·论　著·

不同生长发育期味连次生代谢产物积累变化研究

胡荣，冉继春，杨荣平，李隆云，瞿显友*(重庆市中药研究院，中药资源学(重庆)重点实验室，重庆 400065)

摘要：目的　研究重庆石柱道地中药材味连在不同生长发育期的次生代谢产物积累动态变化规律，为确定最佳采收期，实现该地区味连的GAP种植和质量控制提供理论依据。**方法**　采集不同生长发育期的4年生味连样品，采用HPLC测定表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱的含量。**结果**　表小檗碱含量在抽薹开花期的最高(1.82%)，冬季休眠期最低(1.33%)；黄连碱含量在新叶盛发期最高(3.86%)，冬季休眠期最低(2.79%)；巴马汀含量在新叶盛发期最高(2.32%)，冬季休眠期最低(1.69%)；小檗碱含量在新叶缓发期最高(10.89%)，冬季休眠期最低(8.28%)。**结论**　味连次生代谢产物的含量随植株的生长发育而波动，其中新叶盛发期、新叶缓发期和抽薹开花期的生物碱含量高于根茎充实期和冬季休眠期。最佳采收期应结合产量和次生代谢产物含量综合判断。

关键词：味连；次生代谢产物；生物碱；生长发育期

中图分类号：R284.1；R917.101　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1007-7693(2015)06-0649-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.06.001

Study on the Dynamic Accumulation of Secondary Metabolites in *Coptis Chinensis* Franch. in Different Growth and Development Period

HU Rong, RAN Jichun, YANG Rongping, LI Longyun, QU Xianyou*(*Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Key Laboratory of Resources of Chinese Materia Medica* (*Chongqing*), *Chongqing 400065, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE　To explore the dynamic accumulation of secondary metabolites in the genuine medicinal plant of Chongqing *Coptis chinensis* Franch. in different growth period in Shizhu county, and provide an experimental base for determination of optimal harvest time, GAP planting and quality control. **METHODS**　The contents of epiberberine, coptisine, palmatine and berberine of 4-year-old *Coptis chinensis* Franch. collected in different growth development period were analyzed by HPLC. **RESULTS**　The contet of epiberberine in sprouting stage was the highest(1.82%) and the lowest(1.33%) in winter dormant period; the contet of coptisine was the highest(3.86%) in new leaves flourishing period and the lowest(2.79%) in winter dormant period; the contet of palmatine was the highest(2.32%) in new leaves flourishing period and the lowest(1.69%) in winter dormant period; the contet of berberine was the highest(10.89%) in leaves slowly growing period and the lowest(8.28%) in winter dormant period. **CONCLUSION**　The content of secondary metabolites in *Coptis chinensis* Franch. fluctuates with its growth and development; and the content of alkaloid in new leaves flourishing period, slowly growing period and sprouting stage is higher than that in the period of rhizome filling and winter dormancy. The optimal harvest time should be determined by both the production and the quality.

KEY WORDS: *Coptis chinensis* Franch.; secondary metabolites; alkaloids; growth and development period

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3种分别均称“味连”、“雅连”、“云连”。其中，味连道地产区有石柱、巫山、巫溪、城口、利川等地，尤以石柱黄连最为著名。黄连的药用始载于《神农本草经》，被列为上品，能清热燥湿、泻火解毒，中医常用于主治温病热甚心烦，湿热痞满，湿热下痢等。中药材质量不但与产地、品种等有关，而且其有效成分的含量随生长发育期的变化而变化[1-3]。中药材有效成分多为次生代谢产物[4-9]，次生代谢产物是植物在长期进化中与环境相互作用的结果，次生代谢产物在植物提高自身保护和生存竞争能力、协调与环境关系上充

基金项目：国家科技支撑计划(2011BAI13B02-1)；国家中医药行业科技专项(201207002-04)；国家科技重大专项(2012ZX09304006)；重庆市集成示范计划项目(cstc2013jcsf10009)

