

不同基原金线莲植物的化学成分比较研究

龚秀会¹, 许敏², 董鸿竹², 林章彩³, 张颖君², 赵平^{1*}

(1. 西南林业大学, 云南昆明 650224; 2. 中国科学院昆明植物研究所

植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南昆明 650201; 3. 福建省永安市八一村金线莲农民专业合作社, 福建永安 366025)

摘要 目的 比较不同基原金线莲植物的化学成分。方法 应用 LC-MS 联用技术对福建金线莲(*Anoetochilus roxburghii*)、台湾金线莲(*A. formosanus*) 组培植株和福建金线莲林下种植植株进行比较分析, 同时应用硫酸-蒽酮法和分光光度法对金线莲主要活性成分(金线莲多糖、总黄酮)的含量进行比较分析研究。结果 福建金线莲(*A. roxburghii*)、台湾金线莲(*A. formosanus*) 组培植株和福建金线莲林下种植植株 3 个金线莲样品(HNJ201001、HNJ201002 和 HNJ201003)中金线莲多糖的含量分别为 16.175%、19.636% 和 10.939%; 3 个金线莲样品中总黄酮的含量分别为 0.722%、0.895% 和 0.984%。结论 3 个样品的化学成分组成及含量非常相似, 其中总黄酮和游离氨基酸的含量均与文献报道的野生金线莲相当或略高, 而组培金线莲样品中的多糖则远高于文献报道的野生金线莲样品。

关键词 金线莲; 化学成分; LC-MS; 硫酸-蒽酮法; 紫外分光光度法

中图分类号 S567 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2012)36-17530-02

Comparative Study of the Chemical Constituents of *Anoetochilus* spp. from different origins

GONG Xiu-hui et al (Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Use in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

Abstract [Objective] To compare the chemical constituents of *Anoetochilus* spp. (Jin-Xian-Lian) from different origins. [Method] The chemical constituents of three Jin-Xian-Lian samples were analyzed and compared by means of LC-MS techniques, which were the tissue cultured *A. roxburghii* and *A. formosanus*, and *A. roxburghii* planted under forest. At the same time, the contents of the main active components in Jin-Xian-Lian were compared and analyzed by anthrone-sulfuric acid method and ultraviolet spectrophotometry, including polysaccharides and total flavonoids. [Result] Polysaccharides contents in three Jin-Xian-Lian samples (HNJ201001, HNJ201002 and HNJ201003) were 16.175%, 19.636% and 10.939%; while the total flavonoids contents were 0.722%, 0.895% and 0.984%, respectively. [Conclusion] The results showed that the chemical composition and their content of these three samples were quite similar. Of which, the contents of total flavonoids and free amino acids of the three Jin-Xian-Lian samples were similar to or even higher than those of the wild species. As for the tissue cultured Jin-Xian-Lian, polysaccharides content was far higher than the wild species.

Key words *Anoetochilus* spp.; Chemical constituents; LC-MS; Anthrone-sulfuric acid method; Ultraviolet spectrophotometry

金线莲别名金蚕、金石松、树草莲、乌人参、金线虎头蕉等。其以全草入药,味甘、性平,具清热凉血和除湿解毒的功效,常用于治疗肺结核咯血、糖尿病、肾炎、膀胱炎、重症肌无力、遗精、风湿性及类风湿性关节炎、小儿惊风、妇女白带以及毒蛇咬伤等症,民间称之为“药王”。其基原植物主要为兰科(Orchidaceae)开唇兰属(*Anoetochilus*)植物福建金线莲(*Anoetochilus roxburghii*(Wall.)Lindl)和台湾金线莲(*A. formosanus* Hayata)。金线莲喜阴凉、潮湿环境,主要生长在有常绿阔叶树木的沟边、石壁、以及土质松散的潮湿地带,分布于我国西南、东南各省,特别是闽台两省。其中,福建永安是野生金线莲分布最为丰富的中心产区,被中国经济林协会评为“金线莲之乡”^[1]。

近年来,国内外对金线莲开展了大量的研究工作,发现其主要化学成分为多糖、挥发油、黄酮、三萜、甾体、有机酸及其配糖体类等^[2-4]。现代药理研究表明,金线莲能阻止葡萄糖在小鼠肠道内的吸收,从而有效降低血糖。主要成分金线莲糖苷(kinsenoside)对受损的胰岛素β细胞有修复作用并提高其功能^[5-6]。此外,金线莲还具有抗高血压、保肝、抗HBV、抗脂质氧化、抗癌、抑制雌性激素缺乏引起的骨流失等多方面的药理作用^[2,7]。

