

DOI: 10.5846/stxb201302060255

徐丽娇, 邱婧珺, 孙铭隆, 张玉红, 夏春梅, 周志强. 季节和地理差异对天然黄檗小檗碱和药根碱含量的影响. 生态学报, 2014, 34(21): 6355-6365.  
Xu L J, Qiu J J, Sun M L, Zhang Y H, Xia C M, Zhou Z Q. The seasonal and geographical variance analysis of the berberine and jatrorrhizine contents in natural populations of *Phellodendron amurense*. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(21): 6355-6365.

## 季节和地理差异对天然黄檗小檗碱和 药根碱含量的影响

徐丽娇<sup>1</sup>, 邱婧珺<sup>1</sup>, 孙铭隆<sup>1</sup>, 张玉红<sup>1</sup>, 夏春梅<sup>2</sup>, 周志强<sup>1,\*</sup>

(1. 东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室, 哈尔滨 150040; 2. 东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040)

**摘要:** 用高效液相色谱法测定了黄檗根皮、茎皮、多年生枝皮、1 年生枝和叶片中小檗碱和药根碱的含量, 研究黄檗不同部位两种生物碱的季节和地理差异。结果表明: 不同季节, 天然黄檗各部位的小檗碱、药根碱含量均表现为: 根皮>茎皮>多年生枝皮>1 年生枝>叶片。小檗碱含量随着季节变化在各部位呈现夏季升高, 到秋季下降的趋势。而药根碱在不同部位中的含量随着季节变化的规律不同。根皮、茎皮中的药根碱含量随着季节推移逐渐增多, 在夏季升高不明显, 而到秋季大量积累。多年生枝皮、1 年生枝、叶片中的药根碱在 3 个季节表现则为先降后升。从纬度水平上看, 不同地域间黄檗各部位的生物碱差异显著, 在调查的 40°—50°N 范围内, 黄檗两种生物碱的含量普遍在纬度低的地区较高, 随着纬度增大先逐渐降低, 到 N44°左右达到最低值, 到了高纬度地区略有回升。

**关键词:** 黄檗; 小檗碱; 药根碱; 不同部位; 季节差异; 纬度差异

## The seasonal and geographical variance analysis of the berberine and jatrorrhizine contents in natural populations of *Phellodendron amurense*

XU Lijiao<sup>1</sup>, QIU Jingjun<sup>1</sup>, SUN Minglong<sup>1</sup>, ZHANG Yuhong<sup>1</sup>, XIA Chunmei<sup>2</sup>, ZHOU Zhiqiang<sup>1,\*</sup>

1 Key Laboratory of Forest Ecology of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

2 College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract:** *Phellodendron amurense* Rupr. (Rutaceae) is a deciduous tree commonly called the Amur cork tree. The bark of *P. amurense* has been widely used in China, Japan, and Korea for hundreds of years for its anti-inflammatory and anti-tumor activities. It is regarded as a rich source of pharmaceutically important isoquinoline alkaloids, including berberine and jatrorrhizine. Berberine currently is recommended in China for the treatment of gastroenteritis, dysentery, tuberculosis, scarlet fever, acute tonsillitis, and respiratory tract infections. The substantial increase in its exploitation has caused serious damage to wild populations. At present, large areas of wild *P. amurense* trees are rare, and the species is severely endangered in China. Its extensive medicinal use has raised interest in its cultivation. The quantities of secondary metabolites in plants, including the *P. amurense* species, vary across habitats, geographical locations, seasons, and parts of the plant. The generation and variation of secondary metabolites has a stronger correlation and dependence on the environment than primary metabolites. The synthesis and accumulation of secondary metabolites are not only significantly affected by genetics, but also by environmental factors such as light, temperature, and moisture. Therefore, secondary metabolite levels within a species may differ among geographic populations. However, few studies have assessed variation in alkaloid content in *P. amurense*. This study attempted to explore alkaloid content variance of *P. amurense* among various

基金项目: 林业公益性行业科研专项(201104066)

收稿日期: 2013-02-06; 网络出版日期: 2014-03-13

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: uwezhou@126.com

habitats in Northeastern China. The berberine and jatrorrhizine contents in different parts (root bark, trunk bark, perennial branch bark, annual branch and leaf) were measured; and the seasonal and geographical variances of the two kinds of alkaloids in organs were analysed by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the seasonal content sequence of berberine and jatrorrhizine in different parts were the same root bark > trunk bark > perennial branch bark > annual branch > leaf. The contents of berberine in various parts increased from spring to summer but fell in autumn. The contents of jatrorrhizine in different parts did not directly line up with the seasonal variation: jatrorrhizine in root bark and trunk bark gradually increased with the season passing, but the enhanced value was not obvious in summer; by autumn however, it accumulated massively. For the perennial branch barks, annual branches and leaves, the jatrorrhizine dropped from spring to summer, and increased in autumn. Along the latitude scale, the two kinds of alkaloids had the significant geographical variance. Normally, the content of alkaloids decreased gradually with the latitude enhancing, and reached the lowest value at  $N44^\circ$ , and then reversed slightly. In the northeast China, the low latitude areas (such as Fengcheng and surrounding areas) could be confirmed for breeding and qualified medicine provenance of *P. amurensis*, the raw material collection should be progressed in the summer or autumn better, and consider replaced trunk bark with perennial branch bark. The above results would help us to know the distribution regulation of the two kinds of alkaloids on multiple scales and provide the theoretical support for optimal cultivation and efficient, sustainable utilization of the natural resources found in *P. amurensis*.

**Key Words:** *P. amurensis*; berberine; jatrorrhizine; different parts; seasonal variance; geographical variance

黄檗 (*Phellodendron amurensis*) 又名黄菠萝, 为芸香科黄檗属阔叶乔木<sup>[1-3]</sup>, 中国特有种。黄檗是著名中药“关黄柏”的药源植物, 关黄柏的主要化学成分为小檗碱 (Berberine), 药根碱 (Jatrorrhizine) 等<sup>[4]</sup>, 具有独特的抗真菌作用<sup>[5-7]</sup>。近年来, 随着天然药物开发的日渐兴起, 天然黄檗资源日渐匮乏。据统计, 2010 年黄檗的国内年药材需求量超过 2000 t, 且未来 3a 每年有近 400 t 的需求增长<sup>[8]</sup>。巨大的市场需求、无序采挖而导致的可用自然资源锐减, 已给黄檗的资源保护和持续利用带来了沉重压力, 资源保护与利用的矛盾非常突出。1989 年出版的《中国珍稀濒危植物》和 1990 年出版的《中国植物红皮书》都把黄檗列入其中<sup>[9-10]</sup>。1999 年国务院公布的国家重点保护野生植物名录, 将黄檗列为国家 II 级重点保护的野生濒危植物。

黄檗天然种群主要分布于中国东北大兴安岭东南部、小兴安岭、长白山、完达山、千山及华北地区燕山山脉以北等地, 地理位置在北纬  $52^\circ$ — $39^\circ$ , 海拔 300—1200 m<sup>[11-12]</sup>。黄檗在中国东北的天然分布区超过  $261.64 \times 10^4 \text{ hm}^2$ <sup>[13]</sup>, 在这样广阔的分布区和丰富多样的生境条件下, 天然黄檗的有效成分很可能由于环境因子变化而产生明显差异。同时, 由于植物的次生代谢产物在自然状态下含量低, 如何提高

