北青龙衣对大鼠尿液中 5 种毒性标志物含量的影响

董文婷，吴晨曦，郝艺铭，霍金海，王伟明*(黑龙江省中医药科学院中药所分析室，哈尔滨 150036)

摘要：目的 考察北青龙衣鲜品对大鼠尿液中 5 种毒性代谢物[L-左旋多巴(laevodopa，L-Dopa)、L-酪氨酸(L-tyrosine，L-Tyr)、L-苯丙氨酸(L-phenylalanine，L-Phe)、吲哚乙酸(indoleacetic acid，Int)及尿黑酸(homogentisic acid，HGA)]含量的影响。**方法** Wistar 大鼠灌胃给予北青龙衣鲜品，周期为 1 个月，采用 MRM 方法，建立同时检测 5 种代谢物的最优方法，并应用 Masslynx 软件外标法，对各代谢物精准定量。**结果** L-Dopa、L-Tyr、L-Phe、Int 及 HGA 的线性范围分别为 30~32 000，25~30 000，7.5~8 000，50~10 000，100~10 000 ng·mL^{-1}，线性良好；与空白组健康大鼠相比，北青龙衣鲜品组尿液中的 5 种代谢物含量均有所升高。**结论** 北青龙衣鲜品可影响大鼠体内 5 种代谢物的正常代谢。

关键词： 北青龙衣；毒性标志物；尿液；多反应监测；超高效液相色谱-质谱法

中图分类号： R917.101　　**文献标志码：** B　　**文章编号：** 1007-7693(2019)20-2513-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.20.004

引用本文： 董文婷, 吴晨曦, 郝艺铭, 等. 北青龙衣对大鼠尿液中6种毒性标志物含量的影响[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(20): 2513-2517.

Effect of *Juglans Mandshurica* on the Contents of Five Toxicity Markers in Rat Urine

DONG Wenting, WU Chenxi, HAO Yiming, HUO Jinhai, WANG Weiming*(*Heilongjiang Academy of Chinese Medical Sciences Institute of Traditional Chinese Medicine Analysis Room, Harbin 150036, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of *Juglans mandshurica* fresh products on five toxic metabolites, including laevodopa acid(L-Dopa), L-tyrosine(L-Tyr), L-phenylalanine(L-Phe), indoleacetic(Int) and homogentisic acid(HGA), in rat urine. **METHODS** Wistar rats were given a fresh product of *Juglans mandshurica* with a period of one month. The MRM method was used to establish the optimal method for simultaneous detection of five metabolites, and the Masslynx software external standard method was used to accurately quantify each metabolite. **RESULTS** The linear ranges of L-Dopa, L-Tyr, L-Phe, Int, and HGA were 30–32 000, 25–30 000, 7.5–8 000, 50–10 000, 100–10 000 ng·mL^{-1}, respectively, the linearity was good. Compared with the blank group, the content of the five metabolites in the *Juglans mandshurica* fresh product groups increased. **CONCLUSION** *Juglans mandshurica* fresh products can affect the normal metabolism of five metabolites in rats.

KEYWORDS: *Juglans mandshurica*; toxicity markers; urine; MRM; UPLC-MS/MS

北青龙衣是胡桃科植物核桃楸(*Juglans mandshurica* Maxim.)未成熟果实的外果皮，传统医学认为其具有清热、解毒、止痢、明目的功效，可用于治疗肿瘤和减轻肿瘤所致疼痛，在临床上有诸多应用[1-2]。目前，北青龙衣已被列入黑龙江省道地药材，但其鲜品(未经炮制)及其活性成分胡桃醌的毒性很大程度上限制了北青龙衣的临床应用，因此阐明其毒性机制是开发利用的关键问题[3-4]。本课题组前期通过非靶标毒性代谢组学研究，发现 35 个生物差异标志物，涉及 13 条毒性代谢通路。通过对以上标志物进行生物学意义分析及裂解碎片结构比对，确定 L-左旋多巴(laevodopa，L-Dopa)、L-酪氨酸(L-tyrosine，L-Tyr)、L-苯丙氨酸(L-phenylalanine，L-Phe)、吲哚乙酸(indoleacetic acid，Int)及尿黑酸(homogentisic acid，HGA)为潜在毒性标志物。故本实验应用 UPLC-MS/MS 技术，采用 MRM 模式，精准定量其含量，探讨北青龙衣鲜品对以上毒性小分子物质的干扰规律，找出北青龙衣不良反应靶点，为临床用药安全性监测提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂

