

引用格式: 李璐璐, 朱志彬, 李水坤, 等. 金线莲中金线莲苷及其差向异构体和内源激素测定[J]. 浙江农林大学学报, 2025, 42(2): 230–238. LI Lulu, ZHU Zhibin, LI Shuikun, et al. Detection of kinsenoside and its isomer, endogenous hormones in *Anoectochilus roxburghii*[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2025, 42(2): 230–238.

金线莲中金线莲苷及其差向异构体和内源激素测定

李璐璐¹, 朱志彬¹, 李水坤², 方洁云³, 白岩¹, 方莉⁴, 刁凌娟⁴, 周小军⁴, 王红珍¹

(1. 浙江农林大学 食品与健康学院 浙江省特色中药资源保护与创新利用重点实验室, 浙江 杭州 311300; 2. 建德市林业局, 浙江 建德 311600; 3. 海南大学 热带农林学院, 海南 海口 570204; 4. 金华市农业科学研究院, 浙江 金华 321017)

摘要: 【目的】金线莲为兰科 Orchidaceae 植物金线兰 *Anoectochilus roxburghii* 新鲜或干燥全草, 金线莲苷是其特征性活性成分, 金线莲苷差向异构体是其制备过程中极难去除的杂质, 本研究旨在明晰金线兰中金线莲苷及其差向异构体、内源激素的含量及分布模式, 以筛选金线莲苷工业化生产优质药源。【方法】利用液相色谱-蒸发光散射 (HPLC-ELSD) 测定金线兰 4 个品系全草、根、茎和叶中金线莲苷及其差向异构体质量分数, 并分析其分布模式; 利用液相色谱中二极管阵列检测器 (HPLC-PDA) 测定金线兰不同部位茎段、叶片中内源生长素 (IAA)、水杨酸 (SA) 和脱落酸 (ABA) 质量分数, 分析其与金线莲苷积累模式相关性。【结果】金线兰 4 个品系全草中, 金线莲苷质量分数有所不同, 范围为 2.84–3.81 mg·g⁻¹, 从大到小依次为‘大叶’‘Daye’、‘小叶’‘Xiaoye’、‘尖叶’‘Jianye’和‘红霞’‘Hongxia’, 地上部分组织中金线莲苷质量分数远高于根, 并且叶中略高于茎; 金线兰 4 个品系中金线莲苷差向异构体质量分数极低, 为 0.14–0.50 mg·g⁻¹, 在根部特异性积累; 在红霞类原球茎中同时检测到金线莲苷及其差向异构体, 其金线莲苷质量分数几乎与全草相当; 在尖叶类原球茎中只检测到金线莲苷, 其质量分数高于全草。金线莲苷和 IAA 积累模式在金线兰 4 个品系茎段中正相关, 金线莲苷与 ABA 积累模式只在红霞和小叶品系茎段中正相关; 金线莲苷与 SA 积累模式在‘小叶’‘尖叶’‘红霞’品系茎段中显著正相关 ($P < 0.05$)。金线兰经生长素抑制剂 (TIBA) 处理前后, 金线莲苷积累模式随着 IAA 积累模式变化而变化, 金线莲苷合成或受内源 IAA 合成调控。【结论】明确了金线兰中金线莲苷及其差向异构体的分布模式, 金线莲苷特异性分布在金线兰的地上部分, 金线莲苷差向异构体特异性分布于根部, 尖叶类原球茎中没有检测到金线莲苷差向异构体, 金线兰地上部分或尖叶类原球茎可以作为低成本生产高质量金线莲苷的优质药源; 金线莲苷与内源 IAA 积累模式正相关, 内源 IAA 或正调控金线莲苷的合成, 或通过改变内源 IAA 的合成调控金线莲苷的合成。图 3 表 4 参 31

关键词: 金线兰; 金线莲苷及其差向异构体; 分布模式; 内源生长激素; 生长素抑制剂

中图分类号: S759.8; Q946.8 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2025)02-0230-09

Detection of kinsenoside and its isomer, endogenous hormones in *Anoectochilus roxburghii*

LI Lulu¹, ZHU Zhibin¹, LI Shuikun², FANG Jieyun³, BAI Yan¹, FANG Li⁴,
TOU Lingjuan⁴, ZHOU Xiaojun⁴, WANG Hongzhen¹

(1. Zhejiang Key Laboratory for Chinese Medicinal Resources Protection and Innovative Utilization, College of Food and Health, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. Jiande Forestry Bureau, Jiande 311600, Zhejiang, China; 3. College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570204, Hainan, China; 4. Jinhua Academy of Agricultural Science, Jinhua 321017, Zhejiang, China)

收稿日期: 2024-07-11; 修回日期: 2024-12-10

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目 (LGG22H280001); 国家林业和草原局科技发展中心生物安全与遗传资源管理专项经费项目 (KJZXSA202306); 金华市重大科技计划项目 (2022-2-009); 金华市院地合作项目 (2020-J-002-ydhz)

作者简介: 李璐璐 (ORCID: 0009-0002-5448-7179), 从事药用植物次生代谢调控研究。E-mail: lilulu688@163.com。
通信作者: 王红珍 (ORCID: 0000-0003-0905-5676), 副教授, 博士, 从事金线莲资源优化与改良研究。
E-mail: Wang.hongzhen@163.com

