

# 延胡索总生物碱大鼠灌胃给药后 入血成分的定性研究

苗凤茹<sup>1</sup>, 刘光宇<sup>2</sup>, 林力<sup>2\*</sup>

(1. 航天中心医院神经内科, 北京 100049; 2. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

**[摘要]** 目的:对延胡索提取物给药后大鼠血浆进行成分的定性研究。方法:应用 ABI 4000 Q TRAP 质谱,结合参考文献和对照品对延胡索提取物的入血成分进行定性研究。结果:从大鼠血浆中共分析鉴定了 8 个成分,其中根据已知对照品确定的 2 个化合物,推测未知的化合物 6 个。结论:大鼠口服延胡索提取物后血浆含有延胡索乙素、脱氢紫堇碱、四氢黄连碱、紫堇杷明碱、异紫堇杷明碱、小檗碱、延胡宁和巴马汀/去氢紫堇碱。

**[关键词]** 延胡索; 定性; 液质联用

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0166-05

## Constituents Absorbed in Rat Serum after Oral Administration of Rhizoma Corydalis Extraction with HPLC-MS-MS

MIAO Feng-ru<sup>1</sup>, LIU Guang-yu<sup>2</sup>, LIN Li<sup>2\*</sup>

(1. Department of Neurology, Aerospace Central Hospital, Beijing 100049, China;  
2. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

**[Abstract]** **Objective:** To obtain chemical constituent information of rat serum after oral administration of Rhizoma Corydalis extraction. **Method:** ABI 4000 Q TRAP Mass was applied to determine the serum of rat and the

**[收稿日期]** 20120817(012)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81102795);国家中医药管理局课题(06-07ZP49)

**[第一作者]** 苗凤茹,主管护师,从事护理及临床药学研究, Tel:010-59971350, E-mail:fengrumiao@sina.com

**[通讯作者]** \* 林力,博士,副研究员,从事药物分析及药代动力学, Tel:010-62835618, E-mail:temlinli@gmail.com

- [12] 张永文,马秀,阳长明. 含朱砂、雄黄的中药制剂的质量控制及安全性评价问题分析[J]. 中国中药杂志, 2010,35(11):1501.
- [13] Liu J, Shi Jingzhen, Yu Limei. Mercury in traditional medicine; Is cinnabar toxicologically similar to mercurial [J]. Exp Biol Med, 2008, 233(7):810.
- [14] Shi J Z, Kang F, Wu Q, et al. Cinnabar-containing Zhu-Sha-An-Sheng Wan is much less chronically nephrotoxic than mercury chloride and methylmercury in rats[J]. Toxicol Lett, 2011, 200: 194.
- [15] Wu Q, Lu Y F, Shi J Z, et al. Chemical form of metals in traditional medicines underlines potential toxicity in cell cultures[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 134: 839.
- [16] Zhang F, Lu Y, Wu Q, Yan J, et al. Role of cinnabar and realgar of WSHFD in protecting against LPS-induced neurotoxicity [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 139 (2):822.
- [17] 彭芳,杨虹,吴芹,等. 万胜化风丹和汞化合物对大鼠亚急性毒性的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (2):1017.
- [18] Lu Y F, Wu Q, Liang S X, et al. Evaluation of hepatotoxicity potential of cinnabar-containing An-Gong-Niu-Huang Wan, a patent traditional Chinese medicine [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2011, 60:206.
- [19] 陆远富,时京珍,石京山,等. 科学评价含雄黄、朱砂中成药的安全性[J]. 中国中药杂志, 2011, 36 (24):3402.
- [20] 刘杰,陆远富,时京珍,等. 含朱砂、雄黄的中成药,是药还是毒? [J]. 成都医学院学报, 2011, 6(4):363.

[责任编辑 邹晓翠]

compounds were analyzed with mass combined with references and standards. **Result:** Eight compounds in rat serum were identified. **Conclusion:** They are tetrahydropalmatine, dehydrocorydaline, tetrahydrocoptisine, corypalmine, isocorypalmine, berberine, yuanhunine and palmatine/dehydrocorybulbine.

