

网络出版时间:2016-05-03 14:05

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2016.06.023

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160503.1405.046.html>

铁皮石斛原球茎与野生铁皮石斛多糖的抗菌及体外抗氧化活性比较

王 玲^{1a}, 唐德强^{1b}, 王佳佳^{1a}, 尚云青², 刘铭琳^{1a}, 林 烨^{1a}

(1 广东海洋大学 a 食品科技学院, b 农学院, 广东 湛江 524088; 2 云南中医学院, 云南 昆明 650500)

[摘 要] 【目的】比较铁皮石斛原球茎多糖与野生铁皮石斛多糖的抗菌及体外抗氧化活性,为铁皮石斛组织培养物的应用提供依据。【方法】以大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)为供试菌,用抑菌圈法测定2种铁皮石斛多糖对目标菌的抗菌活性;分别用羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基(O_2^-)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH $\cdot$)法和硫代巴比妥酸法(TBA法)结合分光光度法检测2种铁皮石斛多糖清除 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 和DPPH $\cdot$ 及抗脂质过氧化的能力,比较2种铁皮石斛多糖的抗菌及体外抗氧化活性。【结果】铁皮石斛原球茎多糖与野生铁皮石斛多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌均具有显著的抑制作用,且野生铁皮石斛多糖的抑菌效果比铁皮石斛原球茎多糖优;2种铁皮石斛多糖对 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 和DPPH $\cdot$ 均有极显著的清除作用,对小鼠肝组织脂质过氧化均有极显著的抑制作用,且野生铁皮石斛多糖比铁皮石斛原球茎多糖效果更好,2种铁皮石斛多糖的抗菌及抗氧化活性与多糖质量均存在剂量效应关系。【结论】与野生铁皮石斛多糖相比,铁皮石斛原球茎多糖在抗菌、抗氧化能力方面虽存在一定差距,但仍具有进一步开发的价值。

[关键词] 石斛原球茎;野生铁皮石斛;抗菌活性;体外抗氧化活性

[中图分类号] S567.23⁺9;TQ464.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2016)06-0167-06

Comparison of antibacterial and *in vitro* antioxidant activities of polysaccharides from *Dendrobium candidum* protocorms and wild *Dendrobium*

WANG Ling^{1a}, TANG De-qiang^{1b}, WANG Jia-jia^{1a},
SHANG Yun-qing², LIU Ming-lin^{1a}, LIN Ye^{1a}

(1 a College of Food Science and Technology, b College of Agriculture, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China; 2 Traditional Medicinal College of Yunnan, Kunming, Yunnan 650500, China)

Abstract: 【Objective】This study compared the antibacterial and antioxidant activities of polysaccharides of *Dendrobium candidum* protocorms and wild *Dendrobium* to provide basis for application of *Dendrobium candidum* tissue cultures. 【Method】Bacteriostatic ring method with *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, and *Candida albicans* was used to determine the antibacterial activity of polysaccharides. Combined with spectrophotometric method, the hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) system, superoxide anion free radical (O_2^-) system, 1,1-two phenyl-2-three nitro hydrazyl free radical (DPPH $\cdot$) method and thiobarbituric acid (TBA) method were used to detect and compare their capability of scavenging

[收稿日期] 2014-10-24

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31070701);地方高校国家级大学生创新训练项目(201410566010)

[作者简介] 王 玲(1965—),女,云南昆明人,副教授,硕士生导师,主要从事食品微生物及食品加工技术研究。

E-mail: wl6509@163.com

($\cdot\text{OH}$), (O_2^-) and ($\text{DPPH}\cdot$) and anti-lipid peroxidation capability. 【Result】 Both polysaccharides had significant inhibitory effects against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. Inhibitory effect of polysaccharide from wild *Dendrobium* was stronger than that of polysaccharide from *Dendrobium candidum* protocorms. Both polysaccharides had significant scavenging effect on $\cdot\text{OH}$, O_2^- and $\text{DPPH}\cdot$ and significant inhibitory effect on lipid peroxidation in liver tissue of mice. Antioxidant effect of polysaccharide from wild *Dendrobium* was stronger than that of polysaccharide from protocorms of *Dendrobium candidum*. There was a dose effect relationship between antibacterial and antioxidant activities and polysaccharide concentration. 【Conclusion】 The antibacterial and antioxidant abilities of polysaccharide from *Dendrobium candidum* protocorms were not as good as those of polysaccharide from wild *Dendrobium*. However, it is worthy to further develop polysaccharide from *Dendrobium candidum* protocorms.

