第五章 黄连不同炮制品中主要生物碱体内分布研究

黄连为毛茛科多年生草本植物黄连 CoptischinensisFranch 的根茎[1],其活性成分为黄连生物碱。石柱黄连(味连)含小檗碱 50%左右,而小檗碱、药根碱、巴马汀和黄连碱等 4 个生物碱之和占总生物碱的 90%左右[2]。有关小檗碱的药代动力学研究较多[3-4],其他黄连生物碱的药代动力学研究相对较少[5]。中药成分在动物体内的代谢与作用网络具有/网通虹势规律[6-7]:中药材成分群往往是同一母核的多种衍生物,药理作用相似;同一母核的有效成分衍生物群在动物内可以相互抑制、加速及转化,其代谢网络相容相通;动物内存在巨大的与自然界类似的以 CYP450 酶为主导的代谢酶网络系统,按 CYP450 进化树的关系对中药及复方成分组群进行代谢和产生药效。黄连生物碱的结构类似,均是异喹啉类生物碱的衍生物。这些生物碱之间在动物体内是否存在相互之间的转化。

黄连为毛茛科植物黄连（Coptis chinensis Franch.）、三角叶黄连（Coptis deltoidea C.Y.Chenget Hsiao）、或云连（Coptis teeta Wall.）的干燥根茎。具有清热燥湿、泻火解毒功效，始载于《神农本草经》，列为上品[1]（[1]魏・吴晋等述.神农本草经.清・孙星衍，孙冯翼辑.北京：人民卫生出版社，1982.26）。也称味连、鸡爪连、川连，目前主要产地为湖北省利川市、重庆市石柱县。其性味苦，寒，归心、脾、胃、肝、胆、大肠经。根茎含多种异喹啉类生物碱，其主要活性成分为小檗碱、黄连碱、表小檗碱、药根碱、巴马汀、非洲防己碱、Groenlandicine 等生物碱。有文献报道，总生物碱的含量高达 10%以上，盐酸小檗碱、药根碱、表小檗碱、巴马汀、黄连碱五种生物碱占据黄连总生物碱含量的 98%以上。其中以小檗碱含量最高为 50%以上[2]（[2] 钟国跃,黄小平,马开森,等.我国黄连(味连)质量评价研究[J].中国中药杂志,2005,30(7): 5941）现代药理研究表明，黄连具有抗菌、消炎、止痛、解毒、退热、驱风、健胃、利胆、降血糖、降血脂、降血压、抗肿瘤、扩张血管，以及治疗腹泻、痢疾等功效，临床主要用于肠胃湿热和痛肿疗毒等症的治疗。目前有关小檗碱的药代动力学及体内分布研究较多[3-4]（[3] 吴晓霞,彭娟,范斌,等 1.LC-MS-MS 测定黄连解毒汤中 3 种生物碱在大鼠血清的含量及其药代动力学研究 [J].中国中药杂志,2009, 34(10): 12761.[4] 赵玉男,邢东明.解热药 YL2000 中小檗碱在正常和发热大鼠体内的药物动力学比较[J].中国药理学通报. 2003,19(10): 1170），其他黄连生物碱的药代动力学及体内分布研究相对较少[5] (李亚梅,叶小利,李雪梅,等.助剂对小鼠吸收黄连总生物碱的影响及药代动力

学的研究[J].中国中药杂志, 2009,34(3):3441)。

本研究以黄酒为辅料，经炒制、蒸制炮制方法处理后，黄连不同炮制品所含主要生物碱在体内不同组织脏器的分布情况，力图从体内分布角度揭示“三焦”理论。

1． 材料

1.1 动物 SD 小鼠,体重(18-20 g),雌雄各半,由南京中医药大学动物中心提供,合格证号 SCXK(渝)2007-0001。

1.2 仪器与试剂

（1）仪器： 液质联用系统： SHIMADZU UFLC XR 超快速液相色谱仪（日本岛津公司， 包括 LC-20AD 型输液单元，STL-20A XR 型自动进样器，CTO-20AC 型柱温箱）；AB SCIEX QTRAP 5500 型质谱仪（美国 AB SCIEX 公司），Analyst 1.5 软件；KQ5200DA 型数控超声波清洗器；TG16-W 微量高速离心机,组织匀浆器。

