配伍对丹参提取物中主要成分体外肠吸收的影响及其定性研究

林　力, 刘建勋*, 张　颖, 毛超一, 段昌令, 付建华, 林成仁

(中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

摘要: 应用改进的大鼠肠囊外翻法研究了配伍对丹参提取物中主要成分吸收的影响。通过 HPLC-ECD 的分离和检测, 在给药后的肠吸收液中发现了 5 个主要成分峰, 经 HPLC-MS/MS 鉴定及标准品确证, 其中峰 2、3、4、5 分别为迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹酚酸 A。同时经过来源分析, 上述物质可以鉴别为丹参提取物中的主要成分, 丹参提取物中另一种主要成分, 丹酚酸 E 则未在肠吸收液中检出。结果显示峰 2、3、4 代表的成分在配伍药物给药前后没有明显的差异, 而峰 5 (丹酚酸 A) 则有着明显的增加, 这预示着丹酚酸 A 可能在配伍用药中起到了增加药效的作用。

关键词: 配伍; 丹参; 肠囊外翻法; 液质联用

中图分类号: R917　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0513-4870 (2010) 10-1290-06

Prescription compatibility effect on the major components absorption in Danshen extract and their identification

LIN Li, LIU Jian-xun*, ZHANG Ying, MAO Chao-yi, DUAN Chang-ling, FU Jian-hua, LIN Cheng-ren

(*Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China*)

Abstract: An improved everted gut sac method was applied to the study of prescription compatibility effect on the major components in Danshen extracts. With the separation and detection by HPLC-ECD, 5 major peaks could be detected in intestinal absorbed solution after prescription administration. Following the identification by HPLC-MS/MS, peak 2, 3, 4, and 5 were rosmaric acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, and salvianolic acid A, respectively, which also confirmed with reference standards of those components. Through paralleling substance identification, peak 2, 3, 4, and 5 could be found as the major components in Danshen extracts, except Salvianolic acid E which is undetectable in intestinal solution. The contents of peak 2, 3, and 4 did not show difference before and after compatible prescription administrated, where the peak 5 had a significant increase in the same process. Those results revealed that peak 5, salvianolic acid A, might lead to an increasing pharmacological effect after prescription compatibility.

Key words: combination; *Salvia miltiorrhiza*; everted gut sac; LC-MS/MS

丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 的干燥根及根茎, 首载于《神农本草经》, 本品味苦微寒, 归心、肝经, 具有活血化瘀、调经止痛、清心安神等功效。丹参在传统中药处方中应用很少, 但现代中医临床实践中丹参成为使用频率很高的草药, 在很多处方中有时候成为主药, 甚至被制成注射剂。丹参具有良好的活血化瘀功效, 在临床上常用于冠心病、心绞痛、缺血性中风等。

本室开发的中药制剂双参通冠方是由人参、丹参和元胡三药有效部位组成, 具有益气活血、祛瘀行气止痛功效, 临床主要用于治疗气血郁滞、心失所养所致的冠心病心绞痛。前期整体药理学和细胞药理学研

收稿日期: 2010-04-10.

基金项目: 国家中医药管理局课题资助项目 (06-07ZP49); 国家自然科学基金重点资助项目 (30830118); 十一五科技重大专项 (2009ZX09502-006).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-62874049, E-mail: liujx0324@sina.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

究都显示复方配伍给药的药效要优于丹参给药的药效, 但作为复方中活血化瘀主药的丹参, 其主要有效成分丹酚酸 B 的 AUC 值在配伍给药后却显著降低[1], 因此, 本文应用大鼠肠囊外翻法观察不同配伍下丹参提取物中主要成分变化规律, 尝试从吸收环节探讨药效增强的原因, 并对肠囊吸收成分进行定性分析, 为下一步从分布、代谢和排泄角度深入探讨复方双参通冠的配伍机制打下基础。

