

· 中药农业 ·

海南白沙县青松乡人工栽培益智 种质资源的调查与分析[△]

李永辉^{1,2}, 王勇^{1,2}, 田建平², 高炳森², 张俊清^{1,2*}

(1. 海南省热带药用植物研究开发重点实验室, 海南 海口 571199; 2. 海南医学院药学院, 海南 海口 571199)

[摘要] 目的: 对海南白沙县青松乡栽培的益智种质资源进行调查, 对 3 个主要益智种质资源的外观形态和次生代谢产物含量进行评价, 为益智优质种质资源选育提供基础。方法: 测量益智不同种质资源叶片的长度和宽度, 称量益智不同种质资源的果实粒重, 用 LC-MSMS 分析不同种质资源果实中次生代谢产物的含量。结果: 不同益智种质资源的叶片长宽度、果实粒重和次生代谢产物含量间具有明显差异, 以圆果益智的质量最佳。结论: 益智不同种质资源的外观形态和次生代谢产物含量差异较大, 圆果益智为优质品种, 建议推广种植。

[关键词] 益智, 种质资源, 形态, 次生代谢产物

Investigation and Analysis of Different *Aplinia oxyphylla* Cultivars in Qingsong of Baisha County

LI Yonghui^{1,2}, WANG Yong², TIAN Jianping², GAO Bingmiao², ZHANG Junqing^{1*}

(1. Hainan Provincial Key Laboratory of R&D on Tropic Plants, Haikou 571199, China;

2. School of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou 571199, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the morphological difference of three *Aplinia oxyphylla* Miq. cultivars, analyze the contents of secondary metabolites in three cultivars and then find the best cultivars. **Methods:** the length and width of leaf and fruit were measured, the fruit mass was weighed, and the contents of secondary metabolites was determined by LC-MSMS. **Results:** The length and width of leaf and fruit, fruit mass and secondary metabolite were significantly different among three cultivars. **Conclusion:** The quality of round fruit *A. oxyphylla* was better than that of the other two cultivars.

[Keywords] *Alpinia oxyphylla* Miq.; cultivars; morphology; secondary metabolites

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.10.017

益智 *Alpinia oxyphylla* Miq. 为姜科多年生草本植物, 以果实入药, 别名益智子、智仁及摘芋子, 为历版《中华人民共和国药典》所收载^[1]。具有暖肾固精缩尿, 温脾止泻摄唾之功效^[2]。

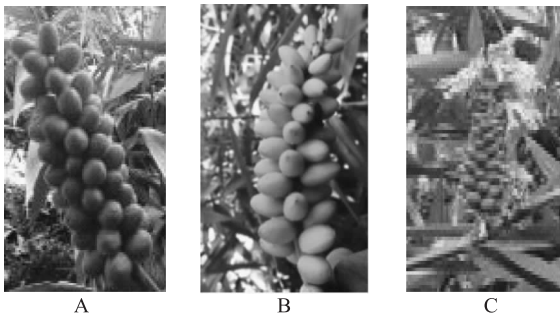
益智在我国有着悠久的栽培历史, 晋代《南方草木状》^[3]曰: “出交趾合浦。建安八年, 交州刺史张津尝以益智粽饷魏武帝”。北宋《本草图经》^[5]记载“益智子, 生昆仑国。今岭南州郡往往有之”。《东坡杂记》记载“海南产益智, 花实皆作长穗而分三节, 其实熟否, 以候岁之丰歉”, 由此可见自晋代以来益智主产于我国两广地区。随着社会发展和气候的变化, 益智的适宜生存环境越来越缩减, 目前在海南的琼中、白沙、保亭等海拔 400m 以上的山

