

## 白芨全酶解法提取物包合物的抗氧化活性研究

吴威<sup>1</sup>, 张振<sup>2\*</sup>, 李雄<sup>1</sup>, 刁银娟<sup>1</sup><sup>1</sup>贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵阳 550025; <sup>2</sup>贵州理工学院制药工程学院, 贵阳 550003

**摘要:** 研究白芨全酶解法提取物包合物的抗氧化活性, 为开发白芨在抗衰老方面的应用提供科学依据。通过 HPLC 检测分析 pH 和加酶量等对全酶解法提取白芨中天然化合物的影响; 通过 DPPH·、·OH、O<sub>2</sub><sup>-</sup> 自由基清除能力及 Fe<sup>3+</sup> 还原力的测定评价白芨全酶解法提取物的白芨多糖包合物和 β-环糊精包合物的抗氧化活性, 同时以白芨多糖作平行对照。试验结果表明, 全酶解法提取白芨中天然化合物的最适 pH 为: 酸性蛋白酶 3.2、果胶酶 3.6、纤维素酶 5.2; 最适加酶量为酸性蛋白酶 4%、果胶酶 3%、纤维素酶 3%; 抗氧化活性研究结果表明, 在浓度 2 mg/mL~10 mg/mL 下白芨多糖包合物、β-环糊精包合物及白芨多糖对 DPPH·、·OH、O<sub>2</sub><sup>-</sup> 自由基的清除能力及对 Fe<sup>3+</sup> 的还原能力均随浓度的增大而增强。白芨多糖及 β-环糊精对全酶法提取物均具有良好的包合能力, 且其包合物均具有一定的抗氧化能力。

**关键词:** 白芨; 酶解; HPLC; 包合物; 抗氧化活性

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.013

## Extraction of Natural Compounds from *Bletilla striata* By Enzymatic Hydrolysis Method and the Antioxidant Activities of Its Inclusion Compound

WU Wei<sup>1</sup>, ZHANG Zhen<sup>2\*</sup>, LI Xiong<sup>1</sup>, DIAO Yin-juan<sup>1</sup><sup>1</sup>School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China;<sup>2</sup>School of Food and Drug Manufacturing Engineering, Guizhou Institute of Technology, Guiyang, Guizhou 550003, China

**Abstract:** Enzymatic hydrolysis method was employed to extract natural compounds from *Bletilla striata*, and the antioxidant activity of natural compounds embedded in polysaccharide of *Bletilla striata* (BSPS) and β-cyclodextrin were studied, as to provide a scientific basis for application in the field of anti-aging. Effect of pH and enzyme dosage on the extraction of natural compounds from *Bletilla striata* were analyzed by HPLC; Antioxidant activity on inclusion compound of BSPS and β-cyclodextrin were evaluated by the clearance rate on DPPH·, ·OH, O<sub>2</sub><sup>-</sup> and the reducing on Fe<sup>3+</sup>. pH3.2, enzyme dosage 4%, pH3.6, enzyme dosage 3%, pH5.2, enzyme dosage 3% respectively are the best condition for acid protease, pectinase and cellulase to extract natural compounds from *Bletilla striata*; Results of antioxidant activity indicated that the increasing of clearance rate on DPPH·, ·OH, O<sub>2</sub><sup>-</sup> and the reducing on Fe<sup>3+</sup> by the increasing concentration of BSPS and inclusion compound of BSPS, β-cyclodextrin in the range 2 mg/mL-10 mg/mL. BSPS and β-cyclodextrin are have good inclusion ability for extracts of *Bletilla striata*, and and their inclusion compounds have certain antioxidant ability.

