

兰花根石油醚部位化学成分研究*

陈俊¹, 葛晓瑾², 付钰¹, 陈随清^{1**}

(1. 河南中医药大学药学院 郑州 450046; 2. 河南省农业科学院经济作物研究所 郑州 450008)

摘要:目的 本研究对兰花根石油醚部位的化学成分进行分离鉴定,并对石油醚总提物及单体化合物进行体外细胞活性研究,为兰花根的开发利用提供理论依据。方法 采用多种柱色谱法,对兰花根石油醚萃取部位进行分离纯化,并结合理化性质及波谱分析对单体化合物进行结构鉴定;采用NO测定法及MTT法对所得石油醚总提物及单体化合物进行抗炎及抗肿瘤活性研究。结果 石油醚部位经柱色谱法分离得到5个单体化合物,分别为豆甾-4-烯- $3\beta,6\beta$ -二醇、 β -谷甾醇、 β -谷甾醇棕榈酸酯、邻苯二甲酸二丁酯、胡萝卜苷。细胞活性研究结果显示,石油醚总提物及豆甾-4-烯- $3\beta,6\beta$ -二醇对人肝癌细胞SMMC-7721及小鼠乳腺癌细胞4T1均有显著增殖抑制作用,石油醚总提物具有明显抗炎作用。结论 兰花根石油醚部位化学成分有一定的抗炎及抗肿瘤作用,具有进一步研究和开发的价值。

关键词: 兰花根 石油醚部位 分离鉴定 体外细胞 抗炎活性 抗癌活性

doi: 10.11842/wst.20190304001 文献标识码: A

兰花根为兰科植物建兰 *Cymbidium ensifolium* (L.) Sw.、春兰 *Cymbidium goeringii* (Rchb. f.) Rchb. f.、蕙兰 *Cymbidium faberi* Rolfe 等的根。根据古籍《本草纲目》记载:“其气清香,生津止渴,润肌肉,治消渴胆瘕”^[1]。兰科兰属植物通常为观赏花卉,但研究认为其根、叶、花、果及种子均有一定的药用价值,其中兰花根性辛、微寒,有清热利湿、活血止血、解毒杀虫之功效。有文献指出,兰花根可治疗肺结核、肺脓肿扭伤等,亦可用于接骨^[2-3]。

现代民间医者有用兰花根配伍治疗疾病的经验及部分案例^[4-5],例如:兰花根配伍卷柏、野菊花,用以治疗鼻咽癌后遗症;兰花配伍白茅根、山豆根、蒲公英,用以治疗喉癌放疗后遗症;兰花配伍夏枯草、灵仙、半枝莲、白花蛇舌草,用以治疗食道癌放疗后患者;兰花根配伍茅根、冬瓜皮,用以治疗泌尿系统感染;兰花配伍美人蕉、徐长卿,治疗神经衰弱;新鲜建

兰根,榨汁或水煎服用,用于治疗肺结核咯血,等等。但现有文献对兰花根化学成分的研究报导屈指可数^[6],对于兰花根药理活性的研究尚未见报导。

本实验采用阴干的蕙兰根为实验材料,95%乙醇加热回流提取得到兰花根提取物,经石油醚等萃取,对石油醚萃取部位采用多种柱色谱法进行分离纯化,并结合薄层检识结果及核磁数据进行结构鉴定;对两种提取方法所得总提物及个别单体化合物进行细胞活性研究,以MTT法考察其对肝癌细胞SMMC-7721及小鼠乳腺癌细胞4T1的增殖抑制作用,以脂多糖(LPS)诱导巨噬细胞RAW264.7为炎症模型,检测NO释放浓度,以考察所得石油醚部位总成分及单体成分抗炎活性。对蕙兰根石油醚部位的化学成分及其体外细胞活性研究,为兰花根的开发利用提供依据。

收稿日期:2019-03-04

修回日期:2019-10-10

* 国家中医药管理局2018年中央财政公共卫生服务补助资金(2100601)中医(民族医)药资源普查专项,负责人:陈随清。

** 通讯作者:陈随清,博士研究生导师,教授,主要研究方向:中药材鉴定及中药材质量评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

本实验所用兰花根样品采自河南省南阳市桐柏县,经河南中医药大学陈随清教授鉴定,样品为兰科(Orchidaceae)兰属(*Cymbidium* Sw.)植物蕙兰(*Cymbidium faberi* Rolfe.)的干燥根^[7]。

样品置于室内阴干后,干燥试样呈不规则弯曲或卷曲长圆柱状,直径约4 mm,表面呈浅棕色或黄棕色,具有不规则横纹及纵纹。质轻而脆,木部呈类白色或类白色,细长,直径约1 mm,质硬,皮部与木部几乎完全分离。

