

UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap HR-MS 分析大黄素甲醚在大鼠体内的代谢产物

董萍萍^{1,2}, 王少平², 王喻淇³, 李浩然¹, 李启艳⁴, 魏霞⁴, 代龙^{1,2*}, 张加余^{2*}
(1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250300; 2. 滨州医学院药学院, 山东 烟台 264003; 3. 北京大学药学院, 北京 102488; 4. 山东省食品药品检验研究院, 山东 济南 250300)

摘要: **目的** 采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱 (UHPLC-Q-Exactive Orbitrap HR-MS) 分析大黄素甲醚在大鼠体内的代谢产物。**方法** 大鼠灌胃给药后, 收集空白组和给药组血浆、尿液和粪便, 固相萃取法处理。分析采用 Waters HSS T3 UPLC 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相 0.1% 甲酸-乙腈, 梯度洗脱, 在正负离子模式下进行分析。**结果** 共鉴定了 20 个代谢产物, 筛选出了 23 个潜在代谢产物, 其主要代谢途径为氧化、甲基化、葡萄糖醛酸化、糖基化、硫酸酯化等及其复合反应。**结论** 本实验可为大黄素甲醚药效学及大黄素蒽醌类物质开发利用提供借鉴。

关键词: 大黄素甲醚; 代谢产物; UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap HR-MS
中图分类号: R969.1 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)12-3524-08
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.12.052

药物代谢指药物进入体内后, 在体内多种药物代谢酶的作用下, 化学结构发生改变的过程。药物在体内经生物转化后可以被活化, 由无药理活性转化成为有药理活性或毒性的代谢物^[1]。因此, 对代谢产物的研究可为药物疗效的表达提供依据。然而, 由于代谢产物谱和药物处理过程的复杂性, 药物代谢产物和代谢途径分析一直面临诸多挑战。

近年来, 高分辨率质谱可为化合物的结构鉴定提供丰富的信息, 极大地提升了代谢产物鉴定效率, 成为中药化学成分及其体内代谢过程研究的常用方法^[2-3]。其中, 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱 (UHPLC-Q-Exactive Orbitrap Mass spectrometry) 可进行高分辨率 (140 000 FWHM) 和高质量精度质谱数据采集, 保证筛查结果的可靠和准确性。同时结合质量亏损过滤 (MDF)、中性丢失过滤 (NLF)、诊断碎片离子过滤 (NFIF) 等数据处理技术, 可为中药化学成分体内代谢研究提供更可靠、更有效的技术支撑^[4-6]。

现代研究表明, 蒽醌类化合物具有广泛的药理作用, 包括泻下作用、抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗氧化、抗损伤和乙酰胆碱酯抑制等作用^[7]。大黄素甲醚是一种蒽醌类衍

物, 广泛存在于大黄^[8]、何首乌^[9]以及土大黄^[10]等中草药中。作为这些中药的主要有效成分, 大黄素甲醚由于其良好的药理作用而受到越来越多的关注。例如, 它不仅通过诱导细胞凋亡、破坏细胞周期和抑制肿瘤转移而发挥有效的抗肿瘤活性^[11], 而且还表现出对各种真菌、细菌和病毒明显的抑制作用^[12]。此外, 许多研究报道大黄素甲醚有抗炎、抗氧化、脂质调节和神经保护作用^[13-14]。然而, 大黄素甲醚也会引起肝毒性、肾毒性和遗传毒性, 且具有剂量依赖性^[15-17]。目前, 大黄素甲醚的体内代谢过程亟需进一步研究, 以期蒽醌类成分的新药研发及中药材、制剂的全面质量控制奠定基础。

1 材料

UHPLC Q Exactive-Orbitrap HR-MS (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 配置电喷雾离子源和 XCalibur 2.1 质谱工作站; 超声波清洗机 (上海比朗仪器制造有限公司); C₁₈ 固相萃取小柱 (500 mg/3 mL, 美国 Sigma 公司); TTL-DCI 型氮吹仪 (北京同泰联科技发展有限公司); BT25S 型电子分析天平 (十万分之一, 北京赛多利斯仪器有限公司); -80 ℃超低温冷冻储藏冰箱 (美国 Thermo Fisher Scientific

收稿日期: 2021-08-09
基金项目: 山东省青创人才引育团队—中药复杂体系作用模式解析创新研究团队 (10073004); 山东省中药材及饮片标准研究项目 (2020-004, 2020-201, 2020-202, 2020-203, 2020-204); 名贵中药资源可持续利用能力建设 (2060302-1907-08); 烟台市校地融合发展中药大健康产业化平台 (2019XDRHXMPT18); 滨州医学院高层次人才科研启动基金 (2019KYQD05, 2019KYQD06, BY2018KYQD11)
作者简介: 董萍萍 (1996—), 女, 硕士生, 从事中药制剂学研究。Tel: 17864191173, E-mail: 17864191173@163.com
* 通信作者: 代龙 (1964—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药制剂学。Tel: 13156189167, E-mail: 2665275709@qq.com
张加余 (1981—), 男, 教授, 硕士生导师, 从事中药质量控制及体内代谢研究。Tel: (0535) 6913719, E-mail: zhangjiayu0615@163.com

公司)。

大黄素甲醚(批号 MUST-19032622)、大黄酸(批号 MUST-19031309)、芦荟大黄素(批号 MUST-19091912)、大黄素(批号 MUST-18110810)、大黄酚(批号 MUST-19040301)对照品均购自成都普曼斯特生物科技有限公司,纯度均大于 98%。乙腈、甲醇(质谱纯,美国 Thermo Fisher 公司);甲酸(色谱纯,德国 Merck 公司)。

