

延胡索活性部位入血成分的 LC-MS/MS 研究

程星烨, 石 钺*, 孙 虹, 金 文, 郑顺亮, 李开通, 杨 帅

(中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: 为深入研究延胡索活性部位体内作用的物质基础, 本文利用 LC-MS/MS 提供的色谱及离子碎片信息, 对口服延胡索活性部位后大鼠血浆中的移行成分进行分析鉴定, 通过保留时间比对、离子碎片解析等综合分析, 鉴定了 9 个入血成分均为原形成分, 同时也发现部分生物碱是以葡萄糖醛酸结合物的形式存在。入血成分及代谢产物可能为延胡索体内直接作用的药效成分, 延胡索活性部位血清药物化学表征为阐明延胡索的药理作用及其机制提供了依据。

关键词: 延胡索; 活性部位; 血清药物化学; 液相色谱-质谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 02-0167-08

Identification and analysis of absorbed components in rat plasma after oral administration of active fraction of *Corydalis yanhusuo* by LC-MS/MS

CHENG Xing-ye, SHI Yue*, SUN Hong, JIN Wen, ZHENG Shun-liang, LI Kai-tong, YANG Shuai

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences,
Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract: To analyze and identify the constituents in rat plasma after oral administration of the active fraction of *Corydalis yanhusuo*, a LC-MS/MS method was established. The constituents absorbed into blood, their original crude drugs and their metabolites were identified either by comparing the retention time and mass spectrometry data with that of reference compounds or by mass spectrometry analysis and retrieving the reference literatures. Nine species are the original form in *Corydalis yanhusuo*, moreover, some metabolites in blood identified as glucuronide were found. The constituents absorbed into blood and the possible metabolites which demonstrate to originate from the active fraction of *Corydalis yanhusuo* are responsible for the observed efficacy. Its serum pharmacology should be subjected to complete investigation so as to illuminate the pharmacology and active mechanism of the active fraction of *Corydalis yanhusuo*.

Key words: *Corydalis yanhusuo*; active fraction; serum pharmacology; LC-MS

中药发挥药效作用的物质基础是化学成分的组合。中药中虽有众多成分, 但只有被吸收入血的成分才能产生作用^[1]。因此, 基于绝大多数药物在动物体内起作用必须被吸收进入血液这一原理, 通过给药后, 分析动物血液中的成分, 有利于发现中药中真正的活性部位和有效成分, 通过分析其进入体内的有效成分的浓度消长和代谢产物变化, 可对血液中测

定的各组分的生物活性进行判断和预测, 有助于中药药物动力学研究的发展。

延胡索, 别名元胡、玄胡索、元胡索, 是传统的镇痛药和活血化瘀药。其化学成分主要是生物碱, 其中叔胺碱多有镇痛、镇静及安定作用, 以延胡索乙素为代表, 目前对延胡索的研究也多集中于这一方面, 而对延胡索中季铵碱成分研究则相对较少。我国古代医籍较多提到使用延胡索治疗心痛、胸痹, 现代在治疗心血管疾病的方剂中亦广泛应用。现代药理研究^[2]

收稿日期: 2008-09-08.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-62892086, E-mail: yshi@implad.ac.cn

证明, 延胡索能显著增加冠脉血流量, 改善心肌缺血、缺氧, 从而缓解心绞痛, 其有效成分为季铵碱类。在药理学实验指导下, 作者^[3, 4]筛选得到了延胡索抗心肌缺血的有效部位, 通过系统化学分离和定性定量分析, 确定其中主要为季铵碱类成分。为进一步了解延胡索治疗心血管疾病的主要有效成分, 本文采用 LC-MS/MS 技术对延胡索抗心肌缺血活性部位体内血中移行成分、代谢产物进行分析, 从而有的放矢地改善其生产工艺, 提高制备技术, 满足临床需要; 同时也为阐明其药理作用及其机制以及全面的质量控制提供依据。

材料与方法

仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪和 API3000 质谱检测器, Analyst 1.1 数据处理系统; Waters 600-2487 紫外检测器-Micro Q-TOF 液相质谱联用仪, MassLynx TM 4.0 软件; Eppendorf centrifug 5810R 高速离心机; Finnpiptette 移液器; 固相萃取小柱 Waters Oasis HLB 1cc 30 mg。

试剂与样品 延胡索抗心肌缺血活性部位 (总生物碱平均含量 57.4%) 为自制。提取方法: 取延胡索药材, 用 80%乙醇回流提取 3 次, 每次 4 h, 合并提取液, 回收乙醇, 得到浸膏, 用水稀释后通过大孔吸附树脂柱, 用水-乙醇系统梯度洗脱, 收集 50%乙醇洗脱部分, 浓缩干燥后得到活性部位。对照品非洲防己碱 (columbamine)、黄连碱 (coptisine)、13-methyl-dehydrocorydalmine、脱氢紫堇鳞茎碱 (dehydrocorybulbine)、13-methyl-palmatrubine、巴马汀 (palmatine)、小檗碱 (berberine) 和脱氢延胡索碱 (dehydrocorydalmine) 均由延胡索活性部位中分离得到, 13-methyl-dehydrocorydalmine 和 13-methyl-palmatrubine 为新化合物, 脱氢紫堇鳞茎碱为首次从延胡索中获得, 有关结构鉴定的核磁、质谱等数据参见文献^[3, 4]。甲醇和乙腈为色谱纯 (Honeywell Burdick & Jackson Co.); 其他化学试剂均为分析纯 (北京化工厂); 水为娃哈哈饮用纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

