

基于生物量、活性物质积累和抗氧化能力的当归高海拔种植区域选择

栗孟飞^{1,2}, 刘学周³, 魏建和², 张真¹, 陈思瑾¹, 刘孜瀚⁴, 幸华^{1*}

1. 甘肃农业大学生命科学与技术学院 甘肃省干旱生境作物学重点实验室, 甘肃 兰州 730070

2. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

3. 甘肃省经济作物技术推广站, 甘肃 兰州 730030

4. 甘肃百草中药材种植有限公司, 甘肃 兰州 730102

摘要: **目的** 以根茎生物量、活性物质含量以及抗氧化能力为指标, 选择适宜提高当归品质的高海拔种植区域。**方法** 在严格控制种质、水分和土壤养分的条件下, 以不同海拔 (2 100、2 500 和 2 900 m) 2 年生当归根茎为材料, 分别对干质量、活性物质含量以及抗氧化能力进行测定与分析。**结果** 高海拔虽不能促进当归根茎生物量, 却显著提高了活性物质的积累量和抗氧化能力; 以单株积累量计算, 2 900 m 未抽薹当归根茎中阿魏酸、可溶性糖、酚和黄酮类含量分别为 2 100 m 植株的 2.06、1.13、1.34 和 1.15 倍; 体外抗氧化能力也随海拔升高逐渐增加。综合分析表明, 在 2 100~2 900 m 海拔内, 未抽薹当归根茎中活性物质的总积累量 (干质量和单株) 均随海拔升高逐渐增加。**结论** 提升当归种植海拔高度可显著提高根茎活性物质质量; 活性物质生物合成与积累受到低温和光照的综合调控。该研究结果将为提高当归产量和品质以及大面积种植栽培提供理论基础与依据。

关键词: 当归; 高海拔; 根茎生物量; 活性物质积累; 抗氧化能力; 阿魏酸

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)02-0474-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.02.026

Selection of high altitude planting area of *Angelica sinensis* based on biomass, bioactive compounds accumulation and antioxidant capacity

LI Meng-fei^{1,2}, LIU Xue-zhou³, WEI Jian-he², ZHANG Zhen², CHEN Si-jin¹, LIU Zi-han⁴, XING Hua¹

1. Gansu Key Lab of Aridland Crop Science, College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

3. Station of Industrial Crop Promotion of Gansu Province, Lanzhou 730030, China

4. Gansu Herbal Medicine Planting Co., Ltd., Lanzhou 730102, China

Abstract: Objective To select the high altitude planting area for improving the quality of *Angelica sinensis* based on biomass, bioactive compounds accumulation and antioxidant capacity in rhizome. **Methods** The experiments were conducted on dry weight (DW), bioactive compounds content and antioxidant capacity in two-year old rhizome of *A. sinensis* grown at different altitudes (2 100, 2 500, and 2 900 m), under controlling plants reproduced from the seeds of the same plant, the same levels of water and fertilizer in soil. **Results** Higher altitude was adverse to rhizome biomass, however, the compounds content (DW and per plant basis) and antioxidant capacity were significantly promoted at higher altitude compared to lower altitude site; On a per plant basis, the content of ferulic acid, soluble sugar, phenolics and flavonoids in rhizome of un-bolted plants grown at 2 900 m respectively was 2.06, 1.13, 1.34 and 1.15 fold greater than that of 2 100 m; The antioxidant capacity also increased with higher altitude. Comprehensive analysis showed that total content of main bioactive compounds in rhizome of un-bolted plants increased with higher altitudes ranging from 2 100 to 2 900 m. **Conclusion** Higher-altitude cultivation can significantly enhance bioactive compounds accumulation in rhizome. The biosynthesis and accumulation of bioactive compounds were regulated by low temperature and light. These findings will provide theoretical references for improving production and quality of rhizome as well as large-scale cultivation.

Key words: *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; high altitude; rhizome biomass; active compounds accumulation; anti-oxidant capacity; ferulic acid

收稿日期: 2019-09-06

基金项目: 国家中药材产业技术体系 (CARS-21); 国家自然科学基金资助项目 (81560617); 甘肃省中药材种植科技创新专项 (GBC-2017-10); 甘肃农业大学“伏羲杰出人才培养计划” (Gaufx-02J04); 甘肃农业大学盛彤笙科技创新基金 (GSAU-STS-1635)

作者简介: 栗孟飞 (1980—), 男, 河南驻马店人, 副教授, 主要从事植物生态生理方面研究。E-mail: lmff@gsau.edu.cn

*通信作者 幸华 (1970—), 女, 甘肃兰州人, 副教授, 主要从事药用植物资源方面研究。E-mail: xingh@gsau.edu.cn

当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 为伞形科 (Umbelliferae) 当归属 *Angelica* L. 多年生草本植物, 属低温长日照类型, 适宜在我国甘肃、陕西、四川、云南和青海等高寒阴湿地区种植栽培^[1]。其干燥根茎是我国常用的中药材, 素有“十方九归”之称, 在《神农本草经》中早有记载, 具有补血活血、调经止痛、润肠通便等功效, 现多用于治疗贫血、妇科疾病、卒中、高血压、冠心病、血栓闭塞性脉管炎、血栓性浅静脉炎等症^[2-4]。化学研究表明, 当归根茎中含有多种类型的化合物, 主要包括多糖类 (如阿拉伯糖、葡萄糖和鼠李糖等)^[5]、有机酸类 (如阿魏酸、樟脑酸和茴香酸等)^[6-7]、挥发油类 (如 Z-藁本内酯、丁烯基酞内酯和 α -蒎烯等)^[8-9]、酚类 [如 4-(2-羟基-1-甲氧乙基)-苯酚、4-(2-羟基-1-乙氧乙基)-苯酚、对甲基苯酚等]^[10]和黄酮类^[11]等化学成分。