Abstract: [Objective] Kinsenoside is a characteristic active ingredient of *Anoectochilus roxburghii*, and its isomer is impurity that is extremely difficult to remove during kinsenoside preparation process. [Method] Kinsenoside and its isomer contents in whole plant, root, stem and leaf of ‘Jianye’, ‘Hongxia’, ‘Daye’, and ‘Xiaoye’ cultivars were detected using HPLC-ELSD, and their accumulation pattern were also analyzed. The contents of endogenous IAA, ABA, and SA were detected using HPLC-PDA, and correlation coefficient of kinsenoside and these hormones accumulation pattern were also analyzed using Pearson correlation analysis. [Result] Kinsenoside contents (2.84 to $3.81\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) were varied in 4 cultivars of *A. roxburghii*, and that was the highest in ‘Daye’, moderate in ‘Xiaoye’ and ‘Jianye’, and the lowest in ‘Hongxia’. Kinsenoside accumulated predominantly in aerial parts, and its content was slighter higher than that in stem. Meanwhile, the content of its isomer were very low in all cultivars (0.14 to $0.50\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) and it exclusively accumulated in root. Kinsenoside and its isomer simultaneously detected in the protocorm like bodies (PLBs) of ‘Hongxia’, and kinsenoside content was almost equal to that of the whole plant. Kinsenoside was detected in PLBs in ‘Jianye’, and its content was higher than that whole plant, while there is no its isomer was detected in PLBs of ‘Jianye’. Kinsenoside and IAA in a polar manner in the stem of all 4 cultivars were positive correlated. Meanwhile kinsenoside and SA accumulation pattern were positively correlated ‘Xiaoye’, ‘Hongxia’ and ‘Jianye’ cultivars. Kinsenoside accumulation pattern hanged with the IAA accumulation pattern after TIBA treatment. These results showed that kinsenoside biosynthesis may be regulated by endogenous IAA accumulation. [Conclusion] This study identified the distribution patterns of kinsenoside and its isomer in *A. roxburghii*. Kinsenoside specificity was distributed in the aboveground part, while the isomer was distributed in the roots. No isomer of kinsenoside was detected in PLBs of ‘Jianye’. The aboveground part or the PLBs with ‘Jianye’ can be used as a high quality drug source to produce high quality clematiside at low cost. There is a positive correlation between kinsenoside and the endogenous IAA accumulation, which either positively regulates the synthesis of kinsenoside, or can regulate the synthesis of kinsenoside by changing the endogenous IAA synthesis. [Ch, 3 fig. 4 tab. 31 ref.]

Key words: *Anoectochilus roxburghii*; kinsenoside and its isomer; distribution pattern; endogenous hormone; TIBA treatment

金线莲为兰科 Orchidaceae 多年生药用植物金线兰 *Anoectochilus roxburghii* 新鲜或干燥全草，味甘、性平，具有保肝护肝^[1]、降血糖^[2]、抗骨质疏松^[3]、抗氧化^[4]等药理学功效，用于治疗肺结核咳血、糖尿病、重症肌无力等症，在民间具有“神草”“药王”之称。金线莲苷(kinsenoside, KD)是金线兰特征性活性成分，对于酒精性肝损伤^[5]、胆汁淤积性肝损伤^[6]、放射性肝损伤^[7]、非酒精性脂肪肝炎^[8]、自身免疫性肝炎^[9]、肝纤维化^[10]等肝损伤具有良好的保护作用，于 2023 年 7 月 28 日获得国家药品监督管理局批进入药物临床试验，但是，市场上金线莲苷奇缺，价格昂贵(标品： $30\sim 75\text{元}\cdot\text{g}^{-1}$)，难以满足临床需求。开展金线莲苷工业化生产势在必行，化学合成金线莲苷因成本高、产率低难以进行工业化生产^[11]。从金线兰中分离提取是工业化制备金线莲苷的唯一方法。金线莲苷差向异构体——斑叶兰苷(goodyeroside A, GD)和金线莲苷分子量相同，理化性质相似，药理学活性不同^[12-17]，是金线莲苷制备过程极难去除的杂质。但是，目前尚无金线兰中金线莲苷及其差向异构体如何分布的报道。

金线兰野生资源濒危，是《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES)附录 II 的保护物种和《国家重点保护野生植物名录》(第二批)二级保护植物，目前市场上野生金线兰资源稀少，多以人工种植为主。人工种植金线兰受品种基因型和产区生态因子的影响^[18-20]，产量和质量极不稳定，难以作为药源工业化生产金线莲苷。明确不同品种、产地金线兰中金线莲苷及其差向异构体的分布是金线兰研究或金线莲苷工业化生产研究中的热点问题。

大多数次生代谢产物对植物细胞有毒害作用，在植物中含量很低，而金线莲苷在金线兰中含量相对

较高^[21],对植物细胞几乎无毒,在植物生长发育的不同时期呈现“S”型变化趋势^[22]。金线莲苷积累势必与植物中内源激素积累相关,但目前尚无相关报道。

本研究分析金线兰中金线莲苷、斑叶兰苷、内源生长素(IAA)、水杨酸(SA)和脱落酸(ABA)的含量及分布模式;并分析了生长素抑制剂(2,3,5-三碘苯甲酸,TIBA)处理下茎段中内源IAA及金线莲苷分布模式的变化,研究结果将为金线兰质量评价提供基础数据,为工业化生产金线莲苷优质药源的筛选提供思路和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 金线兰‘大叶’‘Daye’、‘小叶’‘Xiaoye’、‘尖叶’‘Jianye’和‘红霞’‘Hongxia’4个品系经鉴定为金线兰。‘尖叶’品系购自浙江省金华市农业科学研究院,‘红霞’‘大叶’‘小叶’品系购自于福建省南靖县金线兰种植企业,4个品系金线兰都在大棚中种植5个月。采集金线兰全草、根、茎、叶,经液氮研磨成粉末,用于分析金线莲苷及其差异异构体含量。采集不同部位茎段及叶,叶分别为顶端叶、中部叶(第1、2位结节处叶片)和底部叶(第3个及以下结节处叶);茎段分为顶端茎段(第3个节以上茎段)、中部茎段(中间3~5个节)及底部茎段(第6个节及以下茎段)。经液氮研磨成粉末,用于分析金线莲苷及其差向异构体、内源激素含量。用100 mg·L⁻¹ TIBA处理^[23]‘尖叶’品系,分别在0、1、2、3、4、5 d取样,经液氮研磨成粉末,用于分析内源激素和金线莲苷积累模式的变化。所有的植物材料重复3次取样。

1.1.2 标品与试剂 金线莲苷(CAS: HS21117B2)、斑叶兰苷(CAS: HS22302B1)购自宝鸡市辰光生物有限公司,生长素(CAS: B21810)、脱落酸(CAS: B27484)、水杨酸(CAS: B21197)、2,3,5-三碘苯甲酸(CAS: S30709)、色谱级乙腈和甲醇购自上海源叶生物科技有限公司。

