

本文引用:曾 燕,朱俊平,范诗琪,梁慧慧,何 红,张喜利,李 龙,刘文龙.野生与种植黄连植株不同部位的生物碱含量比较研究[J].湖南中医药大学学报,2019,39(7):856-859.

野生与种植黄连植株不同部位的生物碱含量比较研究

曾 燕^{1,2},朱俊平^{1,3},范诗琪^{1,3},梁慧慧^{1,3},何 红^{1,4},张喜利^{1,3},李 龙¹,刘文龙^{1,3*}

(1.湖南中医药大学药学院,湖南 长沙 410208;2.邵阳学院附属第二医院药剂科,湖南 邵阳 422000;

3.中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室,湖南 长沙 410208;4.湖南省儿童医院药剂科,湖南 长沙 410007)

[摘要] 目的 采用UV和HPLC法比较野生与种植黄连植株不同部位生物碱含量差异。方法 UV法在波长345 nm处测定黄连总生物碱含量,HPLC采用C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱,乙腈和0.4%磷酸水溶液(25:75)等度洗脱,流速1.0 mL/min,进样量10 μL,检测波长345 nm,柱温30 ℃以测定盐酸小檗碱含量。结果 黄连不同部位的总生物碱含量:种植黄连根茎含(9.88±0.03)%、须根含(6.41±0.03)%、茎叶含(1.92±0.04)%;野生黄连根茎含(7.95±0.03)%、茎叶含(0.64±0.03)%。黄连不同部位的盐酸小檗碱含量:种植黄连根茎含(0.45±0.04)%、须根含(0.17±0.03)%、茎叶含(0.09±0.03)%;野生黄连根茎含(0.38±0.03)%、茎叶含(0.16±0.03)%。结论 种植黄连植株不同部位的总生物碱含量高于野生黄连,但其盐酸小檗碱含量低于野生黄连植株;野生与种植黄连均为根茎部总生物碱和盐酸小檗碱含量最高。

[关键词] 黄连;UV;HPLC;盐酸小檗碱;生物碱标志物

[中图分类号]R284.1

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.07.014

Comparative Study on Alkaloid Content in Different Parts of *Coptis chinensis* Grown in Wild and Cultivated

ZENG Yan^{1,2}, ZHU Junping^{1,3}, FAN Shiqi^{1,3}, LIANG Huihui^{1,3}, HE Hong^{1,4}, ZHANG Xili^{1,3}, LI Long¹, LIU Wenlong^{1,3*}

(1. School of Pharmacy College, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Shaoyang Academy, Shaoyang, Hunan 422000, China;

3. Hunan Key Laboratory of Druggability and Preparation Modification for Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 4. Department of Pharmacy, Hunan Children's Hospital, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To compare the alkaloid content in different parts of wild and cultivated *Coptis chinensis* by UV and HPLC. **Methods** Determination of total alkaloids in *Coptis chinensis* by ultraviolet spectrophotometry at 345 nm. HPLC was performed on C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) chromatographic column by isocratic elution with acetonitrile -0.4% phosphoric acid aqueous (25:75) as mobile phase, the flow rate was 1 mL/min, the injection volume was 10 μL, the detection wave length was 345 nm, the column temperature was set at 30 ℃. **Results** The content of total alkaloids in cultivated *Coptis chinensis*: the rhizome, fibrous root, cauline contains (9.88±0.03)%, (6.41±0.03)%, (1.92±0.04)%, respectively; The content of total alkaloids in wild *Coptis chinensis*: rhizome was (7.95±0.03)%, stem and leaf was (0.64±0.03)%. The content of berberine hydrochloride in cultivated *Coptis chinensis*: rhizome was (0.45±0.04)%, fibrous root, and stem and leaf contain (0.17±0.03)%, (0.09±0.03)%, respectively.

