

湖北利川黄连不同生长龄期主要生物碱的分布及变化

曾焯¹, 王学奎^{1*}, 薛翔楠¹, 司海倩¹, 孙先忠², 涂代群³

(1. 华中农业大学植物科技学院中心实验室, 武汉 430070;

2. 湖北省利川市清江黄连开发有限责任公司, 湖北 利川 445413;

3. 湖北省利川市药办, 湖北 利川 445400)

[摘要] **目的:** 研究湖北利川黄连不同生长龄期主要生物碱的累积变化过程, 为标准化种植提供科学依据。**方法:** 采用紫外分光光度法和 HPLC 测定黄连有效成分。**结果:** 随着生长龄期的增长, 黄连叶片数、根茎干重都在不断的增加; 黄连不同部位中总生物碱含量的由大到小的顺序依次是根茎 > 须根 > 叶片; 在黄连 2~3 龄阶段为黄连生长最旺盛的时期, 酪氨酸、总生物碱、小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱的含量增长速度最快; 在 5 龄阶段, 这 4 种生物碱含量的大小顺序依次是小檗碱、黄连碱、表小檗碱、巴马汀, 且这 4 种生物碱含量之和占总生物碱含量的比例在不断增加。**结论:** 为黄连的种植管理提供了参考。

[关键词] 黄连; 高效液相色谱; 表小檗碱; 黄连碱; 巴马汀; 小檗碱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0123-04

[doi] 10.11653/syfy2013110123

Study on Division and Change of Main Alkaloids from *Coptis chinensis* in Lichuan Hubei at Different Growth Stages

ZENG Ye¹, WANG Xue-kui^{1*}, XUE Xiang-nan¹, SI Hai-qian¹, SUN Xian-zhong², TU Dai-qun³

(1. Central Laboratory of College of Plant Science & Technology, Huazhong Agricultural University,

Wuhan 430070, China; 2. Qingjiang Coptis Development Co., Ltd, Lichuan 445413, China;

3. Chinese Herbs Management Office of Lichuan City, Lichuan 445400, China)

[Abstract] **Objective:** Through studying the cumulative change process of main alkaloids from *Coptis chinensis* in Lichuan at different growth stages, provides scientific truth for standardization planting. **Method:** The effective components of *C. chinensis* were measured by UV spectrophotometry and HPLC methods. **Result:** The leafs and dry weight of root of *C. chinensis* were constantly increasing by the growth of the age growth. The main alkaloids content in different parts of *C. chinensis* was in the order of root > fibrous root > leaf. *C. chinensis* was growing fastest during two to three years stages, and the content of the tyrosine, total alkaloids, epiberberine, coptisine, palmatine and berberine was growing fastest too. These four alkaloids content was in the order of epiberberine > coptisine > palmatine > berberine. The proportion was inreasing that the sum content of the four alkaloids accounts for total alkaloids content. **Conclusion:** The result can be used to provide reference for planting and managing *C. chinensis*.

[Key words] *Coptis chinensis*; HPLC; epiberberine; coptisine; palmatine; berberine

黄连根茎含有以小檗碱(BER)、黄连碱(COP)、表小檗碱(EPI)和巴马汀(PAL)为主的多种生物碱^[1-6], 具有降血糖、保护缺血心肌、抗消化性溃疡等药理作用, 临床应用广泛^[7-8], 其在栽培方面也多有报道。为探讨不同生长龄期黄连产量与质量的关系, 笔者采用测定单株鲜质量和干质量的方

[收稿日期] 20120810(005)

[第一作者] 曾焯, 硕士, 从事药用植物生理学研究, Tel: 18071042268, E-mail: hnzengye@sina.com

[通讯作者] * 王学奎, 副教授, 硕士生导师, 从事药用植物生理学研究, Tel: 13387535898, E-mail: ang-xuekui@mail.hzau.edu.cn

法, 并以其主要有效成分生物碱为指标, 比较了不同龄期黄连中各种主要生物碱的含量变化, 从中找出黄连最佳生长年限, 把握整体质量, 为规范种植黄连提供了一种参考方法。