1.1.3 仪器 岛津高效液相色谱仪(LC-2030 Plus)购自日本岛津公司;超声仪(KQ-300GDV)购自绍兴谱尔仪器设备有限公司。

1.2 试验设计与方法

1.2.1 金线莲苷及其差向异构体测定方法 金线莲苷及差向异构体分离、提取参照WANG等^[24]方法并有所改动,准确称取样品粉末0.2 g,加入1 mL体积分数为90%的甲醇,30 ℃超声处理30 min称量,用体积分数为90%的甲醇补足挥发溶剂。5 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液用0.22 μm滤膜过滤。HPLC-ELSD测定金线莲苷及差向异构体,检测方法参照张闻婷等^[21]测定金线莲苷的方法并有所改动,利用岛津高效液相色谱仪(LC-2030 Plus,日本岛津),分别采用NH₂、XSelect HSS T3色谱柱,柱温为30 ℃,流动相为水:乙腈=92:8,流速为1 mL·min⁻¹,等度洗脱。PDA检测波长为210 nm,ELSD检测条件:载气为氮气,雾化室温度为50 ℃,进样量为10 μL。以峰面积(x)和物质质量浓度(y)构建线性回归方程。金线莲苷线性回归方程为: $y=1\text{E}+06x-126\,593$, $R^2=0.999$,线性范围为0.10~1.25 g·L⁻¹;斑叶兰线性回归方程为: $y=591\,928x-118\,70$, $R^2=0.993$,线性范围为0.02~0.16 g·L⁻¹。

1.2.2 生长素、脱落酸和水杨酸测定方法 准确称取样品粉末0.2 g,加1 mL体积分数为90%的甲醇,超声提取30 min,称量,用90%甲醇补足损失的溶剂,5 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液用0.22 μm滤膜过滤,每个样品重复3次。利用岛津高效液相色谱仪,采用C₁₈色谱柱,以体积分数为0.05%的甲酸水溶液(A)-0.05%的甲酸乙腈(B)为流动相梯度洗脱(B: 0~1.5 min, 10%→5%; 1.5~24.0 min, 5%→95%; 24.0~27.0 min, 95%→95%; 27.0~27.3 min, 95%→5%; 27.3~36.0 min, 5%→10%),柱温为30 ℃,流速为0.6 mL·min⁻¹,进样量为10 μL,IAA、ABA和SA检测波长分别为254、254和304 nm。以峰面积(x)和物质质量浓度(y)构建线性回归方程。IAA线性回归方程为: $y=15\,492\,788.47x+137.74$, $R^2=0.999$,线性范围为0.000 1~0.010 0 g·L⁻¹; ABA线性回归方程为: $y=87\,093\,692.12x-536.04$, $R^2=0.999$,线性范围为0.000 1~0.010 0 g·L⁻¹; SA线性回归方程为: $y=20\,994\,444.05x+10.92$, $R^2=0.999$,线性范围为0.000 1~0.010 0 g·L⁻¹。

1.3 统计学分析

金线莲苷及其差向异构体、IAA、ABA、SA质量分数(鲜质量)用平均值±标准差表示,利用SPSS 22.0分析样品间的差异显著性,所有样品重复3次。

2 结果与分析

2.1 金线兰中金线莲苷及其差向异构体质量分数及积累模式分析

如表 1 和图 1 所示：4 个品系金线兰中金线莲苷质量分数为 2.84~3.81 mg·g⁻¹，‘大叶’品系中金线莲苷质量分数最高，‘红霞’品系中金线莲苷质量分数最低，‘大叶’品系金线莲苷质量分数显著高于‘尖叶’‘红霞’品系 ($P<0.05$)，与‘小叶’品系无显著差异；4 个品系根、茎和叶中金线莲苷质量分数分别为 1.35~1.62、2.27~3.72 和 3.69~5.34 mg·g⁻¹，叶中金线莲苷质量分数最高，茎中次之，根中最低，并且金线兰地上部分金线莲苷质量分数远高于根；4 个品系金线兰中金线莲苷差向异构体质量分数极低 (0.14~0.50 mg·g⁻¹)，并且特异性地积累于根部，在金线兰的地上部分中没有检测到金线莲苷差向异构体。分别以‘尖叶’和‘红霞’品系茎段为外植体诱导类原球茎，‘尖叶’品系类原球茎中金线莲苷质量分数 (4.25 mg·g⁻¹) 高于全草，并且没有检测到金线莲苷差向异构体；‘红霞’品系类原球茎中金线莲苷质量分数为 2.56 mg·g⁻¹，金线莲苷差向异构体质量分数为 0.52 mg·g⁻¹。上述结果表明金线兰地上部分、‘尖叶’类原球茎有望用作低成本、高质量工业化生产金线莲苷的药源。

表 1 金线兰中金线莲苷及其差向异构体质量分数

品系	金线莲苷/(mg·g ⁻¹)					斑叶兰苷/(mg·g ⁻¹)				
	全株	根	茎	叶	类原球茎	全株	根	茎	叶	类原球茎
‘大叶’	3.81±0.02 a	1.62±0.06 a	3.55±0.04 ab	3.69±0.26 b	\	—	0.24±0.01 d	—	—	\
‘小叶’	3.68±0.13 a	1.35±0.02 c	3.15±0.04 b	4.78±0.37 ab	\	—	0.43±0.01 c	—	—	\
‘红霞’	2.84±0.01 c	1.45±0.07 bc	2.27±0.10 c	5.34±0.68 a	2.56±0.53 b	0.22±0.01	0.50±0.07 a	—	—	0.52±0.13
‘尖叶’	3.47±0.02 b	1.51±0.05 ab	3.72±0.27 a	3.76±0.41 b	4.25±0.46 a	—	0.46±0.14 b	—	—	—

