

基于 UPLC-MS 技术分析铁皮石斛炮制前后糖类成分差异

陈志琳^{1,2}, 赵颖^{2,3}, 李玮^{1*}, 杨立新^{2,3*}

1. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025

2. 中国科学院昆明植物研究所 植物医生研发中心, 云南 昆明 650201

3. 云南省生物多样性和传统知识研究会, 云南 昆明 650034

摘要: 目的 研究铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 鲜条及其炮制品中糖类化合物, 探讨铁皮石斛炮制前后对糖类化合物积累的影响, 为铁皮石斛炮制工艺提供基础研究。方法 采用超高效液相色谱-串联高分辨质谱 (UPLC-MS) 非靶向技术对铁皮石斛鲜条及其炮制品代谢物质进行检测, 使用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘判别分析法 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 鉴定代谢物中糖类化合物的差异代谢物。结果 共鉴定 76 个糖类化合物, 61 个糖类化合物在西枫斗中上调积累。其中麦芽五糖和麦芽六糖炮制前后差异倍数达 30 倍, 15 个糖类化合物及其团聚体下调积累, 炮制前后下调的差异倍数幅度较小。结论 炮制明显提升铁皮石斛炮制品西枫斗中代谢物的积累, 研究结果为西枫斗炮制的深入研究提供理论基础。

关键词: 铁皮石斛; 西枫斗; 炮制方法; UPLC-MS; 糖类化合物

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)13-4321-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.13.025

UPLC-MS metabonomics technology revealing difference of carbohydrate in *Dendrobium officinale* under different processing methods

CHEN Zhi-lin^{1,2}, ZHAO Ying^{2,3}, LI wei¹, YANG Li-xin^{2,3}

1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. Bio-Innovation Center of DR PLANT, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China

3. Center of Biodiversity and Indigenous Knowledge, Kunming 650034, China

Abstract: Objective To study the sugar compounds in raw *Dendrobium officinale* and its processed products, to explore the effect of *D. officinale* on the accumulation of sugar compounds before and after processing, and to provide preliminary applied basic research for the processing technology of *D. officinale*. Xifengdou. **Methods** High liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS) non-targeted technology was used to detect the metabolites of *D. officinale* and its processed products. Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial minimum Orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) was used to identify differential metabolites of carbohydrates in metabolites. **Results** A total of 76 carbohydrates were identified, and 61 carbohydrates were up-regulated and accumulated in Xifengdou. Among them, maltopentaose and maltohexaose had a 30-fold difference before and after processing, and 15 sugar compounds and their aggregates were down-regulated and accumulated, and the difference in the fold before and after processing was small. **Conclusion** Processing significantly increases the accumulation of metabolites in Xifengdou, a processed *D. officinale* product. The research results provide a theoretical basis for the in-depth study of Xifengdou concoction.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; UPLC-MS; Xifengdou; carbohydrate compounds

收稿日期: 2022-12-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31970357); 植物医生项目 (Y8570842C1); 中国科学院东南亚生物多样性研究中心 (2015CASEABRIRG001); Southeast Asia Biodiversity Research Institute, Chinese Academy of Sciences (Grant Nos. 2015CASE-ABRIRG001, Y4ZK111B01)

作者简介: 陈志琳, 在读硕士, 主要从事中药炮制与中药材产地加工研究。E-mail: 1427882883@qq.com

*通信作者: 杨立新, 高级工程师, 主要从事民族植物学研究。E-mail: rattan@mail.kib.ac.cn

李玮, 教授, 主要从事中药民族药产地加工与炮制研究。E-mail: 3304676447@qq.com

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 为兰科植物铁皮石斛的干燥茎，始载于《神农本草经》且位列上品，《道藏》尊其为“中华九大仙草”之首，作为一味珍稀名贵中药而备受瞩目。具有益胃生津、滋阴清热的功效，用于热病津伤、口干烦渴、胃阴不足等症^[1]。现代研究表明铁皮石斛含有多糖、萜类及其衍生物、酚类、黄酮、氨基酸^[2-5]等多类药效活性成分。具有增强免疫力、抗氧化、降血糖、抗癌、降血压等多方面药理作用^[6-11]。作为药食同源及珍稀名贵植物，具有很高的药用价值，在医学辅助治疗、保健营养品乃至药物原料均具有很高的应用价值。

云南是石斛原产地之一，广南铁皮石斛“西枫斗”驰名中外，“枫斗”据《本草纲目拾遗》记载至今已 200 多年历史。由于新鲜的石斛不能长久保存，通过炮制将新鲜石斛炮制成枫斗后不易霉烂、虫蛀和变质，同时由于石斛类植物的茎多含有黏液成分，炮制成枫斗后其黏液成分被固化而稳定，使有效成分不易分解^[12]。本研究采用的西枫斗为广南县壮族手工制作，主要分为以下 6 个步骤：（1）经分类成 3 个等级；（2）炒草：用猛火炒、反复搓揉去皮后晾置 2~3 d，让其回软有韧性；（3）分段：剪为 3~5 cm 的长段；（4）绕圈，温火烤软，扭制绕圈第一步定形，冷却，再温火烘烤、再搓揉去皮、巩固绕圈，反复 3 次可完全定形；（5）修剪：剪弃毛边、棱角；（6）烤干：温火慢烤至干透方成。整个过程一般需要一周时间，火温的控制是制作优质西枫斗的关键，如火温、烤制时间掌握不当，便会出现“死草”，不能绕圈定形。

糖类化合物是最丰富的天然产物。除了在新陈代谢和构造方面的作用，它们是每个细胞表面的基本成分，参与了重要的细胞识别过程^[13]。铁皮石斛中富含丰富的糖类物质，这些糖类物质与苷元结合发挥更多的生物活性^[14]。铁皮石斛多糖（*D. officinale* polysaccharide, DOP）为其主要的活性成分，也是其中含量最高的物质，主要包括葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、鼠李糖、甘露糖及微量果糖，多糖是铁皮石斛抗氧化、清除自由基等药理作用的主要成分，经研究发现，石斛多糖含量越高，质量越重，咀嚼越粘稠，则药性价值也就越好，种质更加优质^[15-17]。品种、生长期、部位、产地、炮制等均会影响多糖含量^[18]。铁皮石斛在民族民间传统炮制西枫斗的手工艺，亦是影响其质量的重要

