

## 复方丹参滴丸人含药血浆中三七相关代谢物的研究

赵欣<sup>1</sup>, 强光辉<sup>2</sup>, 郭毅<sup>3</sup>, 赵新锋<sup>1</sup>, 刘青<sup>1</sup>, 郑晓晖<sup>1</sup>

(1. 西安交通大学中草药现代化研究及工程中心, 陕西 西安 710061; 2. 西安市自来水总公司, 陕西 西安 710082;  
3. 陕西省计量测试研究所, 陕西 西安 710048)

**摘要:**建立了复方丹参滴丸人含药血浆中三七相关代谢物的固相萃取-高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱分析方法。采用固相萃取预处理样品, 高效液相色谱梯度洗脱分离样品, 电喷雾正离子模式测定, 通过离子阱质谱的步进式碰撞功能, 获得多级碎片信息。在人含药血浆的全扫描代谢谱中发现 4 个新的色谱峰。利用多级质谱提供的碎片离子信息, 对其进行结构分析, 推测其形成途径, 发现 4 个色谱峰均由三七相关代谢物产生。该方法精密度、稳定性、重复性均符合测定要求, 可用于对复方丹参滴丸人含药血浆中三七相关代谢物的进一步研究。

**关键词:**电喷雾-离子阱质谱; 代谢; 复方丹参滴丸; 三七

**中图分类号:** O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2007)01-23-04

## The New Metabolites of *Notoginseng* in Compound Danshen Dripping Pills in Human Plasma

ZHAO Xin<sup>1</sup>, QIANG Guang-hui<sup>2</sup>, GUO Yi<sup>3</sup>, ZHAO Xin-feng<sup>1</sup>, LIU Qing<sup>1</sup>, ZHENG Xiao-hui<sup>1</sup>

(1. *Engineering and Research Center of Chinese Herb Modernization of  
Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China;*

2. *Xi'an Municipal Water Company, Xi'an 710082, China;* 3. *Institute of Computation and Test, Xi'an 710048, China*)

**Abstract:** A method was established to study the new metabolites of *Notoginseng* in human plasma after sublingual administration of Compound Danshen Dripping Pills (CDDP). The method involved a solid phase extraction and a high performance liquid chromatography coupled with electrospray-mass spectrometric detection. With gradient elution and full scan in positive mode, four new metabolites of *Notoginseng* in human plasma were detected. Structure and metabolic pathway were presumed according to the information of product ion by ion trap mass spectrometry. The results indicate that this method has good precision, stability and reproducibility. It can be used in further study of metabolites of *Notoginseng* in plasma after administration of CDDP and other parallel experiments.

**Key words:** electrospray-mass spectrometry; metabolism; Compound Danshen Dripping Pills; *Notoginseng*

收稿日期: 2006-05-15; 修回日期: 2006-10-23

基金项目: 陕西省自然科学基金项目(2000H10)

作者简介: 赵欣(1981~), 汉族, 北京人, 硕士研究生, 主要从事药物分析及仪器分析研究。E-mail: goforit126@126.com

通讯作者: 郑晓晖(1968~), 汉族, 陕西西安人, 副教授, 主要从事烟草化学及药物分析研究。E-mail: zhengxh@mail.xjtu.edu.cn

复方丹参滴丸 (Compound Danshen Dripping Pills) 是根据《中国药典》1995 年版复方丹参片的处方, 提取有效成分研制而成的中药滴丸剂, 主要成分为丹参、三七、冰片, 临床上用于治疗胸中憋闷、心绞痛。作为片剂的换代品, 它具有疗效高、作用迅速、副作用小的特点, 现已被定为全国中医院急诊必备中成药<sup>[1]</sup>。已有文献报道采用 HPLC 法测定复方丹参滴丸中人参皂苷  $R_{g_1}$  与  $R_{b_1}$ 、三七皂苷  $R_1$  和丹参三种水溶性成分的含量<sup>[2-4]</sup>。王宁生<sup>[5]</sup>、洪馨<sup>[6]</sup>和裴涓静等<sup>[7]</sup>分别采用液相色谱-质谱法测定了复方丹参滴丸中丹参素的血药浓度。但对于复方丹参滴丸中三七相关成分的体内代谢研究目前少有报道。本工作通过  $C_{18}$  固相萃取柱对人含药血浆进行预处理, 以电喷雾离子阱质谱作为检测手段, 对复方丹参滴丸中三七的体内代谢物进行研究。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器及试剂