说明：同列不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。“—”表示没有检测到；“\”表示未检测。

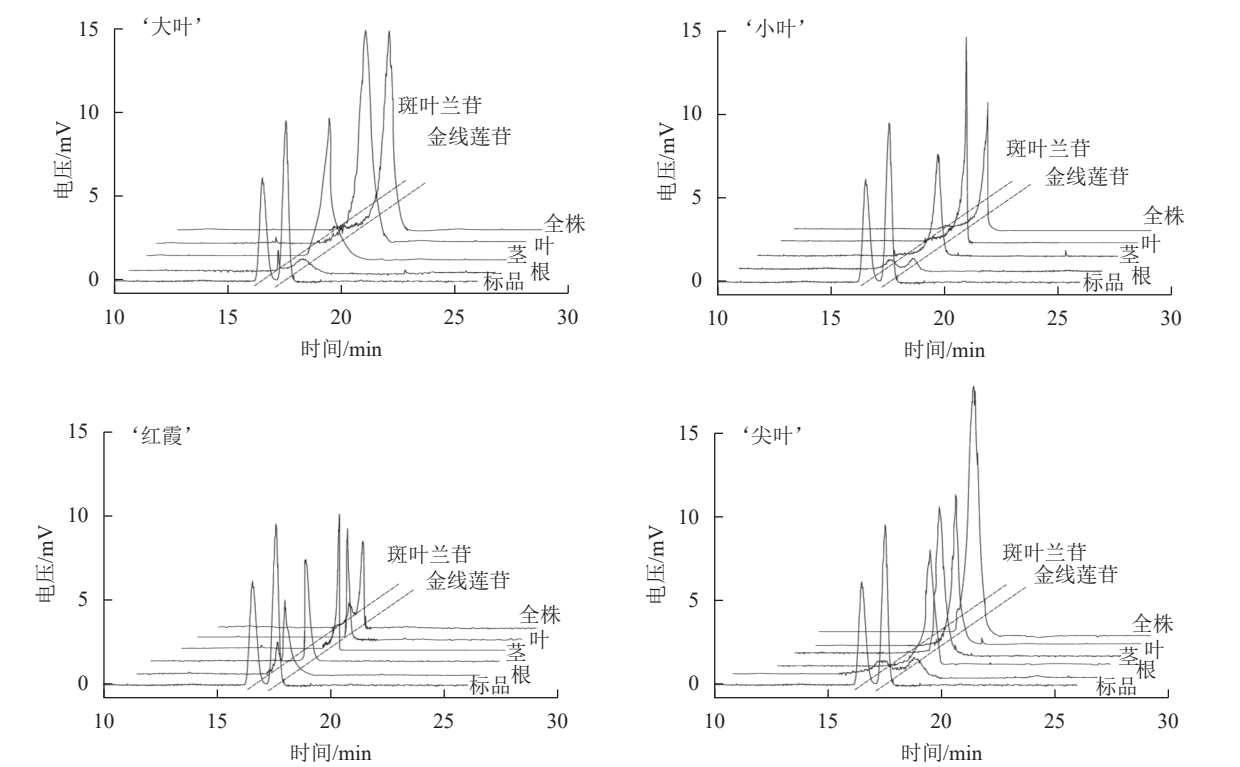


图 1 金线兰 4 个品系中金线莲苷及其差向异构体 HPLC 分析色谱图
Figure 1 HPLC chorographic profiles of kindenoside, goodyeroside A in the 4 cultivars of *A. roxburghii*

2.2 金线兰不同部位叶、茎段中金线莲苷及其差向异构体质量分数及积累模式分析

由表 2 可见：4 个品系金线兰中金线莲苷在不同部位叶中积累模式不同。‘大叶’品系中金线莲苷积累模式为：中间部位叶中金线莲苷质量分数最高，显著高于顶端叶中金线莲苷 ($P<0.05$)，与底部叶中

表 2 金线兰不同部位叶片、茎段中金线莲苷及其差向异构体质量分数

Table 2 Contents of kinsenoside and it's isomer in leaves and stems of in <i>A. roxburghii</i>								
组织 部位	金线莲苷/(mg·g ⁻¹)							
	‘大叶’		‘小叶’		‘红霞’		‘尖叶’	
	叶	茎段	叶	茎段	叶	茎段	叶	茎段
顶端	2.65±0.17 b	4.36±0.37 a	9.74±0.40 a	4.81±0.16 a	2.91±0.09 c	3.44±0.41 a	3.90±0.28 b	3.65±0.30 a
中部	4.14±0.17 a	4.32±0.26 a	6.68±0.05 c	4.71±0.06 a	3.39±0.13 b	2.97±0.16 a	5.33±0.59 a	3.03±0.81 ab
底部	3.71±0.26 a	4.13±0.21 a	8.35±0.03 b	4.55±0.13 a	4.13±0.07 a	2.64±0.33 a	3.10±0.55 b	2.52±0.02 b

说明：未检测到金线莲苷异构体，因此未在表中列出。同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

金线莲苷无显著差异；‘小叶’品系中金线莲苷质量分数积累模式为：顶端叶中金线莲苷质量分数最高，中间部位叶中金线莲苷质量分数最低，顶端叶中金线莲苷质量分数显著高于中部和底部叶 ($P<0.05$)；‘红霞’品系中金线莲苷质量分数积累模式为：金线莲苷质量分数随着叶位置降低而逐渐升高，底部叶片中金线莲苷质量分数显著高于中部和顶部叶 ($P<0.05$)；‘尖叶’品系中金线莲苷积累模式为：中间部位叶中金线莲苷质量分数最高，显著高于顶端和底部叶中金线莲苷质量分数 ($P<0.05$)。在所有叶中没有检测到金线莲苷差向异构体。

金线兰不同部位茎段中，‘大叶’‘小叶’‘红霞’‘尖叶’品系中金线莲苷质量分数分别为 4.13~4.36, 4.55~4.81, 2.64~3.44 和 2.52~3.65 mg·g⁻¹，表现为顶端茎段中金线莲苷质量分数最高，中间部位茎段中金线莲苷质量分数次之，底部茎段中金线莲苷质量分数最低，呈现极性积累模式，且在不同部位茎段中金线莲苷质量分数均无显著差异。在所有茎段中没有检测到金线莲苷差向异构体。上述研究结果进一步证实，金线兰地上部分可以作为工业化生产金线莲苷的优质药源。