研究表明, 当归的生长发育和活性物质的积累受到环境条件的显著影响。通过对海拔与生长发育相关性分析表明, 海拔是影响当归植株生长和抽薹的主要调控因子^[1,12], 进一步研究发现, 适宜高海拔通过改变光合产物分配格局和干物质积累速率以及降低抽薹率而提高产量^[1,12-15], 且根茎中多糖、阿魏酸和藁本内酯干质量以及挥发油收率均随海拔升高而增加^[14-16]。然而, 其他生态环境因子也显著影响当归的生长发育及其化学组分的积累, 如栽培土壤的理化性质、降雨量、水分和光照等^[17-19]; 同时, 遗传多样性也会影响其产量和品质^[20-21]。基于当归的根茎生物量在适宜高海拔 (2 600 m) 达到最大值, 而主要活性物质含量随海拔 (2 300~2 900 m) 升高而显著增加^[1,12], 因此, 有必要在控制同一品种以及相同土壤和水分的条件下, 采用干质量和单株含量 2 种衡量标准, 对海拔影响当归产量和品质进行细致研究。为此, 本研究以同一植株种子繁殖的 2 年生根茎为材料, 利用紫外分光光度法和高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 等方法, 就不同海拔区域根茎干质量、主要活性物质 (阿魏酸、可溶性糖、酚和黄酮类) 含量以及抗氧化能力进行了测定与分析, 旨在为当归产量和品质的提高以及大面积种植栽培提供理论基础与依据。

1 材料与试剂

1.1 材料

实验于 2016—2017 年在甘肃百草中药材种植有限公司种植园区 (104°01'17"~104°02'39"E,

35°45'12"~34°45'39"N) 进行。2016 年 6 月初, 利用同一批次当归植株繁殖的种子进行床播育苗, 9 月下旬起苗, 苗龄 110 d。2017 年 4 月上旬, 将上年繁殖的幼苗种植于 3 个海拔 (2 100、2 500 和 2 900 m) 区域; 种植方式和密度为覆黑膜垄作, 膜宽 1 m, 膜上种 3 行, 行株距 30 cm×25 cm 三角形错开挖穴, 穴深 15 cm, 每穴摆放 1 株; 3 个海拔区域采用统一田间施肥水平, 4 月初施入腐熟厩肥 (52 500 kg/hm²), 7 月中旬施入氮磷钾复合肥 (750 kg/hm²) 进行追肥; 田间土壤含水量控制在 24%~26%。至 9 月份地上部分枯萎时, 采用 5 点取样法采挖植株根部、流水冲洗干净后, 置于室温通风处阴干。植株样品由甘肃农业大学生命科学技术学院杨德龙教授鉴定为伞形科当归属 *Angelica* L. 植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels。对照品阿魏酸 (质量分数≥99%, Sigma 公司, 美国), 没食子酸和儿茶素 (质量分数≥90%, 天津市光复精细化工研究所)。

1.2 仪器与试剂

LC-10A 型岛津液相色谱仪 (岛津公司, 日本), 安捷伦色谱柱 (Agilent Zorbax SB-C₁₈, 美国), TU-1810 型紫外分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司)。其他化学试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 提取液的制备

将阴干的根茎粉碎后过 0.18 mm 筛, 称取 2.0 g 置于 20 mL 95%乙醇具塞三角瓶中, 室温 120 r/min 振荡提取 72 h; 然后 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min; 收集上清液, 用 95%乙醇定容至 25 mL, 4 °C 保存, 用于当归可溶性糖、总酚类、总黄酮以及抗氧化能力测定。

2.2 阿魏酸质量分数的测定

采用 HPLC 法测定阿魏酸的含量, 主要参考 Lu 等^[7]的方法测定。具体步骤: 将提取液用 0.22 μ m 有机滤膜滤过, 色谱柱为 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 进样量 10 μ L, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 320 nm, 柱温 30 °C, 流动相为 1.0%乙酸 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~20 min, 10%~20% B; 20~50 min, 20%~80% B; 50~70 min, 80%~100% B)。以阿魏酸为对照品, 用 90%甲醇配制 2.5 mg/mL 的阿魏酸溶液; 采用梯度质量浓度稀释法分别获得 2.0、1.5、1.0、0.5、0.25 mg/mL 的溶液; 以峰面积 (Y) 对检测质量浓度 (C) 进行回归计算, 得到阿魏酸对照品回归方程为 $Y=739.45 C+8.93$ ($r^2=0.996$)。样品中阿魏酸的质量分数计算公式如下。

