

黄连不同提取部位对大鼠心脏损伤机制的初步研究

梅小利, 吴思澜, 郭延奎, 杨雪, 莫宗成, 黄鹤, 黄崇刚*

重庆市中药研究院 重庆市药物安全评价中心, 重庆 400065

摘要:为考察黄连不同提取部位对大鼠心毒性的影响,取SD大鼠分组,分别ig给予纯化水、黄连乙酸乙酯提取部位、二氯甲烷提取部位、石油醚提取部位、水部位25 g生药/kg,连续30天;30天后进行生化指标测定和心脏重量检查,计算脏器脏体系数,测定血清CK、LDH水平。运用UPLC-Q-TOF-MS联用技术,初步分析黄连各提取部位的成分差异。结果表明,与溶媒对照组比较,乙酸乙酯提取物组大鼠血清LDH显著升高,心脏重量及脏体系数明显增加。提取物中共检测出生物碱类及黄酮类化合物34个,各提取部位共有的化合物21个,石油醚部位独有化合物1个,二氯甲烷部位独有化合物2个,乙酸乙酯部位独有化合物1个,水部位独有化合物2个。提示乙酸乙酯提取物对大鼠心脏毒性作用较为显著,2',4,4'-三羟基-6'-甲氧基二氢查尔酮(2',4,4'-trihydroxy-6'-methoxydihydrochalcone)成分可能是其心脏毒性活性成分。而二氯甲烷提取物、石油醚提取物、水提物作用较弱。

关键词:黄连;提取部位;心脏损伤

中图分类号:R992

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)Suppl-0093-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.S.014

Study on the mechanism of different extracts of Rhizoma Coptidis on heart injury in rats

MEI Xiao-li, WU Si-lan, GUO Yan-lei, YANG Xue, MO Zong-cheng, HUANG He, HUANG Chong-gang*

Chongqing Drug Safety Evaluation Center, Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

Abstract:To investigate the effects of different extracts of Rhizoma Coptidis on cardiotoxicity in rats. SD rats were divided into five groups and ig treated with purified water, ethyl acetate extract, dichloromethane extract, petroleum ether extract and water extract, respectively, 25 g crude drug/kg for 30 days. After 30 days, biochemical indexes and heart weight were measured, organ coefficient was calculated, and CK and LDH levels in serum were measured. UPLC-Q-TOF-MS was used to analyze the difference of components in different extracts from Rhizoma Coptidis. Compared with the control group, the LDH level in rat serum treated with the ethyl acetate extract was significantly increased ($P < 0.05$), and the heart weight and organ coefficient were both significantly increased. A total of 34 kinds of alkaloids and flavonoids were detected in extracts by UPLC-Q-TOF-MS, of which 21 compounds were common in each extract fraction, one compound was unique in petroleum ether extract fraction, two compounds uniquely existed in dichloromethane extract fraction, one compound was unique in ethyl acetate extract fraction and two compounds were unique in water extract fraction. It is suggested that ethyl acetate extract had a significant cardiotoxic effect on rats, and 2',4,4'-trihydroxy-6'-methoxydihydrochalcone may be its cardiotoxic active component. However, dichloromethane extract, petroleum ether extract and water extract had weak cardiotoxicity.

Key words: Rhizoma Coptidis; extract fraction; heart injury

黄连是重庆出产的国家地理标志产品(原产地域产品),收载于历版中国药典,在我国资源丰富,应用广泛,为历代治疗清热解毒的要药。虽然黄连具有多种药理活性,但其安全问题不容忽视^[1]。现

代研究证明黄连已引起了锥体外系反应,呼吸衰竭,肝功能损害,严重心律失常,甚至导致死亡^[1,2]。现代研究已证实黄连具有潜在急性毒性,其急性毒性物质基础主要为黄连各生物碱尤其是小檗碱^[3,4],其毒性机制与乙酰胆碱酯酶抑制有关^[5]。但现有研究对黄连肝毒性方面研究较多,对心脏毒性研究较少^[6-8]。故本实验以正常大鼠为研究对象,考察黄

收稿日期:2021-07-01

接受日期:2021-10-15

基金项目:重庆市中药研究院院级项目(jbky20200021)

