

黄连废弃物中生物碱含量的时空分布研究

许婧榆¹, 张荣庆¹, 李颖¹, 庞婕², 李学刚^{2*} (1. 重庆市巴蜀中学, 重庆 400013; 2. 西南大学药学院, 重庆 400716)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)19-1798-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.19.25

摘要 目的: 研究黄连废弃物(须根和茎叶)中小檗碱、黄连碱、巴马汀和表小檗碱等生物碱含量的时空分布情况。方法: 先采用高效液相色谱(HPLC)法测定黄连废弃物中小檗碱在不同采收时间和不同部位中的质量分数, 再以相对保留时间和峰面积比值计算样品中黄连碱、巴马汀和表小檗碱的质量分数。结果: 黄连须根(全须)中生物碱质量分数变化不大, 总体维持在2.7%左右。黄连茎叶中生物碱质量分数变化较大, 其中黄连茎中生物碱质量分数冬季(0.9%)低于夏季(1.9%), 但也分别高于黄连叶中冬季(0.7%)和夏季(1.0%)的质量分数。黄连近须和近茎(离黄连根≤4 cm)中生物碱质量分数分别是远端的2倍以上。结论: 黄连废弃物具有深入开发应用的价值。

关键词 黄连; 须根; 茎叶; 生物碱含量; 时空分布

Study on Spatial and Temporal Distribution of Alkaloids Contents in *Coptis chinensis* Wastes

XU Jing-yu¹, ZHANG Rong-qing¹, LI Ying¹, PANG Jie², LI Xue-gang² (1. Bashu Secondary School, Chongqing 400013, China; 2. School of Pharmacy, Southwest University, Chongqing 400716, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study spatial and temporal distribution of alkaloids (berberine, coptisine, palmatine and epiberberine) contents in *Coptis chinensis* wastes (fibril, stem and leaf). METHODS: The content of berberine in *C. chinensis* wastes with different harvesting time and different parts were tested by HPLC. The contents of coptisine, palmatine and epiberberine were calculated with relative retention time and peak area ratio. RESULTS: There were no significant changes of alkaloids contents in *C. chinensis* fibrils without in stems and leaves (around 2.7%). Alkaloids content of *C. chinensis* stems and leaves showed great changes, and that of *C. chinensis* stems in winter (0.9%) was lower than in summer (1.9%) but higher than *C. chinensis* leaves in winter (0.7%) and in summer (1.0%), respectively. Alkaloids contents in short-distance parts of *C. chinensis* fibrils and stems (less than 4 centimeters away from root) were two times more than in long-distance parts. CONCLUSIONS: There is a value for the deep development of *C. chinensis* wastes.

KEY WORDS *Coptis chinensis*; Fibril; Stem and leaf; Contents of alkaloids; Spatial and temporal distribution

黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.、三角叶黄连 *C. deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao 或云连 *C. teeta* Wall. 的干燥根茎, 入药最早记载于《神农本草经》。现代药理研究表明, 它具有抗菌^[1]、抗病毒^[2]、解热、降脂^[3]等功效。黄连的入药部位主要为根部(约占黄连全株干物质的60%), 其余的须根和茎叶(约占40%)废弃不用, 十分可惜。肖培根院士也认为“黄连……种植成本比较高, 如果能将黄连的须根和茎叶充分利用, 不仅能有效地利用资源, 也能减少生产成本”^[4]。

黄连采收的季节很长, 从每年9月份持续到第二年1月份。在不同的采收时间里, 黄连须根和茎叶中生物碱等有效成分的含量如何变化、如何分布, 黄连须根和茎叶是否具有深度开发应用的价值, 这些问题已成为研究者热衷的课题。为了促进黄连废弃物资源的利用, 笔者利用高效液相色谱(HPLC)技术系统研究了黄连废弃物(须根和茎叶)中小檗碱、黄连碱、巴马汀和表小檗碱等生物碱的“时空”分布(不同采收时间和不同部位)情况, 为后续黄连须根和茎叶的开发应用提

供参考数据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AD型HPLC仪[岛津仪器(苏州)有限公司]; 超声波提取器(武汉嘉鹏电子有限公司); 鼓风干燥箱(杭州汇尔仪器设备有限公司)。

1.2 试剂

盐酸小檗碱对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 11713-200911); 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