动物 雄性 Wistar 大鼠, 体重 (180 ± 20) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证编号: SCXK (京)2007-0001。

色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (含 0.8%冰醋酸和 0.2%三乙胺) (24 : 76) 等度洗脱; 流速: 1 mL·min⁻¹;

柱温: 30 °C。

质谱条件 离子源: ESI 源; 扫描方式: 正离子扫描; 扫描范围 m/z : 100~700; NEB (雾化气): 8 个单位; CUR (帘幕气): 12 个单位; CAD (碰撞气): 6 个单位; 源电压: 4.5 kV; 毛细管温度: 400.0 °C。碰撞能量: 30/50 eV。

延胡索活性部位供试品溶液制备 称取延胡索活性部位 20 mg, 用 80%甲醇定容于 100 mL 量瓶中, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。

另取延胡索活性部位以 0.5% CMC-Na 配制为悬浮液, 作为大鼠灌胃样品溶液 (40 mg·mL⁻¹)。

空白血浆及含药血浆样品制备 取 Wistar 大鼠 10 只, 随机分为空白组和给药组, 给药前禁食 12 h, 给药组以上述药液灌胃, 给药体积为 10 mL·kg⁻¹ (给药剂量为 0.4 g·kg⁻¹), 空白组给予等体积的生理盐水。于给药后 3 h 眼静脉丛采集血样, 肝素抗凝后, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 得到含药血浆。

分别精密移取含药血浆和空白血浆各 800 μL, 加入磷酸盐缓冲液 (pH 7.2) 400 μL, 混匀 30 s, 加至固相萃取柱中, 流出液弃去, 依次用水 1 mL、20%甲醇 1 mL 淋洗, 然后用 HCl-乙腈溶液 (0.5 : 99.5) 1 mL 洗脱, 收集洗脱液, 将洗脱液用氮气吹干后, 用 2%醋酸-乙腈 (1 : 9) 100 μL 复溶, 溶液 10 000 r·min⁻¹ 高速离心, 取上清液, 即得。

含药血浆中移行成分分析 首先通过提高流动相洗脱强度, 使血浆中主要化学成分在较短时间内洗脱出来, 通过检测色谱峰的质谱图, 从总体上分析血浆中的化学成分的离子信息。

入血成分的指认及结构确定 采用 LC-MS/MS 技术对血浆样品成分进行详细分析, 通过保留时间 (t_R) 比及对离子碎片质荷比 (m/z) 解析, 对色谱峰进行指认和鉴定; 结合体外情况分析成分的吸收变化, 从而确定吸收入血的原形成分和可能的代谢产物。

结果

1 含药血浆中移行成分的初步分析

在较高流动相洗脱强度 (乙腈 : 0.2% 乙酸 = 60 : 40) 条件下, 通过比较含药血浆和空白血浆的总离子流图, 可以明显看出血浆中主要化学成分在较短时间内 (2~3 min) 被洗脱出来; 从对不同保留时间的色谱峰进行质谱检测 (图 1) 可以发现, 不同色谱峰中主要离子在分布上有其明显特征区域: ① t_R 2.611 min: m/z 300~400 之间的区域为主要离子 (图 1A)。根据已知生物碱的分子质量, 可以判断其所代

表的主要是在血浆中以原形存在的生物碱以及可能存在的 I 相代谢产物。② t_R 2.379 min: m/z 500~550 之间的区域为主要离子 (图 1B)。由于这一区域离子与原形生物碱质量差的特殊性, 初步判断可能为生物碱与其他化合物结合的 II 相代谢产物。

2 延胡索活性部位入血成分的指认及结构确定

通过体外延胡索活性部位、对照品 HPLC 图谱 (图 2) 及活性部位、含药血浆、空白血浆的选择性离子流图 (图 3) 的对比分析, 发现含药血浆中主要的生物碱原形成分绝大多数可被检测到, 也很容易对 3、6、7、10~12 号峰进行指认, 在进一步的 LC-MS/MS

研究中 (图 4) 亦得到确认。

在对 2 号峰的检测中, 发现峰成分较复杂, 为多个葡糖醛酸与生物碱的结合物, 目前难以确认。

在对 4 号峰的检测中, 离子流图相应保留时间处一级质谱观察到了 m/z 370, 二级质谱中母离子给出了碎片离子 m/z 354, 206, 190, 165 (图 5), 谱图与文献^[5]基本一致, 推测为 fumaricine $[M+H]^+$, 可能裂解途径如图 6 所示。

在对 5 号峰的检测中, 一级质谱未观察到黄连碱 (coptisine) 的分子离子峰 m/z 320, 而是观察到了 m/z 338。体外分析时 5 号峰所对应的离子主要为

