

基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的北青龙衣大鼠肾组织化学成分分析

王改丽, 程 团, 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 利用超高压液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)联用技术对北青龙衣大鼠肾组织化学成分进行分析。方法 大鼠 ig 给予北青龙衣醇提物后,采集肾组织,采用 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),流动相为 0.1%甲酸的水溶液(A)-0.1%甲酸的乙腈溶液(B),梯度洗脱,质谱采用电喷雾(ESI)离子源,在正离子模式下采集数据,通过 Peakview 2.0/masterview 1.0 和 Metabolitepilot 数据分析软件,通过对比保留时间、碎片丰度比、母离子精确质量数及二级质谱图鉴定和表征北青龙衣在大鼠肾组织成分。结果 从大鼠肾组织中鉴定了 24 种化学成分,包括 16 个原型成分和 8 个代谢产物,其中包含 12 个萘醌类、5 个黄酮类、3 个二芳基庚烷类、4 个三萜类成分。结论 初步确定了北青龙衣在大鼠肾组织中原型成分及代谢产物,为北青龙衣用药安全性和有效性提供参考,为其在大鼠体内成分及组织分布研究提供方法学借鉴。

关键词: 北青龙衣; 肾组织分布; 超高压液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱; 核桃酮; 柚皮素

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)16-3763-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.16.006

Analysis on chemical constituents from rat kidney tissue of *Juglans mandshurica* based on UPLC-Q-TOF/MS

WANG Gai-li, CHENG Tuan, HUO Jin-hai, WANG Wei-ming

Heilongjiang Academy of Chinese Medical Sciences, Harbin 150036, China

Abstract: **Objective** To analyze the chemical constituents from rat kidney tissue of *Juglans mandshurica* by UPLC-Q-TOF/MS. **Methods** The kidney tissue was collected after oral administration of ethanol extract of *J. mandshurica*. The gradient elution was performed using a Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 0.1% formic acid water (A), and 0.1% formic acid acetonitrile (B) mobile phase system. An electrospray (ESI) ion source was used for mass spectrometry to collect data in positive ion mode. Combined with Peakview 2.0/masterview 1.0 and Metabolitepilot data analysis software, the kidney tissue components of *J. mandshurica* were identified by comparing the retention time, isotope kurtosis ratio, exact mass of the parent ion, and MS/MS fragment. **Results** Twenty-four chemical constituents including 16 prototypic components and eight metabolites were identified from rat kidney tissue, which contains 12 naphthoquinones, five flavonoids, three diarylheptanoids, and four triterpenoids. **Conclusion** The prototype components and metabolites of kidney tissue of *J. mandshurica* were determined. In further study, it provides reference for the safety and effectiveness of the treatment of *J. mandshurica* and provides a methodological reference for its *in vivo* composition and tissue distribution.

Key words: *Juglans mandshurica* Maxim.; kidney tissue distribution; UPLC-Q-TOF/MS; regiolone; naringenin

北青龙衣为胡桃科胡桃属植物核桃楸 *Juglans mandshurica* Maxim. 未成熟果实的外果皮,以止痛止痢、清热解毒、祛风疗癣等功效入药^[1]。目前,从青龙衣中分离得到的化合物有萘醌类、黄酮类、二芳基庚烷类、萜类、鞣质类、多糖类、有机酸类及

挥发油等^[2-3]。北青龙衣多年来一直用于治疗恶性肿瘤并取得了较好的疗效^[4-5],但其提取物的急性毒性实验也表明北青龙衣具有一定的毒性作用,且毒性主要集中于北青龙衣醇提物的醋酸乙酯和氯仿萃取部位^[6],而这 2 个部位主要是以萘醌类成分为主^[7]。

收稿日期: 2018-04-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(81503348); 黑龙江省自然科学基金项目(H2017044); 国家中医药管理局中医药科学技术研究专项(2015-14)

作者简介: 王改丽(1992—),女,在读硕士,研究方向为中药质量评价及药效物质基础研究。Tel: 13895771250 E-mail: wanggai522@163.com

***通信作者** 王伟明(1966—),女,硕士生导师,研究员,研究方向为中药新产品研发。Tel: (0451)55665478 E-mail: zyyjy@163.com

大量文献报道植物中含有的萘醌类成分具有一定的毒性^[8-9],而肾脏是机体主要的排泄器官,也是毒性直接作用的靶器官,因此进行北青龙衣在肾组织化学成分分析的研究尤为重要,为如何保证北青龙衣用药的安全性和有效性奠定基础,及促进其进一步开发与利用。

