

· 配伍 ·

基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术分析不同配伍比例雄黄对青黛入血成分的影响

张敏, 吴青青, 李晨辉, 许玲玲, 周媛媛, 黄鹏, 黄和平, 俞娟, 汪电雷*
(安徽中医药大学药学院, 中药复方安徽省重点实验室, 合肥 230012)

[摘要] **目的:**基于青黄散的配伍组方,探讨不同比例雄黄与青黛配伍后青黛在大鼠血清中移行成分的差异。**方法:**采用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术对青黛供试品溶液、空白血清以及3种不同配比(青黛10 g分别配伍雄黄52.5, 105, 210 mg,依次记为A组, B组, C组)青黄散含药血清进行检测,结合青黛供试品溶液中鉴定的化学成分,分析3组复方中青黛在大鼠体内的移行成分差异;以3组青黄散含药血清作用于人白血病细胞HL-60细胞,采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测各含药血清对HL-60细胞活性的影响。**结果:**从青黄散A组, B组, C组含药血清中分别检测到了19, 22, 25个移行成分,且3组含药血清均含有来自青黛供试品溶液中的5个原型成分,分别为色胺酮,靛蓝,靛玉红,2-氨基苯甲酸和N-苯基-2-萘胺;CCK-8法检测结果表明青黄散C组含药血清对HL-60细胞的抑制作用最强。**结论:**固定青黛剂量后,随着雄黄剂量的增加,含药血清中移行成分增多,且对HL-60细胞的抑制作用也逐渐增强,提示雄黄可能会促进青黛中有效成分在体内的吸收,从而增强药效,进一步阐释了不同比例雄黄和青黛的配伍规律及药效物质基础。

[关键词] 青黛; 雄黄; 青黄散; 血清药物化学; 移行成分; 生物碱; 药效物质基础

[中图分类号] R22; R914; R28; R965; O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)13-0079-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200648

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200103.0957.002.html>

[网络出版日期] 2020-1-3 11:28

Analysis of Effect of Realgar with Different Compatibility Proportions on Transitional Constituents of Indigo Naturalis in Rat Serum Based on UPLC-Q-TOF-MS/MS

ZHANG Min, WU Qing-qing, LI Chen-hui, XU Ling-ling, ZHOU Yuan-yuan, HUANG Peng,
HUANG He-ping, YU Juan, WANG Dian-lei*

(Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, School of Pharmacy, Anhui
University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of different dose of Realgar compatible with Indigo Naturalis on the transitional constituents of Indigo Naturalis in rat serum based on the compatibility of Qinghuangsan. **Method:** Indigo Naturalis test solution, the drug-containing serum of three different proportions of Qinghuangsan (10 g of Indigo Naturalis compatible with 52.5, 105, 210 mg of Realgar for group A, B and C, respectively) and blank serum were detected by UPLC-Q-TOF-MS/MS, in combination with the chemical components identified in Indigo Naturalis test solution, the differences of transitional constituents of Indigo Naturalis in rat serum from the group A, B and C were analyzed. HL-60 cells (human leukemia cells) were treated with the three groups of Qinghuangsan drug-containing serum and the effect of drug-containing serum on

[收稿日期] 20190917(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403318)

[第一作者] 张敏,在读硕士,从事药物新剂型研究, E-mail:2941782906@qq.com

[通信作者] *汪电雷,博士,教授,从事药代动力学研究, Tel:0551-68129153, E-mail:dlwang@ahtcm.edu.cn

the activity of HL-60 cells was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. **Result:** A total of 19, 22, 25 of transitional constituents were detected in Qinghuangsan drug-containing serum from group A, B and C, respectively. The three groups of drug-containing serum all contained 5 prototype components from Indigo Naturalis test solution, including tryptanthrin, indigo, indirubin, 2-aminobenzoic acid and *N*-phenyl-2-naphthylamine, respectively. The results of CCK-8 assay showed that Qinghuangsan drug-containing serum of group C had the strongest inhibitory effect on HL-60 cells. **Conclusion:** After fixed Indigo Naturalis dose, with the increase of Realgar dose, the transitional constituents in rat serum increase and the inhibitory effect on HL-60 cells also gradually enhances, which indicates that Realgar may promote the absorption of active components in Indigo Naturalis *in vivo*, thus enhance the efficacy, further explains the compatibility law and pharmacodynamic material basis of different proportions of Realgar and Indigo Naturalis.

[**Key words**] Indigo Naturalis; Realgar; Qinghuangsan; serum pharmacology; transitional constituents; alkaloids; pharmacodynamic material basis

青黛入肝经,具有清热解毒、凉血消斑、泻火定惊的功效,用于温毒发斑、血热吐衄、胸痛咳血、口疮、疔腮、喉痹、小儿惊痫^[1]。目前,青黛所含化学成分已基本确认,其中无机成分及水分质量分数达90%;有机成分质量分数约10%,主要包括生物碱类色胺酮、靛蓝、靛玉红、靛红、异靛蓝和 *N*-苯基-2-萘胺等,甾醇类,核酸类以及十多种氨基酸^[2-4]。现代研究表明青黛具有抗菌、抗肿瘤作用,临床上用于多种疾病的治疗,尤其是对慢性粒细胞白血病疗效良好^[5-6]。雄黄又名黄金石、石黄,功效解毒杀虫、燥湿祛痰、截疟,临床用于治疗痈肿疔疮、蛇虫咬伤、虫积腹痛、惊痫、疟疾^[1]。研究发现雄黄主要成分为二硫化二砷(As_2S_2)或四硫化四砷(As_4S_4),并夹杂少量三氧化二砷(As_2O_3)和其他重金属盐^[7-8]。临床应用和实验研究证明雄黄能抗菌、抗病毒和抗肿瘤,被广泛用于治疗各种不同类型的白血病^[9]。