黄连须根和茎叶采集于重庆石柱县黄水镇黄连GAP基地, 经西南大学庞蕾讲师鉴定来源为黄连 *C. chinensis*。

2 方法与结果

2.1 样品的采集与处理

2.1.1 不同时间样品的采集与处理 从2011年10月份至2012年9月份, 每月定期在黄水镇黄连GAP基地采集5年生黄连的须根和茎叶, 每个样品采集100 g, 于70℃烘干粉碎, 过40目筛, 备用。

* 通信作者: 教授, 博士研究生导师, 博士。研究方向: 天然产物化学、药物化学。电话: 023-68250728。E-mail: xuegangli2000@yahoo.com.cn

2.1.2 不同部位样品的采集与处理 分别于2011年10、12月份和2012年2月份,定期在黄水镇黄连 GAP基地采集5年生黄连(见图1)的叶、远茎、近茎、远须、近须(黄连近根和近茎:离黄连主根≤4 cm;黄连远根和远茎:离黄连主根>4 cm),按“2.1.1”项下方法处理后备用。



图1 黄连植株不同部位分布

Fig 1 Distribution of different parts of *C. chinensis*

2.2 HPLC法测定黄连废弃物中生物碱的含量

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Hypersil ODS2(200 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钾(50:50, V/V);流速:1.0 ml/min;柱温:20 ℃;检测波长:345 nm。

2.2.2 对照品溶液的制备 取盐酸小檗碱对照品适量,加流动相溶解并稀释制成质量浓度为60.00 μg/ml的对照品溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 分别取黄连须根和茎叶各适量,粉碎,过40目筛,分别精密称取0.2 g,置具塞锥形瓶中,加入甲醇-盐酸(100:1, V/V)溶液50 ml,密塞,超声处理(功率:250 W,频率:40 kHz)30 min,滤过,精密量取续滤液2 ml,置10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,即得各部位供试品溶液[相当于800 μg(生药)/ml]。

2.2.4 盐酸小檗碱标准曲线的制备 取盐酸小檗碱对照品适量,加甲醇溶解并稀释制成质量浓度分别为250.00、125.00、62.50、31.25、15.62、7.81 μg/ml的对照品溶液。精密吸取各对照品溶液10 μl注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,记录峰面积。以峰面积积分值(y)对对照品质量浓度(x)绘制标准曲线,得回归方程为 $y=51\ 656x+81\ 745$ ($r=0.998\ 7, n=6$)。结果表明,盐酸小檗碱的质量浓度在7.81~250.00 μg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系。盐酸小檗碱对照品的HPLC图见图2。

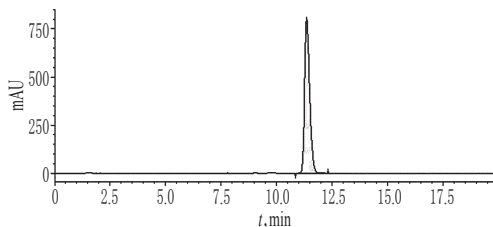


图2 盐酸小檗碱对照品的HPLC图

Fig 2 HPLC chromatograms of berberine hydrochloride control

2.2.5 精密度试验 取“2.2.4”项下62.50 μg/ml的盐酸小檗碱对照品溶液适量,连续进样5次,按上述色谱条件测定,记录峰

面积。结果, $RSD=0.45\%$ ($n=5$),表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 称取同一批黄连须根粉末适量,共6份,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品中小檗碱的质量分数。结果,小檗碱的平均质量分数为2.753%, $RSD=2.74\%$ ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一黄连须根的供试品溶液适量,分别于0、4、8、12、20、24 h按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果, $RSD=1.19\%$ ($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取已知小檗碱质量分数(2.820%)的黄连须根粉末1 g,共6份,分别精密加入盐酸小檗碱对照品溶液(62.50 μg/ml)1 ml,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,用外标法计算样品含量,并计算加样回收率。结果,盐酸小檗碱的平均加样回收率为99.8%, $RSD=3.6\%$ ($n=6$)。

2.2.9 黄连生物碱含量测定与计算方法 根据2010年版《中国药典》分析检测黄连生物碱的一测多评技术^[9],将小檗碱出峰的保留时间设为“1”,计算出巴马汀、黄连碱、表小檗碱出峰的相对保留时间,结果详见表1。通过表1结果可以确定HPLC图中小檗碱、巴马汀、黄连碱和表小檗碱的出峰位置,进而确认相应的化合物。

表1 表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱的相对保留时间

Tab 1 Relative retention time of epiberberine, coptisine, palmatine and berberine