Waters ACQUITY 液相色谱系统，Waters XEVO TSQ 三重串联四级杆质谱仪，配有 ESI 离

基金项目： 哈尔滨市应用技术研究与开发项目(2017RAQXJ224)；黑龙江省科学基金项目(H2017044)；国家青年科学基金项目(81503348)

作者简介： 董文婷，女，硕士，助理研究员　Tel: (0451)55653086　E-mail: 1776427432@qq.com　*__通信作者：__ 王伟明，女，博士，研究员，博导　Tel: (0451)55653086　E-mail: zyyy@163.com

子源以及 Masslynx 数据处理软件(美国 Waters 公司)。DW-86L959 型超低温冰箱(青岛海尔集团)；BSA224S-CW 型分析天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司)；超声清洗仪(昆山超声仪器有限公司)；ST16R 型低温高速离心机(赛默飞)；0.22 μm 水性滤膜(天津津腾实验设备有限公司)。

L-Dopa(批号：LRAA9068；纯度≥99.5%)、L-Tyr(批号：SLBN0617V；纯度≥99.5%)、L-Phe(批号：BCBR1655V；纯度≥99.5%)、Int(批号：BCBS1159V；纯度≥98.0%)、HGA(批号：SLBN3527V；纯度≥99.5%)均购自美国 Sigma 公司。甲醇、乙腈购自默克公司；屈臣氏蒸馏水。

1.2 动物

SPF Wistar 大鼠，♂，体质量(200±20)g，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，许可证号：SCXK(京)2012-0001。屏障级实验动物室饲养，12 h 明暗周期，室温 22~24 ℃，湿度 40%~70%，动物自由摄食饮水。

1.3 受试药物

北青龙衣鲜品药材 2014 年 7 月 29 日采自黑龙江省宾县铜矿(东经 127°50′00.0″，北纬 45°56′18.5″)，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楸(*Juglands mandshurica* Maxim.)未成熟果实。制作方法：取新鲜外果皮，每 500 g 加水 250 mL，3 000 r·min^{-1} 匀浆 30 s，−80 ℃冷冻。临床以日服用量 15 g 计；北青龙衣鲜品服用量暂以相当于临床干品的折干量计算。

2 方法与结果

2.1 动物分组及给药

40 只大鼠，随机分为空白组，北青龙衣鲜品高、中、低剂量组，每组 10 只。取北青龙衣鲜品，加水分别制成 2.033 1，1.016 6，0.508 3 g·mL^{-1} 溶液，作为高、中、低剂量组的供试品浓度(体表面积法计，相当于临床日用量的 4 倍、2 倍及 1 倍)。空白组给予同等体积的蒸馏水，连续给药 4 周，观察期间大鼠自由摄食、饮水。

2.2 尿液的收集及处理

给药 4 周后，采用代谢笼法，收集 12 h 尿液。留尿期间动物不摄食，自由饮水。收集尿液后，4 ℃ 13 000 r·min^{-1} 离心 10 min，取上清液，置于−80 ℃冰箱中保存备用，分析前解冻。取大鼠尿液各 200 μL，分别加入 200 μL 水稀释至 2 倍，3 000 r·min^{-1} 涡旋 1 min，0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液进样。

2.3 空白尿液样本制备

按尿液体积加入 2 倍活性炭，1 500 r·min^{-1} 涡旋混合，低温(4 ℃)13 000 r·min^{-1} 离心 10 min 后，取上清液，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，保存备用[5-6]。

2.4 对照品溶液的制备

分别精密称取对照品 L-Dopa、L-Try、L-Phe、Int、HGA 适量，置于 10 mL 棕色量瓶中，用色谱甲醇稀释为 1 mg·mL^{-1} 的母液，然后稀释至 500 μg·mL^{-1} 的储备液，4 ℃低温保存。