四极杆-飞行时间串联质谱(Q-TOF)为高分辨质谱仪,具有高分辨、高选择性的特点,不仅能通过精确的相对分子质量快速确定化合物分子式,还可以通过高低能碰撞扫描,提供丰富的二级质谱信息,再通过对照品比对及裂解规律分析,从而鉴定或推断化合物结构,已被广泛用于中药及复方体内成分分析^[10-11]。本研究首次采用UPLC-Q-TOF/MS技术对北青龙衣大鼠肾组织化学成分进行分析,共鉴定和推测出24种化学成分,包括16个原型成分和8个代谢产物,其中包含12个萘醌类、5个黄酮类、3个二芳基庚烷类、4个三萜类成分,该研究为北青龙衣用药的安全性和有效性提供了参考,为其体内成分及组织分布研究提供了方法学借鉴。

1 材料

1.1 仪器

AB SCIEX ExionLC™ UPLC 超高效液相色谱仪(SCIEX公司,美国);AB SCIEX Triple-TOF™ 5600⁺ 高分辨质谱仪(SCIEX公司,美国);Analyst TF 1.7.1 Software(SCIEX公司,美国);PeakView 2.0/masterview1.0 软件(SCIEX公司,美国);Metabolitepilot 1.5 软件(SCIEX公司,美国);BP211D 型电子天平(Sartorius公司,德国);DW-86L959 型超低温冰箱(青岛海尔特种电器有限公司);CM-12J 型氮吹仪(北京成萌伟业科技有限公司);Legend Micro 17R 型冷冻高速离心机(ThermoFisher公司,美国)。

1.2 试药与试剂

北青龙衣药材于2016年6月29日采自哈尔滨市方正县(东经128°92'62.1",北纬45°62'82.8"),经黑龙江省中医药科学院初东君主任药师鉴定为胡桃科胡桃属植物核桃楸 *Juglans mandshurica* Maxim 的果实。剥取外果皮,通风处阴干。

甲醇,色谱级,Merck公司;乙腈,色谱级,Merck公司;甲酸,色谱级,Fisher公司。

1.3 实验动物

Wistar 大鼠,雄性,SPF级,体质量280~300 g,动物许可证号SCXK(京)2016-0011,北京维通利华实验动物技术有限公司;大鼠饲养于SPF级

动物室,室温20~25℃,湿度50%~70%。

2 方法

2.1 样品溶液的制备

2.1.1 北青龙衣醇提物的制备 取北青龙衣药材350 g,加入8倍量75%乙醇超声提取2次,每次1 h,减压回收得乙醇提取物,取提取物适量,加75%乙醇配制成含生药0.12 g/mL的溶液,过0.22 μm的微孔滤膜,供LC-MS分析。

2.1.2 ig 药液的制备 取乙醇提取物,依据《黑龙江省中药饮片炮制规范及标准(2012年版)》中北青龙衣成人最大日用量为30 g,加水配制成含生药1.35 g/mL的药液(按照临床等效剂量换算,相当于人日用量的10倍),储存于4℃冰箱中备用。

2.2 组织样品制备

Wistar 大鼠12只,随机分成空白组和给药组,各6只,禁食12 h,自由饮水,称定质量,标记。按20 mL/kg 体质量 ig 给予质量浓度为1.35 g/mL的青龙衣提取物,空白组 ig 等量的蒸馏水,给药后1 h,以10%水合氯醛麻醉,采集给药组和空白组大鼠的肾组织。取肾组织各0.2 g,加1 mL水匀浆,加入4 mL醋酸乙酯,涡旋1 min,超声处理2 min,静置10 min,定量取2 mL上清液,于4℃、13 000 r/min 离心10 min,定量取1.2 mL上清液,氮气吹干,残渣用80%甲醇250 μL 复溶,涡旋震荡1 min后,于4℃、13 000 r/min 离心10 min,取上层清液,供LC-MS分析。

2.3 色谱条件

Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),Acquity UPLC BEH C₁₈ 保护柱(2.1 mm×5 mm, 1.7 μm),柱温35℃,流动相:含0.1%甲酸的水溶液(A)-含0.1%甲酸的乙腈溶液(B),梯度洗脱程序:0~3 min, 5%~22% B; 3~12 min, 22%~60% B; 12~16 min, 60%~70% B; 16~22 min, 70%~100% B; 22~23 min, 100% B; 23~23.1 min, 100%~5% B; 23.1~25 min, 5% B,体积流量0.3 mL/min,进样量10 μL。

2.4 质谱条件

电喷雾离子源,正离子模式下,离子源电压分别为5 500 V,离子源温度为550℃,雾化气为N₂,雾化气 Gas1 (379 kPa),辅助气 Gas2 (379 kPa),气帘气 241 kPa,解簇电压分别为80 V,碰撞能量(CE)分别为35 eV,碰撞能量扩展(CES)均为15 eV。TOF MS 扫描范围为 *m/z* 100~1 500,IDA 设

