

栽培唐古特大黄中多糖和蒽醌含量的动态变化研究*

刘何春^{1,2}, 周国英^{1,3**}, 聂秀青^{1,2}, 熊丰^{1,2}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所 藏药研究重点实验室, 西宁 810008;

2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室, 西宁 810008)

摘要 目的:以青海省3个不同地区栽培的唐古特大黄药材为实验材料,测定根中大黄多糖和蒽醌含量,比较多糖和蒽醌含量年际和月际的变化特征。**方法:**测定多糖含量采用硫酸比色法,对照品为0.102 0 mg·mL⁻¹D-无水葡萄糖标准溶液,5%苯酚溶液显色,490 nm波长处紫外分光光度仪下测定吸收度。测定蒽醌含量采用高效液相色谱法,色谱柱为Eclipse plus C₁₈(4.6 mm×250 mm、5 μm),流动相A为甲醇,流动相B为0.1%乙酸溶液,梯度洗脱,检测波长254 nm。**结果:**(1)湟中县群加乡、湟源县东峡乡2~9年生的大黄多糖含量呈现出“M”型的变化趋势,西宁市廿里铺镇3~7年生的大黄多糖含量呈现出“V”型的变化趋势;(2)5年生的湟中县群加乡、西宁市廿里铺镇、湟源县东峡乡栽培唐古特大黄5~11月的大黄多糖含量呈现出“W”型的变化趋势;(3)湟中县群加乡、湟源县东峡乡2~9年生的大黄蒽醌含量呈现出“N”型的变化趋势,西宁市廿里铺镇3~7年生的大黄多糖含量呈现出倒“V”型的变化趋势;(4)5年生的湟中县群加乡、西宁市廿里铺镇、湟源县东峡乡栽培唐古特大黄5~11月的大黄蒽醌含量呈现出三峰变化趋势。**结论:**地理位置及生境条件(土壤有机质、海拔、经纬度)不同的种植地,唐古特大黄药材多糖和蒽醌含量随植物的生长发育时期节律波动(包含生长期和繁殖期的年际变化和5~11月的月际变化),且表现出基本一致的动态变化规律。

关键词:栽培药材;唐古特大黄;多糖;蒽醌;含量变化;动态特征;硫酸比色法;高效液相色谱法

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)05-0782-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.05.07

Dynamic change of polysaccharides and anthraquinones in cultivated *Rheum tanguticum**

LIU He-chun^{1,2}, ZHOU Guo-ying^{1,3**}, NIE Xiu-qing^{1,2}, XIONG Feng^{1,2}

(1. Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences,

Xining 810008, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Qinghai Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Biological Resources, Xining 810008, China)

Abstract Objective: To determine annual and monthly change of the content of polysaccharides and anthraquinones in root of *Rheum tanguticum* from 3 habitats in Qinghai Province. **Methods:** Polysaccharides were

* 青海省科技支撑计划项目(2014-NS-115); 国家科技支撑计划项目(2011BA105B03); 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-GS-10); 青海省重点实验室发展建设专项(2017-ZJ-Y10)资助

** 通信作者 Tel: (0971)6159630; E-mail: zhougy@nwipb.cas.cn

第一作者 Tel: 18089019517; E-mail: liuhechun0812@126.com

determined at 490 nm by phenol-sulfuric acid method with 0.102 0 mg · mL⁻¹ D-glucose solution as standard. Anthraquinones were determined by HPLC with Eclipse plus C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) as the column and methanol-0.1% acetic acid as the mobile phase with gradient elution. The detection wavelength was 254 nm.

Results: The results showed that: (1) The annual change of polysaccharides presented “M”-shaped in samples from Qunjia and Dongxia (2-9 years) and “V”-shaped in samples from Ershilipu (3-7 years); (2) The monthly change of polysaccharides presented “W”-shaped in samples from three habitats; (3) The annual change of anthraquinones presented “N”-shaped in samples from Qunjia, Dongxia (2-9 years) and presented “V”-shaped in samples from Ershilipu (3-7 years); (4) The monthly change of anthraquinones presented three peaks in samples from three habitats. **Conclusion:** Polysaccharides and anthraquinones in cultivated *Rheum tanguticum* in different habitats and environments (including soil organic matter, elevation, latitude and longitude) fluctuated by plant growth and development rhythm. Annual changes during the growing season and the breeding season and monthly changes during May to November of the above two kinds of components were similar.

