【评价方法学】

基于靶细胞萃取的延胡索药效成分的筛选和含量测定

王　磊，王　媛，李爱主，李遇伯*
天津中医药大学 中药学院，天津　300193

摘　要：目的　建立靶细胞萃取延胡索 *Corydalis Rhizoma* 中的药效成分并采用 HPLC 法进行定量分析的方法。**方法**　选用人脐静脉内皮细胞（HUVEC）作为靶细胞，萃取延胡索中的药效成分。在细胞对数生长期加入延胡索冻干粉，孵育 2 h 收集细胞并用液氮裂解，得到萃取药物后的细胞样品。采用 UPLC/Q-TOF-MS 对其进行检测，分析萃取进入细胞内的物质，即延胡索中进入细胞进一步发挥药效的有效成分。最后，用 HPLC 法对进入细胞中的有效成分进行定量分析。**结果**　HUVEC 萃取到 5 个药效成分，分别为延胡索乙素、四氢小檗碱、延胡索甲素、盐酸小檗碱、去氢延胡索甲素。同时建立 5 个成分的含量测定方法。**结论**　靶细胞萃取的分析方法可以通过化合物与细胞之间的相互作用，反映出药物中发挥药效的活性物质，在中药复杂体系的研究中起到重要的作用。

关键词：延胡索；靶细胞萃取；含量测定；UPLC/Q-TOF-MS。
中图分类号：R　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674 - 6376 (2016) 06 - 0990 - 05
DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.06.013

Screening and quantitative analysis of pharmacodynamic components in *Corydalis Rhizoma* based on target cell sorption

WANG Lei, WANG Yuan, LI Ai-zhu, LI Yu-bo
College of Chinese MateriaMedica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective　To establish a method that using target cell to extract the pharmacodynamic components and quantitative analysis in *Corydalis Rhizoma*. **Methods**　Take the human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as target cells, and add the freeze-dried powder of yanhusuo in logarithmic growth period. After 2 h incubation, the cells were collected and liquid nitrogen was used to cleave those cell samples. While compounds in the extract of cell samples were determined by UPLC/Q-TOF-MS, the effect of effective components that entered the cell of *Corydalis Rhizoma* was ananlyzed. Finally, HPLC was used to quantitatively analyze the effective components. **Results**　After HUVEC extraction, five active ingredients were obtained, such as tetrahydropalmatine, berberine, tetrahydroberberine, berberine hydrochloride, and dehydrocorydalinecorydaline, respectively. At the same time, the method was established for the determination of the five components. **Conclusion**　The analysis method of the target cell extraction can reflect the active substance in the medicine, through the interaction between the compound and the cell. This method will play an important role in the study of complex system of traditional Chinese medicine.

Key words: *Corydalis Rhizoma*; target cell sorption; quantitative analysis; UPLC/Q-TOF-MS.

延胡索 *Corydalis Rhizoma* 具有 2 000 多年的用药历史，为历代医家推崇的镇痛药[1]。最早记载于《本草拾遗》，“生于奚，从安东道来，根如半夏，色黄”。在《雷公炮炙论》、《济生方》、《药品化义》等书籍中也有相应的记载[2]。在现代中医学中，将其用于腕腹疼痛、产后瘀阻、经闭痛经、跌扑肿痛等疾病的治疗。随着中药现代化进程的发展，明确中药中的药效活性物质，成为系统研究和梳理的重点。

靶细胞萃取法是一种细胞色谱法，以药物与生物活性靶标（受体、酶、离子通道等活性靶点）作用进而产生生物效应为基本研究原理[3]。以活细胞

收稿日期：2016-04-17
基金项目：国家科技支撑计划课题（2011BAI07B00）
作者简介：王　磊，女，硕士研究生，主要从事药理方向研究。E-mail: 1327812057@qq.com
*通信作者：李遇伯，硕士生导师，主要从事中药分析和代谢组学研究。E-mail: yuboli1@163.com