金线莲具有较高的药用、保健以及观赏价值,但是由于苛刻的生长环境,加之近年自然环境遭受严重破坏,其野生资源越来越少。目前,利用植物组织培养技术,已实现对其进行快速繁殖,并大规模培育^[8-9]。为比较金线莲不同基原植物的化学成分,笔者应用 LC-MS 联用技术对福建省永安市八一村提供的福建金线莲(*A. roxburghii*)和台湾金线莲(*A. formosanus*)的组培植株以及福建金线莲林下种植植株进行了比较分析研究,同时应用硫酸-蒽酮法、分光光度法等方法对其主要活性成分金线莲多糖及总黄酮的含量进行了比较分析,以期对金线莲的进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。福建金线莲(*A. roxburghii*) (HNJ201001)、台湾金线莲(*A. formosanus*) 组培苗(HNJ201002)和福建金线莲(*A. roxburghii*) 林下种植 360 d 以上的样品(HNJ201003),均由福建省永安市八一村金线莲农民专业合作社提供。

1.1.2 主要仪器。Shimadzu UV2401PC 紫外可见分光光度计,购自日本岛津公司; API QSTAR Pulsar 液相色谱、四极杆和飞行时间串联质谱仪,购自美国应用生物系统公司。

1.1.3 主要试剂。LC-MS 分析用甲醇为色谱纯,甲醇、乙醇、正己烷、蒽酮试剂、亚硝酸钠、硝酸铝和氯化钠等均为分析纯,市售。

1.2 方法

1.2.1 LC-MS 分析。

1.2.1.1 样品溶液的制备。精密称取 2.000 g 金线莲药材

基金项目 云南省高等学校特色专业点建设项目(特色专业生物技术, 50116001)资助。

作者简介 龚秀会(1978-),女,云南曲靖人,实验师,从事生物技术试验方面的研究。* 通讯作者,研究员,硕士生导师,博士,从事天然产物化学研究工作, E-mail: hypzhao@yahoo.com。

收稿日期 2012-10-11

粉末,用 100 ml 无水甲醇超声浸提,浸提液浓缩,用无水甲醇溶解,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,待测。

1.2.1.2 色谱质谱条件。色谱柱为 ZORBAX SB-C₁₈ (50 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇(含 0.1% 甲酸) - 水(含 0.1% 甲酸), 0 min (20:80, V/V) $\rightarrow$ 40 min (100:0, V/V); 流速为 1.0 ml/min; 检测波长为 280 nm; 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为 10 μl 。电喷雾负离子扫描(ESI, m/z 150 ~ 1 500), 毛细管电压为 4 kV; 毛细管柱温为 400 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2 总多糖的含量测定。

1.2.2.1 供试品溶液的制备。精密称取 1.000 g 样品于 250 ml 的三角瓶中,加入 100 ml 正己烷溶液浸泡过夜,过滤,挥干正己烷,将残渣同滤纸一起放置在 250 ml 的三角瓶中,加入 200 ml 沸水浸泡 15 min,过滤,用沸水洗滤渣 3 次,每次 10 ml,滤液收集到 250 ml 的容量瓶中,加水定容至刻度线,摇匀,待用(每个样品平行 3 份)。

1.2.2.2 硫酸-蒽酮溶液的制备。精密称取干燥至恒重的蒽酮试剂 0.200 g,于 100 ml 的容量瓶中,加浓硫酸溶解并定容至刻度线,摇匀,待用。

1.2.2.3 标准葡萄糖溶液的制备。精密称取干燥至恒重的标准葡萄糖 10.15 mg,于 100 ml 的容量瓶中,加水溶解并定容至刻度线,摇匀,待用。

1.2.2.4 线性关系的考察。采用硫酸-蒽酮法测定样品中多糖的含量。精密量取标准溶液 0.0、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 和 1.0 ml,各加入蒸馏水至 1.0 ml,加入 4.0 ml 浓度 0.2% 的硫酸-蒽酮溶液,充分混匀后于水浴中加热 10 min 后,取出冷却至室温,在 625 nm 波长处测吸光度。以葡萄糖浓度(mg/ml)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线。