Agilent 1100 系列电喷雾离子阱质谱, Alltech 固相萃取仪, Agilent  $C_{18}$  固相萃取小柱; 美国 Agilent 公司产品; Maxima 超纯水机; 基因公司产品。

复方丹参滴丸: 天士力制药集团公司产品, 批号 20040706; 甲醇: Fisher 公司产品; 人参皂苷  $R_{g_1}$ : 购于中国药品生物制品检定所, 0703-2005117; 人参皂苷  $R_{b_1}$ : 购于中国药品生物制品检定所, 110704-200419; 三七皂苷  $R_1$ : 购于中国药品生物制品检定所, 110745-200312; 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 样品制备

**1.2.1 对照品溶液的制备** 精密称取人参皂苷  $R_{g_1}$ 、人参皂苷  $R_{b_1}$  和三七皂苷  $R_1$  适量, 分别用 50% 甲醇溶液配制成浓度为  $0.21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $0.24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品溶液,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  储存备用。

**1.2.2 复方丹参滴丸溶液的制备** 取复方丹参滴丸 100 粒, 研磨成粉末,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  烘干至恒重, 取  $2.0 \text{ g}$  溶于  $20 \text{ mL}$  0.5% 氨水甲醇溶液, 超声  $20 \text{ min}$ ,  $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $10 \text{ min}$ , 取上清液  $15 \text{ mL}$ ,  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  减压浓缩至干。残渣用 50% 甲醇溶液转移至  $25 \text{ mL}$  容量瓶中, 并稀释至刻度。取  $1.0 \text{ mL}$  溶液, 用  $0.2 \text{ } \mu\text{m}$  滤膜滤过,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  储存备用。

**1.2.3 空白血浆、空白血浆加标、血浆加药供试品溶液的制备** 10 名健康男性受试者,  $12 \text{ h}$  禁

食不禁水, 静脉取血  $2.0 \text{ mL}$ , 取  $1.0 \text{ mL}$  置于经过肝素钠处理的离心管中,  $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $10 \text{ min}$ 。取上层清液  $0.5 \text{ mL}$ , 加入  $2.0 \text{ mL}$  0.5% 氨水甲醇溶液, 漩涡震荡  $1.0 \text{ min}$ ,  $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $10 \text{ min}$ 。取上层清液  $2.0 \text{ mL}$ , 氮气吹干, 残渣溶于  $1.0 \text{ mL}$  0.5% 氨水甲醇溶液中, 转入固相萃取小柱, 用  $3.0 \text{ mL}$  水洗脱, 弃去洗脱液, 再依次用体积比为  $20:80$ 、 $35:65$ 、 $55:45$  和  $70:30$  的甲醇-水溶液各  $5.0 \text{ mL}$  洗脱, 合并洗脱液, 氮气保护吹干,  $1.0 \text{ mL}$  流动相溶解, 用  $0.2 \text{ } \mu\text{m}$  滤膜滤过, 即得空白血浆样品, 于  $-4 \text{ }^\circ\text{C}$  储存备用。

另取  $1.0 \text{ mL}$  空白血浆, 置于经过肝素钠处理的离心管中, 其中  $0.5 \text{ mL}$  加入复方丹参滴丸样品  $0.1 \text{ mL}$ , 另  $0.5 \text{ mL}$  加入适量三种皂苷标准品混合物, 分别按空白血浆样品处理方法处理, 即得到空白血浆加药样品和空白血浆加混标样品。

