

## 云南球花石斛提取物体外自由基清除活性研究

张凯丽<sup>1, 3)</sup>, 文小玲<sup>1, 2)</sup>, 孙孔春<sup>1)</sup>, 翁瑞旋<sup>1)</sup>, 张君<sup>1)</sup>, 李玉鹏<sup>1)</sup>

(1) 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室; 2) 人事处, 云南昆明 650500; 3) 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

**[摘要]** 目的 研究药用植物球花石斛 (*Dendrobium thysiflorum*) 95%乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、甲醇5种粗提物体外自由基清除活性. 方法 采用DPPH自由基清除法对云南球花石斛五种提取物的体外自由基清除作用进行研究. 结果 球花石斛乙酸乙酯粗提物的自由基清除效果最显著, 其IC<sub>50</sub>为0.11 mg/mL. 结论 球花石斛提取物在自由基清除活性方面有一定的应用价值, 该研究工作对球花石斛的开发应用, 提供一定的科学依据.

**[关键词]** 球花石斛; 药用植物; 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 (2015) 02-0001-03

## Study on Radical Scavenging Activity in Vitro of *Dendrobium thysiflorum* Extracts in Yunnan

ZHANG Kai-li<sup>1, 3)</sup>, WEN Xiao-ling<sup>1, 2)</sup>, SUN Kong-chun<sup>1)</sup>, WENG Rui-xuan<sup>1)</sup>, ZHANG Jun<sup>1)</sup>, LI Yu-peng<sup>1)</sup>

(1) School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products; 2) Dept. of Personnel, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 3) Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the radical scavenging activity in vitro of five extracts of *Dendrobium thysiflorum* extracted by 95% ethanol, petroleum ether, ethyl acetate, n-butanol and methanol. **Method** DPPH radical scavenging activity in vitro method was used to research the radical scavenging activity in vitro of five crude extracts of *Dendrobium thysiflorum*. **Result** Among the five extracts of *Dendrobium thysiflorum*, the ethyl acetate extract exhibited the highest scavenging activity (IC<sub>50</sub> = 0.11 mg/mL). **Conclusions** The extracts from *Dendrobium thysiflorum* have a certain value in radical scavenging. The research provides scientific basis for utilizing this medicinal plant

**[Key words]** *Dendrobium thysiflorum*; Medicinal plant; Radical scavenging activity

石斛为兰科 (*Orchidaceae*) 石斛属 (*Dendrobium* Sw.) 多种植物的新鲜或干燥茎的统称. 石斛属是兰科植物中一个较大的属, 广泛分布于亚洲、欧洲和大洋洲等地. 在《神农本草经》中, 石斛被列为上品, 具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳、明目强身等功效<sup>[1]</sup>. 球花石斛<sup>[2]</sup> (*Dendrobium thysiflorum* Rehb. f.), 为兰科石斛属 (*Dendrobium* Sw) 多年生草本植物, 附生于海拔 1 100 ~ 1 800 m 的山地林中树干上. 分布于云南南部至西南部,

印度东北部、缅甸、泰国、老挝、越南亦产. 为满足石斛商品市场的需要, 于 1998 年被收入江苏省药材标准. 从球花石斛分得联苜、菲类、茛酮、香豆素和多糖等类型的化学成分<sup>[3-11]</sup>.

为了开发和应用该药用植物, 寻找到该植物药用物质基础, 在对云南产束花石斛体外抗氧化活性研究的基础上<sup>[12]</sup>, 笔者对云南产球花石斛体外自由基清除活性进行研究.

