

本斯石斛花的香气成分及抗氧化活性研究

杨宇涵^{1,2}, 谢雯婷^{1,2}, 赵杰^{1,2}, 杜芝芝^{1,3*}

¹中国科学院昆明植物研究所资源植物与生物技术重点实验室 云南省野生资源植物研发重点实验室, 昆明 650201;

²中国科学院大学, 北京 100049; ³中国科学院昆明植物研究所 植物医生研发中心, 昆明 650201

摘要:为探究本斯石斛鲜花的香气组成及抗氧化活性,本文采用溶剂辅助风味蒸馏法对本斯石斛鲜花的挥发性成分进行提取,采用3种体外自由基清除模型结合人永生化皮质细胞内SOD酶活力修复模型对本斯石斛花的提取物进行抗氧化活性评价。通过GC-MS对挥发物的化学组成进行分析,峰面积归一化法确定各化合物的相对百分含量,结合嗅觉阈值所计算得到的气味活度值,确定了本斯石斛鲜花中的关键香气化合物。结果显示:从本斯石斛花挥发物中共鉴定出51种化合物,约占总含量的90.0%,其中关键香气成分16个,包括苯甲醇(45.5%)、香草醛(17.0%)、己醛(3.4%)、苯乙醇(2.7%)等,修饰性香气化合物6个以及潜在香气化合物3个,这些成分共同构成了本斯石斛鲜花具有的青草香、甜香、花香等的香气特征。本斯石斛鲜花高浓度乙醇提取物在羟基自由基清除、DPPH自由基清除、ABTS自由基清除模型、人永生化皮质细胞内SOD酶修复模型评价中均表现出较强的抗氧化活性。本研究为本斯石斛花相关香型日化产品和抗氧化活性物质的研发提供了科学依据。

关键词:本斯石斛;溶剂辅助风味蒸馏;香气成分;气质联用;抗氧化活性

中图分类号:TQ654 + 2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)8-1292-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.8.004

Study on aroma components and antioxidant activity of *Dendrobium bensoniae* Rchb. f.

YANG Yu-han^{1,2}, XIE Wen-ting^{1,2}, ZHAO Jie^{1,2}, DU Zhi-zhi^{1,3*}

¹Key Laboratory of Economic Plants and Biotechnology, Yunnan Key Laboratory for Wild Plant Resources, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China;

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

³Bio-Innovation Center of DR PLANT, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China

Abstract: In order to explore the aroma composition and antioxidant activity of *Dendrobium bensoniae* Rchb. f. flower, the volatile extract of *D. bensoniae* was obtained by solvent-assisted flavor evaporation (SAFE) and the antioxidant activities of its extracts were evaluated by three kinds of free radical scavenging models *in vitro* combined with SOD activity repair model in human immortalized cortical cells. The chemical composition of the volatiles was analyzed by GC-MS and the relative percentage of each compound was determined by peak area normalization method. Odor active value of each compound was calculated based on its relative percentage and accordingly odor threshold, which indicated the key aroma compounds in *D. bensoniae* flower. The research results showed that a total of 51 compounds were identified from the flower volatiles, accounting for 90.0% of the total content. Among them, 16 key aroma compounds, 6 modified aroma compounds and 3 potential aroma compounds were identified, including benzyl alcohol (45.5%), vanillin (17.0%), hexanal (3.4%) and phenylethyl alcohol (2.7%), which responsible for the aroma characteristics of grass, sweet and floral notes of the flower. The material extracted by high concentration ethanol from *D. bensoniae* flower showed strong antioxidant activity in hydroxyl free radical scavenging, DPPH free radical scavenging, ABTS free radical scavenging bio-assays and SOD activity repair model in human immortalized cortical cells. The results of the present study provide a scientific basis for the research and development of *D. bensoniae* flow-

er related products and antioxidant substances.

Key words: *Dendrobium bensoniae*; SAFE; aroma compounds; GC-MS; antioxidant activity

石斛属(*Dendrobium* Sw.)作为兰科植物中仅次于石豆兰属的第二大属,全世界约有1 000个种,我国有76种,主要分布于秦岭以南诸省,尤其以云南为多^[1]。石斛花的香气种类繁多,且大多具有非常鲜明的特点。本斯石斛(*Dendrobium bensoniae* Rchb. f.)为兰科石斛属附生植物,原产于印度东北部及缅甸^[2]。因其优雅别致的造型及独特宜人的香气而深受消费者喜爱,现已成为重要的观赏园艺花卉,在世界范围内广泛种植,拥有巨大的商业价值。

