

· 基础研究 ·

雅连和云连中生物碱的含量测定[△]吴佳¹, 匡艳辉^{2*}

1. 长沙民政职业技术学院医学院, 湖南 长沙 410004;
2. 广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广东 广州 510515

[摘要] 目的: 分析雅连和云连在质量标准方面的区别, 指导雅连和云连的质量标准制定。方法: 采用高效液相色谱法。结果: 雅连中含有表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱4个生物碱, 云连中则含有黄连碱、巴马汀和小檗碱3个生物碱, 未发现药根碱和表小檗碱。结论: 利用高效液相色谱法比较雅连和云连中的生物碱种类并利用其种类的差异可为区分黄连品种提供依据。

[关键词] 雅连; 云连; 生物碱

[中图分类号] R282.5; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)04-0464-04

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20181018004

Determination of Alkaloids Content in *Coptis deltoidea* and *Coptis teeta*WU Jia¹, KUANG Yan-hui^{2*}

1. Changsha Social Work College, Changsha 410004, China;
2. Hutchison Whampoa Guangzhou Baiyunshan Chinese Medicine Co., Ltd., Guangzhou 510515, China

[Abstract] **Objective:** To analyze the difference of quality standards between *Coptis deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao and *Coptis teeta* Wal, and guide the formulation of quality standards between them. **Methods:** The content of alkaloids was determined by HPLC. **Results:** Epiberberine, coptisine, palmatine and berberine were found in *C. deltoidea*. Coptisine, palmatine and berberine were found in *C. teeta*, but jatrorrhizine and epiberberine were not found. **Conclusions:** The HPLC method can be used for comparing alkaloids in *C. deltoidea* and *C. teeta*. The difference of alkaloids could be used distinguish different *Coptis* species.

[Keywords] *Coptis deltoidea*; *Coptis teeta*; alkaloids

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。以上三种分别习称“味连”、“雅连”和“云连”。主要分布于我国重庆、湖北、四川、云南等地。其味苦, 性寒。归心、脾、胃、肝、胆、大肠经。具有清热燥湿, 泻火解毒之功效^[1-2]。

味连、雅连和云连受到政策指导、市场价格、每亩产量等多方面因素的影响, 分布呈极端情况。据实际调查和样品收集, 目前味连在市场上占绝对主导地位, 而雅连和云连在市场上基本没有发现。2015版《中华人民共和国药典》一部中只有味连的含量测定项, 却没有雅连和云连的含量测定项。通过大量文献调研发现, 雅连和云连中生物碱的质量控制方法多为紫外分光光度法或薄层色谱法^[3]。雅连和云连同为黄连的重要品种, 为了黄连药用资源

的可持续发展, 本研究拟收集雅连和云连样品, 采用 HPLC 法制定雅连和云连的质量标准。

有文献检测了不同产地和品种黄连药材中的总生物碱, 发现不同基原的黄连中总生物碱的含量有差异^[4]; 有研究检测了不同产地和品种黄连中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和药根碱的含量, 也发现不同基原的黄连中这几种生物碱的含量有差异^[5]。我们总共收集到了5批雅连药材和10批云连药材, 对上述黄连药材进行了含量测定, 为雅连和云连的质量标准的制定提供指导依据。

1 方法学的建立

1.1 混合对照品溶液的制备

精密分别称取5个生物碱: 盐酸药根碱、盐酸表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱

[△] [基金项目] 中医药行业科技专项资助(200707009)

* [通信作者] 匡艳辉, 高级工程师; 研究方向: 中药质量控制; E-mail: 277792835@qq.com

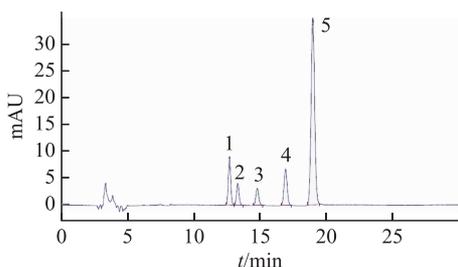
4.39、2.59、2.39、4.90、28.78 mg, 分别置于10 mL量瓶中, 用甲醇溶解, 并定容至刻度, 摇匀, 得各对照品溶液; 分别精密量取各对照品溶液1 mL, 置于10 mL量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 即为混合对照溶液, 4℃冰箱中保存, 备用。

