海拔高度与黔产白及 9 种主要成分相关性研究

迟明艳，黄勇，李勇军，王爱民*
（贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室，民族药与中药开发应用教育部工程研究中心，药学院，贵阳 550025）

［摘要］ **目的：**研究分析生长在不同海拔高度白及中有效成分含量差异以及变化规律，探讨海拔与有效成分之间的相关性。**方法：**采用 UPLC 测定不同海拔白及药材中的 4-羟基苯基葡萄糖苷(**1**)，4-(葡糖糖氧基)-肉桂酸葡萄糖氧基苄酯(**2**)，1，4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯-2-葡萄糖苷(**3**)，1，4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯(**4**)，二氢菲 5(**5**)，1，4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯-2-(4-*O*-肉桂酰基)葡萄糖苷(**6**)，二氢菲 1(**7**)，苄基氢菲 3(**8**)，1，4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯-2-(4-*O*-肉桂酰基-6-*O*-乙酰基)葡萄糖苷(**9**)的含量，通过 SPSS 17.0 统计软件分析 9 个指标成分与海拔高度的相关性。**结果：**不同海拔高度白及有效成分总量差别较大。在 779～1 337 m，有效成分总量较高且随海拔高度的升高而呈现增加趋势。**结论：**白及中有效成分含量与高度密切相关，建议该药材栽培在 800～1 300 m。

［关键词］ 白及；主要成分；海拔高度；相关性
［中图分类号］ R282.2 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1005-9903(2016)16-0036-04
［doi］ 10.13422/j.cnki.syfjx.2016160036

Correlation Between Altitude and Nine Kinds of Main Components in Bletilla Rhizoma from Guizhou Province

CHI Ming-yan, HUANG Yong, LI Yong-jun, WANG Ai-min*
(*Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou Province*, *Engineering Research Center for Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine*, *Ministry of Education*, *Guizhou Medical University*, *Guiyang* 550025, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To study the differences in the content of effective constituents of Bletillae Rhizoma from areas with different altitudes, in order to explore the correlation between the altitudes and the contents of effective constituents. **Method**: The content of 4-hydroxymethylphenyl *β-D*-glucoside(**1**), blestroside (**2**), dactylorhin A(**3**), militarine(**4**), dihydrophenanthrenes 5(**5**), gymnosides V(**6**), dihydrophenanthrenes 1 (**7**), benzylphenanthrenes 3(**8**), gymnosides IX(**9**) were determined by UPLC. The correlation between the contents of nine kinds of components and the altitude was analyzed by SPSS 17.0 software. **Result**: The total effective constituents from areas with different altitudes had significant differences. The samples from areas with altitudes between 779-1 337 m showed a higher content of total effective constituents, which rose with the increase of the altitude. **Conclusion**: Altitude is closely related to the content of effective constituents of Bletillae Rhizoma from Guizhou Province, which suggests that this herb shall be planted in areas with altitudes between 800-1 300 m.

[**Key words**] Bletillae Rhizoma; main constituent; altitude; correlation

白及为兰科植物白及的干燥块茎，具有收敛止血，消肿生肌等功效[1]。现代药理研究表明，白及药用功能广泛，药用价值高，具有止血，抗菌，抗肿瘤及促进血管内皮细胞生长等药理作用。另有研究发

［收稿日期］ 20151226(008)
［基金项目］ 国家自然科学基金项目(81360636，81460630)；贵阳市科学技术计划项目(筑科合同[2012204]20 号)
［第一作者］ 迟明艳，硕士，讲师，从事新药研发研究，Tel：0851-88416167，E-mail：379876001@qq.com
［通讯作者］ * 王爱民，教授，从事药物质量控制研究，Tel：0851-88416167，E-mail：jack_568@163.com

现白及正逐渐成为我国现代医药工业的重要原材料[2]。白及主要分布在 100 ~ 3 200 m 的常绿阔叶林下,栎树林或针叶林下、路边草丛、岩石或石缝中[3]。贵州地区山多,气候温和,山阴多潮湿,是白及生长最好的地理环境,经过科学驯化,贵州地区已成功实现白及的规模化种植。贵州省白及分布分散,产地海拔高度相差悬殊,关于不同海拔高度对白及有效成含量的影响未见报道。本研究基于对白及止血药效物质基础的研究,选择药材中含量较高和具有活性的成分[4]4-羟基苯基-葡萄糖苷(**1**),4-(葡糖糖氧基)-肉桂酸葡萄糖氧基苄酯(**2**),1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯-2-葡萄糖苷(**3**),1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯(**4**),二氢菲 5(**5**),1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯-2-[4-*O*-肉桂酰基]葡萄糖苷(**6**),二氢菲 1(**7**),苄基氢菲 3(**8**),1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯-2-[4-*O*-肉桂酰基-6-*O*-乙酰基]葡萄糖苷(**9**),共 9 个化合物作为含量测定指标,采集贵州省内海拔高度在 410 ~1 908 m 不同区域的白及,通过 UPLC 测定,讨论不同海拔高度对白及有效成分含量的影响趋势,为白及的道地性开发和栽培区域划分提供参考。

