

基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术快速分析杜仲抗补体活性部位的入血成分

郭 颀¹, 贾 佳¹, 温 泉¹, 何明珍^{1*}, 姚 闽^{2*}, 冯育林¹, 杨世林¹
(1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330006; 2. 江西省药品检验检测研究院, 江西 南昌 330006)

摘要: **目的** 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术快速分析杜仲抗补体活性部位的入血成分。**方法** 采用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇按序对杜仲 80% 乙醇提取物进行萃取, 得到 4 个部位的萃取物, 并测定其经典途径的抗补体溶血活性 (CH₅₀)。采用 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 分析技术, 并结合质谱分析中的目标化合物筛查法, 根据保留时间、精确相对分子质量和二级质谱裂解碎片鉴定有效部位的入血成分。**结果** 正丁醇部位具有较好的抗补体活性, CH₅₀为0.049 mg/mL。共鉴定了 12 种入血成分, 均为原型入血。**结论** 该方法准确稳定, 重复性好, 可用于杜仲的质量控制。

关键词: 杜仲; 抗补体; 入血成分; UHPLC-Q-TOF-MS/MS

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)04-1091-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.04.048

补体在免疫系统中发挥着重要作用, 其激活主要通过经典和旁路两条途径。补体过度激活会导致人体正常的组织产生损伤, 在许多疾病的发病过程中扮演着重要角色, 如急性肺损伤、类风湿性关节炎等^[1]。目前, 对于补体的抑制已成为治疗诸多疾病的首要关注点。据报道, 中药材中的诸多成分, 如黄酮、多糖、甾体等^[2]均具有较好的抗补体活性。

杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv., 为杜仲科植物, 为名贵的中药材, 主要分布于陕西、甘肃、河南、湖北、江西、安徽等省区^[3]。现代研究表明, 杜仲的主要成分包括黄酮、苯丙素、木脂素等, 经研究发现其具有降血压、降血糖、保肝、抗炎等活性^[4]。同时, 现代研究表明, 抗炎活性与抗补体活性息息相关^[5], 然而杜仲的抗补体活性研究却鲜见报道。本实验首先对杜仲石油醚、乙酸乙酯、正丁醇及水部位进行补体抑制活性检测, 结果显示乙酸乙酯与正丁醇部位均具有较好的抗补体活性; 其次, 在前期实验中课题组对乙酸乙酯部位和正丁醇部位的成分进行了研究, 发现 2 个部位有相交的部分, 只是含量不同, 因此, 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术, 对相交部分含量较高的正丁醇部位的入血成分进行研究, 并快速鉴别了体内 12 种原型入血成分, 以为杜仲的进一步利用开发奠定基础。

1 材料

SpectraMax i3 多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); Triple TOF™ 5600+高分辨质谱仪 (美国 Sciex 公司); Analyst TF 1.6 和 peakview 1.2 数据处理系统 (美国 Sciex

公司); LC-30A 超高压液相色谱仪 (日本岛津公司), 配置 LC-30AD 高压输液泵、CBM-20A 系统控制器、SIL-30AC 自动进样器 (美国 Molecular Devices 公司); Sartorius BT25S 型分析天平 (十万分之一, 德国赛多利斯公司); N-1001D-OSB2100 旋转蒸发仪 (南京泰诺施格科学仪器有限公司); KQ250DB 型数控超声清洗器 (巩义市予华仪器有限公司)。

京尼平苷 (批号 J-028-161216)、京尼平 (批号 10080-201409)、异绿原酸 C (批号 PRF8060542) 对照品均购自成都瑞芬思生物科技有限公司。水 (广东屈臣氏食品饮料有限公司); 巴比妥缓冲液 (pH 7.4, 北京雷根生物技术有限公司); 肝素钠和绵羊血 (北京索莱宝科技有限公司); 溶血素 (上海延慕有限公司); 甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher 公司); 甲酸 (色谱纯, 美国 Sigma 公司); 其余试剂为分析纯。