1.1.2 细胞材料

巨噬细胞 RAW264.7、小鼠乳腺癌细胞 4T1(购自上海中科院细胞库),人肝癌细胞 SMMC-7721(武汉普诺赛生命科技有限公司)。

1.1.3 仪器与试剂

TRACE 1310/TSQ 8000 GC-MS联用仪(三重串联四级杆,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);超导核磁共振仪(DPX-400 型)(瑞士 Bruker 公司);质谱仪(LTQ-Orbitrap XL Hybrid 型)(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);1260 型半制备高效液相色谱仪(配有四元泵、在线脱气机、自动进样器、自动馏分收集器、UV 检测器和 Chemstation 工作站,美国 Agilent 公司);LC-52 型半制备高效液相色谱仪(配有二元泵,UV 检测器);转蒸发仪(N-1000 型)(上海爱朗仪器有限公司)。

Thermo Fisher Scientific 371 型 CO₂ 恒温细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),SW-CJ-2F 型超净工作台(广州市深华生物技术有限公司),GR60DF 型高压蒸汽灭菌锅(厦门致微仪器有限公司),BSA 124 S、BT 25 S 型分析天平(赛多利斯科技仪器有限公司),2 μL、10 μL、200 μL、1000 μL 移液枪(德国 Eppendorf 艾本德公司),TD 5 型低速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司),Motic AE 2000 型倒置显微镜,BCD-315 TNGS 型低温冰箱(青岛海尔股份有限公司),Varioskan™ LUX 型全自动多功能酶标仪(美国赛默飞世尔公司),MX-S 型涡旋混合仪(大龙兴创实验仪器有限公司),血球计数板(上海市求精生化试剂仪器有限公司)。

薄层层析硅胶 G、GF254(颗粒范围 10–40 μm),柱层析硅胶 G(160–200 目、200–300 目)(购自青岛海洋化工厂),分析纯甲醇、正丁醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷、石油醚等(购自天津市致远化学试剂有限公司,天津市富宇精细化工有限公司)。

RPMI-1640 培养基、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、脂多糖(LPS)、胰蛋白酶(0.25% EDTA)、青霉素-链霉素混合液(双抗)(以上均购自索莱宝生物科技有限公司),DMSO(上海麦克林生化试剂有限公司、美国 Sigma 公司),四季青胎牛血清(FBS)(浙江天杭生物科技有限公司),Corning DMEM 培养基(美国 Corning 公司)、LONSERA 胎牛血清(FBS),羰基二胺盐酸盐、磺胺、亚硝酸钠(上海麦克林生化试剂有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 单体化合物提取分离方法

取兰花根干燥药材 5.6 kg,加以 95% 乙醇连续回流提取 3 次(每次 2 h),合并提取液,减压抽滤,滤去药渣。滤液经真空减压浓缩,至无醇味浸膏状,得兰花根 95% 乙醇总提物浸膏 869.2 g。浓缩浸膏加以适量蒸馏水混悬,使用有机试剂(石油醚、乙酸乙酯、水饱和正丁醇),依试剂极性由低到高,进行多次重复萃取,单次萃取液料比为 1 : 1,同一溶剂反复萃取 5 次以上(含 5 次),至萃取液基本无色时更换为下一溶剂。将萃取所得石油醚部位进行减压浓缩,挥至干膏,共得石油醚部位萃取物(79.1 g)。

使用 100 目硅胶,对石油醚部位萃取物拌样、装柱,以石油醚:氯仿体系梯度(100 : 1, 80 : 1, 50 : 1, 20 : 1, 10 : 1, 3 : 1)顺次洗脱,收集流出液。根据 GF254 薄层板硅胶板检识结果,对具有相同薄层行为的流出液合并,反复利用吸附色谱法(硅胶柱层析)、分配色谱法(凝胶)(二氯甲烷:甲醇)以及重结晶的方法,对该部分成分进行分离纯化。对单体化合物进行薄层检识及 ¹³C-NMR, ¹H-NMR 等分析,确定结构。

1.2.2 细胞活性研究方法

(1) 细胞培养

巨噬细胞 RAW 264.7、人肝癌细胞 SMMC-7721、小鼠乳腺癌细胞 4T1 均为贴壁生长细胞。细胞复苏后,传代培养 3 代以上,待细胞状态稳定,以适量浓度接种于培养皿中,根据细胞类型及生长要求不同,分别选择加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 或 RPMI-1640 完全

培养基。将细胞培养皿置于37℃恒温、5%CO₂稳定及湿度饱和的培养箱中培养,根据传代培养观察细胞生长状态,取对数生长期细胞进行实验。

(2)细胞抑制增殖实验(MTT法)