因素^[19]。然而，对铁皮石斛炮制前后代谢物的变化规律及其相关药理活性之间的关系鲜有研究。

目前对铁皮石斛药材的研究主要集中于化学成分、药理作用和资源研究方面，对于不同炮制方法的研究主要集中于主要成分含量变化，亦有指纹图谱研究，紫外谱线组鉴别等，而西枫斗的研究鲜有报道。本实验采用高效液相色谱串联质谱（UPLC-MS）结合植物非靶向代谢组学技术整体表征铁皮石斛鲜条及其炮制品西枫斗中糖类化合物差异性。为发掘铁皮石斛炮制前后代谢物的变化与相关药理活性之间的潜在规律，阐明铁皮石斛炮制过程中的主要糖类化合物物质变化，为铁皮石斛炮制方法提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

样品采自我国西南部云南省文山州广南县，西枫斗为同一批次铁皮石斛药材炮制品。样品由中国科学院昆明植物研究所杨立新教授鉴定为铁皮石斛 *D. officinale* Kimura et Migo 鲜条。模式标本保存于昆明植物标本馆。

1.2 仪器

Dionex U3000 型高效液相色谱仪（赛默飞世尔科技公司），QE 型高分辨质谱仪（赛默飞世尔科技公司），ACQUITY UPLC HSS T3 型色谱柱（100 mm×2.1 mm, 1.8 μm, Waters 公司）。主要试剂包括甲醇、甲酸、水、乙腈均购自 Thermo 公司，L-2-氯苯丙氨酸购自上海恒创生物科技有限公司。所有化学药品和溶剂均为分析纯或色谱级。

2 方法

2.1 样品制备

选择同样大小的样本，液氮下研碎，均匀混合，鲜品和炮制品均 4 次生物学重复，共 8 个样品。此外，铁皮石斛鲜条及其炮制品样品等量混合成质控样本，共 3 个重复，用于检测仪器的重复性和精确度。用于分析的铁皮石斛鲜条和西枫斗分别为 80 mg，转入 1.5 mL 微离心管，加入 2 个小钢球。然后，将 20 μL 的 L-2-氯苯丙氨酸（0.3 mg/mL 甲醇）加入 1.0 mL 的甲醇-水 7:3 中作为内标。冷冻 2 min 至 -20 °C，60 Hz 研磨 2 min，冰水浴超声提取 30 min，-20 °C 培养 20 min，4 °C，13 000 r/min 离心 10 min。用玻璃注射器收集上清液 150 μL，用微过滤器（0.22 μm）滤过上清液，备用。

2.2 液相色谱-质谱分析条件

2.2.1 色谱条件: ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱; 柱温为 40 °C; 流动相为 A-水 (含 0.1% 甲酸), B-乙腈 (含 0.1% 甲酸); 体积流量 0.35 mL/min; 进样体积为 5 μL; 梯度为 0~1 min, 95% A; 1.0~2.5 min, 95%~70% A; 2.5~6.0 min, 70%~50% A; 6~7 min, 50%~30% A; 7~10 min, 30%~20% A; 10~12 min, 20%~0% A; 12~14.2 min, 100% B; 14.2~16 min, 95% A。

2.2.2 采用正负离子模式检测 雾化气体为高纯度 (N₂), 喷涂电压 3800 V, 毛细管温度 320 °C, 辅助燃气加热器温度 350 °C, 质量范围 m/z 100~1200。MS 扫描的分辨率为 70 000, 高能碰撞解离 (HCD) MS/MS 扫描的分辨率为 17 500, 碰撞能量分别为 10、20 和 40 eV。

2.3 数据处理

Progenesis QI V2.3 (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK) 软件进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐和归一化, 每个色谱峰的峰面积代表对应物质的相对含量, 导出数据矩阵。利用三重四级杆质谱的多反应监测模式 (MRM) 将获得的二级质谱数据与数据库进行比对, 对化合物进行定性、定量分析。使用数据库包括迈维公司自建 MWDB、MassBank、HMDB 等数据库。R 软件 ropls 包对数据矩阵进行 PCA 和 OPLS-DA、PLS-DA 分析, 鉴定差异性代谢产物。使用 R 软件 pheatmap 包进行聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA), 以表征不同样本代谢物的积累模式。

3 结果与分析

3.1 铁皮石斛炮制前后糖类化合物的鉴定

根据设定的液相色谱质谱条件, 取供试品溶液进行分析。UPLC-MS 首先以正、负离子模式对混样质控 QC 样品进行检测, 质控样本 TIC 曲线重叠性高、质谱峰保留时间和强度一致, 表明所建方法可靠、仪器稳定性较好 (图 1)。所获得的代谢物高分辨二级质谱数据经与公共数据库比对, 从铁皮石斛鲜品和炮制品中共鉴定 76 个糖类化合物。从表 1 中差异倍数可以看出, 西枫斗样品中有 61 个糖类化合物上调高积累, 而有 15 个糖类化合物下调积累。其中, 在上调的糖类化合物中, 西枫斗中有 52 个糖类化合物的差异倍数至少是铁皮石斛鲜条的 2 倍, 尤其是麦芽五糖和麦芽六糖的差异倍数炮制前后达 30 倍。在下调的糖类化合物中, 2-磷芒果苷和花青素。3-(6-咖啡基

