

金钗石斛叶中总黄酮的提取分离及体外抗阿尔茨海默病活性研究^Δ

李艳萍^{1*}, 李海燕¹, 纪晓婉¹, 岑志芳¹, 颜金武², 吴剑峰^{1#} (1. 佛山科学技术学院口腔医学院医药工程学院, 广东佛山 528000; 2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006)

中图分类号 R961 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)03-0330-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.03.10

摘要 目的: 对金钗石斛叶中总黄酮进行提取分离, 并考察其体外抗阿尔茨海默病(AD)活性。方法: 采用超声提取法提取金钗石斛叶中总黄酮, 将所得浸膏用水分散后分别用氯仿、乙酸乙酯和正丁醇进行萃取, 采用显色反应和薄层色谱法对各极性提取物进行定性分析, 硝酸铝-亚硝酸钠法定量分析各提取物中总黄酮含量。采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除试验考察各提取物的体外抗氧化活性, 硫黄素T法考察各提取物对A β ₄₂蛋白聚集的抑制作用, 紫外-可见光谱扫描法测定各提取物对金属离子(Cu²⁺, Fe³⁺和Zn²⁺)的螯合能力, 以考察其体外抗AD活性。结果: 乙酸乙酯、正丁醇、水提取物中均含有黄酮成分, 含量分别为0.03、0.12、0.05 mg/mL。3种提取液对DPPH自由基的半数清除浓度(IC₅₀)分别为0.021、0.011、0.013 mg/mL, 对A β ₄₂蛋白聚集的抑制率分别为43.77%、52.28%、38.42%, 对金属离子具有一定的螯合能力, 其中尤以对Cu²⁺的螯合作用最为明显。结论: 金钗石斛叶中总黄酮具有较好的抗氧化、抑制A β ₄₂蛋白聚集及螯合金属离子的能力, 具有一定的体外抗AD活性, 且以正丁醇提取物效果最明显。

关键词 金钗石斛叶; 黄酮成分; 阿尔茨海默病; 抗氧化; A β ₄₂蛋白

Separation and Extraction of Total Flavonoids from *Dendrobium nobile* Leaves and Study on Its Anti-Alzheimer's Disease Activity *in vitro*

LI Yanping¹, LI Haiyan¹, JI Xiaowan¹, CEN Zhifang¹, YAN Jinwu², WU Jianfeng¹ (1. School of Medical Engineering, College of Stomatology, Foshan University, Guangdong Foshan 528000, China; 2. School of Bioscience and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To separate and isolate total flavonoids from *Dendrobium nobile* leaves, and to investigate its anti-Alzheimer's disease (AD) activity *in vitro*. METHODS: Total flavonoids were obtained by ultrasonic extraction method and extracted by chloroform, ethyl acetate and butyl alcohol after the obtained extract was dispersed with water. Qualitative analysis was carried out with color reaction and TLC. The content of total flavonoids in extracts was analyzed quantitatively by Aluminum nitrate-sodium nitrite method. Antioxidant activity of extract was investigated by DPPH radical scavenging assay; the inhibitory effect of each extract on A β ₄₂ protein aggregation was investigated by Thioflavin T assay. Metals (Cu²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺) chelating property was studied by UV-vis spectrum scanning to investigate the anti-AD activity *in vitro*. RESULTS: The flavonoids were found in ethyl acetate, butyl alcohol and aqueous extracts, and their flavonoids contents were 0.03, 0.12, 0.05 mg/mL, respectively. IC₅₀ of three extracts to DPPH free radicals were 0.021, 0.011, 0.013 mg/mL. Inhibitory rates of them to A β ₄₂ protein aggregation were 43.77%, 52.28%, 38.42%, respectively. Three extracts exerted metal chelating ability which was best in Cu²⁺. CONCLUSIONS: The total flavonoids from *D. nobile* leaves have good antioxidant activities, A β ₄₂ aggregation inhibitory activities and metal chelating activity, show certain anti-AD activity *in vitro* especially in butyl alcohol extract.