区有大量栽培, 全国 90% 的药用益智产自海南省。野生益智零散分布于海南省山区, 存在较多居群, 其叶、果实等原植物外形差异较大, 生物多样性复杂^[3-4]。在益智的人工栽培种植和优选过程中, 益智的原植物外形逐渐向一致性转化。当地药农根据益智不同种质资源的生长期青果形态, 分别命名为圆果益智、椭圆果益智和小果益智, 其中圆果益智的青果呈近圆形, 果实较大; 椭圆果益智的青果呈椭圆形或纺锤形, 果实大小居于其它两种益智之中; 小果益智青果果实最小, 不同益智种质资源的青果外形见图 1。

作者在益智的栽培种植技术研究过程中, 发现 3 种不同的益智种质资源除外形相差较大外, 其果

[△] [基金项目] 国家自然科学基金(81560738), 海南省应用技术研发与示范推广专项(ZDXM2014071)

* [通信作者] 张俊清, 教授, 研究方向: 中药新产品研究; Tel: (0898)66893460, E-mail: hy_jqzhang@163.com



注：A. 圆果益智、B. 椭圆果益智、C. 小果益智
图 1 三种不同益智栽培种质资源的果实外观图

重、产量和化学成分含量也存在显著差异。益智中主要功效成分倍半萜、二苯基庚烷和黄酮^[5-6]的含量在 3 个种质资源之间也有较大差异。为了进一步研究益智不同种质资源之间的质量差异，寻找优势种质资源，本课题对 3 种益智种质资源的形态学和化学成分的差异进行了研究，以期为益智的优质种质资源寻求提供基础。

1 材料与方法

1.1 调查地点

本研究共设 4 个调查地点，分别是：青松乡打炳村、牙打村、南雅村和打贺村，采样地点海拔高度为 380 ~ 450 m 的丘陵地带，经度位于 109°14' ~ 109°18' 之间，纬度位于 19°10' ~ 19°40' 之间，属热带季风气候，年均降水量 1725 mm，土壤类型为山地黄壤，益智多间种于 5 ~ 10 年生的橡胶林下。

1.2 调查方法

结合益智种植栽培情况选择 5 ~ 7 年生益智，咨询当地的药农确定调查点。由于益智间种于橡胶林下，在调查中，随机选择 1 行做为样方，每个样方包含 6 株益智，每个调查点选择 20 ~ 40 个样方进行调查。通过咨询药农确定益智生长年限，测量益智株高、叶片形态等。

1.3 样品采集

分析用益智样品分别采集于青松乡不同自然村的益智种植基地，均为五年生长期益智，每个栽培的种质资源分别采集植物样品和果实样品各 6 份，所有样品经海南医学院李友宾研究员鉴定，其基源为姜科山姜属益智 *Alpinia oxyphylla* Miq.。

1.4 形态比较

分别选取 3 个不同种质资源的益智叶片各 10 批，

用直尺测量叶片的长度、宽度并计算长宽比。选取 3 个不同种质资源的益智种子各 10 批，每批 20 粒，干燥后称重，计算粒重。

1.5 次生代谢产物分析

1.5.1 材料与试剂 益智酮甲、杨芽黄素、伊砂黄素、白杨素均为自制，采用 HPLC 峰面积归一化法计算，纯度均大于 98%；圆柚酮购于西亚化学试剂有限公司，批号 M5614。甲醇为色谱纯，购于天地公司。其它试剂为分析纯。

岛津 LC-20AD 超快液相色谱洗脱：二元泵，在线真空脱气系统，自动进样器，柱温箱。配 ABI-4000plus 串联四极杆质谱检测仪。

1.5.2 色谱方法 Waters Xbridge BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm)，流动相为 A (甲醇含 0.1% 甲酸)-B (水含 0.1% 甲酸) 梯度洗脱：0 ~ 10 min, 10% B ~ 100% B；流速 0.4 mL · min⁻¹；柱温：40 °C；进样量 5 μL。质谱检测条件参照文献^[7]方法，具体参数见表 1。

表 1 化合物的质谱检测条件						
化合物	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
圆柚酮	219.1	163.2	85	12	22	11
益智酮甲	313.2	136.8	85	12	12	8
杨芽黄素	269.0	226.1	110	12	43	11
伊砂黄素	285.1	242.3	110	12	43	11
白杨素	255.3	153.1	110	12	42	10