植物次生代谢产物的产量是关系到天然药物的开发能否应用于实际生产的关键环节。目前, 仅有一些黄檗的研究涉及到林学基础, 其他的少量研究关于病虫害以及蝶类的化学生态方面, 更多的研究工作则集中在黄檗植物化学 (生物碱等) 与药理学方面, 对于不同地理位置分布下黄檗天然种群生物碱含量的差异研究较少。本文以东三省 10 个采样点 312 样株的数据为依据, 试图揭示天然黄檗的小檗碱、药根碱含量受不同部位、不同季节和不同纬度的影响以及植物次生代谢物适应不同生境的生态学意义, 同时也为高效、可持续利用天然黄檗资源提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 采样地概况及样本处理

针对黄檗的分布状况, 选取黄檗集中分布的中国东北三省地区 (黑龙江, 吉林, 辽宁), 按照纬度梯度 (纬度梯度基数) 选取了 10 个采样点。北至北纬  $49^\circ 51' 19.7''$  (黑河), 南至  $40^\circ 32' 39.11''$  (凤城)。经度范围从  $E123^\circ 30' 34.00''$  (法库) 至  $E130^\circ 11' 11.0''$  (穆稜), 该区域属于寒带大陆性季风气候, 年均温  $0.97$ — $6.28^\circ$ , 降雨量 524.34—775.17 mm, 涵盖了黄檗的主要分布区。采样时间为 2011 年 5 月—2011

年 10 月,采用典型取样法。每个采样地选取胸径为 10—40 cm 的黄檗,依据采集的年轮芯数据,做出了每个采样地点的胸径-年龄曲线。筛选年龄为 20—

30a 间的样树,分别取每株样树根皮,1.3 m 处茎皮,多年生枝皮,1、2 年生枝,叶片 5 处器官作为研究样本。全部样本在 60℃<sup>[14]</sup> 烘至恒重,密封保存。

表 1 采样地信息

Table 1 The basic information of sampling sites

地点 Site	纬度 Latitude/ (°N)	经度 Longitude/ (°E)	年均温 Mean temperature per year/℃	降水量 Precipitation per year/mm	日照时数 Sunshine time per year/h	取样株数 Number of the sample tree	平均年龄 Average age/a
辽宁凤城	40.54	123.77	8.41	968.63	2376.84	35	23.5
辽宁桓仁	41.19	124.87	7.12	805.78	2256.92	35	24.8
辽宁新宾	41.83	124.89	5.55	749.97	2198.92	31	25.7
吉林临江	41.94	123.99	5.56	796.53	2183.44	26	22.4
辽宁清原	42.20	124.89	6.18	769.76	2374.89	35	28.3
辽宁法库	42.46	123.51	7.45	572.86	2588.18	30	26.3
吉林安图	43.17	129.10	4.27	646.45	2197.87	30	26.4
黑龙江穆棱	44.40	130.19	3.85	511.99	2198.92	30	23.3
黑龙江鹤岗	47.39	129.94	3.77	637.38	2256.92	30	26.9
黑龙江黑河	49.86	127.18	0.89	527.36	2376.84	30	23.6

## 1.2 实验仪器与药品

小檗碱标准品购于中国药品生物制品检定所。高效液相色谱仪(Waters 2996 自动进样器、2487 紫外检测器、KJA HIQ sil C18 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)。高速离心机(德国 Heraeus 22RBiofuge、电子天平(瑞士 AB104 型)。超声波仪(江苏昆山超声仪器公司,KQ-100DB)。色谱纯乙腈(美国 TEDIA 公司),水(超纯水),无水乙醇(色谱纯),磷酸二氢钾、十二烷基磺酸钠(分析纯,北京化学试剂公司)。

## 1.3 色谱条件

黄檗样品中生物碱含量参照秦彦杰<sup>[15]</sup>的方法,略有改动。流动相为乙腈/水溶液 1:1 (1000 mL 水溶液中含磷酸二氢钾 3.4 g 及十二烷基磺酸钠 1.7 g),流速 1.0 mL/min;检测波长 345 nm;进样量 10 μL。图 1 为标准品和样品的保留时间。

## 1.4 样品溶液的制备

精密称取样品 0.100 g,用 63% 的乙醇定容至 5 mL,超声 3 h(温度 40℃,功率 100 W),在 12000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液 1 mL 装入进样瓶。每个样重复 3 次。

## 1.5 数据的采集和统计方法

采用 SPSS 18.0 软件对不同地点的黄檗树根皮,茎皮,多年生枝皮,1 年生枝和叶片中小檗碱、药根碱的含量进行 One-way 方差分析(ANOVA)计算,差异显著,再分别以各采样地的地理坐标为自变量