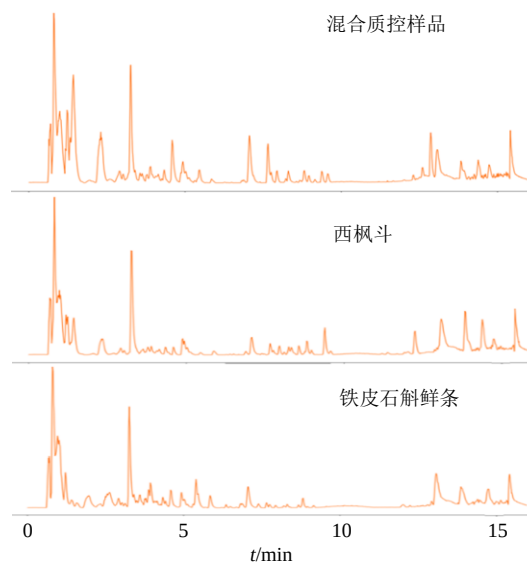


图 1 铁皮石斛糖类化合物正离子模式总离子图

Fig. 1 Total ion map of carbohydrate from *D. officina* under positive ion mode

葡萄糖苷)-5-葡萄糖苷、苄基 O-[阿拉伯呋喃磺基-(1→6)-葡萄糖苷]、1-O-E-肉桂基-(6-阿拉伯糖基)、5a,6a-环氧-7e-megastigmen-3b,9e-二醇 9-葡萄糖苷西枫斗的差异倍数比铁皮石斛鲜条平均降低 3 倍, 有 15 个糖类化合物的差异倍数是铁皮石斛鲜条的 2 倍以下。以上结果显示, 铁皮石斛炮制前后糖类化合物的积累有显著性差异

3.2 PCA 和代谢物积累模式分析

代谢组数据经标准化处理后进行 PCA 分析, 前 2 个主成分特征值 > 1, 模型累积解释率 R^2_X 为 0.83。一般认为 R^2_X 大于 0.5, 表示模型可靠, 值越大越能反映样本间的差异。PCA 得分图 (图 2-A), 表明各组样本分布于不同区域, 所建立方法可良好表征炮制前后代谢物的差异性。变量载荷图显示几种物质位于坐标边缘 (图 2-B), 表明这些物质在组间样本中差异明显 (有较大/较小的极端值等), 它们对排序空间和样本差异的贡献较大, 是潜在的重要标志性代谢物。其中, 差异较大的代谢物包括了糖类化合物, 例如, D-红血球-D-半乳糖-辛糖醇、麦芽五糖、麦芽六糖、(E)-2-O-肉桂酰-β-D-吡喃葡萄糖、(8S,8S)-海杉醇 9-木糖苷、乙基香草醛糖苷、1-(3-甲基-2-丁烯基)-6-无糖基葡萄糖、3-呋喃甲醇葡萄糖苷、乙酯-D-吡喃葡萄糖苷、呋喃醇 4-葡萄糖苷等。此外, 聚类分析显示 (图 2-C), 不同组间代谢物积累模式存在明显的差异, 同一组的样本代谢物积累趋势较为一致且高度聚合为一支。

表 1 铁皮石斛鲜条和西枫斗糖类差异代谢物

Table 1 Information of different carbohydrate detected in *D. officinale* from different processing methods

