

气相色谱-质谱法定性分析麝香保心丸挥发性入血成分的研究

郭黎安^a, 王淑萍^b, 向丽^b, 姜鹏^b, 张卫东^b, 柳润辉^b (第二军医大学, a. 训练部; b. 药学院天然药物化学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 建立气相色谱-质谱法(GC-MS)定性分析麝香保心丸挥发性入血成分的方法。方法 健康雄性SD大鼠给予麝香保心丸混悬液灌服(剂量3.4 g/kg体重),于口服30 min后肝门静脉取血,蛋白沉淀法处理血浆样品进行GC-MS分析。分析条件:Thermo TR-5 ms色谱柱;Xcalibur色谱工作站;载气为氦气;载气流速为1.0 ml/min;进样口温度为220℃;离子源温度为250℃;梯度升温;进样体积为1 μl;分析时间59 min。结果 通过比较麝香保心丸提取液、空白组及给药组,及与在线NIST05数据库比对,共识别和鉴定10个化学成分,其中6个为麝香保心丸中原型成分,其余4个为代谢物。结论 本研究建立了一种快速筛选麝香保心丸中挥发性入血成分的方法,可为其深入研究提供基础。

[关键词] 麝香保心丸;血清药物化学;冠心病;气相色谱-质谱联用

[中图分类号] R541.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)03-0207-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.03.013

Identification of volatility components of Shexiang Baoxin pill in rat plasma by GC-MS

GUO Li-an^a, WANG Shu-ping^b, XIANG Li^b, JIANG Peng^b, ZHANG Wei-dong^b, LIU Run-hui^b (a. Second Military Medical University, Training Department; b. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To identify the volatile components in rat serum of Shexiang Baoxin Pill (SBP) by gas chromatography couples with mass spectrometry (GC-MS). **Methods** Serum samples from control and SBP administration rats were deproteinated by adding methanol prior to gas chromatography. The separation was carried out on a Thermo TR-5 ms column (30 m × 0.25 mm I. D.). The inlet temperature was set at 220 °C and ion source temperature was 250 °C with gradient warming. The carrier gas was N₂ with a gas flow rate of 1.0 ml/min, and the injection volume was 1 μl. The total analysis time was 59 min. The data acquisition were performed on Xcalibur workstation. **Results** Ten components including 6 components from SBP and 4 metabolites were observed from a comprehensive analysis of the chromatography of SBP solution. All the observed components were identified by using the online NIST05 library. **Conclusion** An integrated method for screening volatile bioactive components in serum after oral administration of SBP was established, which provided helpful information for further mechanism research.

[Key words] Shexiang Baoxin pill; serum pharmacology; coronary heart diseases; GC-MS

麝香保心丸为国家中药保护品种,其经麝香、人参、苏合香、肉桂、蟾酥、牛黄、冰片7种药物配伍组合而成。临床上主要用于冠心病,动脉粥样硬化,心肌缺血及心肌纤维化等的治疗,效果显著。现代药理研究表明,麝香保心丸具有一系列药理活性,其可提高NO的水平^[1]、提高内皮型NO合酶基因的表达等作用^[2]以及能减轻微小血管的损害,下调MMP-2 mRNA和蛋白表达^[3],改善心肌缺血引起的心肌坏死等^[4],尽管对其整体药效机制评价较多,但其主要药理活性成分,即复方主要药效物质尚未得到充分阐明。

由于中药复方为中医药理论指导下的多味药材

经配伍组合后的有机整体,先前的生物活性导向下的植化系统分离模式不能完全阐明中药复方的药效物质,因为它忽略了中药复方整体作用机制,而且不能反映中药复方中的化学成分体内动态变化过程。近年来,中药血清药物化学研究已经成为快速筛选中药体内活性成分的一种有效手段。该技术基于“口服中药经胃肠道吸收入血的成分有最大可能成为真正药效成分”的理论,广泛应用于多个中药复方药效成分的筛选^[5-7],成果显著。

麝香保心丸含有的植物二次代谢产物主要分为挥发性成分与非挥发性成分组成。本课题组前期研究已经阐明了其主要非挥发成分^[8],但麝香保心丸中挥发性成分尚未完全探讨。因此,本研究基于中药血清药物化学理论,建立气相色谱-质谱法(GC-MS)定性分析中药复方麝香保心丸挥发性入血成

[作者简介] 郭黎安(1978-),女,讲师. E-mail: gla@smmu.edu.cn.
[通讯作者] 柳润辉. Tel: (021)81871245, E-mail: lyliurh@126.com.

