

· 化学与分析 ·

不同生长条件下峨眉产黄连个体生物量 及生物碱类成分含量的比较

刘芳¹, 张浩^{2*}, 青琳森³, 武勇⁴

(1. 长治医学院, 山西 长治 046000; 2. 四川大学华西药学院, 成都 610041;

3. 中国科学院成都生物研究所, 成都 610041; 4. 山东宏济堂制药集团有限公司, 济南 250103)

[摘要] 目的:探索峨眉地区黄连在不同生长条件下,个体营养器官生物量及根茎中生物碱类成分含量的变化,确定最佳栽培方式,为黄连药材的规范化种植提供参考。方法:以峨眉黄连《中药材生产质量管理规范》(GAP)基地为观测对象,采集不同海拔高度、遮荫方式及种植密度4年生黄连样品,分析黄连个体营养器官生物量的变化,采用反相高效液相色谱法(PR-HPLC)测定黄连根茎中7种生物碱类成分的含量,流动相乙腈-3.4 g·L⁻¹ KH₂PO₄溶液(H₃PO₄调pH 3.0)(40:60),流速1.2 mL·min⁻¹,检测波长345 nm。结果:在海拔1 200~1 800 m峨眉地区,黄连个体营养器官总生物量无显著差异,7种生物碱类成分含量符合2010年版《中国药典》规定;采用遮阳网方式与传统搭棚遮荫无显著差异,但该技术省工、省材,保护了森林资源;采用株行距10 cm×10 cm正方形栽植较株行距12 cm×12 cm正方形栽植每公顷可增产32%。结论:峨眉地区黄连适宜在海拔1 200~1 800 m,单层网遮荫和株行距10 cm×10 cm的条件下栽培,为黄连药材的GAP规范化种植提供参考。

[关键词] 黄连; 海拔高度; 遮荫方式; 种植密度; 生物量; 生物碱

[中图分类号] R282.4;R284.1;R284.2;R932 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)18-0021-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015180021

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150806.1725.008.html>

[网络出版时间] 2015-08-06 17:25

Comparison on Individual Biomass and Alkaloids Content of Coptidis Rhizoma in Different Growth Condition from Emei County LIU Fang¹, ZHANG Hao^{2*}, QING Lin-sen³, WU Yong⁴ (1. Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China; 2. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China; 4. Shandong Hongjitang Pharmaceutical Co. Ltd., Ji'nan 250103, China)

[Abstract] **Objective:** To study individual biomass of vegetative organs and alkaloids content in rhizome of Coptidis Rhizoma under different growth condition, and provide basic research data of optimal conditions for this herb in Emei county. **Method:** The weighing method and RP-HPLC was applied to determined biomass and compare contents of alkaloids in Coptidis Rhizoma under different altitude, shading way and cultivation density from Emei GAP base. **Result:** At an altitude of 1 200-1 800 m in Emei county, individual biomass of Coptidis Rhizoma had no significant difference, and contents of seven kinds of alkaloids conformed to requirement of the 2010 edition of *Chinese Pharmacopoeia*. Compared with traditional covering means, one and two layer shading net was no significant difference, but the new technology was saving labor and materials, protecting the forest resources. Production increased 32% per hectare with planting spacing of 10 cm×10 cm by comparing with 12 cm×12 cm. **Conclusion:** This study indicates that proper plant method, which is in altitude of 1 200-1 800 m, with monolayer net and planting spacing of 10 cm×10 cm, should be taken to improve quality and output of Coptidis Rhizoma. This method is proved to be practical for quality control of samples from GAP base of Coptidis

[收稿日期] 20150308(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(21202161);中国博士后科学基金项目(2013T60863)

[第一作者] 刘芳,在读博士,讲师,从事药用植物资源的研究与开发,Tel:0355-3151521,E-mail:kidant@163.com

[通讯作者] *张浩,博士生导师,教授,从事药用植物资源的研究与开发,Tel:028-85503037,E-mail:zhanghxx@vip.sina.com

Rhizoma.