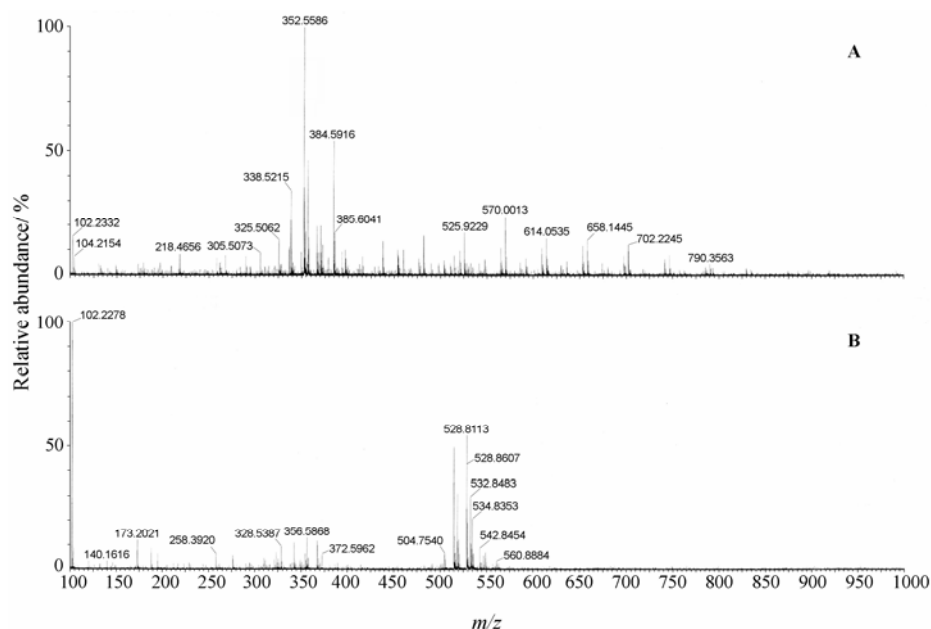


Figure 1 ESI-MS spectra in the positive mode of the peaks eluted at 2.611 min (A) and 2.379 min (B) separated by HPLC and detected in the total ion chromatogram of rat plasma sample after 3 h administration. Conditions were: Diamonsil C_{18} column; acetonitrile-water containing 0.2% acetic acid (60 : 40, v/v); flow rate, 1.0 mL·min⁻¹; and electrospray mass spectra were recorded in the positive ion-mode on Q-Tof II mass spectrometer

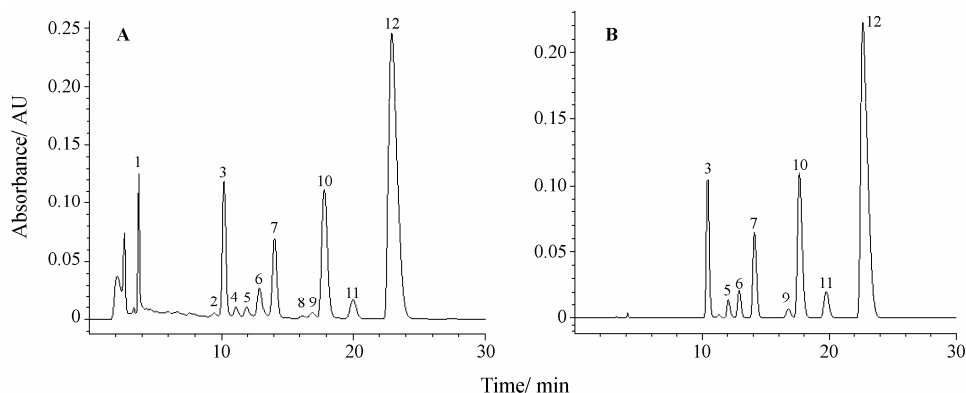


Figure 2 Representative HPLC-UV chromatograms of active fraction of *Corydalis yanhusuo* (A) and a standard mixture (B). 3: Columbamine; 5: Coptisine; 6: 13-Methyl-dehydrocorydalmine; 7: Dehydrocorybulbine; 9: 13-Methyl-palmatrubine; 10: Palmatine; 11: Berberine; 12: Dehydrocorydalmine. Others are unknown