Keywords: cultivated *Rheum tanguticum*; polysaccharides; anthraquinones; content variation; dynamic characteristics; phenol-vitriol colorimetry; HPLC

唐古特大黄 (*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf.) 为蓼科 (Polygonaceae) 大黄属 (*Rheum* Linn.) 多年生草本植物, 藏医称“君扎”, 是《中华人民共和国药典》2015年版中规定的大黄药材的主要来源之一, 是青海省的道地药材之一^[1-2]。唐古特大黄有效成分主要是蒽醌类衍生物, 包括芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄酚及其苷类, 具有较强的泻下, 抗病源微生物, 镇痛抗炎, 抗氧化抑酶, 保肝, 利胆, 降血脂, 抗衰老, 调节免疫的作用^[1-4]。大黄为多途径的传统用药, 最近研究表明, 除泻下等传统功用外, 其所含大黄多糖还具有抗肿瘤, 抗衰老, 降低血糖, 抗辐射等多种药用价值^[5-9]。多糖类成分已成为近年来中药天然药物研究领域倍受关注的一类重要成分, 其药理作用广泛, 独特的活性和低毒特点在临床应用中具有极大的潜力^[10-15]。

对不同药用植物的研究表明, 植物因为生长年限、生长环境的不同, 其有效成分的积累动态有所不同^[16-17]。本研究以青海省湟中县群加乡、西宁市甘

里铺镇、湟源县东峡乡栽培唐古特大黄为研究对象, 用苯酚-硫酸比色法测定根中大黄多糖含量, 高效液相色谱法测定蒽醌含量, 探究多糖和蒽醌含量年际和月际的变化特征, 为道地药材唐古特大黄有效成分的动态积累、质量控制、种植栽培及资源的充分利用提供一定的科学依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料

栽培唐古特大黄种子 2001 年 9 月采集于青海省果洛州达日县境内, 于 2002 年 5 月人工播种于 3 个种植地 (表 1): 青海省湟中县群加乡、青海省西宁市甘里铺镇、青海省湟源县东峡乡。样品采集自栽培 2 年开始, 生长季每月中旬采集 1 次。年际动态选择了生长季末期 10 月中旬的样品, 月际动态选择了 5 年生 5~11 月每月中旬采集的样品。样品由中国科学院西北高原生物研究所周国英研究员鉴定为唐古特大黄 (*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf.)。

表 1 唐古特大黄 3 个样地地理位置及生境条件

Tab. 1 Habitats and environmental conditions of three planting samples

产地 (habitats)	土壤有机质的含量 (soil organic matter)/(g · kg ⁻¹)	海拔 (altitude)/m	N: 纬度 (latitude)	E: 经度 (longitude)
湟中群加 (Qunjia, Huangzhong)	82.93	2 857	36° 17' 27.5"	101° 40' 28.1"
西宁甘里铺 (Ershilipu, Xining)	31.72	2 297	36° 42' 15.5"	101° 45' 24.9"
湟源东峡 (Dongxia, Huangyuan)	87.21	2 970	36° 43' 31.1"	101° 22' 18.2"

1.2 仪器与试剂

Cary 300 Bio 型紫外-可见分光光度计(美国 Varian 公司); 优普 UPT-II-20L 型超纯水机(上海优普实业有限公司); TGL-16C 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(包括 G1311C Quat Pump VL、G1329B ALS、G1316A TCC、G1315D DAD VL); Agilent 色谱工作站; R1001-VN 型旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司); KQ5200DE 型数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司); Sartorius AG CP224s 精密电子天平(精度 ± 0.0001 g); Mettler Toledo XS105 精密电子天平(精度 ± 0.01 mg)。

对照品: *D*-无水葡萄糖(批号 10833-200904)、芦荟大黄素(批号 110795-201007)、大黄酸(批号 110757-200206)、大黄素(批号 110756-200110)、大黄素甲醚(批号 110758-201013)和大黄酚(批号 110796-201118)购自中国食品药品检定研究院,纯度均在 98% 以上。

有机溶剂包括石油醚、无水乙醇、正丁醇、三氯甲烷、甲醇、冰乙酸、盐酸(分析纯,天津市百世化工有限公司); 苯酚(分析纯,陕西亿农高科药业有限公司); 浓硫酸(分析纯,甘肃白银化工有限公司); 甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司化工分公司)。

1.3 苯酚硫酸法测定多糖含量

1.3.1 对照品溶液制备和标准曲线绘制 精密称取 105 °C 干燥至恒重的 *D*-无水葡萄糖对照品 10 mg, 置 100 mL 量瓶中,加适量水溶解,并稀释至刻度,摇匀,即得 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 *D*-无水葡萄糖溶液。实际配得质量浓度为 $0.1020 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 *D*-无水葡萄糖对照品溶液。

