

黑骨藤化学成分与生态因子和土壤因子的相关性

周环娟, 安兰兰, 付艳, 王瑞鑫, 刘刚, 刘育辰*, 孙庆文, 张永萍
(贵州中医药大学, 贵阳 550025)

[摘要] 目的:研究不同产地苗族药黑骨藤中8个化学成分含量与生态因子和土壤因子的相关性。方法:采用超高压液相色谱法(UPLC)同时测定新绿原酸,绿原酸,隐绿原酸,异绿原酸B,异绿原酸A,异绿原酸C,原花青素A₂和杠柳毒苷的含量。收集各产地样品根系土壤,并进行多种土壤因子检测。利用ArcGIS软件提取气候数据,GPS记录地形数据。利用SPSS 24.0统计软件对不同产地药材中的8个化学成分含量与生态因子和土壤因子进行双变量分析和逐步回归分析。结果:建立了8个化学成分含量与生态因子和土壤因子的逐步回归方程,分析其结果,新绿原酸与最冷季度降水量呈负相关;绿原酸与最干月降水呈负相关;隐绿原酸与最冷季度降水量和最暖季节平均温度呈负相关,与硒呈正相关;异绿原酸B主要受到土壤因子的影响,与有效铁和铝呈正相关,与全磷和有效磷呈负相关;异绿原酸A与铝呈正相关,与降水变异系数呈负相关;异绿原酸C与交换性镁呈正相关;原花青素A₂与铝呈正相关,与速效钾呈负相关;杠柳毒苷与降水变异系数负相关。结论:明确了黑骨藤中8个化学成分与生态因子和土壤因子之间的相关性,为黑骨藤引种栽培、规范化种植提供参考,以及进一步研究生态因子和土壤因子与黑骨藤品质形成机制提供理论基础。

[关键词] 黑骨藤;化学成分;生态因子;土壤因子;栽培;种植

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)16-0141-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211018

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210609.1327.001.html>

[网络出版日期] 2021-06-11 11:43

Correlation of Chemical Components in *Periploca forrestii* with Ecological and Soil Factors

ZHOU Huan-juan, AN Lan-lan, FU Yan, WANG Rui-xin, LIU Gang, LIU Yu-chen*,
SUN Qing-wen, ZHANG Yong-ping
(Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

[Abstract] **Objective:** To study the correlation of eight chemical components in Miao medicine *Periploca forrestii* from different producing areas with the ecological and soil factors. **Method:** The contents of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, procyanidin A₂, and periplocin were simultaneously determined by ultra-performance liquid chromatography (UPLC). The root soil samples from various producing areas were collected for testing various soil factors, followed by climate data extraction with ArcGIS and topographic data recording using GPS. SPSS 24.0 was employed to conduct the bivariate analysis and stepwise regression analysis of the eight chemical components in *P. forrestii* from different producing areas with the ecological and soil factors. **Result:** Stepwise regression equations of the content of eight chemical components against ecological and soil factors were established. The findings demonstrated that neochlorogenic acid was negatively correlated with precipitation in the coldest season and chlorogenic acid negatively correlated with precipitation in the driest month.

[收稿日期] 20210407(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(U1812403,81560618);贵州省国内一流建设学科项目(中药学)(GNYL[2017]008号)

[第一作者] 周环娟,在读硕士,从事中药及民族药化学及中药新药研究,Tel:0851-88233089,E-mail:1483664309@qq.com

[通信作者] *刘育辰,博士,教授,从事中药及民族药资源分类鉴定与质量控制等研究工作,Tel:0851-88233089,E-mail:lyc8564732@163.com

Cryptochlorogenic acid was negatively correlated with precipitation in the coldest season and average temperature in the warmest season, but positively with selenium. Isochlorogenic acid B was mainly affected by soil factors. Specifically, it was positively correlated with available iron and molybdenum but negatively with total phosphorus and available phosphorus. Isochlorogenic acid A was positively correlated with molybdenum but negatively with the coefficient of variation of precipitation. Isochlorogenic acid C showed a positive correlation with exchangeable magnesium. Procyanidin A₂ exhibited a positive correlation with molybdenum and a negative correlation with available potassium. Periplocin was negatively correlated with the coefficient of variation of precipitation. **Conclusion:** The correlation between the eight chemical components of *P. forrestii* and the ecological and soil factors has been clarified, which will provide reference for the introduction, cultivation, and standardized planting of *P. forrestii* and also a theoretical basis for further research on its ecological and soil factors and quality formation mechanism.

[Keywords] *Periploca forrestii*; chemical components; ecological factors; soil factors; cultivation; planting

苗药黑骨藤系萝藦科杠柳属植物黑龙骨的干燥根或全株,始载于《滇南本草》,具有活血、通经、解毒、祛风功效,主治风湿关节痛、跌打损伤、月经不调等证,应用于治疗闭合性软组织损伤、风湿与类风湿等疾病^[1],是贵州、云南、四川等地区的习用药物,主要用于治疗类风湿性关节炎(RA)。黑骨藤中主要含有咖啡酰基奎宁酸类、黄酮类、甾体类等多种化学成分^[2]。现代药理学研究表明,黑骨藤醇提物中咖啡酰基奎宁酸类化合物具有抑制人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞(MH7A细胞)增殖的作用^[3],原花青素类化合物具有较强的抗氧化活性^[4],强心苷类化合物杠柳毒苷能增强心脏细胞活性^[5]。

目前,黑骨藤质量控制方法主要依据2003年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》^[6],仅有性状、显微及部分理化鉴别。近年来,多采用高效液相色谱法(HPLC)对黑骨藤化学成分进行含量测定^[7-9]和指纹图谱研究^[10-14],紫外-可见分光光度法测定黑骨藤总黄酮及总皂苷的含量^[15],建立黑骨藤毛细管电泳指纹图谱^[16]等,为黑骨藤药材品质评价提供了理论依据。药材品质主要受到遗传因素和生长环境两方面的影响^[17],其中,经纬度、海拔、温度和降水等生态因子和土壤因子会影响药用植物次生代谢产物的形成、积累^[18-24],因此,明确药用植物次生代谢产物合成和积累的主导生态因子是保证药材良好品质的关键。