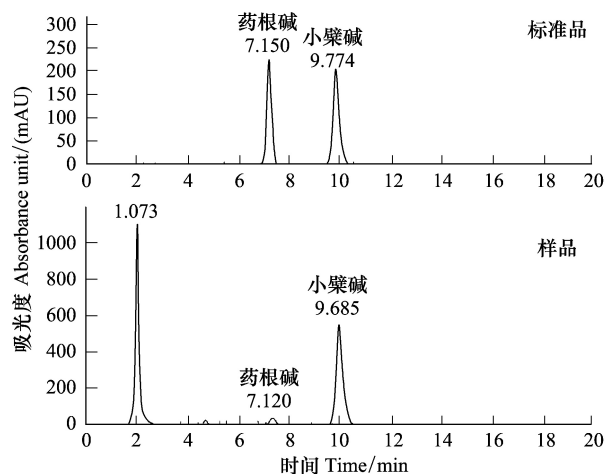


图 1 药根碱和小檗碱的保留时间

Fig.1 The retention time of berberine and jatrorrhizine

作及回归分析,建立方程并进行显著性检验。探讨各种参数对小檗碱、药根碱含量的影响程度。

## 2 结果与分析

对 2011 年采集的东北 3 个省份 10 个地区 312 株黄檗不同季节根皮、茎皮、多年生枝皮、1 年生枝、叶片的小檗碱和药根碱含量进行了分析。

### 2.1 黄檗不同部位小檗碱含量的季节差异

如图 2 所示,在春、夏、秋 3 个季节,黄檗各部位小檗碱的含量均为:根皮>茎皮>多年生枝皮>1 年生枝>叶片。根皮中的小檗碱含量最多,茎皮和多年生

枝的小檗碱含量相近,而 1 年生枝和叶片中的小檗碱含量普遍较少。

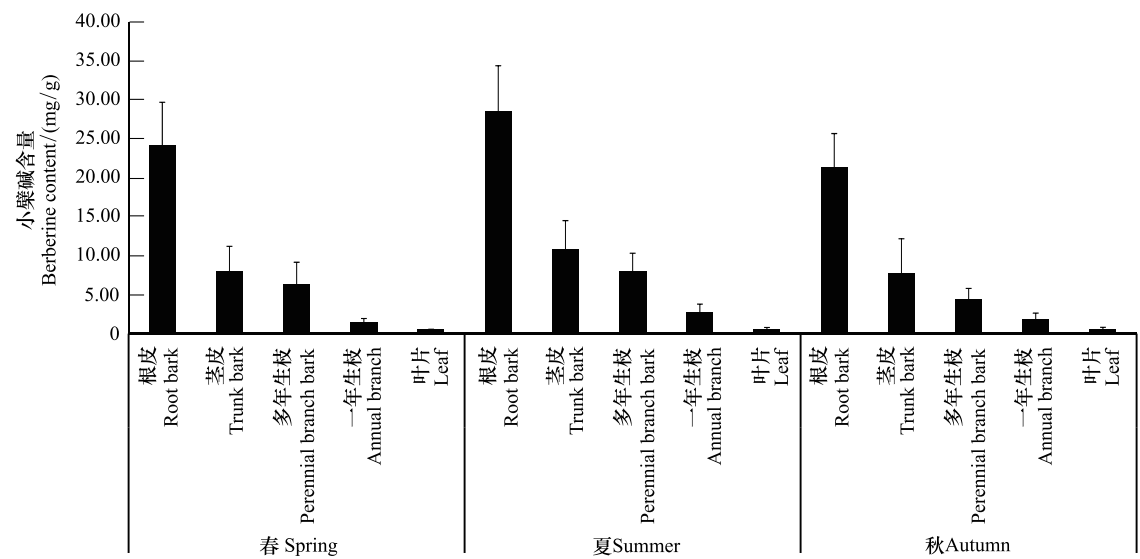


图 2 黄檗不同部位小檗碱含量

Fig.2 The berberine content in the different parts of *P.amurensis*

随着季节变化,不同采样地的黄檗各部位小檗碱含量也发生改变(表 2)。根皮中的小檗碱含量在夏季明显高于春季( $P<0.05$ ),到了秋季又降低到了与春季含量相近或略低的水平。茎皮中小檗碱含量的变化规律与根皮相同,夏季的含量最高,而春、秋两季含量较低。辽宁凤城夏季茎皮中小檗碱含量比春季增多了 60.42%。3 个季节,多年生枝中小檗碱的含量变化明显,夏季是小檗碱含量最高的季节,春、秋两季含量差别不大( $P>0.05$ )。

表 2 黄檗不同季节小檗碱含量

Table 2 The berberine content in the different seasons of *P.amurensis*

采样地点 Sampling sites	根皮 Root			茎皮 Trunk			多年生枝 Perennial branch		
	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn
辽宁凤城	25.76±5.39	32.27±6.14	17.84±5.03	10.79±3.46	17.31±5.79	10.94±1.59	10.12±3.90	14.32±3.21	10.31±0.07
辽宁桓仁	24.15±8.44	39.36±14.07	28.78±8.73	9.21±5.78	13.44±3.89	11.35±5.77	8.35±4.74	9.33±4.04	9.03±0.05
辽宁新宾	22.76±4.02	34.26±10.06	24.06±12.14	10.84±4.24	13.65±3.46	9.87±5.77	10.20±2.10	6.16±0.35	6.34±0.05
辽宁清原	28.83±4.64	25.67±12.84	25.52±7.68	10.09±2.44	11.62±2.01	10.10±4.09	6.08±2.42	7.76±1.58	6.28±0.09
辽宁法库	16.48±7.03	25.65±10.20	18.15±7.46	4.82±2.30	7.65±4.79	4.29±2.82	8.15±4.29	11.61±5.00	7.27±0.02
吉林安图	26.19±8.08	27.91±6.04	17.68±9.45	6.59±3.06	5.73±3.99	4.64±1.94	5.38±2.73	6.12±1.12	5.72±0.62
吉林临江	24.99±9.13	22.54±9.98	16.09±3.58	7.34±1.85	8.85±3.06	4.91±2.65	5.84±1.97	8.78±0.76	6.33±0.03
黑龙江黑河	24.94±6.54	24.24±4.43	20.10±5.78	9.66±5.67	3.89±1.30	5.68±3.43	4.38±2.62	7.69±1.06	4.71±0.76
黑龙江鹤岗	27.53±7.28	24.22±4.58	22.95±5.54	6.73±1.59	8.02±1.32	8.54±3.26	4.07±1.64	5.00±2.06	4.31±0.06
黑龙江穆棱	19.63±5.71	26.87±1.47	20.91±8.09	5.10±1.85	5.88±2.29	4.93±2.37	3.77±2.65	5.45±0.08	4.39±0.12

采样地点 Sampling sites	1 年生枝 annual branch			叶片 leave		
	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn
辽宁凤城	2.07±1.26	5.08±2.55	2.17±0.72	0.14±0.04	0.05±0.05	0.31±0.08
辽宁桓仁	1.21±0.56	1.33±1.00	1.07±0.49	0.14±0.02	0.08±0.06	0.46±0.06
辽宁新宾	1.92±0.67	2.92±0.11	1.23±0.52	0.14±0.03	0.16±0.12	0.85±0.12

续表

采样地点 Sampling sites	1 年生枝 annual branch			叶片 leave		
	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn
辽宁清原	1.25±0.43	2.67±1.11	1.12±0.11	0.13±0.03	0.11±0.07	0.63±0.07
辽宁法库	1.32±0.26	4.03±1.00	1.82±0.67	0.14±0.02	0.03±0.03	0.27±0.04
吉林安图	1.22±0.38	1.03±0.14	2.12±0.37	0.14±0.02	0.04±0.01	0.72±0.12
吉林临江	1.70±0.53	2.12±0.15	2.91±1.19	0.13±0.02	0.06±0.02	0.33±0.03
黑龙江黑河	1.37±0.71	0.69±0.32	1.58±0.52	0.13±0.02	0.04±0.03	0.71±0.05
黑龙江鹤岗	1.29±0.39	1.28±0.52	1.43±0.33	0.13±0.01	0.06±0.05	0.31±0.06
黑龙江穆棱	1.38±0.56	0.86±0.37	2.15±0.75	0.14±0.03	0.03±0.04	0.39±0.08