白血病是一类源自异常造血干细胞的恶性克隆性疾病,我国白血病的发病率在各种肿瘤中位居前十,也是导致儿童恶性肿瘤死亡的主要原因^[10]。中医将导致白血病的理化及生物学因素统称为邪毒,采用解毒化瘀方法治疗^[11]。中药配伍不仅可以减少副作用,且多组分可通过多个靶点发挥协同治疗效果,青黛与雄黄在临床上常配伍成青黄散使用,该复方在《世医得效方》等古籍中均有记载,具有解毒凉血、散瘀消积之功效,适用于治疗各种白血病。国内外研究表明青黄散已广泛用于治疗各型白血病,且疗效显著^[12],目前对于青黄散中青黛和雄黄单方治疗白血病的机制报道较多,关于青黄散复方大多从分子学角度探究其治疗白血病的机制^[13-14]。为了揭示青黄散治疗白血病的药效物质基础,本课题组前期通过固定青黄散中雄黄剂量,以

不同剂量青黛配伍进行了一系列研究,本实验拟通过固定青黛的剂量,以不同剂量的雄黄进行配伍,采用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术分析不同配比青黄散中青黛在体内代谢成分的变化,运用血清药物化学方法从本质上阐明方剂的配伍规律,为研究青黄散的药效物质基础提供参考。在此基础上,将3组含药血清作用于HL-60细胞,研究其对细胞的抑制作用,进一步对青黄散配伍规律进行阐释,为该复方的临床用药提供理论依据,对白血病的治疗具有一定的现实指导意义。

1 材料

ACQUITY型超高效液相色谱仪和Xevo G2-XS Q-TOF型质谱仪(美国Waters公司), Milli-Q Gradient A10型超纯水器(美国Millipore公司), AS5150A型超声清洗仪(加拿大Autoscience公司), BP211D型电子天平(德国Sartorius公司)。

青黛(批号150907),雄黄(批号20151026)均购自安徽亳州药材市场,经安徽中医药大学药学院彭华胜教授鉴定,分别为蓼科植物蓼蓝 *Polygonum tinctorium* 的叶或茎叶经加工制得的干燥粉末和硫化物矿物雄黄族雄黄;靛玉红(中国食品药品检定研究院,批号110717-200204),靛蓝(上海迈瑞尔化学技术有限公司,批号67707224,纯度 $\geq 98\%$),色胺酮[韶远科技(上海)有限公司,批号E187-296-28C,纯度 $\geq 97\%$],乌来糖(上海山浦化工有限公司,批号20170911),肝素钠注射液(常州千红生化制药股份有限公司,批号151712106A),*N,N*-二甲基甲酰胺(色谱纯,天津市光复科技发展有限公司,批号20170112),水为自制超纯水,乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

SPF级健康SD大鼠,雌雄各半,体质量(200±

20) g,由安徽医科大学实验动物中心提供,合格证号SCXK(皖)2017-001,本文所涉及的动物实验经安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准。人白血病细胞HL-60细胞购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用ACE Excel C₁₈-AR色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),流动相乙腈(B)-水(A)梯度洗脱(0~3 min, 5%~45%B; 3~5 min, 45%~55%B; 5~10 min, 55%~65%B; 10~15 min, 65%~75%B; 15~20 min, 75%~80%B; 20~24 min, 80%~75%B; 24~26 min, 75%~65%B; 26~28 min, 65%~45%B; 28~38 min, 45%~5%B),流速0.2 mL·min⁻¹,柱温30 °C,进样量2 μL。

2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正离子扫描模式,扫描范围 m/z 50~1 200,扫描间隔1 s,锥孔电压40 V,较低的碰撞能量6 V,较高的碰撞能量20~40 V,脱溶剂气温度设定500 °C,脱溶剂气体积流量800 L·h⁻¹,碰撞气为高纯氦气,雾化气为高纯氮气。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取色胺酮和靛玉红对照品适量,分别加乙腈配制成100 mg·L⁻¹的对照品储备液。精密称取靛蓝对照品适量,加 N,N -二甲基甲酰胺配制成质量浓度为100 mg·L⁻¹的储备液。分别将色胺酮、靛蓝和靛玉红对照品储备液稀释成质量浓度为10 μg·L⁻¹的工作液。

2.4 供试品溶液的制备 称取青黛粉末约5 mg,精密称定,置于5 mL量瓶中,加入 N,N -二甲基甲酰胺4 mL,超声30 min(功率250 W,频率40 kHz),放冷后加 N,N -二甲基甲酰胺定容至刻度,经0.22 μm微孔滤膜过滤,于4 °C保存,备用。