[Key words] Coptidis Rhizoma; altitude; shading way; planting density; biomass; alkaloids

黄连为毛茛科黄连属多年生草本植物,是我国人工栽培历史较早的中药材之一。四川是从古至今最著名的黄连产区,被称为“黄连故乡”。峨眉产黄连在历代本草《名医别录》、《新修本草》、《本草纲目》中均有记载^[1]。由于味连产量比雅连高,在国家扶持下,味连已被成功引种,并逐步发展为人工大面积栽培^[2]。在大规模发展黄连种植的同时,必须保证该药材的产量和质量,以实现峨眉地区的黄连《中药材生产质量管理规范》(GAP)种植。本实验以峨眉黄连定点采样为基础,结合黄连生物量及总生物碱含量,考察不同海拔高度、遮荫方式和种植密度对黄连生长的影响,为黄连的规范化种植提供参考。

1 材料

LC-10Atvp 型高效液相色谱仪(日本岛津),BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司),PHS-3C 型 pH 计(上海雷磁)。盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110713-201212, 110732-201108, 110733-201108),黄连碱、表小檗碱、非洲防己碱和 groenlandicine 对照品(自制,经红外、紫外、核磁、质谱鉴定,纯度均 >99%),乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。黄连采自峨眉地区龙池镇 GAP 生产示范基地移栽后 4 年生药材,经四川大学华西药学院生药教研室张浩教授鉴定为黄连 *Coptis chinensis*,见表 1。

表 1 黄连药材样品信息

Table 1 Sample informations of Coptidis Rhizoma

No.	海拔/m	遮荫方式	株行距/cm × cm
1	1 200	单层网	10 × 10
2	1 400	单层网	10 × 10
3	1 600	单层网	10 × 10
4	1 800	单层网	10 × 10
5	1 800	双层网	12 × 12
6	1 800	双层网	10 × 10
7	1 800	搭棚	10 × 10

2 方法与结果

2.1 生物量的测定 选取生长正常、大小基本相近的植株,随机采集 6 株。将取回植株去净泥沙,测量株高、根长;将须根、根茎、叶(包括叶柄)分离,分别

测定鲜重。在常温条件下晾干,烘箱 80 °C 烘至恒重,测定干重。

2.2 色谱条件^[3] Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-3.4 g·L⁻¹ KH₂PO₄ 溶液(H₃PO₄ 调 pH 3.0)(40:60)[内含十二烷基硫酸钠(SDS)1.7 g·L⁻¹],流速 1.2 mL·min⁻¹,检测波长 345 nm,柱温 40 °C,进样量 10 μL。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、黄连碱、表小檗碱、非洲防己碱和 groenlandicine 适量,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇-盐酸(100:1)溶解并稀释至刻度,得质量浓度分别为 1.772,0.193,0.384,0.300,0.300,0.234,0.261 g·L⁻¹的对照品储备液。

2.4 供试品溶液的制备 精密称取黄连根茎干燥细粉约 0.1 g,置具塞锥形瓶中,加甲醇-盐酸(100:1)溶液 50 mL,称定质量,冷浸过夜,超声提取 60 min,补足质量,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.5 方法学考察

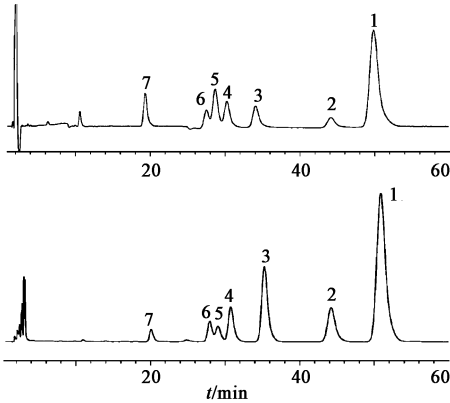
2.5.1 线性关系考察 将 2.3 项下储备液稀释 2, 2.5, 5, 10, 20, 200 倍,制成系列对照品溶液,按 2.2 项下条件测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得 groenlandicine 和非洲防己碱、盐酸药根碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱回归方程依次为 $Y = 3.366 \times 10^6 X + 2.232 \times 10^3 (r = 0.9999)$, $Y = 2.313 \times 10^6 X + 3.022 \times 10^3 (r = 0.9998)$, $Y = 3.250 \times 10^6 X - 2.413 \times 10^4 (r = 0.9998)$, $Y = 3.168 \times 10^6 X - 532 (r = 0.9999)$, $Y = 3.088 \times 10^6 X - 8.381 \times 10^3 (r = 0.9998)$, $Y = 2.632 \times 10^6 X - 2.716 \times 10^4 (r = 0.9996)$, $Y = 3.044 \times 10^6 X - 1.504 \times 10^5 (r = 0.9997)$, 线性范围分别为 0.013 05 ~ 1.305, 0.011 7 ~ 1.170, 0.019 2 ~ 1.920, 0.015 ~ 1.500, 0.015 ~ 1.500, 0.009 65 ~ 0.965, 0.088 6 ~ 8.860 μg。