取对数生长期细胞,以细胞浓度为 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,每孔100 μL 接种于96孔培养板中,培养12 h。取出培养板,吸出上清液弃去,设正常组与给药组(石油醚萃取物总部位给药浓度梯度为 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,单体化合物给药浓度梯度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $6.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3.125 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),每个浓度设3个复孔。给药组各孔加入相应浓度药物200 μL ,正常组加入不完全培养基200 μL ,培养24 h。吸出上清液弃去,每孔加入100 μL 不完全培养基及20 μL MTT($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),孵育4 h。终止培养,吸取孔内上清,弃去。每孔加入150 μL DMSO,摇床振荡15 min,酶标仪570 nm测各孔OD值,记录结果。

(3)NO浓度标曲测定

称取亚硝酸钠,按比例加入蒸馏水配制成 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚硝酸钠溶液,以 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚硝酸钠为母液,稀释为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $6.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3.125 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.5625 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.7813 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.3906 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.1953 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.0977 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.0488 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.0224 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,共13个不同浓度点。酶标仪540 nm测各孔OD值,绘制标准曲线。

(4)抗炎活性测定(NO浓度)

取巨噬细胞RAW 264.7,以细胞浓度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$,每孔100 μL 接种于96孔培养板中,培养12 h。取出培养板,吸出上清液弃去,设立正常组,模型对照组(LPS,浓度 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),阳性对照组(地塞米松,浓度 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),给药组(依MTT结果设定浓度,药物以含 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS的不完全培养基稀释),每个浓度3个复孔,各孔加入相应浓度药物200 μL ,培养24 h。终止培养,取各孔上清100 μL ,加入Griess试剂(试剂A[1%磺胺磷酸溶液(5%):试剂B(0.1%的萘基乙烯基二胺)]1:1)100 μL ,反应15分钟,酶标仪540 nm测各孔吸光值,代入标曲计算NO浓度。

(5)数据处理

检测及计算所得数据导入GraphPad Prism 7.00软

件,绘制柱状图,并以空白组或模型组作对照。对数结果进行t检验,根据P值衡量各药物作用显著性。

2 结果与分析

2.1 提取分离法结果与分析

化合物1(25 mg)白色针晶,易溶解于三氯甲烷等。1%茴香醛-浓硫酸显紫红色,提示可能为甾体类化合物。¹H-NMR(500 MHz, in DMSO)数据显示,不饱和区 δ 5.33(1H, s)为烯烃氢信号, δ 3.97(1H, d, $J=2.3 \text{ Hz}$), δ 3.93(1H, m)为连氧叔碳氢信号。¹³C-NMR(125 MHz, in DMSO)谱显示,不饱和区仅两条谱线,即 δ : (145.2, 128.8),对应两个烯烃碳信号; δ : (72.2, 66.1)对应两个连氧季碳氢信号。其余碳信号为 δ : [55.6, 55.5, 54.1, 45.1, 42.0, 36.8, 36.3, 35.5, 33.3, 29.9, 28.9, 28.7, 27.7, 26.4, 23.8, 22.6, 20.9, 20.5, 19.7, 18.9, 18.6, 11.8(末端CH₃), 11.7(末端CH₃)],以上数据与文献^[8]中NMR数据进行对比,本实验碳谱中 δ : [39.7(C-8), 39.1(C-11)]两处碳信号与溶剂峰重叠,其余信号基本一致,故确定该化合物为豆甾-4-烯-3 β , 6 β -二醇。

化合物2(125 mg)白色片状结晶,溶于二氯己烷、三氯甲烷、丙酮等有机溶剂。GF254硅胶薄层层析识,碘蒸显棕黄色斑点,1%茴香醛浓硫酸显色呈紫红色斑点。¹H-NMR(500 MHz, in CDCl₃)谱中,较明显的质子氢信号化学位移值为 δ : [5.33(1H, d, $J=4.0 \text{ Hz}$), 3.50(1H, m), 2.26(2H, m), 1.98(2H, m), 1.51(br, (CH₂)_n), 1.09(br, s, (CH₂)_n), 0.66(3H, s), 0.78(3H, d, $J=8.4 \text{ Hz}$), 0.81(3H, d, $J=4.1 \text{ Hz}$), 0.84(3H, d, $J=8.8 \text{ Hz}$)]. ¹³C-NMR(125 MHz, in CDCl₃)谱图中共显示出28条碳谱谱线,即表明该化合物结构中共有28种碳原子,化学位移值为 δ : (11.8, 12.0, 18.8, 19.0, 19.4, 19.8, 21.1, 23.1, 24.3, 26.1, 28.2, 29.1, 31.7, 31.9, 33.9, 36.1, 36.5, 37.2, 39.8, 42.3, 42.3, 45.8, 50.1, 56.0, 56.8, 71.8, 121.7, 140.7),其中 δ 31.9处谱线积分值为其余谱线二倍,故推断该化合物共有29个碳原子, δ 121.7, δ 140.7两处为烯碳特征信号峰,证明该化合物结构中含有不饱和双键结构。查阅文献^[9-10]NMR数据,进行对比,确定该化合物为 β -谷甾醇。