2.5 灌胃药液的制备 青黄散A组称取青黛粉末10 g,加入雄黄52.5 mg;青黄散B组称取青黛粉末10 g,加入雄黄105 mg;青黄散C组称取青黛粉末10 g,加入雄黄210 mg;各组均以0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)18 mL和乙醇2 mL混悬,按给药体积10 mL·kg⁻¹灌胃给药。

2.6 血清样品的处理 将24只SD大鼠随机分为给药组及空白组,给药组设定了青黄散A,B,C一共3组,每组6只(雌雄各半),禁食12 h,可自由饮水。空白组灌胃等体积的0.5% CMC-Na溶液,每日给予2次,连续给药3 d,于末次给药1 h后肝门静脉取血,于37 °C恒温静置30 min,放入4 °C离心机中于3 500 r·min⁻¹离心10 min,取上清置于-20 °C保存,备用。每组血清取其中一部分56 °C灭活30 min,经

0.22 μm微孔滤膜过滤,-20 °C保存备用。每组另取血清100 μL,加入乙酸乙酯750 μL,涡旋5 min,于4 500 r·min⁻¹离心10 min,取上清于37 °C氮气吹干,加乙腈50 μL复溶,12 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液供UPLC-Q-TOF-MS/MS分析。

2.7 青黛供试品溶液及其入血成分的分析与鉴定 按2.1和2.2项下条件对青黛供试品溶液、空白血清、青黄散A,B和C组含药血清进行UPLC-Q-TOF-MS/MS分析,通过ChemSpider,ChemicalBook和ChemBioDraw Ultra 14.0等,检索PubMed数据库和CNKI数据库,并结合文献[4,15-17]建立青黛的化学成分及其可能代谢产物的数据库,采用MassLynx 4.1数据处理工作站采集和分析质谱数据。采用SPSS 23.0软件对实验数据进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。采用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术对供试品溶液和对照品溶液进行分析,供试品溶液总离子流图见图1。根据化合物保留时间(t_R)和质荷比、碎片离子信息以及文献[18-21],分析供试品溶液中的化学成分,其鉴定信息见表1。

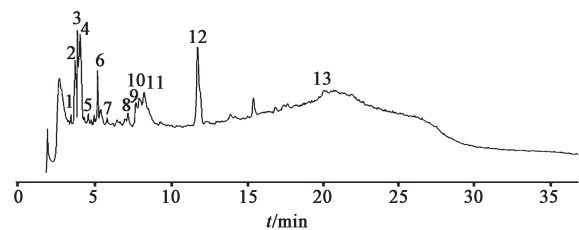


图1 正离子模式下青黛供试品溶液的总离子流

Fig. 1 Total ion-flow chromatogram of Indigo Naturalis test solution in positive ion mode

峰8化合物一级准分子离子峰 m/z 249.068 8 $[M+H]^+$,结合数据库,初步推断分子式为C₁₅H₈N₂O₂,二级质谱出现 m/z 130.029 1 $[M+H-C_7H_5NO]^+$,符合色胺酮裂解途径,结合对照品 t_R 等,推测该化合物为色胺酮,其可能裂解途径及一、二级质谱图见图2。峰9的 t_R =7.522 min,一级质谱准分子离子峰 m/z 263.082 6 $[M+H]^+$,二级质谱出现 m/z 235.086 9 $[M+H-CO]^+$,推测该化合物分子式为C₁₆H₁₀N₂O₂,符合靛蓝裂解途径,结合对照品 t_R 等信息,最终推断其为靛蓝,其可能裂解途径和一、二级质谱图见图3。峰11的 t_R =8.049 min,一级质谱准分子离子峰 m/z 263.082 6 $[M+H]^+$,二级质谱出现 m/z 235.086 9 $[M+H-CO]^+$ 和 m/z 219.094 4 $[M+H-CO-NH_2]^+$ 碎片离子,推测该化合物分子式为C₁₆H₁₀N₂O₂,根据靛玉红对照品 t_R 等信息,最终确定

表1 青黛供试品溶液中化学成分的上PLC-Q-TOF-MS/MS分析

Table 1 Analysis of chemical constituents of Indigo Naturalis test solution by UPLC-Q-TOF-MS/MS

No.	t_R /min	m/z ([M+H] ⁺)	分子式	δ /ppm	特征碎片离子	化合物
1	2.622	182.080 9	C ₉ H ₁₁ NO ₃	4.4	137.084 1, 164.071 2	酪氨酸
2	3.507	147.048 6	C ₈ H ₆ N ₂ O	4.1	102.033 6, 116.050 3	4-羟基喹唑啉
3	3.676	148.038 8	C ₈ H ₅ NO ₂	-6.8	134.061 6, 116.050 3, 120.043 2	靛红
4	3.744	134.061 0	C ₈ H ₇ NO	2.9	106.066 2, 116.050 3	吲哚酚(吲哚的羟基取代化合物)
5	3.896	138.054 8	C ₇ H ₇ NO ₂	-5.1	92.050 6, 120.045 4	2-氨基苯甲酸
6	4.933	279.077 6	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ O ₃	-2.5	132.045 9, 249.065 6, 250.070 9	羟基靛玉红
7	5.920	267.077 2	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	3.8	119.088 0	3-(2'-羧基苯基)-4(3H)-喹唑啉
8	6.961	249.068 8	C ₁₅ H ₈ N ₂ O ₂	9.6	130.029 1	色胺酮
9	7.522	263.082 6	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ O ₂	2.3	219.091 3, 235.086 9	靛蓝
10	7.719	263.082 6	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ O ₂	2.3	221.071 0	异靛蓝
11	8.049	263.082 6	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ O ₂	2.3	219.094 4, 235.086 9	靛玉红
12	12.199	220.113 3	C ₁₆ H ₁₃ N	-3.0	143.074 2	N-苯基-2-萘胺
13	20.058	364.106 6	C ₂₃ H ₁₃ N ₃ O ₂	5.6	235.087 1	青黛酮