代谢物 ID	代谢物	分子式	P 值	差异倍数	活性	文献
HMDB0012254	maltopentaose	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆	0.00	38.71	moisturizing	20
HMDB0012253	maltohexaose	C ₃₆ H ₆₂ O ₃₁	0.00	38.01	moisturizing	20
HMDB00393073	5,5-dihydroxyphenyl 1-O-(6-O-galloyl-β-D-glucopyranoside)	C ₁₉ H ₂₀ O ₁₂	0.00	-0.71	anti-oxidant	21
HMDB0000975	trehalose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	0.00	0.30	moisturizing	22
HMDB0029965	methyl-β-D-glucopyranoside	C ₇ H ₁₄ O ₆	0.00	3.53	anti-inflammatory	23
HMDB0030776	maltol	C ₆ H ₆ O ₃	0.00	4.35	anti-toxicity	24
HMDB0029856	(S)-α-terpinyl glucoside	C ₁₆ H ₂₆ O ₆	0.00	1.20	radical-scavenging activity against (DPPH)	25
HMDB0033150	(4R,5S,7R,11S)-11,12-dihydroxy-1(10)-spir-ovetiven-2-one	C ₂₁ H ₃₄ O ₈	0.00	4.46	surfactants	26
HMDB0038749	osmanthuside B	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₃	0.00	0.57	lipase inhibition	27
HMDB0035165	cinnacsiol A 19-glucoside	C ₂₆ H ₄₀ O ₁₂	0.00	-1.73	anticom plement	28
HMDB0029347	acuminoside	C ₂₁ H ₃₆ O ₁₀	0.03	-0.29	anti-inflammatory, surfactants, detergents	29
HMDB0029968	ethyl-β-D-glucopyranoside	C ₈ H ₁₆ O ₆	0.00	6.40	anti-inflamrmatory	30
HMDB0041024	hydroxytyrosol 1-O-glucoside	C ₁₄ H ₂₀ O ₈	0.00	2.67	anti-oxidant	31
HMDB0036822	(3S,7E,9S)-9-hydroxy-4,7-megastigmadien-3-one 9-glucoside	C ₁₉ H ₃₀ O ₇	0.00	4.06	nutrient, emulsifier, surfactant	32
HMDB0013682	coniferin	C ₁₆ H ₂₂ O ₈	0.00	2.22	N/A	N/A
HMDB0035023	acacetin 7-[apiosyl(1→6)-glucoside]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	0.00	-0.71	N/A	N/A
HMDB0039952	1-(3-methyl-2-butenyl)-6-apiosylglucose	C ₁₆ H ₂₆ O ₁₁	0.00	6.66	N/A	N/A
HMDB0034627	1-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,2-ethanediol 2-O-β-D-glucoside	C ₁₆ H ₂₄ O ₉	0.00	1.94	N/A	N/A
HMDB0033138	methyl salicylate O-[rhamnosyl-(1→6)-glucoside]	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₂	0.00	0.94	N/A	N/A
HMDB0039383	quercetin 7-(rhamnosylglucoside)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	0.00	2.33	N/A	N/A
HMDB0040668	blumenol C glucoside	C ₁₉ H ₃₂ O ₇	0.00	2.55	N/A	N/A
HMDB0036015	mangalkanyl glucoside	C ₂₁ H ₃₈ O ₆	0.00	-9.59	N/A	N/A
HMDB0037682	ethylvanillin glucoside	C ₁₅ H ₂₀ O ₈	0.00	7.33	N/A	N/A
HMDB0034843	acteoside	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	0.00	1.41	N/A	N/A
HMDB0036123	[6]-gingerdial 5-O-β-D-glucopyranoside	C ₂₃ H ₃₈ O ₉	0.00	1.06	N/A	N/A
HMDB0038964	3-hydroxy-4,6-heptadiene-1-yl 1-glucoside	C ₁₃ H ₁₈ O ₇	0.00	2.88	N/A	N/A
HMDB0035880	(E)-2-O-cinnamoyl-β-D-glucopyranose	C ₁₅ H ₁₈ O ₇	0.00	13.31	N/A	N/A
HMDB0039365	isolimonic acid glucoside	C ₃₂ H ₄₄ O ₁₅	0.00	1.43	N/A	N/A
HMDB0038042	isovitexin 2"-O-(6"-feruloyl)glucoside	C ₃₇ H ₃₈ O ₁₈	0.00	1.75	N/A	N/A
HMDB0039509	trans-p-coumaric acid 4-glucoside	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	0.00	4.80	N/A	N/A
HMDB0038029	eriojaposide B	C ₂₅ H ₄₀ O ₁₁	0.00	4.69	N/A	N/A
HMDB0037088	cis-p-coumaric acid 4-[apiosyl-(1→2)- glucoside]	C ₂₀ H ₂₆ O ₁₂	0.00	-2.76	N/A	N/A
HMDB0039319	kaempferol 3-rhamnoside 3-xyloside	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	0.00	-2.69	N/A	N/A
HMDB0034687	resveratrol 4'-(6-galloylglucoside)	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₂	0.00	2.41	N/A	N/A
HMDB0038332	2-(3-hydroxyphenyl)ethanol 1'-glucoside	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	0.00	3.74	N/A	N/A
HMDB0029953	D-erythro-D-galacto-octitol	C ₈ H ₁₈ O ₈	0.00	39.37	N/A	N/A
HMDB0029349	neryl rhamnosyl-glucoside	C ₂₂ H ₃₈ O ₁₀	0.00	4.67	N/A	N/A
HMDB0032992	furaneol 4-glucoside	C ₁₂ H ₁₈ O ₈	0.00	6.28	N/A	N/A
HMDB0034677	cinnacsiol D1 glucoside	C ₂₆ H ₄₂ O ₁₀	0.00	4.17	N/A	N/A
HMDB0037084	(8S,8'S)-secoisolariciresinol 9-xyloside	C ₂₅ H ₃₄ O ₁₀	0.00	10.19	N/A	N/A
HMDB0040559	aromadendrin 3,7-diglucoside	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₆	0.01	-0.53	N/A	N/A
HMDB0033584	O-methylgalactinol	C ₁₃ H ₂₄ O ₁₁	0.00	3.79	N/A	N/A
HMDB0037463	spinosin C	C ₃₇ H ₃₈ O ₁₇	0.00	2.74	N/A	N/A
HMDB0034185	schottenol 3-glucoside	C ₃₅ H ₆₀ O ₆	0.00	-1.26	N/A	N/A
HMDB0029766	(3S,7E,9R)-4,7-megastigmadiene-3,9-diol 9-[apiosyl-(1→6)-glucoside]	C ₂₄ H ₄₀ O ₁₁	0.00	4.96	N/A	N/A
HMDB0041232	8-hydroxyhesperetin 7-[6-acetylglucosyl-(1→2)-glucoside]	C ₃₀ H ₃₄ O ₁₈	0.00	2.30	N/A	N/A
HMDB0039910	(Z)-resveratrol 3,4'-diglucoside	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₃	0.00	1.00	N/A	N/A
HMDB0038306	5a,6a-epoxy-7E-megastigmen-3b,9e-diol 9-glucoside	C ₁₉ H ₃₂ O ₈	0.00	-3.45	N/A	N/A
HMDB0034771	3,7-dimethyl-5-octene-1,7-diol 1-glucoside	C ₁₆ H ₃₀ O ₇	0.00	0.76	N/A	N/A
HMDB0031956	prenyl apiosyl-(1→6)-glucoside	C ₁₆ H ₂₈ O ₁₀	0.00	1.20	N/A	N/A
HMDB0037951	catechin 3',5'-diglucoside	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₆	0.00	3.38	N/A	N/A
HMDB0041514	benzyl O-[arabinofuranosyl-(1→6)-glucoside]	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀	0.00	-3.88	N/A	N/A
HMDB0040701	9-hydroxy-7-megastigmen-3-one glucoside	C ₁₉ H ₃₂ O ₇	0.00	2.95	N/A	N/A
HMDB0040538	kaempferol 3-[2"-(p-coumaroylglucosyl)-rhamnoside]	C ₃₆ H ₃₆ O ₁₇	0.00	2.80	N/A	N/A