雄性 SD 大鼠,体质量(200±10) g,购于济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物生产许可证号 SCXK(鲁)20190003,饲养于 SPF 级动物房,昼夜循环 12 h,温度 22~24 ℃,相对湿度 55%~65%。

2 方法

2.1 溶液制备 精密称取大黄素甲醚、大黄素、大黄酸、大黄酚、芦荟大黄素对照品各 1 mg 至 10 mL 量瓶中,甲醇超声溶解,滤过,即得对照品溶液。称取大黄素甲醚对照品 60 mg,加入 6 mL 生理盐水,配成质量浓度为 10 mg/mL 的混悬液。

2.2 动物实验与样品采集 6 只大鼠随机分为空白组和给药组,每组 3 只,实验前适应性喂养 1 周,禁食 12H,不禁水,给药组按 25 mg/kg 剂量灌胃给药^[18-20],空白组灌胃给予等量生理盐水,灌胃后分别于 0.5、1、2、4、6 h 眼眶取血 0.5 mL,置于肝素钠抗凝 EP 管中,摇匀,3 500 r/min 离心 15 min,合并上清液,得空白血浆和含药血浆,置于-80 ℃冰箱中保存备用;收集 0~24H 尿样,3 500 r/min 离心 15 min 后取上清液,于-80 ℃冰箱保存,得空白尿样与含药尿样;收集 0~24 h 粪样,晾干后碾碎,装于离心管中保存^[21-22]。

2.3 生物样品前处理 取空白组和给药组大鼠粪便各 1 g,研磨,加入 5 mL 纯水超声提取 30 min,3 500 r/min 离心 15 min 后取上清液,即得空白粪样与含药粪样^[18]。取固相萃取柱,依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水对其进行活化,吸取血浆、尿液、粪便各 1 mL 上样,依次用 3 mL 水、3 mL 甲醇洗脱,收集甲醇洗脱液,在室温下用 N₂ 吹干,残渣用 100 μL 初始流动相溶解,涡旋振荡 3 min,14 000 r/min 离心 15 min,取上清液^[23-24]。

2.4 分析条件

2.4.1 色谱 WatersHSS T3 UPLC 色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.8 μm);流动相 0.1% 甲酸(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~1 min,5% B;1~3 min,5%~40% B;3~6 min,40%~50% B;6~11 min,50%~65% B;11~19 min,65%~95% B);体积流量 0.3 mL/min;柱温 35 ℃;进样量 3 μL。

2.4.2 质谱 正负离子检测模式;鞘气、辅助气氮气(纯度≥99.99%),体积流量 30、10 L/min;毛细管温度 320 ℃;蒸发器温度 400 ℃;喷涂电压 4 500/-3 800 V;分辨率 70 000;高分辨扫描范围 *m/z*80~1 200;碰撞能 30 eV;dd-MS² 分辨率 17 500。

2.5 数据处理 所有蒽醌类化合物都具有共同的碱性 1,8-二羟基对苯二酚的结构,以及 C-3、C-5 不同取代(主要是甲基、羟基、甲氧基和羧基),经过一系列代谢反应后大黄素型 5 种游离蒽醌会相互转化^[23]。因此,本实验以 5 种大黄素型蒽醌为原型,建立其可能的代谢反应模板,包括化合物名称,分子式,结构式等,进行目标化合物的筛选与鉴定。

采用 Thermo Xcalibur 2.1 工作站进行数据采集和处理,为了获得尽可能多地获得大黄素甲醚代谢物的 ESI-MS/MS 碎片离子,选择正离子模式强度不低于 40 000、负离子模式强度不低于 10 000 的信号峰进行鉴定。根据精确分子质量,元素组成和可能发生反应,对所有母离子和碎片离子的分子式进行预测设置,参数设置为 C [5-30],H [5-60],O [2-20],S [0-2],N [0-3],环不饱和和双键数(RDB) [3-20],质量精度误差在 1.0×10⁻⁵ 以内。

3 结果

3.1 大黄素甲醚质谱裂解规律分析 在负离子模式下,大黄素甲醚的准分子离子峰[M-H]⁻为 *m/z*283.0611(C₁₆H₁₁O₅),见图 1,在其二级质谱中检测到特征离子碎片 *m/z*240 [M-H-CO-CH₃]⁻、*m/z*197 [M-H-2CO-CH₂O]⁻、*m/z*183 [M-H-2CO-CH₂-CH₂O]⁻、*m/z*211 [M-H-CO-CH₂-CH₂O]⁻,其可能的裂解规律见图 2。大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄酸的二级质谱图以及碎片离子见图 3、表 1。

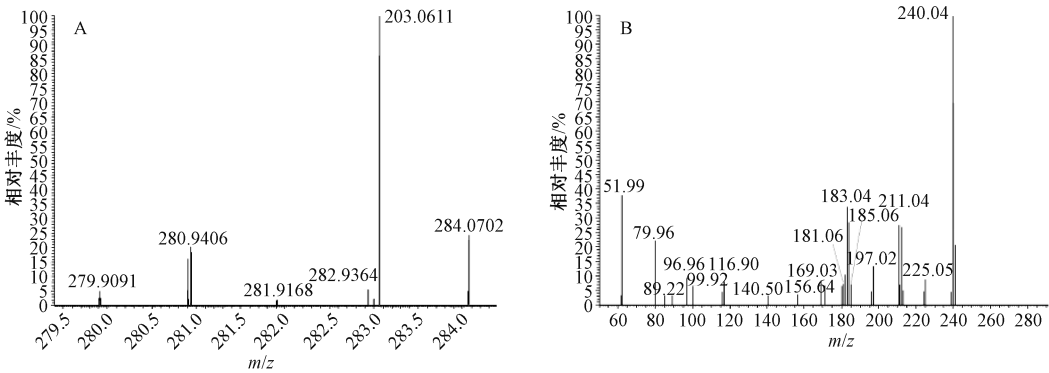


图 1 大黄素甲醚对照品一级(A)、二级(B)质谱图(负离子模式)