置响应值超过 100 cps 的 8 个最高峰进行二级质谱扫描, Product Ion 扫描范围为 m/z 50~1 500, 开启动态背景扣除 (DBS)。采集软件: Analyst TF 1.7.1 Software。

2.5 数据分析方法

原型成分: 使用 Peakview 2.0 软件中的 Masterview 功能导入给药肾组织和空白肾组织的液质采集数据, 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%, 以 sample/control 为 3 倍扣除空白肾组织内源性成分的干扰, 将剩余检测到的离子与体外药材提取液所检测到化合物的保留时间、碎片丰度比、母离子精确质量数及二级质谱图进行对比, 如果一致则确认为北青龙衣中的原型成分。

代谢产物: 运用 MetabolitePilot 1.5 代谢物数据处理软件, 将前期的北青龙衣药材成分数据库先建立 Compound library, 导入化合物的结构式和二级谱图; 为每一个化合物设置不同的 Biotransformation parameters, 根据化合物可能发生的代谢选择所有可能的 I 和 II 相代谢途径, 设置 Peak Finding Strategy、Generic Parameters 和 Compound-Specific Parameters; 导入给药后肾组织和空白肾组织的液质采集数据, 分别作为 sample 和 control, 结合软件给出的代谢物保留时间和二级碎片及相关参考文献推断可能代谢产物。

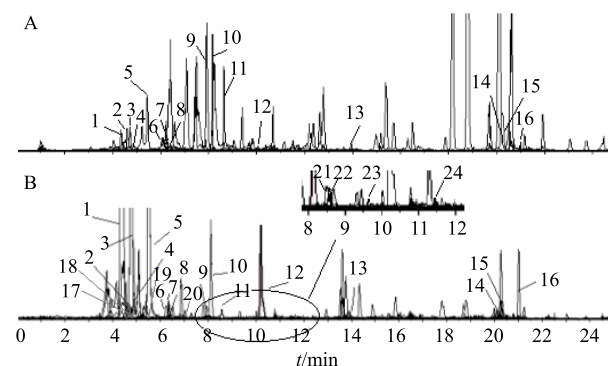
3 结果

3.1 UPLC-Q-TOF/MS 的采集

利用“2.3”和“2.4”项下建立的分析方法在正离子模式下采集的北青龙衣体外药材和肾组织样品的提取离子流图, 见图 1。

3.2 肾组织中化学成分鉴定结果

采用“2.5”项下数据分析策略, 并结合以往的文献报道^[12-17], 共鉴定和推测出 24 种化学成分, 包括 16 个原型成分和 8 个代谢产物, 其中包含 12 个萘醌类、5 个黄酮类、3 个二芳基庚烷类、4 个三萜类成分。结果见表 1。



A-北青龙衣体外药材溶液 B-含药肾组织样品
A-in vitro medicinal solution of *J. mandshurica* B- administration of kidney tissue sample

图 1 正离子模式下的提取离子流图

Fig. 1 Extracted ion chromatogram in positive mode

表 1 肾组织中化学成分鉴定结果

Table 1 Results of chemical composition in kidney tissue

序号	t_R / min	选择 离子	测定值 m/z	理论值 m/z	误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	主要二级碎片离子 (MS/MS)	鉴定结果	类别
1	4.39	$[M+H]^+$	161.058 8	161.059 7	-5.6	$C_{10}H_8O_2$	161 $[M+H]^+$, 143 $[M+H-H_2O]^+$, 133 $[M+H-CO]^+$, 115 $[M+H-H_2O-CO]^+$, 105 $[M+H-2CO]^+$, 103 $[M+H-CO-CH_2O]^+$	1,5-萘二酚	原型
2	4.78	$[M+H]^+$	195.064 7	195.065 2	-2.6	$C_{10}H_{10}O_4$	195 $[M+H]^+$, 177 $[M+H-H_2O]^+$, 159 $[M+H-2H_2O]^+$, 149 $[M+H-H_2O-CO]^+$, 131 $[M+H-2H_2O-CO]^+$, 107 $[M+H-C_3H_4O_3]^+$, 103 $[M+H-2H_2O-2CO]^+$	4,5,8-三羟基- α -四氢萘醌	原型
3	4.80	$[M+H]^+$	177.054 1	177.054 6	-3.2	$C_{10}H_8O_3$	177 $[M+H]^+$, 159 $[M+H-H_2O]^+$, 149 $[M+H-CO]^+$, 131 $[M+H-H_2O-CO]^+$, 121 $[M+H-CO-C_2H_4]^+$, 107 $[M+H-C_2H_2O]^+$, 103 $[M+H-H_2O-2CO]^+$	5-羟基-1,4-萘醌	原型
4	4.82	$[M+H]^+$	147.043 2	147.044 1	-5.6	$C_9H_6O_2$	147 $[M+H]^+$, 119 $[M+H-CO]^+$, 91 $[M+H-2CO]^+$	7-hydroxy-1 <i>H</i> -inden-1-one	原型
5	5.52	$[M+H]^+$	179.069 5	179.070 3	-4.1	$C_{10}H_{10}O_3$	179 $[M+H]^+$, 161 $[M+H-H_2O]^+$, 143 $[M+H-2H_2O]^+$, 133 $[M+H-H_2O-CO]^+$, 115 $[M+H-2H_2O-CO]^+$, 105 $[M+H-H_2O-2CO]^+$	核桃酮	原型
6	6.27	$[M+H]^+$	231.028 4	231.028 8	-2.0	$C_{12}H_6O_5$	231 $[M+H]^+$, 203 $[M+H-CO]^+$, 175 $[M+H-2CO]^+$, 147 $[M+H-3CO]^+$, 129 $[M+H-3CO-H_2O]^+$	5,8-dihydroxynaphtho [2,3-c] furan-4,9-dione	原型
7	6.35	$[M+H]^+$	191.033 0	191.033 9	-4.4	$C_{10}H_6O_4$	191 $[M+H]^+$, 163 $[M+H-CO]^+$, 145 $[M+H-CO-H_2O]^+$, 121 $[M+H-C_2H_2O-CO]^+$, 103 $[M+H-C_2H_4O_2-CO]^+$	2,5-二羟基-1,4-萘醌	原型