续表 1

代谢物 ID	代谢物	分子式	P 值	差异倍数	活性	文献
HMDB0031676	5a,6a-epoxy-7E-megastigmen-3a,9e-diol 3-glucoside	C ₁₉ H ₃₂ O ₈	0.00	2.43	N/A	N/A
HMDB0039722	2-O-β-D-gucopyranuronosyl-D-mannose	C ₁₂ H ₂₀ O ₁₂	0.01	0.38	N/A	N/A
HMDB0032924	3-furanmethanol glucoside	C ₁₁ H ₁₆ O ₇	0.00	6.64	N/A	N/A
HMDB0040121	methyl 3,4-dihydroxy-5-prenylbenzoate 3-glucoside	C ₁₉ H ₂₆ O ₉	0.00	1.61	N/A	N/A
HMDB0036376	3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,2-propanediol 2-O-(galloyl-glucoside)	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₃	0.00	1.61	N/A	N/A
HMDB0039934	chrysin 7-[rhamnosyl-(1→4)-glucoside]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₃	0.02	-2.80	N/A	N/A
HMDB0033581	trans-O-coumaric acid 2-glucoside	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	0.00	4.27	N/A	N/A
HMDB0038747	(2E,4E,7R)-2,7-dimethyl-2,4-octadiene-1,8-diol 8-O-β-D-glucopyranoside	C ₁₆ H ₂₈ O ₇	0.00	1.19	N/A	N/A
HMDB0030294	1-O-E-cinnamoyl-(6-arabinosylglucose)	C ₂₀ H ₂₆ O ₁₁	0.00	-3.55	N/A	N/A
HMDB0037852	apigenin 7-[galactosyl-(1→4)-mannoside]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	0.00	3.04	N/A	N/A
HMDB0040845	(S)-nerolidol	C ₃₃ H ₅₆ O ₁₄	0.00	-1.92	N/A	N/A
HMDB0038853	β-D-galactopyranosyl-(1 → 3)-β-D-galactopyranosyl-(1 → 6)-D-galactose	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	0.00	1.44	N/A	N/A
HMDB0035025	6Z-8-hydroxygeraniol 8-O-glucoside	C ₁₆ H ₂₈ O ₇	0.00	1.48	N/A	N/A
HMDB0034784	trans-p-menthane-1,7,8-triol 8-glucoside	C ₁₆ H ₃₀ O ₈	0.00	0.63	N/A	N/A
HMDB0031367	linalool oxide D 3-[apiosyl-(1→6)-glucoside]	C ₂₁ H ₃₆ O ₁₁	0.00	0.88	N/A	N/A
HMDB0029772	corchoionol C 9-glucoside	C ₁₉ H ₃₀ O ₈	0.00	1.72	N/A	N/A
HMDB0033009	foeniculose VIII	C ₁₆ H ₂₈ O ₈	0.00	2.38	N/A	N/A
HMDB0039473	2'-methoxy-3-(2,4-dihydroxyphenyl)-1,2-propanediol 4'-glucoside	C ₁₆ H ₂₄ O ₉	0.00	1.96	N/A	N/A
HMDB0039124	crosatide A	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	0.00	5.32	N/A	N/A
HMDB0037983	cyanidin 3-(6-caffeoylglucoside) 5-glucoside	C ₃₆ H ₃₇ O ₁₉	0.00	-5.93	N/A	N/A
HMDB0040471	isolaricresinol 4'-O-β-D-glucoside	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₁	0.00	0.86	N/A	N/A
HMDB0041176	(3S,5R,6S,7E,9S)-7-megastigmen-3,6,9-triol 9-glucoside	C ₁₉ H ₃₄ O ₈	0.00	2.10	N/A	N/A

N/A 表示未查到活性报道

N/A indicates no activity reports have been found

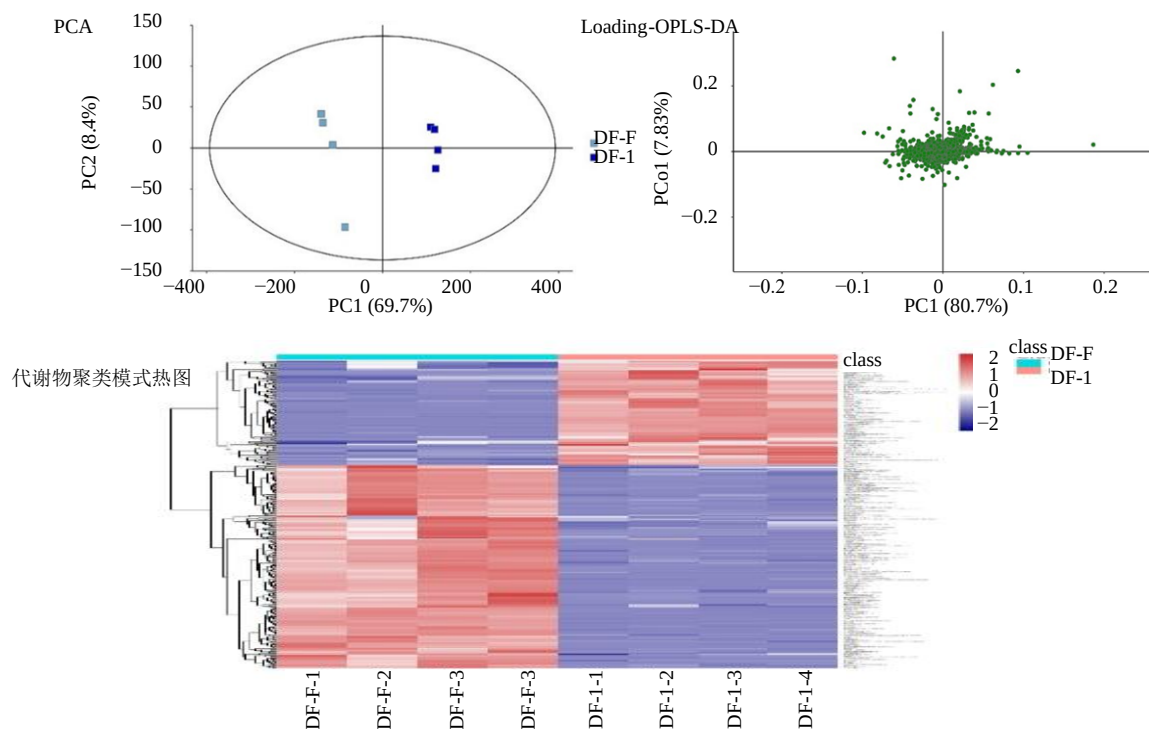


图 2 不同炮制方法样品 PCA 分析及代谢物积累模式

Fig. 2 PCA analysis for *D.officinale* samples from different processing method and accumulation pattern of metabolites