1 材料

Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (G1314F 可变波长检测器), UV-2100 型紫外-可见分光光度计 [尤尼柯 (上海) 仪器有限公司], BRANSON B-321 型超声清洗机 [美国必能信超声波 (亚太) 有限公司], 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

以湖北利川市清江黄连开发有限责任公司的黄连为研究对象, 其药材基地为中药材生产质量管理规范 (GAP) 种植基地, 平均海拔在 1 000 ~ 1 300 m, 各龄期栽培及管理条件基本一致, 其采挖日期为 2011 年 11 月 1 日。黄连药材经湖北中医研究院王克勤研究员鉴定为味连 *Coptis chinensis*。小檗碱对照品 (批号 110713-200911) 和巴马汀对照品 (批号 110732-200907) 由中国药品生物制品检定所提供。表小檗碱和黄连碱由本实验室经逆流提取制备, 纯度 96% 以上。乙腈为色谱纯, 其余试剂都为分析纯。

2 方法

2.1 样品的处理 随机抽取 2 龄黄连 20 株, 3, 4, 5 龄各 5 株, 将取回的黄连样用清水洗去泥沙后, 将叶片、须根和根茎分装于档案袋, 105 °C 杀青 15 min, 80 °C 烘干至恒重, 粉碎后, 过 60 目筛, 干燥保存。

2.2 酪氨酸含量测定^[9] 取待测地上部或地下部烘干保存样品 0.15 g, 加入 1 mL 6 mol·L⁻¹ 盐酸于 20 mL 刻度试管, 微波加热 30 s, 过滤, 蒸馏水定容于 25 mL 量瓶。取 2.5 mL 于 25 mL 量瓶, 依次加入 5.02 × 10⁻² mol·L⁻¹ 的 4-氨基安替比啉 2.5 mL、pH 9 NH₄OH-NH₄Cl 1.25 mL、0.1 mol·L⁻¹ 的 NaIO₄ 2.5 mL, 混匀后用蒸馏水定容至刻度, 显色 25 min 后, 以空白作对照, 测定 480 nm 下的吸光值 (A), 以酪氨酸为标准计算样品中酪氨酸含量, 重复 3 次。得回归方程 $Y = 0.369 3X + 0.025 5$, $r = 0.992 9$, 线性范围 0.4 ~ 2.0 g·L⁻¹。

2.3 黄连总生物碱含量的测定^[10] 取叶片、须根和根茎干燥保存样品 0.2 g 于 250 mL 三角瓶中, 精密加入 50 mL 甲醇-盐酸 (100:1) 混合液密封, 超声处理 30 min, 放冷, 甲醇补足质量, 过滤, 取 0.5 mL 滤液, 甲醇定容至 25 mL, 以甲醇-盐酸 (100:1) 作空白, 在 345 nm 测定 A, 以盐酸小檗碱为标准计算样品中生物总碱的含量, 重复 3 次。得回归方程 $Y = 0.063 2X + 0.035 8$, $r = 0.998 7$, 线性范围 2.0 ~

10.0 mg·L⁻¹。

2.4 黄连生物碱 4 种主要生物碱含量测定

2.4.1 样品制备 黄连根茎经粉碎机粉碎并过 60 目筛, 称取待测干样 0.2 g 至 50 mL 三角瓶, 加入盐酸-甲醇 (1:100) 溶液 50 mL 密封, 超声波处理 30 min, 冷却、定容至 50 mL, 上清液经 0.22 μm 微孔膜抽滤后备用。

2.4.2 对照品的制备 精密称取盐酸小檗碱 30.00 mg 和盐酸巴马汀 50.00 mg, 分别溶于 30 mL 和 50 mL 甲醇溶液 (制成对照品溶液质量浓度为 1 g·L⁻¹ 的母液, 备用, 以上对照品在中国药品生物制品检定所购买)。表小檗碱 9.3 mg 和黄连碱 55.4 mg (由本实验室逆流提取制备) 分别溶于 9.3 mL 和 55.4 mL 甲醇溶液制成质量浓度为 1 g·L⁻¹ 的母液。