[收稿日期]2017-12-15

[基金项目]国家自然科学基金(81270055);湖南省教育厅科研优秀青年项目(15B174)。

[作者简介]曾 燕,女,硕士,研究方向:中药成分分析。

[通讯作者]* 刘文龙,男,副教授,硕士研究生导师,E-mail:dragon5240@126.com。

The content of berberine hydrochloride in wild *Coptis chinensis*: rhizome was (0.38±0.03)%, and that of stem and leaf was (0.16±0.03)%. **Conclusion** The content of total alkaloids in different parts of cultivated *Coptis chinensis* was higher than that in wild *Coptis chinensis*, but the content of berberine hydrochloride was lower than that in wild *Coptis chinensis*. The rhizome part in both wild and cultivated *Coptis chinensis* had the highest content of total alkaloids and berberine hydrochloride.

[**Keywords**] *Coptis chinensis*; UV; HPLC; berberine hydrochloride; alkaloid markers

随着中医药临床疗效显著、临床应用扩大,中药材的需求量越来越大^[1],中药种植及其 GAP 应运而生,极大程度地解决了中药资源短缺等问题。然而,传统观点则认为野生中药材的质量均优于种植的,无需考察首选野生药材^[2]。也因此使得野药材的价位远高于种植的。课题组在多年中药材质量研究中发现,并不是所有的中药质量均为野生优于种植,某些种植药材的质量反而优于野生的,临床上种植药材逐渐取代了野生药材,不会因此而影响临床疗效。

黄连为毛茛科植物黄连(*Coptis chinensis* Franch.)、三角叶黄连(*Coptis deltoidea* C.Y. Cheng et Hsiao)或云连(*Coptis teeta* Wall.)的干燥根茎,主产于四川、重庆、湖南、云南、贵州、陕西等地,具有清热燥湿、清心除烦、泻火解毒功效^[3]。药理实验表明,其主要成分生物碱中的小檗碱具有明显的抗菌^[4-5]、抗炎^[6]、抑制乳腺癌细胞^[7-8]、干预非酒精性脂肪性肝炎^[9]、抑制前列腺癌^[10]。其功效多而显著,在临床上应用极广^[11],既有其单味药制剂“黄连胶囊”,也有很多其参与的复方制剂。随着黄连在临床使用范围及中药茶、中药保健品开发等应用力度越来越大,黄连的须根、茎叶部位也逐渐打入市场,进而存在市售的黄连成药中极易掺杂使用黄连根茎、须根、茎叶等部位而导致其质量不一的现象。因此本研究通过 HPLC 和 UV 测定野生与种植黄连不同部位有效成分盐酸小檗碱及总生物碱的含量,通过比较分析野生与种植黄连植株不同部位生物碱的含量,揭示其质量优劣的真实情况,以期指导临床使用,确保临床疗效。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters 液相色谱仪(Waters 1525);TU-1900 双光束紫外分光光谱计(北京普析通用仪器有限责任公司);台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);KQ5200DE 型数控超声波振荡仪(上海科学超声仪器有限公司);YD601N 型电子天平(上海恒平科技仪器有限公司);YP1002N 型电子天平(上海菁海仪器有限公司);RE-52AA 旋转蒸发仪(上海雅荣生化设备仪器有限公司);超纯水机

(长沙市科临电子科技有限公司)。

1.2 试药

新鲜黄连样品为实地采集,有野生黄连(未知年限黄连,多为单只,细瘦弯曲,状如蝎尾。)、种植黄连(6年生黄连,根状茎黄色,微弯曲如蚕状,具较长的“过桥”。),均由湖南中医药大学石继连教授鉴定为毛茛科黄连属黄连(*Coptis chinensis* Franch.)。及时将鲜品黄连进行清洗、分装等前处理,分装为种植黄连根茎、种植黄连须根、种植黄连茎叶;野生黄连根茎、野生黄连茎叶(由于野生黄连植株须根极短而少,故没有收集处理其须根部位)于-80℃冰箱储存。