杜仲采自江西吉水县, 经江西省药品检验检测研究院高级工程师姚闽鉴定为杜仲科杜仲属植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮。

2 方法

2.1 药材提取 取杜仲药材 500 g, 粉碎后用 80% 乙醇加热回流提取 2 次, 每次 1 h, 分别依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取, 减压回收溶剂后, 即得相应部位萃取物, 减压干燥, 备用。

2.2 补体经典途径 CH₅₀测定

2.2.1 供试品溶液制备 称取杜仲石油醚、乙酸乙酯、正

收稿日期: 2020-01-19

基金项目: 2019 年度江西中医药大学校级研究生创新专项资金项目 (JZYC19S03)

作者简介: 郭 颀 (1995—), 女, 硕士, 研究方向为中药活性成分。Tel: 13970876227, E-mail: 1057020534@qq.com

*** 通信作者:** 何明珍 (1977—), 女 (瑶族), 博士, 讲师, 研究方向为中药活性成分。Tel: (0791) 87119632, E-mail: hmq07@163.com

姚 闽 (1984—), 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向为中药资源开发。Tel: 13970074523, E-mail: 2337263942@qq.com

丁醇和水 4 个部位萃取物适量。依次用 30 μL DMSO、770 μL BBS 溶液超声溶解。用 BBS 溶液对倍稀释成 8 个浓度的供试品溶液 (1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256)。

2.2.2 补体的效价测定 参考文献 [6], 取一定的豚鼠血清 (补体), 制备成 1:2 的溶液, 并对倍稀释成 1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256 溶液。取 1:3 000 溶血素 100 μL 、上述各浓度补体 200 μL 和 2% SRBC 溶液 100 μL , 溶于 200 μL BBS 溶液中, 混匀, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴温育 30 min, 离心后取上清在 405 nm 处测定吸光度 (A)。以三蒸水溶血管的吸光度作为全溶血标准, 选择达到相似吸光度的最低补体浓度作为正常溶血所需要的临界补体浓度。

2.2.3 药物经典途径抗补体活性测定 吸取“2.2.2”项下确定的临界补体浓度与供试品溶液, 分别加入 100 μL 溶血素和 2% SRBC 溶液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 30 min, 离心, 取上清液, 405 nm 处测定吸光度 (A)。

2.3 液相条件 参考文献 [7], Welch Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μm); 流动相 0.1% 甲酸 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0.01~4 min, 5% B; 4~10 min, 5%~10% B; 10~25 min, 10%~13% B; 25~37 min, 13%~27% B; 37~45 min, 2%~90% B; 45~49 min, 90% B; 49~50 min, 90%~5% B; 50~56 min, 5% B); 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 2 μL 。

2.4 质谱条件 在负离子模式下采用电喷雾电离源 (ESI); 喷雾电压 (ISVF) -4 500 V; 雾化器 (GS1) 和辅助器 (GS2) 均为 50 psi (1 psi=6.895 kPa); 质量扫描范围为 m/z 50~1 250; 数据采集时间为 56 min; 采用母离子触发的子离子 (TOF-MS-IDA-MS/MS) 扫描方式; 碰撞能量 (CE) -35 eV; 碰撞能量叠加 (CES) 15 eV。

2.5 生物样品采集 取 SD 大鼠 7 只, 随机分为杜仲给药组 (5 只) 和正常组 (2 只), 杜仲给药组给药剂量为 12 g/kg, 空白组按 12 g/kg 剂量给予生理盐水。分别于给

药后 0.5、1、2、4、6 h 对各组大鼠进行眼眶静脉丛取血约 300 μL , 离心, 取上清, 保存于 -40 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

2.6 生物样品处理 取 0.5、1、2、4、6 h 待测血浆各 30 μL 混合于 4 mL 离心管中, 加入 50 μL 甲酸, 再加入 5 倍量甲醇沉淀蛋白, 涡旋, 离心, 取上清液, 氮气吹干, 50% 甲醇 100 μL 复溶, 涡旋, 离心, 取 2 μL 上清液进行 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 分析。