**1.2.4 含药血浆供试品溶液的制备** 空白血浆样品取得后, 受试者空腹舌下含化复方丹参滴丸 10 粒, 在服药  $1.5 \text{ h}$  后静脉取血  $2.0 \text{ mL}$ , 置于经过肝素钠处理的离心管中, 按 1.2.3 中的处理方法, 即得含药血浆样品供试品溶液。

### 1.3 分析条件

色谱柱: Zorbax SB- $C_{18}$ ,  $150 \times 2.1 \text{ mm}$ ,  $5 \text{ } \mu\text{m}$ ; 柱温:  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 流速:  $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 进样体积:  $10 \text{ } \mu\text{L}$ ; 流动相:  $A=5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  甲酸铵,  $B=$  甲醇; 梯度: 50% B 保持  $15 \text{ min}$ ,  $45 \text{ min}$  内至 100% B; 质谱条件: 电喷雾电离源,  $7 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  干燥气; 雾化气压力:  $241.32 \text{ kPa}$ ; 干燥气温度:  $325 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

## 2 结果及讨论

### 2.1 复方丹参滴丸人含药血浆三七相关代谢物的质谱分析

空白血浆、空白血浆加混标、空白血浆加药及复方丹参滴丸人含药血浆供试品溶液的 ESI-MS 总离子流图示于图 1, 分别为图 A、B、C、D。图 1B 中三个峰分别为三七皂苷  $R_1$ 、人参皂苷  $R_{g_1}$  和人参皂苷  $R_{b_1}$ , 其保留时间分别为  $5.2 \text{ min}$ 、 $8.0 \text{ min}$  和  $16.3 \text{ min}$ 。通过与三种空白供试品溶液进行对比, 发现图 1D 中标示的峰 1~4 既非原药材中的物质, 又不来源于外源性或内源性的干扰, 推测这四种物质应为人含药血浆中新代谢产物。它们在正离子模式下的  $m/z$  值分