3.3 炮制前后糖类化合物差异的鉴定

OPLS-DA 为分类监督模式识别方法,可降低样本组内差异,能更加准确表征样本组间特征。为进一步挖掘铁皮石斛鲜条及其炮制品中代谢物的差异性,鉴定潜在的差异性糖类物质,分别对铁皮石斛炮制前后组间代谢数据进行 OPLS-DA 分析。根据 OPLS-DA 模型的变量重要性投影(variable importance in project, VIP)鉴定差异代谢物,标准为 $VIP > 1$ 且单维检验 $P < 0.05$ (差异倍数 > 2),共鉴定 37 个差异物质(表 1)。由表 1 分析发现,西枫斗与鲜条共存在 37 个差异物质,且均在西枫斗组上调高积累。OPLS-DA 模型优化表明鲜条与西枫斗的 R^2_X 、 R^2_Y 值,分别为 0.98、1.00, OPLS-DA 得分图如图 3 所示,表明所建立的模型对组间样品具有良好的区分度,相同组内样品高度聚合一类。OPLS-DA 排列验证($n=200$)实验表明 2 组模型的原始 R^2 和 Q^2 均大于 Y 置换后的相应的值,暗示 2 组模型未过度拟合,可用于后续代谢物的鉴定。

研究结果表明在铁皮石斛鲜条及其炮制品的糖类化合物代谢过程中,由表 1 可以看出铁皮石斛炮

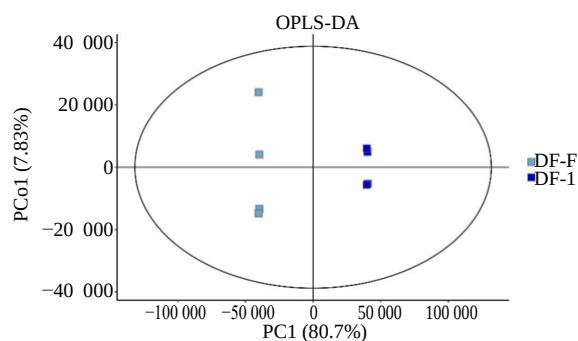


图 3 鲜品和炮制品的 OPLS-DA 得分图

Fig. 3 OPLS-DA score plot of samples from different processing methods

个糖类化合物差异变化最大为 *D*-红血球-*D*-半乳糖-制前后 25 个糖类化合物存在较大差异。其中, 10 辛糖醇、麦芽五糖、麦芽六糖、(*E*)-2-*O*-肉桂酰- β -*D*-吡喃葡萄糖、(8*S*,8*S*)-海杉醇 9-木糖苷、乙基香草醛糖苷、1-(3-甲基-2-丁烯基)-6-无糖基葡萄糖、3-呋喃甲醇葡萄糖苷、乙酯-*D*-吡喃葡萄糖苷、呋喃醇 4-葡萄糖苷, 且 25 个糖类化合物在炮制品中上调积累。典型糖类化合物结构见图 4。

