

# HPLC-MSn法分析当归乙酸乙酯提取物在大鼠体内的代谢产物

王璐\*,徐风,刘广学,尚明英#,蔡少青(北京大学药学院天然药物学系,北京 100191)

中图分类号 R931.71;R917;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)47-4425-06  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.47.04

**摘要** 目的:探讨当归乙酸乙酯提取物的抗凝血活性药效物质及其显效形式。方法:采用高效液相色谱-二极管阵列-电喷雾飞行时间质谱联用(HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MSn)技术对当归乙酸乙酯提取物的化学成分进行鉴别,并对其在大鼠体内的代谢产物进行分析。色谱柱为Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温为28℃,流动相为0.1%甲酸水-甲醇(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为280 nm。结果:通过对当归乙酸乙酯提取物的成分进行分析,共指认出22个化合物,其中当归相关研究中首次报道的化合物为4,7-二羟基-3-丁基苯酞;从大鼠含药尿液中共指认出18个化合物,包括原形成分4个,以及当归相关研究中首次报道的代谢产物14个,其中新化合物2个,分别为*N,N*-4,5-alkene-ligustilide-6/7-*O*-sulphate和6,7-dihydrosenkyunolide F-9-sulphate-6/7-thiol。结论:该方法能准确、快速地从复杂的生物样品中筛选和鉴定相关代谢产物,可为阐明当归抗凝血活性的药效物质及显效形式(原形、代谢产物或两者兼有)提供化学依据。

**关键词** 当归;乙酸乙酯提取物;高效液相色谱-二极管阵列-电喷雾飞行时间质谱;代谢产物;药效物质

## Analysis of the Metabolites of Ethyl Acetate Extract from *Angelica sinensis* in Rats by HPLC-MSn

WANG Lu, XU Feng, LIU Guang-xue, SHANG Ming-ying, CAI Shao-qing (Dept. of Natural Medicine, School of Pharmacy, Peking University, Beijing 100191, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To analyze the anticoagulant activity substance and effective form of ethyl acetate extract from *Angelicae sinensis* in rats. METHODS: The chemical constituents of ethyl acetate extract from *A. sinensis* were identified by HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MSn, and the in vivo metabolites of ethyl acetate extract were analyzed. The determination was performed on Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column, using 0.1% formic acid-methanol as mobile phase (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 28℃, and UV detection was set at 280 nm. RESULTS: By analyzing ethyl acetate extract from *A. sinensis*, 22 compounds were detected and identified; among them, 4,7-dihydroxyl-3-butylphthalide was reported for the first time. And 18 compounds were detected and identified in rat urine, containing 4 prototype and 14 metabolites reported for the first time, among which, *N,N*-4,5-alkene-ligustilide-6/7-*O*-sulphate and 6,7-dihydrosenkyunolide F-9-sulphate-6/7-thiol were new compounds. CONCLUSIONS: The method can screen and identify related metabolites from complex biological specimens accurately and rapidly, and provide chemical evidence for interpreting effective forms and pharmacodynamic substances of *A. sinensis* anticoagulant activity.

**KEYWORDS** *Angelicae sinensis*; Ethyl acetate extract; HPLC-ESI-IT-TOF-MSn; Metabolites; Pharmacodynamic substances

当归为常用中药,始载于《神农本草经》。2010年版《中国药典》记载,当归为伞形科植物华当归*Angelica sinensis*(Oliv.) Diels的干燥根,具有补血活血、调经止痛、润肠通便的功效<sup>[1]</sup>。

当归的主要化学成分包括苯酞类、酚酸类和黄酮类化合物<sup>[2]</sup>。应用气相色谱-质谱(GC-MS)技术研究当归中化学成分的报道较多,主要是分析当归挥发油,包括藁本内酯、丁烯基苯酞和蒎烯等成分<sup>[3]</sup>。随着液相色谱-质谱(LC-MS)技术的广泛应用,相关研究从当归中共指认出20多种化合物,其中以苯酞类和酚酸类化合物为主<sup>[4]</sup>。当归广泛应用于补血活血的方剂中,素有“十方九归”的美誉。含当归的中药复方(如当归补血汤、当归芍药散、补阳还五汤)体内、外代谢研究结果表明,与当归有关的主要代谢产物为藁本内酯、正丁基苯酞和阿魏酸的硫酸酯化产物,以及洋川芎内酯 I 的半胱氨酸结合产物

和乙酰半胱氨酸结合产物<sup>[5]</sup>。但是,当归单味药的体内吸收和代谢研究仅见文献<sup>[6]</sup>对ig当归汤的家兔血液进行分析,其发现了10个代谢产物,但是未给出代谢产物的结构。

有文献报道,当归水煎液、当归多糖、挥发油、阿魏酸和苯酞类均有不同程度的抗凝血活性<sup>[7-9]</sup>。本研究室前期研究发现,当归乙酸乙酯提取物具有较好的抗凝血活性(文章待发表)。为了探讨当归乙酸乙酯提取物的抗凝血活性的药效物质及其显效形式,本研究采用高效液相色谱-二极管阵列-电喷雾飞行时间质谱联用(HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MSn)技术,对当归乙酸乙酯提取物及其在大鼠体内的代谢产物进行了研究,以为其药理作用机制和新药研发提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);IT-TOF-MSn LC-MS联用仪,包括2个LC-20AD输液泵、1个LC-20AB输液泵、CBM-20A系统控制器、DGU-20A3型脱气单元、SIL-20AC型可制冷自动进样器、CTO-20A型SPD-M20A柱温

