

石斛水提上清液活性成分量效关系研究

张玥, 王东晖, 方芳, 王艳, 幸岑璨, 王凤忠

(中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193)

摘要: 为综合利用石斛资源, 分析测定传统法及酶辅助提取法提取石斛多糖后副产物上清液中生物碱、多酚、黄酮和多糖成分及含量, 以 DPPH 自由基清除率, 羟基自由基清除率、总还原能力和 α -淀粉酶抑制能力为标准表征上清液的抗氧化和降糖活性。研究表明: 果胶酶辅助提取石斛多糖的上清液副产物中生物碱、多酚、黄酮及多糖物质含量及生物活性均高于传统法提取多糖后的石斛上清液。其中经过 7.5 U 果胶酶处理后的石斛上清液中物质含量最高, 生物碱、多酚、黄酮及多糖含量分别为: 0.1971、0.6873、28.4598 和 7.0500 mg/g; 经 15U 果胶酶处理后的石斛上清液抗氧化能力最强, 对 DPPH 自由基及羟基自由基的 IC_{50} 值分别为: 1.25 和 4.1 mg/mL; 经量效关系分析, 传统法的上清液及总水提液中的多酚、黄酮含量与功能性指标显著相关, 采用酶处理后上清液与功能性指标无显著相关性。

关键词: 石斛; 上清液; 功能活性; 量效关系

文章编号: 1673-9078(2017)10-72-76

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.10.011

Does-effect Relationship of Active Ingredients from Supernatant Water of *Dendrobium devonianum* Paxt.

ZHANG Yue, WANG Dong-hui, FANG Fang, WANG Yan, XING Cen-can, WANG Feng-zhong

(Institute of Food Science and Technology CAAS, Beijing 100193, China)

Abstract: In order to utilize the resource of *Dendrobium devonianu* Paxt., the content of alkaloids, polyphenols, flavonoids and polysaccharides in the supernatant of *Dendrobium* byproducts were determined after the polysaccharides were extracted by traditional method and enzyme assisted extraction method. The antioxidant and hypoglycemic activities of the supernatant were characterized by the DPPH free radical scavenging rate, the hydroxyl radical scavenging rate, the total reducing capacity and α -amylase inhibition capacity. The results showed that alkaloids, polyphenols and flavonoids and polysaccharides content as well as biological activity in supernatant of *Dendrobium* byproducts after the polysaccharides were by pectinase assisted extraction were much higher than those in traditional method. The content of alkaloid, polyphenols, flavonoids and polysaccharide in supernatant of *Dendrobium*, treated with 7.5 U pectinase has the highest material content were 0.1971, 0.6873, 28.4598 and 7.0500 mg/g, respectively; The supernatant of *Dendrobium devonianu* Paxt treated with 12.5 U pectinase have the strongest antioxidant capacity, the DPPH free radicals' and hydroxyl radicals IC_{50} value were 1.25 and 4.1 mg/mL, respectively. After analysis the relationship of does-effect, the content of polyphenols, flavonoids in the supernatant and the total water extract extracted by the traditional method were significantly correlated with the functional indexes, there was no significant correlation between the supernatant and the functional indexes after enzyme treatment.

Key words: *Dendrobium*; supernatant; functional activity; does-effect relationship

石斛 (*Dendrobium devonianum* Paxt.), 单子叶植物纲兰科石斛属, 又称不死草和还魂草等, 是我国“九大仙草”之首的名贵药用植物, 被国际植物界列为“植物大熊猫”, 具有悠久的药用历史, 医书记载石斛有解热镇痛、益胃生津、护肝利胆和滋养皮肤等功效。石

收稿日期: 2017-02-13

作者简介: 张玥 (1993-), 女, 硕士, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 王东晖 (1984-), 博士, 助理研究员, 研究方向: 食品功能因子研究与利用; 王凤忠 (1972-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品化学