盐酸小檗碱对照品(质量分数:86.8%,批号:110713-200208)购于中国药品生物制品检定所;甲醇(色谱纯,LOT:13050085)、乙腈(色谱纯, No. 0000406281/03)均购自美国 TEDIA 公司;磷酸(AR,批号:20150930)、磷酸二氢钾(AR,批号:20170109)、十二烷基磺酸钠(CP,批号:20160829)、盐酸(AR,批号:20131023)、氢氧化钙(AR,批号:20161227)均购自国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

2.1.1 UV 对照品溶液 UV 测定时以盐酸小檗碱计总生物碱含量,精密称取盐酸小檗碱对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 90.5 μg 的对照品溶液,备用。

2.1.2 HPLC 对照品溶液 “2.1.1”项下同法制得浓度为 90.5 μg/mL 的盐酸小檗碱对照品溶液,超声脱气,0.22 μm 的微孔滤膜滤过,即得。

2.2 供试品溶液的制备^[3]

2.2.1 UV 供试品溶液 称取种植黄连根茎、种植黄连须根、种植黄连茎叶、野生黄连根茎、野生黄连茎叶各 0.100 g,剪碎,分别置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇-盐酸(100:1)的混合溶液各 50 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 分钟,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 2 mL,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,备用。

2.2.2 HPLC 供试品溶液 取“2.2.1”项下制得的种植黄连根茎、种植黄连须根、种植黄连茎叶、野生黄连根茎、野生黄连茎叶溶液,超声脱气,0.22 μm 的微孔滤膜滤过,即得。

2.3 仪器条件

2.3.1 UV 检测波长的确定 取“2.1.1”和“2.2.1”项下的UV对照品和供试品溶液,以甲醇为空白,在200~600 nm 波长范围内扫描,选择最佳检测波长345 nm。

2.3.2 HPLC 色谱条件 采用 C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相为0.4%磷酸水溶液-乙腈(75:25),等度洗脱30 min;流速为1.0 mL/min;进样量为10 μL ;检测波长345 nm;柱温30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 UV 法 精密称取盐酸小檗碱对照品18.00 mg于5 mL量瓶中加甲醇稀释定容,记为盐酸小檗碱对照品储备液。分别量取储备液125、140、250、500、1 000 μL 于10 mL量瓶中甲醇稀释定容,摇匀,即得0.045、0.05、0.09、0.18、0.36 mg/mL的盐酸小檗碱溶液,按“2.3.1”项下条件测定吸光度。以吸光度值(A)为纵坐标,以对照品浓度(C)为横坐标,进行线性回归,回归方程为

$$A=6.439\times C-0.01776, r=0.9999。$$

HPLC 法 精密称取盐酸小檗碱对照品45.25 mg于5 mL量瓶中加甲醇稀释定容,记为盐酸小檗碱对照品储备液。分别量取储备液1 000、250、125、83.3、62.5、50.0 μL 于100 mL量瓶中甲醇稀释定容,摇匀,既得90.5、22.63、11.31、7.54、5.66、4.53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的盐酸小檗碱对照品溶液,并按“2.3.2”项下色谱条件进行测定,以色谱峰面积(Y)为纵坐标,以浓度(X)为横坐标,绘制标准曲线。回归方程为

$$Y=284166X-127968, r=0.9994。$$

2.4.2 精密度试验 UV 法 精密吸取“2.1.1”项下对照品溶液,适当稀释后,按“2.3.1”项下条件连续测定6次,吸光度RSD为0.12%,表明仪器精密度良好。

HPLC 法 取“2.2.2”项下盐酸小檗碱对照品按“2.3.2”项下色谱条件重复进样6次,盐酸小檗碱峰面积RSD为0.67%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 UV 法 取种植黄连根茎的同一批样品6份,等量,按“2.2.1”项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,按“2.3.1”项下条件测定种植黄连根茎的总生物碱含量,其RSD为1.07%,表明本方法重复性良好。