（具有生物活性环境、细胞膜表面的立体构型、活性靶点以及细胞功能的完整性的特点[4]）类比于色谱技术中的固定相，具有药效的活性物质与靶点进行特异性结合，这些物质或结合于细胞膜表面或进入细胞中，对得到的细胞进行检测，筛选到药效活性成分，这样能够很好的排除无药效成分的干扰[5]。在中药现代化进程中，中药中的药效物质基础研究是亟需解决的问题，细胞色谱与分析技术相结合阐释中药药效物质基础成为近年来的研究热点。因此，本文以人脐静脉内皮细胞（HUVEC）为作用对象，建立了延胡索药效成分的筛选方法，并对其中的药效成分进行含量测定。

1 材料和仪器

1.1 材料与试剂

HUVEC 细胞（天津赛尔生物技术有限公司），胰蛋白酶（Gibco BRL，美国），DMEM 培养基（Gibco BRL，美国）；1640 培养基（Gibco BRL，美国），胎牛血清（FBS）（Gibco，美国），DMSO（天津市化学试剂一厂），96 孔培养板（Orange Scientific，比利时）。延胡索药材购于北京鹤延龄中药饮片有限公司（批号 150200431）。对照品四氢小檗碱（批号 AW098T）、去氢延胡索甲素（批号 AW027D）、延胡索乙素（批号 AB034R）均购买于中国食品药品检定研究院；盐酸小檗碱（批号 Y-035-121130，成都瑞芬思生物科技有限公司，质量分数大于 98%）；延胡索甲素（批号 20130815，天津士兰科技有限公司，质量分数均大于 98%）。

1.2 实验仪器

CO_2 恒温培养箱（Thermo Forma，美国），超净工作台（苏州净化设备有限公司），倒置显微镜（Olympus，日本），TS-1 型摇床（江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司），5415D 型离心机（Eppendorf，德国），酶标仪（Bio-tek，美国），MTT（Ameresco 公司，美国）。岛津 LC-20AT 液相色谱仪（配有 SPD-M20A 型检测器，SIL-20A 自动进样器）BS124S 电子天平（北京赛多利斯仪器系统有限公司），KDM 型调温电热套（山东省邺城永兴仪器厂），RE-52AA 型旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂），SHZ-95B 型循环水式多用真空泵（河南巩义市英峪予华仪器厂）。

2 延胡索药效成分的筛选

2.1 色谱、质谱分析条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} Column（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）；流动相为 0.1%甲酸水（A）-0.1%甲酸乙腈（B）；体积流量 0.3 mL/min，柱温 35 ℃，进样量 5 μL，梯度洗脱（0～1 min，15% B；1～6min，15%～30%；6～10 min，30%～60%；10～12 min，60%～15%；12～15 min，15%）。

2.1.2 质谱条件 超高效液相色谱法耦合到 Q-TOF-MS，配备电喷雾电离源（ESI），采用正离子模式进行扫描分析。MS 参数设定如下：干燥气体积流量 10 mL/min，N_2 温度 350℃，雾化器气压 310 kPa，脱溶剂氮气体积流量 600 L/h，锥孔反吹氮气 50 L/h。毛细管电离电压 2.1 kV，四级杆扫描范围 *m*/*z* 50～1 000，辅助气体为高纯氮气。

2.2 供试品溶液制备

精密称取 1.0 g 延胡索药材于圆底烧瓶中，加入 10 倍量 70%乙醇回流提取 1 h，滤过取上清液，残渣再加入 8 倍量 70%乙醇，提取 1 h，滤过，合并两次滤液，减压浓缩并冻干成粉末。

2.3 细胞培养

选用稳定的细胞株 HUVEC，用 DMEM 高糖培养基在培养瓶中培养，培养基中含有 10% FBS、1%PS、1%非必需氨基酸，在 37 ℃、饱和湿度、5% CO_2 培养箱中培养。隔天更换培养基，生长 3～4 d 后细胞达到融合。用胰蛋白酶（0.25%）–EDTA（1 mmol/L）的消化液传代。在倒置相差显微镜下放大 200 倍观察，选均匀铺满瓶底、排列整齐、胞浆饱满、生长状态良好均一的细胞供实验用。