（2）试剂：盐酸药根碱（纯度≥98%，批号 960383-96-4;表小檗碱（纯度≥98%，批号 MUST-11022503）；黄连碱（纯度≥98%，批号 3486-66-6）；盐酸巴马汀（纯度≥98%，批号 10605-02-4）；盐酸小檗碱（纯度≥98%，批号 633-65-8）；四氢巴马汀（ ）等均购自成都曼思特生物科技有限公司,含量 98%以上；其他试剂均为分析纯或色谱纯。

1.3 药材及炮制方法

黄连采挖自湖北省恩施州利川市佛宝山官康彬农户五年生黄连，经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为毛茛科植物黄连（CoptischinensisFranch.），习称“味连”、“鸡爪连”。

黄连生品：黄连药材经产地加工，火燎去须根和泥沙，干燥，撞去残留须根，强水抢洗，切片，干燥后即得。（南京海源中药饮片公司，批号 ）

黄连酒炒品：取上述生黄连生饮片适量，加黄酒拌匀，闷透，置铁锅内，用文火慢慢炒制，炒至色泽加深，略带酒香气时取出，干燥后即得。黄连每 1kg,用黄酒 kg。（南京海源中药饮片公司，生产批号： ）

黄连酒蒸品：取上述生黄连饮片，加黄酒拌匀，闷透，置蒸制容器内，用黄酒蒸汽加热，至色泽变深，带有酒香气时取出，干燥后即得。黄连每 1kg,用黄酒 kg。（南京海源中药饮片公司，生产批号： ）

1.4 样品液制备

黄连生品供试液的制备：取生黄连饮片适量，煎煮提取二次，第一次加水 10 倍煎煮提取 1h，过滤，滤渣加水 8 倍，煎煮提取 1h，过滤，合并两次滤液，浓缩至 0.9g 生药/ml，4℃储存备用。

黄连酒炒品供试液的制备：取酒炒黄连饮片适量，煎煮提取二次，第一次

加水 10 倍煎煮提取 1h，过滤，滤渣加水 8 倍，煎煮提取 1h，过滤，合并两次滤液，浓缩至 0.9g 生药/ml，4℃储存备用。

黄连酒蒸品供试液的制备：取酒蒸黄连饮片适量，煎煮提取二次，第一次加水 10 倍煎煮提取 1h，过滤，滤渣加水 8 倍，煎煮提取 1h，过滤，合并两次滤液，浓缩至 0.9g 生药/ml，4℃储存备用。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱条件 ACQUITY UPLC T3 C18 色谱柱(2. 1mm × 100 mm， 1. 8 μm，Waters 公司) ; 柱温 40 ℃; 流动相 0. 2% 甲酸水(A) -0. 2% 甲酸乙腈(B) ，等度洗脱 2min，流速 0. 4 mL·min^{-1} ; 进样量 2 μL。

质谱条件：

采用 AB 5500 UFLC QTRAP MS，ESI 源, 检测方式为选择离子监测模式（MRM），正离子检测方式，喷雾电压 5500 eV，离子源温度(TEM) 为 550 ℃，气帘气(CUR N2) 为 35 Pa，雾化气 (GS1 N2)为 50 Pa，辅助气 (GS1 N2)为 50 Pa，去簇电压(DP)为 70eV; 检测电压 1.6KV。

Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Dwell(msec)	Param	Start	Stop	ID
338.300	279.200	100.00	DP	31.00	31.00	
			CE	37.00	37.00	
			CXP	22.00	22.00	
Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Dwell(msec)	Param	Start	Stop	ID
342.200	58.100	100.00	DP	36.00	36.00	
			CE	69.00	69.00	
			CXP	10.00	10.00	
Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Dwell(msec)	Param	Start	Stop	ID
336.200	320.100	100.00	DP	191.00	191.00	
			CE	41.00	41.00	
			CXP	26.00	26.00	
Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Dwell(msec)	Param	Start	Stop	ID
352.100	336.000	100.00	DP	151.00	151.00	
			CE	39.00	39.00	
			CXP	26.00	26.00	
Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Dwell(msec)	Param	Start	Stop	ID
335.700	320.100	100.00	DP	31.00	31.00	
			CE	39.00	39.00	
			CXP	18.00	18.00	
Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Dwell(msec)	Param	Start	Stop	ID
319.950	292.000	100.00	DP	86.00	86.00	
			CE	39.00	39.00	
			CXP	14.00	14.00	
Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Dwell(msec)	Param	Start	Stop	ID
338.000	294.100	100.00	DP	146.00	146.00	
			CE	37.00	37.00	
			CXP	20.00	20.00	