HPLC 法 取种植黄连根茎的同一批样品6份,按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶

液,按“2.3.2”项下色谱条件测定,盐酸小檗碱峰面积的RSD为1.24%,表明本方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 UV 法 取“2.2.1”项下的5个供试品溶液,分别在0、1、2、4、6、12 h,345 nm 波长处测定吸光度,甲醇空白,供试品中总生物碱的RSD分别为0.86%、1.37%、1.78%、1.50%、0.99%,表明5个供试品在12 h内稳定性良好。

HPLC 法 取“2.2.2”项下的5个供试品溶液,分别在0、4、8、16、24、48 h 进样分析,进样量10 μL ,供试品中对应的盐酸小檗碱峰面积的RSD分别为1.36%、1.21%、0.98%、1.12%、0.79%,表明5个供试品在48 h内稳定性良好。

2.4.5 加样回收试验 UV 法 精密称取种植黄连根茎、种植黄连须根、种植黄连茎叶、野生黄连根茎、野生黄连茎叶各0.100 g,各6份,分别置具塞锥形瓶中,精密加入90.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 盐酸小檗碱对照品溶液5 mL,按“2.2.1”项下处理,“2.3.1”项下条件测定,分别计算回收率。其平均回收率分别为98.05%、97.12%、97.52%、98.03%、97.08%,RSD分别为1.20%、1.12%、1.61%、1.05%、0.84%。表明本方法准确性良好。

HPLC 法 精密称取种植黄连根茎、种植黄连须根、种植黄连茎叶、野生黄连根茎、野生黄连茎叶各0.100 g,各6份,分别置具塞锥形瓶中,精密加入90.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 盐酸小檗碱对照品溶液5 mL,按“2.2.1”项下处理至“用甲醇补足减失的重量”,摇匀,0.22 μm 的微孔滤膜滤过,按“2.3.2”项下的色谱条件测定,分别计算回收率。其平均回收率分别为98.31%、99.02%、98.52%、98.83%、99.50%,RSD分别为0.97%、1.32%、1.81%、1.25%、1.54%。表明本方法准确性良好。

2.5 样品生物碱含量测定

2.5.1 UV 法 按“2.2.1”项下方法制备野生与种植黄连不同部位供试品溶液,分别取种植黄连根茎0.4 mL、种植黄连须根0.4 mL、种植黄连茎叶5.0 mL、野生黄连根茎0.4 mL、野生黄连茎叶10.0 mL,于10 mL容量瓶甲醇定容。结果见表1。

2.5.2 HPLC 法 按“2.2.2”项下制备5种供试品溶液各6批,并按照“2.3.2”项下色谱条件进行测定,色谱图见图1。采用外标法计算盐酸小檗碱含量,结果见表2。

3 讨论

3.1 测定方法的确定

本实验在2015版《中华人民共和国药典》基础上优化了HPLC测定黄连中盐酸小檗碱含量的方

表1 UV测定野生与种植黄连不同部位总生物碱含量($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

成分	种植黄连			野生黄连	
	根茎	须根	茎叶	根茎	茎叶
总生物碱	9.88±0.03	6.41±0.03	1.92±0.04	7.95±0.03	0.64±0.03

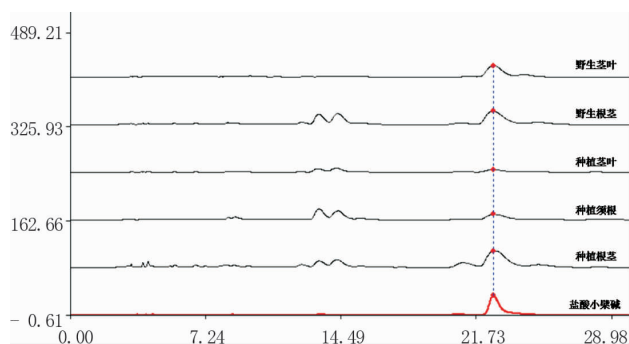


图1 野生与种植黄连不同部位的HPLC代表图谱

表2 HPLC测定野生与种植黄连不同部位盐酸小檗碱含量($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