斛花颜色艳丽, 可用于观赏, 石斛茎是生物活性的主要来源。近年来研究表明石斛中含有生物碱、多酚、黄酮和还原糖等物质^[1], 具有抗氧化^[2]、提高免疫力和抗炎^[3]等生物活性。石斛多糖作为石斛重要的活性物质, 其药理作用引起了人们广泛的关注, 目前, 从石斛中提取多糖的方法日益成熟, 如热水浸提法、水提醇沉法和加酶辅助提取法等, 在传统水提醇沉的基础上, 添加酶制剂辅助提取可大大提高多糖得率。在实际生产中, 醇沉多糖的过程产生了大量的上清液, 而其中含有活性物质, 活性物质常随上清液一起被视为

废料, 直接丢弃, 造成了资源的浪费且污染环境。

为了充分利用提取活性物质而产生的废液, 诸多学者对此进行了研究, 夏伯候等人对将夏枯草醇沉后的上清液进行分析发现, 溶液具有较高的生物活性^[4]及利用价值, 将上清液进行循环利用, 富集溶液中活性物质, 可大大减少资源的浪费。为了探明石斛水提醇沉提取多糖后的上清液中所含成分及活性功能, 并确定由于不同提取方法对上清液中成分及活性功能的影响, 本文分别测定了采用不同方法提取多糖后, 上清液中生物碱、多酚、黄酮及多糖的含量, 以 DPPH 自由基清除率、羟基自由基清除率、总还原能力和 α -淀粉酶抑制率, 评价其抗氧化能力及降血糖能力, 分析不同提取方法上清液中各物质含量与生物活性的相关性, 望有助于提高石斛的利用价值, 上清液的循环利用效率, 为研究石斛资源的深加工, 减少资源浪费和环境污染提供了理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 原料

齿瓣石斛 (*Dendrobium devonianum* Paxt) 新鲜茎条, 2014 年 12 月采于云南省保山市。

1.1.2 主要设备及试剂

酶联免疫检测仪 (spectra MAX 190, Molecular devices, California); 果胶酶 (P116864、30000 U/g) 购于阿拉丁公司; 阿卡波糖和芦丁等试剂购于 sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验样品制备

1~2 cm 石斛鲜茎, 1:30 的料液比, 采用 80 °C 热浸提 2 次, 每次 2 h, 离心, 合并水提液。加入无水乙醇使溶液中乙醇浓度达到 65%, 过夜沉降离心, 收集上清液, 冷冻干燥即“传统法上清液组分”^[5], 未经乙醇沉淀的水提液冷冻干燥为对照组, 即“总水提液组分”。

分别以 7.5 和 12.5 U/mg 的果胶酶辅助提取石斛多糖, 1:30 的料液比, 提取温度 50 °C, 醇沉后离心, 将上清液浓缩、冷冻干燥^[8], 获得“7.5 U 酶上清液组分”和“15 U 酶上清液组分”。

1.2.2 样品含量的分析

1.2.2.1 成分预测

钨硅酸沉淀法、三氯化铁反应沉淀法、盐酸-镁粉法及菲林反应分别预测生物碱类、多酚类、黄酮类化

合物及多糖类。

1.2.2.2 成分含量测定

待测样品分别溶于氯仿、纯水、纯水和甲醇, 配置成规格 5 mg/mL 的待测液; 酸性染料比色法、福林酚比色法、氯化铝亚硝酸钠比色法及苯酚硫酸法分别测定生物碱、多酚、黄酮及多糖含量。

1.2.3 功能活性的测定

1.2.3.1 抗氧化活性测定

DPPH 自由基清除率、清除羟基自由基能力和总还原能力法用于测定样品的抗氧化活性。

DPPH 自由基清除率法的测定参考 Liu 的方法^[7], 适当改动。2 μ mol/L 的 DPPH 无水乙醇溶液与各待测上清液等体积混合, 以无水乙醇代替样品作为对照组, 无水乙醇代替 DPPH 溶液作为空白, 进行测定。

清除羟基自由基能力的测定采用氨基酚反应的方法稍作改动^[8], 将各待测上清液与硫酸亚铁溶液、过氧化氢溶液、水杨酸混合; 用等体积蒸馏水代替样液作为对照组; 用等体积蒸馏水代替水杨酸作为空白组, 进行测定。