分别精密移取上述 *D*-无水葡萄糖对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 分别置 25 mL 具塞试管中,加蒸馏水补至 2.0 mL,摇匀,依次加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL 混匀后,缓慢加入浓硫酸 5.0 mL,摇匀后冷却至室温,进行显色反应,以 2.0 mL 蒸馏水作为空白对照,在 490 nm 进行紫外分光光度法测定。以 *D*-无水葡萄糖对照品溶液的浓度 $C(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ 为横坐标,对照品溶液的吸收度值 A 为纵坐标,绘制标准曲线,计算其标准曲线回归方程:

$$Y=13.666X+0.0493 \quad r=0.9991$$

1.3.2 供试品溶液制备 称取 2 份样品粉末(过 40 目筛)0.500 g,精密称定(精确到 ± 0.001 g),置于 100 mL 圆底烧瓶中,加石油醚 100 mL,加热回流 30 min,过

滤。待滤纸上挥干溶剂后,将滤渣转移入三角烧瓶中,用装有 75% 乙醇的洗瓶冲洗滤纸上的剩余残渣,继续加入 75% 乙醇至约 100 mL,160 W、40 kHz、30 °C 条件下超声 30 min,过滤。滤渣与滤器用 75% 乙醇 30 mL 分次洗涤,除去滤液和洗涤液,用蒸馏水将滤渣冲洗入三角烧瓶中,加水 150 mL,置于加热板上加热 30 min,冷却至室温后,过滤。将滤液转移入 250 mL 量瓶中,并用少量蒸馏水洗涤滤器 3 次,将洗涤液也转移至上述量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,精密移取 3 mL,加 Sevage 试剂[三氯甲烷-正丁醇(5:1)]3 mL,剧烈振荡使其充分混合,在 $9000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速下离心 5 min,弃去中间变性蛋白层和下层有机层,水相继续重复上述操作直至水相与有机相中间无变性蛋白出现为止,移取所有上清液,留存作为供试品溶液。

1.3.3 供试品溶液测定 将上述供试品溶液稀释 10 倍(精密移取供试品溶液 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加水稀至刻度,摇匀),精密移取该溶液 0.5 mL 置 25 mL 具塞试管中,加蒸馏水补至 2.0 mL 后依次加入 5% 苯酚溶液 1 mL,混匀,缓慢加入浓硫酸 5 mL,摇匀冷却至室温后进行显色反应,紫外分光光度仪在 490 nm 波长处测定其吸收度。从标准曲线上读出供试品溶液中含有的 *D*-无水葡萄糖浓度,再根据稀释情况进行计算。同时做空白实验以排除滤纸对实验结果的干扰。

1.3.4 大黄粗多糖制备和换算因子的确定 称取已干燥粉碎好的样品粉末(过 40 目筛)10 g,加蒸馏水 200 mL,置加热板加热煮沸 1 h; 过滤,滤液在 60 °C 真空浓缩至约 20 mL 左右,分成 2 份,按比例 1:4 加 Sevage 试剂 40 mL,剧烈振荡使其充分混合,在 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速下离心 5 min,弃去中间变性蛋白层和下层有机层,水相继续重复上述操作直至水相与有机相中间无变性蛋白出现为止。剩余液体按比例 1:4 加无水乙醇沉淀,置冰箱中冷藏 24 h。次日过滤,除去滤液,沉淀置于研钵中依次用 90% 乙醇、无水乙醇和丙酮各洗涤 3 次,直至成粉末状。在 60 °C 真空干燥至恒重,即制得大黄粗多糖粉末。

精密称取干燥至恒重的自制大黄粗多糖粉末约 10 mg,置于 25 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,得自制粗多糖样品溶液。根据实际情况取用一定量多糖溶液置 25 mL 具塞试管中,加蒸馏水补至 2.0 mL,摇匀。按“1.3.1”项下的方法测定吸收度,由回归方程计算出样品溶液中葡萄糖浓度,按换算因子 $f=m/C \cdot D$ [式中: m 为称取大黄多糖的质量(mg),

C 为多糖液中 D-无水葡萄糖的浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), D 为多糖的稀释倍数] 计算, 结果为 1.442。

1.4 高效液相色谱法测定蒽醌含量

1.4.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse plus C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 A 为甲醇, B 为 0.1% 乙酸溶液, 梯度洗脱 (0~20 min, 60%A → 80%A; 20~40 min, 80%A → 95%A; 40~45 min, 95%A); 体积流量 1.000 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 254 nm。

1.4.2 混合对照品溶液和供试品溶液的制备 精密称取对照品芦荟大黄素 1.10 mg, 大黄酸 0.60 mg, 大黄素 1.12 mg, 大黄素甲醚 1.24 mg, 大黄酚 0.55 mg, 甲醇溶解, 定容至 25 mL, 制成含芦荟大黄素 44 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 大黄酸 24 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 大黄素 44.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 大黄素甲醚 49.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 大黄酚 22 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