续表 1

序号	t_R / min	选择 离子	测定值 m/z	理论值 m/z	误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	主要二级碎片离子 (MS/MS)	鉴定结果	类别
8	6.37	$[M+H]^+$	313.144 5	313.143 4	3.3	$C_{19}H_{20}O_4$	313 $[M+H]^+$, 189 $[M+H-C_9H_8O_2]^+$, 151 $[M+H-C_{10}H_{10}O_2]^+$, 137 $[M+H-C_{11}H_{12}O_2]^+$, 119 $[M+H-C_{11}H_{14}O_3]^+$	pterocaraine	原型
9	8.03	$[M+H]^+$	273.075 4	273.075 8	-1.4	$C_{15}H_{12}O_3$	273 $[M+H]^+$, 255 $[M+H-H_2O]^+$, 153 $[M+H-C_8H_8O]^+$, 147 $[M+H-C_6H_6O_3]^+$, 119 $[M+H-C_7H_6O_4]^+$	柚皮素	原型
10	8.13	$[M+H]^+$	276.086 8	276.086 7	0.6	$C_{14}H_{13}NO_3$	275 $[M+H]^+$, 258 $[M+H-H_2O]^+$, 240 $[M+H-2H_2O]^+$, 230 $[M+H-H_2O-CO]^+$, 214 $[M+H-H_2O-CO_2]^+$, 202 $[M+H-C_3H_6O_2]^+$, 190 $[M+H-C_4H_6O_2]^+$, 175 $[M+H-C_4H_7NO_2]^+$, 147 $[M+H-C_4H_7NO_2-CO]^+$, 121 $[M+H-C_4H_7NO_2-CO-C_2H_2]^+$	4-[(1,4-二氢-8-羟基-1,4-二氧代-2-萘基)氨基]-丁酸	原型
11	8.58	$[M+H]^+$	301.070 8	301.070 7	0.3	$C_{16}H_{12}O_6$	301 $[M+H]^+$, 285 $[M+H-CH_4]^+$, 257 $[M+H-CH_4-CO]^+$, 229 $[M+H-CH_4-2CO]^+$, 213 $[M+H-CH_4-CO-CO_2]^+$, 121 $[M+H-C_9H_8O_4]^+$	ethyl 2-(2-furyl)-4-oxo-4H-chromen-3-yl carbonate	原型
12	10.22	$[M+H]^+$	343.154 2	343.154 0	0.7	$C_{20}H_{22}O_3$	343 $[M+H]^+$, 325 $[M+H-H_2O]^+$, 245 $[M+H-C_6H_{10}O]^+$, 163 $[M+H-C_{10}H_{12}O_3]^+$, 147 $[M+H-C_{11}H_{16}O_3]^+$	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
13	13.93	$[M+H]^+$	341.284 0	341.283 9	0.4	$C_{24}H_{36}O$	341 $[M+H]^+$, 323 $[M+H-H_2O]^+$, 203 $[M+H-C_9H_{14}O]^+$, 191 $[M+H-C_{10}H_{14}O]^+$	4,4,20-三甲基-8,14,16-三烯-3-孕甾醇	原型
14	20.27	$[M+H]^+$	443.388 7	443.388 4	0.8	$C_{30}H_{50}O_2$	443 $[M+H]^+$, 425 $[M+H-H_2O]^+$, 407 $[M+H-2H_2O]^+$, 221 $[M+H-C_{15}H_{26}O]^+$	白桦脂醇	原型
15	20.30	$[M+H]^+$	425.378 1	425.377 8	0.6	$C_{30}H_{48}O$	425 $[M+H]^+$, 407 $[M+H-H_2O]^+$, 285 $[M+H-H_2O-C_9H_{14}]^+$, 135 $[M+H-H_2O-C_{20}H_{32}]^+$, 123 $[M+H-H_2O-C_{21}H_{32}]^+$, 109 $[M+H-H_2O-C_{21}H_{32}-CH_2]^+$	26-methylstigmasta-5,22,25(27)-trien-3-ol	原型