2.3 茎段不同部位中内源生长素、脱落酸、水杨酸质量分数及其与金线莲苷积累模式的相关性分析

如表 3 所示：‘大叶’‘小叶’‘红霞’‘尖叶’品系茎段中 ABA 质量分数分别为 0.020~0.030、0.002~0.005、0.002~0.003 和 0.010~0.012 mg·g⁻¹，SA 质量分数分别为 0.009~0.013、0.085~0.107、0.074~0.108、0.001~0.005 mg·g⁻¹，IAA 质量分数分别为 0.020~0.030、0.120~0.140、0.010~0.030 和 0.003~0.006 mg·g⁻¹。在所有品系中，顶端茎段中 IAA 质量分数最高，中间部位茎段中 IAA 质量分数次之，底部茎段中 IAA 质量分数最低，IAA 积累模式与金线莲苷积累模式相似，相关性系数为 0.874~0.937 ($P<0.01$)(图 2 I)；ABA 在 4 个品系茎段中积累模式有所不同，在‘大叶’品系中，底部茎段中 ABA 质量分数显著高于中部茎段中 ABA 质量分数 ($P<0.05$)，与顶端茎段中 ABA 质量分数无显著差异；在‘尖叶’品系茎段中 ABA 质量分数无显著差异；在‘小叶’‘红霞’品系茎段中与金线莲苷积累模式一致，相关性系数分别为 0.835、0.898 ($P<0.01$)(图 2 II)；SA 在 4 个品系茎段中积累模式有所不同，在‘大叶’品系中，底部茎段中 ABA 质量分数显著高于顶端茎段中 ABA 质量分数 ($P<0.05$)，与中部茎段中 ABA 质量分数无显著差异；在‘小叶’‘红霞’‘尖叶’品系茎段中与金线莲苷积累模式一致，相关性系数分别为 0.958、0.895、0.838 ($P<0.01$)(图 2 III)。上述结果表明：在所研究的金线兰中金线莲苷与内源 IAA 积累模式相关性不受品种基因型影响，金线莲苷与 ABA 和 SA 积累模式相关性一定程度受品种基因型影响。

表 3 金线兰茎段中 IAA、ABA、SA 质量分数分布模式

		Table 3 Content distribution of IAA, ABA and SA in stems of <i>A. roxburghii</i>											
茎段不 同部位		IAA/(mg·g ⁻¹)				ABA/(mg·g ⁻¹)				SA/(mg·g ⁻¹)			
		‘大叶’	‘小叶’	‘红霞’	‘尖叶’	‘大叶’	‘小叶’	‘红霞’	‘尖叶’	‘大叶’	‘小叶’	‘红霞’	‘尖叶’
顶端		0.027±	0.142±	0.032±	0.006±	0.022±	0.005±	0.003±	0.012±	0.009±	0.107±	0.108±	0.005±
		0.003 a	0.005 a	0.003 a	0.001 a	0.003 ab	0.001 a	0.001 a	0.001 a	0.002 b	0.008 a	0.005 a	0.001 a
中部		0.026±	0.133±	0.020±	0.005±	0.019±	0.003±	0.003±	0.013±	0.011±	0.098±	0.098±	0.004±
		0.004 a	0.008 ab	0.003 b	0.001 a	0.001 b	0.001 b	0.001 a	0.001 a	0.001 ab	0.006 ab	0.007 a	0.001 b
底部		0.025±	0.122±	0.015±	0.003±	0.024±	0.002±	0.002±	0.010±	0.013±	0.085±	0.074±	0.001±
		0.004 a	0.011 b	0.001 b	0.001 b	0.003 a	0.001 b	0.001 a	0.001 a	0.001 a	0.005 b	0.005b	0.000 c

说明：同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

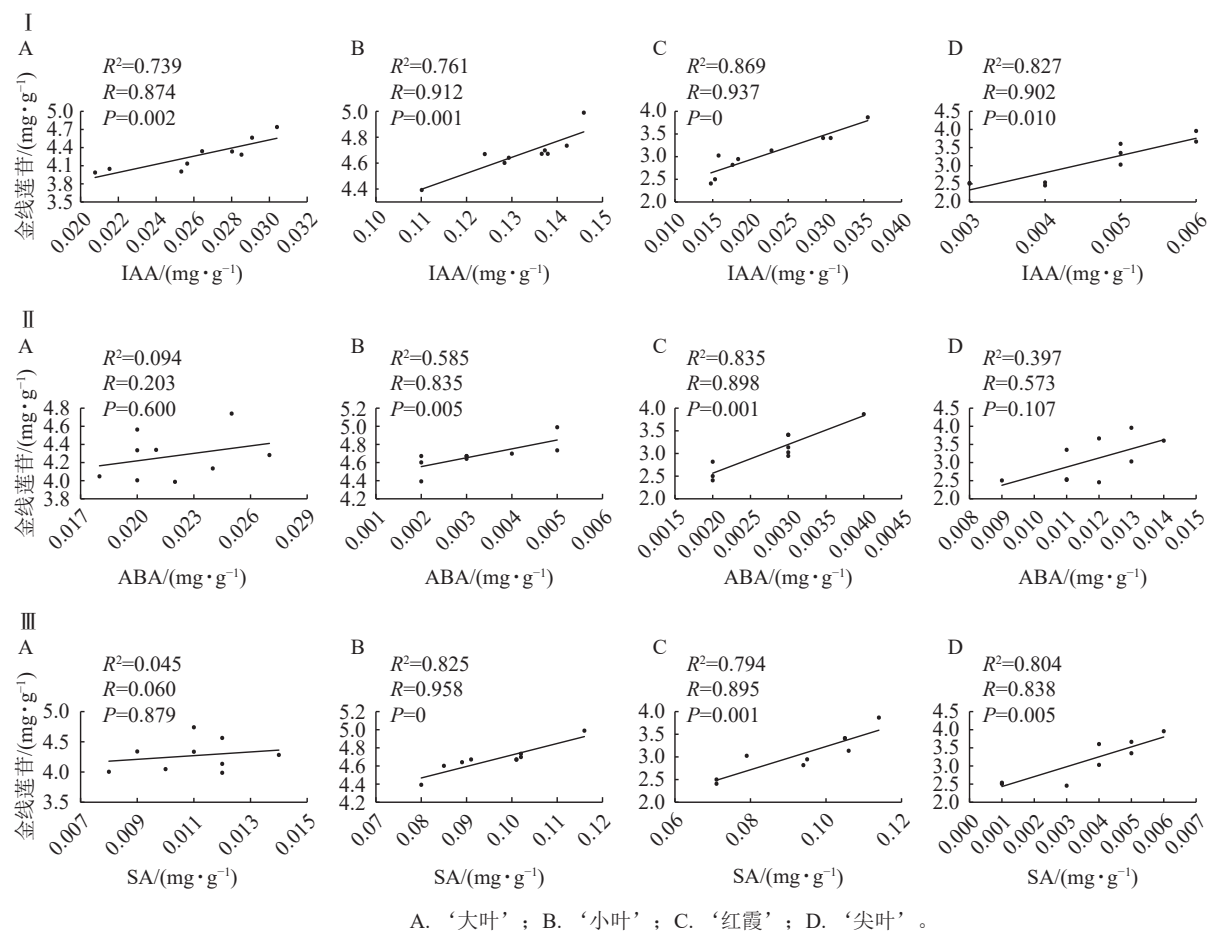


图 2 金线兰茎段不同部位中金线莲苷与内源激素质量分数相关性分析
Figure 2 Correlation between endogenous hormones and kinsenoside in different stems' parts of *A. roxburghii*

