

黄皮树不同部位生长过程中主要生物碱成分的累积研究

季可可¹, 谢红旗², 蔡松³, 曾建国^{1,2*}

1. 湖南中医药大学 湖南省植物功能成分利用协同创新中心, 湖南 长沙 410208

2. 湖南农业大学 国家中药材生产(湖南)技术中心, 湖南 长沙 410128

3. 湖南湘泉药业股份有限公司, 湖南 吉首 416000

摘要: 目的 分析黄皮树不同生长树龄、不同采收季节、不同采收部位中小檗碱和黄柏碱的质量分数变化规律, 为增加中药材种植收益提供依据。方法 采用高效液相色谱分析方法对小檗碱和黄柏碱进行定量测定。结果 黄皮树中小檗碱和黄柏碱的累积高低顺序均为根皮>茎皮>根; 2种生物碱的量逐年变化, 前3年量变化趋势明显, 且第3年的茎皮量接近5%, 显示“幼龄黄柏”有开发价值, 第3年后2种生物碱量变化趋势减缓; 同一树龄10月份采收的黄柏, 其黄柏碱和小檗碱较高。结论 小檗碱和黄柏碱代谢累积规律的分析 and 总结, 为黄柏药材采收及资源的可持续利用提供了依据。

关键词: 黄柏; 小檗碱; 黄柏碱; 代谢累积; 幼龄黄柏

中图分类号: R282.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)23-3462-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.23.020

Accumulation of main alkaloids composition in growth process of different parts of *Phellodendron chinense*

Ji Ke-ke¹, Xie Hong-qi², Cai Song³, Zeng Jian-guo^{1,2}

1. National Herbal Medicine Production Technology Center, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Hunan Co-Innovation Center for Utilization of Botanicals Functional Ingredients (Hunan), Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

3. Hunan Xiang Quan Pharmaceutical Co., Ltd., Jishou 416000, China

Abstract: Objective To analyze the content variation of phellodendrine and berberine from *Phellodendron chinense* in different years, different seasons, and different parts, and to provide the basis for increasing the planting benefit of Chinese herbal medicine. **Methods** High performance liquid chromatography (HPLC) analysis method was used to determine the contents. **Results** The contents of phellodendrine and berberine from different parts of *P. chinense* showed as the following order: root barks > barks > roots. The contents of the two kinds of alkaloids changed each year. In first three years, the content change trend was obvious, and the content in barks was close to 5% in the third year. The young *P. chinense* had development value. After the third year, the contents of the two kinds of alkaloids changed slowly. The contents of phellodendrine and berberine in October were higher. **Conclusion** The metabolic accumulation rules of berberine and phellodendrine are summarized, in order to provide the basis for the sustainable utilization of *P. chinensis* resources.

Key words: *Phellodendron chinense* Schneid.; berberine; phellodendrine; metabolic accumulation; young barks of *P. chinensis*

黄柏为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮, 习称“川黄柏”^[1]。《中国药典》2010年版(以下简称“药典”)将来源于芸香科的植物黄檗 *Phellodendron amurense* Rupr. 的干燥树皮收录为“关黄柏”。黄柏作为传统中药材已有上千年药用历史, 其性味苦寒, 有清热燥湿、

泻火除蒸、解毒疗疮之功效^[2]。现代药理学研究表明黄柏具有广泛的药理活性, 如抗菌、抗病毒、镇咳、降压以及增强免疫等^[3-6]。由于黄柏生长缓慢、周期长、见效慢, 一般在10年以上才可采收。目前国家已禁止野生黄柏等42种国家重点保护的野生动植物上市交易, 黄柏的供应可能在多年后会出现

收稿日期: 2014-08-15

基金项目: 国家科技支撑计划(2012BAI29B04); 湖南省科技重大专项(2013FJ1011)

作者简介: 季可可(1990—), 女, 湖南长沙人, 硕士研究生, 研究方向为中药化学与分析。Tel: 13574868034 E-mail: gliazzuri5@hotmail.com