Key words: *Dendrobium candidum*; wild *Dendrobium*; antibacterial activity; *in vitro* antioxidant activity

多糖(Polysaccharide)是一类存在于植物、动物和微生物中的天然活性物质,具有较强的抗衰老、抗氧化、抗肿瘤、增强机体免疫力等功能^[1-3]。自由基(Free radical)是一些具有高度化学活性的原子、原子团或分子,在生物体内,许多功能障碍和疾病的发生都与自由基有密切关系^[4]。

铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl)为兰科石斛属植物,是《中华人民共和国药典》中收录的名贵中草药之一,具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳的功效^[5],现代药理学和植物化学研究表明,铁皮石斛主要的生物活性物质是多糖类化合物,且在植物界中其多糖类物质含量相对较高,抗氧化能力较强^[6-9]。然而由于铁皮石斛的种子极小、无胚乳,生长条件苛刻,生长周期长,导致野生铁皮石斛的产量非常有限,加上长期过度采挖,目前野生铁皮石斛已濒临灭绝^[10]。为实现铁皮石斛资源的可持续发展,近年来,云南、广西、广东等地的相关科研及技术部门已经利用植物细胞培养技术,获得了其组织培养物——铁皮石斛原球茎,为铁皮石斛植株的人工栽培提供了技术保障。但铁皮石斛原球茎多糖与野生铁皮石斛多糖在抗菌及体外抗氧化活性方面的差异尚不清楚,为此,本研究比较了铁皮石斛原球茎多糖与野生铁皮石斛植株多糖的抗菌及体外抗氧化活性,并分析二者的差异,以期对铁皮石斛组织培养物的进一步开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 铁皮石斛原球茎,由云南纳博生物技术有限公司提供,将铁皮石斛茎段诱导出的原球茎接种到改良的 B5 培养基中,28 ℃培养 35 d;野

生铁皮石斛采自云南普洱山区。

铁皮石斛多糖粗品自行制备,以料液比(体积比)1:2 的比例将经过破碎的铁皮石斛用 90 ℃热水浸提 3~4 h,浸提液浓缩至 1/10 体积时,用 6 倍体积的体积分数 95%乙醇进行多次沉淀,所得沉淀经 55 ℃干燥后即得铁皮石斛多糖粗品。

1.1.2 试验菌种 供试菌种为大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和白色念珠菌(*Candida albicans*),均购自广东省微生物研究所。

1.1.3 试验动物 雄性昆明种小白鼠,体质量(20±2) g/只,购自昆明医科大学实验动物养殖中心。

1.1.4 试剂和仪器 盐酸羟胺、对氨基苯磺酸、 α -萘胺、三羟甲基氨基甲烷、硫代巴比妥酸、过氧化氢、硫酸亚铁等均为国产生化试剂或分析纯试剂;N,N,N,N-四甲基乙二胺、DPPH $\cdot$ 为 Sigma 公司产品。

主要仪器有上海博迅电热恒温培养箱 HPX-9162MBE、日立 U-3010 型紫外可见分光光度计 Hitachi。

1.2 方法

1.2.1 铁皮石斛多糖抗菌活性测定 取 2 种铁皮石斛多糖粗品用无菌水分别溶解成 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL 5 个梯度,将经过 120 ℃干热灭菌的滤纸片放入其中浸泡 0.5 h 备用。

将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌接种于牛肉膏蛋白胨斜面培养基上,于 30 ℃培养 24 h 进行活化;白色念珠菌接种于改良马氏琼脂培养基上,25 ℃培养 2~3 d 进行活化。然后在活化好的斜面试管中加入 10 mL 无菌生理盐水,振荡数次,洗下斜面上的细菌,制成 10^6 CFU/mL 的菌悬液,然后取 100 μL 该菌悬液于相应的固体琼脂平板上,用无

菌棒涂均匀,再分别将浸泡过多糖的滤纸片小心地平铺于上述涂菌平板上,距离适中,于 30 ℃ 下培养 48 h,观察有无抑菌圈形成,对有抑菌圈形成的试验组测定其直径,减去滤纸片的直径(6 mm)后记录结果。试验重复 3 次,结果取平均值。

1.2.2 铁皮石斛多糖体外抗氧化活性测定 (1)对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的清除能力。参考文献[11]的方法稍加改进。其原理是利用 H_2O_2 与 Fe^{2+} 混合产生 $\cdot\text{OH}$,在体系中加入水杨酸捕捉 $\cdot\text{OH}$ 并产生有色物质,该物质在 510 nm 处有最大吸收。样品组试管中加入 1 mL 0.15 mmol/L FeSO_4 、0.4 mL 2 mmol/L 水杨酸、0.2 mL 不同质量浓度的铁皮石斛多糖溶液、1 mL 6 mmol/L H_2O_2 和 0.4 mL 蒸馏水;空白组用蒸馏水代替铁皮石斛多糖溶液,对照组用蒸馏水代替水杨酸。将 3 组试管放入 37 ℃ 水浴锅中,1 h 后取出冷却,用蒸馏水调 0,分别测吸光度 A_{510} ,均设 3 个重复,取平均值。吸光度越小,表明对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果越好。以抗坏血酸(V_C)作阳性对照, $\cdot\text{OH}$ 清除率的计算公式为:

$$\text{清除率} = \frac{A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}})}{A_{\text{空白}}} \times 100\%$$