2.4 TIBA 处理对内源 IAA 及金线莲苷积累模式影响

由表 4 可见：喷施 TIBA 1 d 后，不同部位 IAA 及金线莲苷质量分数均有少量下降，但积累模式无变化，顶端茎段中 IAA 和金线莲苷质量分数显著高于中部和底部 ($P<0.05$)；喷施 TIBA 2 d 后，IAA 和金线莲苷积累模式发生变化，中部和底部 IAA 质量分数显著高于顶部 ($P<0.05$)，中部金线莲苷质量分数与底部无显著差异，两者均显著高于顶部 ($P<0.05$)；喷施 TIBA 3 d 后，中部 IAA 质量分数显著高于顶端和底部 ($P<0.05$)，金线莲苷在中部最高，但与其他部位差异不显著。喷施 TIBA 4~5 d 后，顶端 IAA 和金线莲苷质量分数均显著高于中部和底部 ($P<0.05$)。喷施 TIBA 后，顶端 IAA 质量分数在处理第 4 天达到最高，显著高于其他天数 ($P<0.05$)，中部 IAA 质量分数在处理第 3 天达到最高，底部 IAA 质量分数在第 2 天达到最高，且显著高于其他天数 ($P<0.05$)；顶端金线莲苷质量分数在处理第 4 天达到最高，与第 5 天无显著差异，并显著高于其他天数 ($P<0.05$)，中部金线莲苷质量分数在处理第 2 天

表 4 生长素抑制剂处理前后茎段中 IAA 和金线莲苷质量分数的变化

Table 4 Contents of endogenous IAA and kinsenoside before and after TIBA treatment												
茎段不同部位	IAA/(mg·g ⁻¹)						金线莲苷/(mg·g ⁻¹)					
	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5 d
顶端	0.006±0.001 Ba	0.005±0.001 CDa	0.004±0.000 Cb	0.003±0.001 Eb	0.008±0.001 Aa	0.005±0.000 BCa	3.65±0.30 Ba	3.58±0.07 Ba	2.77±0.27 Cb	2.87±0.09 Ca	4.21±0.01 Aa	3.98±0.07 Aa
	0.005±0.001 ABa	0.003±0.000 Bb	0.006±0.001 ABa	0.007±0.002 Aa	0.004±0.003 Bb	0.003±0.000 Bb	0.81±0.34 Bab	0.71±0.34 Bb	0.28±0.28 Aa	0.34±0.34 ABa	0.43±0.43 ABb	0.24±0.24 Bb
中部	0.003±0.001 Bb	0.002±0.001 Bc	0.006±0.001 Aa	0.003±0.003 Bb	0.003±0.019 Bc	0.003±0.001 Bb	2.52±0.02 Bb	2.52±0.11 Bb	3.89±0.08 Aa	2.87±0.31 Ba	2.87±0.21 Bb	2.77±0.70 Bb

说明：不同大写字母表示同部位同一激素不同处理时间差异显著 ($P<0.05$)；不同小写字母表示相同时间不同部位间差异显著 ($P<0.05$)。

达到最高,底部金线莲苷质量分数也在第2天达到最高,且显著高于其他天数 ($P < 0.05$)。喷施 TIBA 处理前后 IAA 与金线莲苷积累极显著相关 ($R = 0.714$, $P < 0.01$) (图 3)。以上结果说明:喷施 TIBA 改变了内源 IAA 和金线莲苷分布模式,内源 IAA 积累可能调控金线莲苷合成。

3 讨论

本研究利用 HPLC-ELSD 尝试用 NH_2 柱和 T3 色谱柱分离金线莲苷及其差向异构体, NH_2 柱无法分开这 2 种物质。利用 T3 色谱柱,移动相中水的比例为 98%~100%,可以分开金线莲苷及其差向异构体,结果与 WEI 等^[25]报道的结果一致。

金线兰 4 个品系中金线莲苷及其差向异构体质量分数各不相同,说明金线兰品种基因型会影响金线兰中金线莲苷^[18-20]及其差向异构体积累,品种基因型是筛选工业化生产金线莲苷药源要考虑的重要因素。在所研究的金线兰中,金线莲苷主要积累于地上部分,根部含量很低,研究结果与金线莲苷组织特异性表达的报道一致^[26],金线莲苷差向异构体特异性积累于根部,组织部位是影响金线莲苷^[26]及其差向异构体分布模式的另一重要因素。WANG 等^[24]前期研究发现:金线兰类原球茎金线莲苷质量分数低于 3 个月全草(大棚苗),本研究中类原球茎中金线莲苷质量分数高于 5 个月全草(大棚苗),可能的原因是金线兰类原球茎和全草中金线莲苷随着生长发育时期积累模式不同^[22]。类原球茎增殖周期短、增殖快,有望代替金线兰用于工业化生产金线莲苷^[24]。

在所研究的 4 个品系茎段中内源 IAA 与金线莲苷积累模式呈正相关,几乎不受品种基因型影响。茎段中 ABA、SA^[27]与金线莲苷^[20]积累模式在一定程度上受品种基因型影响。内源激素与金线莲苷积累模式正相关说明金线莲苷在金线兰生长防御过程中或发挥一定的作用^[28]。TIBA 处理改变了内源 IAA 和金线莲苷积累模式,这说明内源 IAA 积累拟调控金线莲苷的合成。结果与王林等^[29]、于海涛等^[30]、麦翠珊等^[31]等报道生长素能促进糖苷类物质合成一致。

4 结论

本研究建立金线兰中金线莲苷及其差向异构体质量分数的 HPLC-ELSD 分析方法,测定了全草、根、茎和叶中金线莲苷及其差向异构体质量分数,金线莲苷特异性积累于地上部分,其差向异构体特异性积累于根部,金线兰地上部分可作为工业化生产金线莲苷的药源。‘尖叶’品系类原球茎中不含金线兰苷差向异构体,并且金线莲苷质量分数高于全草,类原球茎有望代替原植物用于工业化生产金线莲苷。TIBA 处理前后,金线兰茎段中内源 IAA 和金线莲苷积累模式正相关,内源 IAA 积累可能调控金线莲苷合成。本研究结果可为金线兰质量评价提供基础数据,为工业化生产金线莲苷药源筛选提供方法和思路。