化合物3(20 mg)白色结晶,易溶解于二氯甲烷、三氯甲烷等低极性有机溶剂。1%茴香醛-浓硫酸显色,加热后呈紫红色斑点,提示可能为甾体类化合物。¹H-NMR(500 MHz, in CDCl₃)谱中,氢信号主要

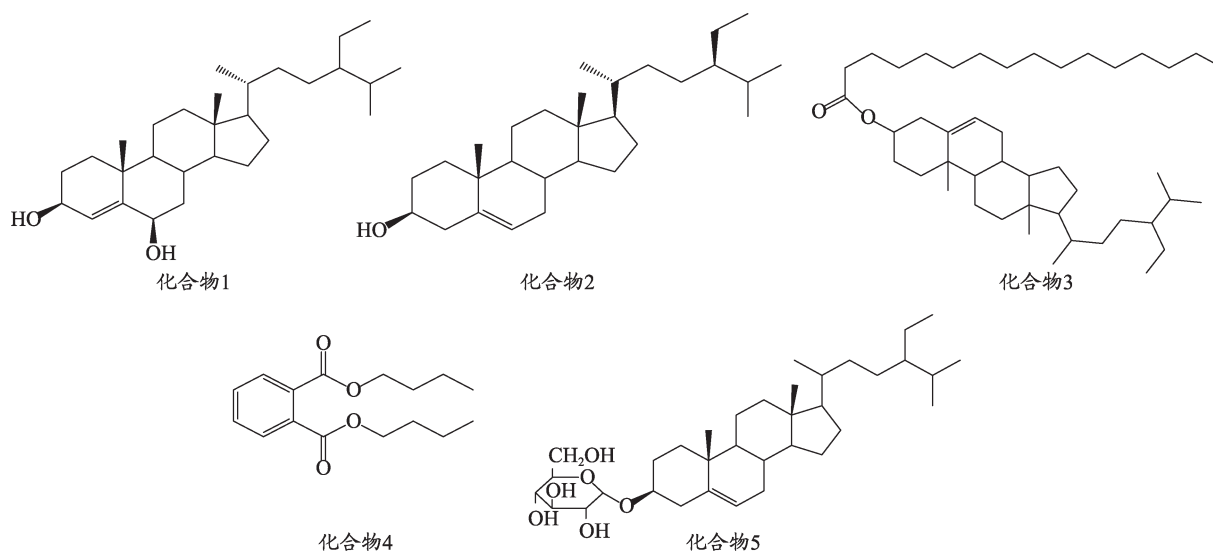


图1 化合物1-5结构图

集中于高场区,含有较多非连氧脂肪氢信号,在低场区 δ 5.35(1H,d, J = 3.8 Hz)处可见到烯烃质子信号,另含一组 δ 4.60(1H,m)处可见的连氧烷烃氢信号,高场区 δ : [1.00(3H,s),0.66(3H,s)]为与季碳相连的甲基氢信号, δ 1.27(br.s,(CH₂)_n)显示信号重叠的多个—CH₂—结构。¹³C-NMR(125 MHz,in CDCl₃)谱中,不饱和区 δ 173.3为羰基碳信号, δ 139.7和 δ 122.5处对应烯碳信号,其余信号中 δ 73.6为连氧叔碳信号, δ : (11.8, 11.9, 14.1, 18.8, 19.0, 19.3, 19.8)为末端甲基碳信号, δ : (21.0, 22.7, 23.1, 24.3, 25.1, 26.1, 27.8, 28.2, 29.1, 29.1, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 29.7, 29.7 $\times$ 3, 31.9, 31.9, 31.9, 33.9, 34.7, 36.1, 36.6, 37.0, 38.2, 39.7, 42.3, 45.8, 50.0, 56.0, 56.7)为饱和脂肪碳信号。以上数据与文献^[11]中NMR数据对照,确定该化合物为 β -谷甾醇棕榈酸酯。