取空白尿液 100 μL，置 1.5 mL 离心管中，精密加入标准曲线各点浓度的对照品溶液 100 μL，制成 L-Dopa、L-Tyr、L-Phe、Int、HGA 混合对照品溶液备用。

2.5 色谱和质谱条件

2.5.1 色谱条件 Waters Acquity UPLC HSS T3 C_{18} 色谱柱(2.1 mm×100 mm，1.7 μm)，AQUITY UPLC HSS T3 C_{18} VanGuard Pre-Column 预柱(2.1 mm×5 mm，1.7 μm)，柱温为 30 ℃。流动相 A 为 0.1%甲酸-水，B 为 0.1%甲酸-乙腈，梯度洗脱：0~2 min，5%B；2~11 min，5%→35% B；11~12.5 min，35%→100% B；12.5~13 min, 100% B；13~13.1 min，100%→5% B；13.1~15 min，5% B)。进样量 5 μL，流速 0.3 mL·min^{-1}。自动进样器温度设为 4 ℃。

2.5.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI)，正离子模式检测，毛细管电压为+3 500 V，去溶剂气流量为 650 L·h^{-1}，去溶剂化温度 300 ℃，离子源温度 120 ℃，采用多通道反应监测(MRM)扫描测定，6 种目标化合物 MRM 质谱条件见表 1。混合对照品溶液的色谱图见图 1。

表 1 5 种化合物多反应离子检测质谱条件

Tab. 1 MRM analysis parameters for the five targeted compounds

化合物	保留时间/min	母离子	子离子	锥孔电压/V	碰撞能/V	极性
L-Dopa	0.87	198.07	152.06	30	17	(+)
L-Tyr	1.13	182.18	136.20	28	16	(+)
L-Phe	1.49	166.08	120.08	25	12	(+)
Int	1.87	176.91	130.06	20	20	(+)
HGA	2.05	169.05	151.04	30	22	(+)

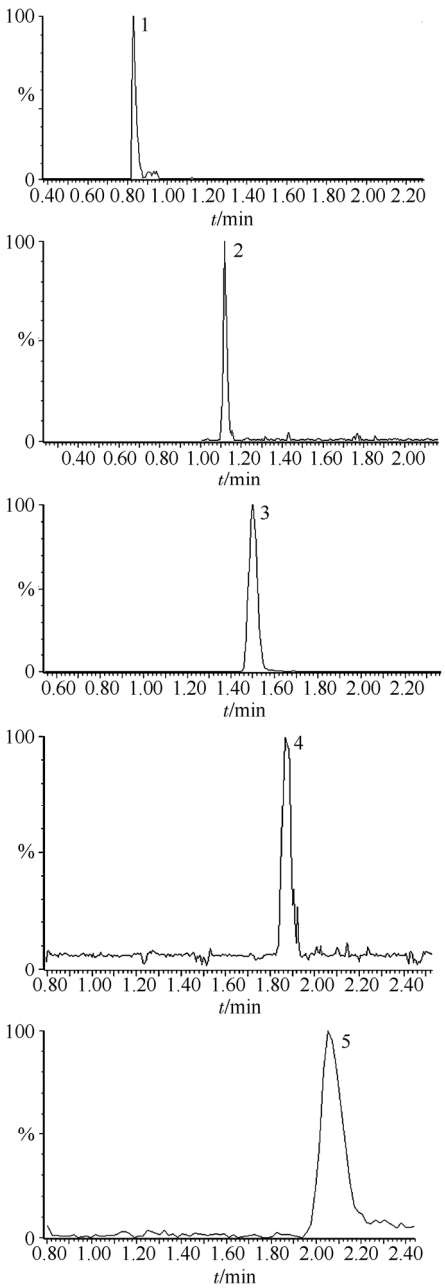

图 1 各成分多反应监测模式下的色谱图

1–L-左旋多巴；2–L-酪氨酸；3–L-苯丙氨酸；4–吲哚乙酸；5–尿黑酸。

Fig. 1 MRM chromatograms of single standard

1–L-dopa; 2–L-tyrosine; 3–L-phenylalanine; 4–indoleacetic acid; 5–homogentisic acid.