对于园艺观赏花卉而言,花香是决定消费者感官体验和鲜花市场价值最重要的因素之一,但目前对石斛鲜花挥发物的研究甚少。已报道的文献中,顶空-固相微萃取(headspace solid phase micro-extraction, HS-SPME)是唯一一种被广泛用于石斛鲜花香气提取的方法。目前已有关于流苏石斛(*D. fimbriatum* Hook.)^[3]、铁皮石斛(*D. officinale* Kimura et Migo)^[4]、鼓槌石斛(*D. chrysotoxum* Lindl.)^[5]等石斛鲜花挥发性化合物的研究。但仍有一些亟待解决的问题,一是HS-SPME采用的不同吸附类型的吸附柱对花朵香气化合物的富集存在选择性偏差,不能够完整地提取并反映原始样品的整个香气轮廓;其次,此前的研究多着重于对石斛鲜花挥发性化合物的研究,而缺乏对其香气属性的分析。

此外,石斛花中含有石斛多糖、石斛碱、黄酮、氨基酸等多种活性成分,具有抗氧化、护肝、降糖、降压等功效^[6-8]。对石斛花抗氧化活性的研究是当前的热点之一,也是决定石斛花开发利用价值的重要因素,以收录于《中华人民共和国药典》^[9]的铁皮石斛、鼓槌石斛、流苏石斛、金钗石斛(*D. nobile* Lindl.)、霍山石斛(*D. huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng)为代表,已有31种石斛被国内外学者报道具有抗氧化活性^[10],但有关本斯石斛花抗氧化活性的研究目前仍是空白。因此本文将花香分析与抗氧化研究相结合,共同探讨本斯石斛花的开发价值与利用前景。

本文采用溶剂辅助风味蒸馏(solvent-assisted flavor evaporation, SAFE)的方法对本斯石斛中提取到的香气化合物进行分离^[11],这种方法在低温及高真空条件下利用各种溶剂辅助样品进行蒸馏,实现

挥发性化合物和非挥发性化合物的高效分离,低温蒸馏可以在很大程度上减少挥发性成分的损失,相比于HS-SPME,SAFE所制得的香气提取物更接近香气实体的气味且实验重现性更好。随后使用气相色谱-质谱联用的分析技术对香气化合物进行分析,并以峰面积归一化法计算各组分的相对百分含量,进一步通过对香气化合物的气味活度值(odor activity value, OAV)进行计算,解析本斯石斛鲜花的香气构成。同时,利用羟基自由基清除实验、DPPH自由基清除实验、ABTS自由基清除实验以及人永生化皮质细胞(HaCaT)内SOD酶活性修复实验评价了本斯石斛鲜花提取物的抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

本斯石斛鲜花,产自云南省普洱市孟连县,经中国科学院昆明植物研究所的黄家林高级工程师鉴定为本斯石斛(*D. bensoniae* Rchb. f.),2020年5月采收于孟连元隆农业科技有限公司种植基地。

1.1.2 仪器和设备

溶剂辅助风味蒸发装置(英国Edwards公司真空泵);7890A-5795C型气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦公司);HP-5色谱柱(50.0 m×0.32 mm×0.5 μm,美国安捷伦公司);旋转蒸发仪(日本EYELA);多功能酶标仪(Infinite M200 Pro)。

1.1.3 试剂

二氯甲烷(色谱纯,美国Meridian Medical Technologies);C₇-C₃₀的正构烷烃(色谱纯,美国SUPELCO公司);抗坏血酸(分析纯,天津市化学试剂三厂);超氧化物歧化酶试剂盒(南京建成);无水硫酸钠、无水乙醇、水杨酸、硫酸亚铁、30%过氧化氢溶液、甲醇、石油醚(分析纯,天津大茂化学试剂厂);ABTS(罗恩试剂);过硫酸钾(分析纯,西陇科学);DPPH(美国GLPBIO公司),水溶性维生素E(美国Sigma公司);DMEM高糖培养基、清链霉素双抗、FBS(美国Biological Industries);蒸馏水;液氮;高纯度氦气(99.999%)。

1.2 本斯石斛鲜花香气研究方法

1.2.1 本斯石斛鲜花挥发物样品的制备

称取200 g当天采收的本斯石斛鲜花(去除花

柄)置于三角瓶中,用2 000 mL 二氯甲烷于室温下浸泡24 h后过滤并收集二氯甲烷相。重复以上步骤3次,合并二氯甲烷相,使用旋转蒸发仪(水浴温度30 ℃)将其体积浓缩至100 mL左右,再将浓缩液使用SAFE装置进行分离(水浴温度45 ℃,循环水温度40 ℃),去除非挥发性成分,收集挥发性成分并继续浓缩至2 mL,最后使用轻柔氮气吹扫至0.5 mL,置于零下20 ℃条件下保存。

1.2.2 GC-MS 分析条件

GC-MS 条件:HP-5 色谱柱,程序升温条件为初始温度50 ℃,保持5 min,之后以2 ℃/min升至90 ℃,保持5 min,再以2 ℃/min升至210 ℃,分析检测时间共90 min;进样量1 μL,不分流,载气为高纯度氦气(含有量99.999%),流速为1.2 mL/min;溶剂延迟5 min。MS 离子源为EI源,离子源温度230 ℃,四极杆温度150 ℃,电子能量:70 eV,质核比扫描范围:40~500 m/z。