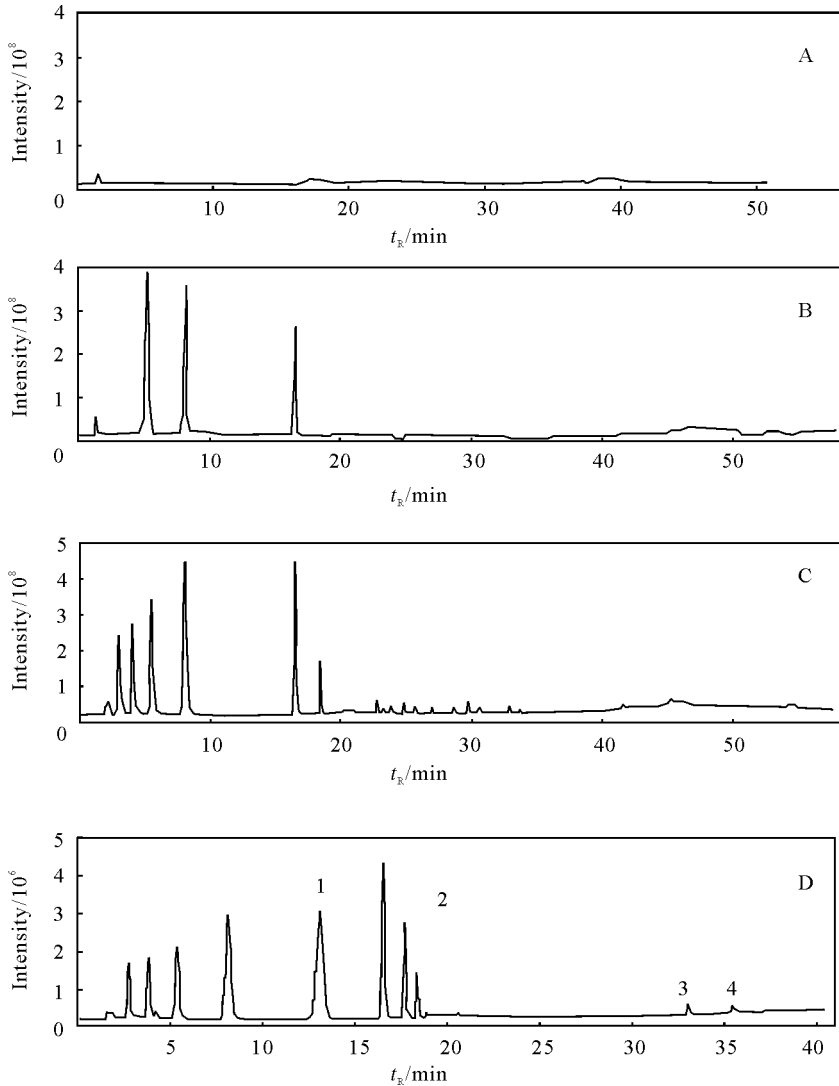


图 1 A:空白血浆供试品溶液总离子流图;B:空白血浆加混标试品溶液总离子流图;  
C:空白血浆加药供试品溶液总离子流图;D:含药血浆供试品溶液总离子流图

Fig. 1 A: TIC of the blank plasma; B: TIC of the blank plasma spiked with CDDP;

C: TIC of the blank plasma spiked with mixed standards; D: TIC of plasma after sublingual administration

别为 638.9、623.1、946.8 和 640.1。

选取  $m/z$  638.9 为母离子进行多级质谱分析,其二级质谱碎片离子主要为  $m/z$  476.9,对照人参皂苷  $Rg_1$  和 20(s)-原人参三醇对照品的结构信息,并结合文献[8-10],推测  $m/z$  638.9 来源于人参皂苷  $Rg_1$  的代谢产物,形成过程为  $m/z$  801.2 $\rightarrow$  $m/z$  638.9 $\rightarrow$  $m/z$  476.9,产生机理示于图 2(用 Ppt 表示 20(s)-原人参三醇[20(s)-protopanaxatriol]母核结构)。

选  $m/z$  946.8 为母离子进行二级质谱分析,

其二级质谱碎片离子中,碎片离子  $m/z$  623.1 相对丰度较大,选其为母离子进一步进行多级质谱分析,得丰度较大的碎片离子  $m/z$  461.1,对照人参皂苷  $Rb_1$  和 20(s)-原人参二醇对照品的结构信息,并结合文献[8, 10-12],得知碎片离子  $m/z$  623.1 和  $m/z$  946.8 来源于人参皂苷  $Rb_1$  的代谢产物,产生过程为  $m/z$  1131.7 $\rightarrow$  $m/z$  946.8 $\rightarrow$  $m/z$  784.9 $\rightarrow$  $m/z$  623.1 $\rightarrow$  $m/z$  461.1,形成机理示于图 3(用 Ppd 表示 20(s)-原人参二醇[20(s)-protopanaxadiol]母核结构)。