1.5.3 对照品溶液配制 取圆柚酮、益智酮甲、杨芽黄素、伊砂黄素和白杨素对照品适量，精密称定，加甲醇制成质量浓度分别为 1 μg · mL⁻¹ 的混合对照品储备液。

1.5.4 供试品溶液的制备 参照文献^[7]方法，精密称定干燥至恒重的样品粉末 (过 4 号筛) 0.5 g，每个样品平行做 3 份，置具塞锥形瓶中，加甲醇 10 mL，称定重量，回流提取 30 min，放冷，用甲醇补足失重，摇匀，滤过，取适量用 0.45 μm 滤膜过滤，即得。

1.5.5 标准曲线的绘制 精密吸取圆柚酮、益智酮甲、杨芽黄素、伊砂黄素和白杨素对照品溶液，加甲醇制成 5.0 ~ 1000 ng · mL⁻¹ 的对照品混合溶液，按照 2.1 项下色谱方法进行测定。分别以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，得 5 个次生代谢产物的线性回归方程，见表 2。

表 2 五个次生代谢产物的标准曲线

化合物名	回归方程	线性范围/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	相关系数 R
圆柚酮	$Y = 5890X + 2860$	5 ~ 1000	0.998 9
益智酮甲	$Y = 7080X + 12\ 800$	5 ~ 1000	0.999 1
杨芽黄素	$Y = 16\ 180X + 9280$	5 ~ 1000	0.997 6
伊砂黄素	$Y = 2260X + 2080$	5 ~ 1000	0.996 8
白杨素	$Y = 5080X + 2930$	5 ~ 1000	0.995 6

1.5.6 精密度试验 精密吸取混合对照品工作液 5 μL ，连续进样 5 次，5 个次生代谢产物峰面积的 RSD 在 0.52% 和 1.53% 之间。

1.5.7 稳定性试验 精密称取益智圆果粉末(样品 2) 6 份，按“2.5.4”项方法制备供试品溶液，按“2.5.2”项下条件进行测定，RSD 分别在 2.6% 和 3.7% 之间。

1.5.8 重复性试验 精密称取益智圆果粉末(样品 2) 6 份，按“2.5.4”项方法制备供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 按“2.5.2”项下条件进行测定，5 种次生代谢产物的含量平均值分别为 2.24、0.72、0.073、0.025、0.013 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。RSD 分别在 1.2% 和 4.3%。

1.5.9 加样回收试验 称取已知含量(圆柚酮、益智酮甲、杨芽黄素、伊砂黄素、白杨素)的益智圆果粉末 6 份，每份约 0.25 g，分别精密加入圆柚酮、

益智酮甲、杨芽黄素、伊砂黄素、白杨素的对照品 0.56、0.18、0.018、0.005 8、0.003 2 mg，按照“2.5.4”项下方法制备供试品溶液，在“2.5.2”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果上述 5 个分析物的平均回收率分别为：102.6%、101.5%、98.9%、96.4%、94.2%；RSD 分别为 1.3%、2.1%、0.89%、2.6%、1.6%。

1.6 数据分析

数据以 $\bar{X} \pm \text{SD}$ 表示，用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。组间两两比较 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