1.2.3 挥发性成分鉴定

采用质谱比对(MS)和保留指数比对(RI)相结合的方法对GC-MS检测到的挥发性成分进行鉴定。将GC-MS分析所得到各成分的质谱图与NIST14质谱库进行比对;通过相同仪器方法下C₇-C₃₀正构烷烃标品峰的保留时间数据计算样品总离子流图中所积分的各色谱峰的保留指数,与NIST Chemistry WebBook(<http://webbook.nist.gov/chemistry/>)在线数据库进行比对。

1.2.4 气味活度值(odor activity value, OAV)及其评价方法

通过峰面积归一化法得到样品中各香气化合物的相对百分含量,并在《化合物嗅觉阈值汇编》一书中^[12]检索这些化合物的嗅觉阈值(odor threshold),并通过以下等式计算各化合物的气味活度值(OAV):

$$OAV = \frac{C}{T}$$

式中C为挥发性香气化合物的相对百分含量,T为化合物的嗅觉阈值。

参考Wu等^[13]的方法,香气化合物的OAV值越大,说明该化合物对本斯石斛花香气轮廓的贡献越大。若OAV>1,说明该化合物可能对香气轮廓有直接影响,定义为关键香气化合物;若0.1<OAV<1,说明该化合物对香气轮廓有修饰作用,定义为修饰性香气化合物;若OAV<0.1,说明该

物质对香气轮廓无显著影响,定义为潜在香气化合物。

1.3 本斯石斛鲜花提取物的制备及抗氧化活性评价方法

1.3.1 本斯石斛鲜花提取物的制备及待测样品的配制

100 g 本斯石斛鲜花,使用95%乙醇-水冷浸提取三次(每次浸泡24 h),得到95%乙醇提取液;剩余的残渣用60%乙醇-水冷浸提取三次(每次浸泡24 h),得到60%乙醇提取液。95%乙醇提取液经减压浓缩除去乙醇,加入蒸馏水混悬后用石油醚萃取三次,得石油醚层和水层,分别减压浓缩除去石油醚并冷冻干燥后得石油醚萃取物(记为PP)和95%乙醇提取物水相部分(记为95% ET);60%乙醇提取液经减压浓缩除去乙醇并冷冻干燥后得到60%乙醇提取物(记为60% ET)。

精确称量提取物1 mg,使用50 μL的DMSO进行溶解,再用超纯水定容至1 mL,得到待测样品溶液。阳性对照为与待测样品相同浓度的抗坏血酸。

1.3.2 羟基自由基清除活性实验

参考Bouabid等^[14]的方法,在96孔板中依次加入待测样品溶液20 μL、9 mM水杨酸溶液20 μL、9 mM FeSO₄溶液20 μL、H₂O₂显色剂20 μL,最后加入超纯水补齐200 μL反应体系。37 ℃保温反应30 min后测定吸光值,检测波长为510 nm。以抗坏血酸为阳性对照。羟基自由基清除率的计算公式为:

$$\text{羟基自由基清除率} = (1 - \frac{A_s - A_t}{A_i - A_j}) \times 100\%$$

式中A_s为样品的吸光度值,A_t为样品不添加H₂O₂本底的反应组的吸光度值,A_i为空白对照组的吸光度值,A_j为空白对照组不添加H₂O₂本底的反应组的吸光度值。

1.3.3 DPPH 自由基清除活性实验

参照Lin等^[15]的方法,稍做修改。将待测样品溶液或阳性对照溶液分别与DPPH(终浓度100 μM)溶液混合,使用无水乙醇补齐200 μL反应体系,于30 ℃反应1 h,测吸光度值(OD),检测波长为517 nm。以抗坏血酸为阳性对照。DPPH自由基清除率的计算公式为:

$$\text{DPPH 自由基清除率} = (1 - \frac{OD_s}{OD_0}) \times 100\%$$

式中OD_s为空白对照的吸光度值,OD₀为样品的吸光度值。

1.3.4 ABTS 自由基清除活性实验

参考 Chen 等^[16]的方法,10 mL 的 ABTS 溶液(7 mM)与 5 mL 过硫酸钾溶液(2.45 mM)混合,室温下避光放置 16 h 得到 ABTS 添加液。将 20 μL 待测样品与 180 μL 的 ABTS 添加液混合,于室温下避光放置 5 min,检测其在 734 nm 处的吸光度。以抗坏血酸为阳性对照。ABTS 自由基清除率的计算公式为:

$$\text{ABTS 自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_s - A_t}{A_i - A_j}\right) \times 100\%$$

式中 A_s 为样品的吸光度值, A_t 为样品不添加 ABTS 本底的反应组的吸光度值, A_i 为空白对照组的吸光度值, A_j 为空白对照不添加 ABTS 本底的反应组的吸光度值。

1.3.5 细胞内 SOD 酶活力修复实验

参考 Shi 等^[17]的方法,使用含 10% FBS、1% 双抗的 DMEM 高糖培养基于 37 °C,含 5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中孵育 HaCaT,取对数生长期细