作者简介：胡荣，女，博士生　Tel: (023)89029068　E-mail: hurong@cqacmm.com　***通信作者：**瞿显友，男，研究员　Tel: (023)89029180　E-mail: quxy@sina.com

当着重要的角色，其产生和变化比初生代谢产物与环境有着更强的相关性和对应性[10]。

味连次生代谢产物主要为生物碱类化合物，包括小檗碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀等生物碱。目前不同生长期黄连有效成分变化的研究已有报道[11-15]，但未见味连 5 个不同生长期有效成分变化的研究。因此，本研究通过分析不同生长发育时期味连的次生代谢产物动态积累，为其规范化种植及合理采收提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

味连样品于 2010 年 4 月—2011 年 3 月间采自重庆市石柱县黄连 GAP 基地同一地块，分别按黄连发育规律定期取样[16]。所采收黄连植株经重庆市中药研究院瞿显友研究员鉴定为 4 年生味连(*Coptis chinensis* Franch.)。盐酸小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所，批号：110713-200609，纯度：98%)，乙腈为色谱纯，其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

LC-20A 型液相色谱仪(Class VP6.1-sp1 色谱系统，日本岛津公司)；KQ250DB 型数控超声波清洗器(巩义市予华仪器有限责任公司)；AUW220D 型电子天平(日本岛津公司，十万分之一)；BS224S 型电子天平(德国赛多利斯公司，万分之一)。

2 方法与结果

2.1 供试品采集方法

2010 年 4 月 1 日—2011 年 3 月 5 日，在新叶盛发期(2010 年 4 月)、新叶缓发期(2010 年 5~7 月)、鳞芽出现根茎充实期(2010 年 8~10 月)、冬季休眠期(2010 年 11 月—2011 年 1 月)和抽葶开花期(2011 年 2~3 月)分别采样，3 次·月$^{-1}$。每次随机选择 1.2 mm^2 采集样品，除去泥及须根，称鲜重，80 ℃干燥并称重。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 测定方法参照中国药典 2010 年版，采用一测多评法，以盐酸小檗碱对照品的峰面积为对照，分别计算小檗碱、表小檗碱、黄连碱和巴马汀以及总生物碱的含量。色谱柱：Welchrom C_{18}(4.6 mm×250 mm，5 μm)；流动相：乙腈-0.05 mol·L^{-1} 磷酸二氢钾溶液(50∶50)(每 100 mL 中加十二烷基硫酸钠 0.4 g，以磷酸调节 pH 至 4.0)；检测波长：345 nm；流速：0.6 mL·min^{-1}；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。理论板数按盐酸小檗碱峰计算应均≥5 000，结果见图 1。

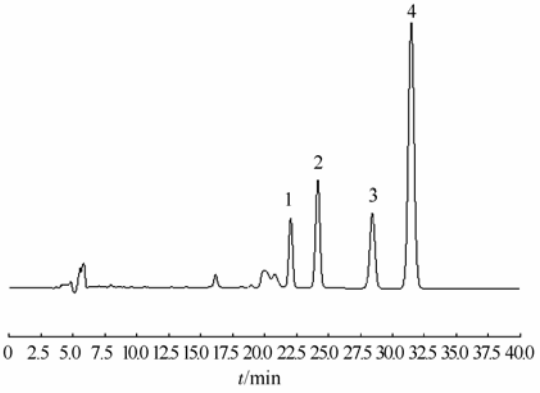

图 1 高效液相色谱图

1–表小檗碱；2–黄连碱；3–巴马汀；4–小檗碱。

Fig. 1 HPLC chromatograms

1–epiberberine; 2–coptisine; 3–palmatine; 4–berberine.