取本品粉末 (过 4 号筛) 约 0.150 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称量, 用甲醇补足损失的量, 摇匀, 滤过; 精密量取续滤液 5 mL, 置烧瓶中, 挥去溶剂, 加 8% 盐酸溶液 10 mL, 220 W、40 kHz、30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下超声处理 2 min, 再加三氯甲烷 10 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 置分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 酸液再用三氯甲烷提取 3 次, 每次 10 mL, 合并三氯甲烷液, 减压回收

溶液至干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 取续滤液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

1.4.3 方法学考察 回归方程: 吸取“1.4.2”项下的混合对照品溶液 2、4、6、8、10、12、16 μL , 按照“1.4.1”项下的色谱条件进样测定, 拟合峰面积 (Y) 和进样量 (X , μg) 做回归曲线, 得回归方程。

稳定性试验: 分别在 0、2、4、6、8、16、24 h 和连续 5 d, 精密吸取“1.4.2”项下的同一混合对照品溶液 10 μL 进样测定, 结果表明 24 h 内和 5 d 内对照品稳定性良好。

精密度试验: 精密吸取“1.4.2”项下的混合对照品溶液 10 μL , 连续测定 6 次, 结果表明仪器及进样精密度良好。

重复性试验: 取同一样品 (湟中县群加乡 5 年生样本) 6 份, 分别制备供试品溶液进行测定, 结果表明方法重复性较好。

加样回收率实验: 精密称取已测知含量的大黄根粉末 0.150 g, 分别精密加入相当于样品中 5 种蒽醌含量的 80%、100%、120% 的对照品溶液, 按“1.4.2”项下方法制备供试溶液, 精密吸取 10 μL 进样测定, 计算回收率。

蒽醌方法学考察结果见表 2。

表 2 蒽醌方法学指标

Tab. 2 Methodology of anthraquinone

蒽醌 (anthraquinone)	回归方程 (regression equation)	R^2	线性范围 (linear range) / μg	日间稳定性 (diurnal stability) RSD/%	日内稳定性 (intraday stability) RSD/%	精密度 (precision) RSD/%	重复性 (repeatability) RSD/%	回收率 (recovery) /%	RSD/ %
芦荟大黄素 (aloemodin)	$Y=2\ 350.8X-0.440\ 9$	1.000	0.044~2.2	0.44	0.26	0.53	2.06	97.7	1.6
大黄酸 (rhein)	$Y=1\ 862X-0.880\ 1$	1.000	0.024~1.2	3.4	0.51	1.7	1.30	99.2	3.0
大黄素 (emodin)	$Y=5\ 437X+1.285\ 6$	1.000	0.044\ 8~2.24	3.2	0.50	0.66	0.56	102.4	1.2
大黄素甲醚 (physcion)	$Y=2\ 891X+6.777\ 6$	0.999\ 9	0.022~1.1	0.32	0.39	2.0	2.19	101.6	0.86
大黄酚 (chrysophanol)	$Y=2\ 491.2X-8.936\ 1$	1.000	0.049\ 6~2.48	2.2	0.31	0.45	0.37	96.7	2.5

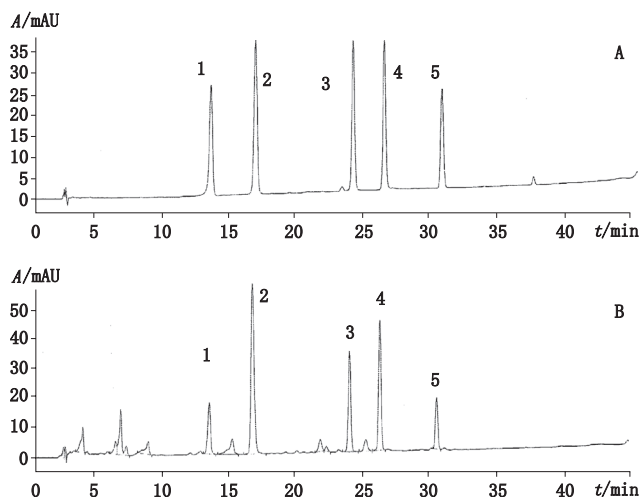
1.4.4 样品测定 精密称取各样品粉末约 0.150 g, 按照“1.4.2”项下的方法制备供试品溶液, 按照“1.4.1”项下的色谱条件注入液相色谱仪进行测定, 每批平行测定 3 次, 记录色谱峰面积, 用标准曲线计