\* 硕士研究生。研究方向:生药质量控制。E-mail: hanayouki@163.com

# 通信作者:副教授,博士。研究方向:生药学。电话:010-82802534。E-mail: myshang@bjmu.edu.cn

箱、DAD检测器、ESI离子源、MS系统(日本岛津公司);万分之一电子天平(美国OHAUS公司);Milli-Q型超纯水制备仪(美国Millipore公司);Retavapor R-200型旋转蒸发器(瑞士Buchi公司);RT-02A型小型粉碎机(北京弘荃翔和机械技术有限公司);MX-S涡旋仪[大龙兴创实验仪器(北京)有限公司];DXL-DL型大鼠代谢笼(苏州市冯氏实验动物设备有限公司);98-1-B型电热套(天津泰斯特仪器有限公司)。

## 1.2 药材

当归于2012年8月购自甘肃省岷县多宝大药房,产地为甘肃省岷县,经北京大学药学院天然药物学系尚明英副教授鉴定为真品。标本存放于北京大学药学院生药标本室,编号为7356。

## 1.3 药品与试剂

阿魏酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110773-200611);甲醇(色谱纯,美国Fisher公司);甲酸(色谱纯,美国Mreda Technology公司);甲酸(色谱纯,天津西华特工厂);超纯水(18.2 M $\Omega$ ,总有机碳<5 ppb);石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、无水乙醇、甲醇和二甲基亚砜(分析纯,北京化工厂);大孔树脂(HP-20,日本三菱化学株式会社)。

## 1.4 动物

SD大鼠, $\delta$ ,体质量250~300 g,购于北京大学医学部实验动物科学部[实验动物使用许可证号:SYXK(京)2011-0039]。所有动物实验均得到北京大学医学伦理委员会的许可。

## 2 方法

### 2.1 当归乙酸乙酯提取物的制备

取当归药材(全归)20.0 g,粉碎,过40目筛,加95%乙醇200 ml(生药10倍量),浸泡过夜,电热套加热回流提取1.0 h,滤过。药渣加50%乙醇160 ml(生药8倍量),加热回流提取2.0 h,滤过。合并2次滤液,低温(45℃)减压回收溶剂至干,得当归提取物16.47 g。将上述提取物加18.0 ml水(等量)溶解,先用等量的石油醚萃取,水层再用等量的乙酸乙酯萃取,萃取液经低温(45℃)减压回收溶剂,得当归乙酸乙酯提取物0.36 g。当归乙酸乙酯提取物加5 ml甲醇溶解,过0.45  $\mu$ m微孔滤膜,滤液于4℃贮藏,备用。将同法制备的当归乙酸乙酯提取物加水制成质量浓度为11 mg/ml的混悬液(ig之前经涡旋仪振荡混匀),4℃贮藏,备用。

### 2.2 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5  $\mu$ m);流动相:0.1%甲酸水(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~50 min,10%~100% B;50~65 min,100% B);流速:1.000 0 ml/min;检测波长:280 nm;柱温:28℃;进样量:10  $\mu$ l。

### 2.3 MS条件及数据处理

离子源:ESI,正负离子切换检测;CDL温度:200℃;加热块温度:200℃;氮气流速:1.5 L/min;接口电压:4.5 kV(+),3.5 kV(-);检测电压:1.7 kV;扫描范围:100~1 000 cm<sup>-1</sup>;分流:0.200 0 ml/min。所有数据的采集和处理采用Shimadzu LCMS Solution Version 3.60软件,分子式和元素组成预测采用Formula Predictor 1.2和Accurate Mass Calculator软件。

### 2.4 动物实验

6只SD大鼠分别置于大鼠代谢笼中饲养。适应性饲养6 d,禁食12 h后,收集空白尿液2 d,之后ig给药(102.6 mg/kg),

每天早、晚各1次,连续3 d,及时收集含药尿液样品(加入少量乙醇防腐)。

## 2.5 样品处理

将空白和含药尿液于45℃下减压浓缩至近干,分别加入10倍量的甲醇,超声提取并沉淀其中的蛋白30 min,转移至50 ml离心管中,以离心半径为6 cm、5 000 r/min离心30 min,取上清液,减压蒸干得空白和含药尿液提取物。所得提取物分别溶于10 ml水中,充分溶解后,经大孔树脂柱预处理,用5~8倍柱体积的水洗脱,除去内源性水溶性成分和无机盐类;再用甲醇洗脱至洗脱液近无色,合并洗脱液,减压回收甲醇,得样品。取0.05 g样品,加5 ml甲醇溶解,经0.45  $\mu$ m微孔滤膜滤过,滤液于4℃贮藏,备用。

## 2.6 大鼠含药尿液中代谢产物分析

化合物结构鉴定思路:首先,通过对对比含药尿液和空白尿液的一级MS,确定代谢产物的准分子离子峰[M+H]<sup>+</sup>或者[M-H]<sup>-</sup>或者[M+HCOO]<sup>-</sup>;然后通过岛津工作站中的分子式预测功能,预测出代谢产物的分子式,一般要求分子质量误差在5 ppm以内,并且满足氮律及不饱和度(DBE)规则;再根据代谢产物的MS<sup>2</sup>和三级MS(MS<sup>3</sup>)裂解碎片信息,进行相关基团和母核结构的推导;最后参照当归乙酸乙酯提取物所含成分的MS裂解规律对代谢产物结构进行推测和指认。