阿魏酸质量分数 = $C \times V / M \times 1\,000$

单株阿魏酸质量分数 = 阿魏酸质量分数 $\times$ 单株干质量

C 为阿魏酸的质量浓度, V 为提取液的体积, M 为材料的干物质质量

2.3 可溶性糖含量的测定

采用硫酸-苯酚法测定可溶性总糖含量, 参考 Dubois 等^[22]和栗孟飞等^[23]的方法测定。其中, 未抽薹样品提取液加样量为 10 μL 、稀释 100 倍后测定, 抽薹样品提取液加样量 30 μL 。可溶性糖的含量以蔗糖为标准品标定, 以样品溶液的吸光度值 (A) 对可溶性糖的量 (C) 进行回归计算, 得到可溶性糖对照品标准曲线方程 $C = 30.91 A - 0.55$ ($r^2 = 0.992$), 按照公式计算可溶性糖含量。

可溶性糖 = $C \times V_2 / N / (V_1 \times M \times 1\,000)$

单株可溶性糖量 = 可溶性糖量 $\times$ 单株干质量

C 为蔗糖的质量浓度, V_1 为待测样品溶液的体积, V_2 为提取液的体积, N 为待测样品稀释倍数, M 为材料的干物质质量

2.4 酚类含量的测定

采用福林酚试剂法测定酚类化合物的含量, 参考栗孟飞等^[23]和 Beato 等^[24]的测定方法。其中, 提取液加样量均为 100 μL , 酚类化合物的含量以没食子酸 (gallic acid, GAE) 为对照品标定, 以样品溶液的 A 值对酚类的量 (C) 进行回归计算, 得到没食子酸对照品标准曲线方程 $C = 32.67 A + 0.78$ ($r^2 = 0.991$), 按照公式计算酚类含量。

酚类质量分数 = $C \times V_2 / (V_1 \times M \times 1\,000)$

单株酚类质量分数 = 酚类质量分数 $\times$ 单株干质量

C 为没食子酸的质量浓度, V_1 为待测样品溶液的体积, V_2 为提取液的体积, M 为材料的干物质质量

2.5 黄酮类含量的测定

采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠法测定黄酮类化合物的含量, 参考栗孟飞等^[23]和 Lay 等^[25]的测定方法。其中, 提取液加样量均为 1 000 μL , 黄酮类化合物的含量以儿茶素 (catechin, CE) 为对照品标定, 以样品溶液的 A 值对黄酮类的量 (C) 进行回归计算, 得到儿茶素对照品标准曲线方程 $C = 203.15 A - 5.26$ ($r^2 = 0.997$), 按照计算公式计算黄酮含量。

黄酮类质量分数 = $C \times V_2 / (V_1 \times M \times 1\,000)$

单株黄酮类质量分数 = 黄酮类质量分数 $\times$ 单株干质量

C 为儿茶素的质量浓度, V_1 为待测样品溶液的体积, V_2 为提取液的体积, M 为材料的干物质质量

2.6 抗氧化能力的测定

采用 DPPH 和铁离子还原/氧化能力 (ferric reducing/antioxidant power, FRAP) 2 种方法测定提取液的抗氧化能力。

DPPH 法参考 Nencini 等^[26]和 Li 等^[27]的方法测定。其中, 提取液加样量均为 300 μL 。按照计算公式计算抑制率。

抑制率 = $(A_0 - A) / A_0$

A 为样品溶液的吸光度, A_0 不加样品溶液的吸光度

FRAP 法参考栗孟飞等^[23]、Li 等^[27]和 Benzie 等^[28]的方法测定。其中, 提取液加样量均为 50 μL , 样品溶液的抗氧化能力以 500 $\mu\text{mol/L}$ Fe^{2+} ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 为参比基础, 按照计算公式计算 FRAP 值。

$\text{FRAP} = (A - A_0) / (A_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} - A_0) \times 500$

A 为样品溶液的吸光度, $A_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}$ 为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液的吸光度, A_0 不加样品溶液的吸光度

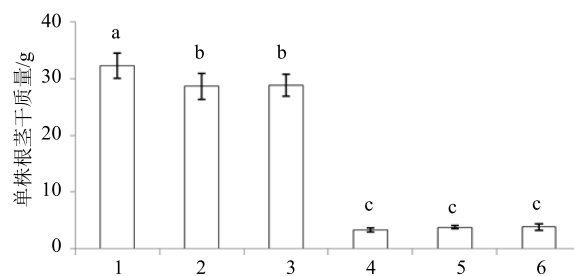
2.7 统计与分析

每个实验重复 3 次, 采用 SPSS 22.0 软件进行 One-Way ANOVA Duncan 数据差异显著性分析; 采用 Excel 2007 制图。

3 结果与分析

3.1 不同海拔对根茎生物量的影响

由图 1 可知, 未抽薹当归植株单株根茎的干质量在 2 100 m 显著高于 2 500 m 和 2 900 m, 抽薹根茎的干质量随海拔升高逐渐增加, 但未达到显著水平 ($P < 0.05$); 同一海拔, 未抽薹单株根茎干质量在低、中和高海拔分别为抽薹的 9.91、7.59 和 7.52 倍。