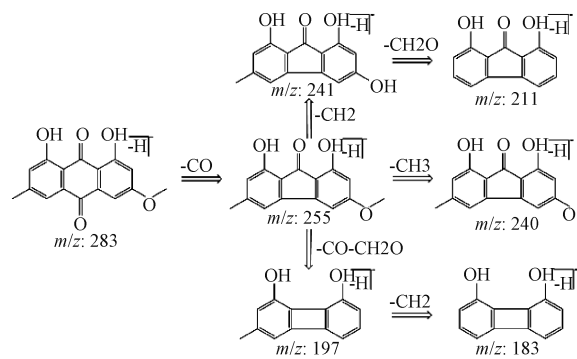


图 2 大黄素甲醚质谱裂解规律（负离子模式）

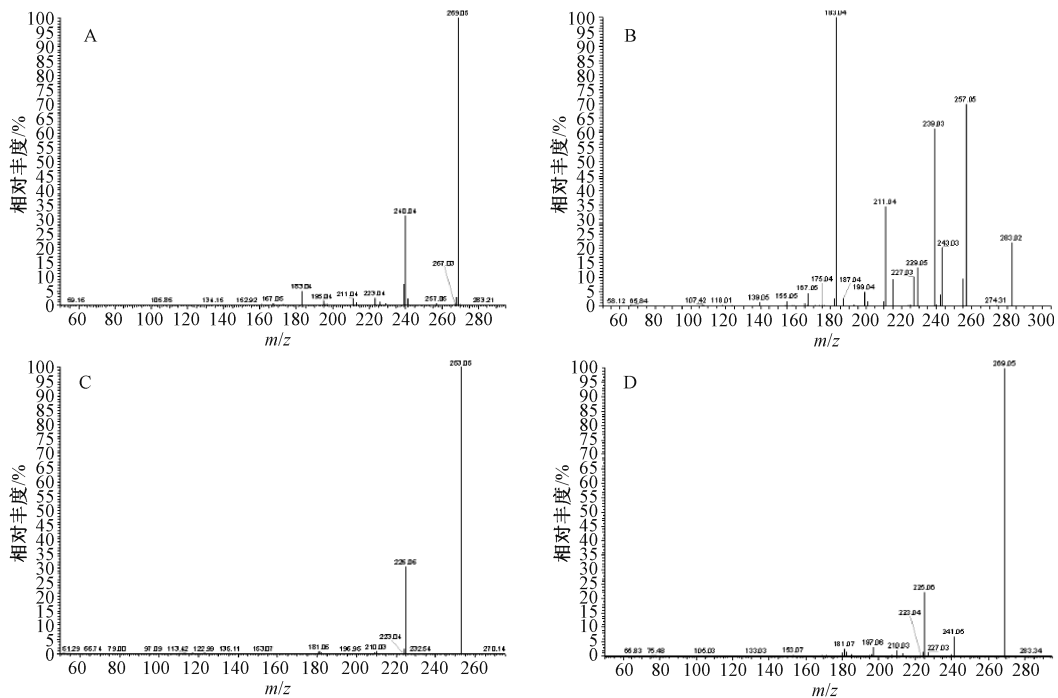


图 3 大黄素 (A)、大黄酸 (B)、芦荟大黄素 (C)、大黄酚 (D) 二级图谱

3.2 大黄素甲醚体内代谢产物分析

对大鼠给药前后的尿液、血浆、粪便进行分析，结合精确分子质量、保留时间、二级碎片离子、Clog *P* 值等参数，共初步鉴定出 20 种代谢物，具体质谱信息见表 1。

M1 在正离子模式下准分子离子为 *m/z*576.128 2，保留时间 3.25 min，推测其最可能的分子式为 C₂₅H₂₆O₁₁N₃S。根据文献和筛选所用模板，推测其为 ω-羟基大黄素-半胱氨酸。在其二级质谱中，*m/z*397 [M+H-C₅H₈N₂O₃S]⁺为谷胱甘肽第二个肽键断裂，中性丢失半胱氨酸-甘氨酸二肽而形成的碎片离子。同时，*m/z*178 为此二肽质子化碎片。离子对 *m/z*415 和 *m/z*162 为半胱氨酸中叔碳和 N 原子相连的键经过诱导碰撞断裂而形成的互补离子对。*m/z*287 为准分子离子丢失 C₁₀H₁₅N₃O₅S 而形成，经计算，该中性碎片为谷氨酸残基-半胱氨酸-甘氨酸，可确定 M1 为 ω-羟基大黄素-半胱氨酸。

M2 和 M3 准分子离子峰分别为 *m/z*445.077 5 和 445.077 3，保留时间分别为 4.48 min 和 4.54 min。经计算，

最可能的分子式为 C₂₁H₁₇O₁₁，其相对分子质量比大黄素和芦荟大黄素多 176，故推测 M1 和 M2 为 大黄素/芦荟大黄素葡萄糖醛酸化产物。其中 M2 和 M3 的二级碎片离子 *m/z*175 [GluA-H]⁻为葡萄糖醛酸碎片离子，*m/z* 269 [M-H-GluA]⁻为准分子离子峰 *m/z* 445 [M-H]⁻脱去 GluA 中性碎片产生的离子。在 M2 的 ESI-MS² 中，碎片离子 *m/z*225 与芦荟大黄素标准品的碎片离子一致，而 M3 的二级碎片中，*m/z*239 与 大黄素标准品碎片相同，故最终推测 M2 为 芦荟大黄素的葡萄糖醛酸结合产物，而 M3 为 大黄素葡萄糖醛酸结合产物。