## 3 结果

### 3.1 当归乙酸乙酯提取物的化学成分分析

通过对化合物的紫外吸收图谱及MS裂解信息进行分析,同时结合文献数据<sup>[9-13]</sup>,对当归乙酸乙酯提取物的一些主要化学成分进行指认。结果,从当归乙酸乙酯提取物中共指认出了22个化合物,其中E6为当归中首次指认的化合物。E6的鉴定:在正离子模式下,一级MS中E6的准分子离子峰[M+H]<sup>+</sup>为 $m/z$  223.09,预测其分子式组成为C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>;在负离子模式下,一级MS中E6的准分子离子峰[M-H]<sup>-</sup>为 $m/z$  221.08。在正离子的二级质谱(MS<sup>2</sup>)图中可见, $m/z$  205.07为[M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>峰;在负离子MS<sup>2</sup>中可见, $m/z$  203.06为[M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>峰, $m/z$  159.07为[M-H-H<sub>2</sub>O-COO]<sup>-</sup>峰, $m/z$  119.05为[M-H-H<sub>2</sub>O-COO-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>]<sup>-</sup>峰;并且E6的紫外最大吸收波长为283 nm,与文献中报道的4,7-二羟基-3-丁基苯酞的数据基本一致<sup>[11]</sup>。因此,推测E6为4,7-二羟基-3-丁基苯酞。色谱、负离子基峰色谱(BPC)见图1(图中E1. phthalic acid; E2. vanillic acid; E3. feruloylquinic acid; E4. ferulic acid; E5. senkyunolide J; E6. 4, 7-dihydroxy-3-butylphthalide; E7. E-6, 7-dihydroxyhydroxyligustilide; E8. senkyunolide I; E9. senkyunolide H; E10. senkyunolide F; E11. senkyunolide D; E12. Z-6, 7-exopoyligustilide; E13. 3-butyl-4-hydroxyphthalide; E14. senkyunolide A; E15. coniferyl ferulate; E16. E-ligustilide; E17. Z-ligustilide; E18. octadenoic acid; E19~22. phthalide dimer)。当归乙酸乙酯提取物中的主要化合物的化学结构见图2;当归乙酸乙酯提取物中的化学成分及其LC-MS数据见表1。

### 3.2 体内原形成分和代谢产物的结构推测

从ig当归乙酸乙酯提取物的大鼠含药尿液中共指认出化合物18个,包括原形成分4个,以及当归相关研究中首次报道的代谢产物14个,其中阿魏酸相关产物2个、洋川芎内酯H/I相关产物3个、洋川芎内酯D相关产物1个、洋川芎内酯F相关产物1个、谱图藁本内酯类相关产物7个。新化合物2个,分别

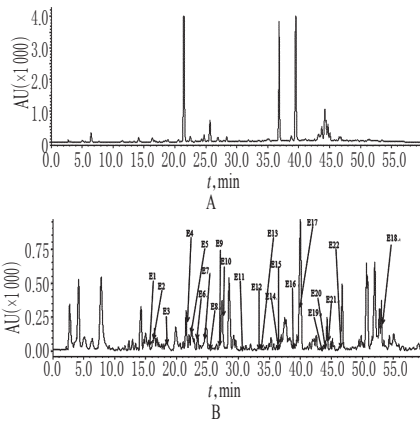


图1 当归乙酸乙酯提取物的高效液相色谱图和负离子基峰色谱图

A.高效液相色谱图;B.负离子基峰色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram and negative ion BPC chromatogram of ethyl acetate extract from *A. sinensis*