[ **Key words** ] Rhizoma Corydalis; qualitative analysis; LC-MS-MS

延胡索始载于《开宝本草》,是罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎。本品味辛、苦,性温,入心、肝、脾经,具有化瘀止痛、行气活血的功效。《本草纲目》中“延胡索,能行血中气滞,气中血滞,故专治一身上下诸痛,用之中的,妙不可言。盖延胡索活血化气,第一品药也”。现代药理研究<sup>[1-2]</sup>表明延胡索在中枢神经系统、心血管系统、消化系统及垂体肾上腺皮质系统等方面具有广泛的药理活性,在临床上应用十分广泛。延胡索中主要活性成分是生物碱<sup>[3-4]</sup>,已鉴定结构的达 40 余个,主要为原小檗碱型(主要为叔胺碱)和小檗碱型(主要为季胺碱)等多种异喹啉类生物碱。目前有关延胡索的研究文献较多,主要集中在药代动力学<sup>[5]</sup>、炮制<sup>[6-7]</sup>和含量测定<sup>[8]</sup>的等方面上,尚未见到延胡索入血成分的定性分析。本文拟采用液质联用的方法对延胡索中总生物碱给药后大鼠血浆进行定性分析,为血药浓度的测定和复方应用中的配伍机制研究提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 药品和试剂** 延胡索乙素(tetrahydropalmatine), 中药药品生物制品检定所,批号 110726-200409;脱氢紫堇碱(dehydrocorydaline)对照品,自制,纯度 > 98%;延胡索总生物碱由中国中医科学院西苑医院药药学室提供,批号 060927。

乙酸、乙酸铵和乙腈均为色谱纯,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;其他试剂均为市售分析纯。

**1.2 动物** Wistar 大鼠,雄性,体重(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。

**1.3 仪器** 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;Agilent 1200 型高效液相色谱系统,美国 Agilent 公司;Micro 22R 型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 型分析天平和 320 pH 计,美国 Mettler Toledo 公司;M18780 型氮吹仪,美国 Pierce 公司;

MS1 Minishaker 涡流混合器,德国 IKA 公司;10 ~ 1 000 μL 移液枪,Soconex 公司出品。

**1.4 待测样品的制备** 取延胡索总生物碱适量溶于蒸馏水中,按 125 mg·kg<sup>-1</sup>灌胃给药后 0.5 h 取全血,离心后取血浆,加入 2 倍量丙酮沉淀蛋白,离心后氮气吹干,流动相复溶后待测。

**1.5 定性测定方法** 色谱条件:Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈-10 mmol·L<sup>-1</sup>的乙酸铵(含 0.1% 的乙酸),梯度洗脱(0 ~ 15 min, 20% ACN; 15 ~ 25 min, 17% ACN; 35 min, 25% ACN; 40 min, 20% ACN),流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C。

质谱条件:离子喷射电压(IS) 4 500 V,源内气体 GS1 为 60 psi,源内气体 GS2 为 40 psi,气帘气体 20 psi,碰撞气(CAD) High,源内温度 600 °C;检测方式:正离子检测;扫描方式:有效组分采用 Q3 MS-IDA-EPI-EPI 方式,肠吸收成分和血浆中成分采用 Q3 MS-MRM 方式,扫描范围 *m/z* 100 ~ 400。

## 2 结果

**2.1 定性分析色谱图** 在保证分离度的基础上,采用尽可能少的时间分析提取物中的成分是复杂体系定性定量分析的一个重点和难度。本实验在反复摸索不同流动相和洗脱条件基础上,最终确定了分离条件,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),在此基础上应用 4 000 Q 上 IDA 方式进行定性分析。

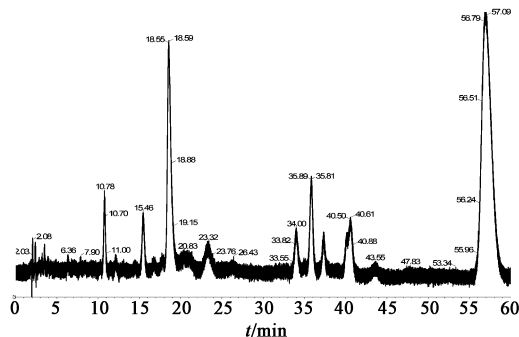


图 1 延胡索提取物的总离子流(正离子)