1~3 分别为海拔在 2 100、2 500、2 900 m 未抽薹当归, 4~6 分别为海拔在 2 100、2 500、2 900 m 抽薹当归; 不同小写字母分别表示在 $P < 0.05$ 水平下达到显著性差异, 下同

1—3 represented un-bolted *A. sinensis* grown at 2 100, 2 500 and 2 900 m, 4—6 represented bolted *A. sinensis* grown at 2 100, 2 500 and 2 900 m, respectively; different lowercase indicated significant at $P < 0.05$ level, same as below

图 1 不同海拔当归根茎的干质量

Fig. 1 Dry weight of rhizome of *A. sinensis* at different altitudes

3.2 不同海拔对根茎中阿魏酸含量的影响

由图 2 可知,以干质量计算,未抽薹和抽薹根茎中阿魏酸含量均随海拔升高显著增加($P<0.05$);同一海拔而言,未抽薹根茎中阿魏酸含量在低、中等和高海拔分别为抽薹的 1.73、2.05、2.06 倍。以单株计算,未抽薹和抽薹根茎中阿魏酸含量也均随海拔升高显著增加($P<0.05$),其中,未抽薹高海拔分别为中和低海拔的 1.24、1.56 倍;同一海拔而言,未抽薹根茎中阿魏酸含量在低、中和高海拔分别为抽薹的 17.23、15.55、15.55 倍。

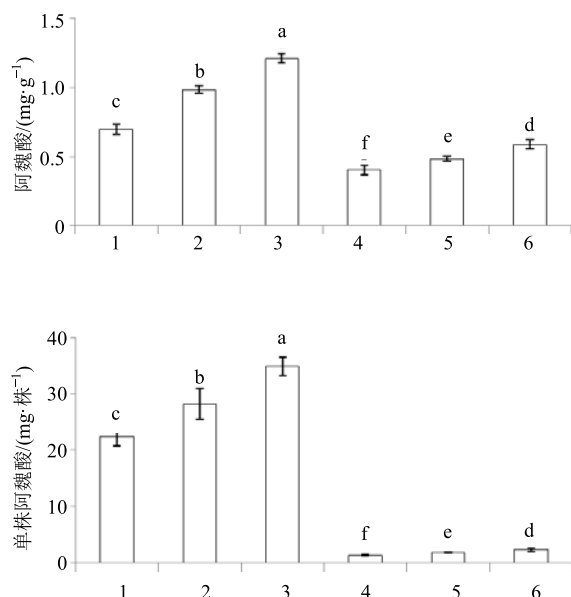


图 2 不同海拔当归根茎中阿魏酸的含量

Fig. 2 Ferulic acid content in rhizome of *A. sinensis* at different altitudes

3.3 不同海拔对根茎中可溶性糖含量的影响

由图 3 可知,以干质量计算,未抽薹根茎中可溶性糖含量随海拔升高显著增加,抽薹根茎呈现随海拔升高逐渐降低趋势,但未达到显著水平($P<0.05$);同一海拔而言,未抽薹根茎中可溶性糖含量在低、中和高海拔分别为抽薹的 12.16、20.06、25.24 倍。以单株计算,未抽薹和抽薹根茎中可溶性糖含量在不同海拔的变化趋势与以干质量为基础的变化基本一致,其中,未抽薹高海拔分别为中和低海拔的 1.11 和 1.13 倍;同一海拔而言,未抽薹根茎中可溶性糖含量在低、中和高海拔分别为抽薹的 120.46、152.19、189.88 倍。