胞接种于 96 孔板培养 24 h,用紫外灯对细胞进行损伤处理 5 min,添加待测样品(空白对照组不做处理),继续培养 12 h。收集细胞上清液用试剂盒进行 SOD 酶活力测定。

1.4 数据处理

GC-MS 数据采用 Agilent MSD Chemstation 数据分析软件进行处理。本文中表格的绘制及数据的处理使用 Microsoft Excel 2016 完成,3 种自由基清除率的结果以均值 ± 标准差表示。方差分析使用 SPSS 26.0 软件进行,分别使用 Shapiro-Wilk 检验和方差齐性检验对数据的正态性及齐性进行检验,采用单因素方差分析进行邓尼特多重比较,结果以均值 ± 标准差及柱状图表示, $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结果分析

2.1 本斯石斛鲜花香气分析结果

2.1.1 本斯石斛花挥发性成分总离子流图

对本斯石斛花的挥发性成分进行 GC-MS 分析,获得其 SAFE 制备液总离子流图(见图 1)。

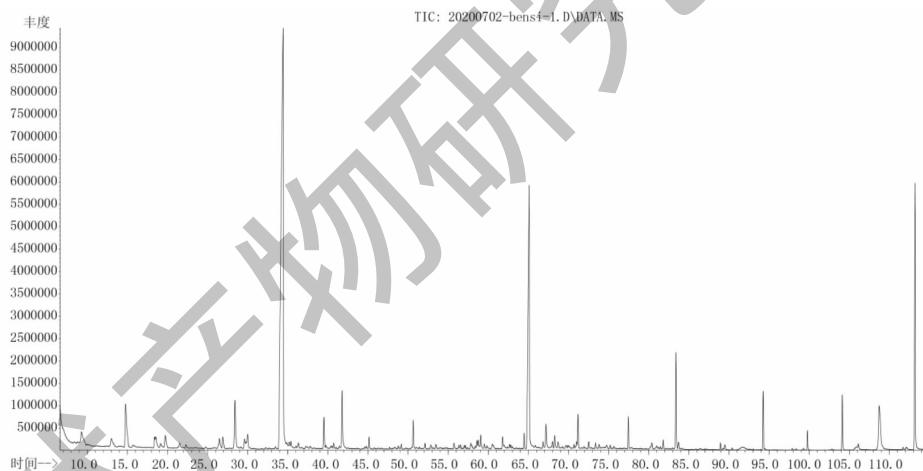


图 1 本斯石斛花的挥发性成分总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatogram of volatile components of *D. bensoniae* flower

2.1.2 本斯石斛花挥发性成分分析

对本斯石斛花的挥发性成分进行鉴定,共鉴定出 51 种化合物,占本斯石斛花挥发性成分的 90.0% (见表 1),其中醇类化合物和醛类化合物是其主要成分(72.0%)。

已鉴定出的 51 种化合物中醇类化合物占 49.8%,主要为苯甲醇(45.5%)、苯乙醇(2.7%)、紫罗兰醇(0.2%)、2,6-二甲基环己醇(0.1%)、 α -松油醇(0.1%)等;醛类化合物占 22.2%,主要为香草醛(17.0%)、己醛(3.4%)、苯甲醛(0.6%)、2-己

烯醛(0.4%)、苯乙醛(0.3%)、反-2-辛烯醛(0.3%)、壬醛(0.2%)等。此外,酚类化合物也占到全部成分的 1.5%。值得注意的是,仅苯甲醇和香草醛两种化合物的相对含量就已超过了 60.0%,但目前已报道文献中仅有紫瓣石斛花的挥发性成分中存在香草醛^[18],而苯甲醇则尚未有相关文献报道。

2.1.3 本斯石斛花香气成分分析

通过在线数据库“Flavornet”及“Perflavor Information System”检索这 51 种挥发性化合物的香气属性,一共检索到 28 种香气化合物(见表 2)。其中共

表 1 本斯石斛花挥发性成分的保留指数和相对百分含量

Table 1 Retention index and relative percentage of volatile compounds in *D. bensoniae* flower