1.2.2.5 样品测定。精密吸取样品溶液 0.1 ml 于具塞试管中,各加入蒸馏水至 1 ml,加入 4.0 ml 浓度 0.2% 的硫酸-蒽酮溶液(加入时沿管壁加入),充分混匀后于水浴中加热 10 min 后,取出冷却至室温,在 625 nm 波长处测吸光度。以相应的样品溶剂为空白,计算出多糖的含量。

1.2.3 总黄酮的含量测定。

1.2.3.1 样品溶液的制备。精密称取 1.000 g 样品于 250 ml 的三角瓶中,加入 100 ml 正己烷溶液浸泡过夜,过滤,挥干正

己烷,将残渣同滤纸一起放置在 250 ml 的三角瓶中,加入 200 ml 无水甲醇超声浸泡,过滤,用无水甲醇洗涤滤渣 3 次,每次 10 ml,滤液收集到 250 ml 的容量瓶中,加无水甲醇定容至刻度线,摇匀,待用(每个样品平行 3 份)。

1.2.3.2 标准芦丁溶液的制备。精密称取干燥至恒重的标准芦丁 10.17 mg 于 100 ml 的容量瓶中,加 20 ml 无水乙醇溶解,加水并定容,摇匀,待用。

1.2.3.3 线性关系的考察。精密量取标准溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 12.0 ml,加蒸馏水至 12.0 ml,然后加入 2.0 ml 浓度 5% 的亚硝酸钠溶液,放置 6 min,继续加入 2.0 ml 浓度 10% 的硝酸铝溶液,混匀放置 6 min,再加入 20.0 ml 浓度 4% 的氢氧化钠溶液,最后加水定容至 50 ml,放置 15 min,在 503 nm 波长处测吸光度。以相应的样品溶剂为空白。以芦丁浓度(mg/ml)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线。

1.2.3.4 样品测定。精密吸取样品溶液 10.0 ml,各加入蒸馏水至 12.0 ml,然后加入 2.0 ml 浓度 5% 的亚硝酸钠溶液,放置 6 min,继续加入 2.0 ml 浓度 10% 的硝酸铝溶液,混匀放置 6 min,再加入 20.0 ml 浓度 4% 的氢氧化钠溶液,最后加水定容至 50 ml,放置 15 min,在 503 nm 波长处测吸光度。以相应的样品溶剂为空白,计算出总黄酮的含量。

2 结果与分析

2.1 LC-MS 分析 福建金线莲(*A. roxburghii*)、台湾金线莲(*A. formosanus*) 组培植株和福建金线莲林下种植植株提取物的液相色谱图见图 1。通过 LC-MS 分析,从中指认了 9 个主要的共有化学成分,分子量分别为 338(m/z 339 [M+H]⁺, 337 [M-H]⁻)、478(m/z 479 [M+H]⁺, 477 [M-H]⁻)、478(m/z 479 [M+H]⁺, 477 [M-H]⁻)、624(m/z 625 [M+H]⁺, 623 [M-H]⁻)、240(m/z 241 [M+H]⁺, 239 [M-H]⁻)、382(m/z 405 [M+Na]⁺, 381 [M-H]⁻)、352(m/z 375 [M+Na]⁺, 351 [M-H]⁻)、256(m/z 257 [M+H]⁺, 255 [M-H]⁻) 和 474(m/z 497 [M+Na]⁺, 473 [M-H]⁻), 但化学结构需作进一步鉴定。3 个样品的化学成分组成非常相似,但福建金线莲林下种植植株中化学成分的含量明显要低于福建金线莲植株和台湾金线莲组培植株中的含量。