(2)对超氧自由基(O_2^-)的清除能力。参考萧华山等^[12]和何铁光等^[13]的方法并加以改进。预先配制溶液 A(1 mol/L 盐酸 48.0 mL,三羟甲基氨基甲烷 36.6 g,N,N,N,N-四甲基乙二胺 0.23 mL,用蒸馏水定容于 100 mL 容量瓶中),然后配制溶液 B(0.14 g 过硫酸铵用蒸馏水定容至 100 mL)。在试管中分别加入溶液 A 0.4 mL 和溶液 B 1.6 mL,反应 1 min 后,加入不同体积的 3.0 mg/mL 铁皮石斛多糖溶液,混匀,加水使总体积为 3.5 mL,以相同体积的蒸馏水作对照,再向各管中加入 10 mmol/L 盐酸羟胺 0.4 mL,25 ℃ 混合后反应 20 min,再加入 17 mmol/L 对氨基苯磺酸 2 mL 和 7 mmol/L α -萘胺 2 mL,25 ℃ 下反应 25 min,反应显色后加入同体积的正丁醇,充分摇匀,静置分层,取正丁醇相,分别测吸光度 A_{530} ,试验重复 3 次取其平均值。 O_2^- 清除率的计算公式为:

$$\text{清除率} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

(3)对自由基(DPPH $\cdot$)的清除能力。DPPH $\cdot$ 在有机溶剂中是一种稳定的自由基,在 517 nm 处有吸收峰,呈紫色。当自由基清除剂存在时,DPPH $\cdot$ 的孤电子被配对,颜色变浅,在最大吸收波长处吸光度变小。因此,测定 DPPH $\cdot$ 在体系中的吸光度变化可

用来评价自由基(DPPH $\cdot$)的清除情况^[14]。

参考文献[15]和[16]的方法测定 2 种铁皮石斛多糖对 DPPH $\cdot$ 的清除能力,但有所改进。在样品管中加入 0.5 mL 不同质量浓度的铁皮石斛多糖溶液与 2.5 mL 体积分数 0.004% 的 DPPH $\cdot$ 溶液;对照管用体积分数 95% 乙醇代替 DPPH $\cdot$ 溶液;空白管用蒸馏水代替多糖溶液。以上 3 组试管均置于 30 ℃ 水浴避光反应 30 min 后,用 0.5 mL 蒸馏水和 95% 乙醇 2.5 mL 调 0,分别测吸光度 A_{517} ,试验重复 3 次取其平均值。以抗坏血酸(V_C)作阳性对照。用下式计算铁皮石斛多糖对 DPPH $\cdot$ 的清除率:

$$\text{清除率} = \frac{A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}})}{A_{\text{空白}}} \times 100\%$$

(4)对小鼠肝组织脂质过氧化反应的影响。参考文献[17]的硫代巴比妥酸 TBA 法并有改进。小白鼠禁食 15 h 后颈椎脱臼处死,迅速取出肝脏,置 4 ℃ 生理盐水中洗净血污,滤纸吸干后称质量,于冰浴中加 9 倍体积的冷生理盐水将肝组织制成质量分数 10% 的匀浆液,4 000 r/min 离心 15 min,取上清液作为肝组织匀浆液置 4 ℃ 冰箱中保存备用。

试验设自发氧化组、对照组、 H_2O_2 诱导组和 FeSO_4 诱导组,对自发氧化组,分别向各试管中加入质量分数 10% 肝匀浆液 0.20 mL 和不同体积的铁皮石斛多糖溶液,无菌水补充体积至 0.4 mL,对照组则以生理盐水替代铁皮石斛多糖溶液,各试管于 37 ℃ 水浴 1 h 后,硫代巴比妥酸(TBA)比色法测吸光度 A_{532} ,试验重复 3 次取其平均值。 A_{532} 值越大,表明肝组织中脂质过氧化物丙二醛(MDA)的含量越高。 H_2O_2 和 FeSO_4 诱导组则分别先加入 0.10 mL 10 mmol/L 的 H_2O_2 和 0.10 mL 5 mmol/L 的 FeSO_4 ,其他方法与自发氧化组相同。按下式计算抑制率:

$$\text{抑制率} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

1.3 数据统计分析

所有数据在 SPSS 7.0 软件上进行计算,采用“平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)”表示,组间比较采用 2 个独立样本的 t 检验, $P < 0.05$ 表示与对照组相比差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 2 种铁皮石斛多糖的抗菌活性