3 结果

3.1 经典途径补体效价测定 将补体用 BBS 溶液对倍稀释成 8 个浓度后加到溶血体系中, 用于评价其效价, 见图 1。当稀释度为 1:2~1:32 时, 溶血率为 100%, 显示达到全溶血状态; 当补体稀释度为 1:64 时, 全溶血率为 (68.49 $\pm$ 6.1)%, 未引起全溶血, 表明个体之间有一定的差异性。因此, 稀释度为 1:32 的豚鼠血清作为经典途径抗补体实验中所使用的补体浓度。

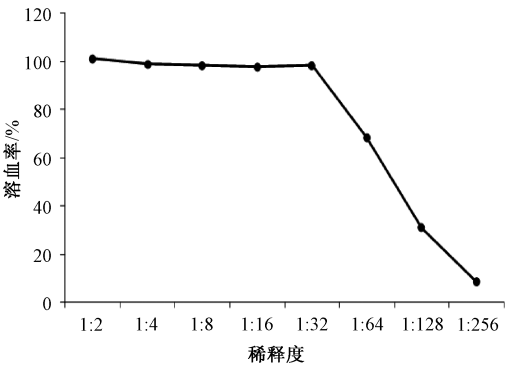


图 1 经典途径不同稀释度豚鼠血清的效价 (% , $\bar{x}\pm s,n=3$)

3.2 抗补体活性部位确定 以肝素钠为阳性对照药 [CH_{50} 为 (0.028 $\pm$ 0.006) mg/mL], 分别对杜仲石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水 4 个部位萃取物进行经典途径抗补体抑制活性测试, 得到乙酸乙酯和正丁醇部位萃取物经典途径抗补体活性 CH_{50} 值分别为 0.072、0.049 mg/mL, 石油醚和水部位萃取物无活性。结果见图 2。

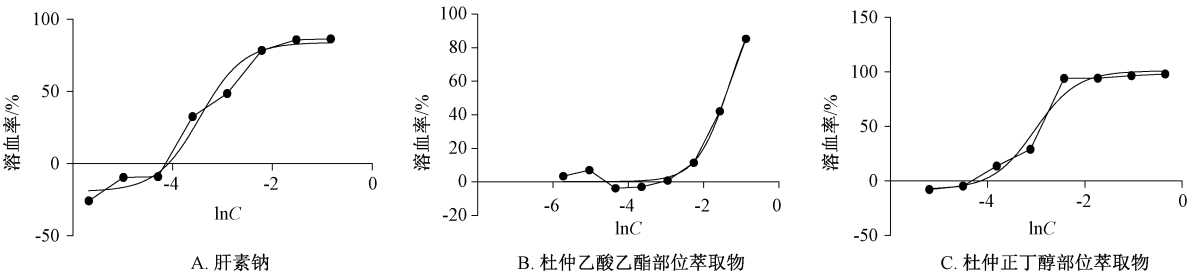


图 2 杜仲各部位抗补体活性

3.3 入血成分 采用 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对大鼠血浆进行入血成分分析, 通过与对照品进行对比, 综合对照品的保留时间及质谱信息, 对本实验所得图谱进行筛查和鉴定。在大鼠空白血浆中未出现而在大鼠给药血浆和杜仲正丁醇部位萃取物中相对应位置共同存在的色谱峰, 即为杜仲正丁醇部位萃取物原型吸收入血成分, 通过此方法共

鉴定出 12 种原型入血成分。见图 3、表 1。

3.4 入血成分解析 化合物 1 为柠檬酸, 一级质谱保留时间在 1.32 min 时, 出现 m/z 为 173.008 9 的峰, 推测为 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^-$ 的峰, 以其作为母离子进行全扫描, 产生 2 个主要的碎片离子, 碎片 m/z 129.019 1 为母离子失去一个 CO_2 分子的 $[\text{M}-\text{CO}_2]^-$ 峰, 碎片 m/z 111.009 4 为母离子失去一