**2.2 四氢巴马汀(tetrahydropalmatine, THP)的定性分析** 四氢巴马汀又叫延胡索乙素,分子式 C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>,精确相对分子质量为 355.178 4,属于原小檗

碱型的生物碱。一级质谱上保留时间 23.32 min, 出现  $m/z$  356.1 的  $[M + H]^+$  分子离子峰。以  $m/z$  356.1 为母离子进行二级质谱(图 2), 碎片  $m/z$  340.1 为母离子脱去  $[M - CH_4]^+$ ,  $m/z$  192.1 为母离子发生 RDA 裂解生成的 A-B 环的碎片  $[C_{11}H_{13}NO_2 + H]^+$ ,  $m/z$  165.1 为 RDA 裂解后产生的互补碎片  $[C_{10}H_{12}O_2 + H]^+$ , 碎片  $m/z$  150.1 为在  $m/z$  165.1 脱去一个甲基, 结合参考文献和对照品质谱图将其定性为四氢巴马汀。

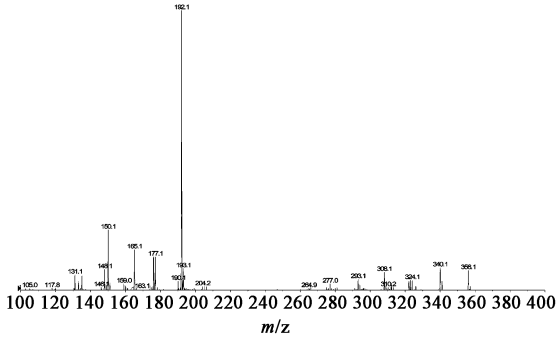


图 2 四氢巴马汀的结构式及其二级质谱

**2.3 脱氢紫堇碱 (dehydrocorydaline, DHC) 的定性分析** 脱氢紫堇碱分子式  $C_{22}H_{24}NO_4$ , 精确相对分子质量为 366.1705, 属于小檗碱型的生物碱。延胡索乙素一级质谱上保留时间 57.70 min, 出现  $m/z$  366.1 的分子离子峰。以  $m/z$  366.1 为母离子进行二级质谱(图 3), 碎片  $m/z$  351.1 为母离子 C-9 位脱去一个甲基, 得到  $[M - CH_3]^+$ ; 碎片  $m/z$  350.1 为离子再脱去与 N 相连的 H 得到  $[M - CH_4]^+$ , 离子继续失去母核上其余甲基分别得到  $[M - 2CH_3]^+$  ( $m/z$  336.1),  $[M - 3CH_3]^+$  ( $m/z$  321.1) 和  $[M - 4CH_3]^+$  ( $m/z$  306.1) 的碎片, 结合参考文献和对照品质谱图将其定性为脱氢紫堇碱。