*通信作者 曾建国(1965—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药资源与开发。Tel: 13808453398 E-mail: ginkgo@world-way.net

较大缺口, 价格也将逐年攀升, 直接威胁到企业的生产成本。因此, 尽可能在较短生长年限(3~5年内)获得生物碱量大的黄柏植株或部位, 基于此从而建立黄柏丰产栽培体系, 缩短黄柏种植周期, 提高农民种植积极性, 将有效缓解黄柏资源供给不足的现状, 满足制药企业对黄柏资源的要求。

黄柏中主要活性成分为生物碱, 其中小檗碱量最高。本实验采用高效液相色谱(HPLC)对不同生长树龄、不同采收时间、不同采收部位黄柏中的小檗碱和黄柏碱的量变化进行研究, 目的是在尽量短的生长时间内获得较高小檗碱的积累水平的原料, 并确定最佳年份和最佳采收部位。

1 材料与仪器

1.1 仪器与试剂

Agilent 1260 Series 高效液相色谱仪, 包括 G1329B 在线脱气机、G1311C 二元高压梯度泵、G1315D 二极管阵列检测器(美国安捷伦公司); Unitary C₁₈ 色谱柱(华谱新创科技有限公司); AE240 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); KQ5200DE 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司); 冷冻离心机(HERMLE 2323K, 德国); DHG-9246A 型电热恒温干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); FW100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

甲醇(色谱纯)、十二烷基磺酸钠(分析纯)、磷酸(分析纯)、乙腈(色谱纯)、水为 Milli-Q 超纯水。

盐酸小檗碱对照品(批号 110713-201212, 质量分数 86.7%), 购自中国食品药品检定研究院; 盐酸黄柏碱对照品(批号 111895-201303, 质量分数 95.8%) 购自上海同田生物技术有限公司。

1.2 材料

2012年7月、10月和2013年1月、3月采收9种不同树龄(1、2、3、4、5、10、15、20、25年)新鲜黄皮树的根皮、茎皮, 切块。

2012年7月和2012年10月2个月份采收的9种不同树龄新鲜黄皮树的根(木质部)的切块。

2012年10月和2013年1月2个月份1年和2年生黄皮树茎(木质部), 切块。

样品来自湘西花垣县道二乡, 均由湖南湘泉药业股份有限公司提供。所有样品经湖南中医药大学杨广民教授鉴定为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid.。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

精密称取盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱对照品用适量甲醇溶解并转移至10 mL量瓶中, 加甲醇至刻度, 配制成181.4 μg/mL的盐酸小檗碱和107.5 μg/mL的盐酸黄柏碱对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取样品粉末0.5 g, 置于150 mL的具塞锥形瓶中, 加入1%醋酸-甲醇50 mL, 称定质量, 超声提取(超声温度为35℃, 功率为250 W、40 kHz) 30 min, 放冷至室温, 再称定质量, 用1%醋酸-甲醇补足减少的质量, 10 000 r/min 离心10 min, 取上清液用0.45 μm的有机滤膜滤过, 即得。

2.3 色谱条件

采用 Unitary C₁₈ 柱(150 mm×2.1 mm, 5 μm)同时测定样品中小檗碱和黄柏碱。体积流量0.25 mL/min; 流动相乙腈-0.1%磷酸溶液(每100毫升加十二烷基磺酸钠0.2 g), 梯度洗脱(0~15 min, 70%~40% A; 15~17 min, 40%~10% A; 17~19 min, 10%~70% A); 检测波长: 小檗碱365 nm、黄柏碱284 nm; 柱温25℃; 进样量5 μL。在此条件下, 样品中黄柏碱和小檗碱与相邻成分达到良好基线分离, 见图1。