M6 在正离子模式下的准分子离子为 *m/z*255.064 9，其二级碎片与 大黄酚 的一致。但是保留时间比 大黄酚 提前，极性比 大黄酚 大，推测其为 大黄酚 的同分异构体。M4 保留时间为 4.66 min，[M-H]⁻为 *m/z*417.118 9，其最可能分子式为 C₂₁H₂₁O₉。其二级质谱中，*m/z*175 和中性丢失 176 (*m/z*417→*m/z*241) 都证明了葡萄糖醛酸的存在。脱去葡萄糖醛酸后其分子式为 C₁₅H₁₃O₃，是 大黄酚 氢化脱氧形成的

表 1 大黄素甲醚代谢产物 (I)

序号	t_{R}/min	分子式 $[\text{M}\pm\text{H}]^{\pm}$	离子模式	理论 m/z	实际 m/z	不饱和 双键数	误差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片	尿液	血浆	粪便
大黄素 *	6.78	$\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_5$	负离子	269.045 6	269.045 4	11.5	3.680	269(100.00), 239(8.31), 183(5.46), 241(3.26)			
大黄酸 *	7.19	$\text{C}_{15}\text{H}_7\text{O}_6$	负离子	283.024 8	283.024 6	12.5	3.023	183(100.00), 257(66.89), 239(60.02), 211(33.08), 283(21.41), 243(19.31), 255(9.38),			
芦荟大黄素 *	9.11	$\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_5$	负离子	269.045 6	269.045 4	11.5	3.457	269(100.00), 225(22.34), 241(6.91), 197(3.21)			
大黄酚 *	11.29	$\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_4$	负离子	253.050 6	253.050 5	11.5	3.733	253(100.00), 225(29.40), 224(1.64), 181(0.80)			
大黄素甲醚 *	12.48	$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_5$	负离子	283.061 2	283.061 1	11.5	3.639	240(100.00), 183(32.13), 211(27.77), 241(19.88), 197(13.14)			
M1	3.25	$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_{11}\text{N}_3\text{S}$	正离子	576.128 3	576.128 2	14.5	-0.045	210(100.00), 287(30.42), 397(20.84), 415(11.07), 162(3.69), 163(3.00), 178(1.81)	+	-	-
M2	4.48	$\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{O}_{11}$	负离子	445.077 7	445.077 5	13.5	2.050	97(100.00), 445(89.27), 175(2.58), 269(1.65), 225(0.51)	-	+	-
M3	4.54	$\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{O}_{11}$	负离子	445.077 7	445.077 3	13.5	1.713	97(100.00), 445(80.84), 175(0.73), 239(0.41)	-	+	-
M4	4.66	$\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_9$	负离子	417.119 1	417.118 9	11.5	2.065	113(100.00), 121(58.09), 119(53.20), 135(30.00), 417(29.67), 241(29.26), 175(23.94)	+	+	-
M5	4.96	$\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_6$	负离子	313.070 7	313.071 4	11.5	2.381	313(100.00), 161(10.80), 269(8.54), 119(7.68), 121(6.28), 131(5.54)	-	-	+
M6	4.97	$\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_4$	正离子	255.065 2	255.064 9	10.5	-1.236	255(100.00), 183(12.23), 227(10.82)	+	-	-
M7	4.98	$\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_5$	负离子	269.044 5	269.045 5	11.5	3.903	269(100.00), 207(24.39), 225(19.23), 251(13.58)	+	-	-
M8	5.00	$\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{10}$	负离子	433.114 0	433.113 9	11.5	2.232	257(100.00), 113(72.92), 433(39.56), 175(20.94), 107(6.26), 119(4.97)	+	+	-
M9	5.28	$\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_5$	负离子	269.044 5	269.045 6	11.5	4.349	269(100.00), 207(11.94), 251(9.95), 225(7.40)	+	-	-
M10	5.44	$\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_9\text{S}$	负离子	367.011 8	367.013 0	10.5	3.272	231(57.48), 367(58.98), 287(35.44)	-	+	-
M11	5.61	$\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$	负离子	459.092 2	459.093 4	13.5	2.662	283(100.00), 240(69.98), 113(12.50), 85(12.37), 268(3.99), 175(1.48)	-	+	-
M12	5.79	$\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$	负离子	459.092 2	459.093 5	13.5	2.880	283(100.00), 240(65.33), 113(8.55), 268(4.35), 175(1.74)	-	+	-
M13	6.31	$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_4$	负离子	267.065 2	267.066 3	11.5	3.987	252(100.00), 267(69.85), 223(21.93), 208(3.07), 117(1.94)	-	+	-
M14	6.35	$\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_4$	负离子	253.049 5	253.050 7	11.5	4.484	253(100.00), 191(39.36), 209(8.82), 163(4.03)	+	-	-
M15	6.6	$\text{C}_{14}\text{H}_9\text{O}_4$	负离子	241.049 5	241.050 3	10.5	3.214	241(100.00), 179(64.88), 213(32.46), 75(1.41), 123(2.69)	+	-	-
M16	6.64	$\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_4$	负离子	253.049 5	253.050 7	11.5	4.484	253(100.00), 209(57.20), 191(24.89), 235(17.37), 163(3.13), 147(1.73), 105(1.34)	+	-	-
M17	6.8	$\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_5$	负离子	269.044 5	269.045 7	11.5	1.261	269(100.00), 241(2.96), 183(1.04)	-	-	+
M18	6.83	$\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_4$	负离子	253.050 6	253.050 4	11.5	3.496	253(100.00), 209(53.00), 191(36.91), 235(13.36), 163(4.67)	+	-	-
M19	7.53	$\text{C}_{16}\text{H}_9\text{O}_4$	负离子	265.049 5	265.050 4	12.5	3.338	265(100.00), 221(7.48), 193(5.58)	-	-	+
M20	8.93	$\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_8\text{S}$	负离子	349.002 4	349.001 5	11.5	0.561	349(100.00), 269(24.27), 197(15.24)	-	+	-