16	21.02	$[M+H]^+$	423.362 1	423.362 1	-0.7	$C_{30}H_{46}O$	423 $[M+H]^+$, 217 $[M+H-C_{10}H_{16}O]^+$, 161 $[M+H-C_{10}H_{16}O-C_4H_8]^+$, 147 $[M+H-C_{10}H_{16}O-C_5H_{10}]^+$	ursa-6,12,20(30)-trien-3-ol	原型
17	4.41	$[M+H]^+$	257.011 5	257.011 4	0.2	$C_{10}H_8O_6S$	257 $[M+H]^+$, 177 $[M+H-SO_3]^+$, 159 $[M+H-SO_3-H_2O]^+$, 149 $[M+H-SO_3-CO]^+$	5-羟基-1,4-萘酮硫酸化产物	代谢
18	4.97	$[M+H]^+$	193.049 2	193.049 5	-1.8	$C_{10}H_8O_4$	193 $[M+H]^+$, 165 $[M+H-CO]^+$, 147 $[M+H-CO-H_2O]^+$, 133 $[M+H-CO-CH_4O]^+$, 119 $[M+H-2CO-H_2O]^+$	胡桃醌水解产物	代谢
19	5.50	$[M+H]^+$	189.054 4	189.054 6	-1.2	$C_{11}H_8O_3$	189 $[M+H]^+$, 171 $[M+H-H_2O]^+$, 143 $[M+H-H_2O-CO]^+$, 115 $[M+H-2CO-H_2O]^+$	2,5,8-trihydroxy-1,4-naphthoquinone 连续脱氧和甲基化产物	代谢
20	7.04	$[M+H]^+$	259.060 2	259.060 1	0.4	$C_{14}H_{10}O_3$	259 $[M+H]^+$, 241 $[M+H-H_2O]^+$, 213 $[M+H-H_2O-CO]^+$, 185 $[M+H-C_6H_2]^+$, 157 $[M+H-C_6H_2-CO]^+$, 121 $[M+H-C_7H_6O_3]^+$	ethyl 2-(2-furyl)-4-oxo-4H-chromen-3-yl carbonate 失去 C_2H_4O 后加氢产物	代谢
21	8.57	$[M+H]^+$	301.070 8	301.070 7	0.5	$C_{16}H_{12}O_6$	301 $[M+H]^+$, 286 $[M+H-CH_3]^+$, 283 $[M+H-H_2O]^+$, 267 $[M+H-H_2O-CH_4]^+$, 258 $[M+H-CH_3-CO]^+$	山柰酚甲基化产物	代谢
22	8.67	$[M+H]^+$	331.082 3	331.081 2	3.2	$C_{17}H_{14}O_7$	331 $[M+H]^+$, 315 $[M+H-CH_4]^+$, 301 $[M+H-C_2H_6]^+$, 273 $[M+H-C_3H_6O]^+$, 269 $[M+H-C_2H_6O_2]^+$	ethyl 2-(2-furyl)-4-oxo-4H-chromen-3-yl carbonate 氧化和甲基化产物	代谢
23	9.70	$[M+H]^+$	367.082 4	367.081 2	3.2	$C_{20}H_{14}O_7$	367 $[M+H]^+$, 349 $[M+H-H_2O]^+$, 331 $[M+H-2H_2O]^+$, 321 $[M+H-H_2O-CO]^+$, 275 $[M+H-C_6H_4O]^+$, 177 $[M+H-C_{10}H_6O_4]^+$	3,8,8'-trihydroxy-2,2'-binaphthalene-1,1',4,4'-tetrone 双加氢产物	代谢
24	11.29	$[M+H]^+$	327.159 4	327.159 1	0.9	$C_{20}H_{22}O_4$	327 $[M+H]^+$, 206 $[M+H-C_7H_5O_2]^+$, 163 $[M+H-C_{10}H_{12}O_2]^+$, 147 $[M+H-C_{10}H_{12}O_3]^+$, 131 $[M+H-C_{10}H_{12}O_2-CH_4O]^+$, 122 $[M+H-C_7H_5O_2-C_3H_8O]^+$	胡桃宁 A 脱甲基产物	代谢