* 通信作者 Tel:86-23-89029152; E-mail:hcg2091@163.com

连不同提取部位对心脏的影响,并通过 UPLC-QT-OF-MS 分析手段比较不同提取部位的成分差异,为探究黄连质量控制及其潜在的心毒性基础研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物

SD 大鼠,SPF 级,雌雄各半,130~180 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,动物许可证号 SCXK(京)2019-0008。动物实验在重庆市中药研究院重庆市药物安全评价中心动物房进行,所有动物使用均按照动物指南进行,并经重庆市中药研究院动物伦理委员会批准。

1.2 药材

黄连药材购自重庆市石柱县,经我院王昌华研究员鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎。

1.3 仪器及试剂

H3-18K 台式高速离心机(湖南可成仪器设备有限公司);Allegra X-12 离心机(美国贝克曼库尔特有限公司);AU480 全自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特有限公司);Triple TOF 4600 高分辨质谱仪(美国 AB SCIEX 公司);Milli-Q Integral5 超纯水机(美国 MILLIPOER 公司);戊巴比妥钠(Sigma);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,成都市科隆化学制品有限公司);氯化钠(NaCl,上海源叶生物科技有限公司);石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、乙醇、甲醇(重庆川东化工集团有限公司);肌酸磷酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(贝克曼库尔特商贸有限公司);乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司);超纯水自制。

1.4 黄连药材不同提取部位的制备

黄连药材 3.06 kg 打成粗粉,用 70% 乙醇回流提取 3 h,重复 3 次;过滤,得到的滤液为醇提部位,醇提部位回收乙醇,回收乙醇后的水液按照(水液:石油醚=1:1)的比例用石油醚重复萃取三次,分别得到石油醚层和水层,回收石油醚层,水浴蒸干得石油醚提取部位(56.18 g);水层继续用二氯甲烷试剂按照(水层:二氯甲烷=1:1)比例重复萃取三次,分别得到二氯甲烷层和水层,回收二氯甲烷层,水浴蒸干得二氯甲烷部位(19.52 g);水层继续用乙酸乙酯试剂按照(水层:乙酸乙酯=1:1)比例重复萃取三次,得到乙酸乙酯层和水层,回收乙酸乙酯层,水浴蒸干得乙酸乙酯部位(9.72 g);余下的水层蒸干为水部位。

1.5 定性分析用供试品溶液的制备

精密称定石油醚部位样品 0.216 6 g 置于 5 mL 试管中,加入 1 mL 甲醇,1 mL 乙腈;精密称定二氯甲烷部位 0.502 5 g 置于 5 mL 试管中,加入 1 mL 甲醇,1 mL 乙腈;精密称定乙酸乙酯部位 0.173 6 g 置于 5 mL 试管中,加入 1 mL 甲醇;水部位直接取 1 mL 溶液置于试管中。上述配置样品于超声波清洗机(300 W,40 kHz)中超声处理 30 min,取出,吸取 1 mL 置于离心管中,置于高速离心机(9 000 r/min,10 min),取上清液置于留样瓶中备用。

1.6 分组与给药

将适应 5 天后的 SD 大鼠按体重随机分为 5 组,每组 10 只,分别为溶媒对照组、黄连乙酸乙酯部位组、黄连二氯甲烷部位组、黄连石油醚部位组、黄连水部位组。溶媒对照组 *ig* 给予 0.5% CMC-Na,其余各组均 *ig* 给予相应药液,黄连各提取部位剂量均为 25 g 生药/kg,给药体积 10 mL/kg,每日 1 次,连续 30 天。

1.7 指标检测

1.7.1 体重及心脏重量测定

各组大鼠于末次给药后 24 h,测定大鼠体重;用 0.9% 戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉采血待用;采血完毕后剖取大鼠心脏,并称取心脏重量,计算脏体比。

$$\text{心脏脏体比} = \text{心脏重量} / \text{体重} \times 100\%$$

1.7.2 血清 CK、LDH 检测

将“1.7.1”项所采血静置 30 min 以上,待血液凝集后,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,按试剂盒操作测定 CK、LDH 水平。

1.8 不同提取部位的定性分析

1.8.1 色谱条件

样品分析使用 AB SCIEX 4600 质谱系统。Agilent XDB C₁₈(100 mm × 2.1 mm, 2.1 μm) 色谱柱;柱温 30 °C;流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B),起始比例 90:10;洗脱过程:1~9 min, B 相变为 85%;8~11 min, B 相为 85%;11.5 min, B 相变为 10%,15 min 结束;体积流量 0.3 mL/min;进样量 3 μL。