化合物4(16 mg)无色油状,易溶于三氯甲烷等有机溶剂。¹H-NMR(500 MHz,in MeOD)数据显示6组氢信号,其中2组不饱和区氢信号 δ : [7.71(1H,d, J = 9.0 Hz), 7.60(1H,d, J = 9.0 Hz)]为邻位芳氢信号, δ 4.28(2H,t, J = 6.6 Hz)为连氧亚甲基氢信号, δ : [1.71(2H,m), 1.45(2H,m)]为亚甲基氢信号, δ 0.94(3H,t, J = 7.5 Hz)为甲基氢信号。¹³C-NMR(125 MHz,in MeOD)显示8组碳信号,其中4组不饱和区碳信号分别为 δ : (169.3, 133.6, 132.3, 129.9), δ 169.3处为羰基碳信号,其余3组为芳碳信号;饱和区 δ 65.5为连氧碳信号, δ 30.5, δ 19.1, δ 13.7(末端CH₃)为饱和脂肪链碳信号。结合以上信息,判断该结构中含一个邻位二取

代苯环,且两个取代基结构相同。以上数据与文献^[12]中谱数据对比,确定该化合物为邻苯二甲酸二丁酯。

化合物5(50 mg)白色片状结晶,溶解于甲醇等有机溶液。1%茴香醛-浓硫酸显色,加热后呈紫红色斑点;莫立许反应呈阳性。¹H-NMR(500 MHz,in DMSO)谱中, δ 5.32(1H,d, J = 4.9 Hz)为烯氢信号, δ 4.84-4.88(3H,br.m)为3个—OH活泼氢信号, δ 4.21(1H,d, J = 7.8 Hz)为 β -D-葡萄糖端基氢信号。¹³C-NMR(125 MHz,in DMSO)谱中,低场区 δ 140.4和 δ 121.2处为烯碳信号, δ 100.8为氧苷端基碳信号,其余C谱数据为 δ : (11.7, 11.8, 18.6, 18.9, 19.1, 19.7)为末端甲基碳信号, δ : (20.6, 22.6, 23.8, 25.4, 27.8, 28.7, 29.2, 31.4, 31.4, 33.3, 35.5, 36.2, 36.8, 38.3, 41.8, 45.1, 49.6, 55.4, 56.2)为饱和脂肪碳信号, δ 61.1为连氧仲碳信号, δ : (70.1, 73.5, 76.8 $\times$ 2, 76.9)为5个连氧叔碳信号。结合HMBC谱及HSQC谱,查阅文献^[13]中NMR数据,进行对比,确定该结构为胡萝卜苷。

化合物结构如图1所示。

2.2 细胞活性试验结果与分析

2.2.1 MTT 结果

兰花根提取物石油醚萃取部位、豆甾-4-烯-3 β ,6 β -二醇对巨噬细胞RAW 264.7无明显细胞增殖抑制作用,细胞存活率均大于90%。作用于人肝癌细胞SMMC-7721后,石油醚部位给药浓度为25 μ g $\cdot$ mL⁻¹时有极显著增殖抑制作用,豆甾-4-烯-3 β ,6 β -二醇给药浓度为25 μ mol $\cdot$ L⁻¹时有显著增殖抑制作用,结果见图2。作用于小鼠乳腺癌细胞4T1后,石油醚部位在25

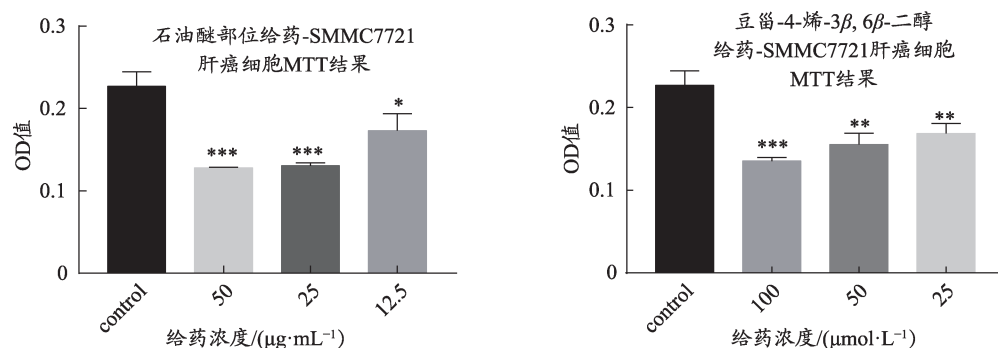


图2 提取物及单体对肝癌细胞增殖抑制活性

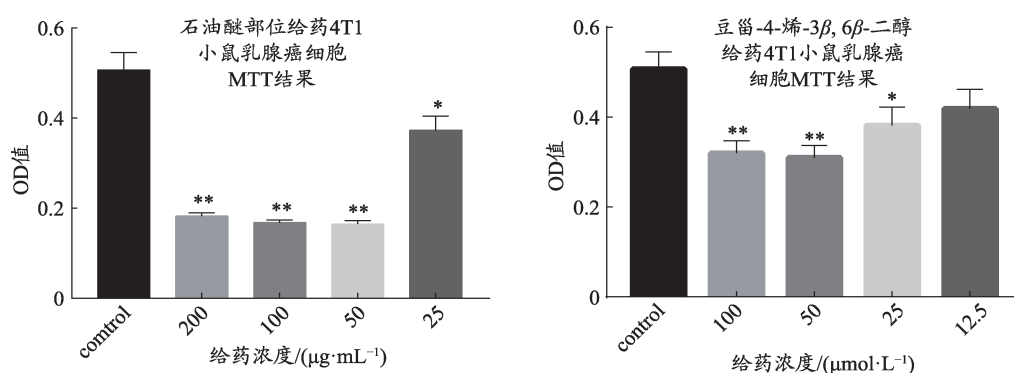
注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 