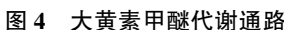
注: * 表示对照品, + 表示能检测到, - 表示不能检测到。

大黄酚蒽酮的氢化产物。 m/z 135 和 m/z 121 分别为离子 m/z 241 在中间环裂解失去 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}$ 和 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}$ 而形成的, 最终鉴定 M4 是大黄酚双氢化脱氧葡萄糖醛酸化产物。M8 的准分子离子为 m/z 433.113 9, 比 M4 高 16, 同时二级碎片离子 m/z 257 比 M4 的 m/z 241 高 16, 故推测 M8 为 M4 的羟基化产物。M7 和 M9 分别在 4.98 min 和 5.28 min 处被洗脱出来, 准分子离子分别为 m/z 269.045 5 和 m/z 269.045 6, 计算其最可能分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_5$ 。在 ESI-MS² 中, 碎片离子 m/z 225 比分子离子少 44, 推测为中性丢失一分子 CO_2 , 证明羧基的存在。根据其分子式和不饱和度, 最终 M7 和 M9 被鉴定为大黄酸蒽酮。M5 的准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 为 m/z 313.071 4, 分子式为 $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_6$ 。经碰撞诱导, 准分子离子脱去一分子 CO_2 产生二级碎片 m/z 269, 故可判定其分子结构中存在羧基。结合其不饱和度以及分子式, 其母核结构为大黄酸蒽酮化合物, 推测其为大黄酸蒽酮的双甲基化、羟基化产物。其中二级碎片离子 m/z 119 和 m/z 161

为非羧基取代侧的苯环被两个甲基取代后, 在中间环的碳基左右两侧断裂后分别得到的碎片离子, 证明双甲基取代和羟基取代分别发生在两侧苯环上, 具体结构见图 4。最终, M5 被鉴定为大黄酸蒽酮-双甲基-羟基化产物。

M10 的准分子离子为 m/z 367.013 0 ($\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_9\text{S}$), 比 ω -羟基大黄素多 82, 结合其分子式, 推测其为 ω -羟基大黄素的氢化、硫酸酯化代谢产物。由 m/z 367 $\rightarrow$ m/z 287 的中性丢失 80 可知硫酸根的存在。二级碎片离子 m/z 231 为 m/z 287 连续丢失 CO 和 C_2H_2 而形成的, m/z 187 为 m/z 287 连续丢失 4 分子水和 1 分子 CO 而成。最终, M10 被鉴定为 ω -羟基大黄素-氢化-硫酸酯化产物。

M11 和 M12 拥有共同的理论 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 值 m/z 459.092 2, 计算分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$ 。二者的 ESI-MS² 基本一致, 其中 m/z 175 和 m/z 113 为葡萄糖醛酸的特征离子碎片, m/z 283 为准分子离子中性丢失葡萄糖醛酸碎片形成。碎片离子 m/z 240 为大黄素甲醚特征碎片, 且碎片离子 m/z 268 为大黄素



M14、M16 和 M18 的 $[M-H]^-$ 为 m/z 253.049 5, 其分子式为 $C_{15}H_9O_4$ 。结合保留时间和相对分子质量, 推测三者为大黄酸蒽酮的脱羧基反应产物。其多级碎片离子 m/z