编号 No.	化合物 Compound	保留指数 Retention index		相对百分含量 Relative percentage(%)
		HP-5	NIST	
1	甲苯 Toluene	768	763	0.9
2	己醛 Hexanal	802	800	3.4
3	2-己烯醛 2-Hexenal, (E)-	852	854	0.4
4	叶醇 3-Hexen-1-ol, (Z)-	854	857	0.8
5	间二甲苯 Benzene, 1,3-dimethyl-	870	866	0.8
6	邻二甲苯 <i>o</i> -Xylene	895	887	0.4
7	乙二醇单丁醚 Ethanol, 2-butoxy-	905	906	0.2
8	苯甲醛 Benzaldehyde	958	962	0.6
9	苯胺 Aniline	975	977	2.8
10	2,2,4,6,6-五甲基庚烷 Heptane, 2,2,4,6,6-pentamethyl-	989	991	0.5
11	苯甲醇 Benzyl alcohol	1 039	1 036	45.5
12	苯乙醛 Benzeneacetaldehyde	1 046	1 045	0.3
13	罗勒烯 1,3,7-Octatriene, 3,7-dimethyl-	1 049	1 047	0.2
14	反-2-辛烯醛 2-Octenal, (E)-	1 058	1 060	0.3
15	反式-2-辛烯-1-醇 2-Octen-1-ol, (E)-	1 067	1 067	< 0.1
16	间甲酚 Phenol,3-methyl-	1 073	1 075	0.1
17	愈创木酚 Phenol,2-methoxy-	1 090	1 090	1.1
18	芳樟醇 Linalool	1 099	1 099	0.1
19	正十一烷 Undecane	1 100	1 100	0.1
20	壬醛 Nonanal	1 103	1 104	0.2
21	2,6-二甲基环己醇 Cyclohexanol,2,6-dimethyl-	1 111	1 112	0.1
22	苯乙醇 Phenylethyl alcohol	1 115	1 116	2.7
23	邻苯二甲醚 Benzene,1,2-dimethoxy-	1 146	1 148	0.1
24	4-萜烯醇 Terpinen-4-ol	1 181	1 177	0.1
25	α -松油醇 α -Terpineol	1 193	1 192	0.1
26	正十二烷 Dodecane	1 197	1 200	0.2
27	2,3-二氢苯并呋喃 Benzofuran,2,3-dihydro-	1 216	1 224	1.1
28	1-十三烯 1-Tridecene	1 289	1 292	0.1
29	正十三烷 Tridecane	1 297	1 300	0.1
30	茶螺旋 Theaspirane	1 306	1 302	0.2
31	2-甲基喹啉 Quinoline,2-methyl-	1 313	1 311	0.1
32	对乙烯基愈创木酚 2-Methoxy-4-vinylphenol	1 316	1 317	0.3
33	苯丙二醇 1,2-Propanediol,1-phenyl-	1 329	1 327	0.2
34	庚基环己烷 Heptylcyclohexane	1 344	1 346	0.1
35	2,6,10-三甲基十二烷 Dodecane,2,6,10-trimethyl-	1 374	1 366	0.1
36	正十四烷 Tetradecane	1 397	1 400	0.5
37	香草醛 Vanillin	1 406	1 404	17.0

续表1(Continued Tab. 1)

编号 No.	化合物 Compound	保留指数 Retention index		相对百分含量 Relative percentage(%)
		HP-5	NIST	
38	反式石竹烯 Caryophyllene	1 432	1 428	0.2
39	壬基环戊烷 Cyclopentane, nonyl-	1 449	1 451	0.3
40	香叶基丙酮 Geranyl acetone	1 453	1 453	0.5
41	十五烯 1-Pentadecene	1 489	1 489	0.1
42	正十五烷 Pentadecane	1 497	1 500	1.1
43	紫罗兰醇 Butylated hydroxytoluene	1 518	1 513	0.2
44	壬基环己烷 Nonylcyclohexane	1 553	1 556	0.2
45	2-甲基十五烷 Pentadecane, 2-methyl-	1 560	1 563	0.1
46	3-甲基十五烷 Pentadecane, 3-methyl-	1 568	1 570	0.1
47	正十六烷 Hexadecane	1 596	1 600	1.0
48	2,6,10-三甲基十五烷 Pentadecane, 2,6,10-trimethyl-	1 646	1 641	0.3
49	6,9-十七二烯 6,9-Heptadecadiene	1 670	1 667	0.3
50	正十七烷 Heptadecane	1 696	1 700	3.4
51	正十八烷 Octadecane	1 796	1 800	0.2

有6种香气化合物被描述为“青草气味”“青叶香”或“薄荷气味”;6种被描述为“焦糖香气”或“甜香”;5种被描述具有“花香”特征;2种被描述具有“香草气味”,这些香气描述符合本斯石斛鲜花具有的青草、甜香、花香的香气特征。

通过计算香气化合物的OAV值(见表2),发现本斯石斛鲜花中含有16个关键香气化合物、6个修饰性香气化合物和3个潜在香气化合物。关键香气化合物主要为青草香型的己醛、2-己烯醛、叶醇、反-2-辛烯醛、壬醛和香叶基丙酮;花香香型的苯甲醇、苯乙醛、芳樟醇、苯乙醇和对乙烯基愈创木酚以及甜香香型的苯乙醛、愈创木酚和香草醛。修饰性香气

化合物分别是邻二甲苯、间二甲苯、苯甲醛、反式-2-辛烯-1-醇、正十四烷及紫罗兰醇。潜在香气化合物分别为苯胺、4-萜烯醇、 α -松油醇。

本斯石斛鲜花中花香香型的关键香气化合物苯乙醇、芳樟醇和苯乙醛与鼓槌石斛鲜花中的香气成分非常类似^[5],而铁皮石斛鲜花中又含有其青草香型的关键香气化合物壬醛、2-己烯醛、香叶基丙酮等^[19],加上甜香香型的苯乙醛、香草醛等化合物和一些带有脂香与不愉快气味的修饰性香气化合物与潜在香气化合物,构成了本斯石斛鲜花清新甜蜜但略带油腻感的香气特征。