图3 提取物及单体对小鼠乳腺癌细胞增殖抑制活性

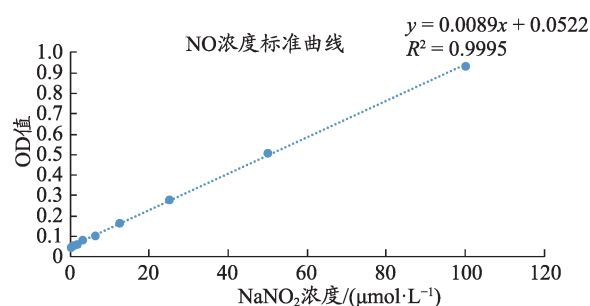
注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 

图4 NO浓度标准曲线

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 仍有极显著增殖抑制作用,豆甾-4-烯-3 β ,6 β -二醇给药浓度为25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时有显著增殖抑制作用,结果见图3。(图表绘制使用GraphPad Prism 7.00软件)。

2.2.2 抗炎活性(NO释放抑制)结果

兰花根提取物石油醚总部位对脂多糖(LPS)所致巨噬细胞炎症模型,有较强NO释放抑制活性,而豆甾-4-烯-3 β ,6 β -二醇,NO释放抑制活性不明显。NO标准曲线如图4,给药结果见图5。

3 讨论

兰花作为我国著名观赏花卉为高等植物,其生长进化级别较高,成分比较复杂。石油醚萃取部位在兰花根95%乙醇总提取物中占比为9.10%。该部分化学成分极性较小且较为集中,分离纯化有一定难度。本实验主要分离得到5个单体成分,分别为: β -谷甾醇棕榈酸酯(20 mg)、邻苯二甲酸二丁酯(16 mg)、豆甾-4-烯-3 β ,6 β -二醇(25 mg)、 β -谷甾醇(125 mg)、胡萝卜苷(50 mg),多为药用植物中常见化学成分,其中豆甾-4-烯-3 β ,6 β -二醇为兰科植物首次分离得到。

本实验体外活性研究结果显示,石油醚部位及单体豆甾-4-烯-3 β ,6 β -二醇,均在不同程度上具有抗炎及抗肿瘤(人肝癌 SMMC-7721、小鼠乳腺癌 4T1)活性,且石油醚部位活性优于豆甾-4-烯-3 β ,6 β -二醇。

有文献报导显示: β -谷甾醇对H22荷瘤小鼠具有一定的抑瘤作用^[14],对肺癌^[15]、肝癌^[16]、乳腺癌^[17]、胃癌^[18]、胰腺癌^[19-20]和宫颈癌^[21-22]等均有抑制增殖或诱导凋亡的作用,并有抗炎,降血脂等药理活性,对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和变形杆菌四种