此外,本实验整合了文献报道的信息中大黄素甲醚可能发生的代谢反应及其分子式改变的情况,预测其代谢物

可能的分子式，通过准确质荷比信息，提取不同质荷比的一级质谱图，并判断其峰形，然后对比文献报道的信息，对没有二级质谱的物质进行分析。最后从一级质谱中初步

分析出 23 种可能的代谢物，分析结果如表 2 所示，其可能的结构如图 4 所示。

表 2 大黄素甲醚代谢产物（Ⅱ）

序号	t_{R}/min	分子式 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$	理论 m/z	实际 m/z	不饱和双键数	误差 $(\times 10^{-6})$	代谢物	尿液	血浆	粪便	参考文献
N1	3.26	$\text{C}_{16}\text{H}_9\text{O}_9\text{S}$	376.996 2	376.996 6	12.5	1.870	methyl-physcion- <i>O</i> -sulfate	+	-	-	[26]
N2	3.92	$\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{O}_{13}$	475.051 8	475.051 2	14.5	1.101	emodic acid-glucuronide	-	+	-	[25]
N3	4.15	$\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{O}_{10}$	429.082 7	429.082 6	13.5	2.160	chrysophanol- <i>O</i> -glucoside	+	+	-	[28-29]
N4	4.17	$\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{O}_{10}$	429.082 7	429.082 2	13.5	1.228	chrysophanol-glucuronide	+	+	+	[28-29]
N5	4.42	$\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_9$	415.103 4	415.104 0	12.5	3.882	chrysophanol-glucoside	-	-	+	[28-29]
N6	4.44	$\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{10}$	431.097 3	431.098 4	12.5	2.660	emodin- <i>O</i> -glucoside	+	+	-	[28-29]
N7	4.51	$\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{10}$	431.097 3	431.098 1	12.5	1.872	emodin- <i>O</i> -glucoside	+	+	-	[28-29]
N8	4.53	$\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{O}_{12}$	475.087 1	475.088 1	13.5	2.163	hydroxyl-physcion-glucuronide	-	+	-	[30-31]
N9	4.57	$\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{O}_{12}$	475.087 1	475.088 4	13.5	2.752	hydroxyl-physcion-glucuronide	-	+	-	[30-31]
N10	4.59	$\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{O}_{12}$	461.072 5	461.071 0	13.5	-0.894	emodic acid-glucoside	-	+	-	[25]
N11	4.62	$\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{O}_{12}$	461.072 5	461.071 7	13.5	0.516	emodic acid-glucoside	-	+	-	[25]
N12	4.78	$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_9\text{S}$	379.011 8	379.012 9	11.5	1.797	hydroxyl-physcion- <i>O</i> -sulfate	-	-	+	[32]
N13	4.82	$\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{O}_{10}$	445.112 9	445.114 0	12.5	2.509	physcion-glucoside	-	+	+	[26,28]
N14	5.02	$\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_7\text{S}$	333.007 4	333.007 2	11.5	2.463	chrysophanol- <i>O</i> -sulfate	+	+	+	[26]
N15	5.04	$\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_4$	255.065 2	255.065 7	10.5	2.018	emodinanthrone	+	+	+	[33]
N16	5.12	$\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_4$	255.065 2	255.065 8	10.5	2.214	emodinanthrone	+	+	+	[33]
N17	5.2	$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_8\text{S}$	363.016 9	363.017 6	11.5	1.833	physcion- <i>O</i> -sulfate	+	-	-	[26]
N18	5.25	$\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_7\text{S}$	333.007 4	333.007 5	11.5	3.304	chrysophanol- <i>O</i> -sulfate	+	+	+	[26]
N19	5.43	$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_9\text{S}$	379.011 8	379.012 4	11.5	1.480	hydroxyl-physcion- <i>O</i> -sulfate	+	-	-	[32]
N20	5.47	$\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{O}_{12}$	475.087 1	475.087 2	13.5	0.184	hydroxyl-physcion-glucuronide	-	+	-	[31]
N21	5.77	$\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{O}_{10}$	445.113 8	445.113 8	13.5	1.970	physcion-glucoside	-	+	-	[26,28]
N22	6.87	$\text{C}_{15}\text{H}_7\text{O}_7$	299.019 7	299.017 8	12.5	-2.906	emodic acid	-	+	-	[25,31]
N23	10.31	$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_6$	299.055 6	299.054 8	11.5	-0.584	hydroxyl-physcion	-	+	-	[34]

注：+表示能检测到，-表示不能检测到。

3.3 大黄素甲醚的体内代谢途径分析 大黄素甲醚的代谢通路图见图 4。大黄素甲醚吸收入体内后，在血液中检测到 27 个代谢产物，尿液中检测到 21 个代谢产物，粪便中检测到 11 个代谢产物。大黄素甲醚在血液中检测出了葡萄糖醛酸结合产物、硫酸酯化产物以及转化的蒽酮、氢蒽等物质，其中以葡萄糖醛酸化结合产物为主。在尿液中产生了谷胱甘肽代谢产物以及大黄酸和大黄酸蒽酮类物质。在粪便中鉴定出了大黄酚和大黄素以及它们的硫酸酯化、葡萄糖醛酸化产物。

4 讨论

为了检测尽可能多的代谢物，建立了 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 结合整合定性分析策略对其在血液中的Ⅰ相代谢物和Ⅱ相代谢物进行靶向筛选和定性分析，在正、负离子模式下对血浆，尿液和粪便中的大黄素甲醚代谢物进行了全面的分析和鉴定，并阐明了其主要的体内代谢途径。

药物体内代谢产物具有复杂多样性，并且这些复杂的代谢产物含量不一，有些甚至很难被检测到。由于质谱扫描过程中二级质谱会选择全扫描中响应前 N 强的离子进行二级扫描，这就导致一些微量代谢产物只存在于一级质谱中，而被二级扫描所忽略造成假阴性。基于此，本文整合了文献中报道的大黄素甲醚的代谢产物，对其可能存在的代谢产物进行了初步的分析。

有研究报道，蒽醌类成分在体内含量过高会有一些的毒性，在体内代谢时主要通过尿液和胆汁排泄促进其毒性的清除^[25]。在本实验中，大黄素甲醚吸收进入体内后，在大鼠血、尿、粪中均未发现其原型，在血液中检测到 27 个代谢产物，尿液中检测到 21 个代谢产物，粪便中检测到 11 个代谢产物，表明了大黄素甲醚主要通过尿液进行排泄。大黄素甲醚在大鼠体内主要进行葡萄糖醛酸结合、硫酸酯化等反应以及转化成蒽酮、氢蒽等物质，进一步进入血液，输送到各个器官，发挥其药理作用。其中在尿液中以糖苷化、硫酸酯化和谷胱甘肽结合产物为主。尿液中检测到的谷胱甘肽结合产物在肝脏中会与细胞亲核物质形成共价加和物，从而导致肝毒性^[27]。与报道一致的是，大黄素甲醚进入体内后，在代谢过程中会转化成大黄素、芦荟大黄素、大黄酸以及大黄酚等，这些物质的蒽醌类基本母核相互转化，其代谢物不仅来自自身，也来自于其他成分^[26]，其代谢途径见图 4。

本实验研究了大黄素甲醚在大鼠体内的代谢情况，为单个物质和整个蒽醌类物质在体内代谢时的相互转化提供了更进一步的依据，同时也为蒽醌类药物的临床安全用药提供了依据。本实验基于从体内代谢过程的角度研究蒽醌类化合物的药效和毒性其物质基础，对于确保相关中药临床使用的安全、有效具有重要意义。

参考文献:

[1] 杨秀伟. 中药成分代谢分析[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 3-5.