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品 2.51 mg，置于 25 mL 量瓶中，加入甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取药材粉末(过二号筛)0.2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇-盐酸(100∶1)混合液 50 mL，密塞，称定重量，超声处理(功率 250 W，频率 40 kHz)30 min，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液 2 mL，置 10 mL 量瓶中，用甲醇定容，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2.4 线性关系考察 精密量取“2.2.2”项下对照品溶液 0.50，1.00，2.00，4.00，8.00，16.00 mL 分别置于 25 mL 量瓶中，用甲醇溶液稀释至刻度，摇匀，每个浓度进样 10 μL。以盐酸小檗碱的峰面积(y)为纵坐标，进量样(x)为横坐标，得到回归方程 y=69.85x+21.02，r=0.999 6。结果表明，盐酸小檗碱在 2.01~64.32 μg·mL^{-1} 内线性关系良好。

2.2.5 不同生长时期味连生物碱的测定 取不同生长时期味连药材样品各适量，分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL，按“2.2.1”项下色谱条件测定，按标准曲线法分别计算样品生物碱的含量，结果见表 1。

2.3 统计学处理

试验处理及数据测定均重复 3 次，取其平均值，方差分析均采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。

2.4 表小檗碱含量的动态变化

表小檗碱含量动态变化曲线先缓慢上升，而

后急剧下降，再上升。抽葶开花期的表小檗碱含量最高为1.82%，新叶缓发期的含量次之为1.78%，冬季休眠期的含量最低为1.33%。新叶盛发期、新叶缓发期、抽葶开花期的表小檗碱含量均与鳞芽出现根茎充实期、冬季休眠期的含量具有显著性差异(P<0.05)；其他时期表小檗碱含量无显著性差异，结果见表1。

表 1 不同时期表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱和总生物碱含量方差分析(n=3)

Tab. 1 The variance analysis of the contents of epiberberine, coptisine, palmatine, berberine and total alkaloids in different growth period(n=3) %

生长发育时期	表小檗碱	黄连碱	巴马汀	小檗碱	总生物碱
新叶盛发期	1.72[1)2)]	3.86[1)2)]	2.32[2)]	9.85	17.76[2)]
新叶缓发期	1.78[1)2)]	3.73[1)2)]	2.14	10.89[1)2)]	18.54[1)2)]
鳞芽出现根茎充实期	1.41	2.99	1.95	8.75	15.10
冬季休眠期	1.33	2.79	1.69	8.28	14.09
抽葶开花期	1.82[1)2)]	3.35	2.18	9.44	16.80

注：Tukey 95% 为整体置信区间。与鳞芽出现根茎充实期比较，[1)]P<0.05；与冬季休眠期比较，[2)]P<0.05。

Note: The confidence intenal is 95%. Compared with rhizome filling period, [1)]P<0.05; compared with winter dormant period, [2)]P<0.05.

2.5 黄连碱含量的动态变化

随着味连的生长，黄连碱含量从新叶盛发期最高值 3.86%逐渐下降至冬季休眠期的最低值2.79%，抽葶开花期逐渐上升。新叶盛发期、新叶缓发期的含量与鳞芽出现根茎充实期和冬季休眠期存在显著差异(P<0.05)；其他生长时期之间无显著性差异，结果见表1。

2.6 巴马汀含量的动态变化

5 个生长时期中巴马汀含量动态变化趋势曲线呈两头高、中间低。巴马汀含量从新叶盛发期最高值2.32%逐渐下降，进入冬季休眠期时降到最低点1.69%，而后又在抽葶开花期积累达到一个较高水平。新叶盛发期与冬季休眠期存在显著差异(P<0.05)，其他生长时期之间无显著性差异，结果见表1。

2.7 小檗碱含量的动态变化

小檗碱含量动态变化为新叶盛发期逐渐积累，新叶缓发期达到最高峰 10.89%，鳞芽出现根茎充实期下降，冬季休眠期时小檗碱含量降至最低点8.28%，进入抽葶开花期后，含量逐渐升高。新叶缓发期分别与鳞芽出现根茎充实期、冬季休眠期的小檗碱含量存在显著性差异(P<0.05)；其他生长时期之间的小檗碱含量无显著性差异，结果见表1。