2.2 黄檗不同部位药根碱的差异

药根碱在黄檗中含量的分布规律与小檗碱相近。不同季节,天然黄檗药根碱的含量在各部位排

序为:根皮>茎皮>多年生枝皮>1 年生枝>叶片(图 3)。

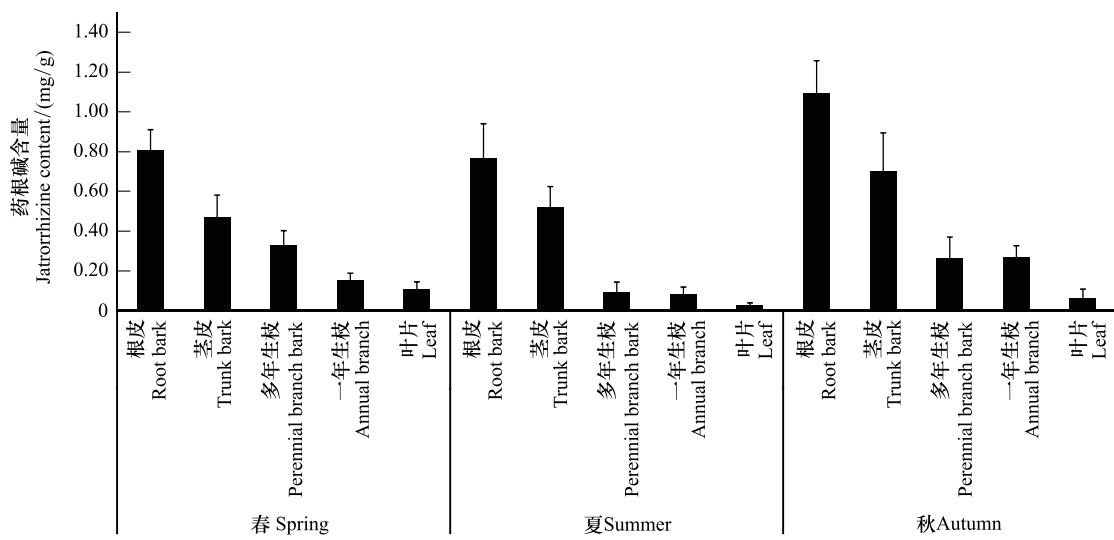


图 3 黄檗不同部位药根碱含量  
Fig.3 The jatrorrhizine content in the different parts of *P.amurense*

对天然黄檗不同部位药根碱含量的季节变化进行比较(表 3),发现根皮、茎皮两处的药根碱含量随着季节的推移逐渐升高。根皮中的药根碱在夏季升高幅度不大,而在秋季显著升高( $P<0.05$ )。茎皮中药根碱含量的变化规律与根皮相同,而多年生枝皮,1 年生枝和叶片中的药根碱在 3 个季节表现为先降后升。以多年生枝皮为例,夏季,药根碱的含量比春季明显降低( $P<0.05$ )。春季到夏季,树木生长旺盛,主要营养用于营养器官的生长,药根碱缓慢消耗,而到了秋天,树木的代谢减慢,生物碱逐渐积累在黄檗的不同部位,含量逐渐增加。

2.3 不同地域黄檗两种生物碱含量差异

2.3.1 不同地域黄檗两种生物碱含量的方差分析

将春、夏、秋 3 个季节 10 个地点的药根碱、小檗碱的含量做方差分析(表 4)。各地区间由于纬度变化引起的气候条件变化,使两种生物碱在黄檗内含量有显著差异( $P<0.05$ ),地域性明显。

2.3.2 纬度对黄檗中两种生物碱含量的影响

为了进一步探究纬度与黄檗中小檗碱、药根碱含量的关系,用 3 个省份 10 个采样地点黄檗根皮、茎皮、多年生枝皮、1 年生枝、叶片中小檗碱、药根碱含量与纬度分别做回归方程,得一元二次回归方程。由于 1 年生枝与叶片两处生物碱含量的变化趋势与纬度没有明显的相关性,所以只选取根皮、茎皮和多

年生枝皮 3 个部位 ( $P<0.05$ ) 作分析。

表 3 黄檗不同部位药根碱含量

Table 3 The jatrorrhizine content in the different seasons of <i>P.amurens</i>									
采样地点 Sampling sites	根皮 Root			茎皮 Trunk			多年生枝 Perennial branch		
	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn
辽宁凤城	0.80±0.22	0.93±0.26	1.25±0.40	0.52±0.15	0.57±0.22	0.86±0.15	0.38±0.10	0.32±0.23	0.45±0.02
辽宁桓仁	0.64±0.17	0.80±0.31	1.02±0.30	0.56±0.27	0.63±0.16	0.86±0.31	0.37±0.15	0.14±0.08	0.26±0.06
辽宁新宾	0.72±0.06	0.80±0.26	1.06±0.48	0.51±0.11	0.56±0.19	0.68±0.22	0.38±0.06	0.17±0.03	0.29±0.08
辽宁清原	0.82±0.20	0.91±0.17	1.09±0.33	0.55±0.11	0.51±0.11	0.66±0.12	0.32±0.07	0.22±0.03	0.36±0.05
辽宁法库	0.59±0.21	0.80±0.32	0.90±0.23	0.34±0.17	0.35±0.20	0.44±0.22	0.44±0.13	0.45±0.22	0.36±0.15
吉林安图	0.66±0.29	0.79±0.43	0.85±0.26	0.38±0.14	0.39±0.24	0.58±0.09	0.28±0.09	0.24±0.12	0.32±0.04
吉林临江	0.88±0.36	0.84±0.14	1.06±0.31	0.40±0.14	0.53±0.19	0.68±0.26	0.31±0.06	0.46±0.08	0.22±0.03
黑龙江黑河	0.95±0.34	0.71±0.23	1.13±0.22	0.51±0.20	0.50±0.25	0.60±0.29	0.31±0.12	0.09±0.02	0.22±0.05
黑龙江鹤岗	0.68±0.28	0.97±0.29	1.17±0.25	0.55±0.06	0.58±0.16	0.83±0.37	0.30±0.08	0.15±0.02	0.27±0.11
黑龙江穆棱	0.60±0.28	0.79±0.21	1.47±0.35	0.40±0.07	0.49±0.16	0.78±0.39	0.30±0.13	0.18±0.01	0.20±0.01

采样地点 Sampling sites	1 年生枝 Annual branch			叶片 leave		
	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn
辽宁凤城	0.17±0.06	0.09±0.06	0.22±0.01	0.10±0.01	0.07±0.05	0.09±0.02
辽宁桓仁	0.15±0.03	0.09±0.01	0.21±0.02	0.10±0.01	0.01±0.02	0.06±0.02
辽宁新宾	0.15±0.03	0.04±0.00	0.15±0.02	0.09±0.03	0.02±0.01	0.09±0.04
辽宁清原	0.14±0.02	0.07±0.02	0.17±0.02	0.10±0.01	0.40±0.20	0.16±0.05
辽宁法库	0.16±0.03	0.18±0.07	0.27±0.03	0.11±0.01	0.04±0.03	0.06±0.05
吉林安图	0.12±0.02	0.09±0.00	0.26±0.03	0.11±0.02	0.04±0.02	0.12±0.04
吉林临江	0.16±0.04	0.12±0.01	0.37±0.10	0.11±0.01	0.05±0.01	0.12±0.03
黑龙江黑河	0.15±0.04	0.07±0.09	0.30±0.04	0.10±0.02	0.03±0.03	0.12±0.05
黑龙江鹤岗	0.17±0.04	0.02±0.01	0.26±0.02	0.11±0.01	0.04±0.01	0.07±0.01
黑龙江穆棱	0.16±0.03	0.07±0.01	0.30±0.05	0.10±0.01	0.07±0.05	0.20±0.01