材料与方法

药品和试剂　丹酚酸 B (salvianolic acid B, SAB) 对照品购自中国药品生物制品检定所, 编号 111562-200403; 紫草酸对照品 (lithospermic acid, LA) 和迷迭香酸对照品 (rosmaric acid, RA) 均购自天津一方科技有限公司, 纯度大于 98%; 丹酚酸 A 对照品 (salvianolic acid A, SAA) 由本草天源提供, 纯度大于 95%; 人参总皂苷、丹参总酚酸和延胡索总生物碱由中国中医科学院西苑医院药学室提供, 批号依次为 040801、050816 和 060927。

牛血清白蛋白 V 购自北京世纪银丰公司, 考马斯亮蓝 G-250 购自华美生物工程有限公司; Tissue Culture 199 培养基 (Invitrogen Corporation) 购自北京夏斯生物科技有限公司; 甲酸、甲醇、乙腈、磷酸和磷酸二氢钠均为色谱纯, 分别购自美国 Fisher 公司和 J.T.BAKER 公司; 水为娃哈哈饮用纯净水, 杭州娃哈哈集团有限公司生产; 其他试剂均为市售分析纯。

实验动物　Wistar 大鼠, 雄性, 体重为 (220 ± 20) g, 中国医学科学院动物实验研究中心提供, 许可证号 SCXY (京) 2004-0001。

实验仪器　日本 Shimadzu LC-10A 高效液相色谱仪, 配有 ESA Coulochem 5100 电化学检测器 (ESA Model 5011 analytical cell); GJ2 酶联免疫分析仪, 美国 Alisei 公司; 美国 Agilent 1200 高效液相色谱色谱系统; API 4000 Q-TRAP 型三重四极杆串联质谱仪, 配有离子喷雾离子源以及 Analysis 1.4.2 数据处理系统, 美国 Applied Biosystem 公司; Micro 22R 台式高速冷冻离心机, 德国 Hettich 公司; Biomedical Freezer 超低温冰箱, 日本 SANYO 公司; AG-245 分析天平和 320 pH 计, 美国 Mettler Toledo 公司; M18780 氮吹仪, 美国 Pierce 公司; MS1 Minishaker 涡流混合器, 德国 IKA 公司; 10～1 000 μL 移液枪, Socorex 公司出品。

供试品溶液的制备　实验分为丹参总酚酸组和复方组, 取各组样品适量, 用 TC199 培养液分别配制成浓度为 0.250 和 1.125 mg·mL^{-1} 的溶液 (两组中含有丹参提取物的量相同, 均为 0.25 mg·mL^{-1}), 待用。

肠囊的制备和孵育　实验采用改良的大鼠肠囊外翻法[2]进行研究。取禁食后大鼠, 脱颈椎处死, 从胃幽门以下 15 cm 开始向下取出整段小肠, 用生理盐水灌洗后转移至 TC199 培养液中, 剥离肠表面的脂肪及血管, 将其分成 4.5 cm 左右的肠囊, 外翻后内侧注入 TC199 溶液 0.8 mL, 外侧加入含有待测药品的 TC199 培养基溶液, 于 37 ℃振荡水浴 (60 cycle/min) 中孵育, 在不同时间点 (30、60、90 和 120 min) 取样 200 μL, 4 ℃高速离心后待测。最后一个时间点取出肠囊, 应用考马斯亮蓝法[3]进行蛋白含量的测定。每个时间点实验重复 3 次。

丹参提取物定性测定方法

色谱条件　色谱柱为美国 Agilent ZORBAX SB-C18 柱 (150 mm × 4.6 mm ID, 5 μm), 流动相为 20% 乙腈-0.1% 的甲酸水, 等度洗脱, 流速为 0.8 mL·min^{-1}, 柱温为 30 ℃。

质谱条件　离子喷射电压 (IS) −4.5 kV, 源内气体 GS1 为 448.18 kPa, 源内气体 GS2 为 310.28 kPa, 气帘气体 137.9 kPa, 碰撞气 (CAD) High, 源内温度 700 ℃; 检测方式: 负离子检测; 对于体外丹参提取物的定性分析, 采用 Q3 MS-IDA-EPI-EPI 扫描方式, 肠囊吸收成分采用 Q3 MS-MRM 方式, 通过保留时间 (t_R) 及离子碎片质荷比 (m/z) 解析化合物结构。