3.4 不同海拔对根茎中酚类化合物含量的影响

由图 4 可知,以干质量计算,未抽薹根茎中酚类

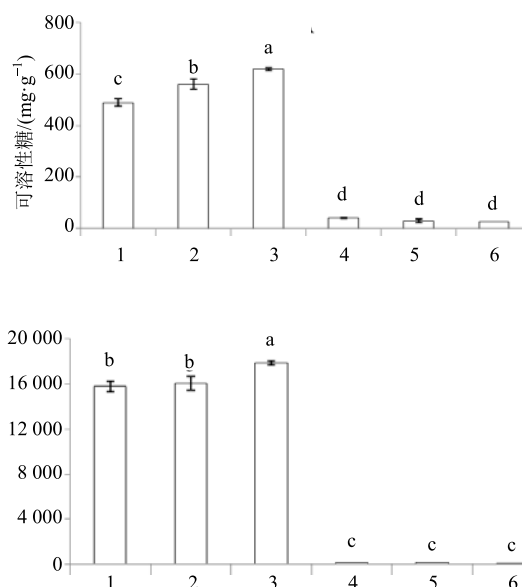


图 3 不同海拔当归根茎中可溶性糖的含量

Fig. 3 Soluble sugar content in rhizome of *A. sinensis* at different altitudes

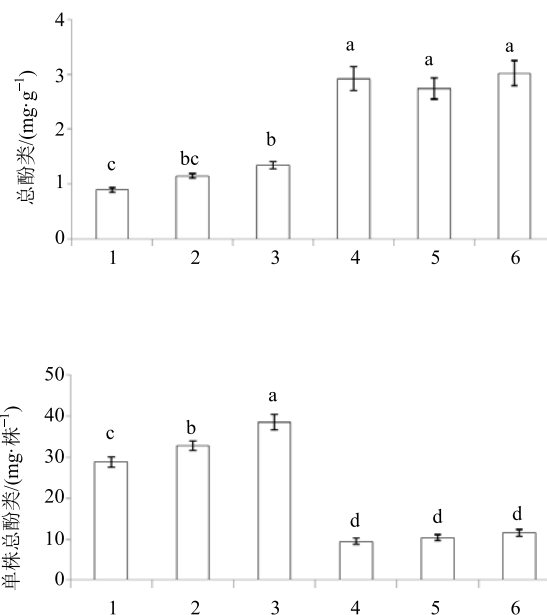


图 4 不同海拔当归根茎中酚类化合物的含量

Fig. 4 Phenolics content in rhizome of *A. sinensis* at different altitudes

含量随海拔升高逐渐增加,但未达到显著水平;同一海拔而言,未抽薹根茎中酚类含量在低、中等和高海拔分别为抽薹的 30.56%、41.67%和 44.22%。以单株计算,未抽薹和抽薹根茎中酚类含量均随海拔升高逐渐增加,其中,未抽薹根茎酚类增加量达到显著水平($P<0.05$),未抽薹高海拔分别为中和低海拔的 1.17 和 1.34 倍;同一海拔而言,未抽薹根茎中酚

类含量在低、中和高海拔分别为抽薹的 3.03、3.16、3.33 倍。

3.5 不同海拔对根茎中黄酮类化合物含量的影响

由图 5 可知,以干质量计算,未抽薹和抽薹根茎中黄酮类含量均随海拔升高逐渐增加,但未达到显著水平;同一海拔而言,未抽薹根茎中黄酮类含量在低、中和高海拔分别为抽薹的 27.65%、31.37% 和 35.10%。以单株计算,未抽薹和抽薹根茎中黄酮类含量均随海拔升高逐渐增加,其中,未抽薹和抽薹根茎分别在高和低海拔开始显著增加($P<0.05$),未抽薹高海拔分别为中和低海拔的 1.14 和 1.15 倍;同一海拔而言,未抽薹根茎中黄酮类含量在低、中、中和高海拔分别为抽薹的 2.74、2.38、2.64 倍。

3.6 不同海拔对根茎提取液抗氧化能力的影响

由图 6 可知,未抽薹和抽薹根茎提取液的抑制率均随海拔升高逐渐增加,仅抽薹根茎提取液的 DPPH 抑制率在高海拔显著增加,其他均未达到显著水平($P<0.05$);同一海拔而言,未抽薹根茎提取液的 DPPH 抑制率在低、中和高海拔分别为抽薹的 1.51、1.44 和 1.05 倍。未抽薹和抽薹根茎提取液的 FRAP 值也均呈现随海拔升高逐渐增加,但未抽薹根茎提取液的 FRAP 值在高海拔显著增加,其他均未达到显著水平;同一海拔而言,未抽薹根茎提取液的 FRAP 值在低、中和高海拔分别为抽薹的 7.45、6.84 和 4.92 倍。