其为靛玉红,其可能裂解途径和一、二级质谱图见图4。

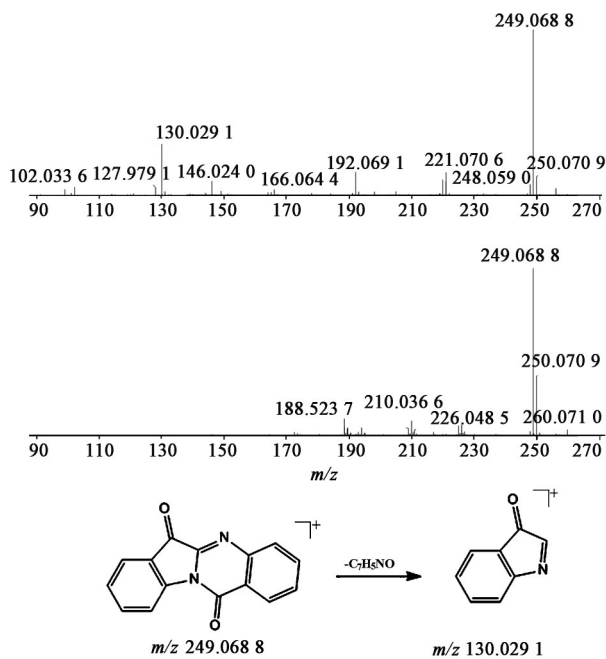


图2 色胺酮可能的裂解途径和一、二级质谱
Fig. 2 Possible cleavage pathways and primary and secondary mass spectra of tryptanthrin

采用UPLC-Q-TOF-MS/MS对空白血清以及青黄散A组,B组,C组含药血清进行分析,见图5。通过对比青黛供试品溶液及空白血清样品的总离子流图,根据精确相对分子质量、同位素丰度比、准分子离子峰、对照品和供试品溶液中色谱峰的 t_R ,推断青黄散A组含药血清共19个移行成分,青黄散B组

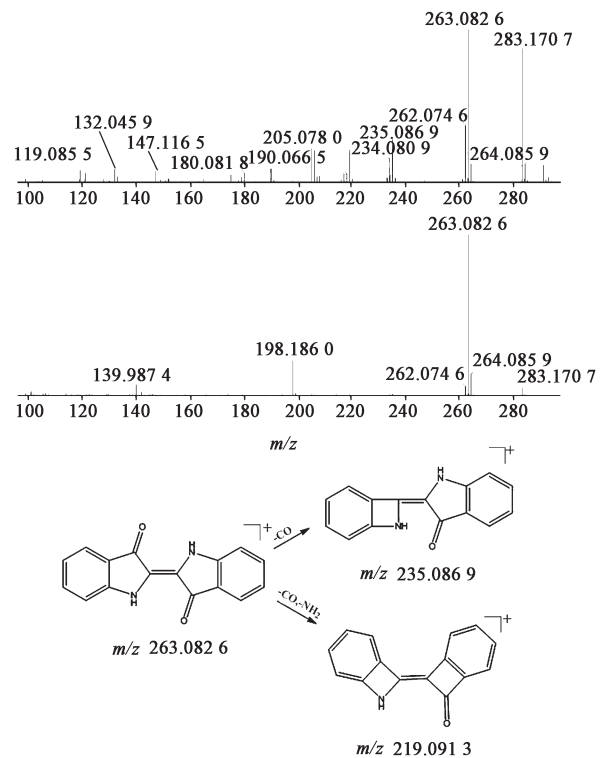


图3 靛蓝可能裂解途径和一、二级质谱
Fig. 3 Possible cleavage pathways and primary and secondary mass spectra of indigo

含药血清共22个移行成分,青黄散C组含药血清共25个移行成分,且3组均含有来源于青黛供试品溶液中的5个原型入血成分,分别为色胺酮,靛蓝,靛玉红,2-氨基苯甲酸和N-苯基-2-萘胺,见表2。峰14~16的 t_R 分别为6.961,7.522,8.049 min,三者准分子离子峰分别为 m/z 249.068 8 [M+H]⁺, m/z