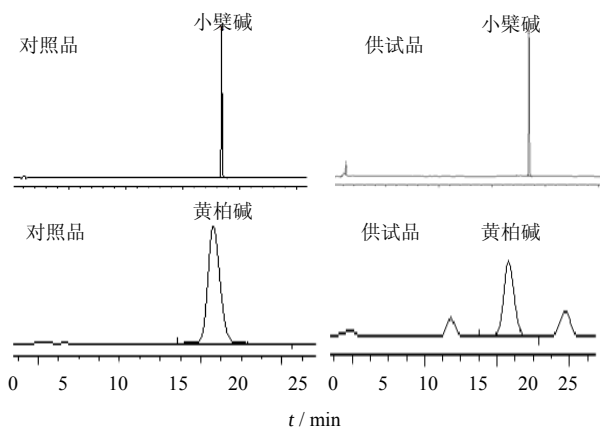


图1 对照品和样品 HPLC 色谱

Fig. 1 HPLC of reference substance and sample

2.4 线性关系的考察

分别精确量取盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱对照品溶液1.5、2、3、4、5、6 μL, 用HPLC检测, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归分析, 回归方程分别为盐酸小檗碱: $Y=76\,078X+1\,575$, $r=0.999\,4$; 盐酸黄柏碱: $Y=28\,081X+6$, $r=0.999\,7$,

盐酸小檗碱在 0.132~0.254 mg/mL, 盐酸黄柏碱在 0.046~0.152 mg/mL 呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

取适量小檗碱、黄柏碱对照品溶液, 在上述色谱条件下, 重复进样 6 次, 测得小檗碱、黄柏碱峰面积, 计算 RSD 分别为 0.15%、0.64%。结果表明, 该方法精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液 2 μ L, 分别在 0、2、4、8、16、24 h 按上述色谱条件测定, 测得小檗碱、黄柏碱峰面积, RSD 分别为 0.04%、0.22%, 结果表明, 供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

精密称取 2 年生黄皮树茎皮粉末 6 份, 每份 0.5 g, 平行制备供试品溶液, 在色谱条件下分析测定。计算 RSD 分别为 1.50%、1.80%, 表明测定方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已测定黄柏碱和小檗碱的样品粉末 6 份, 加 1%醋酸-甲醇溶液 50 mL 超声提取, 所得溶液用 HPLC 检测, 测得小檗碱、黄柏碱平均回收率分别为 96.90%、104.1%; RSD 为 1.75%、1.89%。

3 结果与分析

3.1 黄皮树根皮、茎皮中小檗碱和黄柏碱量累积分析

取样品根皮、茎皮各 36 份, 取样量均为 1 g,

进行样品处理和测定, 测得根皮、茎皮两部位中小檗碱和黄柏碱的量见表 1~4。

由表 1~4 中数据分析, 黄皮树中黄柏碱和小檗碱的量最高的部位是根皮, 其根皮中黄柏碱与小檗碱质量分数的平均值分别为 0.59%、5.31%; 茎皮略低, 为 0.33%、4.21%。

根皮与茎皮的小檗碱积累在第 3 年达到接近 5%, 可考虑用“幼龄黄柏”即生长年限在 3 年左右的黄皮树茎皮, 通过大规模密植解决因生长年限过长的资源需求和短时期追求种植效益的现实问题, 采收地上部分后还可在 3 年后继续采收茎皮。从表 1~4 数据来看, 根皮、茎皮的差异不大, 开发“幼龄黄柏”的可能性较大。

由表 1~4 数据分析, 4 个不同月份采收的黄柏中小檗碱、黄柏碱量有所不同, 但有一定规律。10 月采收的黄柏中小檗碱、黄柏碱量均高于其他月份, 7 月采收的黄柏中生物碱累积量最低。因此, 证实传统秋季采收的合理性。

3.2 黄皮树根(木质部)中小檗碱和黄柏碱量累积分析

取黄皮树根(木质部)共 18 份样品, 取样量均为 1 g, 进行样品处理和测定, 测得根(木质部)中小檗碱和黄柏碱的量, 结果见表 5 和 6, 9 种不同树龄黄皮树的根(木质部)中黄柏碱和小檗碱的量, 最后取平均值, 分别为 0.04%、0.42%。