[2] 詹丽娜, 陈沁, 古淑青, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱检测食品中的牛奶过敏原酪蛋白[J]. 色谱, 2017, 35(4): 405-412.

[3] 李上富, 向丽, 蔡宗苇. 基于非靶标筛查的超高效液相色谱-三重四极杆质谱法检测尿液样品中的酰基肉碱[J]. 色谱, 2017, 35(1): 80-85.

[4] 王永丽, 张聪聪, 张凤, 等. UHPLC-Q-Exactive Orbitrap HR-MS 分析荆银颗粒的化学成分及其组织分布特征[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(22): 5537-5554.

[5] Wong P L, Nurul A F, Sitin M Y, et al. Biological Activities of Selected Plants and Detection of Bioactive Compounds from *Ardisia elliptica* Using UHPLC-Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometry[J]. *Molecules*, 2020, 25(13): 3067.

[6] 李凯琳, 熊佩, 龚开妍, 等. UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 结合离子排除列表快速鉴定茛菪马卡列丙中化学成分[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(2): 250-256.

[7] 熊汝琴, 王锐, 龚建康, 等. 鼠李属植物中的蒽醌和蒽酮成分及药理活性研究进展[J]. 山东化工, 2019, 48(22): 49-54.

[8] 金丽霞, 金丽军, 栾仲秋, 等. 大黄的化学成分和药理研究进展[J]. 中医药信息, 2020, 37(1): 121-126.

[9] 倪昌荣, 刘史佳, 卢嘉微, 等. 不同产地制何首乌 HPLC 指纹图谱研究及 5 种成分的含量测定[J]. 中医药导报, 2020, 26(9): 29-33.

[10] 杨娟艳, 王珍珍, 茅向军, 等. HPLC 法比较 3 种土大黄中游离蒽醌和总蒽醌的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(4): 615-623.

[11] Pan X P, Tong D M, Wang C, et al. Physcion induces apoptosis in hepatocellular carcinoma by modulating miR-370[J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(12): 2919-2931.

[12] Li B W, Chen L, Li B, et al. Chemical constituents, cytotoxic and antioxidant activities of extract from the rhizomes of *Osmunda Japonica* Thunb[J]. *Nat Prod Res*, 2018, 34(6): 847-850.

[13] Gao F, Liu W J, Guo Q L, et al. Physcion blocks cell cycle and induces apoptosis in human B cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells by downregulating HOXA5[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 94: 850 - 857.

[14] Hong J Y, Chun H J, Bae S Y, et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by physcion, an anthraquinone isolated from rhubarb (Rhizomes of *Rheum tanguticum*), in MDA-MB-231 human breast cancer cells[J], *Cancer Prev*, 2014, 19(4): 273 - 278.

[15] Kang L, Si L Q, Rao J, et al. *Polygoni Multiflori Radix* derived anthraquinones alter bile acid disposition in sandwich-cultured rat hepatocytes[J]. *Toxicol in Vitro*, 2017, 40: 313-323.

[16] Yu J, Xie J, Mao X J, et al. Hepatotoxicity of major constituents and extractions of *Radix Polygoni Multiflori* and *Radix Polygoni Multiflori praeparata* [J]. *Ethnopharmacol*, 2011, 137(3): 1291-1299.

[17] Chang S J, Huang S H, Lin Y J, et al. Antiviral activity of *Rheum palmatum* methanol extract and chrysophanol against Japanese encephalitis virus[J]. *Arch Pharm Res (Seoul)*, 2014, 37(9): 1117-1123.

[18] 李翠丽, 马江, 李会军. 蒽醌类化合物的吸收和代谢研究进展[J]. 药物生物技术, 2012, 19(6): 557-560.

[19] 于飞, 李苏宁. 大黄蒽醌在大鼠体内的药动学研究[J]. 现代药物与临床, 2017, 32(12): 2313-2320.

[20] 邵明晶, 冯芳. 蒽醌在正常及酒精肝损伤大鼠的药动学比较[J]. 广州化工, 2015, 43(6): 53-56.

[21] Lin Q Y, Ma C, Guan H D, et al. Metabolites identification and reversible interconversion of chelerythrine and dihydrochelerythrine *in vitro/in vivo* in rats using ultra-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 189: 113462.

[22] Liu Z H, Wang S P, Dong F, et al. Comprehensive analysis of resveratrol metabolites in rats using ultraHigh performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry[J]. *Arab J Chem*, 2020, 13(9): 7055-7065.

[23] He M L, Chu Z Z, Wu L, et al. A targeted strategy to identify untargeted metabolites from *in vitro* to *in vivo*: Rapid and sensitive metabolites profiling of licorice in rats using ultra-high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1092: 40-50.

[24] Xiang C, Qiao O X, Wang Q, et al. From single compounds to herbal extract: a strategy to systematically characterize the metabolites of licorice in rats[J]. *Drug Metab Dispos*, 2011, 39(9): 1597-1608.

[25] Xu Y, Zhang L, Wang Q, et al. An integrated strategy based on characteristic fragment filter supplemented by multivariate statistical analysis in multi-stage mass spectrometry chromatograms for the large-scale detection and identification of natural plant-derived components in rat: the rhubarb case[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 174: 89-103.