2.5.2 精密密度、重复性、稳定性试验 参照文献[4]中方法进行检测,结果显示各组分 RSD < 3.0%,表明该方法的精密密度、重复性良好,供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.3 加样回收率试验^[4] 称取已知含量的供试品约 0.05 g,共 9 份,等分为 3 组,分别精密加入高、中、低质量浓度的相应对照品溶液,按 2.4 项下方法制备供

试品溶液,按 2.2 项下条件测定,计算盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、黄连碱、表小檗碱、非洲防己碱和 groenlandicine 平均加样回收率分别为 100.7%, 100.0%, 101.1%, 100.0%, 101.9%, 99.9%, 99.7%, RSD 依次为 2.8%, 1.8%, 1.2%, 2.2%, 2.0%, 1.8%, 0.8%, 结果表明本方法的回收率符合要求。

2.6 样品测定 取各黄连样品适量,按 2.4 项下方法制备供试品溶液,精密量取 5 μ L 按 2.2 项下条件测定,计算各成分含量,色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 盐酸小檗碱; 2. 盐酸巴马汀; 3. 黄连碱; 4. 表小檗碱; 5. 盐酸药根碱; 6. 非洲防己碱; 7. groenlandicine

图 1 黄连药材 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Coptidis Rhizoma

2.6.1 海拔高度对黄连生长的影响 在海拔 1 200 ~ 1 800 m 的实验区样品,黄连根长在海拔 1 200, 1 400, 1 600 m 处均与海拔 1 800 m 处有显著差异,其他各营养器官生物量差别不显著,见表 2。但各营养器官生物量随海拔呈现一定的规律性变化,地上部分叶片及叶柄占整株生物量的比例随海拔升高而降低,地下部分根茎及须根的比例随海拔的升高而升高。在海拔 1 800 m 地上部分叶与叶柄占总生物量的 35.1%,海拔 1 200 m 时这一比例增加至 39.8%,叶及叶柄的平均折干率 41.3%,且总生物碱和盐酸小檗碱的质量分数分别达 2.63%, 1.70%;但叶与叶柄寿命只有 2 ~ 3 年^[5],因此落叶可能伴随有效成分的损失。单株损失盐酸小檗碱 211 mg,总生物碱 326 mg,相当于同株根茎盐酸小檗碱含量的 56% 和总生物碱含量的 49%。因此,黄连的地上部分叶与叶柄的利用应引起重视。各海拔地区黄连根茎中盐酸小檗碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸巴马汀的质量分数均高于 2010 年版《中国药典》规定的 5.5%, 0.8%, 1.6% 和 1.5%^[4],总生物碱质量分数均 > 15%,见表 3。说明在 1 200 ~ 1 800 m 的中海拔山区黄连根茎充实,质量好,说明这一海拔范围的光照、气温、降水等气候因素均利于黄连的生长发育,适宜栽培黄连。

表 2 不同海拔高度对黄连植株生长的影响

Table 2 Effect of different altitude on growth of Coptidis Rhizoma

No.	海拔高度/m	株高/cm	根长/cm	鲜重/g			总生物量/g
				根茎	须根	叶及叶柄	
1	1 200	20.5 \pm 3.5	10.5 \pm 0.7 ¹⁾	15.6 \pm 3.9	12.5 \pm 6.8	18.2 \pm 4.6	46.4 \pm 15.3
2	1 400	20.2 \pm 1.5	10.2 \pm 1.0 ¹⁾	7.9 \pm 2.3	8.7 \pm 4.9	10.2 \pm 2.0	26.8 \pm 9.5
3	1 600	20.3 \pm 2.1	11.3 \pm 0.6 ¹⁾	7.5 \pm 6.3	12.7 \pm 7.7	11.7 \pm 5.9	31.9 \pm 19.5
4	1 800	18.8 \pm 2.3	15.8 \pm 2.0	17.0 \pm 2.6	26.5 \pm 2.2	18.9 \pm 2.5	60.0 \pm 2.7