2.2 溶液配制

（1）内标物溶液配制：称取四氢巴马汀对照品适量，用甲醇配制成浓度为 200ng/mL。

（2）对照品溶液配制：

非洲防己碱对照品溶液配制：称取非洲防己碱约 2mg，精密称定，置 10mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，使其浓度为 202μg/mL。

黄连碱对照品溶液配制：称取黄连碱约 2mg，精密称定，置 10mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，使其浓度为 182μg/mL。

盐酸药根碱对照品溶液配制：称取盐酸药根碱约 2mg，精密称定，置 50mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，使其浓度为 42μg/mL。

盐酸巴马汀对照品溶液配制：称取盐酸巴马汀约 2mg，精密称定，置 10mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，使其浓度为 222μg/mL。

盐酸小檗碱对照品溶液配制：称取盐酸小檗碱约 2mg，精密称定，置 10mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，使其浓度为 235μg/mL。

表小檗碱对照品溶液配制：称取盐表小檗碱约 2mg，精密称定，置 10mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，使其浓度为 211μg/mL。

木兰花碱对照品溶液配制：称取木兰花碱约 2mg，精密称定，置 10mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，使其浓度为 226μg/mL。

（3）混合对照品溶液配制：从上述对照品溶液中，分别精密移取非洲防己碱对照品溶液 800μL、黄连碱对照品溶液 800μL、盐酸药根碱对照品溶液 240μL、盐酸巴马汀对照品溶液 800μL、盐酸小檗碱对照品溶液 800μL、表小檗碱对照品溶液 800μL、木兰花碱对照品溶液 800μL 置 100mL 容量瓶中，甲醇定容至刻度。精密移取上述混合对照品溶液 3mL，置 50mL 容量瓶，用甲醇稀释至刻度，使其浓度分别为非洲防己碱 96.96ng/mL、黄连碱 87.36ng/mL、盐酸药根碱 60.48 ng/mL、盐酸巴马汀 106.56 ng/mL、盐酸小檗碱 112.8 ng/mL、表小檗碱 101.28 ng/mL、木兰花碱 108.48 ng/mL。

2.3 组织样品预处理：称取组织样品（心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、大肠）各 0.1g，精密称定，置 50mL 具塞离心塑料试管中，精密移入甲醇与盐酸混合液（100:1）20mL,加入内标溶液 5mL，精密称定，进行组织匀浆，超声提取 30min，补足重量，以 3000r/min 转速离心 5min，取上清液 1 mL，以 10000r/min 转速离心 5min，微孔滤膜过滤。取上清液进行 HPLC-MS/MS 分析。

2.4 动物分组

SD 小鼠，平衡喂养 3d 后，随机分成空白对照Ⅰ组、生品Ⅰ组、酒炒品Ⅰ组、酒蒸品Ⅰ组，每组 10 只，雌雄各半。

2.5 方法学考察

2.5.1 方法专属性

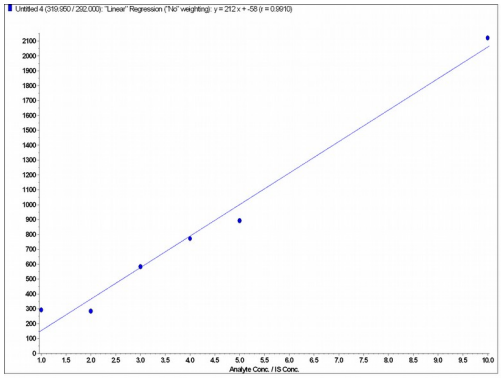
2.5.2 标准曲线和线性范围

精密移取上述混合对照品溶液 5μL、10μL、20μL、40μL、80μL、100μL 置 EP 管中，分别加入浓度为 200ng/mL 内标溶液 50μL，混匀置 70℃烘箱挥干溶剂，加精密加入 100μL 甲醇复溶，涡旋 1min，转移至套管中，进行 HPLC-MS/MS 分析，记录色谱图。以待测物浓度为横坐标，待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标，进行线性回归，结果如下表