肠囊吸收成分分析方法　采用 HPLC 电化学检测器进行样品分析: 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C18 柱 (150 mm × 4.6 mm ID, 5 μm), 流动相为 50 mmol·L^{-1} 的磷酸二氢钠−乙腈 (79.5∶20.5), 等度洗脱, 流速为 1 mL·min^{-1}, 检测电压: 300 mV, 柱温为 30 ℃。

数据分析　小肠对药物的吸收可能由于有效吸收面积的不同而不同, 因此不能以直接测定的药物浓度来计算药物的肠吸收。考虑到精确测定肠囊表面积较为困难, 同时由于肠表面积与肠蛋白含量具有一定的线性关系[2], 因此本文采用肠蛋白量进行校正, 以消除不同批次肠囊大小对吸收结果的差异。对

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

于不同配伍引起化合物的吸收差异, 用单位肠蛋白累积吸收总量表示。如下式所示: $Q_i = (C_iV + M_{out})/M_{pro}$, 式中 Q_i 为单位肠蛋白累计吸收总量, C_i 为第 i 时刻肠内液药物浓度, V 为肠内液体积, M_{out} 为已取出肠液中所含药物的总量 (当 i 为 0.5 h 时, 即第 1 次取样时 M_{out} 为 0), M_{pro} 为该段肠囊的蛋白含量。

对于丹酚酸 B, 通过方法学研究对其肠囊吸收进行定量分析, 数据单位为 ng·mg^{-1} protien, 表示每毫克大鼠肠蛋白能转运丹酚酸 B 的量; 对于其他 3 种成分, 直接应用峰面积法进行半定量分析, 数据单位为 peak area/mg protein, 表示每毫克大鼠肠囊蛋白可以转运该化合物的峰面积的量。实验结果用“$\bar{x} \pm s$”表示, 用 t 检验考察不同给药方式下肠蛋白转运药物能力的差别。

结果

1 丹参提取物主要成分体外定性分析

取适量丹参提取物进行化合物定性分析, 通过调整其色谱条件, 使待测化合物在总离子流图上保证各峰达到基线分离 (图 1), 应用 4000 Q 上 IDA 方式进行定性分析, 结果显示, 总离子流图上丹参提取物中共有 5 个色谱峰 (分别命名为 Peak A～E)。

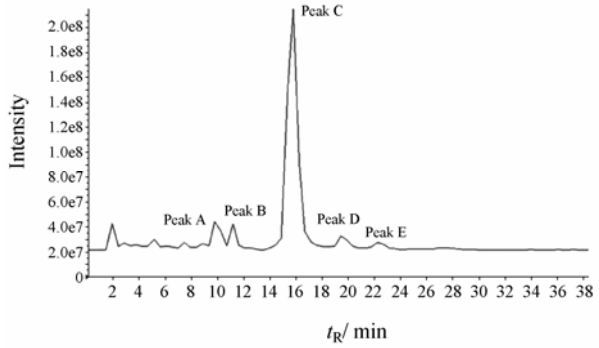

Figure 1 Total ion chromatogram of Danshen extraction (negative mode). Peaks A: Rosmaric acid, RA; B: Lithospermic acid, LA; C: Salvianolic acid B, SAB; D: Salvianolic acid E, SAE; E: Salvianolic acid A, SAA

1.1 Peak A 的定性分析 Peak A 的保留时间为 9.91 min, 在该时间点进行一级扫描, 质谱图上出现了 *m/z* 359.0 和 *m/z* 380.9 的峰, 推测可能分别为 $[M-H]^-$和 $[M+Na-2H]^-$峰; 二级质谱图 (图 2A) 以 *m/z* 359.0 为母离子时, 分别出现 *m/z* 179.0、*m/z* 161.0 和 *m/z* 133.1 的峰, 其中 *m/z* 179.0 为母离子脱去一分子咖啡酸生成的, *m/z* 161.0 为母离子脱去一分子丹参素生成的, *m/z* 133.1 在此基础上脱去 CO 生成。结合文献[4]和对照品质谱图 (图 2A') 确认其为迷迭香酸。