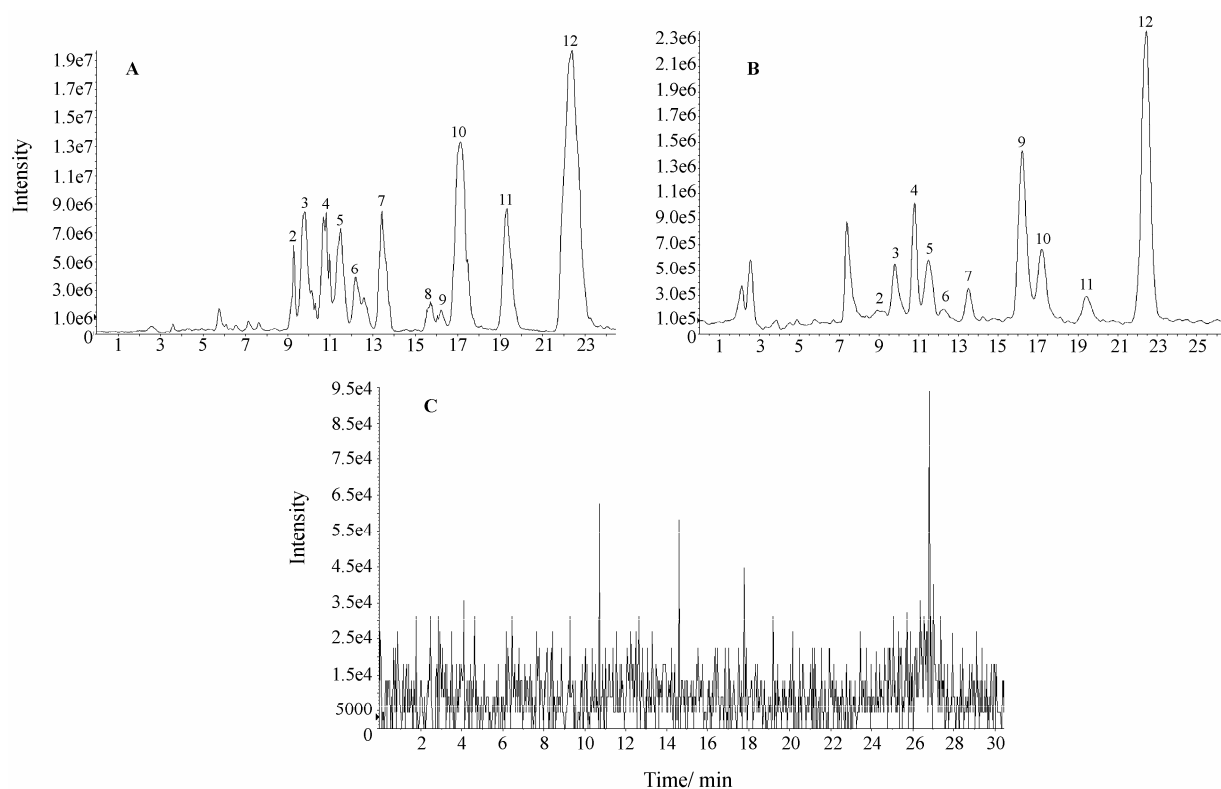
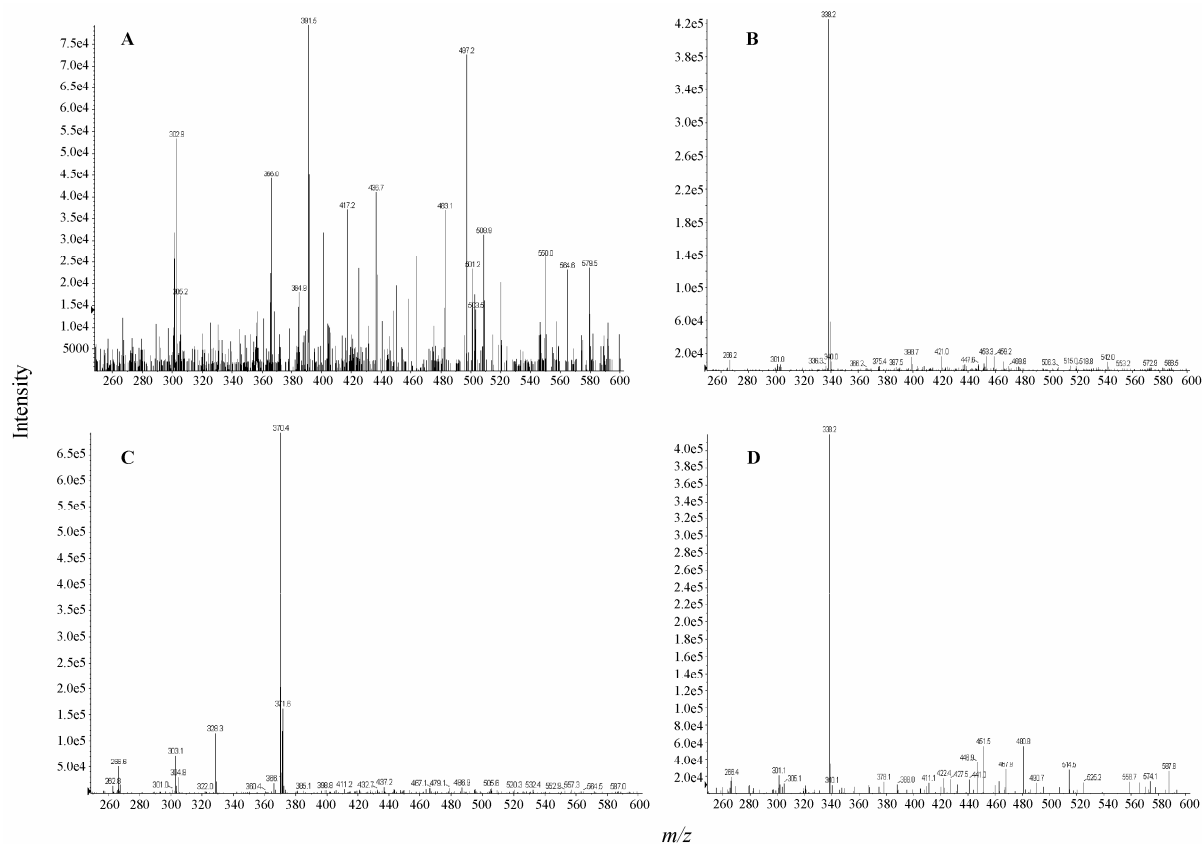


Figure 3 Extracted ion chromatograms of the components: active fraction of *Corydalis yanhusuo* (A), rat plasma sample after oral administration of active fraction of *Corydalis yanhusuo* (B) and blank rat plasma (C). Conditions were: Diamonsil C₁₈ column; acetonitrile-water containing 0.8% acetic acid and 0.2% triethylamine (24 : 76, v/v); flow rate, 1.0 mL·min⁻¹; and electrospray mass spectra were recorded in the positive ion-mode on API 3000 mass spectrometer. Peak numbers correspond to those found in Figure 2