表　各生物碱线性关系

化合物	回归方程		相关系数
	slope	intercept	r
黄连碱	212	-58	0.9910

小檗碱	209	-188	0.9728
表小檗碱	902	-591	0.9778
药根碱	30.4	4.96	0.9941
非洲防己碱	276	42.4	0.9941
木兰花碱	43	32.8	0.9864
巴马汀	466	-152	0.9903



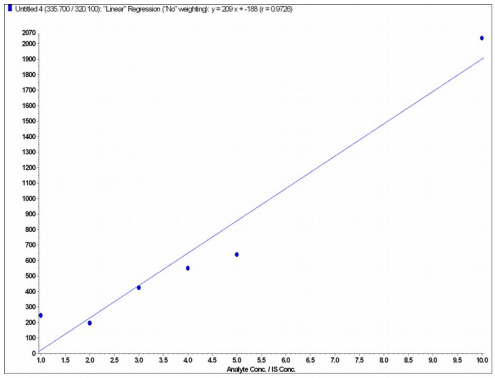
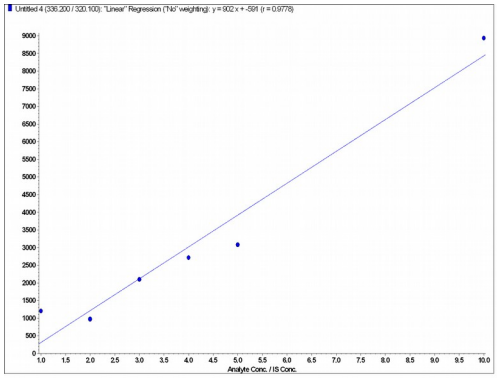


图 黄连碱工作曲线

图 小檗碱工作曲线



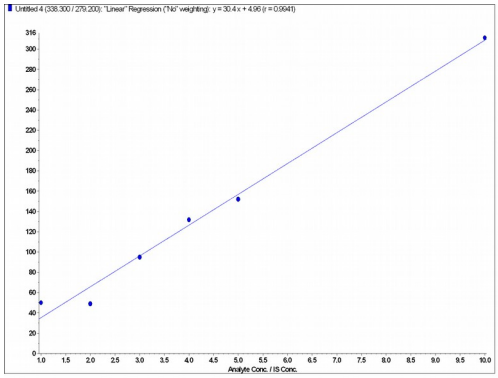
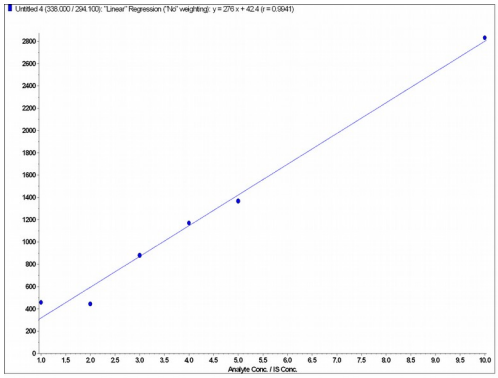