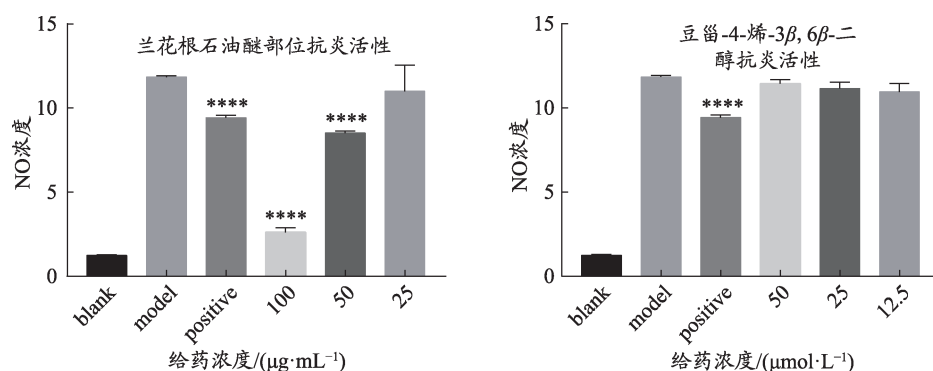


图5 提取物及单体化合物抗炎活性

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

细菌均有一定的抑制作用,且具有一定的抗氧化效果^[23-24];胡萝卜苷对HeLa和HepG-2细胞具有一定的细胞毒性作用^[25-27],对大肠杆菌有轻微的抑制活性,具有一定的抗氧化、降低血糖^[28]作用;邻苯二甲酸二丁酯的生物活性主要体现在对植物病菌的抑制作用,例如对茄子根际黄萎菌具的抑制作用及对水稻纹枯病菌、小麦赤霉病菌病原菌都有一定的杀菌活性^[29],但作用于人体,往往体现出一定的雌激素作用^[30],促进卵巢细胞凋亡,抑制卵巢的抗氧化能力^[31];β-谷甾醇棕榈酸酯未显示出对人肝癌细胞BEL-7402有细胞毒活性^[33]。兰科药用植物中,具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎作用的独蒜

兰、贝母兰、带叶卷瓣兰、杜鹃兰中均含有β-谷甾醇、胡萝卜苷等甾体类成分^[34-37]。

结合前人研究及本实验结果,我们认为兰花根基原种类较多,但目前进行分离研究的仅限于蕙兰根,且所得的化合物种类较少;兰花根(蕙兰根)石油醚部位具有明显的抗炎及抗肿瘤活性,但兰花根的具体药效成分及作用机制尚不明确,因此具有进一步研究和开发利用的药用价值;加之兰花观赏性高,根系发达,在大规模人工栽培、繁育和移植过程中,大量根及须根被废弃,因此,对兰花根的开发利用也有不容忽视的经济价值。

参考文献

- 李时珍. 本草纲目(上册). 北京: 人民卫生出版社, 1982:903-906.
- 王国强. 全国中草药汇编(卷二)(第三版). 北京: 人民卫生出版社, 2014: 391-393.
- 四川中药志编写组. 四川中药志. 成都: 四川人民出版社, 1979.
- 曾再新. 兰花的药用和食用价值. 中国花卉盆景, 1989, 6: 21.
- 余诚. 兰花的食用和药用价值. 花木盆景(花卉园艺), 2006, 9: 35-35.
- 葛晓瑾. 兰花根的化学成分及质量标准研究. 郑州: 河南中医药大学硕士研究生论文, 2017.
- 陈随清, 葛晓瑾, 刘傲雪, 等. 兰花根的生药学鉴别. 中药材, 2016, 39(9): 1993-1996.
- 王静, 费娇冬, 丁刚, 等. 流苏金石斛石油醚萃取部位化学成分研究. 中国药理学杂志, 2013, 48(16): 1343-1346.
- 李雯珊, 孙章华, 潘清灵, 等. 白木香内生真菌Fusarium sp.A2固体发酵产物的化学成分研究. 广东药学院学报, 2016, 32(2): 139-143.
- 葛利, 蓝柳凤, 暴惠宾, 等. 山蓝化学成分的初步研究. 广西植物, 2014, 34(2): 155-159+202.
- 李娟, 何峰, 尹娴, 等. 土贝母正丁醇部位化学成分研究. 华中师范大学学报(自然科学版), 2016, 50(5): 721-725.
- 苑祥, 张莉, 赵建强, 等. 短管兔耳草化学成分研究. 中草药, 2015, 46(10): 1437-1440.
- 薛灵爱, 马养民, 曹晓晖. 丛枝蓼化学成分的研究. 中成药, 2018, 40(3): 618-622.
- 林明珠, 赵岩, 蔡恩博, 等. β-谷甾醇对H₂(22)荷瘤小鼠体内抗肿瘤作用. 中国公共卫生, 2017, 33(12): 1797-1800.
- 周玲玉. β-谷甾醇对人肺癌细胞增殖、凋亡影响的初步研究. 重庆: 重庆医科大学硕士研究生论文, 2016.
- Wang L, Yang Y J, Chen S H, et al. Effects of beta-sitosterol on microtubular systems in cervical cancer cells. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2006, 86(39): 2771-2775.
- 陶仕英, 牛建昭, 王继峰, 等. β-谷甾醇对T47D细胞增殖和细胞周期的影响及作用机制探讨. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(2): 362-366.
- 王娟, 刘军权, 陈复兴, 等. β-谷甾醇对人共刺激细胞杀伤胃癌SGC-7901细胞的影响及其机制的探讨. 免疫学杂志, 2014, 30(7): 578-584.