2.8 总生物碱含量的动态变化

总生物碱含量动态变化趋势为从新叶盛发期到新叶缓发期，总生物碱含量逐渐积累至整个生长时期的最高峰 18.54%。之后开始下降，历经鳞芽出现根茎充实期，在冬季休眠期时期降至整个生长期的最低点 14.09%。进入抽葶开花期后，总生物碱含量慢慢积累，含量逐渐上升。新叶缓发期分别与鳞芽出现根茎充实期、冬季休眠期的总生物碱含量存在显著性差异(P<0.05)；新叶盛发与冬季休眠期的总生物碱含量存在显著性差异(P<0.05)；其他生长时期之间的总生物碱含量无显著性差异，结果见表1。

3 讨论

从种子萌发到植株衰老枯死，完成一代生活史所经历的时间，叫做植物的生长发育周期。由于味连是多年生的草本植物，各个生育阶段是连续不断且相互重叠的。可以将味连生长时期化为新叶盛发期、新叶缓发期、鳞芽出现根茎充实期、冬季休眠期和抽葶开花期[17-19]。

植物生物碱是植物在长期的生态环境适应过程中为抵御动物、微生物、病毒及其他植物的攻击而形成的一类次生代谢产物，而生物碱要保护植物就必须分布在植物最需要保护的地方以及积累足够高的浓度。同时，由于次生代谢产物含量只有在初级代谢中间产物积累到一定程度并在调节次生代谢的酶促作用下才会出现高峰。

新叶盛发期、新叶缓发期和抽葶开花期这 3 个时期，光照充足，光合作用的速率较高，因此味连生长迅速，代谢旺盛。然而此时也易成为食草动物的食物或微生物侵袭的对象，所以生物碱含量处于较高水平，次生代谢的底物也不断增加。

而当味连的生长进入鳞芽出现根茎充实期和冬季休眠期时，这 2 个时期光照减少，代谢减弱，其体内累积的物质开始分解或转化，植物体生理活动减弱，消耗的营养物质相对较少，所以次生代谢产物含量不断降低。

本研究结果表明，味连的次生代谢产物含量随植株的生长发育而波动，而传统采收期(每年的10~11 月)的生物碱含量较低。由此提示味连最佳采收期的选择不应仅仅由产量来决定，还应结合次生代谢产物即药材的内在质量综合判断。因此，

针对不同生长发育期味连的次生代谢产物积累变化的研究是必要的。本课题的研究结果为保障味连药材的质量和产量提供了科学依据，为重庆石柱地区味连 GAP 种植提供了技术支撑。

REFERENCES

[1] ZANG P, WU X L, GAO Y G, et al. Comparative research on effective components and toxic components of Asari Radix Et Rhizoma form different areas [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(4): 416-421.

[2] YAO D Z, MIN H, HE H H, et al. Determination and comparison of total alkaloids content of Fritiliariae Thunbergh Bulbus from different habitats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(10): 1249-1251.

[3] LIU M, YU L, Li S f, et al. Determination of gallic acid and quercetin in different parts and period of traditional She Medicine-*Melastoma dodecandrum* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(11): 1351-1355.

[4] 陕西省林业研究所. 毛白杨[M]. 北京: 中国林业出版社, 1981: 18-21.

[5] 陆景陵. 植物营养学[M]. 第2版. 北京: 中国农业大学出版社, 2003: 192-210.

[6] WALSH L, BUTIN J N. Determination of soil and plant analysis [M]. Beijing: Agricultural Press, 1982: 278-296.

[7] LI J H, JIN Z X ,CHEN B, et al. Dynamic analysis of the secondary metabolites contents in the leaves of an endangered plant *Sinocalycanthus chinensis* [J]. J Northwest Forestry Univ (西北林学院学报), 2008, 23(2): 28-30.

[8] ZHANG K M, ZI M S, ZHANG T, et al. A study on the growth features of individuals and secondary metabolites of *Eucommia ulmoides* leaves [J]. Sci Silvae Sinicae(林业科学), 2001, 37(6): 45-51.

[9] ZHANG Y L, KAISAR S, WANG G P. Carbon and nitrogen rate and secondary metabolites change of *Ferula fukangensis* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2008, 19(2): 363-364.