5 致谢

华中科技大学药学院周渊对本研究进行了指导,浙江农林大学胡润准对金线兰品系进行了鉴定,匿名审稿人仔细审阅了手稿,并提出许多宝贵的意见。谨致谢意。

6 参考文献

- [1] XIANG Ming, LIU Tingting, TAN Wanyue, *et al.* Effects of kinsenoside, a potential immunosuppressive drug for autoimmune hepatitis, on dendritic cells/CD8⁺ T cells communication in mice [J]. *Hepatology*, 2016, 64(6): 2135–2150.
- [2] TANG Tingting, DUAN Xiaoyu, KE Yu, *et al.* Antidiabetic activities of polysaccharides from *Anoectochilus roxburghii* and *Anoectochilus formosanus* in STZ-induced diabetic mice [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 112: 882–888.

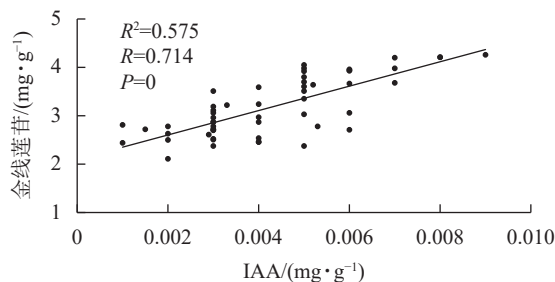


图 3 金线兰经 TIBA 喷施处理前后内源 IAA 和金线莲苷积累相关性分析

Figure 3 Correlation analysis of endogenous IAA and kinsenoside before and after TIBA treatment

- [3] ZHOU Feng, MEI Jingtian, HAN Xiuguo, *et al.* Kinsenoside attenuates osteoarthritis by repolarizing macrophages through inactivating NF- κ B/MAPK signaling and protecting chondrocytes [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2019, **9**(5): 973–985.
- [4] XU Mengjie, SHAO Qingsong, YE Shenyi, *et al.* Simultaneous extraction and identification of phenolic compounds in *Anoectochilus roxburghii* using microwave-assisted extraction combined with UPLC-Q-TOF-MS/MS and their antioxidant activities[J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, **8**: 1474[2024-06-10]. DOI: [10.3389/fpls.2017.01474](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01474).
- [5] 杨晓灵. 金线莲多糖对酒精诱导小鼠肝损伤的保护作用及其颗粒冲剂的研制[D]. 福州: 福建医科大学, 2017.
YANG Xiaoling. *The Protective Effect of ARPS on the Alcoholic Liver Injury Mice and ARPS Granule Prepared* [D]. Fuzhou: Fujian Medical University, 2017.
- [6] MING Jiaxiong, XU Qianqian, GAO Limin, *et al.* Kinsenoside alleviates 17 α -ethinylestradiol-induced cholestatic liver injury in rats by inhibiting inflammatory responses and regulating FXR-mediated bile acid homeostasis[J/OL]. *Pharmaceuticals*, 2021, **14**(5): 452[2024-06-10]. DOI: [10.3390/ph14050452](https://doi.org/10.3390/ph14050452).
- [7] TAO Yi, YANG Ying, ZHU Fei, *et al.* Serum metabolome profiling, network pharmacology analysis, and experimental validation of *Anoectochilus roxburghii* in the treatment of carbon tetrachloride-induced liver injury[J]. *Biomedical Chromatography*, 2023, **37**(10): e5706[2024-06-10]. DOI: [10.1002/bmc.5006](https://doi.org/10.1002/bmc.5006).
- [8] 陈玮, 吴仕明, 林恢, 等. 金线莲联合恩替卡韦治疗湿热型 HBsAg 阳性慢性乙型肝炎 31 例[J]. 福建中医药, 2020, **51**(4): 74–75.
CHEN Wei, WU Shiming, LIN Hui, *et al.* *Anoectochilus roxburghii* combined with entecavir in the treatment of 31 cases of damp-heat HBsAg positive chronic hepatitis B[J]. *Fujian Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2020, **51**(4): 74–75.
- [9] 刘婷婷. 金线莲苷靶向树突状细胞与 CD8⁺T 细胞的相互作用抗自身免疫性肝炎作用机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2017.
LIU Tingting. *Effects of Kinsenoside, a Potential Immunosuppressive Drug for Autoimmune Hepatitis, on Dendritic Cells/CD8⁺T cells Communication* [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2017.
- [10] 李叶, 祁克明, 卢伟, 等. 基于代谢组学和网络药理学分析福建金线莲叶和台湾银线兰叶治疗肝纤维化作用差异[J]. 中国现代应用药学, 2022, **39**(23): 3092–3102.
LI Ye, QI Keming, LU Wei, *et al.* Exploring the difference in mechanism of action of *Anoectochilus roxburghii* leaves and *Anoectochilus formosanus* leaves in the treatment of liver fibrosis based on integrative metabolomics and network pharmacology [J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2022, **39**(23): 3092–3102.
- [11] 宋薇. 新型 PTP1B 抑制剂金线莲苷衍生物的设计、合成和生物活性评价[D]. 济南: 山东大学, 2019.
SONG Wei. *Design, Synthesis and Biological Activity Evaluation of Anoectoside Derivatives as a New PTP1B Inhibitor*[D]. Jinan: Shandong University, 2019.
- [12] 王建栋, 王红珍, 张爱莲, 等. 金线莲苷研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2015, **35**(19): 1795–1798, 1802.
WANG Jiandong, WANG Hongzhen, ZHANG Ailian, *et al.* Recent advances in kinsenoside studies [J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2015, **35**(19): 1795–1798, 1802.
- [13] 高立敏. 金线莲苷对酒精性脂肪肝和肝纤维化的保护作用及机制探索[D]. 武汉: 华中科技大学, 2022.
GAO Limin. *Protective Effect and Mechanism of Anoectochilin on Alcoholic Fatty Liver and Liver Fibrosis*[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2022.
- [14] 陈星宇. 金线莲苷减轻酒精联合四氯化碳所致肾损伤的作用及机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2021.
CHEN Xingyu. *Effect and Mechanism of Kinesenoside on Renal Injury Induced by Alcohol Combined with Carbon Tetrachloride*[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2021.
- [15] 安彦峰, 张雅琼, 冯德强. 金线莲药理和临床研究进展[J]. 中国现代中药, 2014, **16**(8): 685–687.
AN Yanfeng, ZHANG Yaqiong, FENG Deqiang. Pharmacological effects and clinical use advances of *Anoectochilus roxburghii* [J]. *Modern Chinese Medicine*, 2014, **16**(8): 685–687.
- [16] QIAO Nan, AN Zhaohong, FU Zeyu, *et al.* Kinsenoside alleviates oxidative stress-induced blood-brain barrier dysfunction via promoting Nrf2/HO-1 pathway in ischemic stroke[J/OL]. *European Journal of Pharmacology*, 2023, **949**: 175717[2024-06-10]. DOI: [10.1016/j.ejphar.2023.175717](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175717).
- [17] ZHANG Feng, HAN Bei, LI Peng, *et al.* Design, synthesis and hepatoprotective activity of analogs of the natural product goodyeroside A [J]. *Molecules*, 2013, **18**(2): 1933–1948.