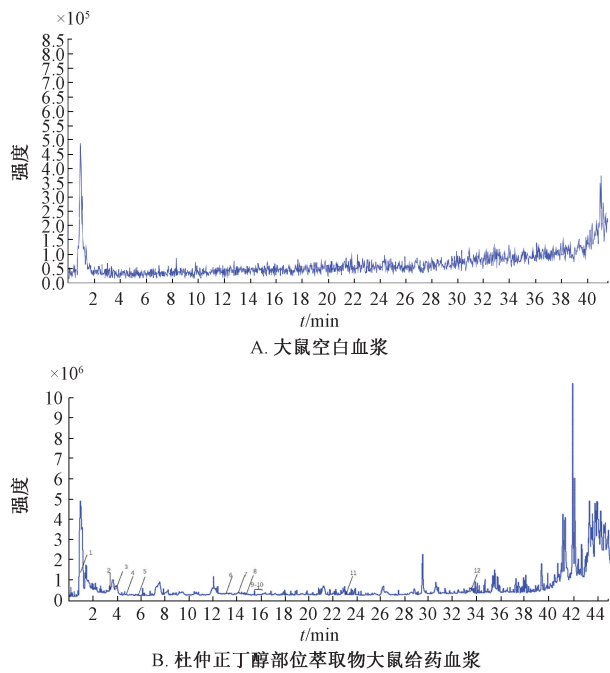


图 3 各样品总离子流图

表 1 杜仲正丁醇部位萃取物原型入血成分鉴定

编号	t_R /min	化合物	分子式	$[M-H]^-$	误差	MS ^a
1	1.32	柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	191.019 6	-0.6	173.008 9, 154.998 1, 129.019 1, 111.009 4, 87.010 0, 85.030 5
2	3.32	4-glucopyranosyloxy-3-benzoic acid	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	329.087 3	-1.6	314.067 8, 283.013 7, 265.947 6, 167.034 4, 152.010 8, 123.044 5, 108.021 5
3	3.69	京尼平苷	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	373.113 7	-0.8	211.061 2, 193.050 4, 167.071 5, 149.060 7, 123.045 2, 121.050 4, 105.035 1
4	4.89	harpagide acetate	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₂	421.134 1	-2.4	385.163 2, 375.130 4, 325.089 3, 213.078 8, 201.070 5, 179.057 1, 151.076 1
5	5.37	3,4-dihydroxy-benzenepropanoic acid	C ₁₉ H ₁₀ O ₄	301.050 6	-2.5	163.039 5, 135.044 7, 134.036 3, 119.049 1, 107.049 9, 93.036 3
6	13.63	4-[3-(glucopyranosyloxy)-2-hydroxyphenyl]-3-methyl-4-oxobutanoic acid	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀	385.115 5	3.7	223.064 4, 205.051 2, 177.056 1, 158.891 2, 145.028 3, 133.063 8, 123.048 5, 121.029 6, 119.036 5, 101.023 8
7	13.90	olivil 4'-O-β-D-glucopyranoside	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₂	537.197 6	-0.3	375.144 4, 357.130 2, 327.124 3, 312.098 2, 279.066 5, 191.072 7
8	15.05	olivil 4"-O-β-D-glucopyranoside	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₂	537.197 4	-0.7	375.143 2, 357.134 5, 345.128 7, 327.124 4, 297.110 6, 191.069 3, 179.070 6, 151.039 9, 137.023 4
9	15.24	5-O-feruloylquinic acid	C ₂₇ H ₂₀ O ₉	367.102 7	-2.1	321.154 2, 193.053 3, 191.056 5, 173.045 7, 134.037 2
10	15.33	京尼平	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	225.076 1	-3.3	207.066 1, 177.054 7, 175.038 5, 149.022 7, 147.045 4, 123.046 0, 101.025 5, 69.000 0
11	22.79	epieucmmiol	C ₁₀ H ₁₈ O ₅	217.107 6	-2.3	199.096 8, 181.086 7, 171.102 4, 155.107 5, 137.096 5
12	33.14	异绿原酸 C	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.118 7	-1.6	353.088 0, 191.056 4, 179.035 2, 173.045 2, 135.045 8