1.8.2 质谱条件

采用 ESI-Positive 模式对黄连样品进行检测;气帘气为 25 Psi,雾化温度 600 °C,TOF-MS-Product Ion-IDA 扫描模式,TOF/MS 一级预扫描和触发的二级扫描 Product Ion-IDA 离子累积时间分别为 250、100 ms,质量扫描范围 *m/z* 100~1 000;鞘气为 55

Psi, 辅助气为 55 Psi; 采用多重质量亏损 (MMDF) 和动态背景扣除 (DBS) 作为二级触发条件, 解簇电压 80 V, CE 碰撞能量为 40 eV, CES 碰撞能量叠加为 (40 ± 15) eV。

1.8.3 定性分析

采用上述质谱条件, 分别获得四个提取部位在 ESI-Positive 模式全扫描总离子流数据, 分别将此数据导入 PeakView 软件, 获得误差小目标化合物, 进而结合相关数据库及二级碎片裂解规律, 对黄连药材的 4 个不同提取部位的化合物进行鉴别。

表 1 黄连不同提取部位对大鼠体重、心脏重量及脏体系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of different extract parts of Rhizoma Coptidis on body weight, heart weight and visceral body coefficient of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose (g 生药/kg)	体重 Body weight (g)	心脏重量 Heart weight (g)	心脏脏体比 Heart weight/ body weight (%)
溶媒对照 Control	-	266 ± 58	0.881 ± 0.202	0.330 ± 0.011
乙酸乙酯部位 Ethyl acetate fraction	25	265 ± 48	0.975 ± 0.232	0.365 ± 0.026 **
二氯甲烷部位 Dichloromethane fraction	25	257 ± 42	0.851 ± 0.156	0.330 ± 0.018
石油醚部位 Petroleum ether fraction	25	254 ± 49	0.875 ± 0.137	0.348 ± 0.033
水部位 Water fraction	25	222 ± 28	0.805 ± 0.119	0.362 ± 0.027 **

注: 与溶媒对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, ** $P < 0.01$.

2.2 对 CK、LDH 含量的影响

与溶媒对照组相比, 黄连乙酸乙酯提取部位组

大鼠血清 LDH 水平显著升高。结果见表 2。

表 2 黄连不同提取部位对大鼠血清 CK、LDH 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of different extract parts of Rhizoma Coptidis on serum CK and LDH content in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose (g 生药/kg)	LDH (IU/L)	CK (IU/L)
溶媒对照 Control	-	1 286 ± 571	557 ± 213
乙酸乙酯部位 Ethyl acetate fraction	25	1 727 ± 317 *	714 ± 112
二氯甲烷部位 Dichloromethane fraction	25	1 644 ± 402	663 ± 158
石油醚部位 Petroleum ether fraction	25	1 593 ± 292	662 ± 122
水部位 Water fraction	25	1 307 ± 643	603 ± 268

注: 与溶媒对照组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control, * $P < 0.05$.

2.3 黄连不同提取部位的化学成分定性分析

从黄连药材的 4 个不同提取部位中共鉴别出 34 个生物碱类及黄酮类化合物; 其中石油醚萃取部位共鉴别出 27 个化合物; 二氯甲烷萃取部位鉴别出 28 个化合物; 乙酸乙酯部位共鉴别出 27 个化合物; 水部位共鉴别出 25 个化合物。其中 4 个不同提取部位共有的化合物为 21 个, 石油醚、二氯甲烷、乙酸

1.9 统计学方法

各组检测数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析。

2 实验结果

2.1 对体重、心脏重量及脏体系数的影响

与溶媒对照组相比, 给药后黄连乙酸乙酯部位组、黄连水部位组大鼠心脏脏体比均明显增加。结果见表 1。

乙酯部位共有的化合物 2 个, 二氯甲烷、乙酸乙酯、水部位共有的化合物 1 个, 石油醚、二氯甲烷部位共有的化合物 2 个, 石油醚、乙酸乙酯部位共有的化合物 1 个, 乙酸乙酯、水部位共有的化合物 1 个, 石油醚部位独有化合物 1 个, 二氯甲烷部位独有化合物 2 个, 乙酸乙酯部位独有化合物 1 个 (见图 1), 水部位独有化合物 2 个。结果见表 3。