A.HPLC chromatogram;B.negative ion BPC chromatogram

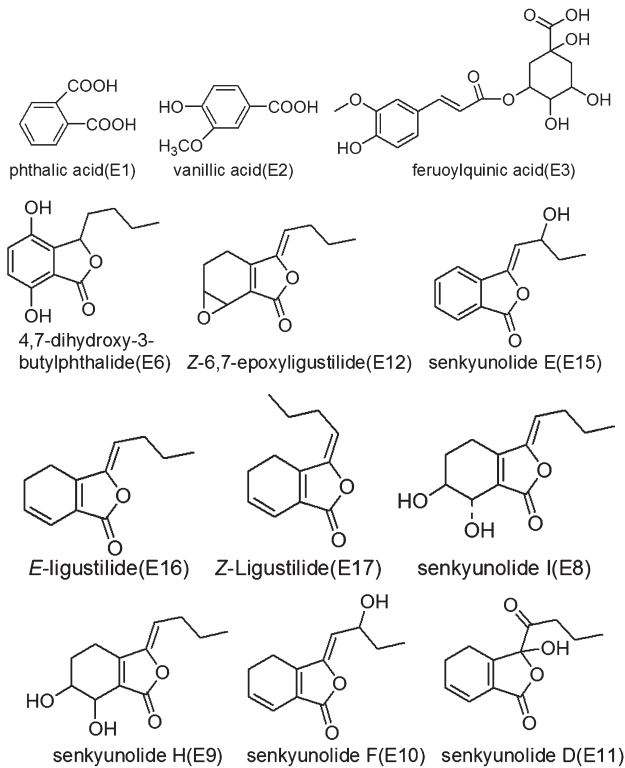


图2 当归乙酸乙酯提取物中主要化合物的化学结构

Fig 2 The major compounds identified in ethyl acetate extract of *A. sinensis*

为6,7-dihydroksenkyunolide F-9-sulphate-6/7-thiol (M11)和N, N-4,5-alkene-ligustilide -6/7-O-sulphate (M12)。大鼠空白尿液和含药尿液的BPC见图3(图中M1. 4,7-dihydroxy-3-butylphthalide;M2. Z-6,7-epoxyligustilide;M3. 3-butyl-4-hydroxyl phthalide;M4. octadecenoic acid;M5. 3-methoxyl benzene propanic acid-4-sulphate;M6. cysteinohroferulic acid;M7. 6,7-dihydroksenkyunolide D-7-sulphate;M8. senkyunolide H/I-6/7-sulphate;M9. senkyunolide H/I-4,5-alkene-6/7-sulphate;M10. senkyunolide H/I-4,5-alkene-6/7-sulphate;M11. 6,7-dihydro-

senkyunolide F-9-sulphate-6/7-thiol;M12. N, N-4,5-alkene-ligustilide-6,7-O-sulphate;M13~15. Z/E-ligustilide-6/7/3/9-O-sulphate;M17~18. Z/E-butylidenephthalide-O-sulphate)。从大鼠含药尿液中指认的化学成分见表2;大鼠ig当归乙酸乙酯提取物后含药尿液中代谢产物的化学结构见图4。

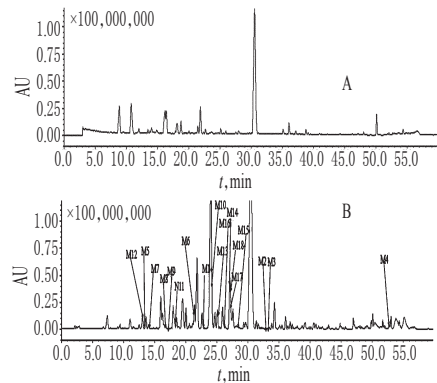


图3 大鼠空白尿液和含药尿液的负离子基峰色谱图

A.空白尿液;B.含药尿液

Fig 3 Negative ion BPC chromatograms of blank urine and drug-containing urine samples

A.blank urine;B.drug-containing urine

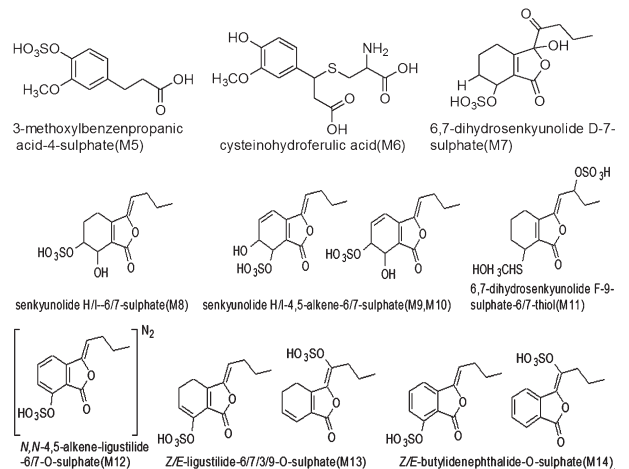


图4 大鼠ig当归乙酸乙酯提取物后含药尿液中代谢产物的化学结构

Fig 4 Metabolites in drug-containing urine of rats after intragastric administration of ethyl acetate extract from *A. sinensis*

3.2.1 原形成分 从含药尿液中共指认出原形成分4个,包括苯酚类化合物3个:4,7-dihydroxy-3-butylphthalide、Z-6,7-epoxyligustilide和3-butyl-4-hydroxylphthalide,以及脂肪酸类化合物1个:octadecenoic acid。

3.2.2 阿魏酸相关产物 经过LC-MS分析,参考相关文献,指认M5和M6为阿魏酸相关的代谢产物<sup>[7]</sup>。在负离子模式下,代谢产物M5的准分子离子峰[M-H]<sup>-</sup>为m/z 275.02,预测其分子式为C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>S。在MS<sup>2</sup>中,可见碎片m/z 195.06为准分子离子丢失SO<sub>3</sub>中性片段产生的碎片离子,预测其分子式组成为C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>,是阿魏酸加氢还原产物;m/z 177.05为[M-H-SO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>峰。因此,推测代谢产物M5为3-methoxyl benzenepropanic acid-4-sulphate。在负离子模式下,代谢产物

表1 从当归乙酸乙酯提取物中指认的化学成分及其LC-MS数据

Tab 1 Chemical constituents identified in ethyl acetate extract of *A. sinensis* and their LC-MS data