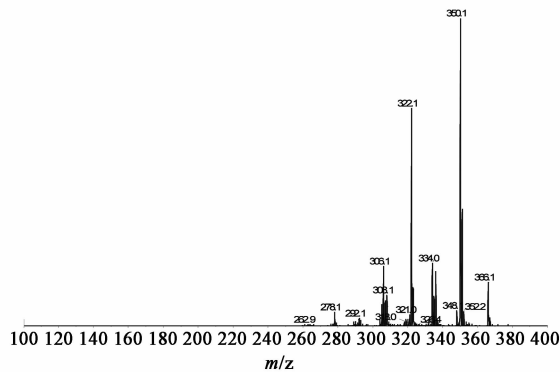


图 3 脱氢紫堇碱的结构式及其二级质谱

**2.4 四氢黄连碱 (tetrahydrocoptisine, THC) 的初步定性** 四氢黄连碱又叫索丁素, 分子式  $C_{19}H_{17}NO_4$ ,

精确相对分子质量为 323.1158, 属于原小檗碱型的生物碱。一级质谱上正离子选择 Mass Range 为 323.0 ~ 325.0, 得到 2 个峰, 保留时间分别为 18.59, 32.73 min。其中  $t_R$  18.59 min 的一级质谱没有出现  $m/z$  324 左右的吸收峰, 仅有  $m/z$  325.1, 356.1 的碎片, 显然其相对分子质量相差太大, 因此该吸收峰不是四氢黄连碱;  $t_R$  32.73 min 的一级质谱出现明显的  $m/z$  324.1 的碎片, 为  $[M + H]^+$ 。二级质谱以  $m/z$  324.1 为母离子时(图 4),  $m/z$  176.1 为母离子发生 RDA 裂解生成的 A-B 环的碎片  $[C_{10}H_9NO_2 + H]^+$ ,  $m/z$  149.1 为 RDA 裂解后产生的互补碎片  $[C_9H_8O_2 + H]^+$ ,  $m/z$  119.1 则是在  $m/z$  149.1 的基础上再失去  $[-CH_2O]$  基团, 综上初步将其定性为四氢黄连碱。

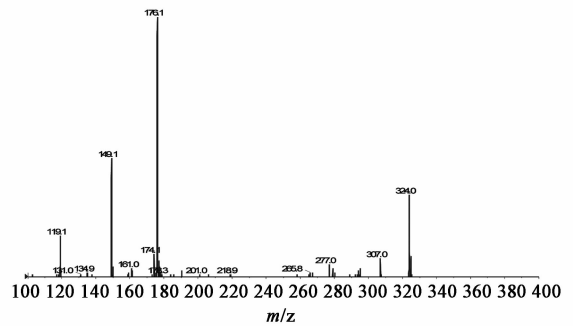


图 4 四氢黄连碱的结构式及其二级质谱

**2.5 紫堇杷明碱 (corypalmine)/异紫堇杷明碱 (isocorypalmine) 的初步定性** 延胡索中紫堇杷明碱、异紫堇杷明碱、紫堇达明碱 (corydalmine)、紫堇定 (corydine) 和异紫堇定 (isocorydine) 分子式都是  $C_{20}H_{23}NO_4$ , 精确相对分子质量为 341.1627。其中紫堇杷明碱、异紫堇杷明碱和紫堇达明碱属于原小檗碱型的生物碱, 紫堇定和异紫堇定属于阿朴芬型生物碱。

一级质谱上正离子选择 Mass Range 为 341.0 ~ 343.0, 得到 2 个峰, 保留时间分别为 10.81, 12.17 min。其中  $t_R$  12.17 min 的一级质谱出现  $m/z$  356.1, 342.1 的吸收峰, 二级质谱以  $m/z$  342.1 为母离子时, 在测定条件下没有二级碎片的产生;  $t_R$  10.81 min 的一级质谱出现明显的  $m/z$  342.1  $[M + H]^+$  的碎片, 二级质谱以  $m/z$  342.1 为母离子时(图 5), 出现  $m/z$  178.1 的碎片, 这是 RDA 裂解生成的 A-B 环的碎片。阿朴芬型生物碱不会产生 RDA 裂解, 因此排除紫堇定和异紫堇定。而紫堇达明碱发生 RDA 裂解生成的 A-B 环碎片应为  $m/z$  192.0, 因此可以排除这 3 个化合物。由于紫堇杷明碱和异紫

莨菪明碱的结构相近(仅A环上甲氧基和羟基的位置有所区别),结构碎片比较接近相符,没有对照品的情况下很难将其区分,因此在此保留时间10.81 min出峰的可能是两者的混合,也可能是其中的一种。

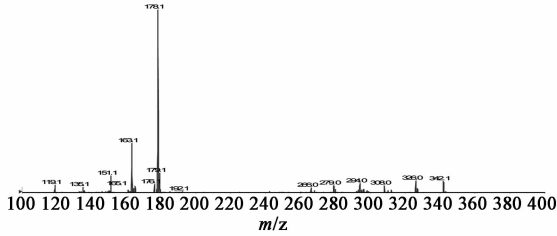


图5 紫堇杷明碱/异紫堇杷明碱的结构式及其二级质谱

**2.6 小檗碱(berberine)的初步定性** 小檗碱分子式 $C_{20}H_{18}NO_4$ ,精确相对分子质量为336.1236,属于小檗碱型的生物碱。

一级质谱上正离子选择 Mass Range 为335.0~337.0得到7个峰,保留时间分别为15.49,34.05,35.86,37.96,40.62,43.61,57.05 min,这其中只有 $t_R$ 43.61 min的分子离子峰为 $m/z$ 336.1,以此为母离子进行二级质谱的扫描(图6),产生的碎片 $m/z$ 320.0为母离子脱去1个甲基与N相连的H得到 $[M-CH_4]^+$ ,碎片 $m/z$ 292.0则在此基础上再失去 $28[-CO]$ ,碎片 $m/z$ 306.0为脱去2个甲基 $[M-2CH_3]^+$ 或是失去1个 $-CH_2O$ 基团所致,综上初步将其定性为小檗碱。