1.2 Peak B 的定性分析 Peak B 的保留时间为 11.20 min, 在该时间点进行一级扫描 (图 2B), 质谱图上出现了 *m/z* 559.0、*m/z* 537.1 和 *m/z* 493.1 的峰, 推测可能分别为 $[M+Na-2H]^-$、$[M-H]^-$和 $[M-H-COOH]^-$峰。出现 $[M-H-COOH]^-$可能与源内裂解有关; 由于该成分分子离子峰易于裂解, 因此在此实验条件下一级碎片中 *m/z* 537.1 的峰强太弱, 仪器没有对其二级进行裂解。但结合一级质谱图和对照品质谱图 (图 2B') 确认其为紫草酸。

1.3 Peak C 的定性分析 Peak C 的保留时间为 15.67 min, 在该时间点进行一级扫描, 质谱图上出现 *m/z* 717.1 和 *m/z* 739.1 的峰, 分别为 $[M-H]^-$和 $[M+Na-2H]^-$峰; 二级质谱 (图 2C) 以 *m/z* 717.1 为母离子时, 分别产生 *m/z* 519.1、*m/z* 339.2、*m/z* 321.2 和 *m/z* 279.1 的碎片。碎片 *m/z* 519.1 为母离子脱去一分子丹参素 $[M-H-Danshensu]^-$, 碎片 *m/z* 339.2 和 *m/z* 321.2 则在此基础上分别再丢失一个 $C_9H_8O_2$ 和一分子丹参素, 碎片 *m/z* 279.1 为 *m/z* 321.2 损失一个 $[-CH_2CO]$所致。上述结构碎片与丹酚酸 B 的结构比较符合, 结合参考文献[4]和对照品质谱图 (图 2C') 确认其为丹酚酸 B。

1.4 Peak D 的定性分析 Peak D 的保留时间为 19.58 min, 在该时间点进行一级扫描, 质谱图上出现 *m/z* 717.1 和 *m/z* 739.1 的峰, 分别为 $[M-H]^-$和 $[M+Na-2H]^-$峰; 二级质谱 (图 2D) 以 *m/z* 717.1 为母离子时, 出现碎片 *m/z* 519.1 为母离子脱去一分子丹参素 $[M-H-Danshensu]^-$, 碎片 *m/z* 339.2 和 *m/z* 321.2 则在此基础上分别再丢失一个 $C_9H_8O_2$ 和一分子丹参素, 碎片 *m/z* 278.9 为 *m/z* 321.2 损失一个 $[-CH_2CO]$所致。上述结构碎片与丹酚酸 B 的结构类似, 但通过对照品发现 SAB 的保留时间为 15.67min, 参考文献[4]显示 SAE 与 SAB 属于同分异构体, 分子式和分子量相同, 但保留时间上比 SAB 稍晚, 因此初步定性为丹酚酸 E。

1.5 Peak E 的定性分析 Peak E 的保留时间为 22.38 min, 在该时间点进行一级扫描, 质谱图上出现 *m/z* 493.0 和 *m/z* 514.9 的峰, 分别为 $[M-H]^-$和 $[M+Na-2H]^-$峰; 二级质谱以 *m/z* 493.0 为母离子时 (图 2E), 分别产生 *m/z* 295.1 和 *m/z* 185.0 的碎片。碎片 *m/z* 295.1 为母离子脱去一分子丹参素 (198 Da) 而生

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

成的[M−H−Danshensu]⁻, 碎片 *m/z* 185.0 为在此基础上再丢失一个含有两个酚羟基的苯环 ($C_6H_6O_2$—110 Da)。上述结构碎片与丹酚酸 A 的结构比较符合, 结合参考文献[4]和对照品质谱图 (图 2E') 确认其为丹酚酸 A。

2　肠囊吸收丹参成分的定性研究

根据丹参提取物中明确的各成分保留时间和二级质谱相关信息, 采用 MRM-IDA-EPI 方式对肠吸收成分进行定性分析, 检测离子对为: SAB/SAE 为 717.2/519.1 和 717.2/321.0, SAA 为 493.1/294.9 和 493.1/184.9,

