质量浓度越高、细胞与药物作用时间越长,亲和活性成分的离子信号越强。为了更快、更准确地鉴定穿心莲活性成分,后续分析及图谱均来源于药物质量浓度最高、亲和时间最长的样品。药物摄取、转运前后的细胞样品总离子流图分别见图 1 和 2。通过与空白细胞裂解液、空白转运组等空白组进行比较,结合穿心莲提取液总离子流图(图 3),药物摄取实验可鉴别出化合物 1、2、3、4、7、9 共 6 个成分,经药物双向转运实验可鉴别出化合物 3、5、6、8、9、10 共 6 个成分。

根据各化学成分的保留时间、质谱信息,并结合提取离子流图与对照品、相关文献质谱数据对比,鉴定出 12,13-双氢穿心莲内酯(1)、黄芩黄酮 I-2'-O-葡萄糖苷(2)、穿心莲内酯(3)、14-脱氧-11,12-

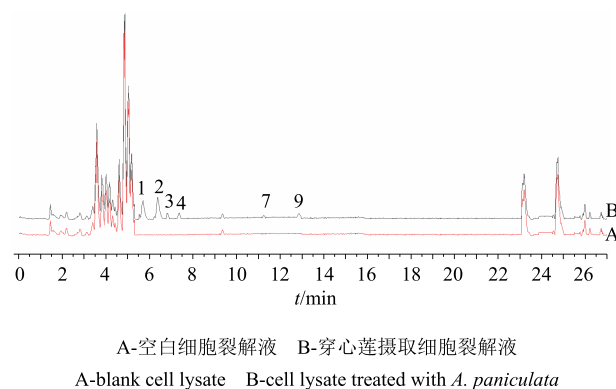


图 1 穿心莲摄取实验的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of *A. paniculata* uptake experiment

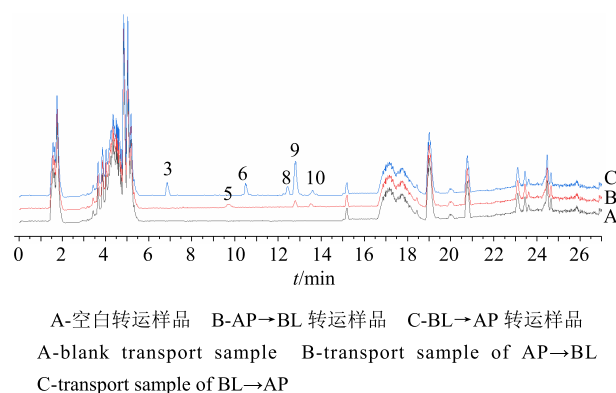


图 2 穿心莲转运实验的总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatograms of *A. paniculata* transport experiment

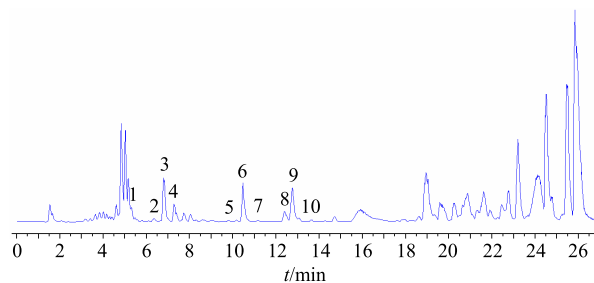


图 3 穿心莲提取液的总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatograms of extract from *A. paniculata*

二脱氢穿心莲内酯苷(4)、7-羟基脱水穿心莲内酯(5)、新穿心莲内酯(6)、3-去氧脱水穿心莲内酯苷(7)、去氧穿心莲内酯(8)、脱水穿心莲内酯(9)和 1 种未知成分,共 10 种亲和成分。相关色谱行为及结构结果见表 2 和图 4。