图 表小檗碱工作曲线

图 药根碱工作曲线



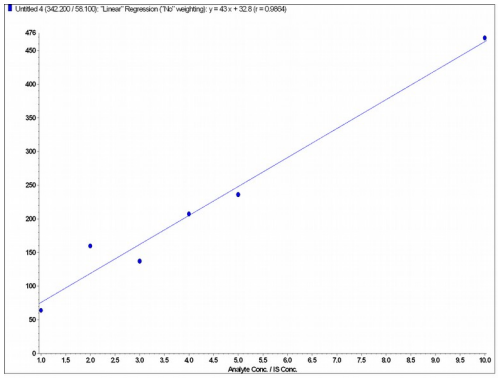


图 非洲防己碱工作曲线

图 木兰花碱工作曲线

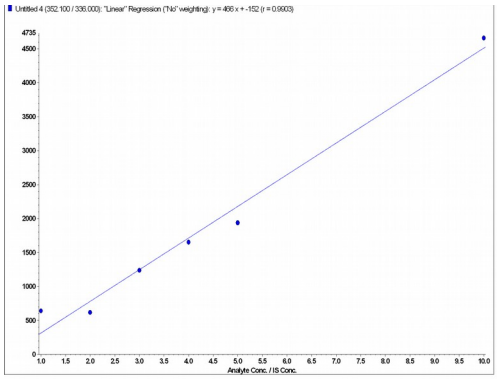


图　巴马汀工作曲线

2.5.3 提取回收率

2.5.4 精密度与准确度

2.5.5 稳定性

2.5.6 反复冻融样品的稳定性

3.黄连生品及酒炒品、酒蒸品在小鼠体内的组织分布情况

3.1 给药途径和方式

给药途径：灌胃

给药方式：多剂量（连续给药 7 天）

给药剂量：以 3.25g 生药量/Kg 的剂量对小鼠灌胃，连续给药 7 天。

3.2 样品采集与处理

空白对照Ⅰ组、生品Ⅰ组、酒炒品Ⅰ组、酒蒸品Ⅰ组分别按照体重灌胃样品液连续灌胃 7 天，于第八天灌胃后 4 h,宰杀小鼠, ,分取心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、大肠、血液。脏器用生理盐水冲洗表面血迹和内容物，滤纸吸干,称重，-20℃冷冻保存，待测。

3.3 黄连生品、酒炙品及酒蒸品在小鼠体内的组织分布情况：按“3.2”项分别进行黄连生品、酒炙品及酒蒸品的组织采集，按“2.3”项的处理方法和“2.1”项的色谱条件进行分析，结果见表

表　黄连生品、酒炒品、酒蒸品中主要生物碱在小鼠体内组织分布（n=10）

种类	组织	小檗碱（μg/g）	巴马汀（μg/g）	表小檗碱（μg/g）	药根碱（μg/g）	木兰花碱（μg/g）	非洲防己碱（μg/g）	黄连碱（μg/g）
生品	心	59.9148	15.1185	3.7796	3.6454	3.3211	3.3442	3.1099
	脑	4.3455	2.4103	1.2053	1.2032	0.8828	1.2031	1.2932
	肝	150.3512	42.5714	10.6429	10.5087	10.1844	10.2075	9.9732
	脾	104.2073	27.2729	6.8182	6.684	6.3597	6.3828	6.1485
	肺	87.3724	25.0084	6.2521	6.1179	5.7936	5.8167	5.5824
	肾	55.2321	15.8619	3.9655	3.8313	3.507	3.5301	3.2958
酒炒品	心	42.3456	9.6044	2.7441	2.6196	2.5307	2.6089	2.6265

	脑	5.6676	2.7928	1.5555	1.6355	1.6305	1.5553	1.6315
	肝	137.3500	32.5725	9.3064	9.1819	9.0930	9.1712	9.1888
	脾	116.4855	26.5246	7.5785	7.454	7.3651	7.4433	7.4609
	肺	283.1152	68.3307	19.5231	19.3986	19.3097	19.3879	19.4055
	肾	167.7040	30.7718	8.7919	8.6674	8.5785	8.6567	8.6743
酒蒸品	心	42.3456	4.6039	1.3154	1.4406	1.2033	1.2833	1.2828
	脑	4.5641	2.5099	1.5743	1.6995	1.4322	1. 2254	1.5417
	肝	123.5641	26.5099	7.5743	7.6995	7.4622	7.5422	7.5417
	脾	96.7957	16.5850	4.7386	4.8638	4.6265	4.7065	4.7060
	肺	222.8048	46.6751	13.3357	13.4609	13.2236	13.3036	13.3031
	肾	126.0957	17.4186	4.9767	5.1019	4.8646	4.9446	4.9441