表3 二级质谱数据分析

Table 3 Analysis of secondary mass spectrometry data

类别 Category	序号 Serial number	鉴定结果 Identification result	分子式 Molecular formula	二级碎片离子 Secondary fragmentation	提取部位 Extraction fraction
生物碱类 Alkaloids	1	小檗碱 Berberine	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	337.162 0, 321.093 8, 307.078 5	A, B, C, D
	2	羟基小檗碱 Berberastine	C ₂₀ H ₁₈ NO ₅	338.095 7, 323.072 3, 295.078 1	A, B, C, D
	3	表小檗碱 Eepiberberine	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	337.122 5, 321.093 9, 307.078 7	A, B, C, D
	4	药根碱 Jatrorrhizine	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄		A, B, C, D
	5	巴马汀 Palmatine	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄	353.156 1, 337.125 5, 323.109 8	A, B, C, D
	6	非洲防己碱 Columbamine	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄		A, B, C, D
	7	小檗红碱 Berberrubine	C ₁₉ H ₁₅ NO ₄		A, B, C, D
	8	黄连碱 Coptisine	C ₁₉ H ₁₄ NO ₄	321.094 1, 293.099 2, 263.089 2	A, B, C, D
	9	岩黄连脱氢卡维丁 Tetradehydroscoulerine	C ₁₉ H ₁₆ NO ₄		A, B, C, D
	10	格兰地新 Groenlandicine	C ₁₉ H ₁₆ NO ₄		A, B, C, D
	11	8-氧化小檗碱 8-Oxyberberine	C ₂₀ H ₁₇ NO ₅	352.117 1, 337.093 6, 322.066 9	A, B, C, D
	12	(-+)-5-羟基-8-氧化小檗碱 (-+)-5-Hydroxyl-8-oxyberberine	C ₂₀ H ₁₇ NO ₆	338.064 4, 335.077 2, 320.054 0	A, B, C, D
	13	8-氧化黄连碱 8-Oxyepiberberine	C ₁₉ H ₁₃ NO ₅	336.088 8, 321.097 3, 308.089 9	A, B, C, D
	14	8-氧化表小檗碱 8-Oxyepiberberine	C ₂₀ H ₁₇ NO ₅	352.117 1, 337.093 6, 322.066 9	A, B, C, D
	15	3-羟基-2-甲氧基-9,10-亚甲二氧基-8-氧化原小檗碱	C ₂₀ H ₁₇ NO ₅	352.117 1, 337.093 6, 322.066 9	A, B, C, D
	16	8-氧化小檗红碱 8-Oxyberberrubine	C ₁₉ H ₁₆ NO ₄		A, B, C, D
	17	四氢小檗碱 Tetrahydroberberine	C ₂₀ H ₂₁ NO ₄	340.152 4, 324.121 7, 309.098 8	A, B, C, D
	18	6-乙酰基-5,6-二氢血竭碱 6-Acetonyl-5, 6-dihydrosanguinarine	C ₂₂ H ₁₅ NO ₅	374.101 8, 358.069 5, 330.075 2	A, B, C, D
	19	Z,E-N-阿魏酰酰胺 Z, E-N-feruloyltyramine	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	177.051 1, 145.028 8, 121.065 2	A, B, C, D
	20	6-([1,3]Dioxolo[4,5-g]isoquinoline-5-carbonyl)-2, 3-dimethoxy benzoic acid methyl este	C ₂₁ H ₁₇ NO ₇	396.106 1, 351.072 8, 276.064 7	A, B, C
	21	Berbithine	C ₁₉ H ₁₇ NO ₅	340.117 8, 325.094 1, 310.070 4	B, C, D
	22	去甲马钱子碱 Norsanguinarine	C ₁₉ H ₁₁ NO ₄	318.075 2, 260.069 9, 232.075 4	A, B
	23	1,3-二氧六环[4,5-g]异喹啉-5(6H)-酮 1,3-Dioxolo[4,5-g]isoquinolin-5(6H)-one	C ₉ H ₇ NO ₃	178.077 0, 135.038 9, 118.038 5	C, D
	24	黄皮树碱 Obamegine	C ₃₆ H ₃₈ N ₂ O ₆	595.284 4, 433.232 9, 415.221 5	A
	25	3-羟基-1-(4-羟基苯乙基)吡咯烷-2,5-二酮	C ₁₂ H ₁₃ NO ₄	236.145 3, 236.089 1, 218.080 2	B