2.6 方法学验证

2.6.1 专属性试验 为考察基质中除目标标志物外，其他内源性物质是否存在干扰，试验对空白尿液基质加样品(A)及真实尿液样本(B)进行比较。结果表明，尿液样本经活性炭吸附后的空白基质对所测的化合物不产生影响，各离子通道中的目标物并未出现明显的干扰峰，见图 2，且标准曲线表现出良好的线性关系；同时，尿液中各化合物出峰位置和空白基质加对照品的位置几乎一致，且无分叉峰出现，说明该方法专属性较高。

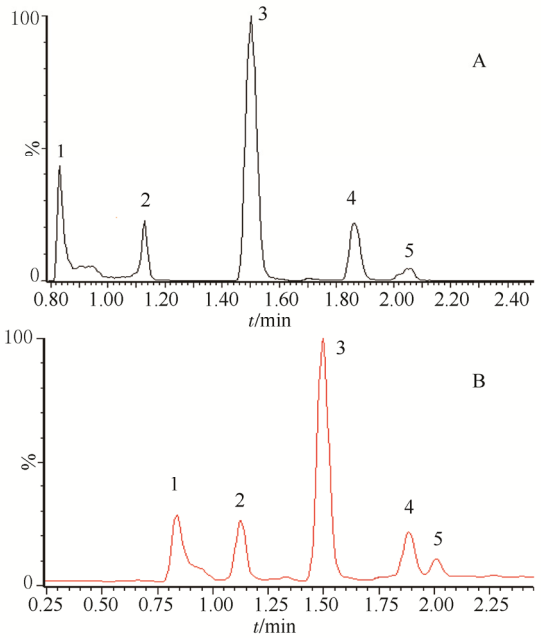

图 2 空白尿液样本加对照品(A)及真实尿液样本(B)色谱图

1–L-左旋多巴；2–L-酪氨酸；3–L-苯丙氨酸；4–吲哚乙酸；5–尿黑酸。

Fig. 2 Chromatograms of blank urine sample plus standard (A) and real urine sample (B)

1–L-dopa; 2–L-tyrosine; 3–L-phenylalanine; 4–indoleacetic acid; 5–homogentisic acid.

2.6.2 线性试验 以各对照品浓度为横坐标，峰面积(Y)为纵坐标绘制线性方程，除 Int 外，其他 4 种目标物质均能满足 r^2>0.999。以峰面积/噪音为 3 倍(S/N=3)、10 倍(S/N=10)时的进样浓度分别为检测限(LOD)及定量限(LOQ)，结果见表 2。结果表明，该方法线性关系良好，且检测灵敏度高。

表 2 5 种化合物方法验证相关参数

Tab. 2 Five compounds parameters of method validation

化合物	线性回归方程	r^2	线性范围/ng·mL^{-1}	LOD/ng·mL^{-1}	LOQ/ng·mL^{-1}
L-Dopa	Y=0.292 7X+13.329	0.999 9	30~32 000	6.250	15.625
L-Tyr	Y=1.921 5X+24.347	0.999 1	25~30 000	5.625	18.750
L-Phe	Y=5.496 5X+83.187	0.999 9	7.5~8 000	1.500	5.000
Int	Y=0.018 9X+6.204 9	0.998 9	50~10 000	9.375	30.000
HGA	Y=180.956X–36.120 6	0.999 0	100~10 000	10.25	31.250

2.6.3 仪器精密度试验 取相同的已知浓度的混合对照品溶液，按“2.5”项下色谱条件，连续进样 6 次，根据峰面积计算精密度 RSD(n=6)为 0.27%~0.52%，表明仪器精密度良好。

2.6.4 稳定性试验 按“2.2”项下方法制备尿液样本的供试品溶液，按“2.5”项下色谱条件，分

别于 0，2，4，8，12，24 h 时间点进样检测分析，计算 5 种目标标志物的峰面积 RSD 值(n=6)，结果均<2%，表明各被测成分稳定性良好。

2.6.5 重复性试验 平行制备尿液样本的供试品溶液 6 份，按“2.5”项下色谱条件分别进样，计算各被测成分峰面积的 RSD 值，结果均<1.2%，结果表明此方法重复性良好。