1 材料

Acquity UPLC(美国沃特世公司,包括二元梯度泵、真空脱气机、自动进样器、色谱柱温箱、阵列二极管检测器,Empower 2 工作站),TGL-16G 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂),AE240 型 1/10 万电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),WP-UP-Ⅱ-10 型超纯水机(四川沃特尔科技发展有限公司),G130 型 GPS 坐标定位仪(北京合众思壮科技股份有限公司)。

白及药材于 2014 年 5 月份集中采集,由贵阳医学院药学院生药学与药用植物学教研室龙庆德副教授鉴定为兰科植物白及 *Bletilla striata* 的干燥块茎,见表 1。化合物 **1** ~ **9** 由本实验室从白及药材中分离得到,经^{1}H,^{13}C-NMR,MS,UV 和 IR 鉴定,TLC 纯

表 1 不同海拔高度白及中 9 种化学成分的质量分数

Table 1 Contents of nine chemical constituents in Bletillae Rhizoma from areas with different altitudes %

No.	产地	海拔/m	化合物									总量
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1	贵州黎平	410	0.163	0.088	0.136	0.792	0.011	0.009	0.012	0.033	–	1.244
2	贵州从江	550	0.338	0.004	0.116	0.369	0.019	0.015	0.004	0.023	0.223	1.111
3	贵州正安桴焉茶坪	670	0.410	0.052	0.349	1.161	0.014	0.065	0.010	0.047	0.203	2.768
4	贵州正安桴焉永合	690	0.163	0.015	0.284	0.579	0.009	0.012	0.028	0.015	–	1.104
5	贵州施秉	779	0.468	0.203	0.885	1.206	0.116	0.065	0.009	0.004	0.119	3.075
6	贵州务川洪渡河	816	0.648	0.107	0.483	2.157	0.055	0.079	0.019	0.380	0.242	3.828
7	贵州茂兰自然保护区	864	0.889	0.408	0.899	0.889	0.203	0.048	0.007	0.078	0.008	3.429
8	贵州清镇	870	0.453	0.056	0.469	2.311	0.209	0.008	0.120	0.019	0.006	3.651
9	贵州正安桴焉坪生	889	0.257	0.088	0.644	1.447	0.025	0.008	0.006	0.011	0.010	2.496
10	贵州正安格林	890	0.467	0.074	0.548	1.750	0.052	0.074	0.020	0.039	0.222	3.246
11	贵州清镇	965	1.330	0.231	0.996	2.036	0.234	0.089	0.009	0.078	0.006	5.009
12	贵州望谟	1 081	0.936	0.226	0.779	1.960	0.088	0.108	0.009	0.155	0.006	4.267
13	贵州黄平	1 053	1.336	0.377	0.882	2.159	0.155	0.004	0.005	0.124	0.049	5.091
14	贵州省贵阳市金筑镇	1 134	0.636	0.306	0.886	1.693	0.116	0.129	0.048	0.569	0.158	4.541
15	贵州茂兰自然保护区	1 205	0.869	0.231	0.708	3.695	0.119	0.089	0.045	0.134	0.718	6.608
16	贵州贵阳市花溪	1 208	0.918	0.109	0.663	1.698	0.015	0.006	–	0.138	0.356	3.903
17	贵州贵阳市乌当区	1 319	0.689	0.156	0.778	1.695	0.236	–	0.008	0.139	0.569	4.270
18	贵州清镇麦格乡	1 337	0.966	0.267	0.008	2.196	0.188	0.056	–	0.169	0.633	4.483
19	贵州大方	1 607	0.436	0.155	0.006	1.320	0.055	–	0.003	0.110	0.623	2.708
20	贵州盘县	1 805	0.622	0.103	0.026	1.339	0.008	0.114	0.046	0.44	0.229	2.927
21	贵州六枝	1 908	0.204	0.005	0.206	0.599	0.007	0.009	0.024	0.030	0.008	1.068

注:"–"低于检测限。

度检查显示单一斑点,UPLC-PDA 在多个波长检测,峰面积归一化含量均 >98%;乙腈(色谱纯,美国 TEDIA 有限公司),甲醇(分析纯,上海振兴化工一厂),纯净水(广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

2 方法与结果

2.1 海拔高度测定 采用手持 GPS 定位仪测量白及的采集地海拔。海拔高度最低的为 410 m,来至于贵州黎平;而海拔高度最高的达到 1 908 m,来至贵州六枝。不同采集地样品的海拔高度相差甚大,具有研究意义。