算含量。混合对照品和样品色谱图见图 1。

2 结果与分析

2.1 唐古特大黄多糖年际和月际变化特征

唐古特大黄多糖年际和月际含量见表 3 和表 4。



1. 芦荟大黄素 (aloe emodin) 2. 大黄酸 (rhein acid) 3. 大黄素 (emodin) 4. 大黄素甲醚 (physcion) 5. 大黄酚 (chrysophanol)

图 1 混合对照品 (A) 和样品 (B) 色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mixed reference standards (A) and sample (B)

由表 3 可知,唐古特大黄多糖在不同的种植地均表现出明显的年际变化动态特点: 湟中县群加乡、湟源县东峡乡 2 年生至 9 年生的栽培唐古特大黄多糖年际含量呈现出“M”字型的变化趋势。群加乡和东峡乡栽培唐古特大黄在 2 年生时多糖含量接近 (5.01% 和 4.88%), 并且在 3 年生时达到第 1 个高峰值 (6.98% 和 6.43%), 多糖含量随着年限的增长而下降, 并在 6 年生 (群加乡, 4.23%) 和 5 年生 (东峡乡, 4.62%) 时达到低峰值, 随后多糖含量随着年限的增长而增长, 并在 8 年生 (群加乡, 7.34%) 和 7 年生 (东峡乡, 5.90%) 时达到第 2 个高峰值, 在 9 年生时都达到低峰值 (4.87% 和 3.96%)。甘里铺 3 年生时含量为 8.35%, 在 5 年生时下降为 4.62%, 7 年生时上升为 7.94%, 变化规律呈“V”字型。

表 3 不同地点唐古特大黄多糖年际含量 (% , n=3)

Tab. 3 Annual change of polysaccharides content in *Rheum tanguticum* from different habitats

地点 (habitat)	2 年生 (2-year)	3 年生 (3-year)	4 年生 (4-year)	5 年生 (5-year)	6 年生 (6-year)	7 年生 (7-year)	8 年生 (8-year)	9 年生 (9-year)
湟中群加 (Qunjia, Huangzhong)	5.01 ^a	6.98 ^b	6.66 ^c	4.58 ^e	4.23 ^b	5.15 ^d	7.34 ^a	4.87 ^f
西宁甘里铺 (Ershilipu, Xining)	—	8.35 ^a	7.14 ^c	3.76 ^e	6.46 ^d	7.94 ^b	—	—
湟源东峡 (Dongxia, Huangyuan)	4.88 ^d	6.43 ^a	4.90 ^d	4.62 ^f	5.07 ^e	5.90 ^b	4.73 ^e	3.96 ^e

注 (note): 一样品空缺 (samples vacancies); 表中不同小写字母表示差异显著, 相同表示不显著。数据分析由 SPSS20.0 统计软件包中的 one-way ANONA 模块进行, 置信区间为 95% (the different letters in the table means the difference was significant, the same letter means the difference was not significant. The data analysis was performed by the one-way ANONA module in the SPSS 20.0 statistical software package with a confidence interval of 95%)

表 4 不同地点唐古特大黄多糖月际含量 (% , n=3)

Tab. 4 Monthly change of polysaccharides content in *Rheum tanguticum* from different habitats

地点 (habitat)	5 月 (May)	6 月 (June)	7 月 (July)	8 月 (August)	9 月 (September)	10 月 (October)	11 月 (November)
湟中群加 (Qunjia, Huangzhong)	5.25 ^d	3.93 ^e	4.85 ^c	6.39 ^b	6.00 ^e	4.58 ^f	6.73 ^a
西宁甘里铺 (Ershilipu, Xining)	7.43 ^a	3.54 ^f	3.97 ^d	7.30 ^a	5.79 ^b	3.76 ^e	5.43 ^c
湟源东峡 (Dongxia, Huangyuan)	4.83 ^e	4.10 ^e	2.64 ^f	6.74 ^b	7.13 ^a	4.62 ^d	4.95 ^e

注 (note): 表中不同小写字母表示差异显著, 相同表示不显著。数据分析由 SPSS 20.0 统计软件包中的 one-way ANONA 模块进行, 置信区间为 95% (the different letters in the table means the difference was significant and the same letter means the difference was not significant. The data analysis was performed by the one-way ANONA module by SPSS20.0 with a confidence interval of 95%)

由表 4 可知,唐古特大黄多糖在不同的种植地也表现出明显的季节变化动态特点: 5 年生的群加乡、甘里铺、东峡乡栽培唐古特大黄从 5 月份到 11 月份的大黄多糖季节含量呈现出“W”字型的变化趋势。5 月份采挖的大黄中, 甘里铺多糖的含量最高; 群加乡和甘里铺的大黄多糖含量在 6 月份, 东峡乡的大黄多糖含量在 7 月份分别降至 5~11 月份