待测成分	相对保留时间(±5%)
表小檗碱	0.71
黄连碱	0.78
巴马汀	0.91
小檗碱	1.00

再通过下式计算各生物碱的质量分数 $[C_x(\%)]$: $C_x(\%) = (S_i/S_0) \times (60/800) \times 100\%$ 。式中, S_i 为HPLC图中待测生物碱的峰面积; S_0 为盐酸小檗碱对照品的峰面积;60为盐酸小檗碱对照品的质量浓度(μg/ml);800为供试品的质量浓度(μg/ml)。

2.3 黄连废弃物中生物碱的时空分布研究

2.3.1 不同采收时间黄连废弃物中生物碱质量分数的变化 不同采收时间黄连须根和茎叶中生物碱的质量分数及变化情况分别见表2、图3、图4。

从表2、图3中可以看到,不同采收时间黄连须根中总生物碱的质量分数变化不大,总体维持在2.7%左右。从表2、图4可以看到,黄连茎叶中生物碱质量分数变化很大,冬季仅为0.9%,夏季高达1.9%;从3月份开始,黄连茎叶中的生物碱质量分数开始上升,至7月份达到最高水平;9月份开始下降,尤以12月份的质量分数最低,仅为最高值的50%左右。

2.3.2 黄连废弃物不同部位中生物碱的质量分数 按“2.1.2”项下方法分3次采集黄连的须根和茎叶。不同采收时间黄连废弃物不同部位中生物碱的质量分数及变化情况见表3、图5;黄连废弃物不同部位中各生物碱的HPLC图见图6。

从表3、图5中可以看到,3个采收时间段采集的黄连废弃物各对应部位中生物碱质量分数相差不大,但黄连近须、近茎中生物碱的质量分数高于对应的远须、远茎中质量分数,为其2倍以上。

表2 不同采收时间黄连须根和茎叶中生物碱的质量分数(%)

Tab 2 Mass fractions of alkaloids in *C. chinensis* fibril, stem and leaf with different harvesting time(%)

月份	部位	表小檗碱	黄连碱	巴马汀	小檗碱	总碱
1	须根	0.313	1.102	0.128	1.211	2.753
	茎叶	0.022	0.078	0.037	0.901	0.948
2	须根	0.253	0.901	0.118	1.221	2.493
	茎叶	0.032	0.130	0.043	1.021	1.226
3	须根	0.310	1.002	0.127	1.111	2.550
	茎叶	0.035	0.201	0.053	1.304	1.593
4	须根	0.310	1.092	0.123	1.211	2.736
	茎叶	0.034	0.251	0.067	1.434	1.786
5	须根	0.311	1.099	0.129	1.311	2.850
	茎叶	0.039	0.251	0.068	1.514	1.872
6	须根	0.323	1.012	0.131	1.411	2.877
	茎叶	0.041	0.249	0.065	1.534	1.889
7	须根	0.331	1.002	0.135	1.421	2.889
	茎叶	0.045	0.255	0.069	1.558	1.927
8	须根	0.324	1.041	0.131	1.422	2.918
	茎叶	0.041	0.254	0.070	1.501	1.866
9	须根	0.323	1.011	0.129	1.431	2.894
	茎叶	0.037	0.151	0.051	1.245	1.484
10	须根	0.311	1.109	0.125	1.321	2.866
	茎叶	0.031	0.115	0.041	1.034	1.221
11	须根	0.312	1.111	0.127	1.311	2.861
	茎叶	0.023	0.098	0.037	0.911	1.069
12	须根	0.313	1.102	0.128	1.211	2.753
	茎叶	0.021	0.076	0.035	0.821	0.953

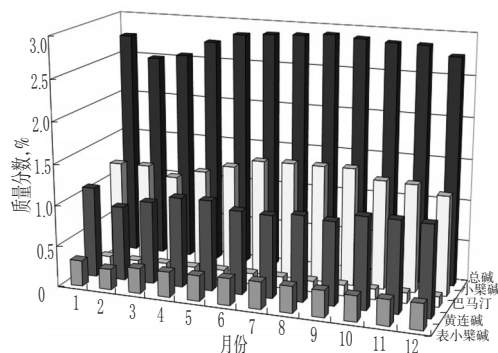


图3 黄连须根中生物碱质量分数随时间的变化

Fig 3 Changes of mass fractions of alkaloids in *C. chinensis* fibril with time

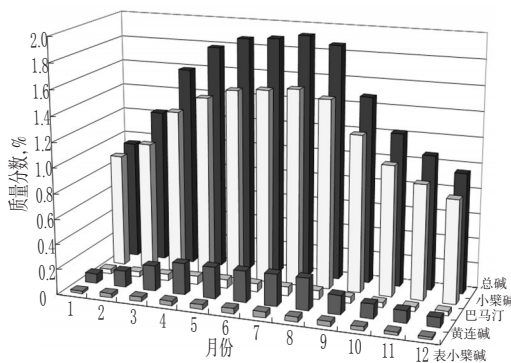


图4 黄连茎叶中生物碱质量分数随时间的变化

Fig 4 Changes of mass fractions of alkaloids in *C. chinensis* stems and leaf with time