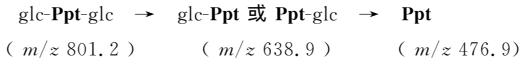


图 2 分子离子峰为  $m/z$  638.9 物质的推测代谢过程

Fig. 2 The speculative metabolic pathway of  $m/z$  638.9

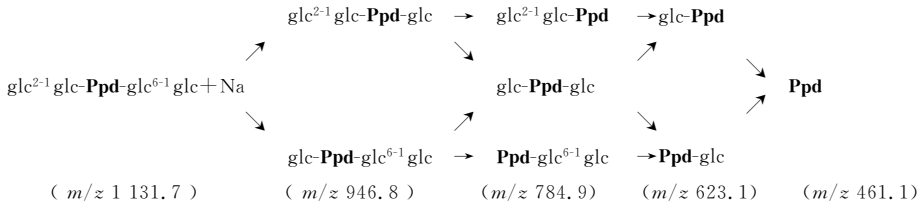


图 3 分子离子峰为  $m/z$  946.8、 $m/z$  623.1 物质的推测代谢过程

Fig. 3 The speculative metabolic pathway of  $m/z$  946.8 and  $m/z$  623.1

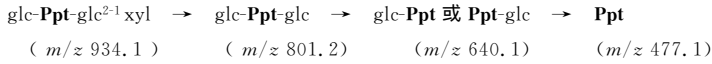


图 4 分子离子峰为  $m/z$  640.1 物质的推测代谢过程

Fig. 4 The speculative metabolic pathway of  $m/z$  640.1

## 2.2 方法学考察

**2.2.1 进样精密性实验** 按 1.2 中的处理方法制备样品,自动进样器连续进样 5 次,每次 10.0  $\mu\text{L}$ ,在拟定条件下测定离子强度,分别计算 4 个峰的标准偏差,RSD 分别为 1.02%、0.96%、1.26%、1.34%。

**2.2.2 稳定性实验** 按 1.2 中的处理方法制备样品,自动进样器每 2 h 进样 1 次,每次 10.0  $\mu\text{L}$ ,在拟定实验条件下测定离子强度,分别计算 4 个峰的标准偏差。结果表明,样品在 48 h 内稳定性良好。

**2.2.3 重现性实验** 按 1.2 中的样品处理方法平行处理 5 份样品,自动进样器分别进样,每份每次 10.0  $\mu\text{L}$ ,在拟定实验条件下测定离子强度,分别计算 4 个峰的标准偏差,RSD 分别为 1.84%、1.57%、2.12%、2.35%。

## 3 讨论

复方丹参滴丸提取液及含药血浆样品中的丹参酚酸类物质给三七相关成分测定带来一定干扰,为排除干扰,在样品处理时采用 0.5% 氨水甲醇溶液提取原药材和沉淀蛋白,有效地排除了复方丹参滴丸中酚酸类物质的干扰。

液相色谱-电喷雾离子阱质谱法不仅能对复

选  $m/z$  640.1 为母离子进行二级质谱分析,其二级质谱碎片离子中,碎片离子  $m/z$  476.8 相对丰度较大,对照三七皂苷  $R_1$  和 20(s)-原人参三醇对照品的结构信息,并结合文献[9-11],得知碎片离子  $m/z$  640.1 来源于三七皂苷  $R_1$  的代谢产物,形成过程为  $m/z$  934.1  $\rightarrow$   $m/z$  801.2  $\rightarrow$   $m/z$  640.1  $\rightarrow$   $m/z$  477.1,形成机理示于图 4。

杂体系进行快速、有效地分离,而且能对中药活性成分及其代谢物结构提供分子量及其各级碎片等丰富的结构信息,该方法必将在中药等复杂体系中活性成分及其代谢物的研究中发挥越来越重要的作用。

## 参考文献:

- [1] Institute of Materia Medica of Academy of Medical Science. Modern research of Chinese traditional medicine[M]. 2nd ed. Beijing: The United Press of Beijing Medical University & Peking Medical College, 1996: 472.
- [2] 黄永焯,王宁生. HPLC-ELSD 法测定复方丹参滴丸中人参皂苷  $R_{g1}$ 、 $R_{b1}$  和三七皂苷  $R_1$  的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(3): 174-176.
- [3] 李晓梅,张文生. 复方丹参滴丸中三七皂苷  $R_1$  含量测定[J]. 天津药学, 2005, 17(5): 8-10.
- [4] 潘桂湘,张伯礼,乔延江. HPLC 法测定复方丹参中丹参的三种水溶性成份的含量[J]. 中草药, 2002, 33(10): 901-903.
- [5] 王宁生,宓穗卿,洪馨,等. 口服复方丹参滴丸血清中丹参相关成分的 LC/MS 检测[J]. 中药新药与临床药理, 2000, 11(3): 141-142.