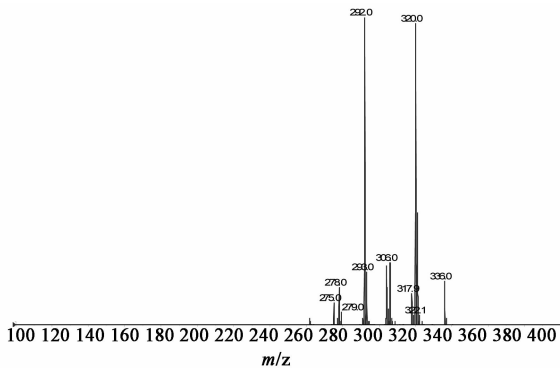


图6 小檗碱的结构式及其二级质谱

**2.7 延胡宁(yuanhunine)的初步定性** 延胡宁分子式是 $C_{21}H_{25}NO_4$ ,精确相对分子质量为355.1784,属于原小檗碱型的生物碱。

一级质谱上正离子选择 Mass Range 为355.0~357.0得到8个峰,保留时间分别为11.55,12.17,12.99,15.49,17.71,18.59,23.35,35.75 min,这其中 $t_R$ 12.99,15.49,17.71,35.75 min出现的峰位上分子离子峰均不是356.1,而 $t_R$ 23.35 min为延胡索

乙素,因此将其排除;对延胡宁的结构进行分析,发现进行RDA裂解能够产生 $m/z$ 192.1,165.1的,只有 $t_R$ 12.17 min出现的峰符合(图7),其他碎片 $m/z$ 341.1为 $[M-CH_3]^+$ , $m/z$ 326.1为 $[M-2CH_3]^+$ , $m/z$ 177.1为RDA裂解碎片192.1失去1个甲基, $m/z$ 150.1为RDA裂解碎片165.1失去1个甲基,综上初步将其定性为延胡宁。

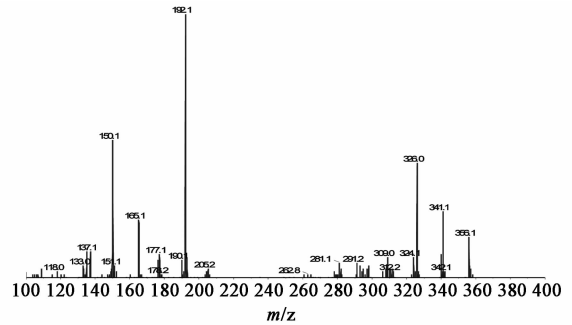


图7 延胡宁的结构式及其二级质谱

**2.8 巴马汀(palmatine)/去氢紫堇鳞茎碱(dehydrocorybulbine)的初步定性** 巴马汀与去氢紫堇鳞茎碱的分子式都是 $C_{21}H_{22}NO_4$ ,精确相对分子质量为352.1549,都属于季胺碱,两者结构非常相近,单纯质谱无法分开。

一级质谱上正离子选择 Mass Range 为351.0~353.0,得到6个峰,保留时间分别为14.52,21.18,34.03,35.89,40.59,56.92 min。这其中除了34.03,40.59 min,其余各时间点的分子离子峰均不是352.1,因此可以排除。 $t_R$ 34.03 min二级质谱图上分别出现 $m/z$ 338.0,337.0,321.0,309.1和293.0的结构碎片, $t_R$ 40.59 min出现 $m/z$ 338.0,337.0,336.0,322.0,308.1,293.1的结构碎片(图8),两者非常相近,因此在没有对照品和相关文献的报道的情况下只能推测在保留时间34.03,40.59 min的峰位上可能为巴马汀和去氢紫堇鳞茎碱。