注:与海拔 1 800 m 样品相比¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 3 不同海拔高度黄连根茎中小檗碱型生物碱类成分的含量

Table 3 Contents of alkaloids in Coptidis Rhizoma from different altitude

No.	海拔高度 /m	groenlandicine	非洲防己碱	盐酸药根碱	表小檗碱	黄连碱	盐酸巴马汀	盐酸小檗碱	总生物碱
		/%	/%	/%	/%	/%	/%	/%	/%
1	1 200	0.26	0.76	0.61	1.10	2.43	2.23	7.83	15.22
2	1 400	0.22	1.01	0.64	1.00	2.56	2.46	8.14	16.03
3	1 600	0.24	0.99	0.69	1.05	2.90	3.47	8.78	18.12
4	1 800	0.26	0.48	0.47	1.04	2.65	1.89	8.65	15.44

2.6.2 遮阴方式对黄连生长的影响 黄连为阴性植物,有怕强光、喜弱光特点,在强光和高温下,植物生长不良,会加速死亡。地方志记载:“黄连产荒山老林,野人匀山地种子,借密枝作矮棚,去地不过三尺,以蔽风日,每年上土薙草亦须伛偻以入……”采用搭棚来遮荫,目前产区仍在沿用。故考察不同遮荫方式与黄连生长情况的相关性,见表 4,5。结果显示双层网、单层网遮荫方式与搭棚遮荫的黄连各营养器官生

物量均无显著性差异,但是通过比较可以看出采用单层网遮荫的黄连株高、根长、根茎干重与折干率均高于双层网遮荫方式。表 5 中单层网遮荫方式的小檗碱含量与总生物碱含量也高于双层网遮荫方式。可见,黄连是荫生植物,但它仍需一定的阳光进行光合作用,所以单层网的荫蔽度比较适合黄连的生长,适合有机营养的合成,有利于植株、根系、折干率的提高,从而有利于次生代谢产物生物碱成分的积累。

表 4 不同遮荫方式对黄连生长的影响

Table 4 Effect of different shading way on growth of *Coptidis Rhizoma*

No.	遮荫方式	株高/cm	根长/cm	平均每株鲜重/g			根茎干重/g	根茎折干率/%
				根茎	须根	叶及叶柄		
4	单层网	18.0 ± 2.3	14.8 ± 2.0	14.6 ± 2.6	26.5 ± 2.2	18.9 ± 2.5	6.0 ± 0.5	41.6 ± 3.8
6	双层网	16.4 ± 0.8	13.3 ± 0.4	25.3 ± 8.5	26.6 ± 13.1	25.0 ± 0.7	5.6 ± 0.9	22.0 ± 1.4
7	搭棚	18.8 ± 3.5	15.8 ± 0.8	17.0 ± 8.2	14.2 ± 12.2	23.8 ± 9.1	6.7 ± 2.6	41.3 ± 7.9

表 5 不同遮荫方式黄连根茎中小檗碱型生物碱类成分含量

Table 5 Contents of alkaloids in *Coptidis Rhizoma* from different shading way

No.	遮荫方式	groenlandicine	非洲防己碱	盐酸药根碱	表小檗	黄连碱	盐酸巴马汀	盐酸小檗碱	总生物碱
4	单层网	0.26	0.48	0.47	1.04	2.65	1.89	8.65	15.44
6	双层网	0.29	0.85	0.53	1.20	2.67	1.75	7.16	14.45
7	搭棚	0.24	0.74	0.44	1.28	2.17	2.22	7.25	14.34

2.6.3 种植密度对黄连生长的影响 黄连植株矮小,宜于适当密植,考察不同种植密度与黄连生长情况的相关性,见表 6,7。结果显示不同种植密度的黄连各营养器官生物量无显著差异,适当密植没有抑制黄连各营养器官的生长,各成分的积累亦无太

大影响。但株行距 10 cm × 10 cm 正方形栽植,每公顷约栽秧苗 100 万株,有时虽然密植的成活率会有所降低,但由于栽的总株数多,所以产量还是比稀植者高。密植的增产比率达 132.0%,而黄连的质量却不因为密植而降低。