总还原能力的测定采用铁离子总还原方法进行测定, 将各待测上清液与缓冲液、1%铁氰化钾溶液、10%三氯乙酸溶液、蒸馏水及三氯化铁溶液混合均匀, 进行测定。

1.2.3.2 降糖活性测定

降糖活性实验采用 α -淀粉酶抑制法, 将各待测上清液与 α -淀粉酶、淀粉溶液混合, DNS 试剂终止反应后沸水浴加热, 冷却稀释后进行测定。

1.3 数据的统计与分析

对原始数据采用 Origin 6.0 软件进行方差分析及绘图, 采用 SPSS 19.0 进行显著性及相关性分析, 数值以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 石斛水提醇沉上清液中功能成分测定

2.1.1 功能成分预测实验

加入不同沉淀剂后, 各待测样呈现的变化如表 1 所示。

由表 1 可知, 各处理方法获得的石斛上清液中不同程度的含有生物碱、多酚、黄酮及多糖, 作为对照的总水提液和采用传统法的上清液中多糖含量较多, 果胶酶处理的上清液中生物碱、多酚及黄酮含量较多, 这一结果与之前对石斛中生物碱及多糖含量的研究相似^[9]。

表 1 预测不同提取方法获得石斛水提液中所含物质组成

Table 1 Forecast the material composition of *Dendrobium devonianum* Paxt. water extract extracted by different methods

组分	生物碱				多酚	黄酮	多糖
	碘化汞钾试剂	碘化铋钾试剂	碘-碘化钾试剂	硅钨酸试剂	FeCl ₃ 溶液	盐酸-镁粉	菲林试剂
总水提液组分	白色+	橘色+	棕色+	白色+	深灰	橙红	红色++
传统法上清液组分	白色+	橘色+	浅棕色+	白色+	深灰	橙红	红色++
7.5U 酶上清液组分	白色++	红棕色++	棕色+	白色+	黑色	紫红	红色+
15U 酶上清液组分	白色++	红棕色++	棕色+	白色+	黑色	紫红	红色+

注：+表示沉淀含量较少，++表示沉淀含量较多。

2.1.2 功能成分含量测定

不同方法获得的石斛上清液中生物碱、多酚、黄酮及多糖的含量测定结果见图 1。总水提液中各物质含量均为 4 者中最低，采用酶处理后的上清液中的物质除多糖外含量均有显著增加，其中采用 7.5 U 果胶酶处理后物质含量增加最为明显，生物碱、多酚及黄酮含量分别达到 0.1971±0.3180 mg/g, 0.6873±0.0255 mg/g 和 28.4598±0.7752 mg/g, 远高于传统法上清液组分及对照组中各物质的含量；而采用传统法获得的上清液中多糖含量最高，说明酶法辅助提取显著提高多糖得率，上清液中多糖残留量低。

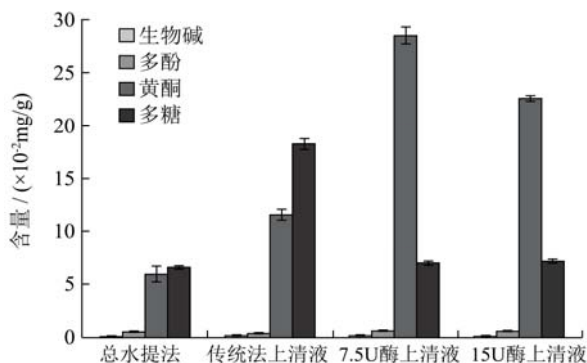


图 1 采用不同提取方法对石斛水提液物质含量的影响

Fig.1 The effects of the different extraction methods on material content of *Dendrobium devonianum* Paxt. water extract