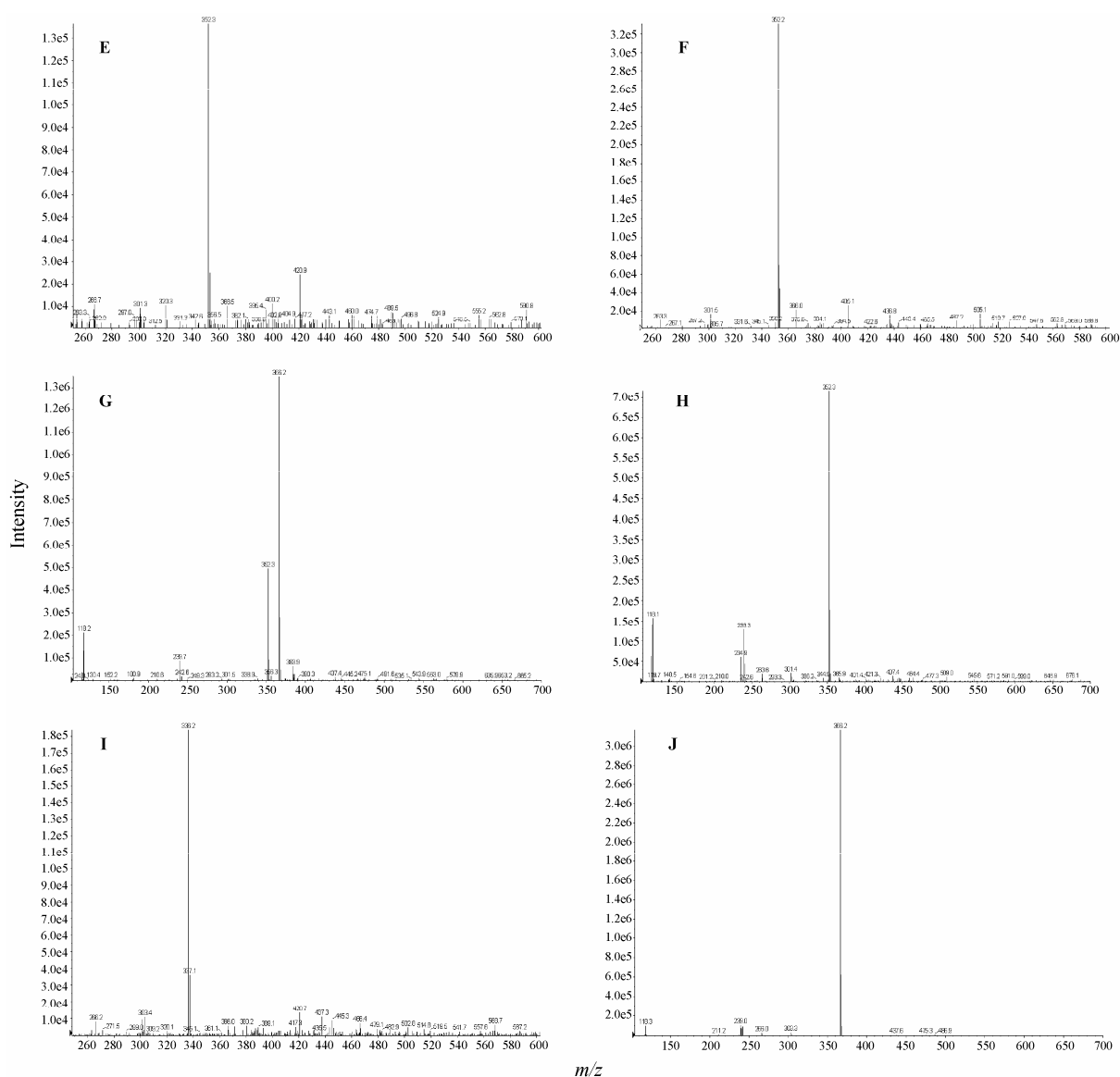


Figure 4 ESI-MS spectrum in the positive mode of the peaks 2 (A), 3 (B), 4 (C), 5 (D), 6 (E), 7 (F), 9 (G), 10 (H), 11 (I) and 12 (J) separated by HPLC and detected in the total ion chromatogram of rat plasma sample after oral administration of active fraction of *Corydalis yanhusuo*. Conditions were: Diamonsil C_{18} column; acetonitrile-water containing 0.8% acetic acid and 0.2% triethylamine (24 : 76, v/v); flow rate, 1.0 mL·min⁻¹; and electrospray mass spectra were recorded in the positive ion-mode on API 3000 mass spectrometer. Peak numbers correspond to those found in Figure 2