No.	$t_R$ , min	[M-H] <sup>-</sup> , $m/z$	[M <sup>+</sup> H] <sup>+</sup> , $m/z$	Meas., $m/z$	Pre., $m/z$	Error, ppm	DBE	Formula	Predicted components
E1	15.558	165.019 3	167.032 7	165.018 7	165.019 3	-2.42	6.0	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	phthalic acid <sup>[16]</sup>
E2	16.512	167.035 3	169.048 2	167.035 3	167.035 0	1.80	5.0	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	vanillic acid <sup>[16]</sup>
E3	18.443	367.103 4	369.116 0	367.103 4	367.103 5	-0.27	8.0	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	feruloylquinic acid <sup>[20]</sup>
E4	21.505	193.050 6	195.063 8	193.050 9	193.050 6	1.55	6.0	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	ferulic acid <sup>[16,21]</sup>
E5	22.790	225.064 0	227.127 0	227.127 0	227.127 8	-3.52	4.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	senkyunolide J <sup>[9]</sup>
E6*	23.070	221.081 9	223.095 8	221.080 6	221.081 9	-4.52	6.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	4,7-dihydroxy-3-butylphthalide <sup>[19]</sup>
E7	24.485	223.090 1	225.111 9	225.111 9	225.112 1	-0.89	5.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	<i>E</i> -6,7-dihydroxyhydroxyligustilide <sup>[17]</sup>
E8	25.922	223.090 3	225.112 4	225.112 4	225.112 1	1.33	5.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	senkyunolide I <sup>[17-18]</sup>
E9	26.960	223.068 4	225.111 3	225.111 3	225.112 1	-3.55	5.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	senkyunolide H <sup>[17-18]</sup>
E10	27.342		207.100 8	207.100 8	207.106 1	-3.86	6.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	senkyunolide F <sup>[17]</sup>
E11	30.848	221.080 0	223.099 8	221.080 0	221.081 9	0.00	6.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	senkyunolide D <sup>[9]</sup>
E12	33.020	205.086 0	207.099 1	205.086 0	205.087 0	-4.88	6.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	<i>Z</i> -6,7-exposyligustilide <sup>[17]</sup>
E13	33.462	205.087 0	207.100 8	205.085 9	205.087 0	-5.36	6.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	3-butyl-4-hydroxyphthalide <sup>[9]</sup>
E14	36.453	191.078 4	193.121 6	193.120 6	193.122 3	-3.62	5.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	senkyunolide A <sup>[9]</sup>
E15	37.983	203.070 1	205.083 2	203.070 1	203.071 4	-6.40	7.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	senkyunolide E <sup>[9]</sup>
E16	38.882		191.105 6	191.105 6	191.106 7	-5.76	6.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	<i>E</i> -ligustilide <sup>[17,18,19]</sup>
E17	39.157		191.105 9	191.105 9	191.106 7	-4.19	6.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	<i>Z</i> -ligustilide <sup>[17,18,19]</sup>
E18	53.052	281.248 2		281.248 2	281.248 6	-1.42	2.0	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	octadecenoic acid <sup>[15]</sup>
E19	43.548	379.214 0	381.205 4	381.205 4	381.206 0	-1.57	11.0	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	phthalide dimer <sup>[17,19]</sup>
E20	44.042	379.206 0	381.205 9	381.205 9	381.206 0	-0.26	11.0	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	phthalide dimer <sup>[17,19]</sup>
E21	44.487	379.190 0	381.205 2	381.205 2	381.206 0	-2.10	11.0	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	phthalide dimer <sup>[17,19]</sup>
E22	46.582		381.208 0	381.208 0	381.206 0	-1.74	11.0	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	phthalide dimer <sup>[17,19]</sup>

注: \* 为新化合物

note: " \* " means new chemical constituent

表2 大鼠含药尿液中指认的化学成分

Tab 2 Chemical constituents identified in drug urine of rats

No.	$t_R$ , min	[M-H] <sup>-</sup> , $m/z$	Meas., $m/z$	Pre., $m/z$	Diff, ppm	DBE	Formula	Main Fragments ions	Identification
M1(E6)	23.095	221.081 0	211.081 0	221.081 9	-4.07	6.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	203.071 6, 159.078 4, 119.051 0	4,7-dihydroxy-3-butylphthalide
M2(E12)	33.037	205.085 9	205.085 9	205.087 0	-5.36	6.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	161.097 1, 118.934 9	<i>Z</i> -6,7-exposyligustilide
M3(E13)	33.392	205.087 3	205.087 3	205.087 0	1.46	6.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	161.097 4, 132.062 0	3-butyl-4-hydroxyphthalide
M4(E17)	52.992	281.249 5	281.249 5	281.248 6	3.20	2.0	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>		octadecenoic acid
M5	13.643	275.023 5	275.023 5	275.023 1	1.45	5.0	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S	195.066 2, 177.057 7	3-methoxybenzenepropanoic acid-4-sulphate
M6	21.212	314.070 4	314.070 4	314.070 4	0.00	6.0	C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub> S	234.112 5, 202.086 4	cysteinohydroferulic acid
M7	14.188	319.049 7	319.049 7	319.049 3	1.25	0.4	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> S	221.082 2, 239.090 7, 177.097 8	6,7-dihydroxy-3-butylphthalide D-7-sulphate
M8	17.242	303.053 5	303.053 5	303.054 4	-2.97	5.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> S	177.090 5, 223.106 6, 205.085 1	senkyunolide H/I-6/7-sulphate
M9	17.743	301.039 0	301.039 0	301.038 7	1.00	6.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> S	221.078 9, 203.074 9, 177.057 7	senkyunolide H/I-4,5-alkene-6/7-sulphate
M10	24.073	301.039 5	301.039 5	301.038 7	2.66	6.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> S	221.083 0, 177.091 8, 135.041 6, 203.074 9	senkyunolide H/I-4,5-alkene-6/7-sulphate
M11*	18.422	349.042 1	349.042 1	349.042 1	0.00	5.0	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub>	285.042 3, 205.085 3, 177.088 12	6,7-dihydroxy-3-butylphthalide F-9-sulphate-6/7-thiol
M12*	13.863	311.033 2	311.033 2	311.034 3	-3.54	8.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S	231.077 0, 188.074 6	<i>N,N</i> -4,5-alkene-ligustilide-6/7- <i>O</i> -sulphate
M13	25.422	285.043 8	285.043 8	285.043 8	0.00	6.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> S	205.087 9, 177.093 5, 145.096 1	<i>Z/E</i> -ligustilide-6/7/3/9- <i>O</i> -sulphate
M14	27.110	285.044 4	285.044 4	285.043 8	2.10	6.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> H <sub>2</sub> S	205.086 3, 177.091 9, 149.096 7, 159.095 2	<i>Z/E</i> -ligustilide-6/7/3/9- <i>O</i> -sulphate
M15	28.383	285.044 4	285.044 4	285.043 8	2.10	6.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> S	205.086 8, 161.098 7, 123.080 7	<i>Z/E</i> -ligustilide-6/7/3/9- <i>O</i> -sulphate
M16	27.393	287.059 9	287.059 9	287.059 5	1.39	5.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> S	207.102 7, 179.109 8	6,7-dihydro- <i>Z/E</i> -ligustilide-6/7/3/9- <i>O</i> -sulphate
M17	26.578	283.027 0	283.027 0	283.028 2	-4.24	7.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> S	203.069 7, 161.059 3, 157.767 7	<i>Z/E</i> -butylidene-phthalide- <i>O</i> -sulphate
M18	27.507	283.028 9	283.028 9	283.028 2	2.47	7.0	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> S	159.082 7, 203.069 5, 147.081 2	<i>Z/E</i> -butylidene-phthalide- <i>O</i> -sulphate