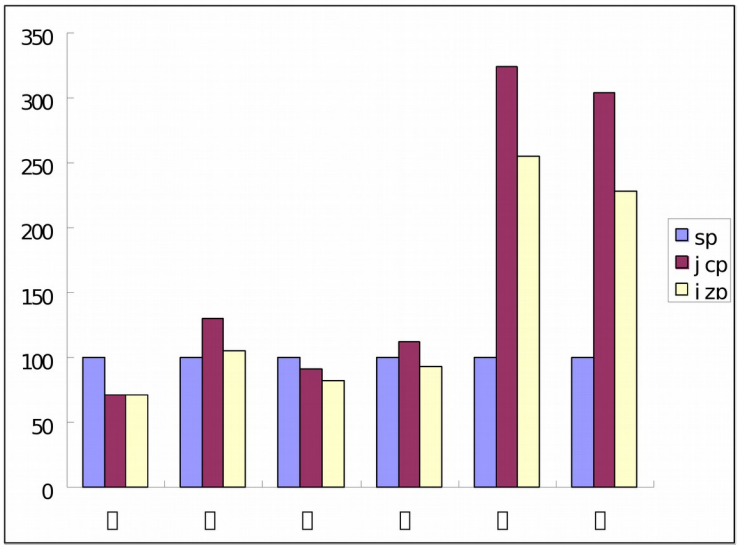


图 小檗碱在小鼠不同组织的分布

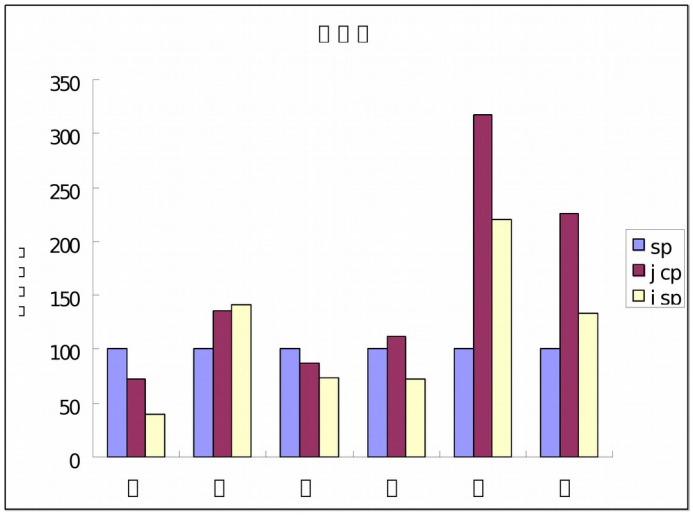


图 药根碱在小鼠体内不同组织的分布

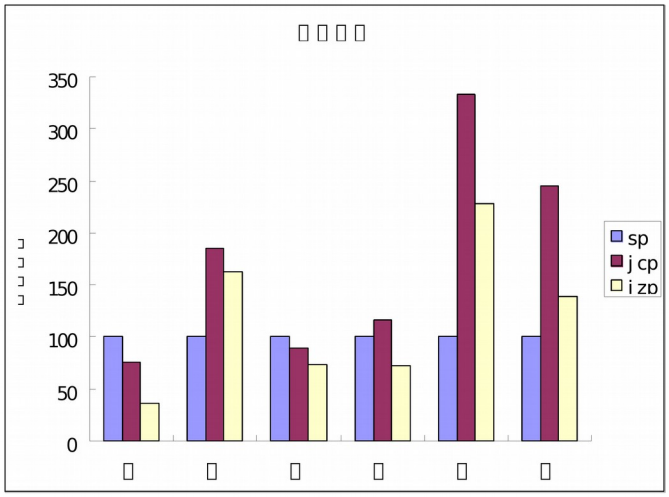


图 木兰花碱在小鼠体内不同组织的分布

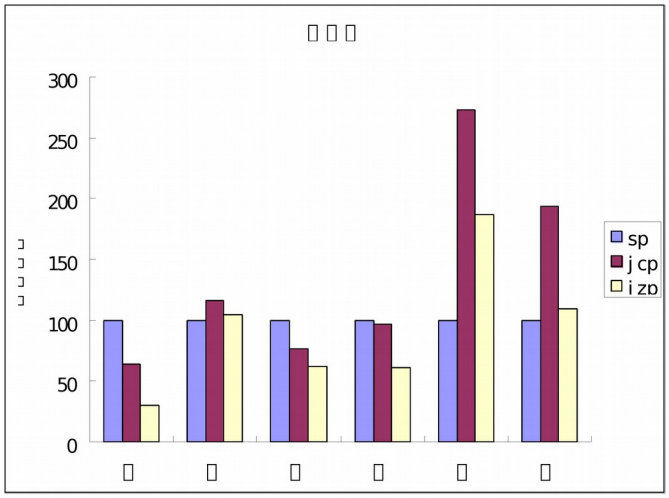