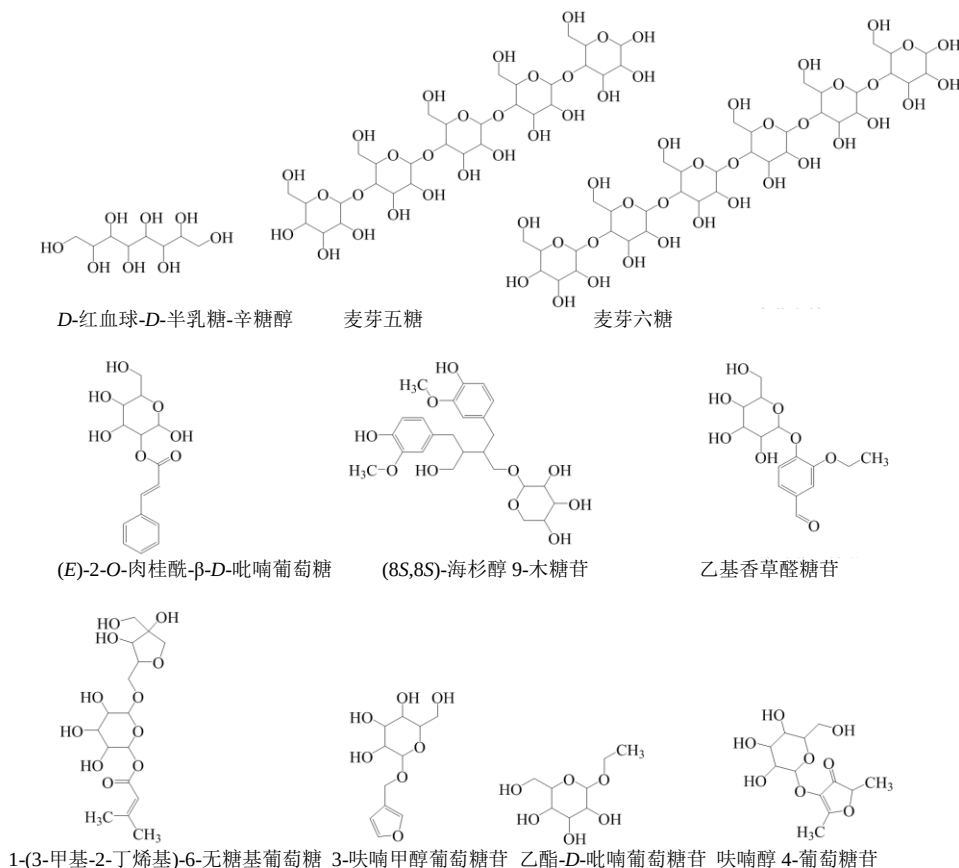


图 4 西枫斗中典型糖类化合物的化学结构

Fig. 4 Typical carbohydrates from Xifengdou

4 讨论

本实验将植物代谢组学的研究方法和思路应用于铁皮石斛炮制前后糖类代谢物差异的研究, 麦芽五糖和麦芽六糖是一种直链麦芽低聚糖, 由 α (1 $\rightarrow$ 4) 链接 *D*-葡萄糖单体和痕迹量的 (1 $\rightarrow$ 6) 链接葡萄糖缩合组成, 聚合度分别为 5 和 6^[33]。麦芽五糖和麦芽六糖作为铁皮石斛的重要次级代谢产物, 其含量的高低对于铁皮石斛的药理活性具有重要影响, 麦芽五糖和麦芽六糖甜度低, 在食品中常作为口感柔和的低甜味剂使用, 同时, 麦芽五糖和麦芽六糖具有较强的持水性, 作为保湿剂被广泛应用于化妆品^[34]。此外, 作为一种直链麦芽低聚糖, 麦芽五糖和麦芽六糖可以不经胃的消化直接进入小肠, 被小肠内的 α -葡萄糖苷酶水解进而进入血液迅速合成糖原, 加速肌糖原和肝糖原的恢复, 其所引起的胰岛素反应和血糖反应比葡萄糖平稳, 能长时间的为人体提高能量。同时能防止运动时大量乳酸的形成, 对于运动员和肝、肾病患者是一种理想的能量补充来源^[35]。麦芽五糖和麦芽六糖在食品、医药、化妆品等领域被广泛应用。

因此, 解析传统西枫斗的炮制工艺, 从而提高铁皮石斛中麦芽五糖和麦芽六糖的含量是非常有意义的。但是, 其变化是否能够支撑铁皮石斛炮制品主要生物活性仍需要进一步进行相对应生物活性的体内外药理活性研究。其次, 本研究首次通过代谢组学技术从铁皮石斛中检测到具有显著护肤活性的糖类化合物, 如海藻糖是一种植物天然保湿剂, 具有很好的锁水性; α -松油基葡萄糖苷、3,5-二羟基苯基 1-*O*-(6-*O*-没食子酰基-*D*-吡喃葡萄糖苷)、羟基酪醇 1-*O*-葡萄糖苷具有很好的抗氧化作用; (4*R*, 5*S*, 7*R*, 11*S*)-11,12-OH-1(10)-spirovetiven-2-1,11-gly-(3*S*, 7*E*, 9*S*)-9-OH-4,7-megastigmadien-3-one 9-gly 是天然的表面活性剂; 羟基酪醇 1-*O*-葡萄糖苷、甲基 β -*D*-吡喃葡萄糖苷具有抗炎的作用。这些物质因具有与护肤相关的作用而被广泛应用于化妆品中。

本研究从植物代谢组学的角度分析得出铁皮石斛炮制成西枫斗, 更有利于糖类化合物的积累, 铁皮石斛糖类物质具有多种药理活性, 包括在护肤化妆品领域的多种活性, 经研究表明, 铁皮石斛多糖主要的生物活性化合物具有保湿、抗氧化、抗衰老和促进头发生长的作用, 受到皮肤科医生和化妆品界的高度重视, 应用在护肤领域具有抗炎修复、止痒、抗辐射及抗衰老 4 大功效^[36-38]。本研究结果不

仅揭示了云南省文山州广南县铁皮石斛独特的“西枫斗”传统炮制工艺价值, 而且解析了西枫斗中丰富的糖类物质, 这些糖类物质是铁皮石斛发挥药理功效的重要物质基础。本研究结果显示: 铁皮石斛炮制成西枫斗更有利于糖类化合物的积累, 与护肤相关的糖类化合物上调导致相关物质的高积累特点, 与生品相比具有显著性差异。分析原因可能与铁皮石斛炮制成西枫斗过程中糖类成分被固化稳定, 使有效成分不易分解有关。

对西枫斗的深入研究需借助现代分析检测手段, 开展铁皮石斛炮制前后主要功效物质成分的变化规律及主要功效物质的含量变化, 采用现代药理学方法对铁皮石斛炮制前后主要活性物质进行监测、鉴定、评价, 例如用主要功效物质进行抗氧化、美白、抗炎、抗紫外线等皮肤化妆品活性研究, 筛选铁皮石斛炮制前后不同护肤功效活性物质, 并进一步探索其活性物质的作用机制, 研发其在不同功效护肤品中的应用, 以期在西枫斗深加工工艺和铁皮石斛提取物在化妆品领域的应用进一步提供科学依据, 该研究为中药现代化和中药材的炮制工艺的评价方法与标准的制定提供一个案例支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 295-296.
- [2] Chen X M, Wang F F, Wang Y Q, et al. Discrimination of the rare medicinal plant *Dendrobium officinale* based on naringenin, bibenzyl, and polysaccharides [J]. *Sci China Life Sci*, 2012, 55(12): 1092-1099.
- [3] 李燕. 铁皮石斛化学成分的研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2009.
- [4] 丁玉莲. 中药铁皮石斛的化学成分分析 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- [5] 宋红坤. 铁皮石斛等十种石斛的鉴别研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2019.
- [6] Xing X H, Cui S W, Nie S P, et al. Study on *Dendrobium officinale* O-acetyl-glucomannan (Dendronan®): Part II. Fine structures of O-acetylated residues [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 117: 422-433.
- [7] Huang X J, Nie S P, Cai H L, et al. Study on *Dendrobium officinale* O-acetyl-glucomannan (dendronan): Part VII. the immunomodulatory and antioxidant activity [A] // Gums and Stabilisers for the Food Industry 18. [M]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2016: 218-226.
- [8] Huang X J, Nie S P, Cai H L, et al. Study on *Dendrobium officinale* O-acetyl-glucomannan (Dendronan (R)): Part VI. Protective effects against oxidative stress in immunosuppressed mice [J]. *Food Res Int*, 2015,