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (21202066); 云南省应用基础研究基金资助项目 (2012FB156); 云南省天然药物药理重点实验室开放研究基金资助项目 (2014G011)

**[作者简介]** 张凯丽 (1991 ~), 女, 河南郑州市人, 硕士研究生, 主要从事天然药物化学成分和药理活性研究工作.

**[通讯作者]** 文小玲. E-mail:wenziaoling96@126.com; 李玉鹏. E-mail:liyupeng26@126.com

## 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); 旋转蒸发仪 (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-苦基肼自由基, 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 植物来源

球花石斛采自云南西双版纳, 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

球花石斛 (0.30 kg), 用 95%乙醇提取 5 次, 减压回收至无乙醇味, 得乙醇提取物 21.0 g。乙醇提取物用水溶解, 依次用石油醚, 乙酸乙酯, 正丁醇, 甲醇进行萃取, 减压浓缩后分别得到石油醚 (5.0 g), 乙酸乙酯 (4.2 g), 正丁醇 (3.7 g), 甲醇 (5.0 g) 五个部分。乙醇提取物和萃取的各部分分别取 20 mg 进行体外自由基清除活性测试。

### 1.4 自由基清除活性测定<sup>[12-14]</sup>

**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<sup>[12, 13]</sup>。

**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, 用乙醇定容, 摇匀, 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 清除 DPPH 自由基能力的测定** 准确量取 1.2 mL DPPH 液, 加入 2.8 mL 95%乙醇溶液, 混匀, 在  $\lambda = 520 \text{ nm}$  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  $\lambda = 520 \text{ nm}$  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  $\lambda = 520 \text{ nm}$  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, 相关分析用直线相关分析。

## 2 结果

结果显示, 球花石斛乙醇提取物及其不同溶剂萃取部分对 DPPH 自由基的清除率随着量的加大有逐步增强的趋势; 但不同提取物自由基清除作用差别较大, 乙酸乙酯萃取部分相对其它提取物清除率略高, 方差分析差异有统计学意义 ( $F = 82.999$ ,  $P < 0.001$ ), 两两比较 ( $q$  检验) 各组清除率 (%) 都不相同 ( $P < 0.05$ )。各粗提取物与 DPPH 自由基清除率呈高度正相关, 相关系数均大于 0.7,  $P$  值均小于 0.001 (表 1)。球花石斛的乙醇粗提物、乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物对 DPPH 自由基清除活性  $IC_{50}$  值相对于其它提取物的  $IC_{50}$  值较小, 表现了较强的自由基清除活性, 但比芦丁弱, 见表 2。

表 1 球花石斛提取物 DPPH 自由基清除率 (mg)

Tab. 1 The DPPH free radicals clearance rate of *Dendrobium thysiflorum* extract (mg)

名称	K (%)							
	0.04	0.08	0.12	0.16	0.20	0.24	0.28	0.32
石油醚*	6.2	9.2	9.4	16.5	18.4	21.3	25.9	26.5
乙酸乙酯*	20.9	34.6	50.7	60.9	70.9	82.7	82.8	84.3
正丁醇*	39.4	64.9	78.9	82.5	82.7	83.1	83.2	84.1
甲醇*	0.8	4.1	4.3	5.9	9.6	10.1	11.7	11.8
95%乙醇*	10.2	19.0	25.9	33.9	39.3	46.0	53.7	59.9

两两比较, \* $P < 0.05$ 。

表2 球花石斛提取物清除 DPPH 自由基活性的 IC<sub>50</sub> 值  
Tab. 2 IC<sub>50</sub> values of *Dendrobium thyrsiflorum* extracts in DPPH free radicals clearance

名称	DPPH (IC <sub>50</sub> /mg.mL)
石油醚萃取部分	1.09
乙酸乙酯萃取部分	0.11
正丁醇萃取部分	4.52
甲醇萃取部分	1.29
95%乙醇提取物	0.26
芦丁	0.063