表 6 不同栽植密度对黄连生长的影响

Table 6 Effect of different planting spacing on growth of *Coptidis Rhizoma*

No.	株行距 /cm × cm	株高 /cm	根长 /cm	每公顷栽植 秧数/万株	平均每株鲜重/g			根茎干重 /g	每公顷 折产/kg	增产比率 /%
					根茎	须根	叶			
5	12 × 12	12.8 ± 1.8	14.8 ± 3.2	69.4	17.3 ± 3.9	42.7 ± 4.5	25.2 ± 3.9	5.2 ± 0.8	2 985	100
6	10 × 10	16.4 ± 0.8	13.3 ± 0.4	100	25.3 ± 8.5	26.6 ± 13.1	25.0 ± 0.7	5.6 ± 0.9	3 936	132

表 7 不同种植密度黄连根茎中小檗碱型生物碱类成分的含量

Table 7 Contents of alkaloids in *Coptidis Rhizoma* from different planting spacing

No.	株行距 /cm × cm	groenlandicine /%	非洲防己碱 /%	盐酸药根碱 /%	表小檗 /%	黄连碱 /%	盐酸巴马汀 /%	盐酸小檗碱 /%	总生物碱 /%
5	12 × 12	0.31	0.52	0.49	0.68	2.44	1.49	6.97	12.90
6	10 × 10	0.29	0.85	0.53	1.20	2.67	1.75	7.16	14.45

3 讨论

采用遮阳网遮荫的黄连在产量及质量方面不比传统搭棚方法逊色。单采用遮阳网技术省工、省材,优于传统的人工搭棚栽连法。据产区统计,遮阳网技术的推广,每公顷黄连节约用木材 45 m³,每年共计节约 9 000 m³,相当于新造林地 40 公顷,植被保护大为改善,基本控制了水土流失,防风固沙的功效进一步加强,减少水土流失 30%~50%。说明遮阳网技术替代传统人工搭棚方式栽培黄连是可行的^[6]。

研究黄连各营养器官生物量的变化规律和根茎有效成分变化规律的目的是从产量和质量的角度来确定适宜的栽培方式^[7-8]。在海拔 1 200~1 800 m 的峨眉地区适宜黄连生长,采用单层网遮荫方式及株行距 10 cm×10 cm 栽培,黄连的质量、产量和生态环境保护、药农经济效益都收到了良好效果。研究结果对保障黄连药材的产量、质量及大规模种植提供了科学依据,为峨眉地区黄连的规范化种植提供了技术支持。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:285-286.
- [2] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京:化学工业出版社,2002:894.
- [3] 徐锦堂. 徐锦堂教授文集:药用植物栽培与药用真菌培养研究[M]. 北京:地质出版社,2006:4-12.
- [4] 刘芳,张浩,青琳森. 黄连 HPLC 数字化指纹图谱研究及 7 种生物碱含量测定[J]. 中国中药杂志,2013,38(21):3713-3719.
- [5] 庄平,黄明远. 峨眉山野生黄连个体生物量与生物碱含量研究[J]. 中草药,1994,25(8):425-428.
- [6] 盛或欣,张金兰,孙素琴,等. 不同栽培条件黄连的质量分析与评价[J]. 药学学报,2006,41(10):1010-1014.
- [7] 王珏,翟显友,钟国跃,等. 洪雅黄连生物量动态变化及有效成分积累的研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(16):2162-2165.
- [8] 曾焯,王学奎,薛翔楠,等. 湖北利川黄连不同生长龄期主要生物碱的分布及变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(11):123-126.

[责任编辑 刘德文]

《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD(E)

经过中国科学院“中国科学引文数据库(Chinese Science Citation Database,简称 CSCD)”定量遴选、专家定性评估,《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD(E)。

2015—2016 年度 CSCD 收录来源期刊 1200 种,其中中国出版的英文期刊 194 种,中文期刊 1006 种。CSCD 来源期刊分为核心库和扩展库两部分,其中核心库 872 种(以备注栏中 C 为标记);扩展库 328 种(以备注栏中 E 为标记)。

CSCD 具有建库历史最为悠久、专业性强、数据准确规范、检索方式多样、完整、方便等特点,自提供使用以来,深受用户好评,被誉为“中国的 SCI”。CSCD 是我国第一个引文数据库,曾获中国科学院科技进步二等奖。该数据库已在我国科研院所、高等学校的课题查新、基金资助、项目评估、成果申报、人才选拔以及文献计量与评价研究等多方面作为权威文献检索工具获得广泛应用。