[26] Tang X Y, Zeng J X, Dai Z Q, et al. Identification and characterization of chemical constituents in Qi-Lin pills and their metabolites in rat bio-samples after oral administration using ultra-high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 188: 113402.

[27] Jiang L L, Zhao D S, Fan Y X, et al. Detection of Emodin Derived Glutathione Adduct in Normal Rats Administered with Large Dosage of *Polygoni Multiflori Radix* [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 446.

[28] Song R, Xu L, Xu F G, et al. Metabolic analysis of rhubarb extract by rat intestinal bacteria using liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. *Biomed Chromatogr*, 2011, 25(3): 417-426.

[29]

蔡 芳, 任繁栋, 任达兵, 等. 整合定性策略用于大黄素代谢物的高通量靶向鉴定[J]. 分析化学, 2019, 47(8): 1212-1222.

[30]

Song R, Xu L, Xu F G, *et al.* *In vivo* metabolism study of rhubarb decoction in rat using High-performance liquid chromatography with UV photodiode-array and mass-spectrometric detection: A strategy for systematic analysis of metabolites from traditional Chinese medicines in biological samples[J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(45): 7144-7152.

[31]

Junko K, Atsuko T, Izumi M, *et al.* Characterization of emodin metabolites in Raji cells by LC-APCI-MS/MS[J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(21): 7493-7499.

[32]

Aly A H, Edrada-Ebel R, Wray V, *et al.* Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides* [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(8): 1716-1725.

[33]

Kimakova K, Kimakova A, Idkowaiak J, *et al.* E: Phenotyping the genus *Hypericum* by secondary metabolite profiling: emodin vs. skyrin, two possible key intermediates in hypericin biosynthesis [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(29): 7689-7699.

[34]

Akinfala T O, Houbaken J, Sulyok M, *et al.* Moulds and their secondary metabolites associated with the fermentation and storage of two cocoa bean hybrids in Nigeria[J]. *Int J Food Microbiol*, 2020, 316: 108490.

基于 UHPLC-Orbitrap-MS/MS 法分析青蒿鳖甲汤化学成分

韩鑫龙^{1,2}, 成 欣^{2,6}, 孙颖超³, 李雨桐^{1,2}, 杨加顺⁴, 张静莹⁵, 唐 玲^{2,6*}
(1. 大连大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116622; 2. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515; 3. 大连三仪动物药品有限公司, 辽宁 大连 116036; 4. 南方医科大学第三附属医院, 广东 广州 510630; 5. 广东医科大学第二临床医学院, 广东 东莞 523808; 6. 广东省中药制剂重点实验室/广东省中药制剂技术工程实验室, 广东 广州 510515)

摘要: **目的** 利用 UHPLC-Orbitrap-MS/MS 法对青蒿鳖甲汤化学成分进行分析。**方法** 采用 UHPLC-Orbitrap-MS/MS 技术, 结合 Mass Frontier7.0、Compound Discoverer3.0、Xcalibur 软件、在线数据库 ChemSpider 和 mzCloud、Scifinder、Pubmed、PlantCyc, 检索青蒿鳖甲汤一级、二级质谱数据, 推断其裂解规律, 鉴别其化学成分。**结果** 共鉴定了青蒿鳖甲汤中的 71 种化学成分, 主要包括酚酸类、黄酮类、香豆素类以及萜类。**结论** 该方法快速准确, 可用于青蒿鳖甲汤化学成分的鉴定, 为该方药效物质基础研究及质量控制提供了理论参考。

关键词: 青蒿鳖甲汤; 化学成分; UHPLC-Orbitrap-MS/MS

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)12-3531-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.12.053

青蒿鳖甲汤, 最早出现于清代叶天士《临证指南医案·卷五·温热·热陷血分王案》, 后在温病学家吴鞠通著的《温病条辨·卷三·下焦篇·风温》条文十二中又有记载。其药方为青蒿、鳖甲、细生地、知母与丹皮, 此方相比叶天士的来看, 去淡竹叶, 规范了用量, 使方证配伍更为严谨切合, 并冠以方名做出方论, 青蒿鳖甲汤就是由此而来^[1]。

青蒿鳖甲汤广泛应用于临床各科发热症候的病症治疗, 除此之外对恶性肿瘤、泌尿系统疾病、更年期综合征等也有较好的疗效^[2]。有关这一方剂的化学成分分析较为鲜见。因此, 探明其化学成分对其药效物质基础、质量控制

方向上有重要意义^[3]。

近年来, 超高效液相色谱-高分辨质谱联用技术凭借其高分辨、高精度等优点在天然产物的鉴定中得到了广泛的应用。本研究利用超高分辨三合一质谱仪对青蒿鳖甲汤的主要化学成分进行快速、全面的结构鉴定, 以期为该方药效物质基础及质量控制提供理论支持。

1 材料

1.1 仪器 液质联用系统(美国 Thermo Fisher 公司), 包括高效液相色谱仪、自动进样器、柱温箱、二元泵、质谱; CPA225D 电子分析天平(德国赛多利斯公司); JP-080ST 超声波清洗器(深圳市洁盟清洗设备有限公司); 旋转蒸

收稿日期: 2020-05-23

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81573661); 广东医科大学帮扶专项资金(4SG19044G, 4SG19057G)

作者简介: 韩鑫龙, 硕士生, 从事天然药物活性成分研究。E-mail: 429148868@qq.com

* 通信作者: 唐 玲(1977—), 女, 教授, 硕士生导师, 从事中药及复方药效物质基础及作用机理研究。E-mail: tangyuling6688@163.com