

云南松乳菇提取物体外自由基清除活性研究

文小玲^{1,2)}, 李 鲜²⁾, 唐丽萍²⁾, 张凯丽²⁾, 张 君²⁾, 李玉鹏²⁾

(1) 昆明医科大学人事处; 2) 药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 研究松乳菇 (*Lactarius deliciosus*) 95%乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、甲醇和水 6 种提取物的体外自由基清除活性. **方法** 采用 DPPH 自由基清除法对松乳菇五种提取物的体外自由基清除. **结果** 实验结果表明, 松乳菇乙酸乙酯提取部分的自由基清除效果最显著, 其 IC_{50} 为 0.26 mg/mL. **结论** 松乳菇提取物在自由基清除活性方面有一定的应用价值, 为松乳菇的开发应用提供了一定的科学依据.

[关键词] 松乳菇; 野生食用菌; 自由基清除活性

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 10-0019-03

Radical Scavenging Activity in Vitro of *Lactarius deliciosus* Extracts

WEN Xiao-ling^{1,2)}, LI Xian²⁾, TANG Li-ping²⁾, ZHANG Kai-li²⁾, ZHANG Jun²⁾, LI Yu-peng²⁾

(1) Dept. of Personnel; 2) School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the radical scavenging activity in vitro of 95% ethanol, petroleum ether, ethyl acetate, n-butanol, methanol and water extracts of *Lactarius deliciosus*. **Method** DPPH radical scavenging activity in vitro method was used to study the activities of five crude extracts of *Lactarius deliciosus*.

Result It was found that the ethyl acetate extract exhibited the best radical scavenging activity ($IC_{50} = 0.26$ mg/mL). **Conclusions** The extracts from *Lactarius deliciosus* have certain values in antioxidant aspect. The research provides scientific basis for utilizing this edible wild mushroom.

[Key words] *Lactarius deliciosus*; Wild edible fungi. Radical scavenging activity

乳菇属 (*Lactarius Pers*) 是担子菌红菇科 (Russulaceae) 下一个大属, 该属全球约 450 种^[1], 主要分布于北温带, 我国已经报道的乳菇属真菌约 131 种 (含 14 变种, 1 变型), 分布于全国各地, 大多种类可食, 少数有毒, 部分种类还具有药用价值^[2]. 乳菇属真菌中的倍半萜类化合物是该属真菌主要的次生代谢产物, 具有细胞毒、抗菌等活性^[3-11].

松乳菇 (*Lactarius deliciosus*) 食味鲜美, 分布广泛, 产量高, 易于采集, 是我国西南地区农贸市场最常见的野生食用菌之一. 该种具有较高的经济价值, 同时还具有一定的抗癌作用^[12,13], 但

关于松乳菇自由基清除活性未见报道, 笔者采用 DPPH 自由基清除法对松乳菇的体外自由基清除活性进行研究^[14-16].

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器 722 S 型可见分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司); 旋转蒸发器 (日本东京理化), FA 2004 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司).

1.1.2 试剂 DPPH (1, 1-二苯基-2-苦基胍自

[基金项目] 云南省应用基础研究基金资助项目 (2012FB156); 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (09Y0182)

[作者简介] 文小玲 (1976~), 女, 湖南永州市人, 理学硕士, 讲师, 主要从事医学统计和天然药物研究工作.

[通讯作者] 唐丽萍. E-mail: lipingtang11@qq.com; 李玉鹏. E-mail: liyupeng26@126.com.

由基, Sigma-Fluka 公司产品); 芦丁对照品 (中国医药集团贵州生物试剂公司); 95%乙醇 (分析纯, 天津化学试剂有限公司), 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 真菌来源

松乳菇于 2009 年 8 月 29 日购自云南省昆明市环西桥农贸市场, 标本保存于昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室。

1.3 提取与分离

新鲜松乳菇 (440 g), 用 95%乙醇提取 5 次, 减压回收至无乙醇味, 得乙醇提取物 12.2 g。乙醇提取物加水溶解, 依次用石油醚 (1.0 g), 乙酸乙酯 (2.6 g), 正丁醇 (1.7 g), 甲醇 (2.8 g) 进行萃取, 水相蒸干得到 (4.1 g) 对各提取物均进行体外自由基清除活性筛选。

1.4 自由基清除活性测定

1.4.1 DPPH 液的配制 准确称取 DPPH 试剂 25 mg, 用 95%分析纯的乙醇溶解, 并定量转入 250 mL 容量瓶中, 用 95%乙醇定容, 摇匀, 得质量浓度为 100 mg/L 的 DPPH 储备液, 置于冰箱中冷藏备用^[13-15]。