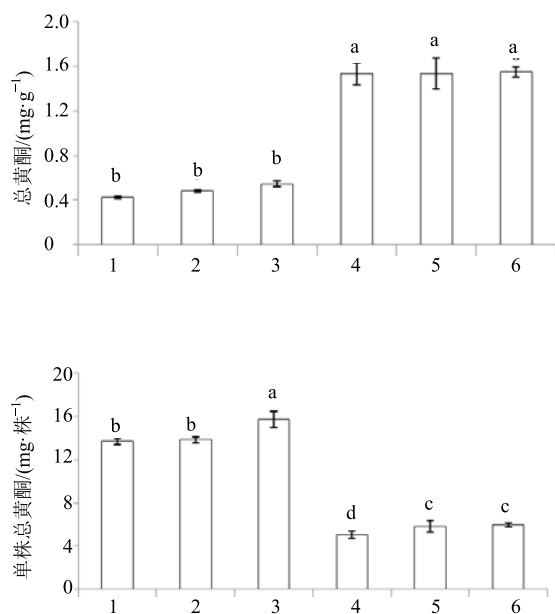


图 5 不同海拔当归根茎中黄酮类的含量

Fig. 5 Flavonoids content in rhizome of *A. sinensis* at different altitudes

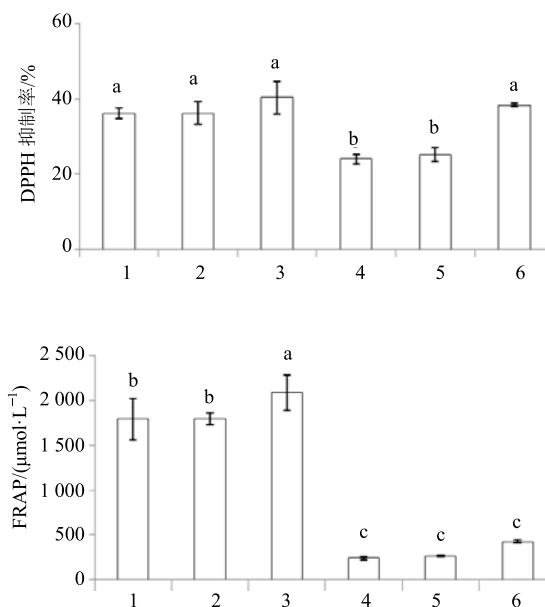


图 6 不同海拔当归根茎中提取液的抗氧化能力比较

Fig. 6 Inhibition percentage and FRAP value of extracts from rhizome of *A. sinensis* at different altitudes

3.7 不同海拔主要生物活性物质积累量的综合分析

为了更为直观地了解不同海拔区域之间根茎品质的差异,对 4 种主要活性物质(阿魏酸、可溶性糖、酚和黄酮类)的积累量进行了综合分析(表 1)。在 2 100~2 900 m 海拔内,未抽薹根茎中活性物质的干质量和单株总积累量均随海拔升高逐渐增加,其中,干质量总含量在 3 个海拔之间的差异均达到显著水平;单株总含量在高海拔显著高于中和低海拔,而中等和低海拔之间无显著差异($P<0.05$),其中,高海拔单株总含量分别为中和低海拔的 1.11 和 1.13 倍。对于抽薹根茎而言,活性物质的干质量和单株积累量均呈现随海拔升高而逐渐降低的趋势,但差异均未达到显著水平。

4 讨论

不同生境条件显著影响植物的生长发育,其中,海拔高度是影响植物布局及其生长发育的重要生态因子^[29-30]。研究发现,海拔对植物生长发育以及代谢物质的积累是相关气候因子(温度、光照和水分等)综合作用的结果^[31],比如,海拔每上升 100 m,直接辐射增大 5.6%,光照强度递增 4%~5%,散射辐射减小 1.9%,温度降低 0.6 °C^[32];植物形态和叶片结构会随海拔升高发生显著变化,比如,植株矮化、增粗和节间缩短、叶片栅栏组织层数、

表 1 不同海拔当归根茎中主要生物活性物质积累量分析

Table 1 Comprehensive analysis of main bioactive compounds in rhizome of *A. sinensis* at different altitudes

抽薹情况	海拔/m	质量分数/(mg·g ⁻¹)					单株总量/(mg·株 ⁻¹)	
		阿魏酸	可溶性糖	酚类	黄酮类	干质量总		
未抽薹	2 100	0.70	488.93	0.89	0.42	490.95±14.05 ^c	15 843.46±1 082.99 ^b	
	2 500	0.99	561.06	1.15	0.48	563.67±21.16 ^b	16 161.52±1 312.56 ^b	
	2 900	1.21	619.10	1.34	0.54	622.19±5.16 ^a	17 967.46±1 180.71 ^a	
抽薹	2 100	0.40	40.21	2.92	1.53	45.07±0.37 ^d	146.80±17.67 ^c	
	2 500	0.48	27.97	2.75	1.54	32.73±7.81 ^d	123.71±8.85 ^c	
	2 900	0.59	24.53	3.02	1.55	29.69±0.46 ^d	113.95±17.68 ^c	

同行不同小写字母分别表示在 $P<0.05$ 水平下达到显著性差异

Different lowercase indicated significant at $P<0.05$ level at same line

细胞厚度和叶片厚度增加等^[33-34]。对当归高海拔生长过程中生理特性研究发现, 尽管高海拔环境下叶绿素含量有所增加, 光合产物向根中分配提前, 但类胡萝卜素、净光合速率、气孔导度和胞间 CO_2 浓度降低, 最终呈现为高海拔在一定程度上抑制根茎干物质的积累^[12], 这与本研究 2 500 和 2 900 m 根茎干质量显著低于 2 100 m 的结果基本一致。

药用植物的品质直接关系到中药的质量及其临床疗效, 其中, 有效成分(生物碱、黄酮类和挥发油等)的含量是衡量品质的主要标准^[35]。植物次生代谢是植物在生长发育过程中与环境相互作用的结果, 其代谢物的产生与积累易受到环境因素的显著影响^[36]。很多研究发现, 植物次生代谢物质的积累与海拔高度呈显著的正相关性, 比如, 桃儿七和八角莲中鬼臼毒素^[37]、西洋参中糖类^[38]和毛叶还阳参中黄酮和酚类^[39]等。对不同海拔区域当归根茎中活性物质的积累方面, 马毅等^[16]研究发现, 多糖含量在 2 900 m 达到最大值; 晋玲等^[14]报道称, 阿魏酸含量在 2 600 m 达到最大值; 而王惠珍等^[12,40]报道称, 在 2 360~2 780 m 区域内, 阿魏酸、挥发油收率、挥发油含量和蒿本内酯含量均随海拔升高而增加; 通过综合分析不同海拔生态因子, 认为温度和水分是影响当归根茎生物量和活性物质积累的主要环境因素, 通过降低温度和增加降雨量可提高产量和品质形成。本研究在严格控制遗传因素、土壤和水分, 在 2 100~2 900 m 的海拔条件下, 阿魏酸、可溶性糖、酚和黄酮类含量(干质量和单株)以及抗氧化能力均随海拔升高而显著增加, 这充分说明了温度和光照在促进当归活性物质积累过程中的重要性。