化合物 1 ($t_R = 5.36$ min): m/z 353.231 6 处出现分子离子峰,该离子通过失去 H_2O 分子和 C 碎片形成 $317.211\ 5\ [M+H-2H_2O]^+$ 、 $299.200\ 1\ [M+H-3H_2O]^+$ 、 $287.197\ 9\ [M+H-2H_2O-CH_2O]^+$ 的离子碎片, $287.197\ 9\ [M+H-2H_2O-CH_2O]^+$ 失去 CO 形成相对分子质量为 259.166 9 的离子。根据文献数据^[13],推断该化合物为 12,13-双氢穿心莲内酯,其 MS/MS 图见图 5。

化合物 2 ($t_R = 6.38$ min): 一级质谱图上出现 m/z 477.138 4 $[M+H]^+$ 、499.121 2 $[M+Na]^+$ 的离子, m/z 477.138 4 $[M+H]^+$ 分别失去 m/z 162、177 得到 $315.084\ 6\ [M+H-Glc]^+$ 、 $300.061\ 9\ [M+H-Glc-CH_3]^+$ 的碎片,说明此化合物含有葡萄糖苷元,且与穿心莲黄酮类成分的裂解规律相似。对比文献数据^[13-14],推测该化合物为黄芩黄酮 I-2'-O-葡萄糖苷,其 MS/MS 图见图 6。

化合物 3 ($t_R = 6.76$ min): 该化合物的碎裂途径与 1 相同,说明为内酯类成分。根据一级质谱图上的 m/z 701.425 2 $[2M+H]^+$ 、351.216 9 $[M+H]^+$,提示相对分子质量为 350,推测该化合物分子式为 $C_{20}H_{30}O_5$ 。 m/z 351.216 9 $[M+H]^+$ 的离子分别失去 H_2O 、C、CO 形成 $333.206\ 1\ [M+H-H_2O]^+$ 、 $315.194\ 9\ [M+H-2H_2O]^+$ 、 $297.184\ 1\ [M+H-3H_2O]^+$ 、 $285.184\ 1\ [M+H-2H_2O-CH_2O]^+$ 、 $257.152\ 7\ [M+H-2H_2O-CH_2O-CO]^+$,再与对照品比较,确定该化合物为穿心莲内酯。

化合物 4 ($t_R = 7.42$ min): 根据 m/z 495.258 7 $[M+$

表2 穿心莲的 UPLC-Q-TOF-MS 鉴别结果

Table 2 Identification results of *A. paniculata* by UPLC-Q-TOF-MS

峰号	t_R/min	分子式	分子离子峰 (m/z)	碎片离子 (m/z)	鉴定化合物
1	5.36	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_5$	353.231 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$	317.211 5 $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$, 299.200 1 $[\text{M}+\text{H}-3\text{H}_2\text{O}]^+$, 287.197 9, 259.166 9, 119.085 3, 105.069 8, 95.085 6	12,13-双氢穿心莲内酯
2	6.38	$\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$	477.138 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 499.121 2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$	315.084 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}]^+$, 300.061 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-\text{CH}_3]^+$	黄芩黄酮 I-2'- <i>O</i> -葡萄糖苷
3	6.76	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_5$	351.216 9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 701.425 2 $[2\text{M}+\text{H}]^+$	333.206 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 315.194 9 $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$, 297.184 1 $[\text{M}+\text{H}-3\text{H}_2\text{O}]^+$, 285.184 1, 257.152 7	穿心莲内酯
4	7.42	$\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_9$	495.258 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 989.511 3 $[2\text{M}+\text{H}]^+$	333.207 0 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}]^+$, 315.195 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 297.184 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-2\text{H}_2\text{O}]^+$, 285.184 4, 257.153 4	14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯苷
5	9.71	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_5$	349.199 5 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 697.393 0 $[2\text{M}+\text{H}]^+$	331.189 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 313.181 2 $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$, 295.166 7 $[\text{M}+\text{H}-3\text{H}_2\text{O}]^+$, 283.169 1, 255.137 7	7-羟基脱水穿心莲内酯
6	10.36	$\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_8$	481.279 1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 498.305 5 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 961.551 7 $[2\text{M}+\text{H}]^+$	319.226 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}]^+$, 301.215 5, 289.215 1	新穿心莲内酯
7	11.24	$\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_8$	496.289 5 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	317.211 5 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}]^+$, 299.199 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 287.199 4	3-去氧脱水穿心莲内酯苷
8	12.45	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4$	335.221 9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 669.435 5 $[2\text{M}+\text{H}]^+$	317.210 2 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 299.199 6 $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$, 287.199 8, 259.168 2	去氧穿心莲内酯
9	12.66	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$	333.205 8 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 665.404 1 $[2\text{M}+\text{H}]^+$	315.194 4 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 297.183 6 $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$, 285.184 8, 257.151 7	脱水穿心莲内酯
10	13.36	未知	379.247 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 757.488 0 $[2\text{M}+\text{H}]^+$	361.237 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 343.229 1 $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$, 315.195 6 $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^+$, 285.184 0, 257.152 4, 175.147 8	未知