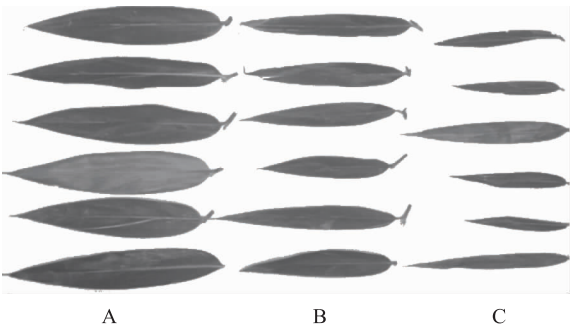
2.1 不同种质资源益智叶的形态学比较

用直尺测量益智叶片的长度和宽度并计算长宽比，观察统计数据见表 3。根据表 3 可知，不同种质资源益智叶的长度在 26.5 ~ 36.5 cm，宽度 3.0 ~ 6.5 cm 之间。三种益智种质资源的叶长相差较小，其中圆果益智的长度在 33 ~ 36cm 之间，椭圆果益智的叶长在 30 ~ 34 cm 之间，小果益智的叶长在 26 ~ 30 cm 之间。三种益智栽培品种的叶宽有较大差异 ($P < 0.05$)，其中圆果益智的宽度在 6.0 ~ 6.5 cm 之间，椭圆果益智的宽度在 4.0 ~ 4.5 cm 之间，小果益智的叶宽在 3.0 ~ 3.5 cm 之间。

表 3 不同益智栽培品种的叶片形态比较

编号	品种名	叶形	叶缘	长度/cm	宽度/cm	长宽比
1	圆果益智	椭圆形，两端微翘起	光滑	$35.8 \pm 0.65^*$	$6.56 \pm 0.35^*$	$5.45 \pm 0.18^*$
2	椭圆果益智	近椭圆形，两端翘起	光滑	$30.7 \pm 1.8^{\#}$	$4.5 \pm 0.56^{\#}$	$6.89 \pm 1.03^{\#}$
3	小果益智	披针形，两端翘起	光滑	$26.9 \pm 1.3^{\#\#}$	$3.07 \pm 0.18^{\#\#}$	$8.79 \pm 0.53^{\#\#}$

注： $\#$ 与圆果益智比较 $P < 0.01$ ，*与椭圆过益智比较 $P < 0.05$ 。



注：A. 圆果益智、B. 椭圆果益智、C. 小果益智

图 2 不同种质资源益智的叶片典型形态图

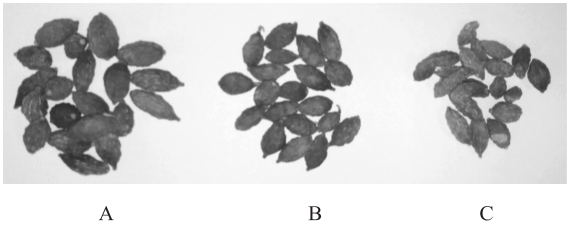
2.2 不同种质资源益智果实的形态比较

用游标卡尺测量益智果实的粒径和长度并计算长径比，用分析天平称量益智的粒重，统计数据见表 4。由表 4 可以看出，不同益智种质资源果实的粒径、长度和粒重有较大差异 ($P < 0.05$)。其中圆果益智的粒径在 8.2 ~ 11.0 mm 之间、长度在 15.1 ~ 22.0 mm 之间，且粒重也最大；椭圆果益智的粒径在 6.9 ~ 8.2 mm 之间，长度在 15.8 ~ 18.2 mm 之间，粒重居于其它两种益智果重之间；小果益智的粒径最小，仅为 4.0 ~ 7.1 mm，长度在 8.1 ~ 17.1 mm 之间，粒重也最小。

表 4 不同益智种质资源的果实形态比较

编号	品种名	果形	长度/mm	粒径/mm	长径比	粒重/mg
1	圆果益智	椭圆形，两端较尖	19.39±2.37 [*]	9.17±0.89 [*]	2.14±0.38 [*]	440.20±20.4 [*]
2	椭圆果益智	椭圆形，两端尖	16.44±0.73 [#]	7.42±0.50 [#]	2.23±0.22 [#]	340.94±16.3 [#]
3	小果益智	纺锤形，两端尖	12.22±2.84 ^{#*}	5.02±0.75 ^{**}	2.43±0.46 ^{**}	184.34±15.7 ^{**}