目前黑骨藤药材来源多为野生,鲜有种植栽培,黑骨藤药材品质与其生境的生态因子和土壤因子的相关性研究尚未见文献报道。本实验在前期研究基础上^[25-26],基于黑骨藤抗RA,抗氧化和强心

活性,拟采用UPLC法对其中的新绿原酸,绿原酸,隐绿原酸,异绿原酸B,异绿原酸A,异绿原酸C,原花青素A₂和杠柳毒苷成分进行含量测定,并与其采样点的生态因子和土壤因子进行相关性分析,以期对黑骨藤药材的栽培选址、规范化种植及品质评价提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 1290 Infinity II系列超高效液相色谱仪(美国Agilent公司,二元梯度泵,高能自动进样器,DAD检测器和色谱工作站),FA2204B型1/1万电子天平(上海天美天平仪器有限公司),MS205DU型1/10万电子天平[北京中仪汇丰瑞士梅特勒托利多仪器(中国)有限公司],SB-4200DTD型超声波清洗机(宁波新芝超声设备有限公司),SHZ-D III型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司),RHP-750A型多功能粉碎机(浙江荣浩工贸有限公司),iCAP7400型全谱直读等离子体发射光谱仪,Xserie II型等离子体质谱仪(美国赛默飞公司)。

1.2 试剂 新绿原酸(批号CHB190217),绿原酸(批号CHB190121),隐绿原酸(批号CHB1809055),异绿原酸B(批号CHB180923),异绿原酸A(批号CHB180921),异绿原酸C(批号CHB180925)均购于成都克洛玛生物科技有限公司;原花青素A₂(批号41743-41-3)购于武汉琼格生物科技有限公司;杠柳毒苷(批号MUST-19072202)购于成都曼思特生物科技有限公司,以上对照品纯度均>98%。乙腈为色谱纯(美国TEDIA公司),其他试剂均为分析纯,纯净水(娃哈哈有限公司)。

1.3 样品 黑骨藤药材采集于贵州,云南,广西,除编号HGT-4为栽培样品外,其他均为野生。全部样

品经贵州中医药大学刘育辰教授鉴定为萝藦科杠柳属黑龙骨 *Periploca forrestii*, 采集信息见表1。

表1 黑骨藤样品来源信息

Table 1 Source information of *Periploca forrestii*

No.	采集地	海拔/m	经度/°E	纬度/°N	采样日期
HGT-1	云南省曲靖市罗平县大水井乡老寨	1 513.00	104.390 305	24.778 361	2019-10-05
HGT-2	云南省师宗县五龙乡大山	1 248.00	104.255 036	24.642 825	2019-10-06
HGT-3	广西省百色市田林县乐业公路瓦厂	1 199.70	106.667 297	24.875 408	2019-10-03
HGT-4	贵州省贵阳市花溪大学城贵州中医药大学(栽培5年)	1 162.64	106.614 875	26.388 670	2020-10-30
HGT-5	贵州省遵义市正安县土坪村	811.00	107.367 929	28.273 908	2020-08-15
HGT-6	贵州省黔西南布依族苗族自治州兴仁县雨樟镇	1 538.00	105.159 272	25.534 533	2019-10-06
HGT-7	贵州省黔西南布依族苗族自治州晴隆县光照镇灵官箐	1 367.80	105.464 563	26.406 922	2019-10-07
HGT-8	贵州省安顺市关岭县中国石油服务区加油站	979.00	105.607 230	25.873 741	2019-10-07
HGT-9	贵州省六盘水市水城县阿嘎乡法路冲子	1 738.20	105.013 333	26.431 944	2019-11-25
HGT-10	贵州省毕节市织金县绮陌街道.S307	1 255.81	105.819 919	26.705 527	2020-05-05
HGT-11	贵州省毕节市织金县绮陌街道大冲头 1号	1 370.46	105.838 641	26.723 758	2020-08-27
HGT-12	贵州省毕节市织金县绮陌街道大冲头 4号	1 370.48	105.838 182	26.723 819	2020-08-27
HGT-13	贵州省毕节市织金县绮陌街道大冲头 5号	1 394.15	105.838 165	26.723 700	2020-08-27
HGT-14	贵州省毕节市织金县官寨苗族乡 X748织金大峡谷 1号	1 149.39	105.874 042	26.773 943	2020-08-27
HGT-15	贵州省毕节市织金县官寨苗族乡 X748织金大峡谷 3号	1 149.39	105.874 042	26.773 943	2020-08-27
HGT-16	贵州省毕节市织金县官寨苗族乡 X748织金大峡谷 4号	1 187.20	105.874 187	26.773 075	2020-08-27
HGT-17	贵州省毕节市纳雍县居仁街道野物坝村 1号	1 397.38	105.484 277	26.741 775	2020-08-28
HGT-18	贵州省毕节市纳雍县居仁街道野物坝村 2号	1 383.97	105.483 160	26.741 149	2020-08-28
HGT-19	贵州省毕节市纳雍县水东镇马田坝	1 393.51	105.502 177	26.740 770	2020-08-28
HGT-20	贵州省黔南布依族苗族自治州贵定县云雾镇马滩瀑布	959.01	107.047 314	26.168 318	2020-05-17
HGT-21	贵州省黔南布依族苗族自治州长顺县种获乡 1号	1 191.00	106.408 333	26.055 555	2020-07-24
HGT-22	贵州省黔南布依族苗族自治州惠水县王佑镇 5号	976.32	106.441 666	25.842 222	2020-07-26
HGT-23	贵州省黔南布依族苗族自治州龙里县天下第一洞	1 170.00	106.966 868	26.429 495	2020-08-07
HGT-24	贵州省贵阳市南明区永乐乡	1 195.00	106.875 708	26.599 230	2019-12-29
HGT-25	贵州省贵阳市开阳县南江布依族苗族乡南江大峡谷梯子岩	853.32	106.990 465	26.957 640	2020-05-04
HGT-26	贵州省贵阳市修文县乌栗田坝 310省道	1 130.00	106.475 555	26.837 500	2020-08-08
HGT-27	贵州省贵阳市云岩区仙人洞毛安坡	1 162.00	106.731 944	26.580 000	2020-08-13
HGT-28	贵州省贵阳市花溪区贵筑社区思杨路	1 088.17	106.649 445	26.388 274	2020-07-13
HGT-29	贵州省贵阳市花溪区贵筑社区思杨路	1 079.79	106.646 559	26.388 824	2020-07-13
HGT-30	贵州省贵阳市花溪区贵筑社区思杨路	1 120.00	106.649 444	26.390 000	2020-08-15
HGT-31	贵州省贵阳市乌当区啊栗村大转弯	1 117.00	106.786 944	26.597 500	2020-08-16
HGT-32	贵州省贵阳市水口寺	1 052.00	106.730 277	26.573 055	2020-08-16
HGT-33	贵州省贵阳清镇市百花湖畔	1 259.00	106.519 444	26.686 111	2020-08-11
HGT-34	贵州省贵阳清镇市流长苗族乡 S307-1号	1 233.75	106.128 661	26.662 855	2020-08-26
HGT-35	贵州省贵阳清镇市流长苗族乡 S307-4号	1 038.02	106.128 077	26.649 935	2020-08-26