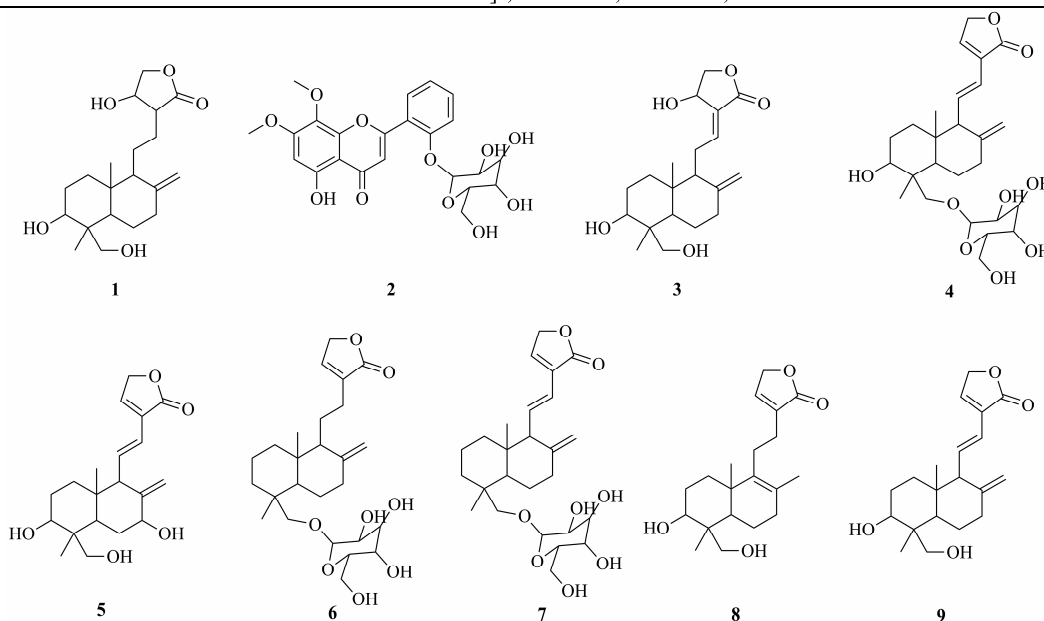


图4 穿心莲活性成分结构

Fig. 4 Structures of active ingredients from *A. paniculata*

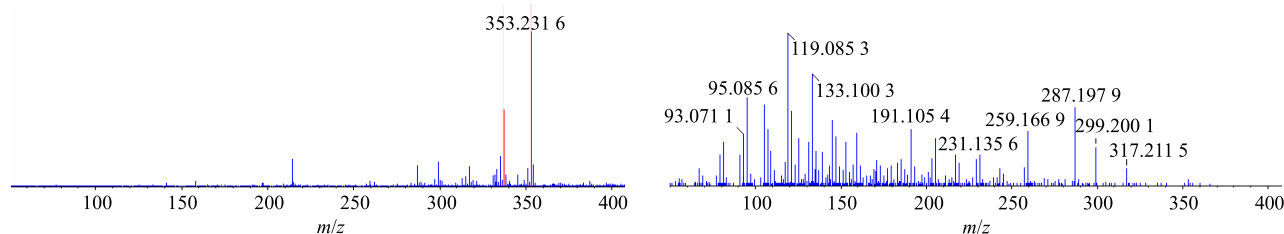


图 5 12,13-双氢穿心莲内酯的 MS/MS 图

Fig. 5 MS/MS spectra of 12,13-dihydroandrographolide

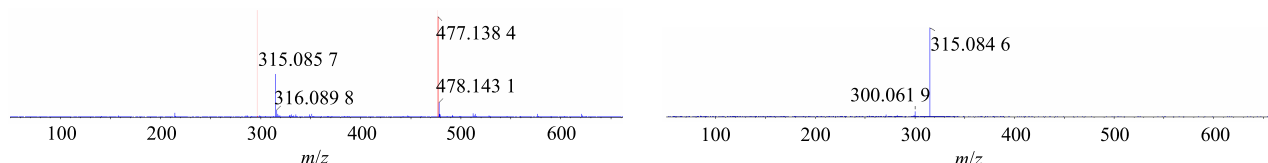


图 6 黄芩黄酮 1-2'-O-葡萄糖苷的 MS/MS 图

Fig. 6 MS/MS spectra of skullcapflavone 1-2'-O-glucoside

$\text{H}]^+$ 、989.511 3 $[2\text{M} + \text{H}]^+$ ，推测其分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_9$ 。 m/z 495.258 7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 失去 m/z 162 (Glc) 形成 333.207 0 $[\text{M} + \text{H} - \text{Glc}]^+$ ，其余碎裂途径同化合物 3，生成 m/z 为 315.195 6、297.184 9、285.184 4、257.153 4 的片段，对比文献数据^[13,15]，推测该化合物为 14-脱氧-11,12-二脱氢穿心莲内酯苷。

化合物 5 ($t_{\text{R}} = 9.71$ min)：一级质谱出现 m/z 349.199 5 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 、697.393 0 $[2\text{M} + \text{H}]^+$ 的准分子离子峰，提示该化合物相对分子质量为 348，其余裂解方式与化合物 3 完全相同，从而获得 m/z 331.189 6、313.181 2、295.166 7、283.169 1、255.137 7 的特征离子峰，结合文献报道^[13]，确定该化合物为 7-羟基脱水穿心莲内酯。