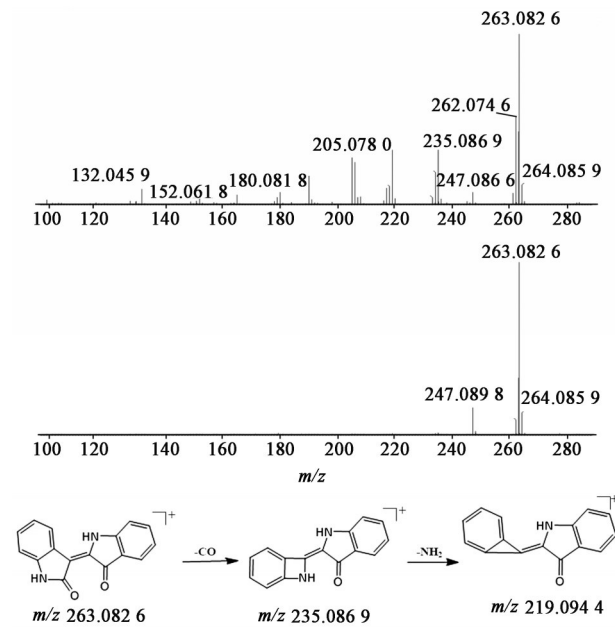
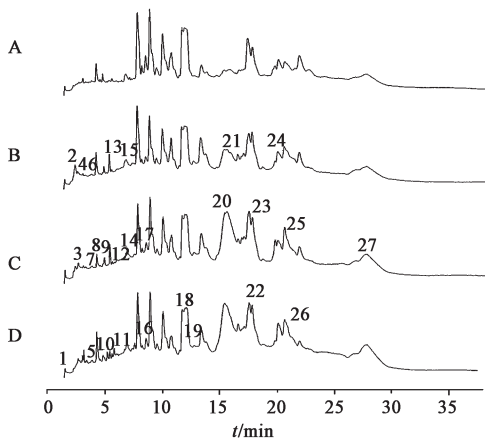


图4 靛玉红可能裂解途径和一、二级质谱
Fig. 4 Possible cleavage pathways and primary and secondary mass spectra of indirubin

263.0826 [M+H]⁺和 *m/z* 263.0826 [M+H]⁺, 结合二级质谱和对照品的相关信息, 确定峰14~16分别为原型成分色胺酮、靛蓝和靛玉红。峰7和峰18的保留时间分别为3.896 min和12.199 min, 结合一级、二级质谱信息, 并与青黛供试品溶液的相关质谱信息进行比对, 推测二者分别为原型成分2-氨基苯甲酸和 *N*-苯基-2-萘胺。



A. 空白血清; B. A组末次给药1h含药血清; C. B组末次给药1h含药血清; D. C组末次给药1h含药血清

图5 青黄散不同组别样品在正离子模式下总离子流
Fig. 5 Total ion-flow chromatograms of samples form different groups of Qinghuangsan in positive ion mode

2.8 青黛入血成分可能的代谢途径分析 青黛入血成分主要发生氧化、还原、乙酰化、甲基化、谷胱甘肽结合以及葡萄糖醛酸化等反应, 其中多发生Ⅱ

相结合反应。以青黛指标成分为例, 靛玉红和色胺酮均发生甲基化、脱羰基反应, 其可能代谢途径见图6, 7。

2.9 含药血清对HL-60细胞增殖的影响 采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测。取对数生长期的HL-60细胞, 计数后加入96孔细胞培养板中, 使每孔细胞悬液中含 2×10^3 个细胞。实验分为调零组、空白血清组和青黄散A组, B组及C组, 取空白血清以及青黄散A组, B组, C组含药血清分别用伊思柯夫改良培养液(IMDM)稀释, 使含药血清最终体积分数为80%, 64%, 32%, 16%, 8%, 每组3个复孔。孔板外周每孔加入磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2~7.4)100 μ L, 于37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂条件下培育, 分别于24, 48 h后取出, 除外周孔外每孔加入CCK-8溶液10 μ L, 于37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂条件下继续孵育4 h, 终止培养, 用酶标仪在450 nm处测定各孔的吸光度 *A*, 取平均值, 计算细胞存活率, 公式为细胞存活率 = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{调零组}}) / (A_{\text{空白血清组}} - A_{\text{调零组}}) \times 100\%$, 见表3。

由表3可知, 当C组含药血清体积分数达到一定值后, 与HL-60细胞共孵育48 h的细胞存活率明显低于24 h的。青黄散A组和B组各体积分数含药血清与HL-60细胞共孵育24, 48 h后对细胞的抑制作用均不明显。青黄散C组含药血清孵育24 h后, 当体积分数达64%时, 与青黄散A组和B组相比, 细胞存活率均有显著性差异 ($P < 0.01$)。青黄散C组含药血清孵育48 h后, 当体积分数达16%时, 与青黄散B组相比, 细胞存活率有显著性差异 ($P < 0.05$); 当体积分数达32%时, 与青黄散A组和B组相比, 细胞存活率均有显著性差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且呈现浓度依赖性趋势, 随着含药血清体积分数的增大, 其对细胞的抑制作用增强。

3 讨论

预试验分别考察了大鼠单次和多次给药方式, 将末次给药0.5, 1, 2, 4, 8, 12 h的含药血清作用于HL-60细胞, 结果发现多次给药组细胞抑制率明显高于单次给药组, 同时末次给药1 h采集的含药血清对细胞的抑制作用最强, 且含有的药物化学成分较多。故本研究选择多次给药方式, 并选择末次给药1 h的血清进行后续实验。临床上青黄散的常用青黛与雄黄配伍比例分别为7:3, 8:2, 9:1, 本文主要考察青黄散中雄黄对青黛在体内吸收的影响, 预试验结果表明青黛在大鼠血清中达到一定浓度后, 部分入血成分才可被检测到, 并最终确定青黛的大鼠给药剂量约 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 同时, 由于雄黄具有一定的