表 1 4 个月份采收的 9 种树龄黄皮树茎皮中小檗碱的质量分数

Table 1 Contents of berberine in stem barks of *P. chinense* of nine tree ages from four months

采收月份	小檗碱质量分数 / %								
	1 年	2 年	3 年	4 年	5 年	10 年	15 年	20 年	25 年
1 月	0.88	1.74	4.67	4.76	4.79	4.80	5.06	5.18	5.49
3 月	0.91	1.77	4.69	4.81	4.83	4.82	5.22	5.33	5.79
7 月	0.82	1.74	4.59	4.62	4.76	4.76	4.93	5.09	5.48
10 月	0.96	1.78	4.73	4.88	4.93	4.96	5.28	5.72	5.94
平均值	0.89	1.76	4.67	4.77	4.83	4.84	5.12	5.33	5.68

表 2 4 个月份采收的 9 种树龄黄皮树根皮中小檗碱的质量分数

Table 2 Contents of berberine in root barks of *P. chinense* of nine tree ages from four months

采收月份	小檗碱质量分数 / %								
	1 年	2 年	3 年	4 年	5 年	10 年	15 年	20 年	25 年
1 月	1.31	2.31	4.71	5.32	5.55	6.58	6.66	7.05	7.28
3 月	1.37	2.36	4.96	5.67	5.85	6.66	6.79	7.08	7.34
7 月	1.00	2.07	4.69	5.07	5.12	6.31	6.36	6.53	6.58
10 月	1.46	2.57	5.48	6.17	6.33	6.87	7.12	7.74	7.90
平均值	1.29	2.33	4.96	5.56	5.71	6.61	6.98	7.10	7.28

表3 4个月份采收的9种树龄黄皮树茎皮中黄柏碱的质量分数

Table 3 Contents of phellodendrine in stem barks of *P. chinense* of nine tree ages in four months

采收月份	黄柏碱质量分数 / %								
	1年	2年	3年	4年	5年	10年	15年	20年	25年
1月	0.12	0.17	0.25	0.29	0.33	0.35	0.36	0.36	0.43
3月	0.13	0.18	0.25	0.31	0.36	0.45	0.47	0.49	0.51
7月	0.11	0.12	0.22	0.24	0.29	0.31	0.32	0.35	0.39
10月	0.14	0.20	0.35	0.36	0.41	0.47	0.49	0.51	0.59
平均值	0.13	0.17	0.27	0.30	0.35	0.40	0.41	0.43	0.48

表4 4个月份采收的9种树龄黄皮树根皮中黄柏碱的质量分数

Table 4 Contents of phellodendrine in root barks of *P. chinense* of nine tree ages in four months

采收月份	黄柏碱质量分数 / %								
	1年	2年	3年	4年	5年	10年	15年	20年	25年
1月	0.19	0.20	0.45	0.63	0.60	0.67	0.69	0.80	0.85
3月	0.21	0.22	0.52	0.66	0.68	0.70	0.74	0.85	1.05
7月	0.14	0.17	0.37	0.38	0.45	0.51	0.60	0.64	0.78
10月	0.24	0.30	0.54	0.71	0.74	0.81	0.83	0.89	1.29
平均值	0.20	0.22	0.47	0.60	0.62	0.67	0.72	0.80	0.99

表5 2个月份采收的9种树龄黄皮树根(木质部)中小檗碱的质量分数

Table 5 Contents of berberine in roots of *P. chinense* of nine tree ages in two months

采收月份	小檗碱质量分数 / %								
	1年	2年	3年	4年	5年	10年	15年	20年	25年
7月	0.02	0.10	0.16	0.35	0.39	0.42	0.51	0.59	0.84
10月	0.03	0.13	0.32	0.39	0.41	0.48	0.72	0.83	0.92
平均值	0.03	0.12	0.24	0.37	0.40	0.45	0.62	0.71	0.88