1.4.2 样品溶液的配制 准确称取待测试样品 20 mg, 溶解在分析纯的乙醇中, 并转入 100 mL 的容量瓶中, 用乙醇摇匀, 定容, 得质量浓度为 200 mg/L 的样品溶液, 置于冰箱中冷藏备用。

1.4.3 芦丁标准溶液的配制 准确称取芦丁 2.5 mg, 溶解在分析纯的乙醇中, 并转入 100 mL 的容量瓶中, 用乙醇定容, 摇匀, 得质量浓度为 25 mg/L 的样品溶液, 置于冰箱中冷藏。

1.4.4 DPPH 自由基清除能力的测定 准确量取 1.2 mL DPPH 液, 加入 2.8 mL 95%乙醇溶液, 混匀, 在 $\lambda = 520$ nm 测吸光度作为 A_c 值, 自由基清除率为零。分别准确量取各样品溶液 0.2、0.4、

0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 mL, 加入 1.2 mL DPPH 液及 2.6、2.4、2.2、2.0、1.8、1.6、1.4、1.2 mL 的 95%乙醇溶液混合均匀, 在 $\lambda = 520$ nm 测吸光度作为 A_i 值。另外分别准确量取各样品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 mL, 加入 3.8、3.6、3.4、3.2、3.0、2.8、2.6、2.4 mL 的 95%乙醇溶液后混合均匀, 在 $\lambda = 520$ nm 测吸光度作为空白校正 A_j 值。以芦丁作为阳性对照, 按下式计算自由基清除率 K 值。

$$K = \frac{1 - (A_i - A_j)}{A_c} \times 100\%$$

1.5 统计学处理

采用 SPSS 软件包进行方差分析, 两两比较用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

结果显示, 松乳菇提取物对 DPPH 自由基的清除率存在量效关系, 但不同提取物自由基清除作用不同。相对其它提取物, 乙酸乙酯提取物清除率较高; 甲醇和水提取物对 DPPH 自由基的清除率较低。研究表明松乳菇自由基清除物质主要集中在乙酸乙酯萃取部分, 见表 1。方差分析及 q 检验显示, 甲醇、水、95%乙醇、正丁醇之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其余两两之间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 以乙酸乙酯清除率最高, 其次为石油醚, 最低为甲醇、水、95%乙醇和正丁醇。

相对于其它提取物的 IC_{50} 值, 松乳菇的乙酸乙酯提取物对 DPPH 自由基清除活性 IC_{50} 值较小 ($IC_{50} = 0.26$ mg/mL), 表明该提取物具有较强的自由基清除活性, 而正丁醇和水提取物清除自由基的活性相对较弱 ($IC_{50} = 170.81, 57.93$ mg/mL), 见表 2。

表 1 松乳菇提取物 DPPH 自由基清除率

Tab. 1 The DPPH free radicals clearance rate of *Lactarius deliciosus* extract

名称	K (%)							
	0.04 mg	0.08 mg	0.12 mg	0.16 mg	0.20 mg	0.24 mg	0.28 mg	0.32 mg
95%乙醇	2.38	4.10	5.43	5.96	6.62	7.02	13.90	15.10
石油醚	8.97*	9.65*	13.18*	13.45*	16.98*	18.48*	24.86*	31.52*
乙酸乙酯	5.19*	15.85*	22.62*	28.10*	38.90*	45.39*	56.20*	59.22*
正丁醇	5.43	6.09	7.10	7.28	7.42	8.74	10.20	11.12
甲醇	0.13	0.14	0.82	1.51	1.79	2.20	2.34	3.71
水	1.08	1.35	1.39	1.54	2.16	2.78	3.09	4.63

两两比较, * $P < 0.05$ 。

表 2 松乳菇提取物清除 DPPH 自由基活性的 IC₅₀ 值
 Tab. 2 IC₅₀ values of *Lactarius deliciosus* extracts in DPPH free radicals clearance

名 称	DPPH (IC ₅₀ /mg)
95%乙醇萃取部分	3.21
石油醚萃取部分	1.67
乙酸乙酯萃取部分	0.26
正丁醇萃取部分	170.81
甲醇萃取部分	2.05
水相	57.93
芦丁	0.063