(下转第 30 页)

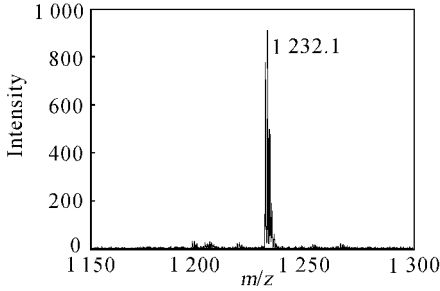


图 4 使用 nH 基质,样品浓度为  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 4 号样品的负离子质谱图

Fig. 4 Negative ion mass spectrum of the sample 4 using nH as matrix with  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

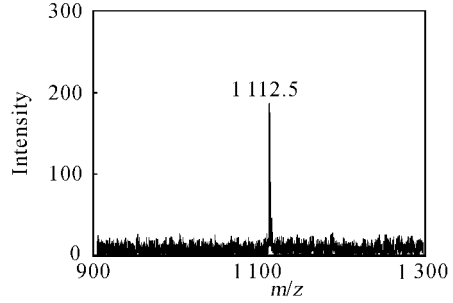


图 5 使用 nH 基质,样品浓度为  $0.001 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 1 号样品的负离子质谱图

Fig. 5 Negative ion mass spectrum of the sample 1 using nH as matrix with  $0.001 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

### 2.4 检测灵敏度

为了考察 MALDI-TOF 质谱检测样品最低浓度是多少,用氯仿将样品溶解成  $0.001 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液,进行质谱分析。用 nH 为基质时 1 号样品的质谱图示于图 5,所得分子离子峰的信噪比大于 40,检测灵敏度为  $1.0 \times 10^{-12} \text{ mol}$ 。

### 3 结 论

本工作应用 MALDI-TOF MS 技术,通过改变离子检测模式,选用不同基质,添加钠、银等离子化试剂和调整溶液浓度等手段,分别考察了各种条件对分析结果的影响。结果表明:用吡啶作基质,负离子检测,可以得到该类化合物较好的质谱图。

### 参考文献:

[1] 赵晓光,薛燕,刘炳玉. MALDI-TOF 质谱仪关

键技术及发展[J]. 现代仪器, 2003, (4): 17-20.

[2] 王京兰,万晶宏,罗凌,等. 蛋白质组研究中肽质量指纹谱鉴定方法的建立及应用[J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(4): 373-378.

[3] KUMARATHASAN P, MOHOTTALAGE S, GOEGAN P, et al. An optimized protein in-gel digest method for reliable proteome characterization by MALDI-TOF-MS analysis [J]. Anal Biochem, 2005, 346: 85-89.

[4] SOUTIF J, DOAN N T H, MONTEBAULT V. Determination by MALDI-TOF MS of the structures obtained from polytransesterification of diethyl 2,6-pyridinedicarboxylate and poly(ethylene glycol) [J]. European Polymer Journal, 2006, 42: 126-132.

[5] 何美玉,何江涛. MALDI-TOF MS 分析研究合成高分子的综述[J]. 质谱学报, 2002, 23(1): 43-55.

=====  
(上接第 26 页)

[6] 洪馨,宓穗卿,王宁生. 复方丹参滴丸中丹参素的药物动力学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2000, 11(5): 286-288.

[7] PEI W J, ZHAO P F, ZHU Z M, et al. Study of the determination and pharmacokinetics of compound danshen dripping Pills in human serum by column switching liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2004, 809(2): 237-242.

[8] 肖盛元,罗国安,王义明,等. LC-MS 鉴定三七及其复方制剂[J]. 药学学报, 2004, 39(2): 127-131.

[9] 万建波,黎畅明,李绍平,等. 加压溶剂提取与液相色谱-电喷雾质谱联用技术分析三七中皂苷类成分[J]. 中药材, 2005, 28(10): 885-890.

[10] 李丽,刘志强,许庆轩,等. 人参皂苷类化合物的 HPLC-ESI-MS 研究[J]. 分析测试学报, 2006, 25(1): 45-48.

[11] 韩凤梅,张玲,蔡敏,等. 三七药材皂苷类成分的电喷雾离子阱质谱特征图谱研究[J]. 湖北大学学报, 2006, 28(2): 176-180.

[12] 邹坤,朱妹,小松かつ子. HPLC 结合 API-MS/MS 法研究屏边三七的皂苷成分[J]. 三峡大学学报, 2002, 24(4): 355-357.