KEYWORDS *Dendrobium nobile* leaves; Flavonoids; Alzheimer's disease; Antioxidant; A β ₄₂ protein

金钗石斛(*Dendrobium nobile*)作为我国传统名贵中

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.21502056); 广东省普通高校青年创新人才项目(No.2014KQNCX182)

* 助教, 博士。研究方向: 药物有效成分的筛选与机制研究。电话: 0757-82836985。E-mail: lypfosu@126.com

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 天然活性成分的研究与开发。电话: 0757-82836985。E-mail: jianfeng839@sina.com

药, 为兰科石斛属植物, 始载于《神农本草经》, 被列为上品, 主要以新鲜或干燥茎入药^[1], 是2015年版《中国药典》(一部)中药用石斛的首要来源。一直以来, 人们主要对其茎部开展相关化学成分和药理作用研究, 发现有效成分主要是石斛碱和多糖类物质, 药理活性主要有增强免疫力和抗肿瘤等。至今, 对金钗石斛叶和花部位的

研究很少。

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种神经退行性疾病,其发病率占老年性痴呆的60%~80%,目前AD尚无有效的治疗药物^[2]。由于AD的病理特征复杂,多靶点抗AD研究已成为抗AD药物研发的热门方向,其主要靶点包括胆碱酯酶、A β 蛋白、自由基以及金属离子等^[3]。黄酮是一类天然抗氧化剂,具有抗氧化、降血糖和保护心血管等作用。近年来,多种黄酮类物质被发现具有良好的抗AD活性。有研究指出,日常饮食中摄入一定量的黄酮成分有助于AD的治疗^[4]。相比茎部来说,金钗石斛叶中黄酮类成分含量更高^[5]。本研究拟通过提取分离手段获得金钗石斛叶中总黄酮,并对其进行初步的体外抗AD活性评价,为金钗石斛叶这一资源的开发利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

BS-110S 电子分析天平(德国赛多利斯公司);RE52-99 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);硅胶G板(德国Merck公司);TLC Visualizer 薄层色谱数码成像系统(瑞士CAMAG公司);UV-1600 PC 紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);WFY-28 荧光分光光度计(天津市拓普仪器有限公司);RT-6100 酶标分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司)。

1.2 药材与试剂

金钗石斛叶(广东国方医药有限公司,批号:2016-05-28,经佛山科学技术学院李海燕副教授鉴定为真品);芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100080-200707,纯度:99.0%);A β ₁₋₄₂蛋白(上海强耀生物有限公司,批号:2016-01-20,纯度:>95%);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、姜黄素、硫磺素T(美国Sigma-Aldrich公司,批号:101585784、1002008101、1002-142019,纯度:>97%、>98%、60%~75%);水溶性维生素E(Trolox,上海阿拉丁生物科技有限公司);石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇(天津市富宇精细化工有限公司);其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 金钗石斛叶中总黄酮的提取

将新鲜金钗石斛叶清洗、烘干至恒质量,研碎成粉末。精确称取粉末4 g,用滤纸包好放入索氏提取器中,加入140 mL石油醚回流脱脂^[6],虹吸至提取液接近无色。取出滤渣,置于锥形瓶中,加80%乙醇室温下超声提取,每次35 min,直至提取液颜色接近无色。合并提取液,于旋转蒸发仪旋干溶液,得浸膏。将浸膏悬浮于水,分别用氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取,每种溶剂连续萃取至无色,合并相同溶剂的萃取液,分别减压浓缩后得到4种提取物。然后将4种提取物分别用80%乙醇溶解并定容至25 mL量瓶中,得到氯仿提取物溶液(A溶