2.2 供试品溶液的制备 白及药材经 60 ℃干燥,粉碎过 40 目筛,取约 1 g,精密称定,置烧瓶中,精密加入 50% 甲醇 25 mL,称定质量,水浴加热回流提取 2 h,放置室温,用 50% 甲醇补足失重,摇匀,滤过,1 万 $r \cdot min^{-1}$离心 10 min,即得。

2.3 对照品溶液的制备 分别精密称定化合物 **1** ~ **9** 为 10.96, 1.06, 10.95, 10.30, 1.10, 1.10, 1.27, 1.14, 1.19 mg,加甲醇溶解到 1 mL,得各对照品储备液。各取 50 μL,加 50% 甲醇至 1 mL,得混合对照品溶液。

2.4 色谱条件 在前期研究基础上[5],以 UPLC-PAD 为检测器。色谱条件为 Acquity BEH C_{18}色谱柱(2.1 mm×150 mm, 1.7 μm);流动相乙腈(A)-水(B);流速 0.3 $mL \cdot min^{-1}$;梯度洗脱(0 ~ 10 min, 5% ~ 16% A; 10 ~ 24 min, 16% ~ 30% A; 24 ~ 27 min, 30% A; 27 ~ 32 min, 31% A; 32 ~ 33 min, 31% ~ 37% A; 33 ~ 45 min, 37% ~ 55% A; 45 ~ 46 min, 55% ~ 100% A),柱温为 45 ℃,二极管阵列检测器(PDA),检测波长 280 nm,进样量 2 μL。9 种混合对照品和白及药材色谱图结果见图 1。

2.5 白及化学成分含量的测定 取不同海拔高度白及药材,按 **2.2** 项下方法制备样品(n = 3),同时计算 9 种成分含量的总量,结果见表 1。结果显示 9 个成分在不同的海拔高度差异较大。贵州茂兰自然保护区(1 205 m)9 种成分的总量最高(6.608%),贵州六枝(1 908 m)最低(1.068%)。表明不同海拔高度白及有效成分含量有明显差异。

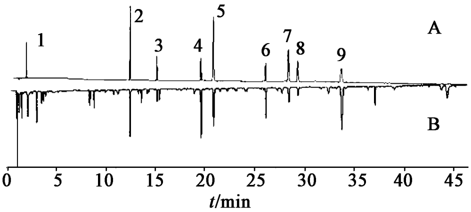

图 1 9 种混合对照品(A)和白及药材(B)UPLC

Fig. 1 UPLC of mixed reference substances (A) and Bletillae Rhizoma (B)

2.6 相关性分析 运用 SPSS 17.0 统计学软件将有效成分含量与对应采样区域海拔高度进行相关性分析,结果表明,所有指标相关性不明显。但是从 21 份样品趋势图中可以看出(图 2),中段海拔 9 个成分总量较高,以 3%(9 个成分总量)为划分依据,将海拔划分为 410 ~ 690, 779 ~ 1 337 m 和 1 337 m 以上。在海拔为 779 ~ 1 337 m 进行相关性分析,结果见表 2。

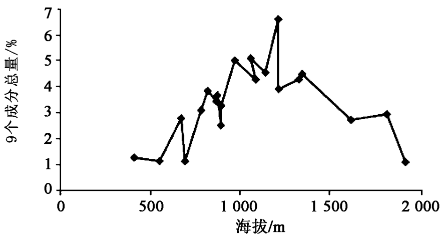

图 2 海拔高度与 9 个成分总量的趋势

Fig. 2 Trend chart of altitude and 9 total effective constituents

由表 2 可以看出,化合物 **9** 与海拔的相关系数为 0.731, P = 0.003(双侧, <0.05),说明两者间有显著正相关趋势;9 个成分总量与海拔的相关系数为 0.573, P = 0.032(双侧, <0.05),说明两者间有显著正相关趋势,两者总体随着海拔高度的增高呈增加趋势。

3 讨论

白及化学成分有芪类、联苄类、菲类、联菲类、联菲醚类、菲比吡喃类、联苄葡萄糖苷类、菲并螺甾内

表 2 白及中 9 种化学成分的总量与海拔的相关性分析

Table 2 Correlation between contents of nine chemical constituents and altitude

海拔/m	指标	化合物 1	2	3	4	5	6	7	8	9	总量
410 ~ 1 908	Pearson 相关性	0.176	0.086	-0.205	0.163	0.026	0.280	0.076	0.358	0.381	0.182
	显著性(双侧)	0.447	0.710	0.372	0.481	0.910	0.219	0.744	0.111	0.088	0.430
779 ~ 1 337	Pearson 相关性	0.383	0.193	-0.247	0.375	0.197	-0.060	-0.191	0.268	0.731	0.573
	显著性(双侧)	0.177	0.508	0.395	0.187	0.500	0.838	0.512	0.355	0.003	0.032