2.6.6 加样回收率试验 取空白尿液样本 200 μL，分别加入 L-Dopa、L-Tyr、L-Trp、Phe、Int、HGA 5 种目标标志物高、中、低质量浓度对照品溶液 100 μL。按“2.5”项下色谱条件分别平行进样 6 次，测定峰面积，以实测浓度与理论添加浓度之比计算各被测物的加样回收率，其平均范围为 87.9%~101.1%，加样回收率结果见表 3。

表 3 5 种化合物在大鼠尿液中回收率及基质效应

Tab. 3 Recoveries and matrix effects of five compounds in rat urine

化合物	浓度/ng·mL^{-1}	平均回收率/%	基质效应/%
L-Dopa	1 000	101.1	93.4
	2 000	98.8	94.8
	4 000	95.9	103.7
L-Tyr	1 000	91.7	93.2
	2 000	95.2	96.4
	4 000	100.9	98.7
L-Phe	1 000	89.3	91.7
	2 000	99.1	100.5
	4 000	98.4	94.7
Int	1 000	90.1	96.2
	2 000	98.1	98.7
	4 000	100.8	101.5
HGA	1 000	93.2	94.0
	2 000	92.1	98.5
	4 000	96.4	101.7

2.6.7 基质效应 取 5 只大鼠的空白尿液样本各 200 μL，分别加入高、中、低浓度的对照品 100 μL，按“2.5”项下色谱条件平行进样，测定峰面积 A，同时用初始流动相配制相同浓度对照品直接进样，记峰面积为 B，基质效应为 A/B×100%，结果见表 3。低、中、高 3 个浓度各物质基质效应平均为 91.7%~103.7%，均不影响定量分析。

2.7 样本含量测定

分别取大鼠尿液按“2.2”项下方法制备样本，运用本方法对各组尿液样本进行定量分析；并采用 SPSS 17.0 软件对含量进行单因素方差分析(F 检验)，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间差异采用 t 检验，以 P<0.05 为差异具有统计学意义，见表 4。

3 讨论

以往对中药的毒性评价方法集中在急性、亚急性和长期毒性等实验上，主要考察指标为生化和组织形态学[7]，但中药安全性评价是复杂成分的组合体，传统的毒性评价方法，并不能阐明中药毒性物质基础、毒性机制等关键问题。目前，代谢组学在毒理学研究中发挥重要的作用，通过分析与不良反应机制密切相关的生物体液或组织中代谢产物的轮廓分布差异，并明确这些差异毒性标志物的精准含量变化规律，确定其不良反应的靶器官、组织或者不良反应过程，从而进行毒理作用机制研究和化合物的毒性评价[8-10]。

本实验利用 UPLC-MRM-MS 方法，对 5 种内源性代谢物 L-Dopa、L-Tyr、L-Phe、Int、HGA 同时进行精准定量分析，观察灌胃北青龙衣鲜品后，5 种内源性代谢物的干扰规律，阐明其不良反应的靶器官。实验表明，与空白组相比，鲜品各剂量组 L-Dopa、L-Tyr、L-Phe、HGA 含量均明显升高，除 L-Dopa 具有显著差异外(P<0.05)，L-Tyr、L-Phe、HGA 均具有极显著差异(P<0.01)。Phe 作为 Tyr 转化的前体物质，Phe 含量升高，致使其转化的 Tyr 含量升高，Phe 除作为氨基酸合成机体组织各种蛋白外[11]，还作为 Tyr 及单胺类信号传导分子的多巴胺、去甲肾上腺素和肾上腺素以及皮肤色素的

表 4 5 种毒性标志物在各组尿液样本中的含量($\bar{x} \pm s$, n=10)

Tab. 4 Content of five compounds in rat urine($\bar{x} \pm s$, n=10)