2.4 靶细胞萃取延胡索的成分

选择处于对数生长期的 HUVEC 细胞，加入无血清的 DMEM 培养基，在 37 ℃，5% CO_2 的条件下孵育 0.5 h，弃去无血清的培养基，加入用无血清的 DMEM 培养基溶解延胡索冻干粉配制的 500 mg/L 的药材溶液，孵育 2 h。弃去含药培养基，用 PBS 冲洗 4 次，取 1 mL 第 4 次洗脱液备用。收集细胞，并将其置于液氮中急速冷冻 10 min，随后取出立即置于 37 ℃水浴中融化，重复以上反复冻融操作 3 次，使细胞破碎，释放出与细胞结合的中药化学成分。并将其冷冻干燥成粉末。取萃取药物后的冻干样品，分别加 200 μL 50%甲醇溶解样品，涡旋混匀 1 min，以 4 ℃，13 000 r/min 离心 15 min，移取上清液备用。将第 4 次洗脱液和细胞破碎液用 UPLC/Q-TOF-MS 检测。以同样的方法用无血清的 DMEM 溶液代替药液作空白细胞的破碎液。

2.5　方法学考察

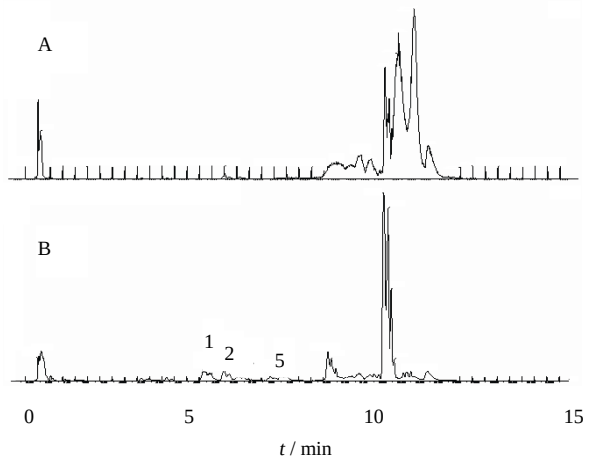
2.5.1　精密度试验　制备延胡索供试品溶液，连续进样 6 次，随机选取 20 个色谱峰，计算 20 个色谱峰的峰面积的 RSD 值，20 个色谱峰峰面积的 RSD 在 0.9%～2.2%，表明仪器精密度良好。

2.5.2　重复性试验　平行制备 6 份延胡索供试品溶液，连续进样分析，随机选取 20 个色谱峰，计算 20 个色谱峰的峰面积的 RSD 值，20 个色谱峰峰面积的 RSD 在 2.2%～5.3%，表明仪器精密度良好。

2.5.3　稳定性试验　制备延胡索供试品溶液，分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样分析，随机选取 20 个色谱峰，计算 20 个色谱峰的峰面积的 RSD 值，各色谱峰峰面积的 RSD 在 0.8%～2.4%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定，所以每批样品保证在 24 h 内测定。

2.6　样品分析

分别对空白细胞破碎液和加入延胡索的 HUVEC 细胞破碎液进行 UPLC/Q-TOF-MS 分析。如图 1（A）所示，空白的细胞破碎液中，未检测到延胡索药材中的成分，说明其对延胡索成分与细胞膜作用无干扰。图 1（B）为加入延胡索药材的 HUVEC 细胞破碎液的 BPI 图，根据对照品和结合本实验室已发表的文章[6]对延胡索中的成分进行鉴定，具体的物质信息和断裂规律见表 1。最终，在



1-四氢小檗碱；2-延胡索甲素；3-延胡索乙素；4-去氢延胡索甲素；5-四氢药根碱

1−tetrahydropalmatine;　2−berberine;　3−tetrahydroberberine;　4−berberine hydrochloride; 5−dehydrocorydalinecorydaline

图 1　空白细胞提取液（A）和加药细胞破碎液（B）的 BPI 图

Fig 1　BPI of extract of HUVEC with blank (A) and with *Corydalis Rhizoma* (B)