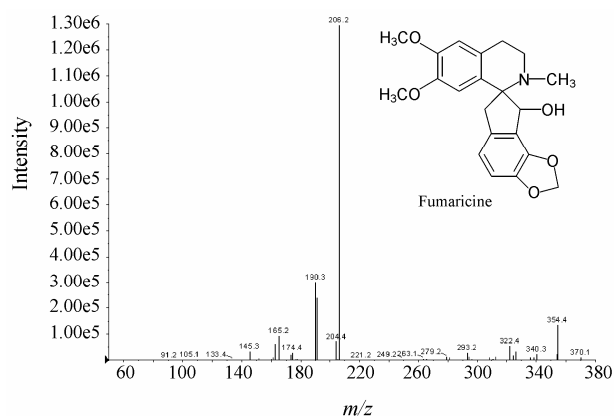


Figure 5 MS² spectra of m/z 370

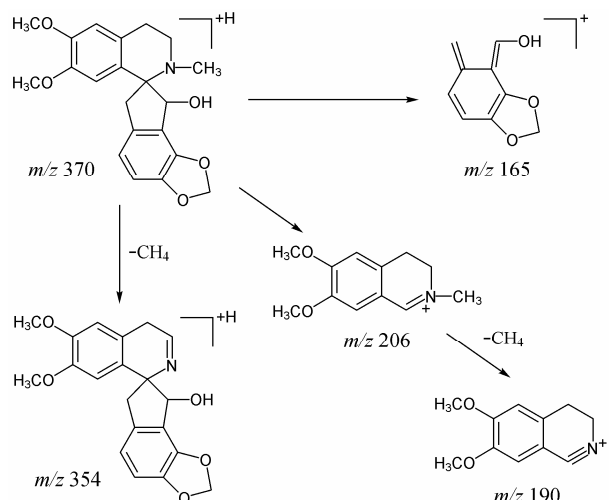


Figure 6 Fragmentation scheme for fumaricine based on MS² experiment

m/z 320, 也发现有较低丰度的 m/z 338 离子的存在, 说明在体外 5 号峰中本身包含两种成分, 只不过黄连碱含量较高, 易于检测; 而在体内, 黄连碱未被吸收或很快被吸收代谢, 所以未检测到; 相反, 分子离子 m/z 338 的成分则易被吸收、检测, 通过 LC-MS/MS 串联质谱试验, 得到丰度很高的碎片离子 m/z 190 (图 7), 是四氢原小檗碱类的典型 RDA 裂解碎片, 由于四氢小檗碱的取代位置多在 A 环 2、3 位, 通过与已知文献^[6]的对比推测为 tetrahydroberberrubine, 可能的裂解途径见图 8 所示。

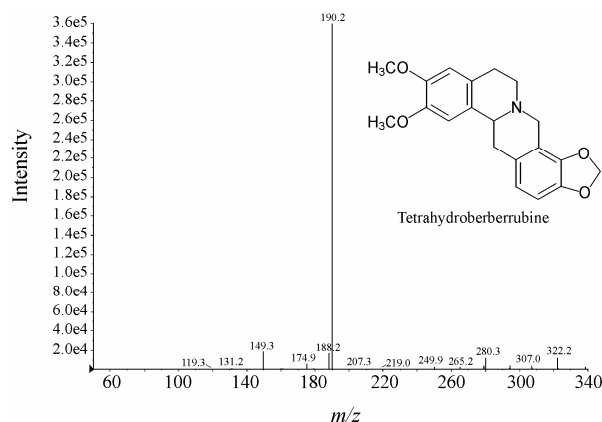


Figure 7 MS² spectra of m/z 338

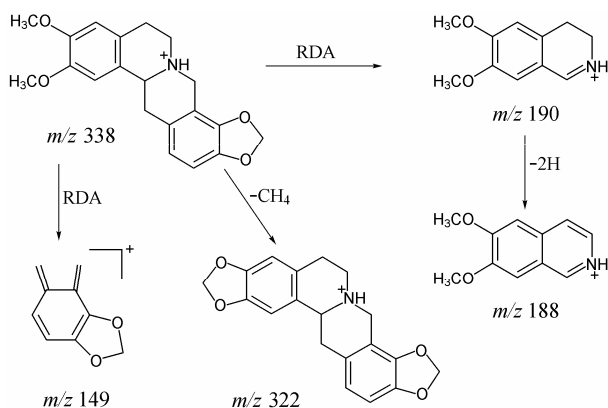


Figure 8 Fragmentation scheme for tetrahydroberberrubine based on MS² experiment

在对 9 号峰的检测中, 一级质谱除发现 13-methyl-palmatrubine (m/z 352) 外, 还发现分子离子峰 m/z 366, 从二级图谱中观察到的碎片离子 m/z 320, 290 (图 9), 尚无法确定具体的结构, 但对比延胡索中已知的各类型生物碱的相对分子质量信息和裂解规律^[6-12], 可以推断为是未知的季铵碱, 有待进一步分离确认。

综合上述分析结果, 从含药血浆中检测并确认了 9 种原形成分 (表 1), 从相对峰面积来看, 8 号峰

(13-methyl-palmatrubine) 在血液中的相对含量比在原药中明显提高, 说明该成分具有良好的吸收率, Caco-2 细胞模型实验也证实了这一点 (结果另文发表), 提示其可能会有较高的生物活性。

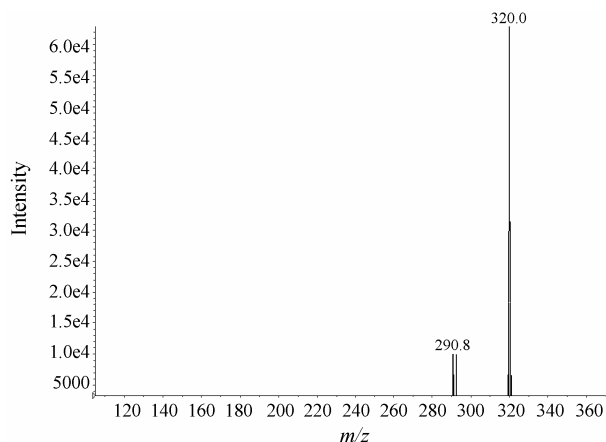


Figure 9 MS² spectra of m/z 366

Table 1 Identification of the components in rat plasma sample after oral administration of active fraction of *Corydalis yanhusuo*. Peak numbers correspond to those found in Figure 2