液)、乙酸乙酯提取物溶液(B溶液)、正丁醇提取物溶液(C溶液)和水提取物溶液(D溶液)。

2.2 黄酮成分的定性分析

2.2.1 显色反应法 分别采用盐酸-镁粉反应法、碱性试剂显色反应法、铝盐反应法、醛糖形成反应(Molish反应)和三氯化铁反应法^[7]定性分析4种提取物溶液中含黄酮成分情况。结果,A溶液在盐酸-镁粉反应和三氯化铁反应中显色不明显,在碱性试剂显色反应和铝盐反应中呈阴性,仅在Molish反应中呈阳性;而B、C、D溶液在5种显色反应中均呈阳性。结果提示,B、C、D溶液中含有黄酮成分。

2.2.2 薄层色谱法 取A、B、C、D溶液点样在硅胶G薄层板上,以正丁醇-醋酸-水(4:1:5, V/V/V,下同)为展开剂展开后,取出,自然晾干,喷1% AlCl₃溶液^[8],挥干后在薄层色谱数码成像中观察斑点情况。结果,B、C、D溶液中均有出现条带,而A溶液中没有。结合显色反应与薄层色谱结果,表明除了A溶液,其余3种提取液中均存在黄酮类成分。薄层色谱图见图1。

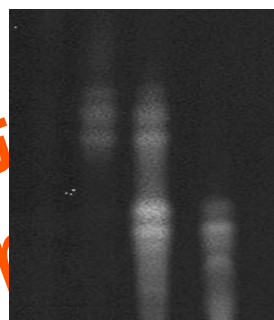


图1 薄层色谱图

Fig 1 TLC spectrum

2.3 总黄酮含量测定

2.3.1 标准曲线的绘制 精密称取芦丁对照品0.010 1 g,用80%乙醇定容至50 mL量瓶中,摇匀,得对照品溶液。精密量取对照品溶液1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL,分别置于10 mL量瓶中,不足5 mL的加80%乙醇补足5 mL;精密加入5%亚硝酸钠溶液0.3 mL,摇匀,放置6 min;然后加入10%硝酸铝溶液0.3 mL,摇匀,放置6 min;再加入1 mol/L氢氧化钠溶液4 mL,最后用80%乙醇定容,摇匀,放置15 min^[9-10]。在510 nm波长处测定其吸光度,以吸光度为纵坐标(y)、芦丁质量浓度为横坐标(x)作标准曲线,用最小二乘法进行线性回归,得回归方程 $y=13.526x-0.013 95$ ($R^2=0.998 8$)。结果表明,芦丁检测质量浓度线性范围为0.02~0.10 mg/mL。

2.3.2 含量测定 精密量取B、C、D溶液各2 mL于10 mL量瓶中,按“2.3.1”项下方法进行测定,并由回归方程计算各样品中总黄酮含量。结果,B、C、D溶液中总黄酮含量分别为0.03、0.12、0.05 mg/mL,折算成每克叶中的含量分别为0.38、1.57、0.63 mg/g。从结果可知,各提取

物中总黄酮含量大小顺序为C溶液>D溶液>B溶液。

2.4 DPPH 自由基清除能力

2.4.1 溶液的制备 (1)DPPH 溶液:称取0.001 1 g的DPPH,用80%乙醇溶解并定容于25 mL量瓶中,摇匀,得浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液,保存于冰箱中,备用^[11-12]。

(2)Trolox 溶液:称取0.009 7 g的Trolox,用无水乙醇溶解并定容于5 mL量瓶中,摇匀。然后稀释至80、60、40、20 $\mu\text{mol/L}$,备用。(3)样品溶液:精密量取B溶液250、200、150、100、50、20 μL ,C溶液150、125、100、75、50、25 μL ,D溶液225、200、175、150、125、100 μL ,分别置于离心管中,再分别加入80%乙醇补足体积至500 μL 。