由于石斛组织中果胶含量丰富，采用果胶酶处理后，被果胶包裹的分子物质释放到溶液中，导致酶处理的上清液中活性物质含量较高；由于高浓度酶溶液在反应前期，产生大量产物，高浓度产物导致酶与底物接触不完全，产生反馈抑制作用，使果胶分解不完全，因此高浓度果胶酶处理后活性物质含量反而低于低浓度酶处理后的上清液，这一结果与酶辅助提取黄连中生物碱^[10]和石榴皮^[11]中多酚的结果类似。

2.2 石斛水提液功能活性的测定实验

2.2.1 石斛水提液清除 DPPH 自由基的能力

不同处理方法获得的石斛上清液对 DPPH 自由基的清除能力见图 2。4 种提取液清除 DPPH 自由基的

能力均随着浓度的增加而递增；在 5.00 mg/mL 时，15 U 果胶酶处理的溶液对 DPPH 自由基的清除能力最先达到 90% 趋于稳定；随着上清液浓度的提高，传统法提取后上清液的 DPPH 清除率接近经 7.5 U 酶处理后的上清液，由于各上清液的抗氧化能力不同，表现出对 DPPH 自由基清除率的 IC₅₀ 值也各不相同，经过 15 U 果胶酶处理后上清液的 IC₅₀ 值最高为 1.25 mg/mL，而经传统法获得的上清液 IC₅₀ 值最低为 6.50 mg/mL，两者相差较大。

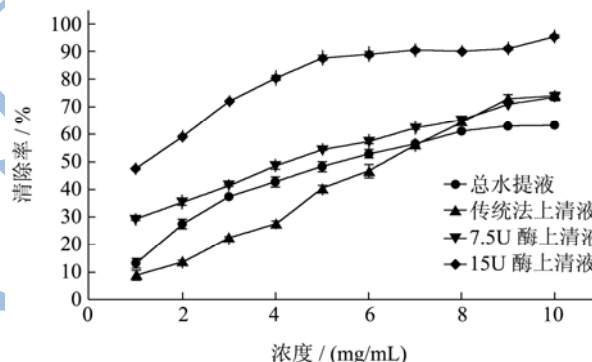


图 2 采用不同提取方法对石斛水提液清除 DPPH 自由基能力的影响

Fig.2 The effects of different extraction methods on DPPH radical scavenging ability of *Dendrobium devonianum* Paxt. water extract

由于提取方法、酶含量不同，导致溶液中黄酮类物质发生降解，其中的糖苷键有一定程度的水解和断裂，并生成黄酮苷元^[12]，前人研究发现，黄酮苷元的抗氧化活性较黄酮糖苷强^[13]，因此，虽然采用 15 U 果胶酶处理的上清液黄酮、多酚物质含量较低，但清除 DPPH 基等其他抗氧化能力较强。

2.2.2 石斛水提液清除羟基自由基的能力

不同处理方法获得的石斛上清液对羟基自由基的清除能力见图 3。溶液对羟基自由基的清除率随着提取液浓度的增加而递增，其中总水提液对羟基自由基的清除能力最弱，IC₅₀ 值为 6.25 mg/mL；高浓度时，果胶酶处理的上清液对羟基自由基表现出较强的清除能力，经 15 U 果胶酶处理的上清液对羟基自由基的清

除率最高, IC₅₀ 值为 5.00 mg/mL

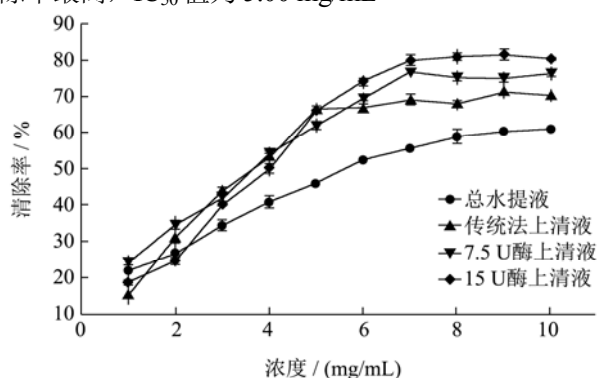


图3 采用不同提取方法对石斛水提液清除羟基自由基能力的影响

Fig.3 The effects of different extraction methods on the hydroxyl radical scavenging ability of *Dendrobium devonianum* Paxt. water extract