酯类以及甾体、三萜和花色素苷类等化合物近 50 种[6-7]，以白及中单一指标分析白及与海拔相关性的方法，不能较全面地反映白及与海拔的信息。本研究前期，采取了中药谱效学研究思路，以指纹图谱为基本手段，通过家兔体外凝血时间影响试验，采用均匀设计，对白及不同组分及其组合物进行了指纹图谱和药理活性研究，实验数据经统计学处理，以统计学手段挖掘了白及化学成分与活性的相关性，探讨其止血活性的药效物质基础。在此基础上，本实验选择药材中含量较高的成分 **1** 和具有活性的成分 **2**～**9**[4]，同时采用 UPLC 测定了 21 份不同海拔高度白及中 9 个成分的含量，更具有科学性和代表性。

文献提示植物化学成分的含量与海拔高度有显著相关[8]。例如生长于高海拔、肥沃砂质土壤的鲜缬草含油量高[9]；鱼腥草槲皮素含量与海拔高度、土壤养分含量间相关性均不显著[10]；宽叶缬草中挥发油含量与海拔有显著负相关趋势[11]。白及有效成分的含量的高低受品种特性、环境因素、栽培条件及技术等因素的综合影响，海拔对植物生长的影响也是多方面的，会影响植物的生长、形态和发育。研究表明随海拔升高，地形地貌的改变，土壤肥力的不同、气温降低、风力增强、降水加大、气压降低、日照增强、二氧化碳含量减少等特征，形成了垂直差异。本文采用 9 个指标成分，包括了联苄葡萄糖苷类、联苄类、菲类、联菲类，比较了不同海拔高度白及样品中有效成分的含量差异。从整体来看，在 779～1 337 m，1，4-二［4-(葡萄糖氧)苄基］-2-异丁基苹果酸酯-2-［4-*O*-肉桂酰基-6-*O*-乙酰基］葡萄糖苷(**9**)与海拔间具有正相关，9 个成分总量随海拔高度的升高也呈现增加趋势。海拔高度升高，大气温度降低，薄雾天气相对增多，太阳辐射增强，有效成分含量发生变化。白及有效成分在低海拔高度 410～690 m，含量较低，由于白及为喜阴性植物，可能与光照较充足，降水量较少有关。而在海拔高度 1 337 m 以上，白及含量较低，与高山的气候寒冷，积温低有关。提示 800～1 300 m，为白及的适宜栽培区域，这个结果与本实验在白及样品资源调查时结果一致，在 800 m 以下和 1 300 m 以上，尤其是野生白及更为少见，大多数的白及为 1～2 年生，而且分布仅1～2 株，样品量极少。但由于生态因素的不可衡量和不确定性，还应积极探索生态因素与有效成分的积累规律，深入研究生态因子与白及有效成分形成的响应过程和生理调控机制，最终实现白及药材的科学种植。

［参考文献］

［1］ 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部［S］. 北京：中国医药科技出版社，2015：103.
［2］ 李伟平，何良艳，丁志山. 白及的应用资源现状［J］. 中华中医药学刊，2012，30(1)：158-160.
［3］ 吴明开，刘作易. 贵州珍惜药材白及［M］. 贵阳：贵州科技出版社，2013：7.
［4］ 汤逸飞，阮川芬，应晨，等. 白及属植物化学成分与药理作用研究进展［J］. 中草药，2014，45(19)：2864-2870.
［5］ 王爱民，焉燕，兰波，等. UPLC 同时测定白及药材中 9 种指标成分的含量［J］. 中国中药杂志，2014，39(11)：2051-2054.
［6］ 任华忠，何毓敏，杨丽. 白及化学成分其药理活性研究进展［J］. 亚太传统医药，2009，5(2)：134-140.
［7］ 韩广轩，王立新，张卫东，等. 中药白及的化学成分研究(Ⅱ)［J］. 第二军医大学学报，2002，23(9)：1029-1031.
［8］ 王健，张连学，赵岩，等. 长白山地区不同海拔人参挥发油含量及其成分变化规律［J］. 安徽农业科学，2011，39(14)：8315-8318，8321.
［9］ 黄宝康，郑汉臣，秦路平. 缬草属植物的镇静催眠作用及机制［J］. 药学实践杂志，2007，25(3)：134-136，142.
［10］ 谷力，谷臣华. 武陵山区缬草属种类和优良种及其化学成分的研究［J］. 林产化学与工业，2002，22(3)：23-27.
［11］ 代泽琴，钱志瑶，周道堂，等. 海拔高度对黔产宽叶缬草中挥发油及乙酸龙脑酯含量的影响［J］. 中国实验方剂学杂志，2015，21(17)：56-58.

［责任编辑　邹晓翠］