2.4.2 DPPH 自由基清除试验 量取以上稀释好的Trolox 溶液和B、C、D样品液各100 μL ,再加入100 μL 的DPPH 溶液。空白溶液为80%乙醇,阴性对照为100 μL 的80%乙醇与100 μL 的DPPH 溶液的混合液。充分混合后,室温避光放置50 min,然后用酶标分析仪于517 nm波长处测定其吸光度(A),所有样品均重复3次。计算DPPH 自由基清除率。清除率(%)=[(A_对-A_空)-(A_样-A_空)]/(A_对-A_空),式中,A_对为阴性对照的A,A_样为样品溶液与DPPH 反应后的A,A_空为空白溶液的A。根据清除率与各样品浓度的拟合曲线计算其半数清除浓度(IC₅₀)。结果表明,对照品Trolox对DPPH 自由基的IC₅₀为28.85 $\mu\text{mol/L}$ (0.007 mg/mL),B、C、D溶液对DPPH 自由基的IC₅₀分别为0.021、0.011、0.013 mg/mL。

2.5 $\text{A}\beta_{42}$ 蛋白聚集抑制活性

精密称取 $\text{A}\beta_{42}$ 蛋白0.2 mg,用1% $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶液100 μL 溶解,然后用20 mmol/L的磷酸盐缓冲液稀释至20 $\mu\text{mol/L}$ 。取B、C、D溶液各150 μL ,分别加入150 μL 的 $\text{A}\beta_{42}$ 蛋白溶液作为样品溶液,阴性对照为150 μL 的 $\text{A}\beta_{42}$ 蛋白溶液与150 μL 磷酸盐缓冲液,阳性对照为20 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素溶液。样品空白分别为B、C、D溶液以及姜黄素溶液各150 μL 与150 μL 缓冲溶液的混合液,背景空白为300 μL 的缓冲溶液与2 700 μL 的硫磺素T溶液的混合液。将上述溶液混匀后,在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应72 h,然后分别加入2 700 μL 的硫磺素T溶液(5 $\mu\text{mol/L}$,用甘氨酸-氢氧化钠缓冲液配制),混匀,反应2 min。最后测试荧光吸收值,其中激发波长为450 nm、发射波长为482 nm^[13]。每个样品均重复3次,计算 $\text{A}\beta_{42}$ 蛋白聚集抑制率[$\text{A}\beta_{42}$ 蛋白聚集抑制率(%)=(1-IFI/IFc)×100%。式中,IFI指样品扣除样品空白后的荧光吸收值,IFc指阴性对照扣除背景空白后的荧光吸收值]。结果显示,对照品姜黄素的 $\text{A}\beta_{42}$ 蛋白聚集抑制率为50.35%,B、C、D溶液的 $\text{A}\beta_{42}$ 蛋白聚集抑制率分别为43.77%、52.28%、38.42%。结果提示,B、C、D溶液对 $\text{A}\beta_{42}$ 蛋白聚集均有较好的抑制活性,其中活性大小顺序为C溶液>B溶液>D溶液。

2.6 金属离子螯合能力

称取0.002 5 g的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.002 7 g的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和0.002 9 g的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,分别用80%乙醇溶解并定容至10 mL量瓶中,制备浓度均为1 mmol/L的 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Zn^{2+} 溶液。精密量取B、C、D溶液各1 mL,置于不同EP管中,加入80%乙醇溶液4 mL进行稀释,摇匀。各取3份上述稀释液1 mL置于试管中,分别加入 Cu^{2+} 溶液200 μL 、 Fe^{3+} 溶液200 μL 和 Zn^{2+} 溶液400 μL ,然后用80%乙醇溶液稀释至4 mL。参比溶液为以80%乙醇为溶剂的等浓度同种离子溶液^[13]。混匀后室温放置30 min^[14]。常温下用紫外-可见分光光度计进行扫描,波长范围为200~500 nm,波长间隔为1 nm,扫描速率为200 nm/min。各溶液对金属离子螯合能力测定结果见图2。