铁皮石斛原球茎多糖与野生铁皮石斛多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌的抗菌效果见表 1。

表 1 2 种铁皮石斛多糖对不同供试菌的抑菌活性

Table 1 Inhibitory activity of 2 polysaccharides against different spoilage bacteria

多糖来源 Source of polysaccharide	多糖质量浓度/ (mg·mL ⁻¹) Concentration	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone			
		大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	白色念珠菌 <i>Candidaalbicans</i>
铁皮石斛原球茎 Polysaccharide from protocorms of <i>Dendrobium candidum</i>	0.1	1.35±0.03	2.13±0.10	3.12±0.11	1.54±0.06
	0.2	1.43±0.08	2.15±0.13	3.82±0.09	2.91±0.12
	0.3	1.79±0.11	3.43±0.08	4.87±0.10	3.24±0.11
	0.4	2.13±0.10	3.89±0.12	5.21±0.14	4.02±0.18
	0.5	2.36±0.13	4.13±0.08	5.96±0.02	4.05±0.16
野生铁皮石斛 Polysaccharide from wild <i>Dendrobium</i>	0.1	1.65±0.04	2.73±0.06	3.41±0.09	1.84±0.10
	0.2	1.78±0.10	2.75±0.12	4.13±0.10	2.96±0.11
	0.3	2.12±0.02	3.89±0.09	5.17±0.10	3.66±0.13
	0.4	2.75±0.10	4.56±0.08	6.21±0.12	4.72±0.09
	0.5	3.20±0.11	5.13±0.08	6.92±0.16	4.76±0.05

从表 1 可以看出,2 种铁皮石斛多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌都有不同程度的抑制作用,且抑菌强度随着多糖质量浓度的增加而增大;同样质量浓度下,野生铁皮石斛多糖比铁皮石斛原球茎多糖有更好的抗菌活性。

2.2 2 种铁皮石斛多糖的体外抗氧化活性

2.2.1 对·OH 的清除效果 从表 2 可以看出,2 种铁皮石斛多糖对羟基自由基(·OH)均有极显著

的清除作用($P<0.01$),且清除能力与多糖的质量浓度存在一定的量效关系,即随着多糖质量浓度的增加,清除率增大;同时,野生铁皮石斛多糖的清除能力比铁皮石斛原球茎多糖强。铁皮石斛原球茎多糖对·OH 的半数清除质量浓度(IC₅₀)为 1.162 mg/mL;野生铁皮石斛多糖的 IC₅₀ 为 1.065 mg/mL。

表 2 2 种铁皮石斛多糖对羟基自由基(·OH)的清除效果

Table 2 Scavenging ·OH by 2 polysaccharides

组别 Group	多糖质量浓度/(mg·mL ⁻¹) Concentration	吸光度(A ₅₁₀) Absorbance	清除率/% Scavenging rate
空白 Blank	—	0.665±0.004	—
对照 Control	—	0.032±0.001**	—
铁皮石斛原球茎 Polysaccharide from protocorms of <i>Dendrobium candidum</i>	0.1	0.575±0.001**	18.31
	0.2	0.514±0.002**	27.52
	0.3	0.478±0.004**	32.93
	0.4	0.421±0.001**	36.11
	0.5	0.389±0.006**	46.31
野生铁皮石斛 Polysaccharide from wild <i>Dendrobium</i>	0.1	0.555±0.002**	21.30
	0.2	0.498±0.001**	29.89
	0.3	0.471±0.002**	34.01
	0.4	0.419±0.004**	41.82
	0.5	0.372±0.004**	48.89

注: ** 表示与对照相比,差异极显著($P<0.01$),下表同。
Note: ** indicates extremely significant different ($P<0.01$) compared with control. The same below.