注: \* 为新化合物

note: " \* " means new chemical constituent

M6的准分子离子峰[M-H]<sup>-</sup>为 $m/z$  314.07, 预测其分子式为C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>6</sub>S。根据其母核结构为阿魏酸, 其分子式组成为C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>, 据此推测代谢产物中存在半胱氨酸结合片段, 并且在MS<sup>2</sup>中可见 $m/z$  234.11为[M-H-SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>峰,  $m/z$  202.08为[M-H-SO<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>OH]<sup>-</sup>峰, 据此推测出代谢产物M6为cysteinohydroferulic acid<sup>[15]</sup>。

3.2.3 洋川芎内酯类相关产物 在负离子模式下, 代谢产物

M7的准分子离子峰[M-H]<sup>-</sup>为 $m/z$  319.04, 预测其分子式组成为C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>S。在MS<sup>2</sup>图中可见 $m/z$  221.08为[M-H-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]<sup>-</sup>峰,  $m/z$  177.09为[M-H-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-COO]<sup>-</sup>峰, 结合上述当归乙酸乙酯提取物的LC-MS分析裂解碎片, 可以推测代谢产物M7的母核结构为senkyunolide D, 由于同时可见 $m/z$  239.09为[M-H-SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>峰, 说明代谢产物M7中存在硫酸酯片段。因此, 推测代谢产物M7为6,7-dihydroxy-3-butylphthalide *d*-7-sulphate<sup>[11]</sup>。

在正离子模式下,代谢产物M8、M9和M10在MS<sup>2</sup>中均可见  $m/z$  207.10([M+H-SO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>),为洋川芎内酯H/I的特征裂解碎片,因此可以推测代谢产物M8、M9和M10为洋川芎内酯H/I的代谢产物<sup>[11]</sup>;在负离子模式下,代谢产物M8的准分子离子峰[M-H]<sup>-</sup>为  $m/z$  303.05,预测其分子式组成为C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>S,在MS<sup>2</sup>中,可见由于中性丢失SO<sub>3</sub>而产生的  $m/z$  223.10([M-H-SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>)碎片,同时可见  $m/z$  205.08为[M-H-SO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O]峰,  $m/z$  177.09为[M-H-SO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O-CO]峰,表明代谢产物M8结构中存在硫酸酯结合片段,因此推测代谢产物M8为senkyunolide H/I-6/7-sulphate<sup>[11]</sup>。在负离子模式下,代谢产物M9和M10的准分子离子峰[M-H]<sup>-</sup>为  $m/z$  301.03,预测其分子式为C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>S,比代谢产物M8的分子质量小2.02 Da,说明M9和M10为M8的脱氢产物,因此推测代谢产物M9和M10为senkyunolide H/I-4,5-alkene-6/7-sulphate<sup>[8]</sup>。

在负离子模式下,代谢产物M11的准分子离子峰[M-H]<sup>-</sup>为  $m/z$  349.04,预测其分子式组成为C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>。在MS<sup>2</sup>中可见  $m/z$  205.08为[M-H-SCH<sub>2</sub>OH-SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>峰和  $m/z$  161.09为[M-H-SCH<sub>2</sub>OH-SO<sub>3</sub>-COO]<sup>-</sup>峰,结合前文当归乙酸乙酯提取物的LC-MS裂解情况,推测其母核结构为senkyunolide F<sup>[19]</sup>,由于同时可见  $m/z$  285.04为[M-H-SCH<sub>2</sub>OH]<sup>-</sup>峰,推测代谢产物M11结构中存在甲硫醇基片段,因此推测代谢产物M11为6,7-dihydro-senkyunolide F-9-sulphate-6/7-thiol。经过数据库检索确定代谢产物M11为新化合物。