3.2.1 原型成分鉴定 共鉴定和表征出 16 个原型成分, 分别以化合物 **5** (萘醌类)、**9** (黄酮类) 为例说明推测过程。

化合物 **5**: 正离子模式下, 其在含药肾组织中检测到的保留时间与北青龙衣体外样品中核桃酮的保留时间基本一致^[18], 二级质谱碎片一致且各个碎片的质量误差均 $<5 \times 10^{-6}$, 各碎片的丰度比也基本一致, 故推测其结构为核桃酮, 相关的对比信息见表 2, 二级质谱图见图 2, 可能的裂解途径见图 3。

化合物 **9**: 正离子模式下, 其在含药肾组织中检测到的保留时间与北青龙衣体外样品中柚皮素的保留时间基本一致^[18], 二级质谱碎片一致且各个碎片的质量误差均 $<5 \times 10^{-6}$, 各碎片的丰度比也基本一致, 故推测其结构为柚皮素, 相关的对比信息见表 3, 二级质谱图见图 4, 可能的裂解途径见图 5。

3.2.2 代谢产物鉴定 共鉴定和表征出 8 个代谢产物, 以 5-羟基-1,4-萘酮硫酸化产物为例说明推测过程。

5-羟基-1,4-萘酮硫酸化产物: 正离子模式下,

表 2 化合物 **5** 体外药材和肾组织样品比对信息表

Table 2 *In vitro* medicinal materials and kidney tissue sample information for compound 5

样品	t_R/min	m/z		二级碎片及丰度比
		测定值	理论值	
体外药材	5.50	179.069 6	179.070 3	179 (2), 161 (75), 143 (80), 133 (100), 115 (97), 105 (70)
肾组织	5.52	179.069 9	179.070 3	179 (2), 161 (80), 143 (60), 133 (100), 115 (98), 105 (68)

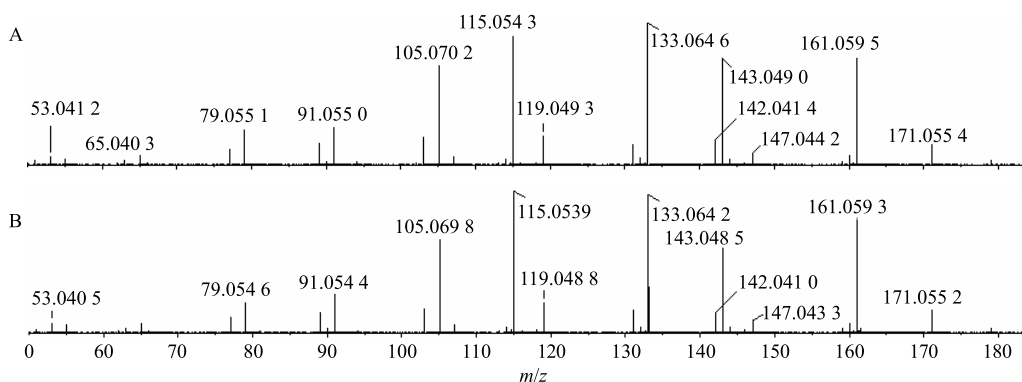


图 2 化合物 **5** 体外药材 (A) 及肾组织样品 (B) 二级质谱图

Fig. 2 *In vitro* medicinal materials (A) and kidney tissue sample (B) MS/MS spectrum for compound 5

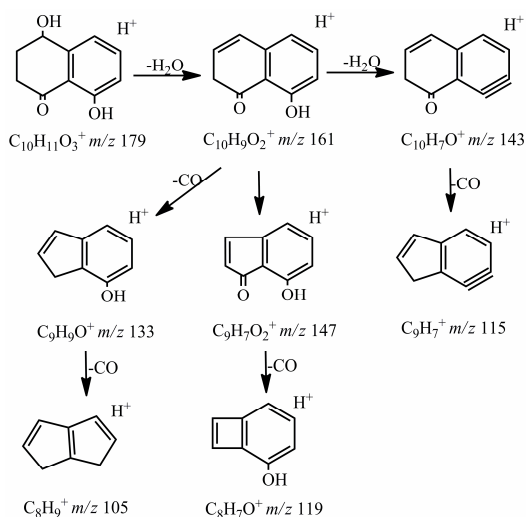


图 3 化合物 **5** 可能的裂解途径

Fig. 3 Possible fragmentation pathway of compound 5

准分子离子峰 m/z 257 $[M+H]^+$, 相对丰度较强, 比 5-羟基-1,4-萘酮准分子离子峰 177 $[M+H]^+$ 多 m/z 80, 提示增加 1 个 SO_3 发生硫酸化缩合, 结合碎片 m/z 159, m/z 149, m/z 131, 与 5-羟基-1,4-萘酮二级碎片比较符合硫酸化过程, 代谢产物匹配度见图 6, 结合以往的文献报道^[18-19], 推测可能的裂解途径见图 7。