碎片 m/z 177.054 7 为母离子失去一个甲氧基分子的 $[M-CH_3O]^-$ 峰, 经对照品对照, 鉴定为京尼平, 分子式 C₁₁H₁₄O₅, 为环烯醚萜苷类。

化合物 5 为异绿原酸 C, 一级质谱保留时间在 33.14 min 时, 出现 m/z 为 353.088 0 的峰, 推测为 $[M-Glu]^-$ 的峰, 以其作为母离子进行全扫描, 产生了 1 个主要的碎片离子, 即为碎片 m/z 353.088 0 为母离子失去一个葡萄糖分子的 $[M-Glu]^-$ 峰, 经对照品对照, 鉴定为异绿原酸 C, 分子式 C₂₅H₂₄O₁₂, 为苯丙素类。

个 H₂O 分子和 CO₂ 分子的 $[M-CO_2-H_2O]^-$ 峰, 经对照品对照, 鉴定为柠檬酸, 其分子式 C₆H₈O₇, 为有机酸类。

化合物 2 为 4-glucopyranosyloxy-3-benzoic acid, 一级质谱保留时间为 3.32, PeakView 中 XIC Manager 软件推测其分子式 C₁₄H₁₈O₉, 该化合物二级质谱中, 产生碎片离子 m/z 167.034 4、152.010 8、123.044 5、108.021 5 母离子丢失 162 Da 后得到 167.034 4 碎片离子, 可能含有香草醛结构。因此, 推测该化合物为 4-glucopyranosyloxy-3-benzoic acid。

化合物 3 为京尼平苷, 一级质谱保留时间在 3.69 min 时, 出现 m/z 为 211.061 2 的峰, 推测为 $[M-Glu]^-$ 的峰, 以其作为母离子进行全扫描, 产生了 2 个主要的碎片离子, 分别为碎片 m/z 193.050 4 为母离子失去一个水分子 $[M-H_2O]^-$ 峰和碎片 m/z 167.071 5 为母离子失去一个甲基分子的 $[M-CO_2]^-$ 峰, 经对照品对照, 鉴定为京尼平苷, 分子式 C₁₆H₂₂O₁₀, 为环烯醚萜类。

化合物 4 为京尼平, 一级质谱保留时间在 15.33 min 时, 出现 m/z 为 207.066 1 的峰, 推测为 $[M-H_2O]^-$ 的峰, 以其作为母离子进行全扫描, 产生 2 个主要的碎片离子,

4 讨论

杜仲是我国传承千年的名贵药材, 其用途广泛, 被称为“植物黄金”^[8]。本实验通过抗补体经典途径研究了杜仲石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水 4 个部位萃取物的抗补体活性, 结果表明, 杜仲石油醚和水部位萃取物无明显抗补体活性, 而正丁醇部位萃取物的抗补体活性最好, 为杜仲的最佳抗补体活性部位。

UHPLC-Q-TOF-MS/MS 具有分析快速、分辨率高、灵敏度好、重复性好等特点, 是天然产物鉴定复杂成分

的有力手段^[9-10]。本实验采用此分析技术对杜仲入血成分进行研究,共鉴定出 12 种原型入血成分。根据入血成分可能是中药的有效活性成分^[11]这一观点,结合参考文献 [12-13] 分析推测其可能为潜在的抗补体活性成分。

本实验从抗补体活性与入血成分两方面对杜仲进行研究,以期有助于拓宽对杜仲药用功效的认知,同时也为进一步讨论杜仲的药效活性提供参考。

参考文献:

[1] 袁尚红,张学俊,任雅芳,等. 全杜仲胶囊治疗高血压的临床疗效[J]. 中国社区医师 (医学专业), 2012, 14 (35): 138.