- 19 Jourdain C, Tenca G, Degueray A, *et al.* In-vitro effects of polyphenols from cocoa and β -sitosterol on the growth of human prostate cancer and normal cells. *Eur J Cancer Prev*, 2006, 15(4): 353-361.
- 20 程静, 刘军权, 陈复兴, 等. β -谷甾醇对人自然杀伤细胞杀伤胰腺癌 SW-1990 细胞的影响. *检验医学与临床*, 2012, 9(24): 3078-3080+3082.
- 21 Jayaprakasha G K, Mandadi K K, Poulose S M, *et al.* Inhibition of colon cancer cell growth and antioxidant activity of bioactive compounds from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Bioorgan Med Chem*, 2007, 15(14): 4923-4932.
- 22 程大丽. β -谷甾醇对宫颈癌细胞株的抑制作用及其机制研究. 沈阳: 中国医科大学博士研究生论文, 2012.
- 23 赵小惠. 聚球藻中活性化合物的分离及抗菌、抗氧化活性研究. 烟台: 烟台大学硕士研究生论文, 2013.
- 24 刘慧琼, 郭书好, 沈英森, 等. 半夏中 β -谷甾醇的抗氧化作用研究. *广东药学院学报*, 2004, 3: 281-283.
- 25 郭海凤, 朴惠顺. 关龙胆抗肿瘤活性成分的研究. *华西药学杂志*, 2011, 26(3): 204-207.
- 26 曾俊权, 林晔, 刘婷婷, 等. 胡萝卜苷对人肝癌细胞株 HepG2 增殖、凋亡的影响及其机制探讨. *山东医药*, 2018, 58(23): 5-8.
- 27 刘星, 肖游章. 胡萝卜苷抑制 HepG-2 细胞增殖和迁移及拓扑异构酶表达. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2016, 25(5): 402-405.
- 28 张海悦. 狭叶荨麻中降血糖和抗疲劳活性成分的研究. 长春: 东北师范大学硕士研究生论文, 2011.
- 29 张良菊, 徐慧慧, 徐志红, 等. 对节白蜡树叶中挥发性成分提取、GC-MS 分析及杀菌活性研究. *河南农业科学*, 2017, 46(6): 80-83.
- 30 杨波, 李文兰, 季宇彬. 邻苯二甲酸丁基苄酯与邻苯二甲酸二丁酯的雌激素生物活性比较. *哈尔滨商业大学学报(自然科学版)*, 2002, 6: 613-614.
- 31 王昱. 邻苯二甲酸二丁酯致小鼠卵巢毒性的实验研究. *首都师范大学学报(自然科学版)*, 2014, 35(1): 25-30.
- 32 靳秋梅, 孙增荣. 邻苯二甲酸二丁酯的拟雌激素活性研究. *环境与健康杂志*, 2005, 4: 261-263.
- 33 景松松, 王颖, 李雪娇, 等. 黑籽重楼化学成分及其抗肿瘤活性研究. *中草药*, 2017, 48, 6: 1093-1098.
- 34 刘星星, 刘宏栋, 潘玲玲, 等. 独蒜兰化学成分及生物活性研究进展. *江西中医药大学学报*, 2019, 31(2): 106-111.
- 35 陈业高, 徐桃苹, 武荷云. 贝母兰属植物化学成分及药理活性研究进展. *时珍国医国药*, 2006, 3: 338-340.
- 36 晏和贵. 带叶卷瓣兰的化学成分、岩笋中萜类、芪类化合物的含量及生物活性研究. 大理: 大理大学硕士研究生论文, 2017.
- 37 韦红边, 吕享, 高晓峰, 等. 兰科药用植物杜鹃兰的研究进展. *贵州农业科学*, 2017, 45(7): 88-92.

Studies on the Chemical constituents from Petroleum Ether Portion of *Cymbidium Rhizoma*

Chen Jun¹, Ge Xiaojin², Fu Yu¹, Chen Suiqing¹

(1. Henan University of traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

2. Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Objective In this experiment, the petroleum ether extracts from *Cymbidium Rhizoma* were separated and purified by various column chromatography methods. Methods The structure of the monomer compounds was identified by combining physical and chemical properties and spectral analysis. Results Five monomer compounds were isolated from petroleum ether extracts, namely stigmasta-4-ene-3 β ,6 β -diol, β -sitosterol, β -sitosterolpalmitate, dibutylphthalate and daucosterol. The anti-inflammatory and anti-tumor activities of petroleum ether extracts and monomer compounds were studied by NO release assay and MTT method. The results showed that petroleum ether extracts and stigmasta-4-ene-3 β , 6 β -diol had significant inhibitory effects on the proliferation of human hepatoma SMMC-7721 and mouse breast cancer cell 4T1, and petroleum ether extracts had obvious anti-inflammatory effects. Conclusion It is concluded that the petroleum ether fraction of *Cymbidium Rhizoma* has certain anti-inflammatory and anti-tumor effects, and has the value of further research and development.

Keywords: *Cymbidium Rhizoma*, petroleum ether portion extracts, anti-inflammatory activity, anticancer activity

(责任编辑: 闫 群, 责任译审: 钱灵姝)