中的最低。随后, 群加乡和甘里铺的大黄多糖含量在 8 月份, 东峡乡的大黄多糖含量在 9 月份分别升至 5~11 月份中的另一高峰值, 并都在 10 月份降至 5~11 月份中的第二低值, 并在 11 月份含量又出现了回升。

2.2 唐古特大黄蒽醌年际和月际变化特征

样品中大黄蒽醌年际和月际含量见表 5 和表 6。

表 5 不同地点大黄蒽醌年际含量(%, n=3)

Tab. 5 Annual change of anthraquinones content in *Rheum tanguticum* from different habitats

地点 (habitat)	2年生 (2-year)	3年生 (3-year)	4年生 (4-year)	5年生 (5-year)	6年生 (6-year)	7年生 (7-year)	8年生 (8-year)	9年生 (9-year)
湟中群加(Qunjia, Huangzhong)	1.82 ^c	2.30 ^b	2.49 ^{ab}	2.72 ^a	2.54 ^{ab}	1.82 ^c	1.78 ^c	2.70 ^a
西宁甘里铺(Ershilipu, Xining)	—	2.29 ^b	2.39 ^b	3.11 ^a	2.16 ^{bc}	1.96 ^c	—	—
湟源东峡(Dongxia, Huangyuan)	2.07 ^d	2.08 ^d	2.21 ^d	2.83 ^b	2.47 ^c	2.43 ^c	2.60 ^c	3.46 ^a

注(note): 一样品空缺(samples vacancies); 表中不同小写字母表示差异显著, 相同表示不显著。数据分析由 SPSS 20.0 统计软件包中的 one-way ANONA 模块进行, 置信区间为 95% (the different letters in the table means the difference was significant, the same letter means the difference was not significant. The data analysis was performed by the one-way ANONA module in the SPSS 20.0 statistical software package with a confidence interval of 95%)

表 6 不同地点大黄蒽醌月际含量(%, n=3)

Tab. 6 Monthly change of anthraquinones content in *Rheum tanguticum* from different habitats

地点 (habitat)	5月 (May)	6月 (June)	7月 (July)	8月 (August)	9月 (September)	10月 (October)	11月 (November)
湟中群加(Qunjia, Huangzhong)	2.08 ^b	2.67 ^a	2.23 ^b	2.18 ^b	1.74 ^c	2.72 ^a	2.16 ^b
西宁甘里铺(Ershilipu, Xining)	2.07 ^c	3.20 ^a	2.25 ^c	2.84 ^b	2.82 ^b	3.11 ^{ab}	2.67 ^b
湟源东峡(Dongxia, Huangyuan)	3.16 ^b	3.91 ^a	2.52 ^d	3.03 ^{bc}	2.31 ^{de}	2.83 ^c	2.17 ^c

注(note): 表中不同小写字母表示差异显著, 相同表示不显著。数据分析由 SPSS 20.0 统计软件包中的 one-way ANONA 模块进行, 置信区间为 95% (the different letters in the table means the difference was significant, the same letter means the difference was not significant. The data analysis was performed by the one-way ANONA module in the SPSS 20.0 statistical software package with a confidence interval of 95%)

由表 5 可知, 群加乡、东峡乡 2 年生至 9 年生的栽培唐古特大黄蒽醌年际含量呈现出“N”字型的变化趋势, 甘里铺 3 年生至 7 年生的栽培唐古特大黄多糖年际含量呈现出倒“V”字型的变化趋势。3 个不同种植地的栽培唐古特大黄在 2~5 年期间随着年龄的增长, 蒽醌含量随之增长; 在 5~7 年间含量下降, 7~9 年间增长。唐古特大黄的蒽醌含量在生长 5 年左右时达到高峰, 尽管在 9 年左右时出现第 2 个高峰, 但考虑生产成本, 生长 5 年采挖较为适宜。

由表 6 可知, 唐古特大黄蒽醌季节动态变化也有明显的特点, 含量在 5~11 月份期间的变化趋势基本一致, 呈现出接近三峰变化趋势。在植物返青及生长初期的 5~6 月份间先上升, 6 月份初含量达到最高; 在生长旺盛期(花果期) 7~9 月份呈明显下降趋势, 9 月份达到最低水平; 10 月份又略有回升; 11 月份又略有下降。由此可见, 唐古特大黄的最佳采挖季节在生长初期的 6 月份和生长季结束的 10 月份。