1.4 生态因子数据 共收集41个环境数据,采样时用全球定位系统(GPS)工具箱记录经度、纬度、海拔。其中19个气候因子依据采样信息经纬度,利用地理信息系统软件(ArcGIS 10.2)从全球气候数据

库(WorldClim, <http://www.worldclim.org/>) 1970年至2000年监测气候数据平均值,提取下载。暂将经度、纬度、海拔等3个地形数据归于气候因子,便于统计比较,见表2。19个土壤因子分别为交换性钙、

交换性镁、全氮、全钾、全磷、水溶盐分,有机质,水解性氮,速效钾,有效磷,有效硫,有效锰,有效铁,有效铜,有效锌,硼(B),钼(Mo),硒(Se),pH。

表2 环境因子描述

Table 2 Description of environmental factors

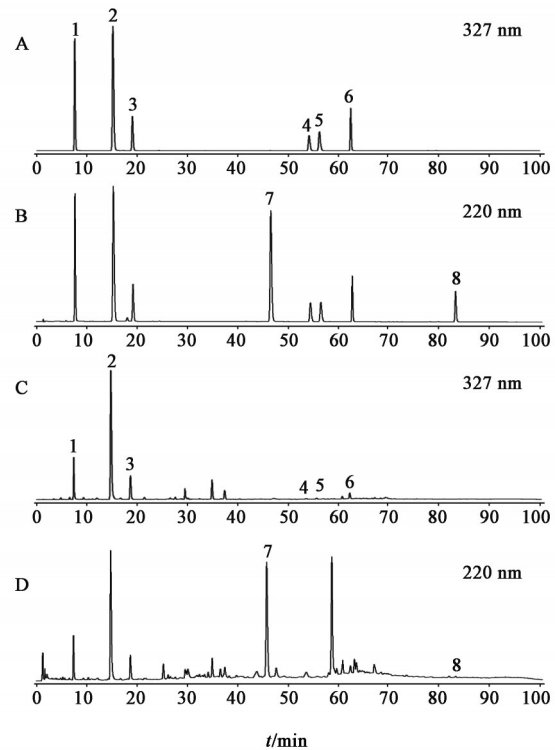
生态因子	描述	生态因子	描述
long	经度	bio9	最干季节平均温度
lat	纬度	bio10	最暖季节平均温度
alt	海拔高度	bio11	最冷季节平均温度
bio1	年均温	bio12	年均降水
bio2	昼夜温差月均值	bio13	最湿月降水
bio3	等温性	bio14	最干月降水
bio4	温度季节变化标准差	bio15	降水变异系数
bio5	最暖月最高温	bio16	最湿季度降水量
bio6	最冷月最低温	bio17	最干季度降水量
bio7	年温差	bio18	最暖季度降水量
bio8	最湿季节平均温度	bio19	最冷季度降水量

2 方法

2.1 色谱条件 采用ZORBAX Eclipse plus C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),并多次进行液相条件筛选后,以0.1%磷酸水(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱,洗脱程序(0~12 min, 6%~7%B; 12~15 min, 7%B; 15~16 min, 7%~8%B; 16~23 min, 8%~10%; 23~30 min, 10%~13%B; 30~33 min, 13%B; 33~55 min, 13%~16%B; 55~57 min, 16%~18%B; 57~62 min, 18%~20.2%B; 62~72 min, 20.2%~21.5%B; 72~77 min, 21.5%~22.5%B; 77~87 min, 22.5%~26%B; 87~92 min, 26%~30%B; 92~100 min, 30%~40%B);流速0.2 mL·min⁻¹,采用双波长进行检测λ₁=327 nm(检测新绿原酸,绿原酸,隐绿原酸,异绿原酸B,异绿原酸A,异绿原酸C),λ₂=220 nm(检测原花青素A₂和杠柳毒苷);柱温30 °C,进样量2 μL。色谱图见图1。

2.2 混合对照品溶液制备 精密称取新绿原酸,绿原酸,隐绿原酸,异绿原酸B,异绿原酸A,异绿原酸C,原花青素A₂和杠柳毒苷对照品适量,置于50 mL量瓶中,加50%甲醇定容至刻度,摇匀,配制成质量浓度分别为0.360 6,0.640 0,0.200 4,0.100 2,0.101 2,0.140 4,0.140 8,0.101 4 g·L⁻¹的混合对照品溶液①,备用。