续表 3 (Continued Tab. 3)

类别 Category	序号 Serial number	鉴定结果 Identification result	分子式 Molecular formula	二级碎片离子 Secondary fragmentation	提取部位 Extraction fraction
生物碱类 Alkaloids	26	甲基黄连碱 Worenine	$C_{20}H_{16}NO_4$	335.108 1, 319.071 9, 305.061 9	D
	27	氧化血根碱 Oxsanguinarine	$C_{20}H_{13}NO_5$	348.120 9, 304.098 7, 200.032 9	D
黄酮类 Flavonoids	28	3,5,7-三羟基-6,8-二甲基黄酮 3,5,7-Trihydroxy-6,8-dimethyl-flavone	$C_{17}H_{14}O_5$	299.090 0, 284.066 5, 256.071 7	A, B, C, D
	29	6,8-二甲基-3,5,7-三羟基菲酮 6,8-Dimethyl-3,5,7-trihydroxy-favone	$C_{17}H_{14}O_5$	299.090 0, 284.066 5, 256.071 7	A, B, C, D
	30	汉黄芩素 Wogonin	$C_{16}H_{12}O_5$	285.075 2, 167.033 5, 105.033 6	A, B, C
	31	7,4'-二羟基-5-甲氧基黄酮 7,4'-Dihydroxy-5-methoxyflavone	$C_{16}H_{14}O_5$	269.080 3, 213.091 0, 198.066 4	A, B
	32	鼠李素 Rhamnetin	$C_{16}H_{12}O_7$	317.063 9, 299.101 4, 197.069 6	A, C
	33	黄连皂苷 II Coptiside II	$C_{21}H_{20}O_{11}$	449.185 8, 375.151 2, 329.109 6	B
	34	2',4,4'-三羟基-6'-甲氧基二氢查尔酮 2',4,4'-Trihydroxy-6'-methoxydihydrochalcone	$C_{15}H_{12}O_4$	257.093 4, 240.051 0, 133.071 3	C

注:A:石油醚部位;B:二氯甲烷部位;C:乙酸乙酯部位;D:水提部位。

Note:A:Petroleum ether fraction;B:Dichloromethane fraction;C:Ethyl acetate fraction;D:Water fraction.