化合物 6 ($t_{\text{R}} = 10.36$ min)：一级质谱给出的 m/z 481.279 1 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 、498.305 5 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ 、961.551 7 $[2\text{M} + \text{H}]^+$ 和 319.226 1 $[\text{M} + \text{H} - \text{Glc}]^+$ 的分子离子峰，在 m/z 319.226 1 $[\text{M} + \text{H} - \text{Glc}]^+$ 处的离子通过失去 H_2O 和 C 碎片而在二级质谱中出现 m/z 301.215 5 $[\text{M} + \text{H} - \text{Glc} - \text{H}_2\text{O}]^+$ 和 289.215 1 $[\text{M} + \text{H} - \text{Glc} - \text{CH}_2\text{O}]^+$ 的特征离子峰。根据二萜内酯的 MS/MS 行为并与对照品比较，化合物 6 可以表征为新穿心莲内酯。

化合物 7 ($t_{\text{R}} = 11.24$ min)：根据 m/z 496.289 5 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ 、317.211 5 $[\text{M} + \text{H} - \text{Glc}]^+$ 、299.199 1 $[\text{M} + \text{H} - \text{Glc} - \text{H}_2\text{O}]^+$ 、287.199 4 $[\text{M} + \text{H} - \text{Glc} - \text{CH}_2\text{O}]^+$ 的离子峰，此裂解途径与化合物 6 相似，故该化合物为内酯类成分，化学式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_8$ 。结合

