

· 论著 ·

用细胞膜色谱法和 HPLC-TOF/MS 研究附子中的有效成分

曹岩¹, 景晶¹, 吕狄亚¹, 朱臻宇¹, 张国庆², 柴逸峰¹ (1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438)

[摘要] **目的** 通过细胞膜色谱技术和高效液相-飞行时间质谱(HPLC-TOF/MS)技术相结合,初步筛选和鉴定附子中的有效成分。**方法** 初步筛选采用自制的大鼠心肌细胞膜色谱柱,流动相为10 mmol/L磷酸盐缓冲溶液,流速为0.2 ml/min。色谱分离采用SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈柱,流动相为0.1%甲酸水溶液和乙腈,梯度洗脱,流速为1.0 ml/min。质谱鉴定采用TOF/MS,正离子模式扫描。**结果** 确定了附子中8个可能的有效成分。**结论** 通过细胞膜色谱技术和HPLC-TOF/MS技术相结合,为从天然产物中快速寻找新的活性成分提供了途径。

[关键词] 细胞膜色谱;高效液相-飞行时间质谱;附子

[中图分类号] R284 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2011)05-0339-04

Study on effective components from roots of *Aconitum carmichaeli* through cell membrane chromatography and HPLC-TOF/MS method

CAO Yan¹, JING Jing¹, LV Di-ya¹, ZHU Zhen-yu¹, ZHANG Guo-qing², CHAI Yi-feng¹ (1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective** To screen the effective components from roots of *Aconitum carmichaeli* by a cell membrane chromatography (CMC) combining with a HPLC-TOF/MS method. **Methods** Screening was conducted on a rat cardiac muscle CMC column, and mobile phase was 10 mmol/L phosphate buffer with a flow rate of 0.2 ml/min. Separation was conducted on a SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ column. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid and acetonitrile using gradient elution with a flow rate of 1.0 ml/min. Identification was conducted by using TOF/MS in positive ion mode. **Results** Eight potential effective constituents were determined. **Conclusion** The combination of CMC and HPLC-TOF/MS method had provided a new way to discover active components targeting membrane receptors from natural products.

[Key words] cell membrane chromatography; HPLC-TOF/MS; *Aconitum carmichaeli*

细胞膜色谱(cell membrane chromatography, CMC)是将细胞膜结合到硅胶表面,制成细胞膜固定相,利用色谱学技术研究流动相中药物与受体相互作用规律的受体动力学新方法^[1,2]。细胞膜色谱中的细胞膜固定相具有细胞膜活性和色谱分离的双重特性,药物可以不经分离步骤,直接在相应的细胞膜色谱上完成筛选过程,其筛选系统是药物研究的高通量筛选提供细胞膜筛选平台。由细胞膜色谱模型获得的色谱保留参数(容量因子)与药物的药理作用密切相关,对药物异构体有识别能力,具有操作简便、稳定可靠、高效灵敏的优点^[3]。目前细胞膜色谱已经应用在药理学研究的多个方面,其中将细

胞膜色谱与药效实验结合的活性成分筛选技术已用于天然植物和中药物质基础的研究^[4,5]。附子是毛茛科植物乌头的子根,具有回阳救逆,补火助阳,散寒止痛的功效。附子的临床应用十分广泛,常与其它中药配伍成方剂应用于临床。药理研究表明,附子有对心血管系统的作用:正性肌力、强心、抗心律失常、舒张血管等。此外还包括增强免疫,抗炎镇痛,抗衰老,抗肿瘤等作用^[6]。附子中所含的乌头碱、新乌头碱、次乌头碱等双酯型生物碱既是有效成分,又是毒性成分^[7]。目前,对于附子的化学物质基础、附子的药效及毒性作用机制等研究的比较多,但对于附子中的药效、毒性成分有几个,其含量研究还不够深入。

