

云南鼓槌石斛提取物体外自由基清除活性研究

文小玲^{1,2)}, 王娅娟²⁾, 徐俊驹³⁾, 张君²⁾, 张凯丽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; 3) 云南农业大学烟草学院, 云南昆明 650201)

[摘要] **目的** 研究鼓槌石斛 (*Dendrobium chrysotoxum*) 95%乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、甲醇五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鼓槌石斛五种提取物的体外自由基清除作用进行研究。 **结果** 鼓槌石斛乙酸乙酯粗提物的自由基清除效果最显著, 其 IC_{50} 为 0.12 mg/mL。 **结论** 鼓槌石斛提取物在体外自由基清除活性方面有一定的应用价值。

[关键词] 鼓槌石斛; 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 (2014) 12-0004-03

In Vitro Radical Scavenging Activity of Extracts from *Dendrobium chrysotoxum* in Yunnan

WEN Xiao-ling^{1,2)}, WANG Ya-juan²⁾, XU Jun-ju³⁾, ZHANG Jun²⁾, ZHANG Kai-li²⁾, 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; 3) College of Tobacco Science, Yunnan Agricultural University, Kunming Yunnan 650201, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the in vitro radical scavenging activity of extracts from *Dendrobium chrysotoxum*, including 95% ethanol, petroleum ether, ethyl acetate, *n*-butanol and methanol extracts. **Methods** DPPH radical scavenging activity method was used to research the in vitro activity of five crude extracts. **Results** The results showed that the ethyl acetate extract exhibited a good scavenging action ($IC_{50} = 0.12$ mg/mL). **Conclusion** The extracts from *D.chrysotoxum* have a certain value in antioxidant aspect.

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

石斛是常用名贵中药材, 为兰科 (*Orchidaceae*) 石斛属 (*Dendrobium* Sw.) 多种植物的新鲜或干燥茎的统称, 我国 76 种石斛属植物中有 30 多种作药用^[1]。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^[2]。国内学者从鼓槌石斛得到联苳、菲类、苳酮等类型的化学成分^[3-10], 且报道其乙醇提取物及联苳化合物毛兰素 (erianin)、鼓槌联苳 (chrysotobibenzyl) 和菲类化合物鼓槌石斛素 (chrysotoxine)、毛兰菲 (confusarin) 具有体

内抑制小白鼠肝癌、艾氏腹水癌和 K562 肿瘤细胞生长的作用^[11-13]。关于鼓槌石斛 (*Dendrobium chrysotoxum*) 自由基清除活性未见报道, 为开发和应用该药用植物笔者采用 DPPH 自由基清除法对鼓槌石斛提取物的体外自由基清除活性进行研究^[14,15]。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器

[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)

[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] 徐俊驹. E-mail: junjuxu007@126.com; 李玉鹏. E-mail: liyupeng26@126.com

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

鼓槌石斛于 2012 年 11 月 10 日采自云南思茅, 样品由昆明医科大学刘毅教授鉴定, 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

鼓槌石斛 (0.25 kg), 用 95%乙醇提取 5 次, 减压回收至无乙醇味, 得乙醇提取物 20.0 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 (4.0 g), 乙酸乙酯 (4.6 g), 正丁醇 (3.2 g), 甲醇 (5.5 g) 五个部分。乙醇提取物和萃取的各部分分别取 20 mg 进行自由基清除活性测试。

1.4 自由基清除活性测定^[14,15]

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。

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, 鼓槌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, 乙酸乙酯和正丁醇萃取部分相对其它提取物清除率略高, 见表 1。方差分析及 q 检验显示, 石油醚与甲醇比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其余两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且不同提取物清除率与剂量呈高度正相关, 相关系数分别为 0.985、0.965、0.777、0.972、0.999, P 值均小于 0.01。鼓槌石斛的 95%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 鼓槌石斛提取物 DPPH 自由基清除率 (mg)

Fig. 1 DPPH free radical scavenging rate of extracts from *D.chrysotoxum* (mg)

分 组	K (%)							
	0.04	0.08	0.12	0.16	0.20	0.24	0.28	0.32 mg
石油醚	2.1	5.1	5.3	12.7	14.8	17.8	22.6	23.2
乙酸乙酯	17.4*	31.6*	48.5*	59.2*	69.6*	81.9*	82.0*	83.6*
正丁醇	36.7*	63.3*	77.9*	81.9*	82.2*	82.3*	82.5*	83.4*
甲醇	0.9	1.3	1.4	2.6	4.5	4.7	5.2	7.2
95%乙醇	6.2*	15.3*	22.6*	30.9*	36.6*	43.6*	51.6*	58.1*