2.3 供试品溶液的制备 取黑骨藤样品粉末(过2号筛)约0.5 g,精密称定,置50 mL具塞锥形瓶中,加入50%甲醇溶液10 mL,称定质量,超声提取



A, B. 混合对照品; C, D. 黑骨藤样品; 1. 新绿原酸; 2. 绿原酸; 3. 隐绿原酸; 4. 异绿原酸B; 5. 异绿原酸A; 6. 异绿原酸C; 7. 原花青素A₂; 8. 杠柳毒苷

图1 混合对照品(A, B)及黑骨藤样品(C, D)UPLC

Fig. 1 UPLC for mixed reference substance (A, B) and *Periploca forrestii* (C, D)

30 min(功率200 W,频率40 kHz),放冷,50%甲醇溶液补足失重,摇匀,0.22 μm微孔滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液。

2.4 方法学考察及结果

2.4.1 线性关系考察 精密吸取2.2项下混合对照品溶液①1 mL,分别置于50,100,250 mL量瓶中,加入50%甲醇溶液定容,摇匀,配制成混合对照品溶液②,混合对照品溶液③,混合对照品溶液④,备用。混合对照品溶液进样前均用0.22 μm微孔滤膜过滤,按2.1项下色谱条件进样。混合对照品溶液①进样1,2,3,4,5 μL,混合对照品溶液②和混合对照品溶液③分别进样1,3,5 μL,混合对照品溶液④进样1,2,3 μL,测定,记录峰面积。以待测成分进样量(μg)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,绘制标准曲线,得回归方程,相关系数r均>0.999,线性关系良好,结果见表3。

2.4.2 精密度考察 取同一批样品粉末(HGT-14)按2.3项下方法制备,按2.1项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。计算新绿原酸,绿原酸,隐绿原酸,异绿原酸B,异绿原酸A,异绿原酸C,原花青

表3 黑骨藤中8各成分的线性回归方程

Table 3 Linear regression equation of *Periploca forrestii*

成分	线性回归方程	r	线性范围/ μg
新绿原酸	$Y=8\ 545.9 X-14.015$	1.000 0	0.003 606~1.803
绿原酸	$Y=8\ 675.4 X-22.026$	1.000 0	0.006 400~3.200
隐绿原酸	$Y=6\ 597.2 X-6.471\ 5$	1.000 0	0.002 004~1.002
异绿原酸B	$Y=7\ 865.9 X-30.328$	0.999 9	0.001 002~0.501 0
异绿原酸A	$Y=10\ 457 X-40.638$	0.999 9	0.001 012~0.506 0
异绿原酸C	$Y=9\ 425.7 X-48.426$	0.999 9	0.001 404~0.702 0
原花青素A ₂	$Y=18\ 899 X-41.124$	0.999 9	0.000 563 2~0.704 0
杠柳毒苷	$Y=5\ 708 X-0.264\ 7$	1.000 0	0.000 405 6~0.507 0

素A₂和杠柳毒苷的峰面积,相对标准偏差(RSD)分别为0.2%,0.07%,0.2%,0.3%,0.9%,0.7%,0.1%,0.5%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性考察 取同一批样品粉末(HGT-14)按2.3项下方法制备,按2.1项下色谱条件,分别于0,2,4,6,8,10,12,24,36,48 h进行测定,记录峰面积。计算供试品溶液中新绿原酸,绿原酸,隐绿原酸,异绿原酸B,异绿原酸A,异绿原酸C,原花青素A₂和杠柳毒苷的峰面积的RSD分别为0.3%,0.4%,0.7%,1.5%,1.3%,1.7%,0.9%,1.8%,表明该供试品溶液在48 h内稳定。

2.4.4 重复性考察 取同一批样品粉末(HGT-14)6份,按2.3项下方法制备,按2.1项下色谱条件进样分析,记录峰面积。计算供试品溶液中新绿原酸,绿原酸,隐绿原酸,异绿原酸B,异绿原酸A,异绿原酸C,原花青素A₂和杠柳毒苷的质量分数,其平均值分别为2.085 4,9.222 3,2.055 9,0.137 9,0.130 4,0.383 3,2.462 8,0.068 2 mg·g⁻¹,RSD分别为1.2%,1.4%,1.0%,1.0%,1.1%,1.2%,1.8%,1.6%,表明该方法测定黑骨藤中上述8个成分含量的重复性良好。

2.4.5 加样回收考察 取同一批样品粉末(HGT-14)0.25 g,共6份,精密称定,加入混合对照品适量,按2.3项下方法制备,按2.1项下色谱条件进样分析,记录峰面积。新绿原酸,绿原酸,隐绿原酸,异绿原酸B,异绿原酸A,异绿原酸C,原花青素A₂和杠柳毒苷的加样回收率分别为97.36%,99.64%,97.88%,101.57%,102.43%,101.43%,98.80%,100.15%,RSD分别为1.0%,2.2%,2.2%,1.0%,0.3%,0.8%,2.3%,1.6%,结果表明该方法准确度良好。

2.5 黑骨藤样品中8个化学成分测定 按2.3项下

方法制备黑骨藤供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样含量测定,黑骨藤药材中8个化学成分含量见表4。

2.6 土壤因子的测定 土壤因子测定方法见表5。

3 黑骨藤8个化学成分与生态因子的统计学分析

3.1 相关性分析 采用双变量相关性分析方法,以生态因子参数作为自变量X,化学成分含量为因变量Y。采用SPSS 24.0统计软件进行双变量相关性分析,明确与化学成分具有相关性的生态因子。

气候因子中,新绿原酸含量与温度因子bio1,bio5,bio6,bio8,bio9,bio10,bio11,bio17,bio19呈极显著负相关,与降水因子bio12,bio14呈显著负相关,与alt呈显著正相关。绿原酸含量与bio14呈显著负相关;隐绿原酸与温度因子bio1,bio17,bio19呈极显著负相关,与bio5,bio6,bio8,bio9,bio10,bio11,bio14呈显著负相关;异绿原酸B与bio2呈显著负相关。异绿原酸A,异绿原酸C与气候因子无显著相关性;原花青素A₂与bio14,bio17,bio19呈显著负相关;杠柳毒苷与bio2,bio3,bio13,bio15,bio16,bio18呈显著负相关,与bio4, long, lat呈显著正相关。Pearson相关系数见表6。