2.4.3 生物碱的含量测定 流动相乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾 (30:70), 用磷酸调 pH 3.0, 流速 1 mL·min⁻¹, Varian C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 25 °C, 检测波长 345 nm, 进样量 20 μL^[11-12]。其中乙腈为色谱纯, 其余试剂都为分析纯。采用外标法计算 4 种生物碱的含量。

通过对照样品的标定, 所得的这 4 种生物碱的标准曲线见表 1。

表 1 4 种生物碱的标准曲线

成分	回归方程	r	线性范围/μg
表小檗碱	$Y = 4 004.2X - 194.45$	0.999 6	0.075 ~ 1.000
黄连碱	$Y = 3 627.7X + 157.55$	0.999 8	0.050 ~ 1.500
巴马汀	$Y = 4 243.6X + 64.004$	0.999 7	0.050 ~ 1.500
小檗碱	$Y = 3 912.3X + 133.64$	0.999 9	0.500 ~ 10.000

2.4.4 精密度实验 分别取 6 份黄连样品参照

2.5.1 项提取黄连生物碱, 按前述分析条件进行测定, 小檗碱与巴马汀含量测定的变异系数 (CV%) 分别为 2.81%, 2.23%, 重复性较好, 表明提取方法可行。将同一样品连续进样 3 次测定小檗碱与药根碱的含量, 其变异系数 (CV%) 分别为 2.75%, 2.56%, 说明仪器的精密度满足分析要求。

2.4.5 稳定性试验 取同一制备好的样品溶液, 在 0, 6, 12, 24 h 分别进样, 分别记录 4 个峰的面积, 计算 RSD 3.25%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.6 加样回收率试验 在待分析的黄连样品中, 定量加入对照品, 按前述方法提取生物碱后进行含量测定, 计算加入的对照品的回收率, 本试验中测定盐酸小檗碱与盐酸巴马汀的平均回收率为 97.53%, 101.47%, RSD 分别为 2.61%, 2.33%, 说

明样品的处理方法和分析条件符合定量分析要求。

3 结果

3.1 黄连生长指标的变化 表 2 看出,随着黄连生长龄期的增长,其地上部叶片数、单株全长、单株鲜重、单株干重及单株根茎干重都在不断地增加。其中在 3~4 龄阶段,黄连的各个生长指标增长的速度最快,就黄连的根茎干重来说,4 龄的是 3 龄的 3.15 倍。而在 4~5 龄期间,其增长速度相对减慢。由此可见,在黄连生长到 3~4 龄期间,适当的追肥,有利于黄连更好更快的生长;当黄生长到 5 龄的时候,根茎干重达到最大,是最佳的采收时期。

表 2 不同生长时期黄连的生长指标

生长龄期	平均单株	平均单株	平均单株	平均单株	平均根茎
	叶片数 /片	全长 /cm	(鲜) /g	(干) /g	(干) /g
2 龄	9.90	14.00	0.77	0.30	0.12
3 龄	31.20	21.70	16.78	6.77	3.49
4 龄	37.50	31.60	46.50	23.54	10.98
5 龄	52.00	35.70	65.80	28.30	12.80