表2 本斯石斛花香气成分的气味描述、嗅觉阈值及相对香气活度值

Table 2 Odor description, odor threshold and odor active value of aroma compounds in *D. bensoniae* flower

编号 No.	化合物 Compound	气味描述 Odor description	嗅觉阈值 Odor threshold (mg/L)	气味活度值 OAV
1	甲苯 Toluene	油漆气味	0.527	1.7
2	己醛 Hexanal	青草	0.005	680.6
3	2-己烯醛 2-Hexenal, (E)-	苹果,青叶香	0.110	3.9
4	叶醇 3-Hexen-1-ol, (Z)-	青草	0.004	188.0
5	间二甲苯 Benzene, 1,3-dimethyl-	塑料	1.000	0.8
6	邻二甲苯 o-Xylene	天竺葵	0.450	0.8
7	苯甲醛 Benzaldehyde	杏仁,焦糖	0.751	0.8

续表2(Continued Tab. 2)

编号 No.	化合物 Compound	气味描述 Odor description	嗅觉阈值 (mg/L) Odor threshold	气味活度值 OAV
8	苯胺 Aniline	甜香, 胺味	70.100	< 0.1
9	苯甲醇 Benzyl alcohol	甜香, 花香	2.546	17.9
10	苯乙醛 Benzeneacetaldehyde	蜂蜜, 甜香	0.006	46.0
11	罗勒烯 1,3,7-Octatriene,3,7-dimethyl-	果香, 湿衣服气味	-	-
12	反-2-辛烯醛 2-Octenal, (E)-	青叶香, 坚果香, 脂香	0.003	86.3
13	反式-2-辛烯-1-醇 2-Octen-1-ol, (E)-	肥皂, 塑料	0.020	0.3
14	间甲酚 Phenol,3-methyl-	粪便, 塑料	0.015	3.9
15	愈创木酚 Phenol,2-methoxy-	烟味, 甜香, 药味	0.001	19.2
16	芳樟醇 Linalool	花香, 薰衣草	0.001	74.0
17	壬醛 Nonanal	脂香, 柑橘, 青叶香	0.001	183.6
18	苯乙醇 Phenylethyl alcohol	蜂蜜, 玫瑰, 百合	0.564	4.8
19	邻苯二甲醚 Benzene,1,2-dimethoxy-	甜香, 奶油, 香草	-	-
20	4-萜烯醇 Terpinen-4-ol	松脂, 肉豆蔻, 霉味	1.200	< 0.1
21	α -松油醇 α -Terpineol	油香, 茴香, 薄荷	1.200	< 0.1
22	茶螺旋 Theaspirane	茶香, 药草香, 青叶香	-	-
23	对乙烯基愈疮木酚 2-Methoxy-4-vinylphenol	丁香, 咖喱	0.012	24.3
24	正十四烷 Tetradecane	烷烃气味	1.000	0.5
25	香草醛 Vanillin	香草气味	0.053	321.1
26	反式石竹烯 Caryophyllene	木香, 香料气味	0.064	3.9
27	香叶基丙酮 Geranyl acetone	木兰气味, 青叶香	0.060	9.0
28	紫罗兰醇 Butylated hydroxytoluene	樟脑	1.000	0.2

注: 化合物嗅觉阈值均以水为介质测出; “-”表示该化合物的嗅觉阈值未查询到或 OAV 值无法计算。

Note: Odor threshold of each compound was detected in water; “-” means the aroma threshold of the compound was not found or the odor active value of this compound can't be calculated.

2.2 本斯石斛鲜花提取物抗氧化活性分析结果

羟基自由基是一种重要的活性氧, 具有很强的氧化能力, 能够与细胞内的蛋白质等生物大分子结合, 破坏细胞结构并影响其正常功能, 羟基自由基清除率越高, 说明测试样品的抗氧化能力越强^[20]。以抗坏血酸为阳性对照, 本斯石斛的三种提取物的羟基自由基清除率均可达到 60.0% 以上(见表 3), 说明这三种提取物均在不同程度上具有一定的羟基自由基清除活性。

DPPH 自由基清除实验广泛应用于待测样品的抗氧化活性研究, 其清除率越高, 意味着该样品打断脂质过氧化链反应的能力越强^[21]。以抗坏血酸为阳性对照, 实验结果显示本斯石斛 95% 乙醇提取物的 DPPH 自由基清除率达到 76.8% \pm 1.2% (见表 3), 说明其具有良好的 DPPH 自由基清除能力, 而其余两组提取物的清除能力则较弱。

ABTS 自由基清除能力的强弱是衡量测试样品

抗氧化性强弱的重要指标之一。以抗坏血酸为阳性对照, 本斯石斛 60% 乙醇提取物的 ABTS 自由基清除率为 66.5% \pm 1.0% (见表 3), 表明该提取物具有一定的抗氧化能力; 浓度为 0.2 mg/mL 的 95% 乙醇提取物的清除率则达到了 93.1% \pm 0.2%, 与浓度 1.5 mg/mL 的铁皮石斛花黄酮的 76.8% 的清除率相比^[22], 具有更高的清除率, 说明该提取物具有较好的抗氧化活性。