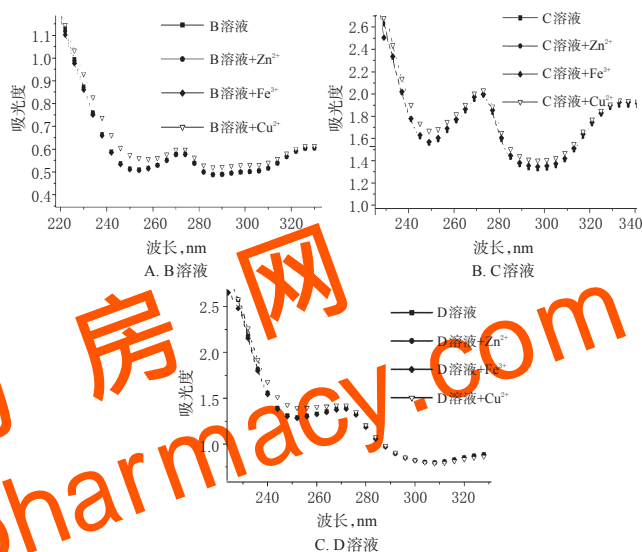


图2 3种提取液金属离子螯合能力的测定结果

Fig 2 The chelating activities of three extracts to Cu^{2+} , Fe^{3+} and Zn^{2+}

由图2可知,B、C、D溶液与 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Zn^{2+} 作用后吸收光谱均出现一定的变化,其中与 Cu^{2+} 作用后吸光谱改变最为明显。可知,这3种溶液对 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 等金属离子均表现出一定的螯合能力,且以对 Cu^{2+} 螯合能力最强。

3 讨论

3.1 总黄酮的提取与分离方法

本文在提取总黄酮前,先用石油醚进行脱脂,以便除去叶绿素等脂溶性色素,减少对显色反应和其他试验结果的影响。另外,本文曾对比回流法与超声法的提取效率^[15],发现后者提取效率是前者的3倍多,因此采用后者作为总黄酮的提取方法。本研究的萃取试剂选用氯仿、乙酸乙酯和正丁醇这3种不同极性的溶剂,目的是分离不同极性的黄酮类成分,获得黄酮苷与苷元。在萃取过程中,正丁醇与水层之间容易出现乳化,加大正丁醇和水层之间的比例或者静置过夜可有效减少乳化现象。

3.2 金钗石斛叶中黄酮成分的性质

在薄层色谱试验中,笔者曾尝试以正丁醇-醋酸-水(4:1:5)、正丁醇-醋酸-水(6:1:5)、甲醇-水(1:1)、氯仿-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(50:5:10:1)、氯仿-甲醇-水(4:1:0.1)、氯仿-甲醇-甲酸(15:5:1)等为展开剂,发现以正丁醇-醋酸-水(4:1:5)分离效果最好,斑点清晰,故最终采用此条件。定性试验结果表明,乙酸乙酯、正丁醇和水提取物中均存在黄酮类成分,而氯仿提取物中则没有,并且黄酮含量大小顺序为正丁醇提取物>水提取物>乙酸乙酯提取物。这表明金钗石斛叶中黄酮类物质的极性较大,并且极性大的成分含量比较高,可能主要以黄酮苷的形式存在。目前鲜有金钗石斛叶中黄酮化学成分的报道,这一研究结果对于笔者后续进行黄酮单体成分的分离具有重要的指导意义。

3.3 金钗石斛叶中黄酮成分的体外抗AD活性

本研究初步考察了金钗石斛叶中黄酮成分对AD的靶点—— $A\beta_{42}$ 蛋白、自由基以及金属离子的影响。其中, $A\beta_{42}$ 蛋白是AD患者脑部淀粉样斑块的主要成分,是一个大约4.2 kDa的短肽, $A\beta_{42}$ 蛋白的聚集是其产生神经毒性的前提。自由基的产生和清除失衡会导致细胞中DNA、脂质、多糖和蛋白质过度损伤,是引发AD患者神经元功能障碍的重要原因^[16]。在AD患者脑部,金属离子 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 的浓度异常升高,这些金属离子可以与 $A\beta_{42}$ 蛋白结合而促进其聚集,并且能够催化活性氧的产生,导致氧化应激反应^[17]。因此,抑制 $A\beta_{42}$ 蛋白的聚集、清除自由基以及金属离子将有利于AD的治疗。结合含量测定和活性研究结果可以看出,含有黄酮成分的乙酸乙酯、正丁醇和水提取物在抗氧化、抑制 $A\beta_{42}$ 蛋白聚集和螯合金属离子方面均表现出良好的活性,并且活性大小顺序基本与黄酮含量大小顺序一致。其中正丁醇提取物中黄酮成分的含量最高,活性也最好,值得进行下一步的单体成分的分离研究。