4 讨论

大鼠 ig 给药后分别在 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 h 采集肾组织, 通过对不同时间点肾组织化学成分进行对比分析, 0.5~1.0 h 主要有萘醌类、二芳基庚烷类、黄酮和三萜类成分, 但是以 1.0 h 时各类化学成分的响应强度和数目最大。1.0 h 后各类化合物的强度降低, 且发生相应的代谢, 3.0 h 及以后原型成分中只检测到萘醌类的成分且比 1.0 h 时化合物数目

表 3 化合物 9 体外药材和肾组织样品比对信息

Table 3 *In vitro* medicinal materials and kidney tissue sample information for compound 9

样品	t_R/min	m/z		二级碎片及丰度比
		测定值	理论值	
体外药材	7.90	273.075 9	273.075 8	273 (25), 153 (100), 147 (29), 119 (8)
肾组织	8.00	273.075 4	273.075 8	273 (39), 153 (100), 147 (30), 119 (20)

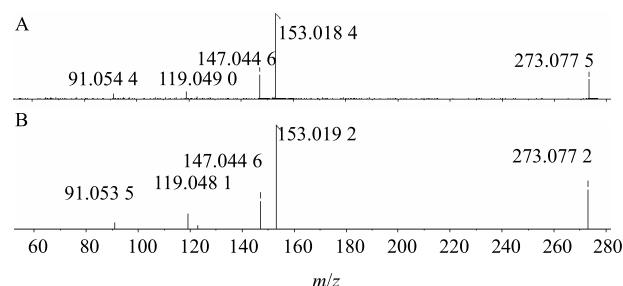


图 4 化合物 9 体外药材 (A) 及肾组织样品 (B) 二级质谱图

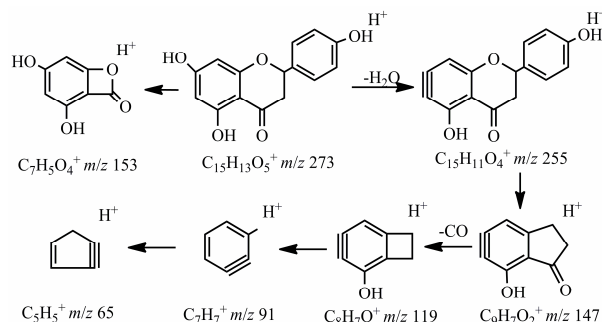
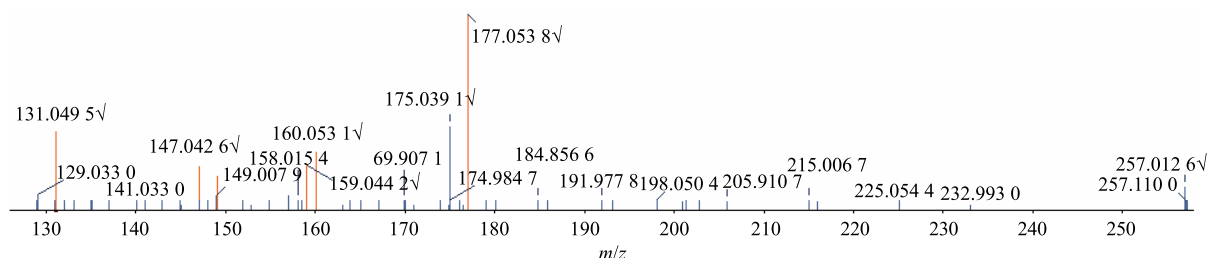
Fig. 4 *In vitro* medicinal materials (A) and kidney tissue sample (B) MS/MS spectrum for compound 9

图 5 化合物 9 可能的裂解途径

Fig. 5 Possible fragmentation pathway of compound 9



√-将推断的代谢产物结构与此二级质谱图进行匹配, 能产生相同的二级碎片

√- By matching the structure of the metabolite with this second-order mass spectrum, the same second-order fragments can be produced

图 6 5-羟基-1,4-萘酮硫酸化产物二级质谱图

Fig. 6 MS/MS spectrum for 5-hydroxy-1,4-naphthyl ketone sulfated product

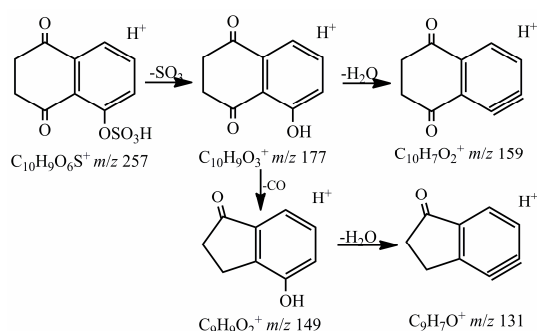


图 7 5-羟基-1,4-萘酮硫酸化产物可能的裂解途径

Fig. 7 Possible fragmentation pathway for 5-hydroxy-1,4-naphthyl ketone sulfated product