表6 2个月份采收的9种树龄黄皮树根(木质部)中黄柏碱的质量分数

Table 6 Contents of phellodendrine in roots of *P. chinense* of nine years in two months

采收月份	黄柏碱质量分数 / %								
	1年	2年	3年	4年	5年	10年	15年	20年	25年
7月	0.0	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06
10月	0.0	0.02	0.03	0.04	0.04	0.05	0.06	0.07	0.09
平均值	0.0	0.015	0.025	0.03	0.03	0.04	0.05	0.06	0.075

3.3 黄皮树茎(木质部)中小檗碱和黄柏碱量累积分析

取黄皮树茎(木质部)共4份样品,取样量均为1g,进行样品处理和测定,测得茎(木质部)中小檗碱和黄柏碱的量,见表7和8。

从表中数据可看出,在秋(10月)、冬(1月)两季采收的1年生、2年生黄皮树茎(木质部)样品中,由于黄柏碱含量较低,其增长量不大,其中1月采收1年生与2年生黄皮树茎(木质部)中黄柏碱质量分数均为0.1%,未见增长;但小檗碱增长速率可观,1月与10月采收的黄皮树茎(木质部),2年生相比1年生样品中小檗碱质量分数分别增长3倍和2.3倍。

比较茎皮、根皮和根(木质部)中小檗碱和

表7 黄皮树茎(木质部)中小檗碱的质量分数

Table 7 Contents of berberine in stems of *P. chinense*

采收月份	小檗碱质量分数 / %	
	1年	2年
1月	0.02	0.08
10月	0.03	0.10
平均值	0.025	0.09

黄柏碱量,根皮中小檗碱和黄柏碱量高一些,但生物量相对小得多。根(木质部)远远低于茎皮、根皮中生物碱累积量,且样品中树龄最高(25年)的黄柏根(木质部)中小檗碱量也仅为0.88%。

4 讨论

本研究以黄柏碱、小檗碱为指标成分,研究产地为湖南吉首的不同生长年限的黄皮树中黄柏碱与

表8 黄皮树茎(木质部)中黄柏碱的质量分数

Table 8 Contents of phellodendrine in stems of *P. chinense*

采收月份	黄柏碱质量分数 / %	
	1 年	2 年
1 月	0.01	0.01
10 月	0.01	0.02
平均值	0.01	0.015

小檗碱在不同树龄、不同季节、不同生长部位中的代谢累积变化规律,采用 HPLC 法测定其小檗碱和黄柏碱量进行数据比较,结果显示小檗碱和黄柏碱的量逐年变化,前 3 年的量变化趋势大,随后小檗碱和黄柏碱量增幅趋势减缓;在黄皮树不同采收部位中,小檗碱和黄柏碱的累积顺序为根皮>茎皮>根;此外,比较同一树龄 1、3、7、10 月采收的黄皮树中小檗碱和黄柏碱量,10 月采收的黄皮树中小檗碱和黄柏碱量略高。本实验室曾做过“幼龄厚朴”研究工作,显示厚朴根皮的厚朴酚累积量远远大于茎皮,可以尝试通过密植的方法得到原料^[7]。但黄皮树根皮与茎皮的量相差不大,证明地上部分茎皮可用于开发,地下根可用于再生。

因此,本实验还将密植黄皮树(3 年生)的茎皮年均亩产量与野生黄皮树(15 年生)茎皮年均每公顷产量进行了比较。采收的 15 年生黄皮树 10 株,株间距为 1.8 m×2.5 m,每公顷约种植 2 100 株。剥取其新鲜茎皮称量,阴干处理,平均单株茎皮 7 kg,茎皮小檗碱量为 5.12%,每公顷产茎皮 14 700 kg,年均每公顷产茎皮 975 kg,每公顷产小檗碱为 750 kg,年均每公顷产小檗碱为 49.5 kg。