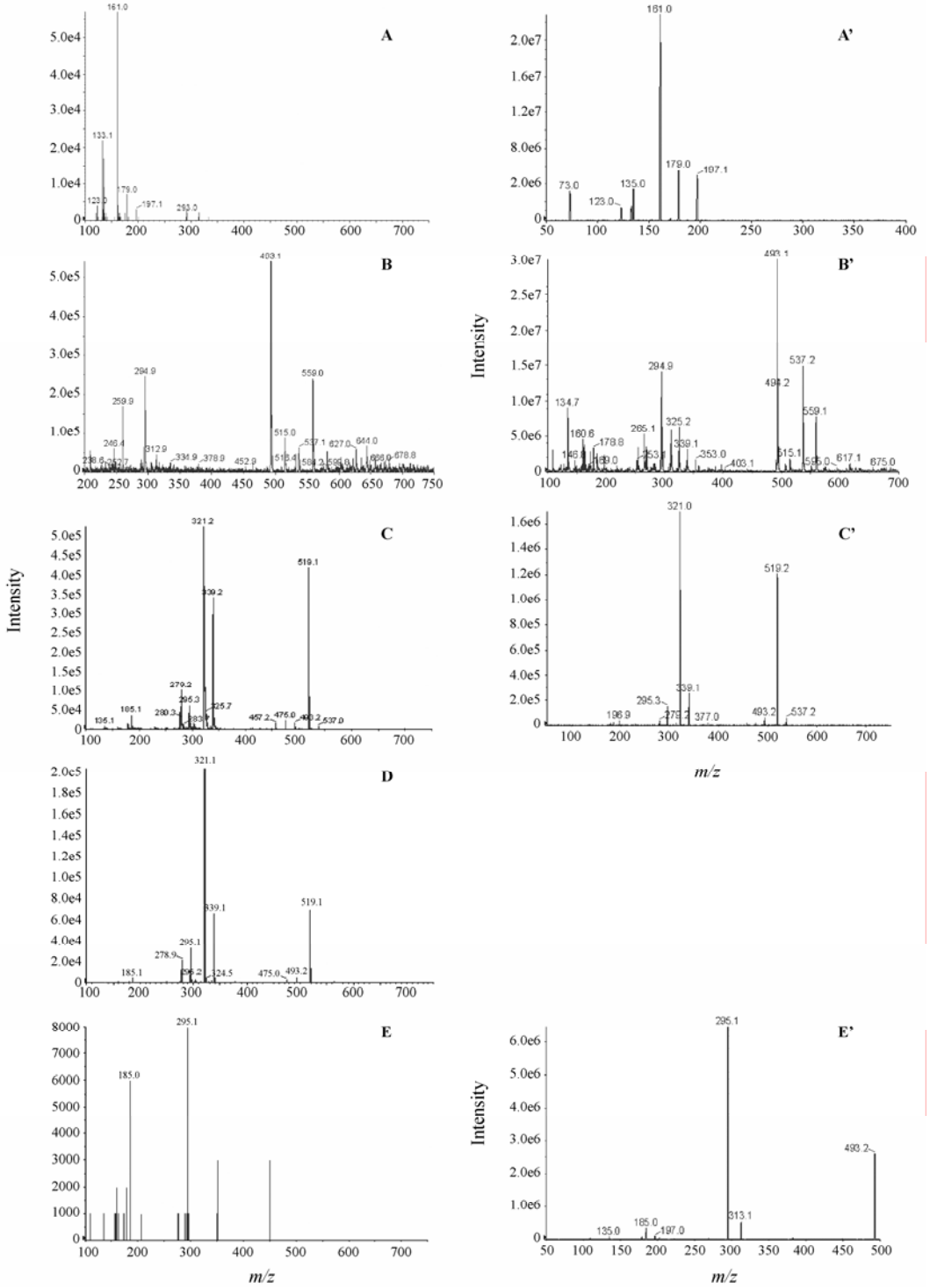

Figure 2　ESI-Mass spectrum of different compound in Danshen extraction (A, B, C, D, and E) and its corresponding reference substance (A', B', C', and E').　A, A': RA; B, B': LA; C, C': SAB; D: SAE; E, E': SAA