### 3 讨论

中药及天然药物的多成分定性分析是十分复杂的,相当一部分成分稳定性差,采用常规的分鉴定技术难度较大。采用HPLC-MS联用技术进行中药化学成分分析,可以同时得到化合物的保留时间、在线紫外光谱、相对分子质量及特征结构碎片等丰富的信息,具有高效快速和高灵敏度的特点,因此在体内化学成分的定性研究中得到广泛应用<sup>[9]</sup>。

生物碱是一大类含氮的有机化合物,具有较强的生物活性。自从1806年德国学者Sertürner F W从鸦片中分离出吗啡碱以后,迄今为止已从自然界

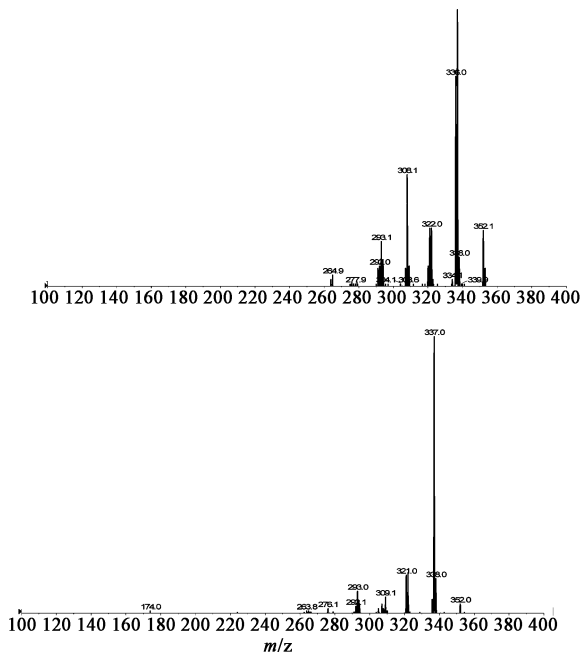


图 8 保留时间在 34.03, 40.59 min 色谱峰的二级质谱

分出 1 万多种生物碱<sup>[10]</sup>。植物体内生物碱含量虽少,但与人类关系密切。本研究在通过文献初步掌握延胡索中可能含有化合物的基础上,应用 Q3 MS-IDA-EPI 方式进行了质谱定性分析,这是因为延胡索有效部位中同分异构较多,MRM 离子对的定性不一定保证定性结果的准确度,因此进行了 EPI 产物离子二级质谱的测定,结合对照品、参考文献和化合物本身的结构信息特点最终初步判断明确延胡索提取物入血成分的结构。

[参考文献]

[ 1 ] 王红,田明,王森,等. 延胡索现代药理及临床研究进展[J]. 黑龙江中医药大学学报, 2010, 38(6): 108.  
[ 2 ] 吕清文,丛雅勤. 延胡索药理作用及临床应用浅议[J]. 内蒙古中医, 2005, 24(1): 26.  
[ 3 ] 许翔鸿,王峥涛,余国奠,等. 延胡索中生物碱成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(6): 483.  
[ 4 ] 吕子明,孙武兴,段绪红,等. 延胡索化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 235.  
[ 5 ] 胡楠,梁日欣,王岚,等. 延胡索提取物在大鼠血浆中的药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 186.  
[ 6 ] 顾雪竹,游修琪,李先端,等. 醋制增效理论试验研究 II——延胡索生品醋制品中延胡索乙素在大鼠血浆及脏器中分布的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 36.  
[ 7 ] 游修琪,李先端,顾雪竹,等. 醋制增效理论实验研究 I——大剂量醋重复炮制对延胡索成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(2): 11.  
[ 8 ] 魏良兵,王晓玉,陈莉,等. 延胡索红花配伍对延胡索乙素含量的动态影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 77.  
[ 9 ] Jin-lan Zhang, Ming Cui, Yun He, et al. Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC-UV and HPLC-MS methods [J]. J Pharm Biomed Ana, 2005, 36: 1029.  
[ 10 ] 姚新生. 天然药物化学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 5.

[责任编辑 邹晓翠]