3.2.4 藁本内酯类相关的代谢产物<sup>[16]</sup> 在正离子模式下,代谢产物M12、M13、M14和M15在一级MS中均可见  $m/z$  191.10和  $m/z$  145.10裂解碎片,推测代谢产物M12、M13、M14和M15为藁本内酯类相关的代谢产物<sup>[16]</sup>。在负离子模式下,代谢产物M12的准分子离子峰[M-H]<sup>-</sup>为  $m/z$  311.03,预测其分子式组成为C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S;在MS<sup>2</sup>中可见,  $m/z$  231.07为[M-H-SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>峰,  $m/z$  188.07为[M-H-SO<sub>3</sub>-CHO·-N]<sup>-</sup>峰,说明其结构中存在硫酸酯和耦合氮的片段<sup>[12]</sup>,因此推测代谢产物M12为*N,N*-4,5-alkene-ligustilide-6/7-*O*-sulphate,为新化合物。在负离子模式下,代谢产物M13、M14和M15的准分子离子峰[M-H]<sup>-</sup>为  $m/z$  285.04,预测其分子式组成为C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>S;在MS<sup>2</sup>图中可见,  $m/z$  205.08为[M-H-SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>峰,因此推测代谢产物M13、M14和M15为*Z/E*-ligustilide-6/7/3/9-*O*-sulphate。代谢产物M16的分子质量比M15的大2.01 Da。因此,推测代谢产物M16为6,7-dihydro-*Z/E*-ligustilide-6/7/3/9-*O*-sulphate。在负离子模式下,代谢产物M17和M18的准分子离子峰[M-H]<sup>-</sup>为  $m/z$  283.02,预测其分子式组成为C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>S;在MS<sup>2</sup>中可见,  $m/z$  203.06为[M-H-SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>峰,因此,推测代谢产物M17和M18为*Z/E*-butylidene-phthalide-*O*-sulphate。

#### 4 讨论

本研究采用HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MSn技术,从当归乙酸乙酯提取物中共指认出化合物22个,包括酚酸及其酯类成分5个,苯酚类成分16个和脂肪酸类成分1个,其中在当归的相关研究中首次报道的化合物为4,7-二羟基-3-丁基苯酚。

对于大鼠含药尿液中代谢产物的构鉴定方法本研究室对赤芍、丹参等进行了大鼠体内代谢产物分析和指认,结果表明该方法能准确、快速地检测和鉴定复杂生物样品中相关的代谢产物<sup>[14]</sup>。

本研究首次对当归乙酸乙酯提取物进行了大鼠体内代谢研究,从含药尿液中指认出化合物18个,包括原形成分4个,代谢产物14个,其中新化合物2个,分别为6,7-dihydro-senkyunolide F-9-sulphate-6/7-thiol(M11)和*N,N*-4,5-alkene-ligustilide-6/7-*O*-sulphate(M12)。

ig 当归乙酸乙酯提取物的大鼠含药尿液的原形成分中,已有研究证实*Z*-6,7-expoxy-ligustilide也是当归口服吸收入血的化学成分之一<sup>[4]</sup>,说明其可能具有较好的活性。并且,从大鼠体内代谢产物可知,当归中酚酸类化合物的代谢反应包括还原反应、水合反应、硫酸酯化以及半胱氨酸结合代谢反应,而苯酚类化合物的代谢反应包括还原、氧化、硫酸酯化、氮耦合以及甲硫醇基结合代谢反应类型。本研究首次报道了藁本内酯耦合氮的代谢产物。代谢产物为药物进入机体后在各种酶的作用下的产物,结构骨架和原形成分具有相似性,代谢产物中存在3组同分异构体,分别为代谢产物M9和M10、M13、M14和M15以及M17和M18,根据LC-MS数据推测这些代谢产物的原形成分分别为洋川芎内酯H/I、藁本内酯和丁烯基苯酚,并且均发生了硫酸酯化反应,表明这些代谢产物可能具有一定的活性。该结果有助于揭示当归乙酸乙酯提取物的药效物质。

综上所述,本研究采用HPLC-ESI-IT-TOF-MSn技术,确定了当归乙酸乙酯提取物的主要化学成分组成,在此基础上,对ig 当归乙酸乙酯提取物的大鼠含药尿液中的代谢产物进行了指认,代谢产物主要以阿魏酸、洋川芎内酯D、洋川芎内酯H/I、洋川芎内酯F、藁本内酯和丁烯基苯酚的相关代谢产物为主,说明这些化合物可以进入到体内。其中,阿魏酸、洋川芎内酯H/I、藁本内酯和丁烯基苯酚报道具有很好的抗凝血活性<sup>[17-18]</sup>,值得今后进一步研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社,2010:124.
- [2] 吴燕燕,尚明英,蔡少青. 当归的化学成分指纹图谱[J]. 药学学报,2008,43(7):728.
- [3] 冯懿挺,陈绍媛,傅承新. GC-MS分析3种不同栽培方式的当归挥发油成分[J]. 中国中药杂志,2006,31(5):432.
- [4] Wang YL, Liang YZ, Chen BM. High-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry for analysis of angelica sinensis[J]. *Phytochem Anal*, 2007,18(4):265.
- [5] 丁雯,钱大玮,段金殿,等. 当归赤芍药对阿魏酸和没食子酸在大鼠血浆和尿液中的代谢物研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(3):366.
- [6] Xiong YK, Lin X, Liang S, et al. Identification of senkyunolide I metabolites in rats using ultra performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013(81/82):178.
- [7] Wang YL, Liang YZ, Chen BM, et al. LC-DAD-APCI-MS-based screening and analysis of the absorption and metabolite components in plasma from a rabbit administered an oral solution of danggui[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005,383(2):247.
- [8] 杨铁虹,贾敏,梅其柄,等. 当归多糖对凝血和血小板聚集的影响[J]. 中药材,2002,25(5):344.