表 4 不同地点黄檗各器官生物碱方差分析

Table 4 Variance analysis of alkaloid content in organs of the <i>P.amurens</i> in different spots							
不同部位 Parts	生物碱 Alkaloid	春季 Spring		夏季 Summer		秋季 Autumn	
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
根皮 Root bark	药根碱	12.44	0.00 **	0.54	0.00 **	6.60	0.00 **
	小檗碱	6.72	0.00 **	7.97	0.00 **	6.15	0.00 **
茎皮 Trunk bark	药根碱	6.15	0.00 **	4.08	0.00 **	6.47	0.00 **
	小檗碱	9.48	0.00 **	21.73	0.00 **	13.05	0.00 **
多年生枝 Perennial branch bark	药根碱	4.54	0.00 **	9.94	0.00 **	7.07	0.00 **
	小檗碱	15.98	0.00 **	20.75	0.00 **	4.03	0.00 **
1 年生枝 Annual branch	药根碱	3.41	0.00 **	22.03	0.00 **	23.41	0.00 **
	小檗碱	4.65	0.00 **	20.57	0.00 **	4.96	0.00 **
叶片 Leaf	药根碱	2.15	0.03 *	6.59	0.00 **	2.77	0.00 **
	小檗碱	7.55	0.00 **	4.69	0.00 **	25.84	0.03 *

\* 表示  $P<0.05$ , \*\* 表示  $P<0.01$

(1) 纬度对黄檗中小檗碱含量的影响

3 个季节中,各地黄檗小檗碱的含量与纬度的回归方程变化规律明显(图 4)。春季,根皮、茎皮、多

年生枝中小檗碱含量均随着纬度升高呈现先降低,后逐渐增多的趋势。根皮中小檗碱含量最多,随着纬度变化规律显著。在 N40°(凤城)根皮中小檗碱

含量最高,随着  $N40^{\circ}$ — $N44^{\circ}$  小檗碱含量逐渐降低,最低值为  $19.62 \text{ mg/g}$ ,仅为凤城含量的  $76.19\%$ 。茎皮中小檗碱含量要小于根皮,但是变化幅度很大,在  $N44^{\circ}$  左右茎皮中小檗碱含量为最高值的  $44.69\%$ ,达到最低值后逐渐回升, $N50^{\circ}$  (黑河) 地区的黄檗茎皮中小檗碱含量为  $N40^{\circ}$  (凤城) 的  $89.51\%$ ,仍小于最大值。多年生枝皮中小檗碱含量则随着纬度增大逐渐降低,下降幅度为  $62.72\%$ ,只在达到最高纬度时略有上升。

夏季黄檗各部位小檗碱的含量随纬度的变化趋势与春季相近,根皮与茎皮中的小檗碱含量随着纬

度的增大先逐渐降低,在  $N46^{\circ}$  左右达到最低值,分别降低了  $47.74\%$  和  $66.21\%$ ,然后略有升高。多年生枝小檗碱在采样范围内随着纬度变化呈现逐渐降低的趋势,最大值分别为最小值的  $2.63$  倍。

秋季,黄檗各部位小檗碱含量均与纬度显示了较好的相关规律。根皮、茎皮、多年生枝皮中小檗碱含量随纬度升高先呈现下降趋势,在  $N46^{\circ}$  左右达到最低值,然后又逐渐升高。这 3 处器官中,根皮的小檗碱在含量最低处比最高处下降了  $36.50\%$ 。而多年生枝的小檗碱含量下降幅度最大,从  $N40^{\circ}$ — $N47.4^{\circ}$ ,降低了  $68.36\%$ 。

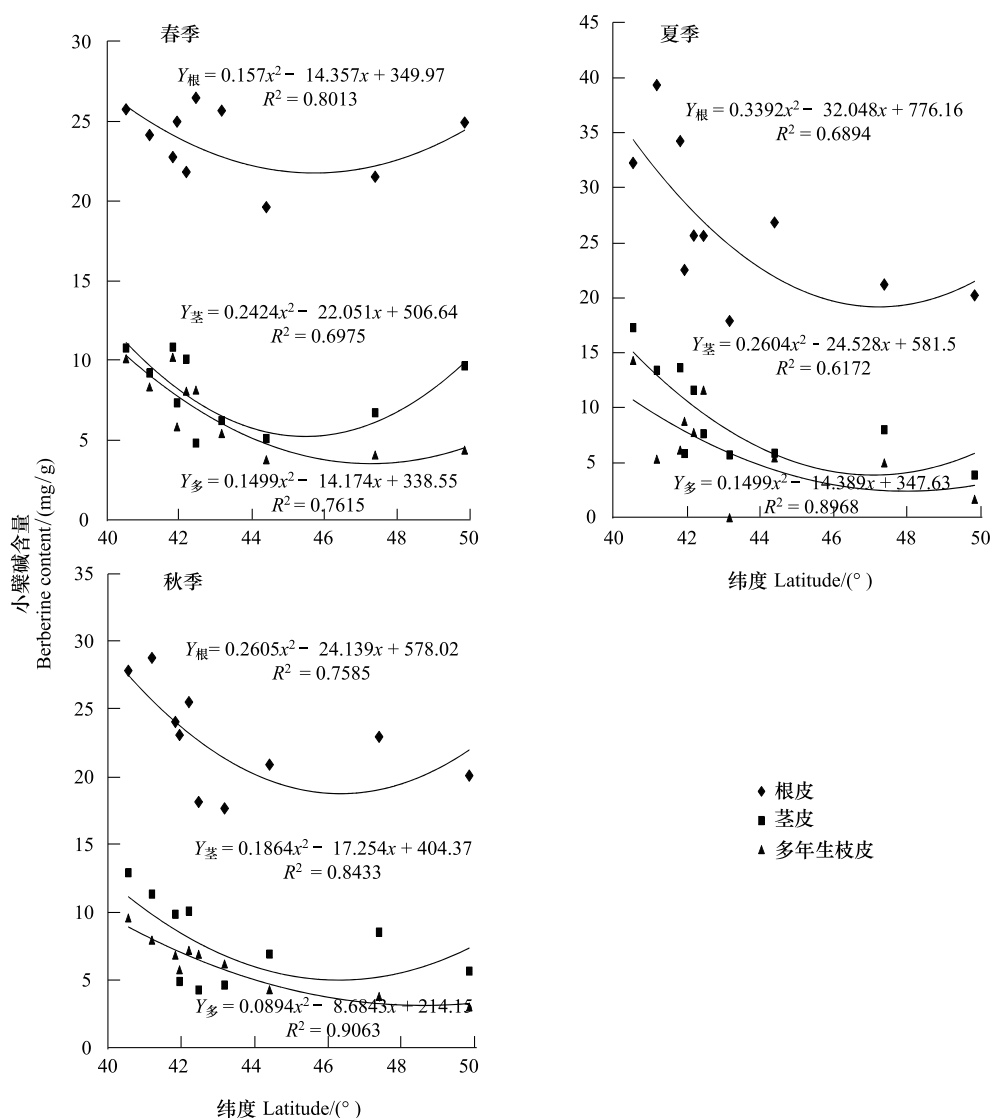


图 4 同季节小檗碱含量与纬度的回归曲线

Fig.4 Regression curve of berberine content with latitude in different seasons

## (2) 纬度对黄檗中药根碱含量的影响

通过回归方程可知(图 5),在采样的纬度范围

内( $N40^{\circ}32'39.11''$ — $N49^{\circ}51'19.7''$ ), 药根碱在春天随着纬度变化的趋势明显。根皮中的药根碱呈现逐渐上升的趋势, 在  $N49^{\circ}51'$  (黑河) 达到最高。茎皮, 多年生枝皮中药根碱含量随着纬度的变化规律为先降后升, 茎皮与多年生枝中药根碱含量变化小于根皮, 但是均在  $N44^{\circ}$  左右达到最低值, 然后随着纬度增高上升, 上升幅度较小。