分,拟为中药复方的药效物质研究提供技术手段。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 质谱仪:Thermo GC DSQ II 气相色谱仪;Xcalibur 色谱工作站;KS5200H 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);BP211D 型电子天平(德国 Sartorius);Anke TGL-16C 型离心机;Vortex QL-901 型涡旋器。

1.2 试剂 麝香保心丸制剂由上海和黄药业有限公司提供(批号 080105),麝香酮(批号 M0128)、肉桂酸(批号 ASB-00003655-025)、肉桂醛(批号 YY90307)、龙脑(批号 M0297)、异龙脑(批号 111512)5种对照品均购自中国药品生物制品检定所,苯甲酸苄酯购自上海鼎瑞化工有限公司。戊巴比妥钠、肝素钠均购自国药集团化学试剂有限公司。正己烷、乙醚、丙酮、氯仿均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量(200 ± 20)g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,动物许可证号 SCXK(沪)2003-0003,实验前禁食 12 h(自由饮水)。

2 方法与结果

2.1 麝香保心丸分析及灌胃样品制备

2.1.1 麝香保心丸分析样品制备 精密称定麝香保心丸样品 500 mg,研细,于 10 ml 容量瓶加入乙醚混悬,超声提取 20 min,冷却至室温,乙醚补足损失体积,静置取上清,同法提取两次,滤液合并,12 000 r/min 离心 10 min。取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,1 μl 进样 GC-MS 分析。

2.1.2 对照品溶液制备 分别精密称取各对照品适量,于 10 ml 容量瓶中加乙醚至刻度,4 °C 冰箱中冷藏,备 GC-MS 分析。

2.1.3 麝香保心丸灌胃样品制备 精密称定麝香保心丸样品适量,研细,于锥形瓶中加入 0.5% 羧甲基纤维素钠制成混悬液(浓度:0.34 g/ml)。20 只 SD 雄性大鼠随机分为溶剂对照组与给药组,每组 10 只,溶剂对照组大鼠给予 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液灌服。给药组大鼠给予麝香保心丸混悬液灌服(剂量:3.4 g/kg)。服药 30 min 后,所有大鼠腹腔注射 1% 的戊巴比妥钠溶液(剂量:0.15 ml/kg)麻醉。肝门静脉取血 5 ml,置于涂肝素的 EP 管中,4 °C,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,-80 °C 冰箱冷冻,备用。

2.2 色谱条件 Thermo TR-5 ms 色谱柱;Xcalibur 色谱工作站;载气为氦气;载气流速 1.0 ml/min;进

样口温度 220 °C;离子源温度 250 °C;进样体积 1 μl;梯度升温程序见表 1;分析时间 59 min。

表 1 梯度洗脱程序

升温速度(°C/min)	温度(°C)	停留时间(min)
	60	0
20	85	1
20	150	5
5	165	0
20	200	6
3	225	2
4	245	2

2.3 质谱条件 进样各对照品溶液,优化 GC-MS 参数,优化的质谱条件:EI 源,电子能量 70 eV,扫描速度 5 次/s,发射电流 100 μA,扫描周期 3 642 amu/s,离子源温度 250 °C,扫描质量范围 10 ~ 650 u。数据分析采用 Xcalibur 色谱工作站。

2.4 入血成分认定 于 5 ml EP 管中加入血浆样品 250 μl,乙醚 1 ml,涡旋 1 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,同法萃取两次,合并上清,真空旋转蒸干,残渣加入 50 μl 乙醚复溶,离心,取上清液 1 μl 进样 GC-MS 分析,比较溶剂对照组与给药组质谱图,确定麝香保心丸入血成分。质谱鉴定过程:于 40 ~ 500 u 范围内,分别对空白血浆,给药血浆以及麝香保心丸提取液的 GC-MS 色谱图以 1 μl 为间隔单位进行提取,即分别提取 40、41、42、498、499 及 500 等离子,对提取离子色谱图进行比较,分析空白血浆和给药血浆离子峰度差异,以此鉴定化合物结构。结果如表 2 所示。