本研究采用细胞膜色谱技术初步筛选附子中的有效成分,再采用HPLC-TOF/MS技术对有效成分进行鉴定,确定了8个可能的有效成分。

[基金项目] 上海市中药现代化专项(09DZ1975100)。

[作者简介] 曹岩(1982-),男,硕士研究生。Tel:(021)81871331, E-mail:caoyan@msn.cn。

[通讯作者] 柴逸峰。Tel:(021)81871201, E-mail:yfchai@smmu.edu.cn。

1 仪器与试剂

Waters 515 液相色谱仪,包括 Waters 996 二极管阵列检测器、柱温箱、Millennium 工作站。Agilent 1200 液相色谱仪,包括在线真空脱气机、二元泵、自动进样器、柱温箱; Agilent G6220A 飞行时间质谱仪,包括标准电喷雾离子源(ESI), MassHunter 色谱工作站和 Qualitative Analysis 质谱分析软件。QL-901 旋涡混合器; KUDOS SK5200H 超声波清洗器; HITACHI SCR20BA 大型高速冷冻离心机。

色谱纯乙腈(Merck, Germany); 色谱纯甲酸(Tedia, USA); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, NaCl , 分析纯无水乙醇(中国医药集团上海化学试剂公司); 娃哈哈纯净水; 空色谱柱、大孔硅胶(上海月旭材料科技有限公司); 熟附片(上海雷允上药业); 丹酚酸 B(中国药品生物制品检定所); 呋塞米注射液(上海禾丰制药有限公司); 盐酸多巴酚丁胺注射液(上海信谊药厂有限公司); 甲磺酸酚妥拉明注射液(上海旭东海普药业有限公司)。

2 实验

2.1 附子提取液的制备 取 5 g 熟附片药材,加 10 倍量水,回流提取 3 次,每次 1.5 h,合并提取液。将提取液浓缩放冷后,加入 2 倍量无水乙醇,4 °C 放置过夜。减压过滤后回收乙醇,将滤液浓缩至 20 ml,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得附子提取液。

2.2 对照品溶液的制备 以丹酚酸 B、呋塞米为阴性对照品,以多巴酚丁胺、酚妥拉明为阳性对照品。用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液分别溶解并稀释对照品,至对照品溶液浓度为 500 μg/ml。

2.3 大鼠心肌细胞膜色谱柱的制备 取健康 SD 大鼠 2 只,猛击头部致死,迅速取出心脏并减去心房,根据文献^[8]的方法,制备大鼠心肌细胞膜。再根据文献^[1,9]的方法制备大鼠心肌细胞膜色谱柱。

2.4 细胞膜色谱实验 色谱柱:大鼠心肌细胞膜色谱柱(30 mm × 2.1 mm, 5 μm); 柱温:37 °C; 流动相:10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液; 流速:0.2 ml/min; 进样量:5 μl; 检测波长:附子为 230 nm,呋塞米为 330 nm,其他对照品均为 280 nm。用流动相平衡 60 min 后进样分析。

2.5 HPLC-TOF/MS 实验

2.5.1 色谱条件 色谱柱:SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相:A 为 0.1% 甲酸水溶液,B 为乙腈,梯度洗脱,具体梯度洗脱条件见表 1; 柱温:25 °C,进样量:5 μl,流速:1.0 ml/min。

表 1 梯度洗脱条件

时间(min)	A(%)	B(%)
0	95	5
15	78	22
28	67	33
40	33	67
45	25	75

2.5.2 质谱条件 电喷雾正离子模式;质量扫描范围:100 ~ 1 200 m/z;毛细管电压:4 000 V;雾化气压:30 psig;干燥气流速:10.0 L/min;干燥气温度:350 °C;碎片电压:160 V。分流比:1 : 3。

3 结果与讨论

3.1 细胞膜色谱模型的考察 采用具有抗氧化作用的丹酚酸 B 和具有利尿作用的呋塞米为阴性对照品,采用 β₁ 肾上腺素受体激动药多巴酚丁胺和 α 肾上腺素受体阻断药酚妥拉明为阳性对照品,对大鼠心肌细胞膜色谱模型进行了考察,4 种药物在该细胞膜色谱柱上的保留情况如图 1 所示。其中丹酚酸 B 和呋塞米在该色谱柱上均无保留,而多巴酚丁胺和酚妥拉明均有明显的保留,其保留时间分别为 5.77 min 和 10.17 min。结果表明该细胞膜色谱模型对作用于 α、β 肾上腺素受体的药物的保留具有选择性,可以用于中药中此类作用成分的筛选。