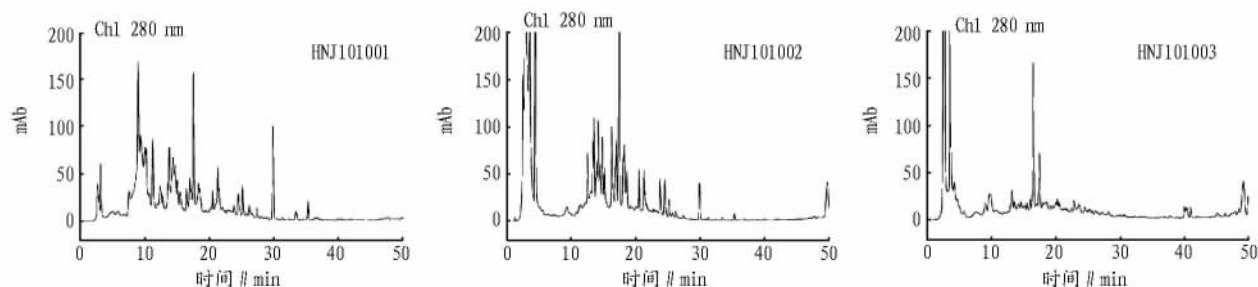


图 1 HNJ201001、HNJ201002 和 HNJ201003 的液相色谱图

2.2 总多糖含量测定

2.2.1 线性关系的考察。计算得线性回归方程为: $Y = 7.6056X + 0.0218$, $R = 0.9993$ 。试验结果表明,在 0 ~ 0.0203

mg/ml 范围内,葡萄糖浓度与吸光度有良好的线性关系。

2.2.2 总多糖含量测定。计算得福建金线莲(*A. roxburghii*)、

(下转第 17607 页)

表2 不同来源花(鱼骨)可量性状的比较

可量性状比值	该试验结果	湖北省水生生物研究所 ^[1] 研究结果	丁瑞华等 ^[2] 研究结果	付立霞等 ^[3] 研究结果	缪学祖等 ^[4] 研究结果
体长/体高	3.50~4.67	4.1~5.5	4.0~5.0	3.99~4.84	3.9~5.4
体长/头长	3.16~4.68	3.5~4.0	3.5~4.1	3.98~4.61	3.6~4.8
体长/尾柄长	4.46~13.44	5.0~5.9	5.8~6.9	5.00~6.13	—
体长/尾柄高	5.99~16.27	—	8.9~12.0	8.80~10.62	—
尾柄长/尾柄高	1.04~2.80	—	—	1.60~2.00	—
头长/吻长	2.06~4.13	2.3~2.9	2.2~3.0	2.55~3.08	2.4~3.1
头长/眼径	3.10~5.11	3.4~5.4	3.5~5.4	3.60~5.00	3.1~5.1
头长/眼间距	2.23~8.89	2.6~3.7	2.5~3.5	2.59~4.50	2.8~4.0

上从侧面上反映了食物消化的难易^[1-13],肉食性鱼类的肠较短,约为体长的1/3~3/4,草(藻)食性和杂食性鱼类的肠较长,可达体长的2~5倍,甚至达15倍。花(鱼骨)的肠道系数为1.08,肠道系数略大于肉食性鱼类远小于草食性和杂食性鱼类,说明其为杂食性偏肉食性鱼类的肠道特征^[4,6,13]。

雌雄形态分析结果表明,雌雄个体形态差异不明显,较难区别^[4];花(鱼骨)雌体有较大的内脏重、性腺重说明其在繁殖季节通过体形变化增加腹腔容积而增加繁殖输出,这是长期自然选择的结果。

参考文献

- [1] 伍献文,杨干荣,乐佩琦,等.中国经济动物志·淡水鱼类[M].北京:科学出版社,1979:86~87.
- [2] 湖北省水生生物研究所鱼类研究室.长江鱼类[M].北京:科学出版社,1976:79~80.
- [3] 丁瑞华.四川鱼类志[M].成都:四川科学技术出版社,1994:264~265.
- [4] 付立霞,乔德亮.夹江花鱼骨的形态生物学[J].水利渔业,2008,28(1):

53~55.