SOD(超氧化物歧化酶)是生物体内清除超氧阴离子自由基的一种重要的酶, 能够使生物体有效地抵御氧自由基的毒性。本实验研究了本斯石斛鲜花的三种提取物对人永生化皮质细胞 SOD 酶活力的修复作用(见图 2), 没有经过处理的 SOD 酶活力为空白对照组(control), 经过 4 h 紫外线照射处理的 SOD 酶活力作为损伤组(UV), 将三种提取物分别加入损伤组对 SOD 酶活力进行 12 h 的修复, 结果显示空白组的 SOD 酶活力为最高值 12.7 U/mL, 且与

表3 本斯石斛鲜花提取物抗氧化活性体外模型评价结果

Table 3 Result of antioxidant activity of extracts from flower of *D. bensoniae* by *in vitro* model

待测物质 Sample	羟基自由基清除率 Hydroxyl radical scavenging rate(%)	DPPH 自由基清除率 DPPH radical scavenging rate(%)	ABTS 自由基清除率 DPPH radical scavenging rate(%)
PP	60.5 ± 1.9	9.3 ± 1.2	13.7 ± 1.0
95% ET	61.0 ± 3.8	76.8 ± 1.2	93.1 ± 0.2
60% ET	67.0 ± 2.0	2.8 ± 0.8	66.5 ± 1.0

注:待测物质浓度均为 200 μg/mL。

Note: The concentrations of the samples were all 200 μg/mL.

损伤组的酶活力值存在极显著差异,说明紫外照射对 SOD 酶活力损伤极其明显。在 12 h 的修复处理后,95% ET 组的 SOD 酶活力值恢复到了 11.4 U/mL,且与损伤组的酶活力值存在极显著的差异,说明 95% 乙醇提取物能够极显著地修复紫外线损伤处理的 SOD 的酶活力,具有较好的抗氧化活性;60% 乙醇提取物对损伤组的酶活力也有非常显著的修复能力,在 12 h 修复处理后 SOD 酶活力值恢复到了 9.2 U/mL,表明该组分的提取物也具有一定的抗氧化活性。

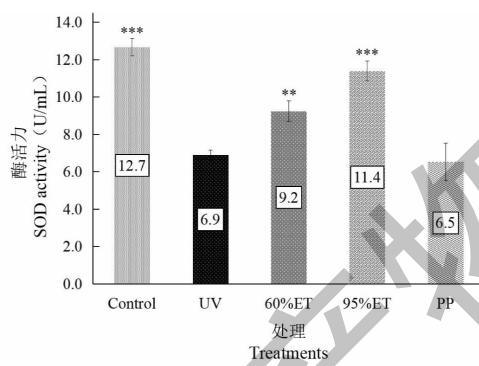


图2 不同处理下的 SOD 酶活力表现

Fig. 2 SOD activity under different treatments.

注:与紫外线照射处理的损伤组比较,*** 极其显著, $P < 0.001$; ** 非常显著, $P < 0.01$; * 显著, $P < 0.05$ 。Note:

Compared with UV radiation group, *** $P < 0.001$, extremely significant; ** $P < 0.01$, very significant; * $P < 0.05$, significant.

3 结论

本文首次采用溶剂辅助风味蒸馏法结合气相色谱-质谱联用技术对本斯石斛鲜花的挥发性成分进行了提取、分析及结构鉴定,从中鉴定出 51 个挥发性化合物,主要为醛类化合物和醇类化合物。根据峰面积归一化法和化合物嗅觉阈值计算的气味活度值结果,初步确认了鲜花挥发物所含的 16 个关键香气化合物,主要的香气类型为青草香型、甜香型和花香型,符合本斯石斛鲜花清新宜人且具有甜香与蜜

香的香气特征;6 个修饰性香气化合物和 3 个潜在香气化合物的主要香气类型则为脂香型、甜香型和具有不愉快气味的胺味,这些化合物构成了本斯石斛鲜花的主要香气轮廓。以上研究阐释了本斯石斛鲜花的主要香气轮廓的化学物质基础,分析结果能够较真实地体现其鲜花的嗅闻特征。但除了“花香”“甜香”“青草香”等特征香型的化合物还发现了一些“脂香”和“胺味”的化合物存在于它的整个香气轮廓中,在嗅闻时除了以上花香特征外也会略感油腻和刺鼻。