羟基自由基是导致体内氧化损伤的主要原因, 在反应过程中, 水杨酸具有特定官能团, 捕捉羟基自由基生成有色物质, 该物质在 510 nm 处有较大的吸光值。由于石斛中含有的多酚类物质具有与水杨酸相同的部分结构, 使石斛同样具有捕捉羟基自由基的能力, 从而达到清除羟基自由基的目的, 但结果发现采用 15 U 果胶酶处理的上清液清除羟基自由基能力较强, 而 15 U 果胶酶上清液中多酚含量低于 7.5 U 果胶酶处理后的上清液, 可能由于 7.5 U 果胶酶处理后, 上清液中多酚含量较高, 抑制了羟基自由基的清除效果, 该实验与姬妍茹^[14]对果酒中多酚物质含量及抗氧化能力的研究相似, 高浓度多酚溶液对羟基自由基的清除能力稍低。

2.2.3 石斛水提液的总还原能力

不同处理方法获得的石斛上清液的总还原能力见图 4。

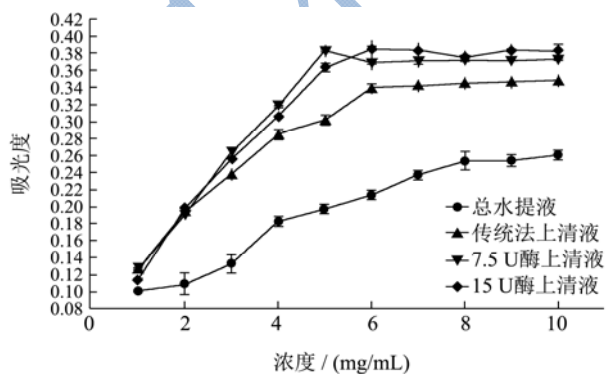


图4 采用不同提取方法对石斛水提液总还原能力的影响

Fig.4 The effects of different extraction methods on the total reducing capacity of *Dendrobium devonianum* Paxt. water extract

不同处理方法获得的石斛上清液, 其代表总还原能力的吸光值差异较大。总水提液的吸光值较低; 采用果胶酶处理后的两种溶液, 其吸光值较为接近, 在浓度为 5.00 mg/mL 时, 表征总还原能力的吸光值达到 0.37±0.01 并保持稳定。

通过与采用相同实验方法的荷叶进行比较发现, 表征各提取液总还原能力的吸光值与经酶处理的石斛上清液的吸光值相近, 石斛总水提液比荷叶总水提液的吸光值高, 表明石斛总还原能力高于荷叶^[12], 这一现象的出现可能与原料中含有的多酚、黄酮物质的种类及含量有关。

2.2.4 抑制 α-淀粉酶活性

经过测定不同处理方法获得的石斛上清液对 α-淀粉酶活性的抑制效果, 其结果见图 5。不同的石斛上清液对 α-淀粉酶有不同的抑制效果, 未经果胶酶处理的上清液对 α-淀粉酶的抑制率高于阿卡波糖, 传统法获得的上清液对 α-淀粉酶的抑制率达到 7.57±0.12%; 经 7.5 U、15 U 果胶酶处理后的上清液对 α-淀粉酶的抑制率分别为 6.68±0.06% 和 6.91±0.04%, 均低于阿卡波糖的 7.18±0.04%。

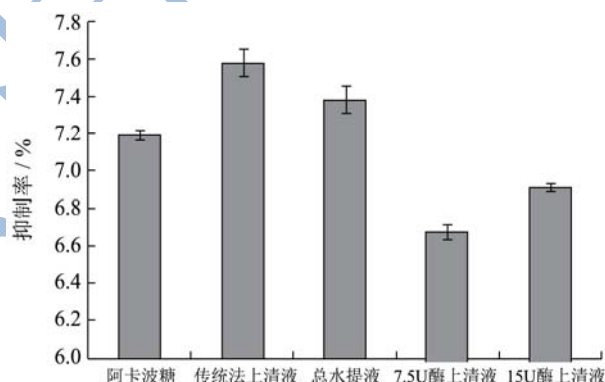


图5 采用不同提取方法对石斛水提液抑制 α-淀粉酶活性的影响

Fig.5 The effects of different extraction methods on α-amylase inhibition activity of *Dendrobium devonianum* Paxt. water extract