成分	种植黄连			野生黄连	
	根茎	须根	茎叶	根茎	茎叶
盐酸小檗碱	0.45±0.04	0.17±0.03	0.09±0.03	0.38±0.03	0.16±0.03

法,建立了UV测定黄连中总生物碱含量的简易方法,并分别进行了方法学研究。HPLC通过盐酸小檗碱外标法得出种植黄连根茎、种植黄连须根、种植黄连茎叶、野生黄连根茎、野生黄连茎叶的盐酸小檗碱含量,通过UV法测定了黄连中总生物碱含量,并对野生与种植黄连不同部位HPLC差异的总体趋势进行复核。两种方法分析效率高、操作简便、测定结果均准确可靠,为黄连的质量控制提供了科学依据。

3.2 黄连不同部位含量差异分析

本实验分析部位主要包括种植黄连根茎、须根、茎叶和野生黄连根茎、茎叶(因野生黄连植株须根极短而少,故野生须根未进行分离)。实验结果表明种植黄连不同部位的盐酸小檗碱含量及总生物碱含量差异明显,根茎的盐酸小檗碱和总生物碱含量均高

于须根和茎叶部位;野生黄连植株根茎的盐酸小檗碱和总生物碱含量远高于茎叶部位。通过盐酸小檗碱含量分析可以鉴别分析黄连植株的不同部位,避免市场上黄连粉质量良莠不齐。

3.3 野生与种植黄连药用部位含量差异分析

本实验通过对野生与种植黄连根茎盐酸小檗碱含量及总生物碱含量的比较,显示种植6年生的黄连根茎高于野生未知年限黄连根茎的盐酸小檗碱含量及总生物碱含量。说明野生黄连质量不一定优于种植黄连,也可能由于野生黄连为未知年限黄连,但目前野生黄连生长年限不易确定,而种植黄连为6年生黄连,其有效成分含量差异受生长年限影响。

参考文献

- [1] 汪莹,申俊龙,赵坤元.基于蛛网模型的中药材价格波动原因分析及对策研究[J].现代中药研究与实践,2014,28(2):79-82.
- [2] 蒋舜媛,孙辉,王红兰,等.羌活产业现状及发展对策[J].中国中药杂志,2017,42(14):2627-2632.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].中国医药科技出版社,2015:303-305.
- [4] 杨勇,雷志英,吴方评,等.小檗碱的抗菌作用研究进展[J].现代生物医学进展,2010,10(9):1783-1785.
- [5] 卿大双,罗维早,孙建彬,等.一测多评法测定黄连及其炮制品中6种生物碱[J].中草药,2016,47(2):324-329.
- [6] FUJII A, OKUYAMA T, WAKAME K, et al. Identification of anti-inflammatory constituents in Phellodendri Cortex and Coptidis Rhizoma by monitoring the suppression of nitric oxide production[J]. Journal of Natural Medicines, 2017, 71(4):745-756.
- [7] 郭钢,金山,张永梅.盐酸小檗碱对人乳腺癌MCF-7细胞增殖和迁移的影响[J].中华实用诊断与治疗杂志,2017,31(9):847-849.
- [8] 张晓亮,邵磊.扶正祛毒方联合盐酸小檗碱对乳腺癌细胞生长抑制作用的临床观察[J].中华中医药学刊,2016,34(9):2289-2291.
- [9] 张慧芹.小檗碱干预非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的分子机制研究[D].北京:北京中医药大学,2014.
- [10] 王玉.小檗碱对前列腺癌的抑制作用及其机制研究[D].山东:山东大学,2011.
- [11] 胥敏,杨诗龙,张超,等.基于气味客观化的黄连及其炮制品鉴别研究[J].中国中药杂志,2015,40(1):89-93.

(本文编辑 李杰)