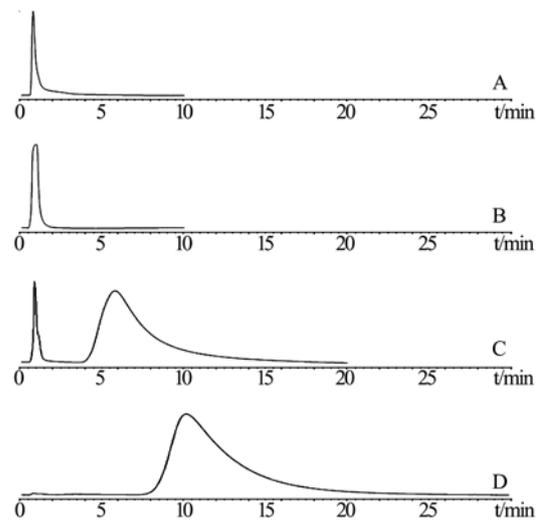


图 1 4 种对照品的细胞膜色谱图

A-丹酚酸 B; B-呋塞米; C-多巴酚丁胺; D-酚妥拉明

3.2 细胞膜色谱实验 将附子提取液进行大鼠心肌细胞膜色谱分析,结果如图 2 所示。可见附子中含有能与心肌细胞膜上的受体相互作用的成分,这些成分可能就是附子中的有效成分。各个组分的保留时间不同说明其与受体的亲和力不同,保留时间

长的亲和力强,保留时间短的亲和力弱。由于附子中的有效成分可能是结构相近的一类化合物,因此所有保留组分在细胞膜色谱上并未得到完全分离。为了进一步鉴定各个可能的有效成分,分别收集具有明显保留特性的组分 R_1 (4 ~ 6 min)、 R_2 (6 ~ 8 min)、 R_3 (8 ~ 12 min) 和 R_4 (12 ~ 16 min)。

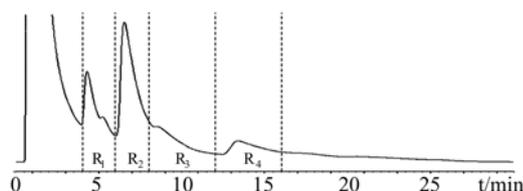


图2 附子提取液的细胞膜色谱图

3.3 HPLC-TOF/MS 实验 将收集到的细胞膜色谱的保留组分 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和附子提取液直接进行 HPLC-TOF/MS 分析,结果如图3所示。通过与附子提取液的质谱总离子流图相比较,可以分别从 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 组分中发现均含有附子的成分,再结合现有文献^[10,11]的报道,从附子的化学成分数据库中鉴定出8种可能的有效成分,如表2、图4所示。 R_1 中主要含有新乌头原碱 (Mesaconine); R_2 中主要含有苯甲酰新乌头胺 (Benzoylmesaconine); R_3 中含有

尼奥灵 (Neoline)、附子灵 (Fuziline)、苯甲酰乌头胺 (Benzoylaconine),其含量差别不大; R_4 中主要含有苯甲酰次乌头胺 (Benzoylhypaconine),塔拉定 (Talatizidine) 和 Chuanfumine。

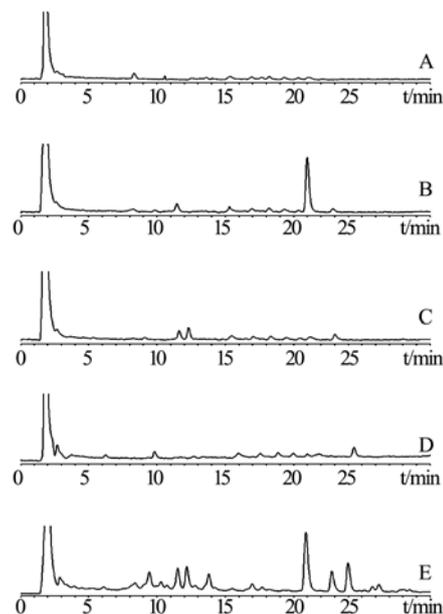
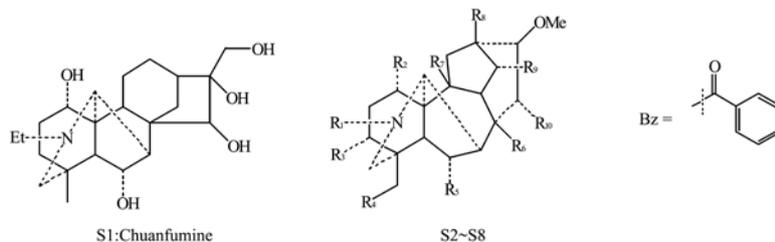