土壤因子中,新绿原酸与土壤因子无显著相关性;绿原酸和隐绿原酸与Mo呈显著正相关;异绿原酸B与Mo呈显著正相关,与有效磷呈显著负相关;异绿原酸A与有效锌,Mo显著正相关;异绿原酸C与交换性镁,有效铁呈显著正相关;原花青素A₂与Mo呈极显著正相关,与速效钾呈显著负相关;杠柳毒苷与Se呈显著正相关性。Pearson相关系数见表7。

3.2 逐步回归分析 为了确定影响苗药黑骨藤8个化学成分含量的主导生态因子,在相关性分析基础上应用逐步回归分析方法,对生态因子进行进一步筛选。将22个气候因子与19个土壤因子导入多元线性回归分析,得到逐步回归方程。结果8个成分均与生态因子建立了回归方程,且P均<0.05,具有统计学意义,见表8。

以最冷季度降水量(bio19)为主导气候因子的成分有2个,新绿原酸和隐绿原酸,回归系数均为负值;以降水变异系数(bio15)为主导气候因子的成分2个,异绿原酸A和杠柳毒苷,回归系数为负值;以最暖季节平均温度(bio10)为主导气候因子1个:隐绿原酸,回归系数为负值;以最干月降水(bio14)为主导气候因子成分1个:绿原酸,回归系数为负值;土壤因子Mo(X₁₇)为主导土壤因子的成分3个:异绿

表4 黑骨藤药材中8个化学成分的含量

Table 4 Contents of 8 chemical components in *Periploca forrestii* medicinal materials mg·g⁻¹

No.	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸B	异绿原酸A	异绿原酸C	原花青素A ₂	杠柳毒苷	No.	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸B	异绿原酸A	异绿原酸C	原花青素A ₂	杠柳毒苷
HGT-1	1.055 8	3.157 3	1.172 2	0.058 7	0.170 3	0.449 9	0.827 5	0.005 8	HGT-19	3.831 9	11.321 6	4.891 5	0.092 8	0.691 0	0.577 2	2.104 0	0.113 7
HGT-2	1.049 3	3.756 6	0.942 6	0.049 2	0.156 5	0.745 5	1.692 1	0.019 7	HGT-20	3.390 2	7.894 4	2.762 0	0.052 7	0.082 5	0.776 5	0.285 8	0.022 5
HGT-3	1.410 1	11.316 4	2.786 6	0.064 1	0.190 1	0.874 3	1.541 2	0.024 3	HGT-21	0.676 3	1.634 6	0.695 6	0.057 4	0.239 8	0.323 1	1.311 4	0.027 4
HGT-4	2.812 5	3.142 2	1.626 3	0.046 0	0.065 5	0.277 8	0.134 1	0.039 3	HGT-22	1.000 6	0.845 9	0.648 1	0.052 6	0.124 2	0.287 4	0.469 6	0.018 8
HGT-5	0.327 8	1.084 3	0.345 7	0.063 8	0.843 8	0.179 3	1.147 0	0.636 2	HGT-23	2.358 0	8.208 7	2.498 9	0.038 6	0.038 9	0.368 3	1.236 7	0.292 6
HGT-6	2.401 3	4.122 9	2.537 2	0.051 0	0.140 6	0.237 1	0.301 6	0.035 7	HGT-24	2.788 9	4.791 1	2.319 7	0.085 9	0.263 9	0.209 3	1.292 7	0.048 4
HGT-7	0.806 1	4.385 3	1.047 5	0.052 5	0.067 6	0.229 1	1.604 3	0.012 0	HGT-25	1.049 3	5.665 7	1.065 7	0.056 5	0.059 7	0.353 2	0.993 5	0.057 0
HGT-8	0.300 4	1.129 7	0.444 0	0.056 7	0.076 1	0.129 4	1.987 0	0.036 4	HGT-26	2.388 4	10.205 1	2.908 5	0.082 6	0.347 3	0.984 5	2.205 7	0.084 0
HGT-9	5.740 3	3.816 6	4.019 9	0.053 6	0.109 1	0.310 0	1.214 4	0.011 4	HGT-27	3.043 9	4.840 1	3.301 8	0.052 3	0.070 3	0.426 1	2.430 7	0.083 3
HGT-10	3.436 5	8.289 9	3.399 5	0.061 1	0.103 2	0.488 0	2.138 3	0.246 0	HGT-28	3.088 6	3.268 4	2.011 8	0.059 8	0.112 6	0.390 5	1.459 6	0.086 0
HGT-11	2.631 9	3.569 5	1.414 2	0.046 6	0.227 3	0.399 3	2.017 8	0.053 0	HGT-29	4.242 0	3.766 2	2.128 9	0.068 9	0.205 8	0.897 8	0.252 4	0.018 8
HGT-12	2.623 5	7.362 7	2.411 3	0.047 8	0.051 9	0.243 5	0.226 3	0.178 8	HGT-30	2.542 2	5.685 7	1.740 8	0.061 3	0.742 4	0.748 9	0.621 1	0.333 1
HGT-13	2.388 3	2.294 8	1.234 9	0.049 6	0.150 3	0.206 7	1.837 3	0.031 9	HGT-31	3.203 8	12.770 4	4.056 9	0.061 4	0.084 8	1.051 6	0.835 9	1.187 8
HGT-14	2.074 2	9.263 9	2.073 8	0.141 9	0.125 2	0.375 9	2.615 4	0.097 5	HGT-32	2.198 5	3.822 5	1.741 7	0.047 8	0.794 6	0.205 3	1.224 7	0.288 1
HGT-15	5.567 7	9.892 9	4.849 3	0.047 1	0.059 0	0.262 0	1.442 8	0.114 2	HGT-33	3.495 8	13.346 8	4.424 8	0.197 3	0.417 9	1.357 6	1.394 9	0.383 5
HGT-16	4.251 9	6.880 4	3.0951	0.064 1	0.097 6	0.222 7	0.535 6	0.070 6	HGT-34	2.714 5	2.054 4	1.395 3	0.046 5	0.091 5	0.386 3	0.316 1	0.061 9
HGT-17	8.281 7	6.614 4	4.073 6	0.067 9	0.119 4	0.837 0	1.071 3	0.112 2	HGT-35	4.893 9	7.079 8	3.464 2	0.069 7	0.109 3	0.684 2	1.271 0	0.035 5
HGT-18	5.401 1	7.648 9	2.975 8	0.058 9	0.197 2	0.281 6	1.778 3	0.291 7									