[10] YANG B F, JIN Z X, LI J M. Dynamic analysis of the secondary metabolites contents in the leafblades of *Heptacodium miconioides* [J]. J Northwest Forest Univ(西北林学院学报), 2008, 23(6): 155-158.

[11] LI Z M, ZHANG T, SHI Y, et al. Determination of effective alkaloids contents in *Coptis teeta* Wall at different collecting period [J]. Southwest Chin J Agric Sci(西南农业学报), 2011, 24(4): 1294-1297.

[12] 朱朝德, 王远清, 薪全海,等. 不同生长龄期黄连产量及小案碱含量的试验[J]. 西北药学杂志, 1987, 2(2): 28-29.

[13] FANG X P, WANG T Z, ZHANG H. Determination of alkaloids in Rhizoma Coptidis of different age [J]. West China J Pharm Sci (华西药学杂志), 1988, 3(4): 214-216.

[14] WANG Y, QU X Y, ZHONG G Y, et al. Dynamic accumulation of effective components and biomass of *Coptis chinensis* in Hongya county [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2011, 36(16): 2162-2165.

[15] 彭强, 刘汉兰, 同大卫. 黄连不同生长期小檗碱含量的变化[J]. 中药材, 1989, 12(2): 7-8.

[16] MA K S, CHEN S J, ZHANG D L, et al. Study on the regulation of dynamic accumulation of the effective components of *Coptis chinensis* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2007, 18(9): 2093-2095.

[17] 瞿显友, 李隆云, 陈仕江. 黄连生态栽培技术[M]. 北京: 中国三峡出版社, 2008: 58.

[18] 瞿显友, 李隆云, 陈仕江.优质黄连产业化生产与经营[M]. 重庆: 重庆出版社, 2009: 18.

[19] 瞿显友, 李隆云, 钟国跃, 等. 黄连栽培进展[J]. 重庆中草药研究, 2009(1): 23-25.

收稿日期：2014-07-09

骨碎补总黄酮对骨质疏松模型大鼠 OPG/RANKL/RANK 轴系统的影响

刘康[1]，吴风晴[2]，吴连国[1]，史晓林[1*]（1.浙江中医药大学附属第二医院骨科，杭州 310005；2.浙江中医药大学第二临床医学院，杭州 310005）

摘要：目的 研究不同剂量骨碎补总黄酮灌胃对骨质疏松模型大鼠雌激素水平及骨保护素(orthopantomography，OPG)、核因子 κB 受体活化因子(receptor activator of NF-κB，RANK)和核因子 κB 受体活化因子配体(receptor activator of NF-κB ligand，RANKL)表达的影响，探讨其对骨代谢影响的可能机制。**方法** 通过去卵巢法造成骨质疏松大鼠模型，以戊酸雌二醇片 0.1 mg·kg^{-1}及低、中、高不同剂量骨碎补总黄酮(0.054，0.108，0.216 g·kg^{-1}·d^{-1})喂养 3 个月后，取动脉血，采用放射免疫法测定雌激素水平，用酶联免疫吸附法(ELISA)检测破骨细胞 OPG、RANK 和 RANKL 的表达。**结果** 与模型组 2 相比，各给药组雌二醇及 OPG 的表达量增加(P<0.05)，RANK 和 RANKL 的表达量减少(P<0.05)，且随着骨碎补总黄酮剂量的增加，雌二醇及 OPG 表达呈上升趋势，RANK 和 RANKL 表达均呈下降趋势。**结论** 不同剂量骨碎补总黄酮均影响 OPG/RANKL/RANK 轴系统，且随骨碎补总黄酮剂量的增加效果越明显，可能是通过调控 OPG/RANKL/RANK 轴系

基金项目：国家中医药管理局“十二五”中医药重点学科建设资助项目([2012]32)；浙江省自然科学基金(LY13H270004)；浙江省教育厅高校科研基金资助项目(Y201121321)

作者简介：刘康，男，博士，主治医师 Tel: 13819120616 E-mail: liukang1982@163.com *通信作者：史晓林，男，博士，主任医师，教授 Tel: 13516724553 E-mail: xlshi-2002@163.com