从黄檗各部位药根碱夏季含量与纬度的回归曲线看, 根皮、茎皮中药根碱含量与纬度变化呈现了与

春季相反的趋势。在这 3 处器官中随着纬度升高, 药根碱含量先增高后小幅度降低, 其中茎皮的药根碱含量变化较小, 变化幅度在  $0.47$ — $0.63$   $\text{mg/g}$  之间, 达到最大值后快速降低到与低纬度地区相近的水平。而多年生枝中药根碱在  $N40^{\circ}$ — $N50^{\circ}$  范围内逐渐降低, 在采样地的最北端降到  $<0.2$   $\text{mg/g}$  的水平。

秋季黄檗各部位药根碱含量随纬度变化的趋势与夏季相似, 根皮中药根碱含量随着纬度增大先降

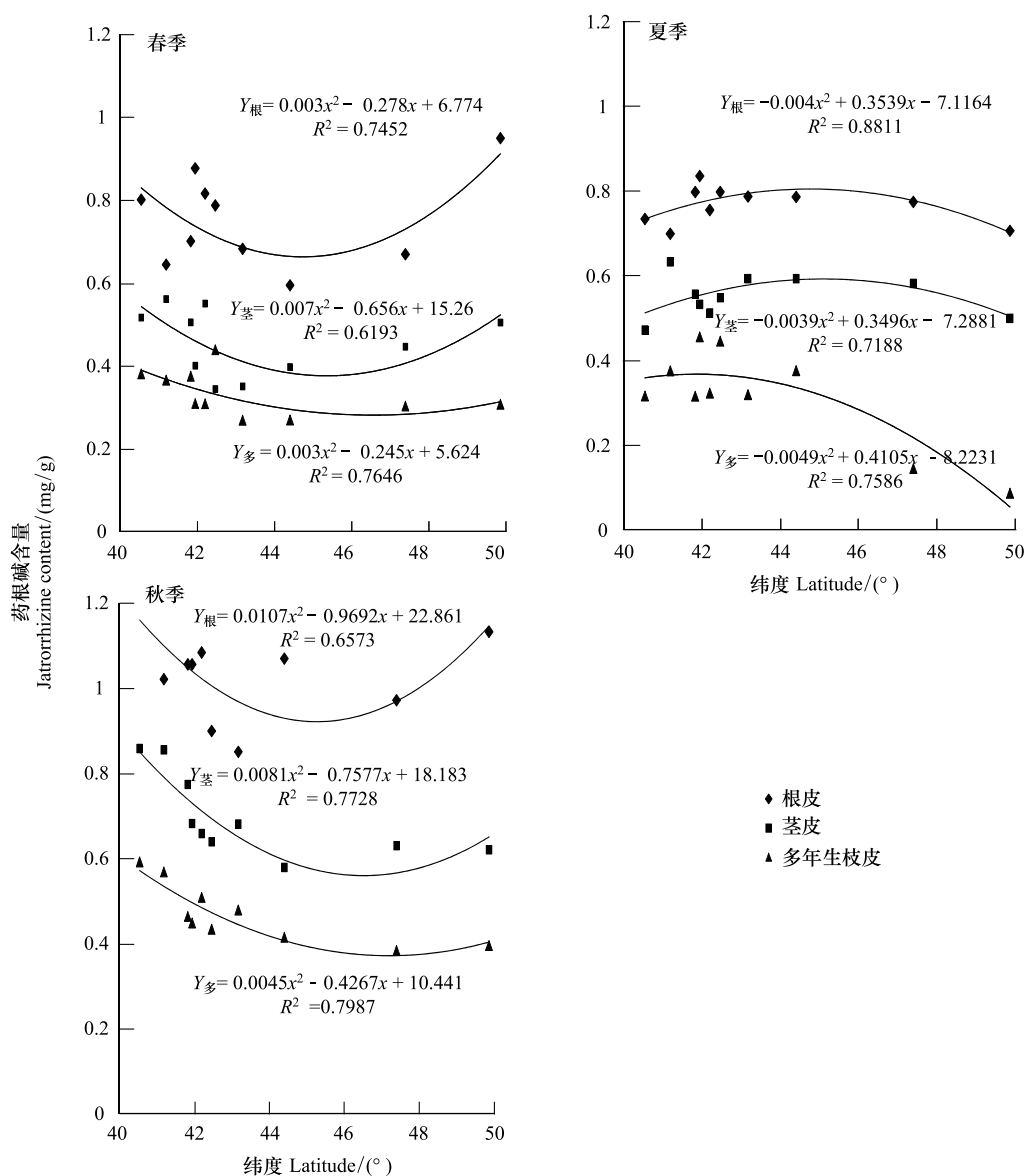


图5 不同季节药根碱含量与纬度的回归曲线

Fig 5 Regression curve of Jatrorrhizine content with latitude in different seasons

低后升高,且变化幅度大。最低值为最高值的68.11%。多年生枝皮中药根碱随着纬度增大则先升高,后逐渐降低。

### 3 讨论

本研究发现,在春、夏、秋3个季节,黄檗不同部位药根碱和小檗碱的含量均表现为:根皮>茎皮>多年生枝皮>1年生枝皮>叶片。这和以往的研究得出的结论相同<sup>[16]</sup>。根皮中的生物碱含量显著地高于其他部位,根皮、茎皮、多年生枝皮3个部位生物碱的含量远远大于1年生枝和叶片。植物的次生代谢是植物在长期进化中与环境(生物的和非生物的)相互作用的结果,其产生和变化比初生代谢与环境有更强的相关性和对应性<sup>[17-18]</sup>。植物的次生代谢产物并非均匀分布于整个植株,不同的发育时期,次生代谢物在植株中分布变化很大<sup>[19]</sup>。植物不同部位次生代谢物的差异性表现在两个方面,即不同部位次生代谢物种类的差异性和不同部位同种次生代谢物含量的差异性。前人的研究结果也证明了次生代谢产物在植株不同部位存在差异性<sup>[20]</sup>。