表3 不同采收时间黄连废弃物不同部位中生物碱的质量分数(%)

Tab 3 Mass fractions of alkaloids in different parts of *C. chinensis* waste with different harvesting time(%)

月份	部位	表小檗碱	黄连碱	巴马汀	小檗碱	总碱
10	近须	0.573	1.375	0.134	1.482	3.564
	远须	0.301	0.803	0.098	1.021	2.223
	近茎	0.224	0.634	0.239	1.524	2.621
	远茎	0.103	0.336	0.165	0.978	1.582
	叶	0.003	0.057	0.068	0.926	1.054
12	近须	0.569	1.386	0.145	1.493	3.593
	远须	0.289	0.705	0.094	1.003	2.091
	近茎	0.231	0.639	0.246	1.656	2.772
	远茎	0.098	0.296	0.134	0.858	1.386
	叶	0.002	0.043	0.052	0.721	0.818
2	近须	0.572	1.421	0.154	1.791	3.938
	远须	0.271	0.689	0.084	0.912	1.956
	近茎	0.244	0.678	0.251	1.734	2.907
	远茎	0.091	0.263	0.114	0.801	1.269
	叶	0.002	0.033	0.042	0.667	0.744

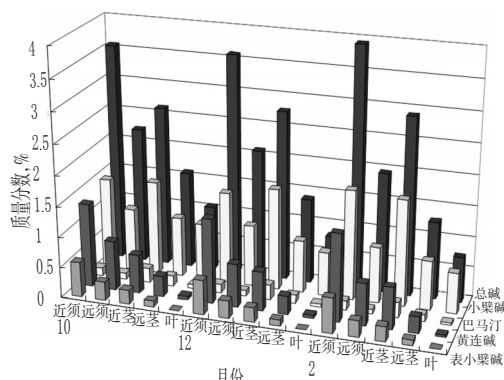


图5 各生物碱在不同采收时间、不同部位黄连废弃物中的质量分数

Fig 5 The contents of alkaloids in different parts of *C. chinensis* waste with different harvesting time

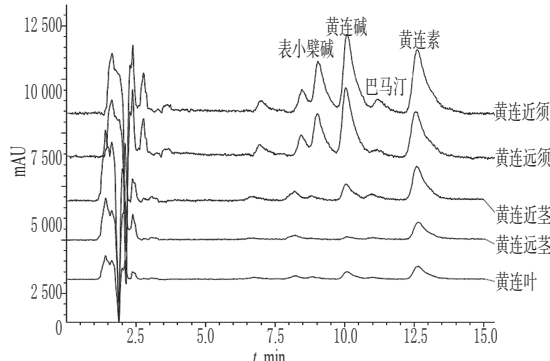


图6 黄连废弃物不同部位中各生物碱的HPLC图

Fig 6 HPLC chromatograms of alkaloids in different parts of *C. chinensis* waste

3 讨论

笔者通过研究黄连废弃物(须根和茎叶)中生物碱在不同采收时间、不同部位的质量分数变化发现:黄连须根(全须)中生物碱质量分数变化不大,总体维持在2.7%左右。黄连近须中生物碱质量分数为3.5%~4.0%,远须中生物碱质量分数为2.0%~2.2%。随着气温的下降,黄连近须中生物碱质量分数

大黄、丹参对重症急性胰腺炎患者的临床疗效观察

牛 威*, 郭莲怡#(辽宁医学院附属第一医院消化科, 辽宁 锦州 121001)

中图分类号 R657.5;R97 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)19-1801-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.19.26