在对本斯石斛鲜花提取物抗氧化活性研究方面,本文采用了 3 种体外自由基清除模型,即羟基自由基清除模型、DPPH 自由基清除和 ABTS 自由基清除模型,结合人永生化皮质细胞内 SOD 酶修复模型评价了本斯石斛鲜花的 3 种提取物的抗氧化活性。结果表明本斯石斛鲜花 95% 乙醇提取物在 4 个模型中均表现出具有抗氧化活性,尤其是在后三个模型中,表现出了较强的抗氧化活性;60% 乙醇提取物除了未在 DPPH 自由基清除率上表现出具有抗氧化活性,在其余 3 个模型中均表现出微弱的抗氧化活性;石油醚提取物仅具有一定的羟基自由基清除活性。

本研究阐明了本斯石斛花的香气轮廓,初步探明了其关键香气成分;抗氧化活性研究表明花提取物,尤其是高浓度乙醇提取物具有较好的抗氧化活性。相关研究为本斯石斛花香型的日化香精的研发以及潜在的抗氧化活性物的开发提供了科学依据。

参考文献

- 1 Chinese Flora Editing Committee. Flora of China(中国植物志)[M]. Beijing: Science Press, 1999, 19:67.
- 2 Lan SR. Wild Orchids of Ornamental Importance(世界观赏野生兰彩色图鉴)[M]. Beijing: Science Press, 2017:146.
- 3 Yang XB, Wang YQ, Xie Y, et al. Analysis of aroma components in *Dendrobium fimbriatum* Hook. flower by SPME-GC-

- MS[J]. Detergent Cosmet(日用化学品科学), 2019, 42:40-43.
- 4 Lv SH, Xu M. Studies on volatile constituents of 11 families of *Dendrobium officinale* flowers[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2016, 22:52-57.
- 5 Huang XL, Zheng BQ, Wang Y. Study of aroma compounds in flowers of *Dendrobium chrysotoxum* in different florescence stages and diurnal variation of full blooming stage[J]. Forest Res(林业科学的研究), 2018, 31:142-149.
- 6 Wang DH, Fan B, Wang Y, et al. Optimum extraction, characterization, and antioxidant activities of polysaccharides from flowers of *Dendrobium devonianum*[J]. Int J Anal Chem, 2018;3013497.
- 7 Lei SS, Lv GY, Jin ZW, et al. Effect of extracts from *Dendrobium officinale* flos on hyperthyroidism Yin deficiency mice[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40:1793-1797.
- 8 Liang KL, Fang P, Shi QQ, et al. Antihypertensive effect and mechanism of *Dendrobium officinale* flos on high-blood pressure rats induced by high glucose and high fat compound alcohol[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43:147-153.
- 9 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020:94-97, 295-296.
- 10 Hou F, Deng XD, Zhong YL, et al. Research progress on antioxidant activity of *Dendrobium*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2021, 33:322-330.
- 11 Schieberle P. Solvent assisted flavour evaporation: a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices [J]. Eur Food Res Technol, 1999, 209:237-241.
- 12 Gemert LJ. Compilations of Odour Threshold Values in Air, Water and Other Media(化合物嗅觉阈值汇编)[M]. Beijing: Science Press, 2018.
- 13 Wu L, Zhang Q, Xu DB. Evaluation of volatile aroma components in blueberry peel, pulp and juice by odor activity value [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2020, 41:195-200.
- 14 Bouabid K, Lamchouri F, Toufik H, et al. Phytochemical investigation, *in vitro* and *in vivo* antioxidant properties of aqueous and organic extracts of toxic plant: *Atractylis gummifera* L [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 253:112640.
- 15 Lin J, Hong H, Zhang LT, et al. Antioxidant and cryoprotective effects of hydrolysate from gill protein of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) in preventing denaturation of frozen surimi[J]. Food Chem, 2019, 298:124868.
- 16 Chen GJ, Wang MJ, Xie MH, et al. Evaluation of chemical property, cytotoxicity and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of polysaccharides from Fuzhuan brick teas[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 116:120-127.
- 17 Shi X, Shang FF, Zhang YJ, et al. Persimmon oligomeric proanthocyanidins alleviate ultraviolet B-induced skin damage by regulating oxidative stress and inflammatory responses [J]. Free Radic Res, 2020, 54:765-776.
- 18 Julsrigvital J, Songsak T, Kirdmanee C, et al. Determination of volatile constituents of Thai fragrant orchids by gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase microextraction [J]. Chiang Mai Univ J Nat Sci, 2013, 12:43-57.
- 19 Huo X, Zhou JH, Yang NJ, et al. Determination of chemical constituents of essential oil from flower of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2008, 23:735-737.
- 20 Zhang X, Miao TT, Lu J, et al. Research progress on assessment methods of antioxidant activity of natural product[J]. Guangzhou Chem Ind(广州化工), 2017, 45:7-10.
- 21 Shi C, Xie CZ, Zhang JP, et al. Comparison of antioxidant activity of raspberry extracts with different polar solvents[J]. Food Sci Tech(食品科技), 2021, 46(1):220-224.
- 22 Li F, Wei Y, Chen YJ. Study on the content of flavonoids in stems, leaves and flowers of *Dendrobium Officinale* Kimura & Migo and its antioxidant activity *in vitro*[J]. Acta Chin Med (中医学报), 2019, 34:1020-1023.