Peak No.	MS (m/z)	MS ² (m/z)	Identification
2	—	—	—
3	338	322, 308, 307, 294, 280, 279, 265, 262	Columbamine
4	370	354, 206, 190, 165	Fumaricine
5	338	322, 190, 188, 149	Tetrahydroberberrubine
6	352	337, 336, 321, 308, 294, 293, 279	13-Methyl-dehydrocorydalmine
7	352	336, 322, 320, 308, 294, 293, 279	Dehydrocorybulbine
8	352	336, 322, 320, 308, 294, 292, 278	13-Methyl-palmatrubine
9	366	320, 290	Unkown alkaloids
10	352	350, 348, 336, 334, 322, 308, 306, 292, 278	Palmatine
11	336	320, 318, 293, 278	Berberine
12	366	336, 322, 320, 308, 294, 292, 278	Dehydrocorydalmine

3 代谢产物分析

按确定的 LC-MS/MS 条件分析血浆样品及空白血浆样品, 发现在保留时间 2~3 min 的峰为代谢产物峰。通过对 500~550 间主要离子的 MS/MS 分析, 多数离子的二级质谱图中观察到了 M-176 或 [M-176-CH₄]⁺ 碎片 (表 2)。葡萄糖醛结合物是体内最常见的的代谢产物存在形式^[7, 8, 13], 推测质谱图中该区域的离子由血浆中生物碱-葡萄糖醛结合物产生。

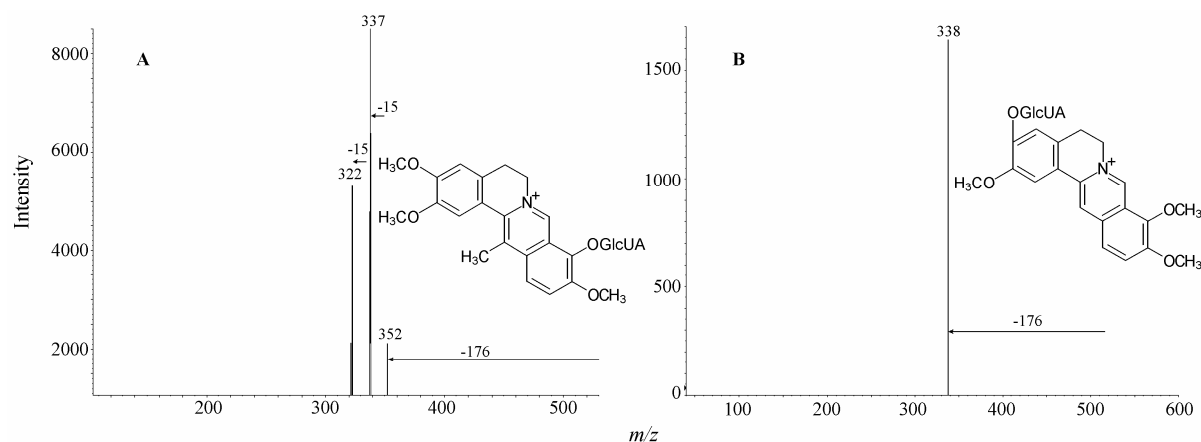


Figure 10 MS² spectra and structures of m/z 528 (A) and m/z 514 (B)

生物碱在体内一方面以原形形式存在, 另一方面也以代谢物葡萄糖醛结合物的形式存在。生物碱吸收进入体内后较快地转化为葡萄糖醛结合物, 通过尿液排出体外, 这一方面是机体自我保护的体现, 同时也是生物碱较难检测到的可能原因之一。通过 MS/MS 数据推测了 6 个这样离子可能的结构 (图 10)。虽然能明确它们是生物碱-葡萄糖醛结合物, 但考虑到四氢小檗碱型叔胺碱和小檗碱型生物碱在代谢过程中结构中常常失去一个 $-CH_3$ 或连接一些类似基团, 代谢行为较复杂, 单凭质谱还难于给出其确切的结构, 加上延胡索活性部位中存在较多的同分异构体, 其代谢产物的鉴别可能还需借助 NMR 来加以区分。

Table 2 LC-MS/MS data of metabolites in rat plasma

No.	MS m/z	MS/MS (m/z)
M1	514	338 [M-GlcUA] ⁺
M2	518	342 [M-GlcUA] ⁺ , 178
M3	528	352 [M-GlcUA] ⁺ , 337, 322
M4	532	356 [M-GlcUA] ⁺ , 342, 294
M5	542	350 [M-GlcUA-CH ₃] ⁺
M6	546	354 [M-GlcUA-CH ₃] ⁺ , 338, 178

讨论

血浆样品常用的处理方法有液液萃取、强酸沉淀、重金属盐沉淀、有机溶剂沉淀和固相萃取法等, 本实验对有机溶剂沉淀法和固相萃取法进行了筛选, 结果发现: 有机溶剂沉淀法处理后的样品杂质很多, 干扰检测, 而通过固相萃取法处理后的样品虽杂质含量较少, 但主要的生物碱未能检测到。分析原因, 可能一方面由于原小檗碱型季铵碱分子与蛋白结合较牢固, 淋洗过程中可能随蛋白流失; 另一方面, 也可能是由于季铵碱与固相萃取柱 (ODS, C18, Agela)