- 72(Jun.): 168-173.
- [9] 吴昊姝, 徐建华, 陈立钻, 等. 铁皮石斛降血糖作用及其机制的研究 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(2): 160-163.
- [10] 孙婧. 铁皮石斛提取物及其活性成分毛兰素对人乳腺癌细胞抑制作用的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [11] 周佳. 铁皮石斛化学成分及抗氧化、降血压活性研究 [D]. 桂林: 广西师范大学, 2015.
- [12] 严华. 铁皮石斛质量控制体系研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.
- [13] Ernst B, Magnani J L. From carbohydrate leads to glycomimetic drugs [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(8): 661-677.
- [14] 袁华茂, 宋金明. 糖类化合物的化学修饰及其生物活性的研究进展 [J]. 海洋科学, 2003, 27(3): 27-31.
- [15] 陈超琴, 蒋丽华, 赵黎明, 等. 石斛多糖的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(2): 441-445.
- [16] 相萍萍, 王旭, 刘超. 铁皮石斛的最新应用研究 [J]. 西部中医药, 2016, 29(1): 129-132.
- [17] 严静, 蔡易熹, 陈燕兰, 等. 铁皮石斛茎、叶、花的活性成分及综合利用研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(17): 299-306.
- [18] Silva J A T, Winarto B, Dobránszki J, et al. Tissue disinfection for preparation of culture [J]. *Folia Hortic*, 2016, 28(1): 57-75.
- [19] 来平凡, 何晓波. 西枫斗“龙头凤尾”实质探讨 [J]. 中药材, 2002, 25(2): 126-127.
- [20] 陈默, 孙懿, 赵亚. 铁皮石斛提取物保湿性能研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2015, 29(6): 70-73.
- [21] Nwude F, Eze M. Protein glycation and oxidation inhibitory activity of *Centella asiatica* phenolics (CAP) in glucose-mediated bovine serum albumin glycoxidation [J]. *Food Chem*, 2020, 332: 127302.
- [22] Ren S, Guan H. Application of marine bioactive extracts on cosmetics [J]. *Chinese J Marine Drugs*, 2007, 26(2): 47.
- [23] He S Z, Wang X R, Liu Z T, et al. Hydroxysafflor yellow A inhibits *Staphylococcus aureus*-induced mouse endometrial inflammation via TLR2-mediated NF- κ B and MAPK pathway [J]. *Inflammation*, 2021, 44(3): 835-845.
- [24] Adnan M, Siddiqui A J, Hamadou W S, et al. Phytochemistry, bioactivities, pharmacokinetics and toxicity prediction of *Selaginella repanda* with its anticancer potential against human lung, breast and colorectal carcinoma cell lines [J]. *Molecules*, 2021, 26(3): 768.
- [25] Kikuzaki H, Miyajima Y, Nakatani N. Phenolic glycosides from berries of *Pimenta dioica* [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71(5): 861-865.
- [26] Fiume M M, Heldreth B, Bergfeld W F, et al. Safety assessment of decyl glucoside and other alkyl glucosides as used in cosmetics [J]. *Int J Toxicol*, 2013, 32(5): 22S-48S.
- [27] Lin Y E, Chen Y C, Lu K H, et al. Antidepressant-like effects of water extract of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link by modulation of ROCK2/PTEN/Akt signaling in an unpredictable chronic mild stress-induced animal model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 276: 114194.
- [28] Yagi A, Tokubuchi N, Nohara T, et al. The constituents of cinnamomi cortex. I. structures of cinnacsiol A and its glucoside [J]. *Chem Pharm Bull*, 1980, 28(5): 1432-1436.
- [29] Haron M, Dale O, Zulfiqar F, et al. Effect of African potato (*Hypoxis hemerocallidea*) extract and its constituents on PXR and CYP450 enzymes [J]. *Appl Vitro Toxicol*, 2019, 5(1): 12-19.
- [30] Xu Y M, Fang S D. The chemical constituents from *Podocarpus nagi* (II) [J]. *Sep Sci Plus*, 1991, 3: 35-46.
- [31] Roca M, Pérez-Gálvez A. Profile of chlorophyll catabolites in senescent leaves of *Epipremnum aureum* includes a catabolite esterified with hydroxytyrosol 1-O-glucoside [J]. *J Nat Prod*, 2020, 83(4): 873-880.
- [32] Dixit D, Reddy C R K, Trivedi M H, et al. Non-targeted metabolomics approach to assess the brown marine macroalga *Dictyota dichotoma* as a functional food using liquid chromatography with mass spectrometry [J]. *Sep Sci Plus*, 2020, 3(5): 140-149.
- [33] Min B C, Yoon S H, Kim J W, et al. Cloning of novel maltooligosaccharide-producing amylases as antistaling agents for bread [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(2): 779-782.
- [34] Ben Ali M, Mhiri S, Mezghani M, et al. Purification and sequence analysis of the atypical maltohexaose-forming alpha-amylase of the *B. stearothermophilus* US100 [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2001, 28(6): 537-542.
- [35] Chegeni M, Hamaker B. Induction of differentiation of small intestinal enterocyte cells by maltooligosaccharides [J]. *FASEB J*, 2015, 29(S1): 8-16.
- [36] Chen J, Qi H, Li J B, et al. Experimental study on *Dendrobium candidum* polysaccharides on promotion of hair growth [J]. *China J Chin Mater Med*, 2014, 39(2): 291-295.
- [37] 陈默, 孙懿, 赵亚. 铁皮石斛提取物保湿性能研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2015, 29(6): 70-73.
- [38] Chen Y, Yao F K, Ming K, et al. Polysaccharides from traditional Chinese medicines: extraction, purification, modification, and biological activity [J]. *Molecules*, 2016, 21(12): 1705-1728.

[责任编辑 时圣明]