2.4.1 原型化合物鉴定 由于空白血浆与给药血浆的质谱离子流图几乎相同,背景噪音掩盖了目标化合物的响应值。为扣除噪音干扰,本研究采用提取离子的方法对空白血浆与给药血浆图谱进行处理。设定提取离子波动范围 ± 0.5u,原型化合物鉴定方法如上所述,如提取离子 m/z 55,空白血浆与给药血浆图谱如图 1 所示。给药血清图谱中于 36.8 min 处出现一差异峰,通过与对照品及 NIST05 数据库比对,该化合物最终被确定为麝香酮。同理,龙脑、异龙脑、苯甲酸苄酯、肉桂醛及肉桂酸经同样方法鉴定。

2.4.2 代谢产物鉴定 代谢产物鉴定方法如上所述,当提取离子为 m/z 108 时,给药后血清和空白血清的提取离子色谱图如图 2 所示。通过给药血浆与空白血浆对比,于保留时间 25.7、26.6 及 26.9 min 处的出现 3 个差异峰,且在麝香保心丸提取液色谱图中未见,提示其可能为代谢成分。经过 NIST05 数据库比对,3 个化合物被鉴定 bicycle[2,2,1]heptan-

2-ol, 2-allyl-1, 7, 7-trimethyl, 2, 6, 10 - trimethyltetradecane 及 2-butyl-5-methyl-3-[2-methylprop-2-enyl] cyclohexanone。

表 2 GC-MS 鉴定的入血成分和代谢产物

保留时间 (min)	化合物	结构式
12.6	borneol	<chem>CC1(C)C2C(C1)C(C2)O</chem>
13.5	isoborneol	<chem>CC1(C)C2C(C1)C(C2)O</chem>
24.2	cinnamaldehyde	<chem>O=CC=Cc1ccccc1</chem>
25.7	bicyclo[2,2,1]heptan-2-ol, 2-allyl-1,7,7-trimethyl	<chem>CC1(C)C2C(C1)C(C2)O</chem>
26.6	2,6,10-trimethyltetradecane	<chem>CC(C)CCCC(C)CCCC(C)CCCC</chem>
26.9	2-butyl-5-methyl-3-[2-methylprop-2-enyl] cyclohexanone	<chem>CC(C)C1C(C)C(C1)C(=O)C</chem>
27.7	6-methyloctadecane	<chem>CCCCCCCC(C)CCCCCCCC</chem>
28.2	binamic acid	<chem>O=C(O)/C=C/c1ccccc1</chem>
35.8	benzyl benzoate	<chem>O=C(OCC1=CC=CC=C1)c2ccccc2</chem>
36.8	muscone	<chem>CC1CCCCCCCC1=O</chem>