**Key words:** *Bletilla striata*; enzymolysis; HPLC; inclusion compound; antioxidant activity

白芨为兰科植物白芨 (*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.) 的地下块茎, 是药食兼用的名贵天然中药材<sup>[1,2]</sup>, 其化学成分主要含联苕类、二氢类、联菲类及蒽醌类成分和酚酸类成分, 还含少量的原儿茶酸、咖啡酸、大黄素等。白芨味苦、甘涩, 性微寒, 有

止血、抗菌、抗氧化、抗癌、消肿生肌等多种药理活性, 临床主要用于治疗肺伤咳血、外科创伤、胃及消化道溃疡、皮肤皲裂、烫伤灼伤等疾病<sup>[3-10]</sup>。白芨不仅普遍应用于医药行业, 在化工、食品、保健等方面也应用广泛<sup>[11-14]</sup>。白芨地下块茎中含有丰富的天然白芨多糖胶, 其化学成分是葡萄甘露聚糖, 是目前用途最为广泛的天然药用辅料, 因为它具有无刺激、缓释、局部滞留、无不良反应等辅料的特性, 适合作为天然化妆品的功能性成分, 所以在保健、美容产品上

使用广泛。

在生命过程中,适量自由基对细胞的分裂、生长、消炎、解毒等方面起着积极的作用,但过量的自由基会与体内许多不饱和脂肪酸反应生成脂质过氧化物,造成生物膜损伤,蛋白质变性失活等,导致细胞解体或死亡。抗氧化是预防衰老的重要步骤,如果能够消除过多的氧化自由基,对于许多自由基引起的与老化相关疾病都能够预防<sup>[15-18]</sup>。目前,少见白芨酶解法提取物相关活性研究报道,本试验运用体外抗氧化活性评价方法,对白芨全酶解法提取物的包合物抗氧化能力进行评价,旨在为开发白芨在抗衰老方面的应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

白芨:鉴定于贵州省农业科学院;蛋白酶(5万U/g),果胶酶(5万U/g),纤维素酶(5万U/g),均为市售添加酶制剂;柠檬酸、柠檬酸钠:分析纯,江苏强盛功能化学股份有限公司;无水乙醇(99.7%):天津市富宇精细化工有限公司;DPPH:纯度>97%,梯希爱(上海)华成工业发展有限公司;硫酸亚铁:分析纯,重庆茂业化学试剂有限公司;过氧化氢:分析纯,成都金山化学试剂有限公司;水杨酸钠、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁:分析纯,天津市化学试剂一厂;盐酸、邻苯三酚:分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;蒸馏水为实验室自制;SZ-96A石英蒸馏器,上海隆拓仪器设备有限公司。

### 1.2 仪器

Agilent1260 高效液相色谱仪,安捷伦公司;Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱(3.5 μm,4.6×100 mm),美国;BSA224S 电子分析天平,赛多利斯科学(北京)仪器有限公司;UH-5300 紫外可见分光光度计,天津市仪德科学仪器有限公司;SHA-C 水浴恒温振荡器,常州澳华仪器有限公司;RE-2000B 旋转蒸发器,上海越众仪器设备有限公司;TGL 16M 凯特离心机,盐城市凯特实验仪器有限公司。

### 1.3 试验方法

取干燥的白芨块茎,一部分压成厚度为0.1-0.2 cm的裂制薄片,一部分粉碎过20目筛,干燥环境避光保存,待用。

#### 1.3.1 白芨全酶解法提取

酸性蛋白酶对白芨植物组织有较强的酶解作用,可以将白芨组织中大量的天然化合物溶解出来,

而植物很多组织之间的结合都是通过果胶质将它们粘接在一起的,由于酶的专一性,

待酸性蛋白酶的酶解完成后仍需用果胶酶才能将细胞间果胶内的天然物质溶解出来,同时还会使植物细胞壁变得更为疏松,便于纤维素酶将纤维细胞内的物质溶出<sup>[19-21]</sup>。

#### 1.3.1.1 酸性蛋白酶提取

于1000 mL三角瓶中加入50 g白芨。将pH为3.2的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液500 mL分三次与1.5 g酸性蛋白酶于250 mL的烧杯中混合,三次洗脱后收集的酶解液合并,倒入三角瓶中,摇匀后置于55℃水浴摇床上进行振荡,酶解4.0 h后取出,沸水浴灭酶2 min后进行抽滤,将抽滤液在旋转蒸发仪上浓缩(60℃)至膏状,加入无水乙醇至体系中乙醇体积分数为80%,剧烈振荡混合充分后静置沉淀过夜,取上清液离心进行HPLC检测分析。