图 巴马汀在小鼠体内不同组织的分布

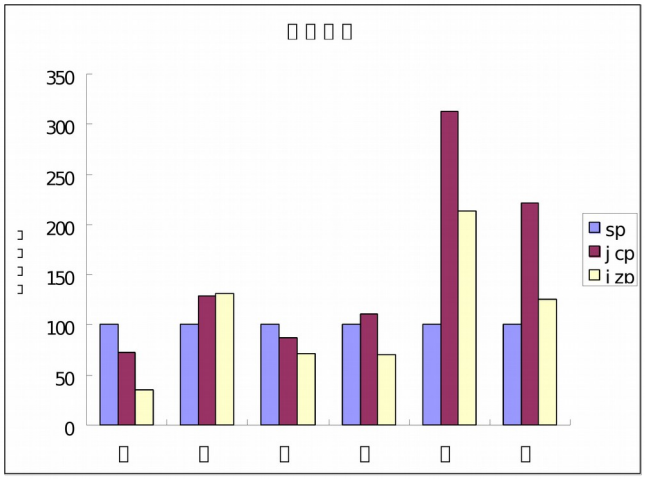


图 表小檗碱在小鼠体内不同组织的分布

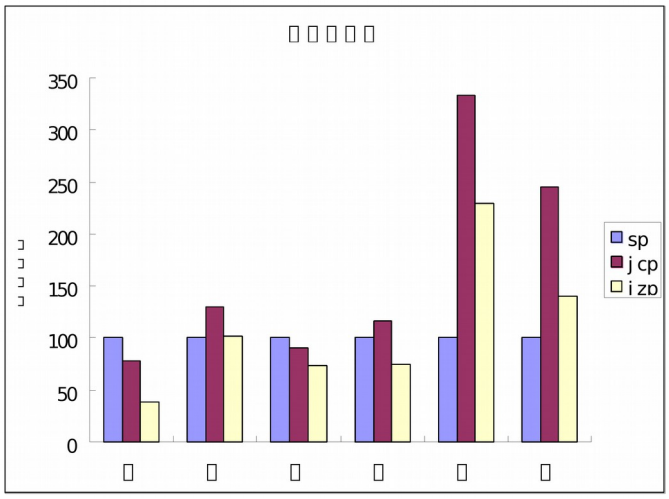


图 非洲防己碱在小鼠体内不同组织的分布

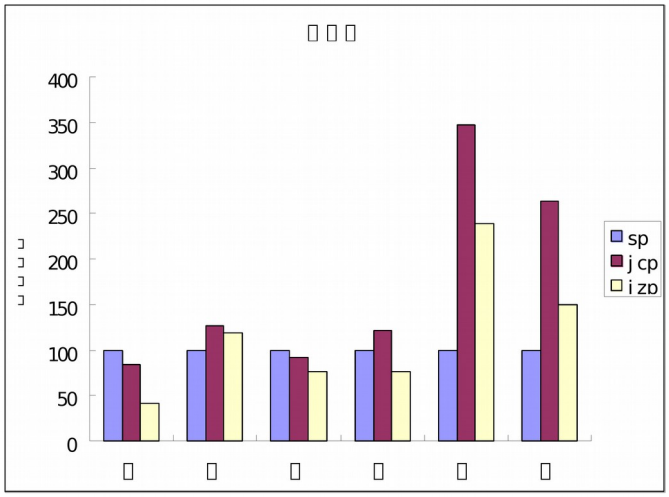


图 黄连碱在小鼠体内不同组织的分布

4.小结

4.1 黄连及其炮制品中主要生物碱的分布具有组织部位特异性