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

LA 为 537.1/493.1 和 537.1/294.9, RA 为 359.0/161.0 和 359.0/133.1。结果显示这 5 种成分在肠内液中均能检测到。

3 配伍对肠吸收的影响

不同配伍对丹参提取物肠吸收的影响实验采用了 HPLC-ECD 的检测方法。通过对丹参提取物进行色谱分离, 结果显示有效组分在色谱图上有 5 个主要吸收峰 (图 3), 将其分别命名为 Peak 1～5, 通过对照品确定峰 2～5 分别为 RA, LA, SAB 和 SAA。由于 Peak 1 肠囊孵育后吸收太少电化学无法检测到, 因此本实验主要对另外 4 个化合物进行肠吸收研究。

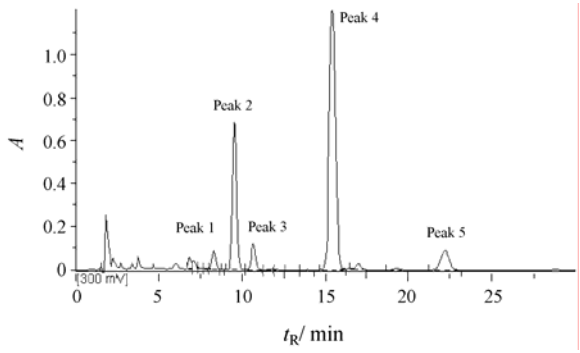

Figure 3 HPLC-ECD chromatogram of Danshen extraction. Peaks 1: Unknown; 2: RA; 3: LA; 4: SAB; 5: SAA

3.1 Peak 4 的测定 取 TC199 培养液依次加入丹酚酸 B 对照品系列溶液, 配制不同浓度的 TC199 样品溶液, 建立工作曲线。求得直线回归方程为 $Y = 0.015 + 2.448\ X$, 相关系数为 0.997, 线性范围在 0.01～10 μg·mL^{-1}。3 个浓度待测成分的相对回收率均大于 90%, 精密度的 RSD 值小于 7.7%, SAB 在 37 ℃ 培养液 3 h 中 RSD 小于 9.2%, 可用于定量分析。

结果显示, 两种给药方式下不同时间点肠囊吸收的量无统计学差异, 见表 1。

3.2 Peak2、Peak 3 和 Peak 5 的测定 取丹参有效部位适量, 用 TC199 培养液配制成不同浓度的样品溶液, 建立工作曲线。结果显示 Peak 2 (RA)、Peak 3 (LA) 和 Peak 5 (SAA) 的峰面积与浓度稀释倍数的相关系数均大于 0.995, 表明在检测范围内样品浓度与仪器信号响应呈正比。

对于 RA 和 LA, 除了 RA 的 1.0 h 外, 其他各时间点在两种给药方式下肠囊吸收的量均没有统计学差异; 对于 SAA, 除了 0.5 h 外其余各时间点复方配伍给药后肠囊吸收的量均显著增加, 与丹参有效部位给药相比具有明显的统计学差异, 测定结果如表 1 所示。

讨论

在定量和定性测定肠吸收成分的研究中, 实验采用了不同的色谱系统, 这是因为肠吸收实验采用的 TC199 培养液中存在较高浓度的盐, 盐溶液的存在会引起质谱严重污染, 因此不能用质谱进行检测。在 HPLC 测定中本实验选择电化学检测器不仅是考虑到酚酸类化合物具有较高的灵敏度, 同时复方中人参总皂苷和延胡索总生物碱均在该检测器上无信号反应, 这样可以大大提高检测丹酚酸类化合物的专属性, 降低色谱分离的难度。

中药及天然药物的多成分定性分析是十分复杂的, 通常需要根据实验者掌握的待测化合物信息多少进行确定定性分析的策略。本实验进行分析的对象是丹参酚酸类的化合物, 初步掌握了可能含有的化合物, 在进行体外定性分析时由于有效部位中样品量足够多, 因此采用了 Q3 MS-IDA-EPI 方式。而对于肠吸收的分析, 由于含量较低, 并且通过体外测