表2 青黄散不同组别含药血清中移行成分的UPLC-Q-TOF-MS/MS分析

Table 2 Analysis of transitional constituents in drug-containing serum of Qinghuangsan group A, B and C by UPLC-Q-TOF-MS/MS

No.	t_R /min	m/z ($[M+H]^+$)	分子式	δ /ppm	代谢途径	原型成分
1	1.567	150.054 8	C ₈ H ₇ NO ₂	-4.7	还原反应 ^{C)}	靛红
2	2.467	299.069 3	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₅	8.7	氧化反应	3-(2'-羧基苯基)-4(3H)-喹唑酮
3	2.520	382.165 6	C ₂₂ H ₂₃ NO ₅	0.5	糖基化反应	N-苯基-2-萘胺
4	2.791	191.080 6	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₂	-7.9	甘氨酸结合	吲哚酚
5	3.761	269.090 9	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₃	-6.3	还原反应	3-(2'-羧基苯基)-4(3H)-喹唑酮
6	3.879	120.045 4	C ₇ H ₃ NO	4.2	脱羰基反应	靛红
7	3.896	138.054 8	C ₇ H ₇ NO ₂	-5.1	原型成分	2-氨基苯甲酸
8	4.305	176.070 5	C ₁₀ H ₉ NO ₂	-0.6	乙酰化	吲哚酚
9	5.021	277.098 4	C ₁₇ H ₁₂ N ₂ O ₂	2.5	甲基化 ^{A,B)}	靛玉红
10	5.156	291.076 2	C ₁₇ H ₁₀ N ₂ O ₃	-2.7	甲酰化	靛玉红
11	6.008	281.091 2	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₃	-5.0	还原反应 ^{C)}	羟基靛玉红
12	6.177	221.073 7	C ₁₄ H ₈ N ₂ O	9.9	脱羰基反应 ^{B)}	色胺酮
13	6.501	281.094 7	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₃	7.5	甲基化	3-(2'-羧基苯基)-4(3H)-喹唑酮
14	6.961	249.068 8	C ₁₅ H ₈ N ₂ O ₂	9.6	原型成分	色胺酮
15	7.522	263.082 6	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ O ₂	2.3	原型成分	靛蓝
16	8.049	263.082 6	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ O ₂	2.3	原型成分	靛玉红
17	8.116	235.086 9	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O	-0.9	脱羰基反应 ^{B,C)}	靛玉红
18	12.199	220.113 3	C ₁₆ H ₁₃ N	-3.0	原型成分	N-苯基-2-萘胺
19	12.726	263.084 1	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ O ₂	7.6	甲基化 ^{C)}	色胺酮
20	15.260	251.049 1	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	0.4	半胱氨酸结合	靛红
21	15.875	467.115 5	C ₂₆ H ₁₈ N ₄ O ₃ S	-4.9	半胱氨酸结合	青黛酮
22	17.558	423.177 9	C ₂₃ H ₂₄ N ₃ O ₅	-3.5	肉碱结合 ^{C)}	羟基靛玉红
23	17.727	525.182 6	C ₂₆ H ₂₈ N ₄ O ₆ S	3.4	谷胱甘肽结合 ^{B,C)}	N-苯基-2-萘胺
24	20.058	493.150 9	C ₂₈ H ₂₀ N ₄ O ₅	-0.7	谷氨酰胺结合	青黛酮
25	21.180	441.132 7	C ₂₂ H ₂₀ N ₂ O ₈	6.6	还原、葡萄糖醛酸化	靛玉红
26	21.181	439.132 2	C ₁₈ H ₂₂ N ₄ O ₇ S	7.7	谷胱甘肽结合 ^{C)}	吲哚酚
27	27.391	471.104 4	C ₂₂ H ₁₈ N ₂ O ₁₀	1.1	甲酰化、葡萄糖醛酸化	3-(2'-羧基苯基)-4(3H)-喹唑酮

注:^{A)}A组含药血清特有成分;^{B)}B组含药血清特有成分;^{C)}C组含药血清特有成分;其余成分均为3组共有成分。

毒性,基于安全性考虑,对雄黄的配伍剂量进行了调整。

本实验采用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术对青黛供试品溶液,空白血清以及青黄散A组,B组,C组含药血清进行分析,同时对比正、负离子下总离子流色谱图,结果表明在正离子模式下青黛供试品溶液中化合物的响应较高,所得到的色谱峰信息量较多,故选择正离子模式下检测分析。本研究鉴定了青黛供试品溶液中的13个化学成分,并进一步对大鼠灌胃给药1h后血清中移行成分进行分析,结果发现3组青黄散含药血清中除5个原型成分外,A组,B组,C组还分别发现了14,17,20个代谢产物,提示随着雄黄剂量的增加,血清中检测到的入血成

分增多,一定剂量的雄黄可能会促进青黛中有效成分的吸收。

基于以上3组青黄散体内代谢产物的差异,进一步对青黛中主要成分靛玉红的体内代谢进行探讨,生物体内甲基化反应是在酶催化下进行的,靛玉红结构中含有吡咯氮原子,易发生N-甲基化,但C组却未发生,可能是该组中雄黄剂量较大,在体内达到一定浓度后,靛玉红分子结构中具有空轨道的氮氧杂原子多数会与雄黄中的三价砷形成水溶性砷的配合物^[22],由于分子结构改变导致其不能发生甲基化,也可能与形成的配合物或其他代谢产物对体内催化酶的活性产生抑制作用有关。相关研究表明,靛玉红自身在体内不可发生脱羰基反应^[23],