细胞破碎液中找到了四氢小檗碱、延胡索甲素、延胡索乙素、去氢延胡索甲素、四氢药根碱 5 种延胡索成分，这 5 种成分进入细胞后进一步发挥药效，因此，这些成分为 HUVEC 在细胞中有吸收的药效成分。

3　药效成分的含量测定

3.1　色谱分析条件

色谱柱为 Diamonsil C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为 0.1%磷酸水（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0～8 min，10%～18% B；8～15 min，18%B；15～16 min，18%～20%B；16～25 min，20% B；25～40 min，20%～25%B；40～50 min，25%～50%B；50～55 min，50%～10%B）；体积流量 1 mL/min；检测波长 280 nm；柱温 35 ℃；进样量 10 μL。

3.2　溶液制备

3.2.1　标准品储备液制备　取延胡索乙素、四氢小檗碱、延胡索甲素、盐酸小檗碱、去氢延胡索甲素对照品适量，精密称定，加 50%甲醇分别配制成质量浓度均为 0.50 mg/mL 的对照品储备液，4 ℃避光保存备用。

3.2.2　供试品溶液　称取干燥的延胡索药材 10 g，置于圆底烧瓶中，加热回流提取两次。第一次加入 10 倍量 70%乙醇回流提取 1 h，第二次加入 8 倍量 70%乙醇提取 30 min。合并两次提取液，浓缩至 10 mL，4℃保存备用。临用前量取浓缩液 500 μL 定容至 10 mL，即得质量浓度为 50 mg/mL（生药）的供试品溶液。

3.3　方法学考察

3.3.1　线性与范围　精密量取“3.2.1”项下制备的对照品储备液适量，用 50%甲醇稀释成四氢小檗碱和去氢延胡索甲素质量浓度为 2.5、15.0、30.0、50.0、65.0、85.0 μg/mL；延胡索乙素和延胡索甲素质量浓度为 10.0、80.0、150.0、225.0、300.0、375.0 μg/mL；延胡索甲素质量浓度为 10.0、80.0、150.0、225.0、300.0 μg/mL；盐酸小檗碱质量浓度为 0.4、3.0、5.0、7.5、10.0、12.5 mg/mL，的系列对照品溶液，各取 10 μL，按“3.1 项”下色谱条件进样测定。以各峰面积为纵坐标，以质量浓度为横坐标，进行线性回归。所得各化学成分的回归方程见表 2，结果表明，四氢小檗碱和去氢延胡索甲素均在 2.5～85.0 μg/mL 内线性关系良好；延胡索乙素、延胡索甲素和盐酸小檗碱分别在 10.0～375.00、10.0～300.0 μg/mL 和 0.4～12.5 mg/mL 内呈良好的线性关系。

3.3.2　精密度试验　取延胡索药材粗粉 10 g，按照

表 1 四氢小檗碱、延胡索甲素、延胡索乙素、去氢延胡索甲素、四氢药根碱的断裂规律

Table 1 Fracture regulation of tetrahydropalmatine, berberine, tetrahydroberberine, berberine hydrochloride, and dehydrocorydalinecorydaline