2.2.2 对 O₂⁻ 的清除效果 由表 3 可以看出,2 种铁皮石斛多糖对超氧阴离子(O₂⁻)均有极显著的清除作用($P<0.01$),且清除率均随多糖质量浓度的增大而提高,二者之间存在较好的量效关系;并且在多糖质量浓度为 0.1~0.4 mg/mL 时,野生铁皮石斛多糖对 O₂⁻ 的清除率与其质量浓度之间具有较好的线性关系;但当其质量浓度高于 0.4 mg/mL 时,其清除率反而有所下降,这可能是由于在自由基引发剂存在的条件下,多糖本身可以自动氧化产生新

的自由基,但高质量浓度增加了多糖分子与自由基引发剂的反应机会,从而使高质量浓度多糖的清除效果有所降低^[18]。铁皮石斛原球茎多糖清除 O₂⁻ 的 IC₅₀ 为 0.786 mg/mL。
2.2.3 对 DPPH· 自由基的清除效果 由表 4 可见,2 种铁皮石斛多糖对 DPPH· 自由基均有极显著的清除能力($P<0.01$),清除能力与清除效果呈明显的剂量效应关系;野生铁皮石斛多糖对 DPPH· 自由基的清除能力较铁皮石斛原球茎多糖

强,其对 DPPH · 的 IC₅₀ 分别为 0. 525 和 0. 621 mg/mL。

表 3 2 种铁皮石斛多糖对超氧阴离子(O₂⁻)的清除效果

Table 3 Scavenging O ₂ ⁻ by 2 polysaccharides			
组别 Group	多糖质量浓度(mg · mL ⁻¹) Concentration	吸光度(A ₅₃₀) Absorbance	清除率/% Scavenging rate
对照 Control	—	0. 299±0. 003	—
铁皮石斛原球茎 Polysaccharide from protocorms of <i>Dendrobium candidum</i>	0. 1	0. 245±0. 001 * *	18. 06
	0. 2	0. 199±0. 002 * *	33. 41
	0. 3	0. 172±0. 001 * *	42. 47
	0. 4	0. 159±0. 002 * *	46. 82
	0. 5	0. 169±0. 001 * *	43. 47
野生铁皮石斛 Polysaccharide from wild <i>Dendrobium</i>	0. 1	0. 235±0. 001 * *	21. 40
	0. 2	0. 191±0. 002 * *	36. 12
	0. 3	0. 166±0. 001 * *	44. 48
	0. 4	0. 152±0. 002 * *	49. 16
	0. 5	0. 170±0. 001 * *	43. 14

表 4 2 种铁皮石斛多糖对 DPPH · 自由基的清除效果

Table 4 Scavenging DPPH · by 2 polysaccharides			
组别 Group	多糖质量浓度/(mg · mL ⁻¹) Concentration	吸光度(A ₅₁₇) Absorbance	清除率/% Scavenging rate
空白 Blank	—	0. 679±0. 004	—
对照 Control	—	0. 038±0. 001 * *	—
铁皮石斛原球茎 Polysaccharide from protocorms of <i>Dendrobium candidum</i>	0. 1	0. 612±0. 002 * *	14. 58
	0. 2	0. 586±0. 004 * *	19. 29
	0. 3	0. 532±0. 003 * *	27. 25
	0. 4	0. 501±0. 005 * *	31. 81
	0. 5	0. 471±0. 004 * *	36. 23
野生铁皮石斛 Polysaccharide from wild <i>Dendrobium</i>	0. 1	0. 582±0. 003 * *	19. 88
	0. 2	0. 539±0. 003 * *	26. 21
	0. 3	0. 499±0. 004 * *	32. 11
	0. 4	0. 463±0. 002 * *	37. 41
	0. 5	0. 392±0. 003 * *	47. 86

2. 2. 4 对小鼠肝组织脂质过氧化反应的影响 2 用见表 5。

种铁皮石斛多糖对小鼠肝组织脂质过氧化的抑制作

表 5 2 种铁皮石斛多糖对小鼠肝组织脂质过氧化的抑制作用

Table 5 Inhibitory effects of 2 polysaccharides on lipid peroxidation in mice liver							
组别 Group	多糖质量 浓度/ (mg · mL ⁻¹)	自发氧化 Autoxidation		H ₂ O ₂ 诱导 H ₂ O ₂ induction		Fe ²⁺ 诱导 Fe ²⁺ induction	
		吸光度(A ₅₃₂) Absorbance	抑制率/% Inhibitory rate	吸光度(A ₅₃₂) Absorbance	抑制率/% Inhibitory rate	吸光度(A ₅₃₂) Absorbance	抑制率/% Inhibitory rate
对照 Control		0. 427±0. 004	—	0. 539±0. 004	—	0. 569±0. 004	—
铁皮石斛原球茎 Polysaccharide from protocorms of <i>Dendrobium</i> <i>candidum</i>	0. 1	0. 416±0. 005 * *	2. 57	0. 516±0. 005 * *	4. 27	0. 526±0. 004 * *	7. 56
	0. 2	0. 378±0. 006 * *	11. 48	0. 508±0. 006 * *	5. 75	0. 498±0. 004 * *	12. 42
	0. 3	0. 326±0. 004 * *	23. 65	0. 471±0. 004 * *	12. 61	0. 479±0. 004 * *	15. 81
	0. 4	0. 298±0. 005 * *	30. 21	0. 460±0. 007 * *	14. 66	0. 444±0. 004 * *	21. 96
	0. 5	0. 281±0. 006 * *	34. 19	0. 416±0. 006 * *	22. 82	0. 368±0. 004 * *	35. 38
野生铁皮石斛 Polysaccharide from wild <i>Dendrobium</i>	0. 1	0. 410±0. 004 * *	3. 98	0. 502±0. 006 * *	6. 86	0. 517±0. 004 * *	9. 13
	0. 2	0. 356±0. 004 * *	16. 62	0. 480±0. 006 * *	10. 95	0. 489±0. 004 * *	14. 06
	0. 3	0. 309±0. 005 * *	27. 63	0. 458±0. 006 * *	15. 21	0. 468±0. 004 * *	17. 75
	0. 4	0. 282±0. 004 * *	33. 95	0. 431±0. 006 * *	20. 03	0. 441±0. 026 * *	22. 49
	0. 5	0. 256±0. 003 * *	40. 04	0. 402±0. 006 * *	25. 41	0. 408±0. 014 * *	28. 29