阿魏酸作为当归品质衡量的重要指标^[41], 按照生物合成的起始分子, 其属于苯丙烷类—简单苯丙酚类(phenyl propanoid)化合物^[36]。阿魏酸生物合

成的起始分子为芳香族氨基酸—苯丙氨酸, 其由苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)催化苯丙氨酸脱氨形成肉桂酸, 然后在肉桂酸 4-羟化酶(cinnamate 4-hydroxylase, C4H)的催化下形成对羟基肉桂酸, 在羟基肉桂酸一系列酶(未知)的催化形成咖啡酸, 最后在咖啡酸 3-甲基转移酶(caffeic acid 3-*O*-methyltransferase, COMT)的催化下形成阿魏酸^[42]。PAL 是一种诱导酶, 其基因的表达可受到外界多种生物和非生物因素的诱导^[36]。研究发现, 低温可促进 PAL 和 COMT 基因的表达^[43-44]、抑制了 C4H 基因的表达^[44], 而光照可诱导 PAL 和 C4H 基因^[45-47]。这说明本研究中高海拔促进当归根茎中阿魏酸的生物合成与积累可能是温度和光照综合作用的结果。对于高海拔促进阿魏酸以及其他活性物质积累的机制, 还需要从具体生态因子(如低温、光照强度和时间等)方面进一步的研究、验证与分析。

参考文献

- [1] 邱黛玉, 蔺海明, 陈 垣, 等. 经纬度和海拔对当归成药期植株长势和早期抽薹的影响 [J]. 草地学报, 2010, 18(6): 838-843.
- [2] 黄伟晖, 宋纯清. 当归化学成分研究 [J]. 药学学报, 2003, 38(9): 680-683.
- [3] 刘雪东, 李伟东, 蔡宝昌. 当归化学成分及对心脑血管系统作用研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2010, 26(2): 155-157.
- [4] 李 曦, 张丽宏, 王晓晓, 等. 当归化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中药材, 2013, 36(6): 1023-1028.
- [5] Yang X B, Zhao Y, Zhou Y J. Component and antioxidant properties of polysaccharide fractions isolated from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(10): 1884-1890.
- [6] 林 茂, 朱朝德, 孙庆民, 等. 当归化学成分的研究 [J]. 药学学报, 1979, 14(9): 529-534.