### 3 讨论

石斛为兰科石斛属植物, 全世界兰科约有 500 属, 15 000 多种; 石斛属是兰科中最大的属之一. 我国石斛属植物有 74 种 2 变种, 云南有 39 种; 石斛为多年生附生性草本植物, 常附生于密林树干或岩石上, 并常与苔藓植物伴生<sup>[5]</sup>. 由于近年对野生药用石斛的过度挖掘, 许多种类处于濒危状态. 国内外学者研究石斛属植物的化学成分发现该属植物所含的化学成分类型多样主要包括生物碱、菲类、联苳类、苋酮类、倍半萜类及香豆素等化学成分<sup>[6]</sup>. 石斛为常用中药材, 研究发现石斛具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳等功能, 用于热病伤津、口干烦渴、病后虚热等多种病症. 现代药理学研究表明, 石斛具有广泛的药理作用<sup>[7]</sup>. 研究表明球花石斛的乙酸乙酯提取物活性较好, 自由基清除 IC<sub>50</sub> 为 0.11 mg/mL, 进一步研究该部分化学成分, 可能得到自由基清除活性较强的化合物.

笔者首次用 DPPH 自由基清除活性研究方法对该植物不同溶剂提取物自由基清除活性进行研究, 该研究为其研究开发和应用提供了科学依据. 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, 分离得到新的活性成分.

#### [参考文献]

[1] 江苏新医学院编. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 586 - 589.

- [2] 陈心启, 吉占和, 罗毅波. 中国野生兰科植物彩色图鉴 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 190.
- [3] 张光浓, 张朝凤, 王峥涛, 等. 球花石斛的化学成分研究 [J]. 中国天然药物, 2004, 2(2): 78 - 81.
- [4] 张光浓, 张朝凤, 罗英, 等. 球花石斛的化学成分研究 [J]. 中国天然药物, 2005, 3(5): 287 - 290.
- [5] WRIGLEYT C. Ayapin, scopoletin and 6,7-dimethoxy coumarin from *Dendrobium thyrsiflorum* [J]. Nature, 1960, 188(3): 1 108.
- [6] YAN-YAN LIU, HONG Y U, YE-GAO CHEN. Chemical constituents of *Dendrobium thyrsiflorum* [J]. Chemistry of Natural Compounds, 2011, 47(2): 275 - 276.
- [7] GUANG-NONG ZHANG, LING-YAN ZHONG, S.W. AN-NIE BLIGH, et al. Bi-bicyclic and bi-tricyclic compounds from *Dendrobium thyrsiflorum* [J]. Phytochemistry, 2005, 66(10): 1 113 - 1 120.
- [8] 郑艳, 徐璐珊, 王峥涛, 等. 球花石斛茎中香豆素类成分的定位与相对定量 [J]. 药学学报, 2005, 40(3): 236 - 240.
- [9] 郑艳, 徐璐珊, 王峥涛, 等. 香豆素类成分在球花石斛根中的分布和相对含量 [J]. 激光生物学报, 2005, 14(2): 87 - 90.
- [10] 张光浓, 张勉, 史永锋, 等. HPLC-UV测定球花石斛中滨蒿内酯和泽兰内酯含量 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41(5): 388 - 391.
- [11] 宋宁, 陆瑛, 邱明华. 球花石斛多糖免疫调节作用的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(3): 445 - 448.
- [12] 文小玲, 徐俊驹, 陈丽君, 等. 云南药用植物束花石斛提取物体外抗氧化活性研究 [J]. 昆明医科大学学报, 2014, 35(4): 4 - 5.
- [13] 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.
- [14] 文小玲, 王娅娟, 徐俊驹, 等. 云南鼓槌石斛提取物体外自由基清除活性研究 [J]. 昆明医科大学学报, 2014, 35(12): 4 - 6.
- [15] 刘妍妍, 虞泓, 袁峰, 等. 滨蒿内酯和泽兰内酯在云南石斛物种中的分布 [J]. 中国中药杂志, 2012, 48(21): 3 691 - 3 695.
- [16] 张光浓, 毕志明, 王峥涛, 等. 石斛属植物化学成分研究进展 [J]. 中草药, 2003, 34(6): 5 - 8.
- [17] 林萍, 毕志明, 徐红, 等. 石斛属植物药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2003, 34(11): 19 - 22.

(2014 - 12 - 09 收稿)