穿心莲内酯类成分的裂解规律^[13]，推测该化合物为 3-去氧脱水穿心莲内酯苷。

化合物 8 ($t_{\text{R}} = 12.45$ min)：其裂解路径与化合物 5 相似，对比文献数据^[13,16]，确定该化合物为去氧穿心莲内酯。

化合物 9 ($t_{\text{R}} = 12.66$ min)：在 m/z 665.404 1、333.205 8 处分别检测到 $[2\text{M} + \text{H}]^+$ 、 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 离子，表明其分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$ ，失去 H_2O 分子后形成 m/z 315.194 4 $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$ 、297.183 6 $[\text{M} + \text{H} - 2\text{H}_2\text{O}]^+$ 。通过与对照品比较 MS 行为，可以将化合物 9 确定为脱水穿心莲内酯。

化合物 10 ($t_{\text{R}} = 13.36$ min)：一级质谱图出现 m/z 379.247 4 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 、757.488 0 $[2\text{M} + \text{H}]^+$ ，提示该化合物相对分子质量为 378。 m/z 379.247 4 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 失去 H_2O 、 CO 、 CH_2O 分别形成 m/z 为 361.237 6、343.229 1、315.195 6、285.184 0、257.152 4 的碎片。其裂解路径与穿心莲内酯类成分一致，推测该化合物为穿心莲二萜内酯类成分，但其具体结构和名称还未可知，其 MS/MS 图见图 7。

4 讨论

经查阅大量文献后发现，大多采用甲醇或乙腈沉淀细胞中的蛋白质，且用量不一。本实验考察了 1 倍量甲醇、3 倍量甲醇、1 倍量乙腈、3 倍量乙腈对 Caco-2 细胞样品中蛋白质的沉淀效果，结果发现用甲醇沉淀比乙腈沉淀后质谱图中出现的干扰成分更少，用 1 倍量甲醇比 3 倍量甲醇沉淀后的质谱离子信号更强，且 1 倍量甲醇足以沉淀样品中的所有