- [7] Lu G H, Chan K, Leung K, *et al.* Assay of free ferulic acid and total ferulic acid for quality assessment of *Angelica sinensis* [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1068(2): 209-219.
- [8] 杨帆, 肖远胜, 章飞芳, 等. 当归化学成分的分析 [J]. 药学学报, 2006, 41(11): 1078-1083.
- [9] Lu X H, Zhang J J, Liang H, *et al.* Chemical constituents of *Angelica sinensis* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2004, 13(1): 1-3.
- [10] 宋秋月, 付迎波, 刘江, 等. 当归的化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 1900-1904.
- [11] 李谷才, 魏文亨, 高堂杰, 等. 当归总黄酮提取及其体外抑菌活性研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2): 310-311.
- [12] 王惠珍, 晋玲, 张恩和. 海拔梯度对当归光合产物积累与分配格局的影响 [J]. 中药材, 2012, 35(8): 1191-1194.
- [13] 王惠珍, 张恩和, 高素芳, 等. 海拔对岷县当归产量调控及关键影响因子分析 [J]. 中草药, 2013, 44(14): 1990-1994.
- [14] 晋玲, 金尧, 王惠珍, 等. 海拔对当归产量和阿魏酸含量的影响 [J]. 中兽医医药杂志, 2014(3): 47-49.
- [15] 李军, 高素芳, 李应东, 等. 当归根中阿魏酸和藁本内酯对海拔的响应研究 [J]. 甘肃中医学院学报, 2014, 31(4): 23-26.
- [16] 马毅, 晋玲, 王振恒, 等. 甘肃岷县不同海拔栽培当归多糖含量比较研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2013, 32(2): 7-9.
- [17] 赵杨景, 陈四保, 高光耀, 等. 道地与非道地当归栽培土壤的理化性质 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(1): 19-22.
- [18] 武延安, 蔺海明, 赵贵宾, 等. 遮光对当归栽培的效应 [J]. 中药材, 2008, 31(3): 334-336.
- [19] 饶碧玉, 罗绍芹, 吴占景, 等. 水肥耦合对当归产量和品质的影响效应研究 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(34): 274-278.
- [20] 朱田田, 晋玲, 张裴斯, 等. 基于 ISSR 的甘肃不同产区栽培当归遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(23): 3549-3557.
- [21] 刘敬, 颜红梅, 刘效瑞, 等. 当归新品系“dga2000-02”与对照品种的遗传差异分析 [J]. 原子核物理评论, 2008, 25(2): 201-203.
- [22] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28(3): 350-356.
- [23] 栗孟飞, 姚园园, 杨林贵, 等. 狭叶红景天引种驯化后抗氧化能力、主要活性物质含量及挥发性组分的变化 [J]. 应用生态学报, 2017, 28(9): 2947-2954.
- [24] Beato V M, Orgaz F, Mansilla F, *et al.* Changes in phenolic compounds in garlic (*Allium sativum* L.) owing to the cultivar and location of growth [J]. *Plant Foods Human Nut*, 2011, 66(3): 218-223.
- [25] Lay M M, Karsani S A, Mohajer S, *et al.* Phytochemical constituents, nutritional values, phenolics, flavonols, flavonoids, antioxidant and cytotoxicity studies on *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl fruits [J]. *BMC Compl Altern Med*, 2014, 14: 152-160.
- [26] Nencini C, Menchiari A, Franchi G G, *et al.* *In vitro* antioxidant activity of aged extracts of some Italian *Allium* species [J]. *Plant Foods Human Nut*, 2011, 66(1): 11-16.
- [27] Li M F, Zhou L L, Yang D L, *et al.* Biochemical composition and antioxidant capacity of extracts from *Podophyllum hexandrum* rhizome [J]. *BMC Compl Altern Med*, 2012, 12: 163-172.
- [28] Benzie I F F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay [J]. *Analytical Biochem*, 1996, 239(1): 70-76.
- [29] Chen F. What is the basis of variation in stress tolerance in plants? [J]. *Chin Sci Bull*, 2017, 62(28/29): 3295-3301.
- [30] 孟肖, 张红瑞, 扶胜兰, 等. 海拔对药用植物生长发育的影响研究概况 [J]. 信阳农林学院学报, 2015, 25(1): 99-102.
- [31] 栗孟飞, 姚园园, 丁耀录, 等. 海拔对桃儿七果实特性、活性成分含量及抗氧化能力的影响 [J]. 草业学报, 2017, 26(4): 162-168.
- [32] Jacobson M Z. *Fundamentals of Atmospheric Modeling* [M]. London: Cambridge University Press, 2005.
- [33] 安黎哲, 戴怡龄, 陈拓, 等. 乌鲁木齐河源区不同海拔的火绒草叶片结构特征的比较研究 [J]. 冰川冻土, 2004, 26(4): 474-481.
- [34] 师生波, 李惠梅, 王学英, 等. 青藏高原几种典型高山植物的光合特性比较 [J]. 植物生态学报, 2006, 30(1): 40-46.
- [35] 王引权, 王艳, 陈红刚, 等. 海拔梯度对药用植物品质形成影响的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2012, 14(5): 41-44.
- [36] 王莉, 史玲玲, 张艳霞, 等. 植物次生代谢物途径及其研究进展 [J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(5): 500-508.
- [37] Li M F, Li W, Yang D L, *et al.* Relationship between podophyllotoxin accumulation and soil nutrients and the influence of Fe^{2+} and Mn^{2+} on podophyllotoxin biosynthesis in *Podophyllum hexandrum* tissue culture [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 71: 96-102.

- [38] 朱仁斌, 宛志沪, 丁亚平. 皖西山区西洋参有效成分含量与栽培地海拔高度的关系 [J]. 中草药, 2002, 33(2): 163-166.
- [39] Zidorn C, Schubert B, Stuppner H. Altitudinal differences in the contents of phenolics in flowering heads of three members of the tribe *Lactuceae* (Asteraceae) occurring as introduced species in New Zealand [J]. *Bioch System Ecol*, 2005, 33(9): 855-872.
- [40] 王惠珍. 当归产量和品质形成对海拔的响应及生理机制 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2011.
- [41] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [42] de Oliveira D M, Finger T A, Mota T R, *et al*. Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis [J]. *Plant Biotechnol J*, 2016, 13(9): 1224-1232.
- [43] Yang D L, Sun P, Li M F. Chilling temperature stimulates growth, gene over-expression and podophyllotoxin biosynthesis in *Podophyllum hexandrum* Royle [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 107: 197-203.
- [44] Kumari A, Singh H R, Jha A, *et al*. Transcriptome sequencing of rhizome tissue of *Sinopodophyllum hexandrum* at two temperatures [J]. *BMC Genom*, 2014, 15: 871-880.
- [45] Yousefzadi M, Sharifi M, Behmanesh M, *et al*. The effect of light on gene expression and podophyllotoxin biosynthesis in *Linum album* cell culture [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2012, 56: 41-46.
- [46] Fritzemeier K H, Kindl H. Coordinate induction by UV light of stilbene synthase, phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase in leaves of *vitaceae* [J]. *Planta*, 1981, 151(1): 48-52.
- [47] Bell-Lelong D A, Cusumano J C, Meyer K, *et al*. Cinnamate-4 hydroxylase expression in *Arabidopsis* (Regulation in response to development and the environment) [J]. *Plant Physiol*, 1997, 113(3): 729-738.