[2] 王 娟,褚小刚. 全杜仲胶囊联合红花逍遥片治疗绝经后骨质疏松 38 例[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34 (4): 1086-1087.

[3] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志第 79 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 23.

[4] 郭 静,李 敏,杨付梅,等. 补体旁路激活致小鼠急性肺损伤的炎症病理机制研究[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(11): 1521-1526.

[5] Arumugam T V, Woodruff T M, Lathia J D, et al. Neuroprotection in stroke by complement inhibition and immunoglobulin therapy [J]. *Neuroscience*, 2008, 158 (3):

1074-1089.

[6] 倪付勇,谢 雪,温建辉,等. 茯苓非多糖类化学成分抗补体活性[J]. 中草药, 2019, 50(11): 2529-2533.

[7] He M, Jia J, Li J, et al. Application of characteristic ion filtering with ultra-highperformance liquid chromatography quadrupole time of flight tandem mass spectrometry for rapid detection and identification of chemical profiling in *Eucommia ulmoides* Oliv[J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1554: 81-91.

[8] 栾庆祥. 杜仲化学成分和药理作用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(9): 153-156.

[9] 唐 娟,吴 耽,陈思颖,等. 基于 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 的红禾麻提取物化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(24): 67-72.

[10] 翟兴英,张 凌,李冰涛,等. 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析半夏药材中的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7): 173-183.

[11] 常存库,王喜军. 中药血清药物化学理论与方法的意义[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2010, 12(4): 634-637.

[12] 徐 晗,章蕴毅,张建文,等. 天然产物中的抗补体活性成分[J]. 中国天然药物, 2007, 5(5): 322-332.

[13] 倪付勇,刘 露,宋亚玲,等. 金银花中抗补体活性酚酸类成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 269-274.

HPLC-MS/MS 法分析中华常春藤与洋常春藤化学成分

倪力军¹, 诸葛 敏¹, 高丽丽², 胡江宁³, 金汉台³, 金志文³

(1. 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237; 2. 中国医学科学院药物研究所, 北京 100050; 3. 浙江康恩贝中药有限公司, 浙江 丽水 323400)

摘要:目的 采用 HPLC-MS/MS 法分析中华常春藤与洋常春藤的化学成分。**方法** 中华常春藤与洋常春藤 80% 甲醇提取物的分析采用 Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 3 μm); 流动相 0.05% 甲酸-甲醇, 梯度洗脱; 体积流量 0.3 mL/min; 检测波长 205 nm。采用电喷雾 (ESI) 离子源, 在正负离子模式下采集数据。**结果** 通过相对分子量、参考文献、对照品和数据库等提供的化学信息, 从 2 种常春藤中鉴定或推断出 53 种成分。**结论** 该方法准确稳定, 重复性好, 可用于中华常春藤叶和洋常春藤叶的质量控制。

关键词: 洋常春藤; 中华常春藤; 定性分析; HPLC-MS/MS

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)04-1094-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.04.049

中华常春藤 *Hedera nepalensis* var. *K. Koch* var. *sinensis* (Tobl.) Rehder 和洋常春藤 *Hedera helix* L 为五加科常春藤属的 2 个亚种, 两者在我国大部分地区均有分布。中华常

春藤药用价值被许多中药典籍记载^[1], 功能主治祛风利湿、活血化瘀、平肝、解毒, 可用于治疗风湿关节急性结膜炎等病症。洋常春藤原产于欧洲和北非^[2], 已被列入欧

收稿日期: 2020-08-18

基金项目: 国家科技重大专项重大新药创制 (2018ZX09721003)

作者简介: 倪力军 (1963—), 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向为天然产物的分离纯化与中药新药开发。Tel: (021) 64253694, E-mail: nljfy@163.com