序号	保留时间/min	相对分子质量	误差（$\times10^{-6}$）	分子式	ESI-MS/MS(*m/z*)	名称
1	5.10	356.1867	−1.40	$C_{21}H_{25}NO_4$	356.1853$[M+H]^+$, 341.1600$[M+H-CH_3]^+$, 192.1024$[M+H-C_{10}H_{12}O_2]^+$, 177.0779$[M+H-C_{10}H_{12}O_2-CH_3]^+$, 165.0915$[M+H-C_{11}H_{13}NO_2]^+$, 150.0677$[M+H-C_{11}H_{13}NO_2-CH_3]^+$	延胡索乙素
2	5.68	340.1551	−0.59	$C_{20}H_{21}NO_4$	340.1538$[M+H]^+$, 325.1291$[M+H-CH_3]^+$, 176.0704$[M+H-C_{10}H_{12}O_2]^+$, 165.0909$[M+H-C_{10}H_9NO_2]^+$, 135.0432 $[M+H-C_{10}H_9NO_2-2CH_3]^+$	四氢小檗碱
3	6.08	370.2031	−3.51	$C_{22}H_{27}NO_4$	370.2010$[M+H]^+$, 355.1751$[M+H-CH_3]^+$, 354.1697$[M+H-CH_4]^+$, 340.1543 $[M+H-2CH_3]^+$, 192.1022$[M+H-C_{11}H_{14}O_2]^+$, 179.1063$[M+H-C_{11}H_{13}NO_2]^+$, 177.0786$[M+H-C_{11}H_{14}O_2-CH_3]^+$, 164.0827$[M+H-C_{11}H_{13}NO_2-CH_3]^+$	延胡索甲素
4	6.41	336.1230	1.79	$C_{20}H_{23}NO_4$	342.1704$[M+H]^+$, 327.1458$[M+H-CH_3]^+$, 326.1384$[M+H-CH_4]^+$, 312.1565$[M+H-2CH_3]^+$, 178.0867$[M+H-C_{10}H_{12}O_2]^+$, 165.0904$[M+H-C_{10}H_{11}NO_2]^+$, 163.0632$[M+H-C_{10}H_{12}O_2-CH_3]^+$, 135.0680$[M+H-C_{10}H_{11}NO_2-2CH_3]^+$	四氢药根碱
5	6.94	366.1709	−1.09	$C_{22}H_{24}NO_4^+$	366.1711$[M+H]^+$, 351.1455$[M+H-CH_3]^+$, 350.1391$[M+H-CH_4]^+$, 336.1230$[M+H-2CH_3]^+$	去氢延胡索甲素

表 2 延胡索乙素、四氢小檗碱、延胡索甲素、盐酸小檗碱、去氢延胡索甲素的线性回归方程、相关系数及线性范围

Table 2 Calibration curves, concentration ranges, and correlation coefficients of tetrahydropalmatine, berberine, tetrahydroberberine, berberine hydrochloride, and dehydrocorydalinecorydaline

化学成分	回归方程	线性范围/（μg·mL^{-1}）	R^2
延胡索乙素	$y=8.5\times10^6x-31\ 981$	10.0～375.0	0.999 7
四氢小檗碱	$y=8.2\times10^6x-4\ 950.9$	2.5～85.0	0.999 3
延胡索甲素	$y=8.1\times10^6x-22\ 359$	10.0～375.0	0.998 2
盐酸小檗碱	$y=2.7\times10^7x-1\ 734.8$	400～125 000	0.999 8
去氢延胡索甲素	$y=2.8\times10^7x-10\ 631$	2.5～85.0	0.999 1

“3.2.2 项”下方法制备供试品溶液，按照“3.1 项”下色谱条件重复进样测定 6 次，分别计算延胡索乙素、四氢小檗碱、延胡索甲素、盐酸小檗碱、去氢延胡索甲素峰面积的 RSD 值在 0.22%～0.68%，表明仪器精密度良好。

3.3.3 重复性试验 精密称取延胡索药材 6 份，按照“3.2.2 项”下方法平行制备供试品溶液 6 份，按“3.1 项”色谱条件进样检测。结果延胡索乙素、四氢小檗碱、延胡索甲素、盐酸小檗碱、去氢延胡索甲素的 RSD 在 3.3%～4.4%。表明该方法重复性良好。

3.3.4 稳定性试验 取延胡索药材 10 g，按照“3.2.2 项”下方法制备供试品溶液，按照“3.1 项”下色谱

条件分别在溶液制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定。结果供试品溶液中延胡索乙素、四氢小檗碱、延胡索甲素、盐酸小檗碱、去氢延胡索甲素峰面积的 RSD 值在 0.3%～1.4%，表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

3.3.5 加样回收率 取已知含量的延胡索药材 5 份，各约 50 mg，精密称定，分别加入四氢小檗碱、去氢延胡索甲素、延胡索乙素、盐酸小檗碱、延胡索甲素对照品溶液适量，按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“3.1 项”下色谱条件进样测定，计算 5 种成分的加样回收率在 99.0～102.0%之间，RSD 在 0.89%～1.6%。表明该方法准确度良好。