- [18] 朱建军, 黄雨佳, 金建红, 等. 不同栽培基质对金线莲 3 种基原植物生长及其活性成分含量的影响[J]. 中国中药杂志, 2019, **44**(12): 2467–2471.
ZHU Jianjun, HUANG Yujia, JIN Jianhong, *et al.* Effect of cultivation substrate on growth and active component contents of *Anoectochilus roxburghii* from three different origins [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2019, **44**(12): 2467–2471.
- [19] 张超, 吴建国, 易骏, 等. HPLC-ELSD 法测定三种植物基原金线莲的金线莲苷含量[J]. 食品工业科技, 2017, **38**(2): 75–78.
ZHANG Chao, WU Jianguo, YI Jun, *et al.* Content determination of kinsenoside in Jin-Xian-Lian from three *Anoectochilus* species by HPLC-ELSD [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, **38**(2): 75–78.
- [20] 陈莹, 王文义, 湛赛男, 等. 不同品系及生长期金线莲的金线莲苷含量变化研究[J]. 中国现代中药, 2021, **23**(8): 1423–1429.
CHEN Ying, WANG Wenyi, CHEN Sainan, *et al.* Changes in kinsenoside content of different strains of *Anoectochilus roxburghii* at different growth periods [J]. *Modern Chinese Medicine*, 2021, **23**(8): 1423–1429.
- [21] 张闻婷, 杨旻静, 梅瑜, 等. 金线莲苷的研究现状[J]. 天然产物研究与开发, 2024, **36**(2): 348–356, 367.
ZHANG Wenting, YANG Minjing, MEI Yu, *et al.* Research status of kinsenoside [J]. *Natural Product Research and Development*, 2024, **36**(2): 348–356, 367.
- [22] 杨彬彬. 金线莲的水溶性化学成分及质量控制研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2018.
YANG Binbin. *Studies on the Water-soluble Chemical Constituents and Quality Control of Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl [D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2018.
- [23] ZHANG Liping, YAN Peng, SHEN Chen, *et al.* Effects of exogenous TIBA on dwarfing, shoot branching and yield of tea plant (*Camellia sinensis* L.) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2017, **225**: 676–680.
- [24] WANG Hongzhen, CHEN Xinying, YAN Xiaoyun, *et al.* Induction, proliferation, regeneration and kinsenoside and flavonoid content analysis of the *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl protocorm-like body [J]. *Plants*, 2022, **11**(19): 2465 [2021-06-10]. DOI: [10.3390/plants11192465](https://doi.org/10.3390/plants11192465).
- [25] WEI Mi, CHEN Xuemin, YI Liwen, *et al.* Detecting kinsenoside from *Anoectochilus roxburghii* by HPLC-ELSD with dual columns of NH(2) and AQ-C(18) [J]. *Phytochemical Analysis*, 2020, **31**(6): 700–710.
- [26] 石瑶. 金线莲中 Kinsenoside 的代谢分布及生物合成初探[D]. 武汉: 华中科技大学, 2021.
SHI Yao. *Metabolic Distribution and Preliminary Biosynthetic Research of Kinsenoside from Anoectochilus roxburghii* [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2021.
- [27] 程琴, 谭秦亮, 李佳慧, 等. 不同宿根年限甘蔗品种内源激素及酶活性分析[J]. 作物杂志, 2022(3): 181–186.
CHENG Qin, TAN Qinliang, LI Jiahui, *et al.* Endogenous hormones and enzyme activity analysis in sugarcane varieties with different perennial root ages [J]. *Crops*, 2022(3): 181–186.
- [28] 袁媛, 郑汉, 黄璐琦. 再论道地药材“优形、优质、优效”特征成因及研究模式[J]. 中国中药杂志, 2024, **49**(15): 3977–3985.
YUAN Yuan, ZHENG Han, HUANG Luqi. Review of contributing factors and research model of “excellent shape, high quality, and superior effect” of Dao-di herbs [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2024, **49**(15): 3977–3985.
- [29] 王林, 朱金峰, 许自成. 烤烟打顶后喷施外源激素对中部烟叶品质的互作效应[J]. 核农学报, 2016, **30**(12): 2411–2417.
WANG Lin, ZHU Jinfeng, XU Zicheng. Interactive effects of exogenous hormone on quality of middle leaves among flue-cured tobacco after the time of topping [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2016, **30**(12): 2411–2417.
- [30] 于海涛, 霍俊伟, 吕其涛, 等. 植物激素对果实花青苷合成的影响[J]. 北方园艺, 2003(4): 56–57.
YU Haitao, HUO Junwei, LÜ Qitao, *et al.* Effects of plant hormones on anthocyanin synthesis in fruit [J]. *Northern Horticulture*, 2003(4): 56–57.
- [31] 麦翠珊, 李方剑, 邓雅茹, 等. 高等植物糖信号转导研究进展[J]. 植物生理学报, 2023, **59**(8): 1474–1488.
MAI Cuishan, LI Fangjian, DENG Yaru, *et al.* Recent advances in sugar signal transduction in higher plants [J]. *Plant Physiology Journal*, 2023, **59**(8): 1474–1488.