- [5] 颜慧,俞小先,唐明虎,等.花鱼骨形态学特性的初步研究[J].齐鲁渔业,2006,23(11):13~14.
- [6] 缪学祖,殷名称.太湖花鱼骨生物学研究[J].水产学报,1983,7(1):31~44.
- [7] 谢从新,龚世园,杨治国,等.武昌南湖花鱼骨的生长研究[J].海洋与湖沼,1988,19(3):225~231.
- [8] 殷名称.鱼类生态学[M].北京:中国农业出版社,1995:51~126.
- [9] BROWN M E. Experimental studies on growth in the physiology of Fishes[M]. London: Academic Press, 1957:361~400.
- [10] 黄峰,严安生,熊传喜,等.黄颡鱼的含肉率及鱼肉营养评价[J].淡水渔业,1999(29):10.
- [11] 尾崎久雄.鱼类消化生理学[M].吴尚忠,译.上海:上海科技出版社,1983:22~380.
- [12] 董棠亮.鱼类生理学[M].北京:科学出版社,1988:253~255.
- [13] 夏前征,官少飞,龚世园,等.丰溪河花鱼骨食性研究[J].江西水产科技,2011(2):24~29.
- [14] 林值华,雷焕宗,林值云,等.花鱼骨的两性异性和雌体繁殖输出[J].上海交通大学学报:农学科学版,2005,23(3):284~288.

(上接第17531页)

台湾金线莲(*A. formosanus*)组培植株和福建金线莲林下种植植株3个金线莲样品(HNJ201001、HNJ201002和HNJ201003)中金线莲多糖的含量分别为16.175%、19.636%和10.939%。试验结果表明,3个样品中特别是组培样品的多糖含量远高于文献报道的野生金线莲样品(8.7%)^[10]。

2.3 总黄酮含量测定

2.3.1 线性关系的考察。计算得线性回归方程为: $Y = 0.2801X + 0.0077$, $R = 0.9988$ 。试验结果表明,在0~0.0244 mg/ml 范围内,芦丁浓度与吸光度的线性关系良好。

2.3.2 总黄酮含量测定。计算得福建金线莲(*A. roxburghii*)、台湾金线莲(*A. formosanus*)组培植株和林下种植福建金线莲植株3个金线莲样品(HNJ201001、HNJ201002和201003)中总黄酮的含量分别为0.722%、0.895%和0.984%。其中林下种植样品的黄酮类成分含量高于2个组培样品。试验结果表明,福建金线莲、台湾金线莲组培品及林下种植福建金线莲样品的总黄酮含量,与文献报道的野生金线莲(0.4%)含量相当或略高^[11]。

3 结论

研究表明,组培及林下种植的金线莲样品的有效成分含量,与文献报道的野生样品含量相当或略高于野生样品,提示组培或种植样品应与野生样品具有相同或相当的品

质和功效。未知成分的阐明及深入的比较分析工作仍在进行中。

参考文献

- [1] 孔祥海.“药王”金线莲的自然资源初步研究[J].中草药,2001,32(2):155~157.
- [2] 张红艳,潘馨.金线莲化学成分及药理活性研究进展[J].海峡药学,2009,21(1):82~84.
- [3] HAN M H, YANG X W, JIN Y P. Novel triterpenoid acyl esters and alkaloids from *Anoetochilus roxburghii* [J]. Phytochemical Analysis, 2008, 19(5):438~443.
- [4] HE C N, WANG C L, GUO S X, et al. A novel flavonoid glucoside from *Anoetochilus roxburghii* (Wall.) Lindl [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2006, 48(3):359~363.
- [5] ZHANG Y H, CAI J Y, RUAN H L, et al. Antihyperglycemic activity of kinsenoside, a high yielding constituent from *Anoetochilus roxburghii* in streptozotocin diabetic rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2007, 114(2):141~145.
- [6] WU J B, LIN W L, HSIEH C C, et al. The hepatoprotective activity of kinsenoside from *Anoetochilus formosanus* [J]. Phytotherapy Research, 2007, 21(1):58~61.
- [7] DU X M, SHOYAMA, FURUSYO, et al. Pharmacologically active compounds in *Anoetochilus formosanus* [J]. Foods & Food Ingredients Journal of Japan, 2008, 213(9):825~834.
- [8] 冉彩虹.台湾金线莲组培苗生根培养研究[J].福建林业科技,2009,36(4):158~160.
- [9] 罗晓青,蒙秋伊,查兰松,等.兴仁金线莲丛生芽诱导增殖研究[J].安徽农业科学,2012,40(22):11231~11232,11260.
- [10] 余杰,崔仕超,张晓辉,等.响应面分析法优化金线莲多糖提取过程的研究[J].汕头大学学报:自然科学版,2009,24(4):55~60.
- [11] 张志信,张铁,赵保发,等.文山野生金线莲总黄酮及多糖含量测定[J].时珍国医国药,2009,20(6):1362~1364.