减少并且强度低。课题组前期进行的北青龙衣大鼠入血成分结果对比, 入血成分中以 0.5 h 时血中化合物的种类和数目最大并且比肾组织中化合物的响应强度大, 0.5 h 以后化合物的种类和数目减少并发生

相应的代谢, 说明北青龙衣中的化学成分进入肾组织的速度比入血速度慢, 成分先吸收入血后进入肾组织进行分布。萘醌类是北青龙衣主要抗肿瘤活性物质, 通过抑制 DNA 拓扑异构酶的活性、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成或直接的细胞毒活性而发挥抗肿瘤作用^[20]。而课题组前期进行过北青龙衣大鼠长期毒性实验, 结果表明给药后大鼠肾脏受损严重, 出现间质内静脉血管瘀血, 肾小球肿大, 肾小球毛细血管、肾小管间隙小血管充血, 肾小管上皮细胞可见颗粒变性至坏死、崩解、脱落不同程度变化, 个别官腔闭塞。说明北青龙衣中的萘醌类成分是其发挥抗肿瘤作用的药效物质基础, 但同时也能导致肾损伤, 也因此影响了青龙衣用药的安全性, 但是不同结构的萘醌类化合物对肾脏损伤的机制可能不同, 还有待进一步深入研究。

本实验采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对北青龙衣在肾组织中的化学成分进行初步研究,初步确定了北青龙衣肾组织中的原型成分及代谢产物。结果表明该方法简便、准确,为北青龙衣用药的安全性和有效性提供参考,为其体内成分代谢及组织分布研究提供方法学借鉴。

参考文献

- [1] 吴征镒,周太炎,肖培根. 新华本草纲目 (第3册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990.
- [2] 周媛媛,王 栋. 胡桃属植物抗肿瘤作用化学成分研究进展 [J]. 中国药房, 2010, 21(43): 4119-4121.
- [3] 管小玉,曲中原,邹 翔,等. 胡桃楸的化学成分研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(S1): 35-38.
- [4] 蒋丽萍,刘宝瑞,胡文静. 青龙衣的化学成分及其抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(11): 2735-2737.
- [5] 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.
- [6] 刘 薇,季宇彬. 青龙衣毒性作用及体内抗肿瘤作用的实验研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报, 2004, 20(1): 4-10.
- [7] 周媛媛,刘雨新,蒋艳秋,等. 青龙衣抗肿瘤有效部位的化学成分研究 [J]. 中草药, 2016, 47(17): 2979-2983.
- [8] 曹璐婷. 新疆紫草萘醌类成分的测定及毒性研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2015.
- [9] 李蔚仑. 萘醌色素的潜在毒性机理研究及潜在毒性评价 [D]. 南宁: 广西科技大学, 2015.
- [10] Yang B, Dong W, Wang X J, et al. UPLC-ESI-Q-TOF-MS for rapid analysis of constituents of Suanzaoren Decotion [J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(22): 3208-3215.
- [11] Liu J H, Sun H, Wang X J, et al. Serum pharmacchemistry combined with multiple data processing approach to screen the bioactive components and their metabolites in *Mutan Cortex* by UPLC-MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(4): 500-510.
- [12] 刘淑莹,宋凤瑞,刘志强. 中药质谱分析 [M]. 北京: 科学出版社, 2012.
- [13] 刘 斌. 中药成分体内代谢与分析研究 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2011.
- [14] 周 乐,赵晓莉. 黄酮类化合物口服吸收与代谢特征及其规律分析 [J]. 中草药, 2013, 44(16): 2313-2320.
- [15] 姜 璇,金 艺,袁 波,等. 复方丹参滴丸的体内代谢产物分析 [J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(2): 126-133.
- [16] 符乃光,陈 峰,魏 娜,等. LC-MS 法鉴定槲皮素在大鼠体内的主要代谢产物 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(5): 764-768.
- [17] 孙国东,霍金海,王改丽,等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的核桃楸皮成分分析 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 657-667.
- [18] 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.
- [19] 邱 峰,朱志勇,朴淑娟,等. 人口服盐酸小檗碱后尿液中代谢产物的研究 [J]. 中国医学研究与临床杂志, 2005, 3(8): 6-9.
- [20] 王增涛,金光洙. 天然来源萘醌类化合物抗肿瘤活性研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(9): 附 2-附 6.