表5 土壤因子的检测方法

Table 5 Detection method of Soil factor

土壤因子	分析方法
交换性(钙、镁)	石灰性土壤交换性盐基及盐基总量的测定 NY/T1615-2008
全氮、水解性氮	森林土壤氮的测定 LY/T1228-2015
全钾、速效钾	森林土壤钾的测定 LY/T1234-2015
全磷、有效磷	森林土壤磷的测定 LY/T1232-2015
水溶盐分	森林土壤水溶盐分分析 LY/T1251-1999
有机质	森林土壤有机质的测定及碳氮比的计算 LY/T1237-1999
有效硫	土壤有效硫的测定 NY/T1121.14-2006
有效(锰、铁、铜、锌)	土壤8种有效态元素的测定二乙烯三胺五乙酸浸提-电感耦合等离子体发射光谱法 HJ804-2016
Mo	硅酸盐岩石化学分析方法第30部分:44个元素量测定 GB/T14506.30-2010
B	区域地球化学样品分析方法第11部分银硼和锡量测定交流电弧-发射光谱法 DZ/T0279.11-2016
Se	区域地球化学样品分析方法第14部分硒量测定氢化物发生-原子荧光光谱法 DZ/T0279.14-2016
pH	森林土壤 pH 的测定 LY/T1239-1999

原酸 B, 异绿原酸 A, 原花青素 A₂, 回归系数为正值; 主导土壤因子交换性镁(X₂), 有效铁(X₁₃), Se(X₁₈) 均只对 1 个化学成分起主导作用, 且回归系数均为正值; 速效钾(X₉) 仅对原花青素 A₂ 起主导作用, 回归系数为正值; 全磷(X₅), 有效磷(X₁₀) 同时对异绿原酸 B 起主导作用, 回归系数均为负值。

4 小结

研究发现, 不同生境黑骨藤药材品质存在一定的差异性。结合化学成分含量测定结果分析, 咖啡酰基奎宁酸类化合物总含量较高的采样点有贵州省贵阳清镇市、毕节市纳雍县、贵阳市乌当区、毕节市织金县、贵阳市修文县, 广西省百色市田林县等;

表6 黑骨藤药材中8个化学成分含量与气候因子的Pearson相关系数

Table 6 Pearson correlation coefficients of contents of 8 chemical components in *Periploca forrestii* medicinal materials and climatic factors

成分	bio1	bio2	bio3	bio4	bio5	bio6	bio7	bio8	bio9	bio10	bio11
新绿原酸	-0.556 ²⁾	-0.174	-0.140	0.020	-0.475 ²⁾	-0.477 ²⁾	0.037	-0.513 ²⁾	-0.451 ²⁾	-0.480 ²⁾	-0.476 ²⁾
绿原酸	-0.268	-0.268	-0.238	0.171	-0.137	-0.286	0.155	-0.178	-0.277	-0.117	-0.294
隐绿原酸	-0.465 ²⁾	-0.225	-0.165	0.047	-0.386 ¹⁾	-0.403 ¹⁾	0.046	-0.412 ¹⁾	-0.397 ¹⁾	-0.379 ¹⁾	-0.411 ¹⁾
异绿原酸B	-0.185	-0.360 ¹⁾	-0.237	0.159	-0.090	-0.185	0.099	-0.155	-0.209	-0.054	-0.218
异绿原酸A	-0.081	-0.276	-0.225	0.225	0.039	-0.138	0.169	0.005	-0.154	0.073	-0.167
异绿原酸C	0.079	-0.043	-0.042	0.066	0.125	0.063	0.050	0.111	0.075	0.122	0.050
原花青素A ₂	-0.164	-0.269	-0.059	-0.071	-0.239	-0.086	-0.130	-0.134	-0.077	-0.189	-0.115
杠柳毒苷	-0.068	-0.355 ¹⁾	-0.355 ¹⁾	0.367 ¹⁾	0.118	-0.218	0.317	0.011	-0.211	0.176	-0.219
成分	bio12	bio13	bio14	bio15	bio16	bio17	bio18	bio19	long	lat	alt
新绿原酸	-0.364 ¹⁾	-0.086	-0.389 ¹⁾	0.111	-0.291	-0.582 ²⁾	-0.192	-0.586 ²⁾	-0.138	0.263	0.351 ¹⁾
绿原酸	-0.208	-0.131	-0.392 ¹⁾	-0.046	-0.191	-0.314	-0.171	-0.317	0.103	0.131	0.071
隐绿原酸	-0.247	-0.036	-0.378 ¹⁾	0.093	-0.187	-0.482 ²⁾	-0.129	-0.487 ²⁾	-0.057	0.202	0.326
异绿原酸B	-0.184	-0.154	-0.213	-0.109	-0.197	-0.209	-0.182	-0.211	0.070	0.192	0.000
异绿原酸A	-0.119	-0.310	0.051	-0.314	-0.235	0.035	-0.256	0.033	0.232	0.321	-0.173
异绿原酸C	-0.159	-0.148	-0.120	-0.072	-0.072	0.045	-0.133	0.050	0.123	-0.112	-0.046
原花青素A ₂	-0.185	-0.082	-0.390 ¹⁾	0.134	-0.133	-0.369 ¹⁾	-0.018	-0.364 ¹⁾	-0.184	0.177	0.099
杠柳毒苷	-0.234	-0.368 ¹⁾	-0.051	-0.420 ¹⁾	-0.354 ¹⁾	-0.013	-0.408 ¹⁾	-0.017	0.337 ¹⁾	0.383 ¹⁾	-0.214