1.2 供试品溶液的制备

取雅连或云连药材粉末(40目)约0.2 g, 精密称定, 置于100 mL锥形瓶中, 精密加入甲醇-盐酸(100:1)溶液50 mL, 称重, 超声30 min, 冷却, 加甲醇补足重量, 滤过, 取续滤液过0.45 μm滤膜, 即得。

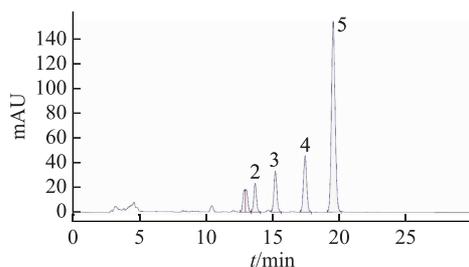
1.3 色谱条件

色谱柱为Kromasil 100-5 C₁₈ (250 × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-50 mmol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液(50:50) (每100 mL中加十二烷基磺酸钠0.4 g, 再以磷酸调节pH值为3.0)为流动相; 柱温: 30℃; 流速: 0.6 mL·min⁻¹; 检测波长: 345 nm; 进样体积: 10 μL。在上述色谱条件下, 雅连药材和云连药材HPLC色谱图如图2及图3所示, 色谱图显示雅连含有表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱4个生物碱, 而云连则只含有黄连碱、巴马汀和小檗碱3个生物碱。上述色谱条件下, 对照品药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱5个生物碱分离良好。如图1。



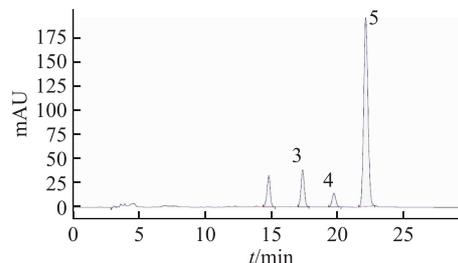
注: 1. 药根碱; 2. 表小檗碱; 3. 黄连碱; 4. 巴马汀; 5. 小檗碱。

图1 混合对照品 HPLC 色谱图



注: 2. 表小檗碱; 3. 黄连碱; 4. 巴马汀; 5. 小檗碱。

图2 雅连样品 HPLC 色谱图



注: 3. 黄连碱; 4. 巴马汀; 5. 小檗碱。

图3 云连样品 HPLC 色谱图

1.4 线性范围

依次将1.1所述混合对照品溶液稀释5、10、20、25、50、100、200倍, 各进样10 μL分析, 每个体积进样2次, 取峰面积积分值的平均值, 见表1。以进样量对峰面积积分值进行线性回归处理, 得药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱的回归直线方程, 见表1。

表1 五个生物碱的标准曲线

化合物名称	回归方程	r	线性范围/μg
药根碱	$Y = 68\ 059X + 1.313\ 7$	0.999 7	0.02 ~ 0.44
表小檗碱	$Y = 61\ 683X - 6.608\ 2$	0.999 9	0.01 ~ 0.26
黄连碱	$Y = 57\ 475X - 4.018\ 3$	0.999 7	0.01 ~ 0.24
巴马汀	$Y = 62\ 765X - 3.786\ 5$	0.999 8	0.02 ~ 0.49
小檗碱	$Y = 61\ 067X - 7.961\ 1$	0.999 9	0.12 ~ 2.88

1.5 精密度试验

依次将1.1所述混合对照品溶液, 连续进样5次, 每次10 μL, 记录药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱的峰面积, 得出日内精密度见表2。