图2 附子提取液及细胞膜色谱保留组分的质谱总离子流图

A-保留组分 R_1 ; B-保留组分 R_2 ; C-保留组分 R_3 ; D-保留组分 R_4 , E-附子提取液。

表2 附子中可能的有效成分的鉴定结果

No	名称	元素组成	R_1		R_2		R_3		R_4	
			RT	$[M+H]^+$	RT	$[M+H]^+$	RT	$[M+H]^+$	RT	$[M+H]^+$
S1	Chuanfumine	$C_{22}H_{35}NO_5$							6.232	394.257 6
S2	Mesaconine	$C_{24}H_{39}NO_9$	8.326	486.268 6						
S3	Talatizidine	$C_{23}H_{37}NO_5$							9.799	408.273 3
S4	Fuziline	$C_{24}H_{39}NO_7$			11.447	454.278 8	11.584	454.279 0		
S5	Neoline	$C_{24}H_{39}NO_6$					12.272	438.283 6		
S6	Benzoylmesaconine	$C_{31}H_{43}NO_{10}$	21.074	590.294	20.996	590.295 7				
S7	Benzoylaconine	$C_{32}H_{45}NO_{10}$			22.884	604.310 2	22.972	604.310 2		
S8	Benzoylhypaconine	$C_{31}H_{43}NO_9$							24.37	574.300 2



S2: Mesaconine, $R_1 = Me, R_2 = OMe, R_3 = OH, R_4 = OMe, R_5 = OMe, R_6 = OH, R_7 = H, R_8 = OH, R_9 = OH, R_{10} = OH$
 S3: Talatizidine, $R_1 = Et, R_2 = OH, R_3 = H, R_4 = OMe, R_5 = H, R_6 = OH, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = OH, R_{10} = H$
 S4: Fuziline, $R_1 = Et, R_2 = OH, R_3 = H, R_4 = OMe, R_5 = OMe, R_6 = OH, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = OH, R_{10} = OH$
 S5: Neoline, $R_1 = Et, R_2 = OH, R_3 = H, R_4 = OMe, R_5 = OMe, R_6 = OH, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = OH, R_{10} = H$
 S6: Benzoylmesaconine, $R_1 = Me, R_2 = OMe, R_3 = OH, R_4 = OMe, R_5 = OMe, R_6 = OH, R_7 = H, R_8 = OH, R_9 = OBz, R_{10} = OH$
 S7: Benzoylaconine, $R_1 = Et, R_2 = OMe, R_3 = OH, R_4 = OMe, R_5 = OMe, R_6 = OH, R_7 = H, R_8 = OH, R_9 = OBz, R_{10} = OH$
 S8: Benzoylhypaconine, $R_1 = Me, R_2 = OMe, R_3 = H, R_4 = OMe, R_5 = OMe, R_6 = OH, R_7 = H, R_8 = OH, R_9 = OBz, R_{10} = OH$

图4 附子中可能的有效成分的化学结构式

脑搽的质量控制提供依据。由于樟脑在水中极微溶解,且樟脑在样品中含量较高,因此本实验中用甲醇作为溶剂,以增强其溶解性,避免有少量樟脑结晶析出,影响测定结果。

预实验中,经过在190~400 nm波长范围内对苯酚樟脑对照品溶液进行紫外光谱扫描,结果发现,苯酚在273 nm处有最大吸收峰,樟脑在287 nm处有最大吸收峰,由于苯酚的紫外吸收特别强,故选择287 nm为检测波长,以增强樟脑的色谱信号响应。

实验中比较了不同比例的流动相和流速,发现苯酚和樟脑的保留时间随甲醇比例的增大而缩短,流速的增加而缩短,以甲醇-水(55:45)为最佳比例流动相,流速0.8 ml/min为最佳流速。