# 黄芩素对人肝癌 HepG2 细胞生长的抑制作用

王 方\*(解放军第 153 中心医院药剂科, 郑州 450042)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)47-4430-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.47.05

**摘要** 目的:研究黄芩素对人肝癌 HepG2 细胞生长的抑制作用。方法:在培养 HepG2 细胞的 96 孔板上加入药物,使黄芩素的终浓度分别为 0、20、40、80、160  $\mu\text{mol/L}$ (即对照组与黄芩素①、②、③、④组)。采用 MTT 法检测细胞的存活情况,分光光度法检测含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)-3、8、9 的活性,并检测丙二醛(MDA)含量,超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。结果:与对照组比较,培养 24、48、72 h 时,黄芩素②、③、④组各时间点的吸光度降低;培养 24 h 时,Caspase-3、8、9 活性增强,MDA 含量增加,SOD、GSH-Px 活性减弱,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论:黄芩素对 HepG2 细胞生长具有抑制作用,其机制与增强 Caspase-3、8、9 活性,增加 MDA 含量,减弱 SOD、GSH-Px 活性有关。

**关键词** 黄芩素;肝癌;HepG2 细胞;MTT 法;含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶;丙二醛;超氧化物歧化酶;谷胱甘肽过氧化物酶

## Study on the Inhibitory Effect of Baicalein on the Growth of HepG2 Cell

WANG Fang (Dept. of Pharmacy, No. 153 Central Hospital of PLA, Zhengzhou 450042, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the inhibitory effect of baicalein on the growth of HepG2 cell. METHODS: The drugs were added into 96-well plate that cultivated HepG2 cells, so that the baicalein extract concentration were 0, 20, 40, 80, 160  $\mu\text{mol/L}$  (namely blank control group and baicalein ①, ②, ③, ④ group). MTT method was adopted to detect cell inhibition ratio. Spectrophotometric method was adopted to detect the activity of Caspase-3, 8, 9; the content of MDA, the activity of SOD and GSH-Px were all determined. RESULTS: Compared with normal control group, the absorbance of baicalein group ②, ③, ④ decreased, the activity of 24 h Caspase-3, 8, 9, and the content of MDA increased; while the activity of SOD and GSH-Px decreased; there was statistical significance ( $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: Baicalin can inhibit the growth of HepG2 cells. The mechanism is related to the increase of inhibition ratio, the activity of Caspase-3, 8, 9 and the content of MDA, and the decrease of the activity of SOD and GSH-Px.

**KEYWORDS** Baicalein; Liver cancer; HepG2 cell; MTT; Caspase; MDA; SOD; GSH-Px

黄芩素又名 5,6,7-三羟基黄酮、黄芩苷元、黄芩黄素、三羟黄酮,是自唇形科植物高黄芩(*Scutellaria altissima* L.)根部

的提取物,黄色针状结晶,分子式为  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$ ,分子质量为 270.24。黄芩素有多种药理活性,如抑菌<sup>[1]</sup>、解热镇痛<sup>[2-3]</sup>、保护

- [9] 宋书辉,徐旭,于冰,等.当归总苯酞活血化瘀作用的实验研究[J].中草药,2012,43(5):952.
- [10] Yang F, Xiao YS, Zhang FF. High performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis of Radix Angelicae Scienis[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 41(11): 1 078.
- [11] Huang WY, Sheu SJ. Separation and identification of the organic acids in Angelicae Radix and Ligustici Rhizoma by HPLC and CE[J]. *J Sep Sci*, 2006, 29(17): 2 616.
- [12] Zuo AH, Wang L, Xiao HB, et al. Identification of the absorbed components and metabolites in rat plasma after oral administration of Rhizoma Chuanxiong decoction by HPLC-ESI-MS/MS[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 56(5): 1 046.
- [13] Wu YY, Wang L, Liu GX. Characterization of principal compositions in the roots of Angelica sinensis by HPLC-ESI-MSn and chemical comparison of its different parts [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2014, 23(6): 393.
- [14] 冯雪科,徐振文,温中明. UPLC-MS/MS 法同时测定人血浆中阿魏酸和芍药苷的含量[J]. 中国药房, 2014, 25(3): 218.
- [15] 梁静,徐风,尚明英,等. 赤芍化学成分没食子酸丙酯在大鼠体内的代谢研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(22): 3 970.
- [16] Liang J, Xu F, Zhang YZ, et al. The profiling and identification of the metabolites of (+)-catechin and study on their distribution in rats by HPLC/DAD-ESI-IT-TOF-MSn technique[J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(3): 401.
- [17] Jackson GM, Hosney RC. fate of ferulic acid in over-mixed wheat flour doughs: partial characterization of a cysteine-ferulic acid adduct[J]. *J Cereal Sci*, 1986, 4(1): 87.
- [18] Ru Y, Nga Ling Ko, Li, SL, et al. Pharmacokinetics and metabolism of ligustilide, a major bioactive component in rhizoma chuan xiong in the rat[J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36(2): 400.

\* 副主任药师。研究方向:药学。电话:0371-60653550。  
E-mail: yxk153happy@163.com

(收稿日期:2014-06-06 修回日期:2014-08-02)