研究表明, 多糖具有抑制 α-淀粉酶活性、降低血糖的作用。经传统法处理的上清液中多糖含量最多, 经过果胶酶辅助提取的 2 种上清液中的多糖含量较少且相差不大, 因此在对 α-淀粉酶抑制活性的测定中, 2 种经过果胶酶处理的上清液抑制率处于较低水平, 传统法获得的上清液对 α-淀粉酶的活性抑制率最高。这一结果与张元对乌龙茶多糖对 α-淀粉酶的抑制效果相似^[15]。

2.3 相关性分析

表2 石斛组分各物质含量与活性指标之间的相关性

Table 2 Correlation between each material content of *Dendrobium devonianum* Paxt. components and activity indexes

物质类型	DPPH 自由基清除率	抗氧化活性		降糖活性 α -淀粉酶抑制率
		羟基自由基清除率	总还原能力	
生物碱	-0.251	0.177	0.404	-0.297
多酚	0.339	0.456	0.275	-0.700
黄酮	0.564	-0.881	0.857	-0.999**
多糖	-0.117	-0.104	0.112	-0.297

注: *.显著相关 ($p < 0.05$)。**.极显著相关 ($p < 0.01$)。

综合各提取方法对提取液中物质含量与功能活性进行相关性分析发现, 黄酮类物质与 α -淀粉酶抑制率极显著相关, 但其他物质含量与功能相关性不显著, 出现此现象的原因可能是, 不同提取方法对黄酮类、多酚类物质的组成有影响, 而同一类大物质中单体成分的含量对活性功能的影响较大, 综合不同的提取方法, 虽然各类物质中单体物质含量不同, 但经过平均值分析后使单体物质含量发生改变, 引起各类物质对活性成分相关性不显著。

3 结论

3.1 采用果胶酶处理后的上清液生物碱、多酚及黄酮物质含量多于传统法处理后的上清液, 而传统法获得的上清液中多糖含量最多。各提取液的抗氧化性及降糖活性有明显差别, 经 15 U 酶辅助处理的上清液抗氧化性最强; 经水提后的上清液抗氧化性最差; 传统法处理的溶液对 α -淀粉酶的抑制作用比经过酶处理的溶液强, 低浓度果胶酶处理后的上清液对 α -淀粉酶的抑制效果低于高浓度果胶酶处理后的溶液。

3.2 通过对石斛多糖提取后上清液中成分的分析, 发现其中生物碱、多酚和黄酮含量丰富, 传统法处理后溶液中多糖残留较多, 这些物质具有良好的生物活性, 可为今后减少资源浪费, 保护环境, 进一步开发石斛副产品以及石斛的综合利用提供了理论基础。