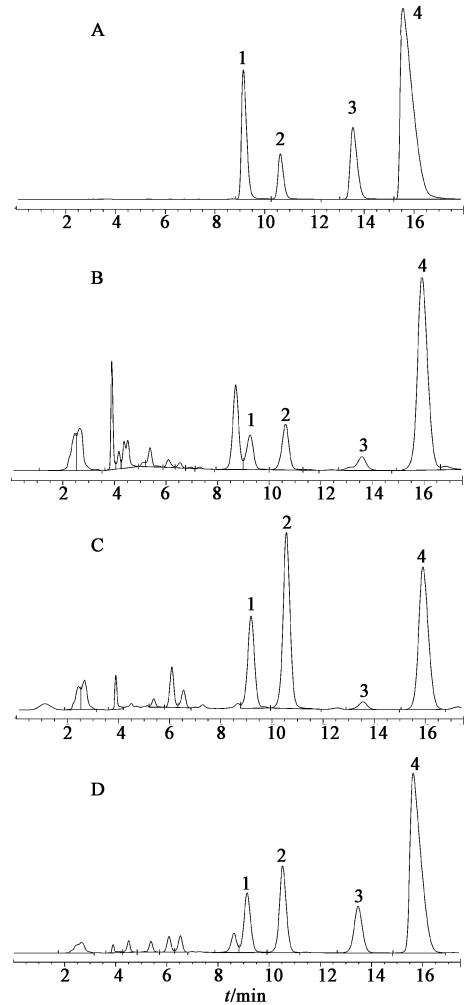
3.2 黄连酪氨酸和总生物碱的变化 表 3 看出,在黄连生长的不同龄期,其体内的酪氨酸和总生物碱含量各不相同。其中在 3 龄阶段,黄连的叶片、须根和根茎的酪氨酸含量达到了最大值,分别为 45.66, 50.64, 80.95 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,而到了 4,5 龄阶段,其含量开始开始降低;在 2~3 龄阶段,黄连不同部位总生物碱含量显著增加。而在 3,4,5 龄阶段,其总生物碱含量基本上保持稳定。

表 3 不同龄期黄连不同生长部位中酪氨酸及总生物碱的含量 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

生长龄期	叶片		须根		根茎	
	酪氨酸	总生物碱	酪氨酸	总生物碱	酪氨酸	总生物碱
2 龄	39.33	38.61	-	-	50.41	58.58
3 龄	45.66	44.15	50.64	45.13	80.95	106.66
4 龄	32.92	42.76	39.49	46.91	76.60	105.66
5 龄	26.99	45.13	43.37	46.32	67.42	105.05

3.3 标准样品和样品的图谱 通过图 1 中混合标样和黄连样品的色图谱可以看出,混合标样中 4 种生物碱和样品中的出峰时间一致。4 种黄连生物碱组分经高效液相色谱仪分离后各峰无杂峰和拖尾现象。进一步说明经高效逆流色谱仪进行分离得到的 4 种生物碱均为单一组分,达到了色谱纯,可以作为标准物质的参照品用于样品的定性和定量分析,从

而也解决了标准物质的限制问题。



A. 混合标样; B. 5 龄黄连叶片;
C. 5 龄黄连须根; D. 5 龄黄连根茎

1. 表小檗碱; 2. 黄连碱; 3. 巴马汀; 4. 小檗碱

图 1 标样和样品的 HPLC 色谱

3.4 4 种生物碱含量的变化 表 4 看出,在黄连的叶片、须根和根茎部位都含有表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱,这 4 种生物碱含量总和的大小顺序依次是根茎 > 须根 > 叶片。当黄连生长到 5 龄阶段时,这 4 种生物碱的含量在不同部位的的大小顺序都是小檗碱 > 黄连碱 > 表小檗碱 > 巴马汀;在叶片中,这 4 种生物碱的含量随着生长龄期的变化,其含量也在不断地变化,在 3 龄阶段,各自含量基本上达到了最大值。而到了 4,5 龄阶段,各自含量有略微的减少;在须根中,除黄连碱含量有一定的增加,其余 3 种生物碱的含量在 3~5 龄阶段都有一定的减少;在根茎中,在 2 龄到 3 龄阶段,这 4 种生物碱含量增加显著,在 3~5 龄阶段除表小檗碱含量有一定的减少,其余 3 种生物碱含量都有一定的增加。