化合物	含量/ng·mL^{-1}				
	L-Dopa	L-Tyr	L-Phe	Int	HGA
空白组	432.4±54.21	4 004.7±237.13	3 784.5±201.46	994.5±104.06	80.4±8.251
北青龙衣低剂量组	489.6±33.78$^{1)}$	5 121.4±310.78$^{2)}$	4 510.4±317.08$^{2)}$	1 088.0±229.761$^{1)}$	120.8±16.074$^{2)}$
北青龙衣中剂量组	532.4±61.40$^{2)}$	5 601.3±261.03$^{2)}$	5 084.9±271.00$^{2)}$	1 985.6±300.50$^{2)}$	160.5±20.391$^{2)}$
北青龙衣高剂量组	602.4±46.15$^{2)}$	6 223.8±192.93$^{2)}$	6 165.0±417.74$^{2)}$	3 310.8±409.85$^{2)}$	200.3±35.423$^{2)}$

注：与空白组相比，$^{1)}P$<0.05，$^{2)}P$<0.01。

Note: Compared with control group, $^{1)}P$<0.05, $^{2)}P$<0.01.

黑色素前体[12]。因此，机体维持正常的生长发育和生理机能需要体内稳定的 Phe 代谢状态。神经系统损伤、内分泌、免疫等多种因素，均会引起 Phe 代谢异常，都会导致其转化致 Tyr 发生紊乱。同时，HGA 与 L-Dopa 是 Phe 和 Tyr 的中间代谢物，两者含量均有所升高，证明北青龙衣确能干扰 Phe-Tyr 代谢。此外，与空白组大鼠相比，北青龙衣鲜品各给药组大鼠尿液中 Int 含量异常升高，Int 是色氨酸代谢通路的起点和中央化合物，色氨酸代谢与中枢神经系统、免疫调节密切相关，对维持中枢神经系统正常生理功能有着重要的作用。故 Int 含量的改变提示北青龙衣鲜品会干扰正常大鼠的色氨酸代谢。

北青龙衣鲜品未经过炮制，其中含有的胡桃醌等萘醌类成分既是其毒性物质，也是其抗肿瘤活性物质，阐明其不良反应机制，可为后期减毒增效及其合理炮制提供科学依据。

REFERENCES

[1] 黑龙江省药品监督管理局. 黑龙江省中药材标准(2001 年版)[M]. 哈尔滨: 黑龙江省科学技术出版社, 2001.

[2] 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, (1): 58-61.

[3] LIU W, LIN W H, JI Y B. Study on the acute toxicity experiment of mice and anti-tumor function *in vitro* of the qinglongyi [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2004, (9).

[4] LIU L J, QI F Q, GONG X F. Studies on the cytotoxicity of naphthoquinone derivatives from the fresh rejuvenated fruits of *Juglans mandshurica* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(7): 574-577.

[5] ZHANG X, XIE X Q, LIU T L, et al. Research progress on endogenous substance's determination methods and boequivalence evaluation [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2011, 20(22): 2221-2228.

[6] ZHU B J. Quantitative study on endogenous carbohydrate and 5-hydroxytryptamine in rat plasma by HPLC-MS spectrometry [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2014.

[7] 笪红远. 中药毒理学研究进展[J]. 中药药理与临床, 2005, 21(6): 87

[8] BOUHIFD M, HARTUNG T, HOGBERG H T, et al. Review: toxicometabolomics [J]. J Appl Toxicol, 2013, 33(12): 1365-1383.

[9] HEIJNE W H, KIENHUIS A S, VAN OMMEN B, et al. Systems toxicology: applications of toxicogenomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics in toxicology [J]. Expert Rev Proteom, 2005, 2(5): 767-780.

[10] JOHNSON C H, PATTERSON A D, IDLE J R, et al. Xenobiotic metabolomics : major impact on the metabolome [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2012(52): 37-56.

[11] RAPOSINHO P D, BROQUA P, PIERROZ D D, et al. Evidence that the inhibition of luteinizing hormone secretion exerted by central administration of neuropeptide Y (NPY) in the rat is predominantly mediated by the NPY-Y5 receptor subtype [J]. Endocrinology, 1999, 140(9): 4046-4055.

[12] KIM C J, KOVACS-NOLAN J A, YANG C, et al. L-Tryptophan exhibitstherapeutic function in a porcine model of dextran sodium sulfate(DSS)-induced colitis [J]. J Nutr Biochem, 2010, 21(6): 468-475.

收稿日期：2018-11-20

(本文责编：曹粤锋)

http://www.chinjmap.com