两两比较, * $P < 0.05$ 。

表 2 鼓槌石斛提取物清除 DPPH 自由基活性的 IC₅₀ 值Fig. 2 IC₅₀ value of DPPH free radical scavenging activity of extracts from *D.chrysotoxum*

名称	DPPH (IC ₅₀ mg/mL)
石油醚萃取部分	0.76
乙酸乙酯萃取部分	0.12
正丁醇萃取部分	4.97
甲醇萃取部分	4.13
95%乙醇提取物	0.28
芦丁	0.063

3 讨论

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。中外学者对多种石斛属植物的化学成分进行了研究,发现该属植物所含的化学成分类型多样,除生物碱外,还有萜类、联苄类、苄酮类、倍半萜类、香豆素、多糖、甾体及挥发油等^[16]。在我国传统医学中,石斛为常用贵重药材,药用历史悠久,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,石斛具有抗肿瘤、抗衰老、增强人体免疫力和扩张血管等作用^[17]。

研究表明鼓槌石斛乙醇粗提物、石油醚和乙酸乙酯提取物活性较好,自由基清除 IC₅₀ 分别为 0.28, 0.76, 0.12 mg/mL, 进一步研究该两部分化学成分,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,从该植物中寻找新的天然自由基清除剂和新的活性化合物。

[参考文献]

[1] 李满飞,徐国钧,徐璐珊,等. 商品石斛的调查及鉴定(II)[J]. 中草药,1991,22(4):173-180.
[2] 江苏新医学院,中药大辞典[M]. 上海科学技术出版

社,1985:586-589.

- [3] 马国祥,徐国钧,徐璐珊,等. 鼓槌石斛化学成分的研究[J]. 药学学报,1994,29(4):763-765.
[4] 马国祥,徐国钧,徐璐珊,等. 鼓槌石斛中一新的联苄化合物—鼓槌石斛素[J]. 药学学报,1996,31(3):222-225.
[5] 杨虹,龚燕晴,王铮涛,等. 鼓槌石斛化学成分的研究[J]. 中草药,2001,32(11):972-974.
[6] 杨虹,王铮涛,徐璐珊,等. 鼓槌石斛化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报,2002,33(5):367-369.
[7] HONG YANG, GUI-XIN CHOU, ZHENG-TAO WANG, et al. Two compounds from *Dendrobium chrysotoxum* [J]. Helvetica Chimica Acta, 2004, 87(2):394-399.
[8] HONG YANG, GUI-XIN CHOU, ZHENG-TAO WANG, et al. Two new fluorenonones from *Dendrobium chrysotoxum* [J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2004, 6(1):35-38.
[9] YE-GAO CHEN, YU-PENG LI, CHEN QING, et al. 4, 5-Trihydroxy-7-methoxy-9H-fluoren-9-one, a new cytotoxic compound from *Dendrobium chrysotoxum* [J]. Food Chem, 2008, 108(3):973-976.
[10] YU-PENG LI, CHEN QING, TIAN-TIAN FANG, et al. Chemical constituents of *Dendrobium chrysotoxum* [J]. Chemistry of Natural Compounds, 2009, 45(3):414-416.
[11] 马国祥,徐国钧,徐璐珊,等. 鼓槌石斛及其化学成分的抗肿瘤活性作用[J]. 中国药科大学学报,1994,25(3):188-189.
[12] 王天山,陆跃鸣,马国祥. 鼓槌石斛中化学成分对K562肿瘤细胞株生长抑制作用的体外实验[J]. 天然产物研究与开发,1997,9(2):1-3.
[13] GUO-XIANG M A, GERALD A. The activity of erianin and chrysotoxine from *Dendrobium chrysotoxum* to reverse multidrug resistance in B16/h, MDR-1 Cell [J]. J Chin Pharm Sci, 1998, 7(3):142-146.
[14] 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.
[15] XIAO-LING WEN, JUN-JU XU, LI-JUN CHEN, et al. Antioxidant activity in vitro of *Dendrobium chrysanthum* Wall in Yunnan [J]. Journal of Kunming Medical University, 2014, 35(4):4-5.
[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(附).
[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.
(2014-08-14 收稿)