由表 5 可知,在自发氧化条件下,随着铁皮石斛多糖质量浓度的增加,A₅₃₂ 逐渐减小,也即小鼠肝组织中脂质过氧化物丙二醛(MDA)的生成量逐渐减少,当各诱导组加入多糖后,MDA 生成受到了不同程度的抑制,其抑制作用随铁皮石斛多糖质量浓度的增加而增强,并呈剂量效应关系,铁皮石斛原球茎

多糖和野生铁皮石斛多糖对小鼠肝组织中脂质过氧化物丙二醛(MDA)的半数抑制质量浓度(IC_{50})分别为 1.962 和 1.801 mg/mL; 2 种铁皮石斛多糖对 Fe^{2+} 诱导组的抗氧化作用强于 H_2O_2 诱导组, 可能是因为 H_2O_2 诱导体中产生的自由基强于 $FeSO_4$ 诱导组^[19]。而且在试验范围内, 自发氧化组、 H_2O_2 诱导组和 $FeSO_4$ 诱导组对小鼠肝组织脂质过氧化的抑制作用均极为显著($P < 0.01$), 说明 2 种铁皮石斛多糖对小鼠肝组织的脂质过氧化反应均有显著的抑制作用。

3 讨论与结论

国内有学者分别对野生铁皮石斛的抗菌活性及铁皮石斛多糖和铁皮石斛原球茎多糖的抗氧化活性进行了研究, 但都缺乏对相同条件下野生铁皮石斛多糖和实验室培养条件下生长的铁皮石斛原球茎多糖抗菌及抗氧化活性的比较研究, 而二者之间的差异正是消费者关注的焦点。

本研究采用乙醇分步沉淀法提取铁皮石斛原球茎多糖与野生铁皮石斛多糖, 对其抗菌及抗氧化活性进行比较, 结果表明, 2 种来源的铁皮石斛多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌均有显著的抑制作用, 且野生铁皮石斛的抑菌效果比铁皮石斛原球茎强; 2 种铁皮石斛多糖都具有较好的体外抗氧化能力, 对 $\cdot OH$ 、 O_2^- 和 DPPH $\cdot$ 自由基均表现出极显著的清除作用, 同时对小鼠肝组织脂质过氧化也表现出显著的抑制作用, 且野生铁皮石斛多糖比铁皮石斛原球茎多糖的抗氧化作用更强; 另外, 2 种铁皮石斛多糖的抗菌及抗氧化活性均与多糖质量浓度存在着良好的剂量效应关系。铁皮石斛原球茎多糖对 $\cdot OH$ 、 O_2^- 和 DPPH $\cdot$ 的半数清除质量浓度(IC_{50})分别为 1.162, 0.786 和 0.621 mg/mL, 野生铁皮石斛多糖对 $\cdot OH$ 和 DPPH $\cdot$ 的 IC_{50} 为 1.065, 0.525 mg/mL, 在 0.1~0.4 mg/mL 时, 其对 O_2^- 的清除率与其质量浓度之间具有较好的线性关系, 当质量浓度高于 0.4 mg/mL 时, 其清除率反而有所下降。2 种铁皮石斛多糖对小鼠肝组织中脂质过氧化物丙二醛(MDA)的半数抑制质量浓度(IC_{50})分别为 1.962 和 1.801 mg/mL。

综上所述, 尽管铁皮石斛原球茎多糖与野生铁皮石斛多糖在抗菌、抗氧化能力方面还有一定差距, 但与野生铁皮石斛相比, 铁皮石斛原球茎具有栽培简单、生产周期短和成本低等优势, 因此无论在抗菌、抗氧化功能还是产品开发方面, 都有进一步研究