植物同一植株不同部位的次生代谢物含量不同,其一是因为植物次生代谢物的产生是一个复杂的过程,包括生物合成、转运、贮藏和分解。次生代谢物的积累是上述过程的平衡,具有组织、器官和个体发育的特异性<sup>[21]</sup>。这一结论在青蒿和鼠尾草等植物的研究中已经得到证实<sup>[22-23]</sup>,小檗碱等生物碱是在黄檗等植物的细胞质、液泡、内质网等部位合成<sup>[24]</sup>,根皮与茎皮生长年份较长,有利于小檗碱、药根碱的积累,而1年生枝和叶片都为当年生长的,由于生长期短,生物碱没有充分的时间积累,可能是造成这种差异的原因。另外,植物不同组织的细胞结构和敏感性以及对外界刺激的反应程度不同,不同器官中营养状况和酶反应体系不同,都可以造成次生代谢产物在不同部位含量的差异。有研究表明,黄檗茎部小檗碱含量的确由根部向上递减,直到1.3 m处附近开始再向上测量变化不大<sup>[14]</sup>。但是药根碱和小檗碱在黄檗体内具体的转化途径是怎样的,还有待于进一步的研究。

此外,季节的变化也是影响黄檗内生物碱分布的因素。在本实验中发现,各部位中小檗碱的含量则均表现为春季>秋季>夏季。药根碱在春、夏、秋3

个季节的变化为:根皮、茎皮随季节变化逐渐升高,多年生枝皮中药根碱在夏季有所降低,然后在秋季显著升高( $P<0.05$ )。其原因可能是春季,树木枝叶生长活动旺盛,光合作用迅速合成次生代谢所需要的底物,所以生物碱含量较高,而夏季树木枝叶生长速率降低,营养主要供给为树木的茎部加粗作用,所以枝叶部位的次生代谢处于低谷,而茎部和根皮的药根碱有少量的提高,到了秋季,树体生理活动减弱,呼吸代谢减慢,生长抑制剂等激素增多,次生代谢更多处于代谢不活泼的库中,没有发生转移,却在各器官中积累下来,从而使秋季次生代谢产物含量较高。这个结论与前人对杜仲和菰蓝的研究结果一致<sup>[25]</sup>。而小檗碱含量随着季节推移的变化趋势与药根碱不同,这种差异主要是由于次生代谢物的形成和贮藏位点都严格控制在植物的一定发育期、特殊的器官、组织和特化的细胞中。有研究表明,小檗碱并不是次生代谢的最终产物,它经过进一步的代谢转化为药根碱,所以总体上看,小檗碱和药根碱的含量呈现互补的状态,这可能是造成这种现象的原因。

对于每一个个体,其次生代谢物都随器官、组织而变化,而年龄、季节和环境条件也是影响次生代谢产物含量的因素<sup>[26]</sup>。因此,不同地理种群材料在次生代谢产物含量上有可能存在较大差异。本实验将10个采样地点的黄檗各器官中小檗碱、药根碱的含量与纬度做回归分析,大部分器官的生物碱随着纬度变化先降低,后升高。只有夏季、秋季茎皮和多年生枝皮中的药根碱与纬度的变化表现为先升高,后降低的趋势。很多学者研究发现,同种药用植物所含次生代谢产物含量的高低除与遗传因素有密切关系外,所生存的环境和气候条件等生态因子对其也有很大的影响。随着纬度的升高,年均温降低,温度影响了黄檗体内的酶活性,使次生代谢的强弱产生了地区差异,从而使较高纬度地区的黄檗生物碱含量有所降低,但是纬度升高,也使高纬度地区的日照时间延长,有研究表明光照时间同样对提高植物次生代谢产物的含量有积极的作用<sup>[27-28]</sup>,所以在本实验范围内的高纬度地区,小檗碱和药根碱含量均出现了略有升高的现象。但是对于生物碱随着纬度变化的具体机制和影响这一结果的关键生态因子是什么,仍需要进一步的研究,以期更好的解释小檗碱、

药根碱在不同季节随着纬度变化,在个别器官出现的规律相反的现象。

与以往对黄檗各尺度生物碱含量的研究相比,本研究有两个特色:一方面是研究的范围比较大,选取了东北地区3个省份不同纬度的10个采样地点,包括了野生黄檗的大部分分布区。本区域内不同的植被类型和立地条件为研究地域因素对黄檗有效成分的含量差异提供了良好的条件,由此能更好地了解黄檗这一濒危物种在东北地区的优质种源区域,为以后选种或人工栽培、高效利用黄柏药材提供依据。二是选取的实验材料为黄檗的天然种群,更真实地反映黄檗次生代谢产物本身的性质和中药材黄柏的采收情况。并对每棵树的根皮、茎皮、多年生枝皮、1年生枝以及叶片各部位做了详细的划分,更好的研究生物碱在黄檗中的分布情况及季节性的变化规律。而以往的研究多数只对单一产地的黄檗内部生物碱含量比较关注<sup>[29-30]</sup>。在现有的研究中,环境因子影响植物次生代谢产物形成和积累的研究甚少<sup>[31]</sup>。而且生态因素对植物体内次生代谢的影响和作用非常复杂,黄檗内小檗碱、药根碱的分布可能受几种生态因子的诱导。通过本研究,我们可以初步确定黄檗小檗碱、药根碱在器官尺度、季节尺度和地域上的差异,并确定了黄檗中的小檗碱在夏季较多,而药根碱在秋季积累量较大。所以东北地区栽培和选取黄檗入药的优质种源可以选择低纬度地区(凤城及周边地区),在夏秋两季采摘,并考虑用多年生枝替代茎皮入药。以此来确定生物碱的最有效采收时期和部位,为合理利用野生黄檗资源提供理论支撑。

## References:

- [1] Chinese Academy of Sciences Editorial Board. Flora of China. Beijing: Science Press, 2004, 43(2): 100-100.
- [2] Azad M A K, Yokota S, Ishiguri F, Yahara S, Yoshizawa N. Histological studies of shoot regeneration system in hypocotyl-derived callus of *Phellodendron amurense* Rupr. Journal of Forest Research, 2005, 10(5): 377-384.
- [3] Wang W, Zu Y G, Fu Y J, Reichling J, Suschke U, Nokemper S, Zhang Y L. *In vitro* antioxidant, antimicrobial and anti-herpes simplex virus type 1 activity of *Phellodendron amurense* Rupr. from China. The American Journal of Chinese Medicine, 2009, 37(1): 195-203.
- [4] Lis A, Boczek E, Góra J. Chemical composition of the essential oils from fruits, leaves and flowers of the Amur cork tree (*Phellodendron amurense* Rupr.). Flavour and Fragrance Journal, 2004, 19(6): 549-553.
- [5] Ghosh R, Graham H, Rivas P, Tan X J, Crosby K, Bhaskaran S, Schoolfield J, Banu J, Fernandes G, Yeh I T, Kumar A P. *Phellodendron amurense* and its major alkaloid compound, berberine ameliorates scopolamine-induced neuronal impairment and memory dysfunction in rats. Anticancer Research, 2010, 30: 857-866.
- [6] Bjorklund J A, Frenzel T, Rueffer M, Kobayashi M, Mocek U, Fox C, Beale J M, Groeger S, Zenk M H, Floss H G. Cryptic stereochemistry of berberine alkaloid biosynthesis. Journal of the American Chemical Society, 1995, 117(5): 1533-1545.
- [7] Grycová L, Dostál J, Marek R. Quaternary protoberberine alkaloids. Phytochemistry, 2007, 68(2): 150-175.
- [8] Ding, L W. Trend reviews of *Phellodendron amurense*. Special Economic Animal and Plant, 2011, 14(4): 16-18.
- [9] Fu L G. China Rare and Endangered Plants List. Shanghai: Shanghai Education Press, 1989: 342-345.
- [10] Fu L G. China Species Red List-Rare and Endangered Plants. Beijing: Science Press, 1991: 572-573.
- [11] Ma F, Zhang J. Investigation of Chinese Key Protected Wild Plant Resources. Beijing: China Forestry Publishing House, 2009: 156-157.
- [12] Yang J L, Zhao B, Kim Y B, Zhou C G, Li C Y, Chen Y L, Zhang H Z, Li C H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Phellodendron amurense* Rupr. using mature-seed explants. Molecular Biology Reports, 2013, 40(1): 281-288.
- [13] Azad M A K, Yokota S, Ishiguri F, Yoshizawa N. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of a medicinal plant, *Phellodendron amurense* Rupr. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2006, 42(6): 502-507.
- [14] Wang Y, Zhang Y H, Yan X F, Yu T. Distribution of berberine content in the stem of corktree saplings. Plant Physiology Communications, 2005, 41(1): 87-89.
- [15] Qin Y J, Zhang Y H, Wang Y, Yan X F. Determination of alkaloids content in *Phellodendron amurense* Rupr. by HPLC. Chemistry and Industry of Forest Products, 2004, 24(s1): 115-118.
- [16] Zhang K J, Dong E J, Ma B L. Studies on the distribution differences of the secondary metabolites in *Eucommia ulmoides*. Scientia Silvae Sinicae, 2002, 38(6): 12-16.
- [17] Wink M. Functions of Plant Secondary Metabolites and Their Exploitation in Biotechnology, Vol 3: Annual Plant Reviews. BocaRaton: CRC Press, 1999.
- [18] Shelton A L. Variable chemical defences in plants and their effects on herbivore behaviour. Evolutionary Ecology Research, 2000, 2(2): 231-249.