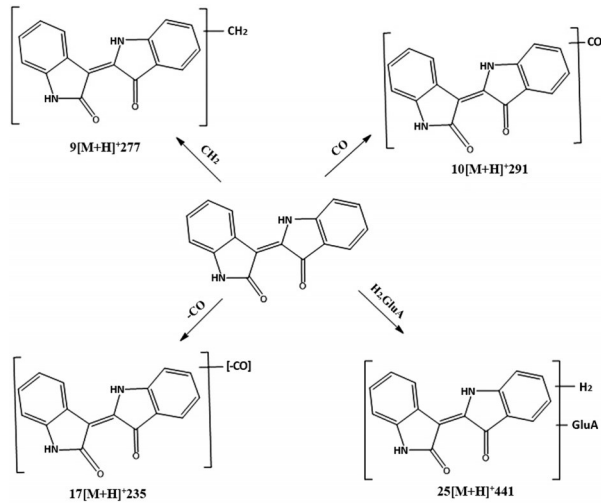


图6 靛玉红可能的代谢途径

Fig. 6 Possible metabolic pathways of indirubin

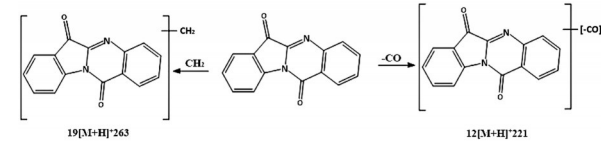


图7 色胺酮可能的代谢途径

Fig. 7 Possible metabolic pathways of tryptanthrin

表3 青黄散含药血清对HL-60细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of drug-containing serum of Qinghuangsansan on proliferation of HL-60 cells after intervention ($\bar{x} \pm s, n=3$)

干预时 间/h	含药血清体 积分数/%	细胞存活率/%		
		A组	B组	C组
24	8	87.99±21.78	114.94±12.12	98.96±0.13
	16	94.51±1.84	107.38±12.73	80.76±5.50
	32	106.90±1.49	107.73±6.32	101.72±5.25
	64	113.64±1.05	136.92±9.97	82.88±8.62 ^{2,4)}
	80	101.33±1.41	102.90±0.40	72.80±5.75 ^{2,4)}
48	8	86.25±2.42	87.23±9.45	103.35±6.33
	16	92.09±11.88	103.08±2.40	80.37±11.54 ³⁾
	32	107.84±9.74	108.61±4.45	75.61±12.42 ^{1,4)}
	64	105.27±1.58	97.43±3.42	65.27±13.34 ^{2,4)}
	80	90.85±1.56	117.29±2.12	52.72±10.77 ^{2,4)}

注:与A组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与B组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ 。

而青黄散B组和C组中靛玉红能发生该反应,可能是一定剂量雄黄与青黛在体内产生的代谢产物可催化靛玉红发生脱羰基反应。CCK-8法检测结果进一步验证发现,当固定青黛剂量后,雄黄增加到一定剂量可抑制HL-60细胞的增殖,表明青黄散的药效增强,一方面可能是雄黄在体内可以促进青黛有效成分的吸收,另一方面可能是雄黄在血清中的

浓度改变使其对细胞的抑制作用增强,且药物浓度达到一定值后才可发挥药效。3组青黄散血清中移行成分大多为生物碱类物质及其代谢产物,多数成分具有抗肿瘤作用,其中靛玉红为双吲哚类抗肿瘤药物,是从青黛中分离出来的抗白血病的主要有效成分,具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、抗病毒及神经保护作用,临床用于治疗慢性粒细胞白血病^[24-25];色胺酮和靛蓝均有抗肿瘤、抗菌、抗炎等作用^[26-29]。通过对不同配比青黄散入血成分进行分析,可进一步阐明该复方的药效物质基础。

本课题组前期研究了不同比例青黛和雄黄配伍对体内砷变化的影响规律,结果显示不同配比的青黄散中砷的血药浓度差异具有统计学意义($P<0.05$),且随着青黛比例的增加能促进大鼠对雄黄中砷的吸收^[30]。这与本文研究结果相呼应,青黛与雄黄配伍后,青黛可促进雄黄中有效成分的吸收,雄黄可增加青黛的入血成分,在一定程度上阐明了青黛和雄黄的配伍规律,揭示了青黄散配伍的科学内涵。本实验主要研究3组不同配比青黄散中青黛入血成分的差异,并未分析入血成分是否有效成分,后期会结合血清药理学实验进行更深入的研究。