和开发的價值。

[参考文献]

- [1] 黄晓君, 聂少平, 王玉婷, 等. 铁皮石斛多糖提取工艺优化及其成分分析 [J]. 食品科学, 2013, 34(22): 21-26.
Huang X J, Nie S P, Wang Y T, et al. Optimized extraction and compositional analysis of polysaccharides from dried stems of *Dendrobium officinale* [J]. Food Science, 2013, 34(22): 21-26. (in Chinese)
- [2] 高正华, 杨兵勋, 陈立钻. 铁皮石斛的研究进展 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2008, 25(8): 692-695.
Gao Z H, Yang B X, Chen L Z. Research progress of *Dendrobium candidum* [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2008, 25(8): 692-695. (in Chinese)
- [3] 汪曙, 魏凤娟, 蔡永萍, 等. 霍山石斛与铁皮石斛多糖体外抗氧化作用的初步研究 [J]. 农业科学与技术, 2009, 10(6): 121-124.
Wang S, Wei F J, Cai Y P, et al. Anti-oxidation activity *in vitro* of polysaccharides of *Dendrobium Huoshanense* and *Dendrobium moniliforme* [J]. Agricultural Science & Technology, 2009, 10(6): 121-124. (in Chinese)
- [4] McClements D J, Decker E A. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular on chemical reactions in heterogeneous food system [J]. Journal of Food Science, 2000, 65(8): 1270-1282.
- [5] 朱艳, 秦民坚. 铁皮石斛茎段诱导丛生芽的研究 [J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(2): 56-57.
Zhu Y, Qin M J. Cluster shoots induction from stem segments of *Dendrobium candidum* [J]. Chinese Wild Plant Resources, 2003, 22(2): 56-57. (in Chinese)
- [6] Lia S P, Sua Z R, Dong T T X, et al. The fruiting body and its caterpillar host of *Cordyceps sinensis* show close resemblance in main constituents and anti-oxidation activity [J]. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, 2002, 9(4): 319-324.
- [7] 陈晓梅, 郭顺星. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(1): 70-75.
Chen X M, Guo S X. Advances in the research of constituents and pharmacology of *Dendrobium* [J]. Natural Product Research and Development, 2001, 13(1): 70-75. (in Chinese)
- [9] 聂少平, 蔡海兰. 铁皮石斛活性成分及其功能研究进展 [J]. 食品科学, 2012, 33(23): 356-361.
Nie S P, Cai H L. Research progress in bioactive components and functions of *Dendrobium officinale* [J]. Food Science, 2012, 33(23): 356-361. (in Chinese)
- [10] 张启香, 方炎明. 铁皮石斛组织培养及试管苗营养器官和原球茎的结构观察 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(9): 1761-1765.
Zhang Q X, Fang Y M. Tissue culture and *in vitro* seedling and protocorm-like body examination of *Dendrobium candidum* [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2005, 25(9): 1761-1765. (in Chinese)

[17] Kong W, Liu N, Zhang J, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction parameters of chlorophyll from *Chlorella vulgaris* residue after lipid separation using response surface methodology [J]. J Food Sci Technol, 2014, 51(9): 2006-2013.

[18] Gan C Y, Latiff A A. Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology [J]. Food Chem, 2011, 124(3): 1277-1283.

[19] 余小翠, 刘高峰. 响应面分析法在中药提取和制备工艺中的应用 [J]. 中药材, 2010, 33(10): 1651-1655.

Yu X C, Liu G F. Application of response surface analysis methodology on the process of extraction and preparation of traditional Chinese medicine [J]. J Chin Med Mat, 2010, 33(10): 1651-1655. (in Chinese)

[20] 李 钰, 吴 卫, 苏 华, 等. 响应面法优化紫苏籽粕超声辅助提取原花青素工艺 [J]. 食品科学, 2014, 35(4): 50-54.

Li Y, Wu W, Su H, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of proanthocyanidins from *Perilla frutescens* using response surface methodology [J]. Food Sci, 2014, 35(4): 50-54. (in Chinese)

[21] 贾学静, 李 乐, 丁春邦, 等. 响应面法优化微波辅助提取成熟叶老鹰茶总黄酮及其抗氧化研究 [J]. 林产化学与工业, 2014, 34(3): 85-91.

Jia X J, Li L, Ding C B, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of total flavonoids from matured leaf hawk tea by response surface methodology and its antioxidant activity [J]. Chem Indus Forest Prod, 2014, 34(3): 85-91. (in Chinese)

[22] 刘云海, 杜 光. 超微粉碎对中药活性成分提取率的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(1): 66-69.