3 讨论

本研究表明松乳菇的乙酸乙酯、石油醚和甲醇提取物活性较好, 自由基清除 IC₅₀ 分别为 0.26, 1.67 和 2.05 mg/mL, 乙酸乙酯提取部分体外自由基清除活性最强, 松乳菇作为民间独特的食用菌, 深受云南各族人民的喜爱, 该研究为松乳菇开发和应用研究提供了科学依据. 在此研究基础上, 笔者将进一步采用新的药理活性筛选方法跟踪, 分离新的活性成分. 国内学者^[17,18]对乳菇属真菌的化学成分及其生物活性方面的研究进行了综合分析和论述, 查阅文献发现该属真菌含有倍半萜、甾醇、含氮化合物等多种结构类型的化合物, 具有明显的生物活性, 但目前对该属真菌活性成分和其作用机制研究还不够深入, 食用乳菇的安全性也缺乏系统评价. 因此, 进一步明确乳菇属真菌子实体或发酵产物中的活性成分, 并阐明其构效关系和作用机制, 将为食用菌的研究和开发提供理论依据, 同时也为新天然药物或农药先导化合物的发现找到新的科学依据.

[参考文献]

- [1] KIRK P M, CANNON P F, MINTER D W, et al. Dictionary of the Fungi (10th ed.) [M]. Wallingford UK, 2008:358.
- [2] 黄年来. 中国大型真菌原色图鉴[M]. 北京:中国农业出版社, 1998:216.
- [3] MARIA D E BERNARDI, GIOVANNI VIDARI, PAOLA VITA FINZI. The Chemistry of *Lactarius fuliginosus* and *Lactarius picinus* [J]. Tetrahedron, 1992, 48(35):7 331 – 7 344.
- [4] OLOV BERGENDORFF, OLOV STERNER. The sesquiterpenes of *Lactarius deliciosus* and *Lactarius deterrimus* [J]. Phytochemistry, 1988, 27(1):97 – 100.
- [5] JIAN – MIN YUE, SHAO – NONG CHEN, ZHONG – W – EN LIN, et al. Sterols from fungus *Lactarium volemus* [J]. Phytochemistry, 2001, 56(8):801 – 806.
- [6] YYAOLTA. MENDO, MKIKUCHI. Sterol constituents from seven mushrooms [J]. Chem Pharm Bull, 1999, 47(6):847 – 851.
- [7] ZHONG – YU ZHOU, JIAN – WEN TAN, JI – KAI LIU. Two new polyols and a new phenylpropanoid glycoside from the basidiomycete *Lactarius deliciosus* [J]. Fitoterapia, 2011, 82(8):1 309 – 1 312.
- [8] YASUNORI YAOITA, HITOMI ONO, AND MASAO KIKUCHI. A New Norsesquiterpenoid from *Russula delica* FR [J]. Chem Pharm Bull, 2003, 51(8):1 003 – 1 005.
- [9] MARCO CLERICUZIO, FUSHENG PAN, FUGUI HAN, et al. Stearoyldelicone, an unstable protoilludane sesquiterpenoid from intact fruit bodies of *Russula delica* [J]. Tetrahedron Letters, 1997, 38(47):8 237 – 8 240.
- [10] MARCO CLERICUZIO, JIAN F U, FUSHENG PAN, et al. Structure and absolute configuration of protoilludane sesquiterpenes from *russula delica* [J]. Tetrahedron, 1997, 53(28):9 735 – 9 740.
- [11] 汤建国, 邵红军, 刘吉开. 变绿红菇化学成分研究[J]. 中草药, 2008, 39(12):1 776 – 1 778.
- [12] 王向华, 刘培贵, 于富强. 云南野生商品蘑菇图鉴[M]. 昆明:云南科技出版社, 2004:65.
- [13] 袁明生, 孙佩琼海. 四川蕈菌[M]. 成都:四川科技出版社, 2000:333.
- [14] 陈亚萍, 邱开雄, 陈亚娟, 等. 干巴菌抗氧化活性研究[J]. 昆明医学院学报, 2012, 33(1):40 – 42.
- [15] 陈亚萍, 李玉鹏, 郭蕴苹, 等. 绿菇抗氧化活性研究[J]. 昆明医科大学学报, 2013, 34(3):12 – 14.
- [16] 汪海波, 肖建青, 刘锡葵. 野生蔬菜苦凉菜抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(6):1 – 3.
- [17] 杨颖, 鲍泥满, 邵红军, 等. 乳菇属真菌化学成分及其生物活性研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(2):274 – 279.
- [18] 董丁, 李广义. 乳菇属真菌的化学成分和活性研究概况 [J]. 天然产物研究与开发, 1991, 3(4):66 – 80.

(2014 – 06 – 12 收稿)