中药血清药物化学是指动物灌胃给药后,通过鉴定和分析动物血清中的移行成分,从而揭示药物药效物质基础规律的有效方法^[31]。本实验基于药物相互作用角度,选择通过中药复方的不同药物配比来研究血清中移行成分变化为主要切入点,采用UPLC-Q-TOF-MS/MS考察不同比例雄黄对青黛血清中移行成分的影响,同时可以借此差异来研究中药复方配伍的机制和意义,结合细胞活性实验对不同配比青黄散的药效进行初步探究,可为青黄散后续的药理学及药动学研究提供实验依据。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:199,336-337.
- [2] 陈迪华,谢晶曦. 中药青黛的化学成分[J]. 中草药,1984,15(12):6-8.
- [3] 陈智,杨明,许润春,等. 青黛无机组成研究[J]. 化学研究与应用,2005,17(1):115-116.
- [4] 王艳. 青黛的化学成分及其结构特征的研究[D]. 成都:四川大学,2004.
- [5] 刘宗林,刘圣. 青黛药理作用与临床应用[J]. 安徽中医学院学报,1997,16(2):58-59.
- [6] 华海清. 青黛的古今应用[J]. 中国中药杂志,1992,

- 17(2):117-120.
- [7] DING W, JI T, XIONG W, et al. Realgar, a traditional Chinese medicine, induces apoptosis of HPV16-positive cervical cells through a HPV16 E7-related pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 3459-3469.
- [8] 宋玲玲, 韩冬月, 林瑞超, 等. 矿物药雄黄的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(3): 433-440.
- [9] 伏旭, 李培武, 尹稳. 雄黄抗肿瘤作用的研究进展 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2016, 33(11): 914-920.
- [10] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [11] 胡晓梅, 刘峰, 麻柔, 等. 周霭祥运用青黄散治疗白血病的经验 [J]. *中医杂志*, 2011, 52(14): 1187-1189.
- [12] 周霭祥. 青黄散治疗白血病的研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1998, 18(10): 582-583.
- [13] 吴建伟, 黄建棚, 郑荣, 等. 青黄散组分抑制 BCL-2、XIAP-1、c-IAP 协同诱导 KG1a 细胞凋亡的实验研究 [J]. *中国当代医药*, 2018, 25(18): 10-16.
- [14] 刘存, 刘丽娟, 周超, 等. 蛋白质相互作用网络指导下青黄散治疗慢性粒细胞白血病的机制探究 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(7): 1629-1633, 1804-1805.
- [15] 吴循循. 青黛抗白血病活性成分的细胞膜色谱筛选及靶标鉴定研究 [D]. 泉州: 华侨大学, 2016.
- [16] 李清华. 青黛的化学成分 [J]. *植物学报*, 1987, 29(1): 67-72.
- [17] 陈迪华, 谢晶曦. 中药青黛的化学成分 [J]. *中草药*, 1984, 15(12): 6-8.
- [18] OBERTHÜR C, HEINEMANN C, ELSNER P, et al. A comparative study on the skin penetration of pure tryptanthrin and tryptanthrin in *Isatis tinctoria* extract by dermal microdialysis coupled with isotope dilution ESI-LC-MS [J]. *Planta Med*, 2003, 69(5): 385-389.
- [19] ZOU P, KOH H L. Determination of indican, isatin, indirubin and indigotin in *Isatis indigotica* by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 21(7): 1239-1246.
- [20] 覃小丽, 陈浩, 夏涛, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的黑骨藤血清药物化学分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(6): 125-129.
- [21] 巩仔鹏, 吴林霖, 伍萍, 等. 羊耳菊提取物在大鼠粪便中的代谢产物分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(24): 100-105.
- [22] 黄鹏, 王强, 黄和平, 等. 仿生条件下青黄散中可溶性砷含量变化的研究 [J]. *甘肃中医学院学报*, 2013, 30(2): 35-39.
- [23] 杨波. 靛玉红体内外代谢研究 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2009.
- [24] 王英, 沙飞, 陈月华, 等. 靛玉红及其类似物抗肿瘤和神经保护作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2014, 45(16): 2404-2411.
- [25] 李楠, 柳越冬, 王长洪, 等. 靛玉红缓解三硝基苯磺酸致大鼠溃疡性结肠炎及其机制研究 [J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(12): 1689-1692.
- [26] 顾运琼, 钟益宁, 申文英, 等. 色胺酮副代谢物的合成、抗肿瘤活性及其与 G-四链体 DNA 相互作用研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2016, 28(8): 1300-1304.
- [27] 缪珊, 张海, 石小鹏, 等. 色胺酮对人白血病细胞株 K562 细胞增殖抑制、凋亡诱导的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(2): 256-259.
- [28] ANDREAZZA N L, DE LOURENÇO C C, STEFANELLO M É, et al. Photodynamic antimicrobial effects of bis-indole alkaloid indigo from *Indigofera truxillensis* Kunth (Leguminosae) [J]. *Laser Med Sci*, 2015, 30(4): 1315-1324.
- [29] ADACHI S, HOSHI N, INOUE J, et al. Indigo Naturalis ameliorates oxazolone-induced dermatitis but aggravates colitis by changing the composition of gut microflora [J]. *Int Arch Allergy Imm*, 2017, 173(1): 23-33.
- [30] 刘耀武, 汪电雷, 黄鹏, 等. ICP-MS 法研究不同青黛和雄黄配伍组方对大鼠体内砷吸收的影响 [J]. *中药材*, 2016, 39(4): 902-904.
- [31] 武晓伟, 郝艳艳, 聂春霞, 等. 中药血清药物化学的方法学概述及应用领域研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(3): 173-179.

[责任编辑 刘德文]