3 讨论

3.1 栽培地点的选择

栽培地点的选择是影响唐古特大黄品质的一个

重要因素。唐古特大黄自然生境分布海拔为 2 800~4 700 m, 东峡乡和群加乡海拔分别为 2 970 m 和 2 857 m, 甘里铺为 2 297 m。唐古特大黄喜凉爽、湿润和富有腐殖质的土壤, 是耐寒喜阴湿的多年生草本, 就我们选择的 3 个种植地而言, 群加乡和东峡乡的海拔和土壤有机质要高于甘里铺, 而甘里铺的 3、4、6、7 年生的大黄多糖含量要高于另外两地, 但就 5 年生的季节含量来说, 三地的含量并无明显高低。推测可能是因为唐古特大黄多糖和蒽醌成分含量并非简单受海拔、土壤有机质含量等个别因素影响, 而是不同生境代表的温度、湿度、光照条件、土壤构成以及海拔、经纬度代表的环境条件综合作用的结果, 其中生境条件尤为典型。

3.2 含量波动与采集时间

数据表明, 在不同的种植地, 唐古特大黄根多糖和蒽醌含量随植物的生长发育节律波动, 且表现出基本一致的动态变化规律。大黄的生长期只有 150~160 d, 一般生长到 3~4 年开始开花、结实。4 月份底或 5 月份初开始生长, 7~10 d 叶子展开; 5 月份中旬抽花茎, 6 月份中旬左右开花, 持续约 1 个月,

7月份中下旬种子全部成熟,随后,茎秆开始枯萎,8月份下旬完全枯死。10月份月上旬第1次霜降以后,簇生叶部分枯黄,10月份下旬植株地上部分完全枯死,根茎部形成越冬芽,待来年长出新植株^[16]。至此,大黄的生长期结束。

多糖为植物初级代谢产物,其规律波动间接反映了植物生长过程中的代谢变化,并可能与植物自身的自我保护相关联。在大黄生长3年以后,开始开花结果,进入繁殖期,此后几年多糖为供应繁殖,分解大于合成,含量发生了下降,随着年限的推移,地上部分越来越茂盛,光合作用速率变强,多糖逐渐积累,含量又出现了上升。

唐古特大黄根部多糖的含量在6~7月份达到最低,6~7月份为唐古特大黄花果期。多糖含量下降很可能是因为植株形成花和种子期间,分解代谢较为旺盛,多糖作为初级代谢产物,为植物传粉、繁衍后代或者其他生理功能提供了能量而分解。唐古特大黄于8~9月,植株地上部分生长基本停滞,植物生理活动减弱,新陈代谢相对降低,同化作用占据了主要代谢过程,植物主要进行根及根茎部分的营养储存,生长增大,多糖含量在这个时期发生了增长。而在9月份之后含量下降,可能是气温降低及日照时间缩短而造成的光合作用速率降低所致。10月份植物生长完全停滞,地上部分枯萎,植物地上部分营养成分向根部运输,地上部分的多糖也向根部累积,致使根部多糖含量增高;另一方面,10月份多糖含量出现的增加趋势在生理上可能与植物的抗寒性相关联。

蒽醌的动态变化,与他人研究结果相似或接近。曹伟国^[7]等曾对1~4年生的唐古特大黄蒽醌含量进行比较,得到蒽醌衍生物的含量随生长年限的增加而增加的结论。李锦萍^[17]曾对相同地点采集的唐古特大黄根蒽醌含量季节动态变化进行研究,结果显示,6年生5~10月份按月采集的大黄根蒽醌变化规律呈现“N”字型。车国冬^[4]等研究表明,3年、4年生唐古特大黄总蒽醌含量在5~6月份生长初期增加,并于6月份初达到最大值,6~9月份生长旺盛期间明显降低,10月份又略有回升。蒽醌作为次级代谢产物,变化特征与5~10月份的多糖(初级代谢产物)恰好相反,可以从某种角度印证了次级代谢产物是以初级代谢产物为前体的。而章英才^[11]对3年生5、7、9、11月份宁夏六盘山掌叶大黄根进行多糖变化规律研