注：[#]与圆果益智比较 $P<0.01$ ，^{*}与椭圆过益智比较 $P<0.05$ 。



注：A. 圆果益智；B. 椭圆果益智；C. 小果益智

图 3 不同种质资源益智果实形态图

表 5 不同益智种质资源的次生代谢产物含量

编号	品种	圆柚酮	益智酮甲	杨芽黄素	伊砂黄素	白杨素
1	圆果益智	2.250 01	0.709 20	0.072 84	0.023 49	0.012 75
2	椭圆果益智	1.666 96	1.125 20	0.082 73	0.040 68	0.057 15
3	小果益智	1.568 82	1.416 40	0.107 02	0.050 77	0.012 37

高，小果益智中益智酮甲、杨芽黄素、伊砂黄素含量较高，椭圆果益智中白杨素含量较高。

3 讨论

益智为多年生草本植物，在白沙县青松乡主要采取公司+基地+农户的推广种植方式，作者在青松乡的走访调查中发现益智的种质资源对益智的品质影响起主要作用，因此优选益智优质种源是保证药材品质的重要因素。通过本项研究，作者向白沙县农业部门建议重点推广种植圆果益智，酌情推广椭圆果益智，逐步淘汰小果益智。

在对 3 种益智栽培种质资源的研究过程中，本人参照文献方法^[8-10]对 3 个种质资源的 ITS2 序列进行了研究。结果显示，不同种质资源虽然外观形态差异较大，但 3 者的 ITS2 基因序列完全相同，提示该 3 个种质资源间的基因差异较小。

根据作者的前期研究结果^[11]，圆柚酮主要分布于益智果实的种仁中，二苯基庚烷和黄酮主要分布于益智种皮中的差异性分布规律，同时结合益智去壳使用的传统用法，益智种仁中的主要成分圆柚酮应为益智质量评价主要参考指标。圆果益智中的圆柚酮含量最高，基本可以确定为质量最优品种，进行大面积推广。

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，2010：273.

2.3 不同益智种质资源中次生代谢产物的含量测定

取 3 种不同种质资源的益智药材粉末，按“2.5.4”项下方法制备供试品溶液，在“2.5.2”项条件下，进样分析，测定各分析物的峰面积。以外标法计算 5 个分析物在药材中的含量。结果见表 5。

由表 5 可以看出，3 种益智种质资源的次生代谢产物含量差异较大，其中圆果益智中圆柚酮含量最

[2] 张俊清,王勇,陈峰,等. 益智的化学成分与药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2013(25):280.

[3] 潘坤,刘晓静,高炳森,等. 海南益智野生居群表型多样性分析[J]. 安徽农业科学,2016,44(16):106.

[4] Wang H,Liu X,Wen M,et al. Analysis of the genetic diversity of natural populations of *Alpinia oxyphylla* Miquel using inter-simple sequence repeat markers[J]. Crop Science, 2012,52(5):1767.

[5] 徐俊驹,谭宁华,曾广智,等. 益智仁化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(8):990.

[6] 邱磊,王治元,王志,等. 益智仁的化学成分[J]. 植物资源与环境学报,2011,20(2):94.

[7] Li Y H,Chen F,Wang J F,et al. Analysis of nine compounds from *Alpinia oxyphylla* fruit at different harvest time using UFLC-MS/MS and an extraction method optimized by orthogonal design[J]. Chemistry Central Journal, 2013(7):134.

[8] 罗焜,马培,姚辉,等. 多基原药材秦艽 ITS2 条形码鉴定研究[J]. 药学报,2012,47(12):1710.

[9] 邵婧,谷巍,巢建国,等. 基于 ITS2 序列的茅苍术及其近缘种 DNA 分子鉴定[J]. 中草药,2015,46(8):1209.

[10] 杨路存,刘何春,周学丽,等. 羌活不同地理种群 ITS 序列变异及系统发生分析[J]. 中国中药杂志,2015,40(19):3478.

[11] Chen F,Li H L,Tan Y F,et al. Different accumulation profiles of multiple components between pericarp and seed of *Alpinia oxyphylla* capsular fruit as determined by UFLC-MS/MS[J]. Molecules,2014(19):4510.

(收稿日期 2016-12-20)