- [19] Yan X F. Ecology of plant secondary metabolism. *Acta Phytoecologica Sinica*, 2001, 25(5): 639-640.
- [20] Ni X B, Su J. Active constituents of above-ground portion and root of *Salvia miltiorrhiza*. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 1995, 30(6): 336-338.
- [21] Win K M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 2003, 64(1): 3-19.
- [22] Goel D, Singh V, Ali M, Mallavarupu G R, Kumar S. Essential oils of petal, leaf and stem of the antimalarial plant *Artemisia annual*. *Journal of Natural Medicines*, 2007, 61(2): 187-191.
- [23] Ferreira J F S, Simon J E, Janick J. Developmental studies of *Artemisia annual* flowering and artemisinin production under green house and field condition. *Planta Medica*, 1995, 61(2): 167-170.
- [24] Tang Z H, Yu J H, Yang F J, Zu Y G. Metabolic biology of plant alkaloids. *Chinese Bulletin of Botany*, 2003, 20(6): 696-702.
- [25] Zhang K J, Ma X H, Ma M, Wang L, Zhang T. Study on dynamic accumulation of metabolites during the growth of *Eucommia ulmoides* oliv. *Scientia Silvae Sinicae*, 1999, 35(2): 15-20.
- [26] Qin Y J. Study on the Distribution of Principal Medicinal Compositions in Amur Corktree [D]. Haerbin: Northeast Forestry University, 2005.
- [27] Wang Z Y, Cui H H, Wang Z Q, Li R M, Kang Y H. Effects of light intensity on resveratrol and polydatin production in *Rumex gmelini* root. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, 17(5): 851-854.
- [28] Zhu R B, Wu Q S, Wan Z H, Ding Y P. Influence of altitudes on effective compositions of American Ginseng in Mountains of West Anhui. *Agricultural Meteorology*, 2001, 22(1): 19-22.
- [29] Li X, Yan X F, Yu T. Effects of color films shading on *Phellodendron amurense* seedlings biomass and primary nitrogen assimilation enzyme activities. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, 17(11): 2020-2023.
- [30] Li X, Yan X F. Effects of color films on three kinds of alkaloids of *Phellodendron amurense* seedlings. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(3): 1292-1299.
- [31] Dong E J, Zhang K J, Liang Z S. Plant Secondary Metabolism and Its Regulation. Yangling: Northwest A&F University Press, 2009: 93-94.
- 参考文献:
- [1] 中国科学院编委会. 中国植物志. 北京: 科学出版社, 2004, 43(2): 100-100.
- [8] 丁立威. 关黄柏走势点评. *特种经济动植物*, 2011, 14(4): 16-18.
- [9] 傅立国. 中国珍稀濒危植物. 上海: 上海教育出版社, 1989: 342-345.
- [10] 傅立国. 中国植物红皮书-稀有濒危植物. 北京: 科学出版社, 1991: 572-573.
- [11] 马福, 张建. 中国重点保护野生植物资源调查. 北京: 中国林业出版社, 2009: 156-157.
- [14] 王洋, 张玉红, 阎秀峰, 于涛. 黄檗幼树茎干中小檗碱含量的分布. *植物生理学通讯*, 2005, 41(1): 87-89.
- [15] 秦彦杰, 张玉红, 王洋, 阎秀峰. 黄檗中生物碱含量的高效液相色谱分析. *林产化学与工业*, 2004, 24(s1): 115-118.
- [16] 张康健, 董娥娟, 马柏林等. 杜仲次生代谢物部位差异性的研究. *林业科学*, 2002, 38(6): 12-16.
- [19] 闫秀峰. 植物次生代谢生态学. *植物生态学报*, 2001, 25(5): 639-640.
- [20] 倪学斌, 苏静. 丹参地上部分有效成分的初步分析. *中国药学杂志*, 1995, 30(6): 336-338.
- [24] 唐中华, 于景华, 杨逢建, 祖元刚. 植物生物碱代谢生物学研究进展. *植物学通报*, 2003, 20(6): 696-702.
- [25] 张康健, 马希汉, 马梅, 王蓝, 张檀. 杜仲次生代谢物生长积累动态的研究. *林业科学*. 1999, 35(2): 15-20.
- [26] 秦彦杰. 黄檗主要药用成分的分布规律研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2005.
- [27] 王振月, 崔红花, 王宗权, 李瑞明, 康毅华. 光强对毛脉酸模根中白藜芦醇和白藜芦醇苷的影响. *应用生态学报*, 2006, 17(5): 851-854.
- [28] 朱仁斌, 吴庆生, 宛志沪, 丁亚平. 皖西山区海拔高度对西洋参有效成分的影响. *中国农业气象*, 2001, 22(1): 19-22.
- [29] 李霞, 阎秀峰, 于涛. 滤光膜对黄檗幼苗生物量及初级氮同化酶活性的影响. *应用生态学报*, 2006, 17(11): 2020-2023.
- [30] 李霞, 阎秀峰. 滤光膜对黄檗(*Phellodendron amuranse*)幼苗三种生物碱含量的影响. *生态学报*, 2009, 29(3): 1292-1299.
- [31] 董娥娟, 张康健, 梁宗锁. 植物次生代谢与调控. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2009: 93-94.