目前国内外对金钗石斛叶中黄酮类化合物研究较少,本研究分离获得了金钗石斛叶中的黄酮成分,并发现其在抗AD方面具有良好的活性,值得进行深入研究,而本研究结果可以为更好地开发利用金钗石斛叶这一资源提供基础研究数据。

参考文献

[1] 郑晓珂,曹新伟,匡海学.金钗石斛的研究进展[J].中国新药杂志,2005,14(7):826-829.

[2] AGISTORRES A, SÖLHUBER M, FERNANDEZ M, et al. Multi-target-directed ligands and other therapeutic strategies in the search of a real solution for Alzheimer's disease[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2014, 12(1):2-36.

[3] CALZÀ L, BALDASSARRO VA, GIULIANI A, et al. From the multifactorial nature of Alzheimer's disease to

multitarget therapy: the contribution of the translational approach[J]. *Curr Top Med Chem*, 2013, 13(15):1843-1852.

[4] VAUZOUR D. Effect of flavonoids on learning, memory and neurocognitive performance: relevance and potential implications for Alzheimer's disease pathophysiology[J]. *J Sci Food Agric*, 2014, 94(6):1042-1056.

[5] 唐丽,李菁,龙华,等.不同生长龄铁皮石斛茎与叶中总多糖,总生物碱及总黄酮含量的差异[J].广东农业科学,2015,42(8):17-21.

[6] 刘银芳,吴文倩,刘春宇,等.沙苑子黄酮提取工艺研究[J].时珍国医国药,2010,21(6):1401-1402.

[7] 刘琼,李乔丽,放茂良,等.傣族药竹叶兰不同极性部位提取物的抗氧化性研究[J].中国农学通报,2011,27(14):77-81.

[8] 刘阳,杨冰,王新锐,等.洋葱不同极性部位总黄酮的定性和定量分析[J].广州化工,2015,43(1):97-98.

[9] 黄琴,沈杨霞,张成静,等.铁皮石斛多酚和黄酮含量及与抗氧化活性的相关性[J].应用与环境生物学报,2014,20(3):438-442.

[10] 孙玉婉,汪春牛,韩昱,等.琼榄不同部位化学成分预试验及总黄酮含量测定[J].中国药房,2013,24(7):618-621.

[11] 韦祯雅,殷丽琴,钟成,等. DPPH法评价抗氧化活性研究进展[J].食品科学,2014,35(9):317-322.

[12] SHIMADA K, FUJIKAWA K, YAHARA K, et al. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cycloextrin emulsion[J]. *J Agric Food Chem*, 1992, 40(6):945-948.

[13] LI YP, NING FX, YANG MB, et al. Syntheses and characterization of novel oxoisoaporphine derivatives as dual inhibitors for cholinesterases and amyloid beta aggregation[J]. *Eur J Med Chem*, 2011, 46(5):1572-1581.

[14] CHEN SY, CHEN Y, LI YP, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of curcumin analogues as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease[J]. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19(18):5596-5604.

[15] 丁彩梅,曾荣华,丘泰球,等.香椿叶黄酮类化合物超声强化提取研究[J].中成药,2005,27(12):1390-1392.

[16] ALIEV G, OBRENOVICH ME, REDDY VP, et al. Antioxidant therapy in Alzheimer's disease: theory and practice[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2008, 8(13):1395-1406.

[17] YAMIN G, ONO K, INAYATHULLAH M, et al. Amyloid beta-protein assembly as a therapeutic target of Alzheimer's disease[J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(30):3231-3246.

(收稿日期:2017-08-14 修回日期:2017-11-13)

(编辑:林静)