Liu Y H, Du G. Influence of ultrafine comminution on the extraction rate of active components of traditional Chinese medicine [J]. Chin Hosp Pharm J, 2010, 30(1): 66-69. (in Chinese)

[23] 杨丽玲, 吴 铁. 不同粉碎度对人参皂苷 3 种不同单体提取率的影响 [J]. 长春中医药大学学报, 2009, 25(5): 669-671.

Yang L L, Wu T. Influence of different comminution degree on the extraction rate of three ginsenosides [J]. J Changchun Univ Trad Chin Med, 2009, 25(5): 669-671. (in Chinese)

[24] 李德成, 刘庆燕, 陈 田, 等. 不同粉碎粒度对甘草中有效成分含量的影响 [J]. 山西中医学院学报, 2010, 11(3): 32-34.

Li D C, Liu Q Y, Chen T, et al. Influence of different comminution degree on effective components in radix *Glycyrrhiza* [J]. J Shanxi Coll Trad Chin Med, 2010, 11(3): 32-34. (in Chinese)

(上接第 172 页)

[11] 李颖畅, 孟宪军. 蓝莓叶黄酮提取物抗氧化活性的研究 [J]. 营养学报, 2008, 30(4): 427-429.

Li Y C, Meng X J. Studies on antioxidant activity of flavonoids from leaves of blueberry [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2008, 30(4): 427-429. (in Chinese)

[12] 萧华山, 何文锦, 傅文庆, 等. 一种用分光光度计检测氧自由基的新方法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(2): 180-183.

Xiao H S, He W J, Fu W Q, et al. A spectrophotometer method testing oxygen radicals [J]. Prog Biochem Biophys, 1999, 26(2): 180-183. (in Chinese)

[13] 何铁光, 杨丽涛, 李杨瑞, 等. 铁皮石斛原球茎多糖 DCP1a-1 对氧自由基和脂质过氧化的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(3): 410-414.

He T G, Yang L T, Li Y R, et al. Effects of the polysaccharides DCP1a-1 from suspension-cultured protocorms of *Dendrobium candidum* on oxygen radical and lipid peroxidation [J]. Natural Product Research and Development, 2007, 19(3): 410-414. (in Chinese)

[14] 孙艳梅, 徐雅琴, 杨 林. 天然物质类黄酮的抗氧化活性的研究 [J]. 中国油脂, 2003, 28(3): 54-57.

Sun Y M, Xu Y Q, Yang L. Research on antioxidant activity of flavonoids from natural materials [J]. China Oils and Fats, 2003, 28(3): 54-57. (in Chinese)

[15] 高荫榆, 洪雪娥, 罗丽萍, 等. 甘薯叶柄蒴类黄酮的体外抗氧化作用研究 [J]. 食品科学, 2006, 27(7): 103-106.

Gao Y Y, Hong X E, Luo L P, et al. Study on *in vitro* antioxidant effects of polysaccharides from sweet potato leaf, stalk and stem [J]. Food Science, 2006, 27(7): 103-106. (in Chinese)

[16] 鲍素华, 查学强, 郝 杰, 等. 不同分子量铁皮石斛多糖体外抗氧化活性研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(21): 123-127.

Bao S H, Zha X Q, Hao J, et al. *In vitro* antioxidant activity of polysaccharides with different molecular weights from *Dendrobium candidum* [J]. Food Science, 2009, 30(21): 123-127. (in Chinese)

[17] 何铁光, 杨丽涛, 李杨瑞, 等. 铁皮石斛原球茎多糖粗品与纯品的体外抗氧化活性研究 [J]. 中成药, 2007, 29(9): 1265-1269.

He T G, Yang L T, Li Y R, et al. Antioxidant activity of crude and purified polysaccharide from suspension-cultured protocorms of *Dendrobium candidum in vitro* [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2007, 29(9): 1265-1269. (in Chinese)

[18] 杨海龙, 李 伟. 短裙竹荪多糖清除 O_2^- 及对人红细胞膜自由基氧化的影响 [J]. 科技通报, 2000, 16(5): 371-374.

Yang H L, Li W. Effects of *Dictyophora duplicata* polysaccharide on eliminating super-oxygen free radical and membrane oxidation of human erythrocyte [J]. Bulletin of Science and Technology, 2000, 16(5): 371-374. (in Chinese)

[19] 李 进, 瞿伟菁, 张素军, 等. 黑果枸杞色素的抗氧化活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(14): 1179-1183.

Li J, Qu W J, Zhang S J, et al. Study on antioxidant activity of pigment of *Lycium ruthenicum* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2006, 31(14): 1179-1183. (in Chinese)