表2 五个生物碱的精密度

化合物名称	1	2	3	4	5	\bar{x}	RSD/%
药根碱	719	732	715	722	720	722	0.88
表小檗碱	461	460	468	452	459	460	1.24
黄连碱	421	432	430	431	425	428	1.09
巴马汀	811	804	812	812	806	809	0.46
小檗碱	2898	2964	2872	2926	3001	2932	1.75

1.6 稳定性试验

取云连供试品溶液, 分别于配制后的0、2、4、8、12、24、48 h进样, 每次10 μL, 记录黄连碱、巴马汀和小檗碱的峰面积, 见表3。表明处理后的样品在2 d内稳定。

表3 云连稳定性试验结果

化合物名称	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h	24 h	48 h	\bar{x}	RSD/%
黄连碱	798	806	811	807	802	811	791	819	806	1.07
巴马汀	369	372	365	359	363	367	352	366	364	1.71
小檗碱	4584	4602	4678	4599	4603	4606	4593	4623	4611	0.63

1.7 重复性试验

精密称取云连药材粉末共6份,按1.2项下制备样品,测得黄连碱、巴马汀和小檗碱的平均含量和RSD分别见表4。

表4 云连重复性试验结果

化合物名称							%	
	第1份	第2份	第3份	第4份	第5份	第6份	\bar{x}	RSD
黄连碱	1.5	1.44	1.46	1.43	1.48	1.39	1.45	2.69
巴马汀	0.58	0.51	0.56	0.57	0.52	0.55	0.55	5.08
小檗碱	9.15	9.34	9.27	9.48	9.04	8.94	9.20	2.17

1.8 加样回收率

精密称取云连药材粉末约0.1g共6份,加入适量对照品,按1.2项下制备样品进行HPLC测定,计算加样回收率。黄连碱、巴马汀和小檗碱的平均回收率及RSD见表5。

表5 云连加样回收率试验结果

化合物	药材含量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收率/ %	RSD/ %
黄连碱	1.51	1.52	3.07	102.70	101.32	2.85
	1.52	1.52	3.05	100.79		
	1.50	1.52	3.08	103.85		
	1.51	1.52	3.04	100.43		
	1.51	1.52	3.09	103.91		
	1.50	1.52	2.96	96.25		
	1.50	1.52	3.07	101.32		
巴马汀	0.58	0.55	1.11	95.52	101.73	4.27
	0.58	0.55	1.16	104.82		
	0.59	0.55	1.18	108.14		
	0.58	0.55	1.14	101.29		
	0.59	0.55	1.14	100.87		
	0.50	0.55	1.05	99.73		
	0.50	0.55	1.05	99.73		
小檗碱	9.22	9.18	18.08	96.48	99.19	1.57
	9.20	9.18	18.3	99.08		
	9.23	9.18	18.33	99.10		
	9.20	9.18	18.29	99.07		
	9.23	9.18	18.5	100.95		
	9.18	9.18	18.4	100.46		

2 样品测定

按正文含量测定方法,取5批雅连药材和10批云连药材依法测定,结果如下,见表6及表7。

表6 雅连样品中4个生物碱含量测定结果

编号	采集地	%			
		表小檗碱	黄连碱	巴马汀	小檗碱
1	四川省峨眉山	0.20	1.62	0.75	5.28
2	四川省峨眉山	0.45	1.24	1.49	5.47
3	四川省峨眉山	0.38	1.03	1.54	4.86
4	四川省峨眉山	0.41	1.12	2.11	5.84
5	四川省	0.68	1.12	1.56	6.17