Table 1 Accumulative absorption of different peaks at different times. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs* Danshen group. SSTG group is composed by the extraction of Danshen, Ginseng and Yuanhu

Sample	Time/h	Peak area/mg			Peak 4 (SAB)/ng·mg^{-1}
		Peak 2 (RA)	Peak 3 (LA)	Peak 5 (SAA)	
Danshen	0.5	33.62 ± 12.13	10.22 ± 9.33	7.31 ± 2.35	16.79 ± 12.30
	1.0	70.14 ± 15.02	21.82 ± 3.91	15.30 ± 5.62	37.16 ± 7.43
	1.5	117.82 ± 58.2	36.51 ± 9.21	24.32 ± 8.03	59.91 ± 10.89
	2.0	146.18 ± 47.71	67.13 ± 14.03	45.93 ± 9.96	108.48 ± 8.13
SSTG	0.5	27.29 ± 7.63	9.58 ± 2.54	9.86 ± 2.27	11.56 ± 1.83
	1.0	45.36 ± 11.23*	25.46 ± 7.85	36.79 ± 6.99**	30.50 ± 9.13
	1.5	112.15 ± 30.61	51.22 ± 20.40	83.35 ± 24.94**	59.58 ± 25.35
	2.0	163.82 ± 7.31	85.31 ± 22.73	128.64 ± 34.82**	104.74 ± 19.78

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

定明确了化合物的质谱特征, 因此选择 MRM 方式进行定性分析。考虑到丹参有效部位中同分异构体较多, 2 对离子对不一定保证定性结果的准确, 实验又进行了 EPI 产物离子二级质谱的测定, 结合这两方面信息并根据体外测定结果最终确定丹参提取物肠吸收原形成分的结构。

本实验主要对丹参提取物中 RA、LA、SAB 和 SAA 等 4 个成分进行了肠吸收的实验研究, 结果显示配伍对 RA、LA 和 SAB 的吸收基本无影响, 但可以显著增加 SAA 的吸收。前期的药代动力学实验结果[1]显示复方配伍可显著降低 SAB 的 AUC 值, 而在大鼠肠囊外翻实验中配伍前后吸收量没有变化, 表明 SAB 在大鼠体内血药浓度的降低可能不是由小肠吸收环节引起的, 药代参数显示该成分表观分布容积较大, 是否与其在大鼠体内分布或代谢相关, 需要进一步的实验研究; 文献[5]报道 SAA 肠道中吸收属于被动扩散, 因此配伍给药后肠吸收成分显著增加不可能是因为肠道转运蛋白的因素。考虑到上皮细胞膜具有脂质膜的特性, 非离子性的有机弱酸和有机碱易吸收, 因此推测配伍后 SAA 在肠道吸收量的增加很有可能是 SAA 在溶液中分子状态存在的数量增加有关。已有文献[6]报道 SAA 具有很强的抗氧化活性, 保护由于缺血再灌注所引起的心脑损伤, 推测复方配伍后药效增加的主要因素很有可能与 SAA 吸收量增大有关。由于这只是体外肠吸收的实验结果, 该结论有待于大鼠体内实验的进一步验证。

References

[1] Lin L, Liu JX, Zhang Y, et al. Effect of different combinations of compound Danshen preparation on pharmacokinetic parameters of salvianolic acid B in rat plasma [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2008, 33: 2683−2687.

[2] Barthe L, Bessouet M, Woodley JF, et al. The improved everted gut sac: a simple method to study intestinal P-glycoprotein [J]. Int J Pharm, 1998, 173: 255−258.

[3] Wilson TH, Wiseman G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface [J]. J Physiol, 1954, 123: 116−125.

[4] Zhang JL, Cui M, He Y, et al. Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC-UV and HPLC-MS methods [J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 36: 1029−1035.

[5] Zhang XR, Pan WS. Studies on the absorptive kinetics of salvianolic acid A in rats' small intestines *in vivo* [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2002, 19: 14−17.

[6] Liu YL, Liu GT. Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by salvianolic acid A [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2002, 37: 81−85.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net