注: ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01(表7同)。

表7 黑骨藤药材中8个化学成分含量与土壤因子的Pearson相关系数

Table 7 Pearson correlation coefficients of contents of 8 chemical components in *Periploca forrestii* medicinal materials and soil factors

成分	交换性钙(X ₁)	交换性镁(X ₂)	全氮(X ₃)	全钾(X ₄)	全磷(X ₅)	水溶性盐(X ₆)	有机质(X ₇)	水解性氮(X ₈)	速效钾(X ₉)	有效磷(X ₁₀)
新绿原酸	0.001	-0.046	-0.166	0.226	-0.006	-0.222	-0.116	-0.174	0.228	0.168
绿原酸	0.218	0.221	0.280	-0.081	0.278	-0.111	0.290	0.154	-0.014	0.088
隐绿原酸	0.114	0.136	0.117	-0.083	0.298	-0.161	0.168	0.017	0.103	0.211
异绿原酸B	0.017	0.191	-0.178	-0.130	-0.056	-0.246	-0.143	-0.191	-0.110	-0.341 ¹⁾
异绿原酸A	0.049	0.295	0.071	0.073	0.247	-0.065	0.073	0.054	0.005	0.045
异绿原酸C	0.249	0.440 ²⁾	0.086	-0.100	0.075	-0.051	0.106	0.053	-0.149	-0.007
原花青素A ₂	0.136	0.095	0.024	-0.226	0.148	-0.098	0.048	0.016	-0.354 ¹⁾	-0.100
杠柳毒苷	-0.083	0.300	0.270	0.096	0.049	0.007	0.256	0.226	0.107	0.069
成分	有效硫(X ₁₁)	有效锰(X ₁₂)	有效铁(X ₁₃)	有效铜(X ₁₄)	有效锌(X ₁₅)	B(X ₁₆)	Mo(X ₁₇)	Se(X ₁₈)	pH(X ₁₉)	
新绿原酸	-0.236	-0.261	-0.010	0.062	-0.112	0.284	0.170	-0.047	-0.028	
绿原酸	0.116	0.218	0.213	0.148	0.003	0.186	0.378 ¹⁾	0.281	-0.204	
隐绿原酸	-0.101	-0.044	0.105	0.254	0.052	0.099	0.438 ²⁾	0.231	-0.116	
异绿原酸B	0.014	0.021	0.256	-0.015	-0.054	0.091	0.425 ¹⁾	0.004	-0.330	
异绿原酸A	-0.065	0.119	0.074	0.292	0.406 ¹⁾	0.041	0.452 ²⁾	0.235	-0.197	
异绿原酸C	0.007	0.185	0.370 ¹⁾	-0.010	0.077	0.175	0.152	0.218	-0.227	
原花青素A ₂	0.265	-0.004	0.086	0.238	0.053	-0.210	0.444 ²⁾	0.103	-0.057	
杠柳毒苷	-0.067	-0.006	-0.008	-0.048	0.309	0.247	0.075	0.349 ¹⁾	-0.192	

原花青素A₂含量较高的采样点贵州毕节织金县、贵阳市修文县、贵阳市云岩区;杠柳毒苷含量较高的

采样点贵州省贵阳市乌当区、贵州省遵义市正安县。

表8 黑骨藤药材中8个化学成分含量与生态因子的逐步回归方程

Table 8 Stepwise regression equations of contents of 8 chemical components in *Periploca forrestii* medicinal materials and ecological factors

成分	回归方程	F	r	P
新绿原酸	$Y=14.996\ 946-0.205\ 421bio19$	17.255	0.586	0.000\ 217
绿原酸	$Y=22.132\ 461-0.933\ 944bio14$	5.987	0.392	0.019\ 906
隐绿原酸	$Y=17.736\ 887-0.080\ 165bio19+1.452\ 492X_{18}-0.528\ 364bio10$	8.615	0.674	0.000\ 263
异绿原酸B	$Y=0.056\ 364+0.021\ 107X_{17}-0.022\ 503X_3+0.000\ 290X_{13}-0.001\ 077X_{10}$	7.649	0.711	0.000\ 226
异绿原酸A	$Y=1.545\ 275+0.112\ 093X_{17}-0.020\ 807bio15$	7.631	0.568	0.001\ 950
异绿原酸C	$Y=0.318\ 463+0.044\ 162X_2$	7.927	0.440	0.008\ 155
原花青素A ₂	$Y=1.342\ 249+0.326\ 698X_{17}+0.002\ 358X_9$	7.616	0.568	0.001\ 971
杠柳毒苷	$Y=2.063\ 500-0.026\ 230bio15$	7.073	0.420	0.011\ 984

根据逐步回归分析建立的回归模型,可见不同产地黑骨藤中各个化学成分含量在一定程度上会受到采样点生态因子和土壤因子的影响,从而影响药材品质。隐绿原酸、异绿原酸A均受到气候因子和土壤因子的双重影响。异绿原酸B,异绿原酸C,原花青素A₂主要受到土壤因子的影响。在一定范围内,土壤中硒、铜、交换性镁、有效铁含量越高越有益于黑骨藤药材中有效成分形成积累,而磷、有效磷、速效钾则反之。土壤中的大量元素氮对成分积累无显著影响。新绿原酸、绿原酸、杠柳毒苷主要受到气候因子的影响,最冷季度降水量、最暖季节平均温度、最干月降水、降水变异系数的值均与黑骨藤药材有效成分积累呈负相关。单咖啡酰基奎宁酸类成分(新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸)主要受到降水量及温度的影响,双咖啡酰基奎宁酸类成分(异绿原酸B,异绿原酸A,异绿原酸C)及原花青素A₂含量主要受到土壤因子的影响,杠柳毒苷主要是受到降水变异系数影响。因此,如果进行黑骨藤引种或栽培中,可以适当提高土壤中硒、铜、交换性镁、有效铁的含量,降低磷和钾的供给。