究时发现,从5月份至9月份根大黄多糖含量逐渐增高,9月份达到最高值,而11月份又有一定程度的下降,与本实验得到的趋势略有不同,原因有待进一步研究。

综合分析可知,在3个种植地,来源相同的唐古特大黄呈现出基本一致的年际和季节动态变化特征,这与植物自身的遗传机制有关,而外界环境因子也是多糖和蒽醌含量波动的重要因素。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 23
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 23
- [2] 刘尚武. 青海植物志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1997: 165
LIU SW. Flora of Qinghai Province[M]. Xining: Qinghai People's Publishing House, 1997: 165
- [3] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991
Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences. Tibetan Medicine[M]. Xining: Qinghai People's Publishing House, 1991
- [4] 车国冬, 李玉林, 王凌云, 等. 栽培唐古特大黄蒽醌含量的季节动态变化[J]. 西北植物学报, 2006, 26(11): 2378
CHE GD, LI YL, WANG LY, et al. Seasonal change of anthraquinone content in cultivated *Rheum tanguticum* [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 2006, 26(11): 2378
- [5] 李玉林, 车国冬, 索有瑞. 青海栽培和野生唐古特大黄蒽醌类成分的 HPLC 对比分析[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20: 469
LI YL, CHE GD, SUO YR. Comparative analysis of anthraquinones content between cultivated and wild *Rheum tanguticum*. [J]. Nat Prod Res Dev, 2008, 20: 469
- [6] 周利, 陈桂琛, 史萍. 一年和二年生人工种植唐古特大黄蒽醌类成分的变化[J]. 中成药, 2011, 33(2): 297
ZHOU L, CHEN GC, SHI P. Change of anthraquinones in 1-2-year-old cultivated *Rheum tanguticum* [J]. Chin Tradit Pat Med, 2011, 33(2): 297
- [7] 曹伟国, 陶燕铎. 不同生长年限唐古特大黄中五种蒽醌衍生物的含量比较[J]. 中国现代应用药学, 2008, 25(5): 404
CAO WG, TAO YD. The comparison of the five kinds of anthraquinone derivative contents in *Rheum tanguticum* of the different growing periods [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2008, 25(5): 404
- [8] 李芸, 苗小楼, 吴平安, 等. 大黄不同品种不同产地加工品的蒽醌含量比较[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(12): 2257
LI Y, MIAO XL, WU PA, et al. Comparison of anthraquinone contents in different species and processed products of rhubarb in different producing areas [J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32

- (12): 2257
- [9] 熊辉岩, 张晓峰, 王环. 大黄属 3 种大黄植物不同部分蒽醌含量的测定与比较 [J]. 西北植物学报, 2003, 23 (2): 328
XIONG HY, ZHANG XF, WANG H. HPLC determination of anthraquinones from various parts of *R. tanguticum*, *R. undulatum* and *R. spiforme* [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2003, 23 (2): 328
- [10] 张思巨, 张淑运, 王岚. 大黄多糖的研究 [J]. 中国中药杂志, 1993, 18 (11): 679
ZHANG SJ, ZHANG SY, WANG L. Studies on polysaccharide of *Rheum palmatum* L. [J]. *China J Chin Mater Med*, 1993, 18 (11): 679
- [11] 章英才, 杨军, 李瑞. 掌叶大黄根多糖的积累分布特征 [J]. 植物研究, 2011, 31 (6): 744
ZHANG YC, YANG J, LI R. Accumulation and distribution characteristics of rhubarb polysaccharides in root of *Rheum palmatum* L. [J]. *Bull Bot Res*, 2011, 31 (6): 744
- [12] 姚文兵, 陈琼华. 大黄的生化学研究 XXXIV. 波叶大黄多糖的抗血栓和强心作用 [J]. 生化药物杂志, 1991 (1): 42
YAO WB, CHEN QH. A biochemistry study on Rheum XXXIV. A anti-thrombotic and cordial effect of *Rheum undulatum* [J]. *J Biochem Pharm*, 1991 (1): 42
- [13] 李亚芳, 张晓华. 多糖类药物的研究概况 [J]. 中国药师, 2002, 5 (4): 233
LI YF, ZHANG XH. Research progress of polysaccharide drug [J]. *China Pharm*, 2002, 5 (4): 233
- [14] 索有瑞. 柴达木盆地白刺研究与开发 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 323
SUO YR. Studies and Developments of Nitraria at the Qaidam Basin [M]. Beijing: Science Press, 2010: 323
- [15] 倪受东, 严德江, 徐先祥, 等. 大黄多糖的提取及含量测定 [J]. 中国药业, 2007, 16 (13): 10
NI SD, YANG DJ, XU XY, *et al.* Extraction and content determination of polysaccharide from *Rheum palmatum* L. [J]. *China Pharm*, 2007, 16 (13): 10
- [16] 张晓峰. 西宁大黄历史资源综合利用 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 2004: 148
ZHANG XF. A Comprehensive Exploitation and Utilization of Historical Resources of Rhubarb in Xining [M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Press, 2004: 148
- [17] 李锦萍. 青海唐古特大黄有效成分动态变化及元素特征研究 [D]. 西宁: 中国科学院西北高原生物研究所, 2010: 22
LI JP. Study at the Dynamic of Active Compounds and Features of Elements of *Rheum tanguticum* in Qinghai [D]. Xining: Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, 2010: 22

(本文于 2017 年 4 月 27 日收到)