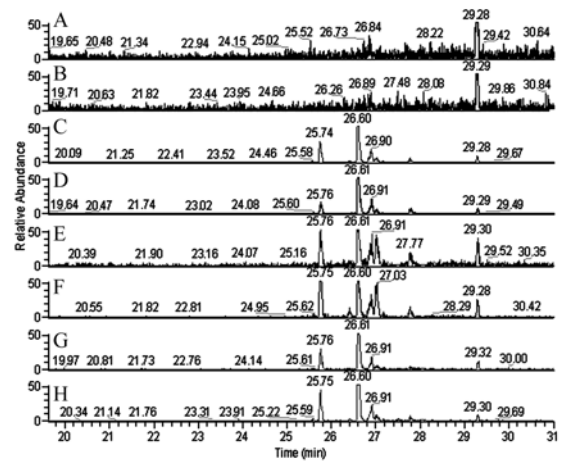


图 2 提取离子 $m/z 10^8$ 的空白血浆质谱图

A, B-给药血浆; C, D-0.5 h 取血; E, F-1 h 取血; G, H-1.5 h 取血

3 讨论

本文基于气相色谱-质谱联用技术,对中药复方麝香保心丸挥发性入血成分进行研究,共确认 10 个入血成分,包括 6 个原型成分及 4 个代谢产物。在已鉴定的这些成分中,很多化合物对心血管疾病有着积极的治疗和预防作用。如肉桂中的肉桂醛能够抑制 TNF- α 诱导的细胞粘附因子的产生,可以减少血小板聚集和血栓形成,有利于对抗动脉粥样硬化^[9,10]。麝香酮抑制血管内皮细胞与中性粒细胞黏附及其表面 ICAM-1、VCAM-1 和 CD44 表达,有利于缓解心血管内皮细胞损伤后的炎症反应^[11]。只含有龙脑和异龙脑的人工冰片则能使冠状窦血流量回升,减慢心率,降低心肌氧耗量^[12]。这些化合物对于心血管积极的治疗作用也从另一方面验证了本研究的可靠性。本研究过程中的方法学优化及结果如下:

3.1 给药剂量确定 本研究分别考察了不同给药剂量(0.8、1.7 和 3.4 g/kg)大鼠血浆中的入血成分,经对比 GC-MS 图谱主要化合物特征离子(麝香酮 $m/z 55$ 、肉桂酸 $m/z 147$ 、龙脑和异龙脑 $m/z 95$)峰度,发现麝香保心丸中主要的挥发性成分在 3.4 g/kg 剂量下的色谱峰较高,所以给药剂量选择为 3.4 g/kg。

3.2 取血时间点的确定 本研究分别考察了不同取血时间(15、30、60 min)大鼠血浆中的入血成分,从提取特征离子色谱峰中发现,30 min 时间点的血浆样品质谱图中发现麝香酮、肉桂酸、龙脑和异龙脑均有色谱峰出现,给药 60 min 后取血浆样品质谱图中各目标离子的提取离子色谱峰变小,冰片中龙脑、异龙脑的色谱峰甚至消失。所以选择 30 min 为最

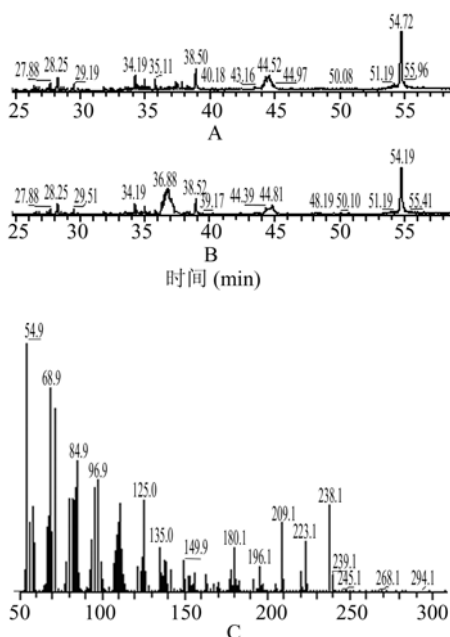


图 1 提取离子 $m/z 55$ 的空白血浆 (A)、给药血浆 (B) 色谱图及差异色谱峰碎片离子图 (C)

佳时间点。

3.3 样品前处理方法优化 本研究分别考察了不同前处理方法对入血成分的影响,经比较,乙醚溶液比正己烷/氯仿(10:1)混合溶液提取效率要高,正己烷/氯仿(10:1)混合溶液对麝香酮提取效果较差,所以最终选择乙醚萃取法作为处理血样方法。

综上所述,本研究建立了一种快速筛选中药复方麝香保心丸中挥发性入血成分的方法,麝香保心丸药效物质得以最大程度阐释,这些化合物在机体的作用靶点和信息调控机制将是今后深入研究的重点。通过学科间的交叉融合,尤其是生物信息学和生物色谱技术等现代科学技术的的应用有利于揭示中药药效物质对机体的调控机理,展现中药复方多成分、多靶点协同作用的特点,为中药复方现代化研究提供可靠技术手段。

【参考文献】

[1] 罗心平. 麝香保心丸对大鼠心肌梗塞后左室胶原改建影响的研究[J]. 中国中医基础医学杂志,1998,4(7):20.
 [2] 李勇,罗心平,范维琥,等. 麝香保心丸对兔动脉壁一氧化氮代谢的影响[J]. 中国急救医学,1999,19(8):451.
 [3] 王学忠,章萍,王岳松,等. 基质金属蛋白酶2在DHR心脏中的表达及麝香保心丸的影响[J]. 中国中医急症,2006,15(8):893.
 [4] 于榕,史念青,鲁映青. 麝香保心丸对家兔心肌梗死的作用及机制[J]. 中国药理学会,2000,17(3):1.
 [5] Lv YH,Zhang X,Liang X, et al. Characterization of the constituents in rat biological fluids after oral administration of Fufang Danshen tablets by ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal,2010,52(11):155.