表 4 不同龄期黄连不同生长部位中 4 种生物碱的含量

mg·g⁻¹

生长龄期	叶片				须根				根茎			
	EPI	COP	PAL	BER	EPI	COP	PAL	BER	EPI	COP	PAL	BER
2 龄	1.36	0.81	0.34	11.27	-	-	-	-	7.18	9.20	2.43	23.50
3 龄	2.51	2.12	1.30	17.09	6.91	9.91	0.69	14.06	11.89	14.60	7.74	46.70
4 龄	2.20	1.50	0.78	16.92	8.51	11.71	0.59	12.91	11.21	15.19	10.71	49.09
5 龄	2.36	2.68	0.79	15.73	6.84	13.08	0.37	13.69	11.02	16.92	9.29	51.50

4 讨论

对不同生长龄期的黄连不同部位的生物碱含量的变化进行了研究,结果表明,黄连随着生长龄期的增长,产量随之增加,其中在 2~3 龄阶段,增加幅度最大,是黄连生长发育最旺盛的时期。为现代规范化种植黄连提示了重要的时间依据。

通过对酪氨酸和总生物碱含量的测定可以看出,在 3 龄生长最旺盛的阶段酪氨酸在叶片和须根中的含量均达到了最大值,而在 4~5 龄阶段,其含量开始慢慢下降,但是总生物碱的含量却有所上升,说明酪氨酸转化成了某种生物碱。这与文献中认为的在苜基异喹啉生物碱合成的早期阶段,去甲劳丹合成酶能催化酪氨酸的芳香族化合物多巴胺和苯乙醛类物质合成去甲劳丹碱和去甲衡州乌药碱这两个合成途径中的重要中间体相符^[13]。

通过对总生物碱和 4 种生物碱含量的比较发现,随着黄连生长龄期的增长这 4 种生物碱含量之和占总生物碱含量的比例在不断地增加,其比例依次 72.23% ,75.88% ,81.58% ,84.47% 。

在色谱条件的考察过程中,曾尝试用 Agilent C₁₈柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),通过改变色谱柱的长度使峰形达到较好的分离效果,但结果表明虽然出峰的时间都提前到了 8 min 以内,峰形和分离度都较差,故最后选择用 Varian C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);同时也对盐溶液的流动相的 pH 进行的调整,当 pH 2 时,样品中不同组分的出峰时间均比混合标样中不同组分的出峰时间提前了 1.2~2.7 min,故最后选择用 pH 3。

[参考文献]

[1] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所. 中国药

用植物栽培学[M]. 北京: 农业出版社, 1991:700.

[2] 胡芳,陆兔林,毛春芹,等. HPLC 测定岩黄连生物总碱中脱氢卡维丁、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7):68.

[3] 向莉,李盾. HPLC 法研究黄连中表小檗碱等 5 种生物碱的含量[J]. 成都中医药大学学报, 2004, 27(2):46.

[4] 应懿,何志红. 测定黄连中 5 种生物碱含量的高效液相色谱法研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(9):843.

[5] 黄小平,李隆云,瞿显有,等. 石柱黄连指纹图谱研究[J]. 中药材, 2006, 29(7):B666.

[6] 王琦,李志峰,陈刚,等. 黄连的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7):74.

[7] 李备,周岐新. 黄连抗消化性溃疡的药理学研究进展[J]. 中国药房, 2005, 16(14):1107.

[8] 马庆军,党耕町,刘中军,等. 脊柱骨巨细胞瘤 36 例诊断与治疗[J]. 北京大学学报:医学版, 2002, 34(6):656.

[9] 邹明珠,茹钦华,曹占双,等. 食品中酪氨酸含量的测定[J]. 分析实验室, 1998, 17(4):61.

[10] 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, 2010:286.

[11] 尹清. HPLC 测定黄连中盐酸小檗碱含量[J]. 上海中医药杂志, 2003, 37(7):53.

[12] 武小赞,李铁钢,阳勇,等. HPLC 法测定黄连中主要生物碱的方法学研究[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(6):112.

[13] Phillison J D, Roberts, Zenk M H, et al. In the chemistry and biology of isoquinoline alkaloids [M]. Berlin:Springer-Verlag, 1986:240.

[责任编辑 顾雪竹]