表7 云连样品中3个生物碱含量测定结果

编号	采集地	%		
		黄连碱	巴马汀	小檗碱
1	怒江州贡山县	1.51	0.54	9.15
2	怒江州福贡县	1.50	0.58	9.15
3	怒江州福贡县	1.53	0.55	8.96
4	怒江州福贡县	1.48	0.57	9.06
5	怒江州福贡县	1.58	0.55	9.27
6	怒江州福贡县	1.62	0.57	10.55
7	怒江州福贡县	1.60	0.57	9.86
8	怒江州福贡县	1.60	0.56	10.55
9	怒江州福贡县	1.53	0.58	9.41
10	怒江州福贡县	1.57	0.59	8.80

3 讨论

黄连的三种不同基原中,味连在市场上占绝对主导地位,以重庆石柱为道地产区。这是由于20世纪50年代,国家大力扶持中药材种植,四川、陕西、湖南等地开始从重庆石柱引种,之后也形成了稳定的种植规模,湖北利川、恩施等地也扩大了种植规模^[4]。雅连传统以四川峨嵋、洪雅、夹江、雅安等地为道地主产区。但自50年代起从重庆引种味连后,雅连种植逐渐萎缩^[5]。经实地调查,目前已几乎没有种植生产,其原因在于雅连为“单枝连”,

亩(1亩 \approx 666.7 m²)产仅在80~120 kg,而味连亩产在300 kg左右,市场价格无差异、种植年限均为5年,所以药农不愿意种雅连。云连仅产于云南局部地区,也为单枝连,亩产略高于雅连。据本研究中的实地调查,目前仅在云南福贡和邻近的贡山一带有种植,近3年种植规模逐渐扩大到接近1万亩,一般4年收获。由于近3年才开始规模化种植,年限不到,所以现在市场上几乎没云连商品药材。

味连,雅连和云连三种黄连中的生物碱的种类有所不同,通过HPLC图可以看出,雅连中含有表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱4个生物碱,至于是否含有药根碱还有待继续研究。而云连中则含有黄连碱、巴马汀和小檗碱3个生物碱,所收集的样品中暂时没有检测到药根碱和表小檗碱。而潘正等^[6-7]同时测定云连药材中6种生物碱的结果发现,云连药材中6种生物碱的平均含量差异较大,其中盐酸小檗碱最高,表小檗碱含量最低,甚至有些批次没有检测到,间接证明了云连中表小檗碱的含量较低,甚至难以检测出来。而该研究中检测出了药根碱,导致这样的结果差异可能与收集的药材产地有一定的关系。

崔灿^[8]对四川、湖北、重庆、陕西和云南等产地所产的黄连中生物碱含量的测定结果显示,不同产地黄连的各种生物碱含量和总生物碱含量有明显差异,表明黄连的生物碱含量与黄连生长环境有密

切关系。这再次证明了味连、雅连和云连中生物碱种类存在差异。

本文首次对雅连和云连中的生物碱种类进行比较,并利用其种类的差异为区分黄连品种提供依据,而化学成分方面的差异是否会导致药理药效方面的差异则有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:303.
- [2] 李彩虹,周克元. 黄连活性成分的作用及机制研究进展[J]. 时珍国医国药,2010,21(2):466-468.
- [3] 赵庆国,吴素体,王颖,等. 不同品种和产地黄连的总生物碱含量测定[J]. 时珍国医国药,2001,12(11):974-975.
- [4] 张莉,张小平. 国产黄连属植物的研究现状[J]. 安徽师范大学学报,2006,29(4):368-371.
- [5] 王永占,沈勇,史晓倩,等. HPLC同时测定云黄连中四种生物碱的含量[J]. 中国药师,2013,16(7):947-949.
- [6] 柳鑫,黄河,黄璐琦,等. 黄连药材原植物资源和市场品种调查[J]. 中国药师,2014,17(10):1691-1695.
- [7] 潘正,高运玲,江生,等. HPLC法同时测定云连药材中6种生物碱的含量[J]. 中国药房,2017,28(24):3408-3411.
- [8] 崔灿. HPLC法鉴定不同产地黄连饮片中含生物碱的研究[J]. 内蒙古中医药,2017,7(14):132.

(收稿日期:2018-10-18 编辑:姚霞)