[6] Wang SP, Liu L, Wang LL, et al. Screening and analysis of the multiple absorbed bioactive components and metabolites in rat plasma after oral administration of Jitai tablets by high-performance liquid chromatography/diode-array detection coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2010,24(16):1641.
 [7] Hu YM,Wang YT,Stephen CW, et al. Identification of the major chemical constituents and their metabolites in rat plasma and various organs after oral administration of effective Erxian Decoction (EXD) fraction by liquid chromatography mass spectrometry[J]. Biomed Chromatogr,2010,24(22):479.
 [8] Jiang P,Liu RH,Dou SS, et al. Analysis of the constituents in rat plasma after oral administration of Shexiang Baoxin pill by HPLC-ESI-MS/MS[J]. Biomed Chromatogr,2009,23(17):1333.
 [9] Liao BC,Hsieh CW,Liu YC, et al. Cinnamaldehyde inhibits the tumor necrosis factor- α -induced expression of cell adhesion molecules in endothelial cells by suppressing NF- κ B activation: Effects upon I κ B and Nrf2[J]. Toxicol Appl Pharmacol,2008,229(2):161.
 [10] Huang JQ,Wang SW,Luo XX, et al. Cinnamaldehyde reduction of platelet aggregation and thrombosis in rodents [J]. Thromb Res,2007,119(3):337.
 [11] 何秀娟,李萍,邱全琰,等. 麝香酮抑制血管内皮细胞与中性粒细胞黏附及其表面 ICAM-1、VCAM-1 和 CD44 表达[J]. 中国免疫学杂志,2006,22(2):148.
 [12] 江文德,徐端正,胡国钧,等. 冠心苏合丸的药理研究及其简化制剂-苏冰滴丸的理论基础[J]. 药学报,1979,14(11):655.

[收稿日期]2012-04-16

[修回日期]2012-05-09

(上接第206页)

【参考文献】

[1] Sipila P, Jalkanen J, Huhtaniemi IT, et al. Novel epididymal proteins as targets for the development of post-testicular male contraception[J]. Reproduction, 2009, 137: 379.
 [2] Moreno RD, Alvarado CP. The Mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence [J]. Mol Repord Dev, 2006, 73(11): 1430.
 [3] Rawe VY, Diaz ES, Chemes HE, et al. The role of sperm proteasomes during sperm aster formation and early zygote development: implications for fertilization failure in humans[J]. Mol Human Reprod, 2008, 23(3): 573.
 [4] Mishra PK, Manivannan B, Pathak N, et al. Status of spermatogenesis and sperm parameters in langur monkeys following long-term vas occlusion with styrene maleic anhydride[J]. Androl, 2004, 24(4): 501.

[5] Jones R, Parry R, Leggio L, et al. Inhibition of sperm-zona binding by suramin, a potential 'lead' compound for design of new anti-fertility agents[J]. Mol. Human Reprod, 1996, 2: 597.
 [6] 吕加国,盛春泉,张珉,等. 人顶体酶三维结构的同源建模及其与KF950的分子对接研究[J]. 化学学报,2006,64(10):1073.
 [7] 宁微微,吕加国,刘雪飞,等. 新型唑啉酮类先导物的设计、合成及抑制人顶体酶活性研究[J]. 药学实践杂志,2010,28(4):296.
 [8] 张珉,吕加国,朱驹,等. 人顶体酶活性腔性质及与抑制剂的结合模式[J]. 高等学校化学学报,2009,30(12):2409.
 [9] Ono Y. Dimethyl carbonate for Environmentally benign reaction. Pure&Appl Chem. 1996, 68(2): 367.
 [10] 宋桂红,张珉,张晓梦,等. 南德士抑制人精子顶体酶活性的实验研究[J]. 中华男科学杂志,2009,15(8):700.

[收稿日期]2012-02-13

[修回日期]2012-03-27