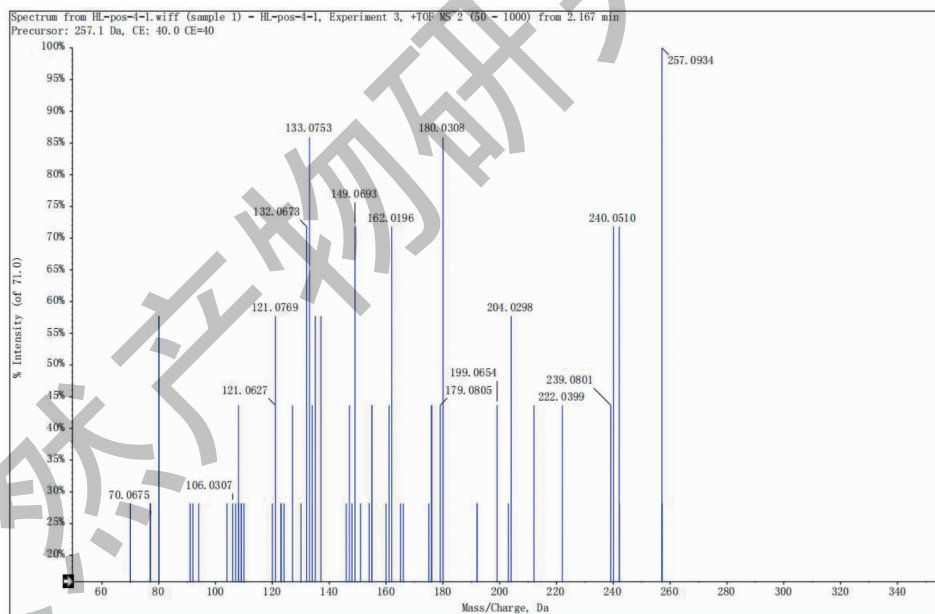


图 1 特异性成分 2',4,4'-三羟基-6'-甲氧基二氢查尔酮质谱图

Fig. 1 The mass spectrum of 2',4,4'-trihydroxy-6'-methoxydihydrochalcone

3 讨论与结论

中药安全性是制约中药现代化和国际化的瓶颈问题。近年来影响中药行业的若干事件(四磨汤、云南白药、正天丸、朱砂、中药注射剂等)基本上都是与中药安全性有关。2020年版《中国药典》一部收录了中药材及饮片 616 种,其中标有毒性的有 83

种,其中大毒 10 种,有毒 42 种,小毒 31 种。这种表述基本沿用了历代本草的记载。值得注意的是,本草古籍中提到的“毒”几乎全部指的是急性毒性,古人对于药物的慢性毒性认识是一个薄弱环节;而现阶段临床治疗慢性疾病的中成药都需要长期服药,这势必对中药的安全性评价提出了更高的要求。因

此,有必要对中药及其成分的急性毒性、慢性毒性有一个更为客观和科学的认识,明确其临床使用的安全窗,为中药的临床用药提供参考。

本实验以渝产道地中药材-黄连为研究对象,通过1个月重复给药试验,观察黄连不同提取部位对大鼠的毒性反应,结果显示给予黄连不同提取部位后,黄连乙酸乙酯部位组、黄连水部位组大鼠心脏脏体比明显增加,其中水部位组大鼠心脏重量与溶媒组大鼠心脏重量未见明显区别,是因为该组大鼠体重减轻,从而导致心脏脏体比与溶媒组有差别,结合该组大鼠心肌酶学指标未见明显变化,考虑为水部位的其他毒性反应引起体重的降低。CK、LDH是反映心脏病变的重要指标,黄连乙酸乙酯部位组大鼠血清LDH水平显著升高,CK有一定的升高趋势,其余提取部位大鼠血清CK、LDH未见明显变化。综合脏器重量及心肌酶学指标分析,乙酸乙酯部位对大鼠心脏毒性作用较为显著,而二氯甲烷部位、石油醚部位、水部位作用较弱。

对黄连各提取部位进行化学成分分析,共鉴别出34个生物碱类及黄酮类化合物,4个不同提取部位共有的化合物为21个,分析发现,2',4,4'-三羟基-6'-甲氧基二氢查尔酮(2',4,4'-trihydroxy-6'-methoxydihydrochalcone)为乙酸乙酯部位的特有成分,结合大鼠毒性反应情况,推测其可能是其心脏毒性活性成分,但需要进一步研究。

参考文献

1 Wang S, Zhao LH, Zhou Y. Clinical application, dose re-

sponse and toxicity of Rhizoma Coptidis in Professor Tong Xiaolin's experience[J]. World Chin Med(世界中医药), 2014,9:1325-1327.

2 Li H, Chai X, Li XF. New applications and the side effects of Rhizoma Coptidis in clinic[J]. Med J Chin PAPF(武警医学), 2008,19:661-663.

3 Ding MH, Nin YM, Wang LY, et al. Preliminary evaluation on the efficacy and safety of total alkaloids of *Coptis chinensis* [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2018,40:1380-1384.

4 Li JR, Gao XS, Liu D. Effects of compatibility on acute toxicity and berberine content of *Coptis chinensis* [J]. Chin J Tradit Chin Med Inform(中国中医药信息杂志), 1999,6(10):32-33.

5 Cai W. Toxicity of *Coptis chinensis* and its influencing factors [J]. Chin J Clin Ration Drug Use(临床合理用药杂志), 2017,10(6B):84-85.

6 Gu MM, He YF, Han CY, et al. Cytotoxicity effects of Rhizoma Coptidis on L929 murine fibroblast cells [J]. J Chin Pharm Sci(中国药学), 2015,24:111-120.

7 Sun NY, Zhang HC, Gu J, et al. Toxicological study on components of *Pueraria lobata* and *Coptis chinensis* [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2017,33(1):95-98.

8 Jia YJ, Li GH, Zhang P. Research on acute toxicity of Coptidis Rhizoma and Huanglian Jiedu Decoction [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2011,46:1399-1404.