【参考文献】

- [1] 宗永辉. 高效液相色谱法测定复方氧化锌涂剂中樟脑和苯酚含量[J]. 中国药业, 2009, 18(1): 16.
- [2] 余小平, 舒金富, 黄 华. 高效液相色谱法同时测定樟脑苯酚溶液中两组分的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(8): 1161.
- [3] 杨 娟, 黄敬群, 李 红, 等. 高效液相色谱法测定复方樟脑搽剂中苯酚的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(18): 1616.
- [4] 宋洪杰, 陆松伟, 朱全刚, 等. 反相离子对色谱法测定三利巴布膏剂中盐酸利多卡因的含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2008, 25(2): 137.
- [5] 李丽萍, 毕雪艳, 景金柱. HPLC法测定盐酸利多卡因胶浆(1)的含量[J]. 齐鲁药事, 2006, 25(2): 92.

[收稿日期] 2011-01-05

[修回日期] 2011-04-08

(上接第341页)

3.4 筛选结果 附子中的双酯型生物碱如乌头碱、新乌头碱和次乌头碱在加热的过程中水解成为相应的单酯型的苯甲酰乌头胺、苯甲酰新乌头胺和苯甲酰次乌头胺,后者又可以继续水解为不含酯键乌头原碱、新乌头原碱和次乌头原碱,因此实验中主要检测到单酯型的生物碱。细胞膜色谱的筛选结果表明,单酯型的苯甲酰乌头胺、苯甲酰新乌头胺和苯甲酰次乌头胺是附子中的有效成分,这与目前认为附子中的主要药效和毒性成分是乌头碱相一致。结果同时表明,塔拉定、尼奥灵和附子灵等也可能是附子中的有效成分,虽然其含量不多,但其在细胞膜色谱上的保留时间较长,具有较强的亲和力,值得进一步研究。

4 结论

本研究采用细胞膜色谱技术和HPLC-TOF/MS技术相结合,实现了对附子中作用于心肌细胞膜上受体的有效成分的初步筛选和鉴定,共确定了8个可能的有效成分,其药理作用还需要进一步研究。该方法充分利用了细胞膜色谱技术简便、高通量筛选的优势,并利用了液相色谱技术弥补了细胞膜色谱法无法有效分离和鉴定的不足,同时由于HPLC-TOF/MS具有更高的灵敏度,使得细胞膜色谱的保留成分不必经过浓缩就可以直接进样进行色谱分析,操作简便、节省时间和成本。为从天然产物中快速寻找新的活性成分提供了途径。

【参考文献】

- [1] He LC, Yang GD, Geng XD. Enzymatic activity and chromatographic characteristics of the cell membrane immobilized on silica surface[J]. Chin Sci Bull, 1999, 44(9): 826.
- [2] He LC, Wang SC, Geng XD. Coating and fusing cell membranes onto a silica surface and their chromatographic characteristics [J]. Chromatographia, 2001, 54(1): 71.
- [3] 袁秉祥, 贺浪冲, 杨广德. 细胞膜生物亲和色谱药物筛选系统[J]. 中国药理通讯, 2003, 20(3): 68.
- [4] 方艺霖, 张艺卜, 肖小河, 等. 细胞膜色谱技术用于中药活性成分筛选的研究进展[J]. 中草药, 2008, 39(7): 1119.
- [5] 聂 红, 孟兰贞. 细胞膜色谱及其在中药活性成分研究中的应用[J]. 中华实用中西医杂志, 2004, 4(17): 334.
- [6] 阎爱荣, 张 宏. 附子的药理研究[J]. 中国药物与临床, 2008, 8(9): 745.
- [7] 张菊花, 张晓艳. 探析不同炮制方法对附子药理作用及毒性的影响[J]. 海峡药学, 2008, 20(10): 89.
- [8] 徐叔云, 卞如濂, 陈 修. 药理实验方法学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 522.
- [9] 贺浪冲. 细胞膜色谱法[D]. 西安: 西北大学, 1998: 27.
- [10] 李 翔. 四逆汤化学成分和抗心肌缺血作用的研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2008: 91.
- [11] Hu R, Zhao J, Qi LW, et al. Structural characterization and identification of C(19)- and C(20)-diterpenoid alkaloids in roots of *Aconitum carmichaeli* by rapid-resolution liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Sp, 2009, 23(11): 1619.

[收稿日期] 2010-03-25

[修回日期] 2011-05-04