另外采收种植 3 年的黄皮树 10 株,株间距为 0.5 m×0.6 m,每公顷约种植 33 000 株。剥取其新鲜茎皮称量,阴干处理,平均单株茎皮 57 g,茎皮小檗碱量为 4.69%,每公顷产茎皮 1 875 kg,年均每公顷产茎皮 630 kg,每公顷产小檗碱为 88.5 kg,年均每公顷产小檗碱为 30 kg。

若要提高小檗碱每公顷产量,可改变 3 年生黄皮树的种植密度,以下是 2 种植方案。

3 年生黄皮树种植方案一:株间距为 0.4 m×0.5 m,每公顷约种植 49 500 株。理论上,其单株茎皮量以及茎皮小檗碱量应与按株间距 0.5 m×0.6 m 种植所得的黄皮树单株茎皮量大致相当。若采用该种植方案,故可推算出其每公顷产茎皮应该可达 2820 kg,年均每公顷产茎皮约 945 kg,每公顷产小檗碱约 195 kg,年均每公顷产小檗碱约 64.5 kg。

3 年生黄皮树种植方案二:株间距为 0.15 m×0.6 m,每公顷约种植 111 000 株。选择该种植间距种植

方法,能使树枝、树叶朝间距宽的两边(60 cm 垄距)生长,从而减少行间生长,该方法在保证树木正常生长需要的同时尽可能将每行中的树木密植。若采用该种植方案所得的黄皮树单株茎皮量和茎皮小檗碱量与上述数据偏差仍不大,那么,理论上该种植高密植的 3 年生黄皮树每公顷产茎皮量可达 6 300 kg,年均每公顷产茎皮 2 100 kg,每公顷产小檗碱应该可达 270 kg,年均每公顷产小檗碱约 90 kg。

进行科学田间管理、优化施肥方案都能增加黄皮树茎皮产量,且采用增皮素^[8]也能促进茎皮生长量。另外,单采的野生 3 年生黄皮树,其中有高达每株 0.11 kg 干茎皮,小檗碱质量分数为 4.73%,由此也间接说明密植黄皮树其 3 年生茎皮的小檗碱量还有提升空间。采用该方法密植幼龄黄柏从其茎皮中获取小檗碱,将使所需种植周期大大缩短,时间和资金上投入也远远小于传统种植方法。该方法土地利用率高,收效快,单位面积小檗碱年产量高,黄柏原料小檗碱含量高,投资见效快,农民种植积极性高,有利于规模化、标准化生产黄柏药材的特点,极具应用、推广价值。若方案二能得以实施,将能带来较以往传统种植方法更大的经济效益,“幼龄黄柏”开发前景可观。

本实验总结的小檗碱和黄柏碱代谢累积规律,为黄柏药材采收及资源的可持续利用提供了依据。湘西州属中亚热带山区季风湿润气候,地理位置及气候环境适应黄皮树的生长。黄柏是我国常用大宗中药材,也是湖南特色中药材,利用湘西特色中药材资源,抓住机遇,发挥优势,发展生物医药特色优势产业,将带动农民种植黄皮树的积极性,具有重大的直接经济利益。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 李行诺,翟文丰,周孟宇,等. 黄柏化学成分研究 [J]. 浙江工业大学学报, 2012, 40(3): 244-246.
- [3] 张倩. 关黄柏与川黄柏质量标准的研究 [D]. 北京中医药大学, 2009.
- [4] 吴嘉瑞,张冰,张光敏. 黄柏药理作用研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2009, 5(11): 160-162.
- [5] 张冠英,董瑞娟,廉莲. 川黄柏关黄柏的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(10): 812-821.
- [6] 石磊,姬志强,李永丽,等. 黄柏胶囊的临床应用概述 [J]. 中国药业, 2012, 21(14): 108-109.
- [7] 曾建国,常新亮,贺晓华,等. 幼朴与传统厚朴的等效性研究 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 673-680.
- [8] 童新旺,曹谷云,李柏海,等. 杜仲专用型植物增皮素的研制与应用 [J]. 技术开发, 1996(4): 27-28.