黑骨藤品质是多种生态因子综合作用的结果,试验中所考察的生态因子变量也存在一定的局限性,未包含生境的坡度,坡向,植被类型等。土壤中各种酶活性^[20,27]等,人为因素等也会影响其药材的品质^[28],在采集过程中发现黑骨藤多长在灌木丛中,并攀附较高植物生长,且部分还生长在岩石缝里(含土壤)的地方。基于中药生态种植及中药生态农业的相关原理^[29-30],在黑骨藤药材的种植栽培(或移栽)过程中应当综合考虑其生态环境的适宜性,并充分整合能促进其次生代谢产物积累的生态因子,以期提高其药材品质。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 陈芳,汪毅,杜江. 贵州民族药物研究及开发现状[J]. 中国民族民间医药,2013,22(6):1-7.

[2] 李雪峰,刘育辰,刘刚,等. 苗药黑骨藤化学成分及药理作用研究进展[J]. 中成药,2018,40(4):904-912.

[3] 王霞,蒋礼,何燕玲,等. 黑骨藤中咖啡酰基奎宁酸类化合物体外抗类风湿性关节炎机制研究[J]. 中国药理学通报,2018,34(10):1362-1367.

[4] 黄婷,周璐,梅婵,等. 枸杞中原花青素和总黄酮的抗氧化活性研究[J]. 生物化工,2020,6(1):72-75.

[5] 马立,王怡. 杠柳毒苷对慢性心力衰竭大鼠心肌PLB和SERCA mRNA表达的影响[J]. 江苏中医药,2009,41(3):71-72.

[6] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:381.

[7] 徐宏,杜江. 反相高效液相色谱法测定黑骨藤中滇杠柳苷I的含量[J]. 中国民族医药杂志,2009,15(7):53-55.

[8] 刘育辰,刘丽苹,刘刚,等. 苗药黑骨藤多指标的含量测定及聚类分析[J]. 中国药房,2018,29(12):1636-1639.

[9] 安兰兰,李开敏,何倩倩,等. 基于6种咖啡酰基奎宁酸类成分结合化学计量法评价不同产地苗药黑骨藤的质量[J]. 中草药,2020,51(22):5850-5855.

[10] 胡恩明. 黑骨藤指纹图谱及谱效关系探索性研究[D]. 贵阳:贵州师范大学,2016

[11] 赵喜玲,张宏,李小云,等. 黑骨藤超高效液相色谱特征图谱的研究[J]. 药物分析杂志,2016,36(11):1963-1970.

[12] 胡茜,李琪,陈坤,等. 响应面法优化黑骨藤指纹图谱的液相色谱条件[J]. 中药材,2017,40(11):2632-2637.

[13] 马雪,何燕玲,刘文静,等. HPLC法同时测定苗药黑骨藤中6种咖啡酰基奎宁酸成分含量及指纹图谱研究[J]. 中国新药杂志,2020,29(9):1052-1058.

[14] 刘耀,胡蝶,程纯,等. 苗药黑骨藤UPLC-MS/MS指

- 纹图谱研究[J]. 大理大学学报, 2020, 5(8): 21-26.
- [15] 郭江涛, 刘杰, 黎正旭, 等. 苗药黑骨藤中含总黄酮及总皂苷量测定[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2018, 34(3): 277-280.
- [16] 刘云, 刘新元, 朱欣婷. 苗药黑骨藤毛细管电泳指纹图谱的建立[J]. 遵义医学院学报, 2013, 36(3): 198-202.
- [17] 曹海禄, 曹国番, 魏建和, 等. 遗传和环境因子对药用植物品质的影响[J]. 中草药, 2007, 38(5): 785-788.
- [18] 鄢丹, 王伽伯, 李俊贤, 等. 论道地药材品质辨识及其与生态环境的相关性研究策略[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(17): 2672-2675.
- [19] 杜欢, 莫家祺, 徐僮, 等. 藏族药川西獐牙菜化学成分与生态因子的相关性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(20): 141-146.
- [20] 谷文超, 母茂君, 杨敏, 等. 太白贝母鳞茎品质与根际土壤因子的相关性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(7): 165-177.
- [21] 林红梅, 韩红祥, 李岳桦, 等. 五味子木脂素与生态因子相关性研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(24): 4281-4286.
- [22] 高萌, 陈欢, 李焜仪, 等. 枳壳活性成分与生态因子的相关性[J]. 中药材, 2019, 42(11): 2508-2512.
- [23] 周国富, 刘金欣, 李晓娟, 等. 黄芩生态适宜性评价及生态因子对5种主要指标性成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(20): 28-32.
- [24] 张甜, 程林, 杨林林, 等. 生态因子及关键酶基因表达对秋季黄芩采收期主要药效成分合成的影响[J]. 中草药, 2019, 50(4): 936-944.
- [25] 杨婉珠, 刘育辰, 杨虹, 等. 苗药黑骨藤醇提物乙酸乙酯部位对离体蛙心功能的影响[J]. 中国药房, 2019, 30(19): 2650-2655.
- [26] 杨婉珠, 杨虹, 刘育辰, 等. 苗药黑骨藤正丁醇部位对大剂量阿霉素所致大鼠急性心力衰竭的保护作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(10): 86-90.
- [27] 王骞, 邬佩宏, 杨敏, 等. 滇重楼根茎品质与根际土壤因子的相关性分析[J]. 中草药, 2020, 51(22): 5839-5849.
- [28] 张小波, 郭兰萍, 黄璐琦. 中药区划研究进展[J]. 中国农业资源与区划, 2010, 31(3): 64-69.
- [29] 王升, 蒋待泉, 康传志, 等. 药用植物次生代谢在中药材生态种植中的作用及利用[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(9): 2002-2008.
- [30] 郭兰萍, 康传志, 周涛, 等. 中药生态农业最新进展及展望[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(8): 1851-1857.

[责任编辑 顾雪竹]