3.4 样品分析

取延胡索药材 10 g，按照“3.2.2 项”下方法平行制备供试品溶液 3 份，按照“3.1 项”下色谱条件进样测定，按回归方程计算各成分的量，见表 2。

表 2 延胡索中延胡索乙素、四氢小檗碱、延胡索甲素、盐酸小檗碱、去氢延胡索甲素的含量

Table 2 Content of tetrahydropalmatine, berberine, Tetrahydroberberine, berberine hydrochloride, and dehydrocorydalinecorydaline

样品编号	四氢小檗碱 /(μg·g^{-1})	延胡索乙素 /(μg·g^{-1})	延胡索甲素 /(μg·g^{-1})	盐酸小檗碱 /(μg·g^{-1})	去氢延胡索甲素 /(μg·g^{-1})
1	258.09	2706.79	2544.09	65.56	928.44
2	261.29	1939.55	2536.98	67.47	954.32
3	242.57	2126.90	2397.12	62.13	875.48
平均	253.98	2257.75	2492.73	65.05	919.42

4 讨论

众所周知，中药中复杂的化学成分一直是研究的困难。化学成分太多，难以区分有效成分和无关物质。且不能辨别出药效成分，不能阐明其中的药物作用机制，成为中药现代化发展过程中的阻碍。靶细胞萃取法以特定细胞作为固定相，模拟出机体中的生理或病理条件，根据中药中复杂成分在固定相中的保留行为（药物与细胞相互作用、相互结合的过程），筛选出中药中的药效成分，也可对药物的作用机制和药理作用进行解释。

本实验旨在通过 HUVEC 建立延胡索中药效成分的筛选方法，进一步建立这些有效成分的定量分析方法，为药材或进入细胞中的药效成分的定量研究奠定基础。应用 HUVEC 特异性的结合延胡索中的药效成分，收集细胞时洗去停留在表面的成分，采用液氮裂解细胞，使细胞失活、破裂，将结合在其中的活性成分释放出来。接着，采用 UPLC/Q-TOF-MS 对细胞裂解液进行检测，比较空白细胞提取液和加入延胡索的细胞提取液，并排除了空白细胞对确定延胡索中药效成分的影响；在加入延胡索的细胞提取液中检测到了 5 个药效成分，分别为延胡索乙素、四氢小檗碱、延胡索甲素、盐酸小檗碱、去氢延胡索甲素。最后，为了给后续研究提供参考，本实验还建立了准确、灵敏、简便、重复性好的延胡索中主要成分延胡索乙素、四氢小檗碱、延胡索甲素、盐酸小檗碱、去氢延胡索甲素含量测定方法。并测定了延胡索药材中这 5 种成分的含量。本实验建立的系统的靶细胞萃取法筛选中药中药效成分及其定量检测的方法，建立的方法稳定可靠，为中药延胡索提供了物质基础研究，同时此方法也可应用于其他中药的药效成分的筛选，为中药复杂体系物质基础研究提供参考。

参考文献

[1] 中国药典[S]. 一部. 2010.

[2] 邹 薇, 张 鹤, 包永睿, 等. 延胡索提取工艺的优化及化学成分与药效指标相关性分析 [J]. 中草药, 2012, 04: 694-698.

[3] Wainer I W, Homan K, Terence A G. Noctorbio-chromatography using immobilized biopolymer: a new approach to the determination of pharmacological properties [J]. *J Pharmacol*, 1993, 45:367.

[4] 洪 敏, 马宏宇, 朱 荃. 肝细胞萃取-HPLC 分析法的建立及其在栀子保肝效应物质初步分析中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2014, 34(4): 450-453.

[5] 陈媛媛, 郭 姣. 细胞膜色谱技术在中药活性成分筛选中的应用进展 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 383-387.

[6] Lei Y, Jia Y, Meng T, *et al*. The classification and identification of complex chemical compositions in yanhusuo herb using UPLC-Q-TOF/MS [J]. *Anal Methods*, 2016, 8:2274-2281.