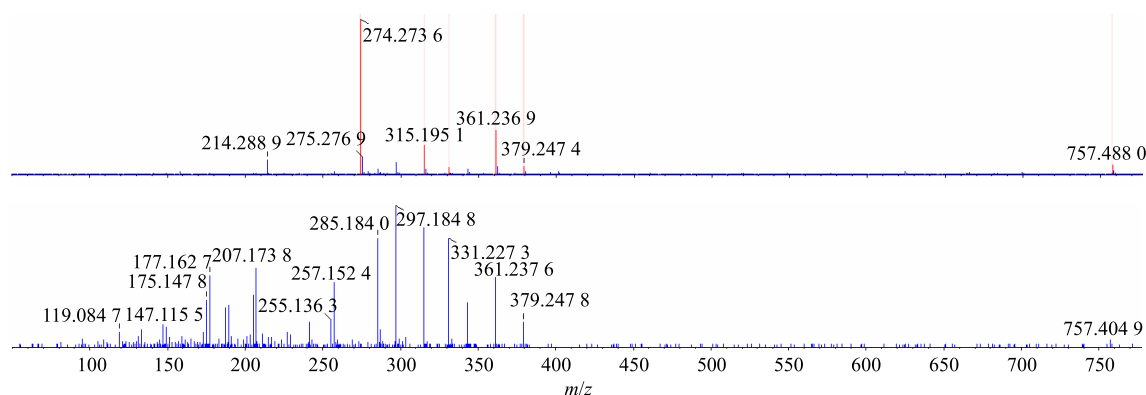


图 7 化合物 10 的 MS/MS 图

Fig. 7 MS/MS spectra of compound 10

蛋白质, 故本实验最终采用 1 倍量甲醇沉淀蛋白。

目前关于穿心莲的研究大多针对穿心莲内酯, 本课题组前期研究发现, 穿心莲制剂的抗炎活性并非与穿心莲内酯含量正相关, 显示出有效部位的优越性, 说明穿心莲内酯的含量不能完全代替穿心莲药材的整体质量, 其药效活性可能存在药效组分群间的协同配伍效应。本实验通过口服药物起作用的关键环节即小肠吸收为切入点, 对穿心莲的活性成分进行筛选, 经药物摄取与转运实验共筛选出 9 种内酯类和 1 种黄酮类活性成分。此外, 本课题组前期利用巨噬细胞亲和筛选出了 5 种黄酮类、3 种内酯类及 1 种甾醇类活性成分。然而, 这些成分之间如何发挥协同配伍效应还需要进一步研究。

本实验首次利用 Caco-2 细胞进行药物摄取结合药物吸收转运实验共同筛选穿心莲的亲亲和活性成分, 同时采用 UPLC-Q-TOF-MS 方法鉴别各化学成分, 这一亲和筛选方法还可用于其他多组分中药或中药制剂活性成分群的筛选, 进而研究其组分间的协同配伍关系。

参考文献

- [1] 陈蓉. 基于遗传与环境的穿心莲品质研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.
- [2] 蒋珍藕. 穿心莲属植物化学成分研究进展 [J]. 中成药, 2011, 33(8): 1382-1388.
- [3] 李修海, 李大新. 穿心莲的药理作用研究进展 [J]. 齐鲁药事, 2009, 28(8): 480-482.
- [4] 华素, 李园园, 赵军利, 等. 穿心莲提取物中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯大鼠肠吸收特性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3117-3123.
- [5] 徐芳芳, 金治全, 石伟, 等. 穿心莲总内酯的 NO 抑制活性研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(5): 1061-1065.
- [6] 赵超, 李会军, 陈君, 等. 中药复杂成分解析与质

量评价的研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2012, 43(3): 283-288.

- [7] 郭思琪, 杨华, 李萍. 亲和超滤结合液质技术在中药有效成分发现中的应用 [J]. 药科学报, 2016, 51(7): 1060-1067.
- [8] 周婧, 王剑, 马宏跃, 等. 细胞亲和-UPLC-QTOF 测定蟾蜍甙与宫颈癌 HeLa 细胞的亲和及与化合物计算分子属性的相关性分析 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(8): 1079-1083.
- [9] Yuan X L, Zhang B, Wang Y N, *et al.* An online coupled breast cancer cell membrane chromatography with HPLC/MS for screening active compounds from *Fructus evodiae* [J]. *Anal Methods*, 2013, 5(20): 5767-5774.
- [10] Yu L, Zhao J, Zhu Q, *et al.* Macrophage biospecific extraction and high performance liquid chromatography for hypothesis of immunological active components in *Cordyceps sinensis* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(2): 439-443.
- [11] Lv Y N, Sun Y M, Fu J, *et al.* Screening anti-allergic components of *Astragali Radix* using LAD2 cell membrane chromatography coupled online with UHPLC-ESI-MS/MS method [J]. *Biomed Chromatogr*, 2017, 31(2): 1-7.
- [12] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [13] 陈丽霞. 穿心莲的化学成分及穿心莲新苷微生物转化研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [14] Chen Z W, Tong L, Li S M, *et al.* Identification of major parent compounds and metabolites in bile, plasma and urine of rats after oral administration of *Radix Scutellariae* extract by UFLC-IT-TOF/MS [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2013, 22(4): 319-328.
- [15] Chao W W, Kuo Y H, Lin B F. Anti-inflammatory activity of new compounds from *Andrographis paniculata* by NF-kappa B transactivation inhibition [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(4): 2505-2512.
- [16] 蒋珍藕. 穿心莲属植物化学成分研究进展 [J]. 中成药, 2011, 33(8): 1382-1388.