参考文献

- [1] 郑秋平, 邱道寿, 刘晓津, 等. 铁皮石斛抗肿瘤活性成分的探究[J]. 现代食品科技, 2014, 5: 12-17
ZHENG Qiu-ping, QIU Dao-shou, LIU Xiao-jing, et al. Extraction of anti-tumor constituents derived from *Dendrobium officinale* [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 5: 12-17
- [2] Tian C C, Zha X Q, Pan L H, et al. Structural characterization and antioxidant activity of a low-molecular polysaccharide from *Dendrobium huoshanense* [J]. Fitoterapia, 2013, 91(10): 247-55
- [3] Wang X Y, Luo J P, Chen R, et al. The effects of daily supplementation of *Dendrobium huoshanense* polysaccharide on ethanol-induced subacute liver injury in mice by proteomic analysis [J]. Food & Function, 2014, 5(9): 2020-2035
- [4] 夏伯侯, 刘菊妍, 李春, 等. 夏枯草水提液及水提醇沉上清液降血压药效评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(2): 113-116
XIA Bo-hou, LIU Ju-yan, LI Chun, et al. Anti-hypertensive effect of aqueous extract and supernatants of alcohol extracting-water precipitation of *Prunella vulgaris* [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2014, 20(2): 113-116
- [5] Yu W W, Pan W H, Liu Y K, et al. Comparison of polysaccharose content in *Fructus Corni* from different producing areas [J]. Medicinal Plant, 2010, 1(12): 63-65
- [6] F L, SH C, XQ Z, et al. Structure and bioactivity of a polysaccharide extracted from protocorm-like bodies of *Dendrobium huoshanense* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 72: 664-672
- [7] Liu Y, Gong G, Zhang J, et al. Response surface optimization of ultrasound-assisted enzymatic extraction polysaccharides from *Lycium barbarum* [J]. Carbohydr Polym, 2014, 110(38): 278-284
- [8] 刘忠义, 谭操, 刘文平, 等. 籽瓜皮多酚的体外抗氧化及抗紫外线辐射作用研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(8): 70-75
LIU Zhong-yi, TAN Cao, LIU Wen-ping, et al. *In vitro* antioxidant activity and resistance to ultraviolet radiation of polyphenol from watermelon rind [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(8): 70-75
- [9] 吴刚, 季祥彪, 康冀川, 等. 石斛中多糖和生物碱的含量测定[J]. 山东农业生物学报, 2008, 27(3): 274-278
WU Gang, JI Xiang-biao, KANG Ji-chuan, et al. Determination of polysaccharides and total alkaloids in *Caulis Dendrobium* [J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2008, 27(3): 274-278
- [10] 王华斌, 王珊, 傅力. 酶法提取石榴皮多酚工艺研究[J]. 中

- 国食品学报,2012,1(6):56-64
- WANG Hua-bin, WANG Shan, FU Li. Enzymatic extraction of polyphenols from pomegranate peel [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 1(6): 56-64
- [11] Hsu D Z. Sesame oil attenuates hepatic lipid peroxidation by inhibiting nitric oxide and superoxide anion generation in septic rats [J]. Journal of Parenteral & Enteral Nutrition, 2008, 32(2): 154-159
- [12] 江慎华,周勇,肖通奋,等. 荷叶不同极性部位抗氧化活性及酸水解对有效部位抗氧化活性的影响[J].现代食品科技,2014,30(12):92-99
- JIANG Shen-hua, ZHOU Yong, XIAO Tong-fen, et al. Antioxidant activity of lotus leaf fractions with different polarities and the effect of acid hydrolysis on the effective fraction [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(12): 92-99
- [13] 沈勇根,蔡志鹏,江慎华,等. 丁香非挥发性成分抗氧化活性[J].农业机械学报,2012,43(10):131-137
- SHEN Yong-gen, CAI Zhi-peng, JIANG Shen-hua, et al. Antioxidant activity of non-volatiles from clove [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Machinery, 2012, 43(10): 131-137
- [14] 姬妍茹,杨庆丽,刘宇峰,等. 黑蒜蓝莓酒抗氧化能力及活性成分研究[J].食品科学技术学报,2017,35(2):65-69
- JI Yan-ru, YANG Qing-li, LIU Yu-feng, et al. Study on antioxidant activity and active ingredients of black garlic blueberry wine [J]. Journal of Food Science and Technology, 2017, 35(2): 65-69
- [15] 张元,林强,崔玉梅,等. 乌龙茶多糖的酶法提取及降血糖活性初步研究 [J]. 中国现代应用药学,2008,25(4):286-288
- ZHANG Yuan, LIN Qiang, CUI Yu-mei, et al. Study on preparation of tea polysaccharides from Wulong and their hypoglycemic activity [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2008, 25(4): 286-288
- [16] Xu B J, Chang S K C. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents [J]. Journal of Food Science, 2007, 72(2): 159-166