之间的结合较牢固, 甲醇未能洗脱。因此尝试改进方法: ① 固相萃取柱改用对极性物质吸附较强的 Waters Oasis HLB 吸附剂; ② 在上样前通过加入磷酸盐破坏蛋白与生物碱分子间的结合; ③ 控制溶液和固相萃取柱 pH 值, 防止因 pH 过低导致生物碱上样或淋洗时随流出液流出而损失; ④ 洗脱时根据 Waters 公司提供的洗脱曲线和推荐方法, 在水淋洗基础上, 再采用 20% 的甲醇淋洗, 充分去除杂质和干扰物; ⑤ 采用酸性有机溶剂洗脱使生物碱不会残留在固相萃取柱上。试验中采用的 Waters Oasis HLB 吸附剂是由亲脂性二乙烯苯和亲水性 *N*-乙烯基吡咯烷酮两种单体按一定比例聚合而成, 其对极性物质的保留能力比硅胶键合的 SPE 吸附剂强, 吸附量大 2~3 倍, 理论上回收率优于溶剂法, 该方法对于今后的定量研究也更合适。

四氢原小檗碱类的质谱裂解主要是 RDA 裂解, 由于芳香环上的取代位置多在 A 环 2、3 位和 D 环的 9、10 位、因此从两个裂解部分质荷比可大致推断出芳香环和 N 原子上的取代。原托品类小檗碱也通常发生 RDA 裂解, 根据两部分碎片的质荷比来推测取代基情况以及与区别四氢原小檗碱类的裂解。

原小檗碱型的季铵碱, 由于 C 环为不饱和结构, 故不发生 RDA 裂解, 不同的取代基, 会发生不同的裂解: ① 若 C-9、C-10 位有甲氧基取代, 它们均可丢失甲基, 得到 [M-CH₃]⁺ 离子, 再脱去与 N 相连的 H 得到 [M-CH₄]⁺ 离子, 而 [M-CH₃]⁺ 离子继续失去另一个甲基, 得到 [M-CH₃-CH₃]⁺ 离子, [M-CH₄]⁺ 脱去 C-9 位 C=O 得到 [M-CH₄-CO]⁺ 离子, 继续还可产生 [M-2CH₃-CO]⁺ 和 [M-2CH₃-CH₂O]⁺。② 结构中 C-2、C-3 位如有甲氧基取代, 还可继续产生 [M-CH₄-2CH₃]⁺, 如巴马汀、脱氢延胡索碱等。小檗碱因 C-2、

C-3 位无甲氧基, 故不产生 $[M-CH_4-2CH_3]^+$ 离子。

③ 黄连碱等如无甲氧基取代的结构则只直接产生丢失 $C=O$ 的裂解。④ 有 13 位甲基取代的结构, 一般 13 位甲基不会裂解, 这些和文献^[10]报道的一致。

本实验仅观察了灌服延胡索活性部位 3 h 后的大鼠血浆样品中原形药物成分和代谢产物, 发现生物碱在体内一方面以原形形式存在, 另外也以葡萄糖醛结合物的形式存在, 至于是否还有其他形式的代谢产物, 还有待进一步研究。生物碱吸收进入体内后较快转化为葡萄糖醛结合物, 这也可能是小檗碱型生物碱原形较难检测到的原因之一。

References

- [1] Wang XJ. Progress and future developing of the serum pharmacchemistry of traditional Chinese medicine [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2006, 31: 789–792.
- [2] Cheng XY, Shi Y. Analysis of chemical constituents of anti-myocardial ischemia fraction of *Corydalis yanhusuo* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2008, 33: 1717–1719.
- [3] Cheng XY, Shi Y, Zheng SL, et al. Two new protoberberine quaternary alkaloids from *Corydalis yanhusuo* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2008, 10: 1117–1121.
- [4] Cheng XY, Shi Y, Zheng SL, et al. Studies on chemical constituents in the anti-myocardial ischemia effective fraction of *Corydalis yanhusuo* [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2008, 12: in press.
- [5] Yu DQ, Yang JS. Analytical Chemical Handbook: Vol 9 (分析化学手册: 第 9 分册) [M]. 2nd ed. Beijing: Chemical Industry Press, 1999: 729.
- [6] Karimov A, Shakirov R. Berberis alkaloids. XX. Investigation of the alkaloids of *Berberis iliensis* [J]. Chem Nat Compd, 1993, 29: 69–70.
- [7] Ding B, Zhou TT, Fan GR, et al. Qualitative and quantitative determination of ten alkaloids in traditional Chinese medicine *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang by LC-MS/MS and LC-DAD [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 45: 219–226.
- [8] Deng YT, Liao QF, Li SH. Simultaneous determination of berberine, palmatine and jatrorrhizine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in rat plasma and its application in a pharmacokinetic study after oral administration of coptis-evodia herb couple [J]. J Chromatogr B, 2008, 863: 195–205.
- [9] Xu XH, Wang ZT, Yu GD, et al. Alkaloids from *Rhizoma corydalis* [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 2002, 33: 483–486.
- [10] Li LJ, Zeper A, Xiang Y, et al. Study on alkaloid contained in *Rhizoma Coptidis* by MS/MS and LC-MS/MS [J]. J Chin Mass Spectrom Soc (质谱学报), 2000, 21: 81–82.
- [11] Zheng JF, Qin MJ, Zheng Y, et al. Alkaloids from *Corydalis bungeana* [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 2007, 38: 112–114.
- [12] Wang HS, Yang HR. The alkaloids of *Corydalis dasysperma* Maxim [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 1997, 9: 37–39.
- [13] Cheng XY, Zhong DF, Jiang H, et al. Characterization of some glucuronide conjugates by electrospray ion trap mass spectrometry [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1998, 33: 849–854.