摘要 目的:观察大黄、丹参对重症急性胰腺炎(SAP)患者的临床疗效。方法:将46例SAP患者随机分为对照组和治疗组,对照组仅采用常规治疗;治疗组在常规治疗基础上加用大黄水提取物与丹参注射液。检测治疗前与治疗后8d两组患者血清肿瘤坏死因子(TNF)- α 、血管内皮生长因子(VEGF)水平,并评价两组患者临床疗效;观察血淀粉酶水平、白细胞水平恢复正常时间;腹痛缓解时间与平均住院时间。结果:与对照组比较,治疗后治疗组患者血清中TNF- α 、VEGF含量显著下降($P<0.05$),临床总有效率显著升高($P<0.05$),血淀粉酶水平、白细胞水平恢复正常时间、腹痛缓解时间与平均住院时间显著缩短($P<0.05$)。结论:大黄、丹参能抑制TNF- α 分泌,下调VEGF水平,对SAP具有良好的治疗作用。

关键词 重症急性胰腺炎;肿瘤坏死因子 α ;血管内皮细胞生长因子;大黄;丹参注射液

Therapeutic Efficacy of *Rheum palmatum* and *Salvia miltiorrhiza* on Patients with Severe Acute Pancreatitis

NIU Wei, GUO Lian-yi (Dept. of Gastrointestinal Disease, The First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Liaoning Jinzhou 121001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To observe the therapeutic efficacy of *Rheum palmatum* and *Salvia miltiorrhiza* on patients with severe acute pancreatitis (SAP). METHODS: 46 patients with SAP were randomly divided into treatment group and control group. Control group only received conventional therapy of western medicine, and treatment group was additionally given *R. palmatum* and Danshen injection on the basis of conventional treatment. Serum levels of TNF- α and VEGF were determined before treatment and after 8 d treatment, and therapeutic efficacies were evaluated in 2 groups; recovery time of serum amylase and white blood cell were observed; pain relief time and the average length of stay were also recorded. RESULTS: Compared with control group, serum content of TNF- α and VEGF in blood serum were decreased significantly ($P<0.05$), while overall response rate was increased significantly; recovery time of serum amylase and white blood cell pain relief time and the average length of stay time were significantly shortened ($P<0.05$). CONCLUSIONS: *R. palmatum* and *S. miltiorrhiza* can inhibit TNF- α secretion, reduce VEGF levels, and has a good therapeutic effect on SAP.

KEY WORDS Severe acute pancreatitis; TNF- α ; VEGF; *Rheum palmatum*; Danshen injection

重症急性胰腺炎(SAP)的特点为起病急,病情危重,进展快,并发症多,死亡率高。其发病机制目前比较趋于一致的认

识是胰腺管道系统暂时或永久性阻塞,导致胰腺分泌物突然释放于胰腺间质组织而引发自溶^[1];胰腺自身消化,以致大量

略有上升,远须中生物碱质量分数明显下降。而黄连茎叶中生物碱质量分数变化较大,冬季最低,仅0.9%,夏季最高,达1.9%。每年春天(3月份),黄连茎叶中的生物碱质量分数开始上升;到夏天(7月份)达到最高水平;秋季(9月份)开始下降;冬季(12月份)较低,为最高值的一半左右。可见,随着气温的下降,黄连近须、近茎中生物碱质量分数在上升,黄连叶和远须、远茎中生物碱质量分数在下降,这可能是由于气温下降促使了黄连须根和茎叶中生物碱向黄连主根中转移所造成的。

由于黄连废弃物须根和茎叶中含有生物碱等有效成分,与黄连主根活性成分一致,因此对于黄连废弃物的后续开发不仅可行,而且具有重要的社会、经济效益。

* 主治医师。研究方向:消化内科疾病。电话:0416-4197472。E-mail:niu475498652@163.com

通信作者:副主任医师,博士。研究方向:肝病临床。电话:0416-4197472。E-mail:angel_gly@163.com

参考文献

- [1] Yang Yong, Ye Xiaoli, Li Xuegang, et al. Synthesis and antimicrobial activity of 8-alkylberberine derivatives with a long aliphatic chain [J]. *Planta Med*, 2007, 73(6):602.
- [2] 杨勇,张保顺,曹春芽,等.小檗碱的心血管药理活性[J]. *中成药*, 2011, 33(5):867.
- [3] Ye Xiaoli, He Kai, Zhu Xiaokang, et al. Synthesis and anti-hyperlipidemic efficiency of berberine-based HMG-Co-A reductase inhibitor[J]. *Med Chem Res*, 2012, 21(7):1353.
- [4] 肖培根,赵润怀,龙兴超,等.中药资源可持续发展产销情况的宏观分析[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(17):2135.
- [5] 国家药典委员会. *中华人民共和国药典:一部*[S]. 2010年版.北京:中国医药科技出版社, 2010:285.

(收稿日期:2013-01-23 修回日期:2013-04-25)