#### 1.3.1.2 果胶酶提取

待酸性蛋白酶提取完全后收集三角瓶中所有白芨残余固体物继续进行果胶酶酶解。酶解pH为3.6,酶解温度为50℃,酶解时间2 h,加酶量1.5 g,其他操作条件同酸性蛋白酶。1.3.1.3 纤维素酶提取

待果胶酶提取完全后收集滤纸上的残渣与瓶中剩余的白芨合并,继续进行纤维素酶提取。酶解pH为5.2,酶解时间2 h,加酶量1.5 g,其他操作同果胶酶。

#### 1.3.2 单因素试验

考察白芨的粉碎或压片处理、酶解用量、酶解pH对提取物成分的影响。

#### 1.3.3 全酶法白芨提取醇沉上清液制备方法的选取

于两个编号为1和2的1000 mL三角瓶中分别加入50 g白芨。在单因素试验的基础上选取酸性蛋白酶、果胶酶、纤维素酶最佳提取条件分别对白芨进行相继酶解。其中1号白芨经三种酶相继酶解后得到三种酶酶解液,合并酶解液按1.3.1的方法灭酶、浓缩、醇沉,得

到醇沉液1。2号白芨酶解得到的三种酶解液分别按1.3.1的方法灭酶、浓缩、醇沉,得到的三种醇沉液合并混匀得醇沉液2。取1号和2号的醇沉上清液分别进行HPLC检测,由HPLC分析结果选取最佳白芨提取醇沉上清液制备方法。

#### 1.3.4 白芨多糖的制备

于1000 mL三角瓶中加入50 g白芨,加入pH为4.0的500 mL酸性蛋白酶酶解液,置于55℃水

浴摇床进行振荡,酶解 4.0 h 后取出,沸水浴灭酶 2 min 后进行抽滤,将抽滤液在旋转蒸发仪上浓缩(60 ℃)至膏状,加入无水乙醇至体系中乙醇体积分数为 80%,剧烈振荡混合充分后静置沉淀过夜,将醇沉淀取出 45 ℃ 下真空干燥,得白芨粗多糖。

### 1.3.5 白芨多糖和 $\beta$ -环糊精包合物的制备及其抗氧化活性研究

利用 1.3.3 中最佳方法获取全酶法白芨提取醇沉上清液。将醇沉上清液平均分为两份,分别与白芨多糖、 $\beta$ -环糊精以 8:1 (mL:g) 的比例充分混合均匀,将混合溶液分别置于(50 ℃, 80 rpm)旋转蒸发仪上浓缩至膏状,取出进行真空干燥(45 ℃),研磨成粉得白芨多糖胶包合物和  $\beta$ -环糊精包合物,并分别测定其 DPPH、羟自由基、超氧阴离子自由基的清除活性及还原力。

### 1.3.6 HPLC 测定方法

测定样品为:酸性蛋白酶提取物、果胶酶提取物、纤维素酶提取物。样品经 0.45  $\mu\text{m}$  的针头微孔

滤膜注射入进样瓶中,进样量为 10  $\mu\text{L}$ ,色谱柱为等径 3.5  $\mu\text{m}$  的 Eclipse Plus C<sub>18</sub> 反相柱,柱长 100 mm,柱径 4.6 mm,柱温 40 ℃,梯度淋洗,流动相流速为 0.45 mL/min,流动相 A 溶液:5% 乙腈,流动相 B 溶液:95% 乙腈,淋洗梯度为(0 ~ 5 min, B 溶液 0% ~ 10%; 5 ~ 10 min, B 溶液 10% ~ 20%; 10 ~ 30 min, B 溶液 20% ~ 30%; 30 ~ 45 min, B 溶液 30% ~ 60%; 45 ~ 55 min, B 溶液 60% ~ 100%),紫外检测波长为 220 nm。

## 2 结果与分析

### 2.1 全酶法提取白芨化学成分的单一因素试验

#### 2.1.1 白芨粉碎或压片处理对全酶解法提取物化学成分的影响

精密称取经粉碎过 20 目筛的干燥白芨粉和经压片的白芨各 50 g,采用酸性蛋白酶、果胶酶、纤维素酶按照 1.3.1 的方法分别进行提取,HPLC 分析。结果如图 1(a)、(b)所示。

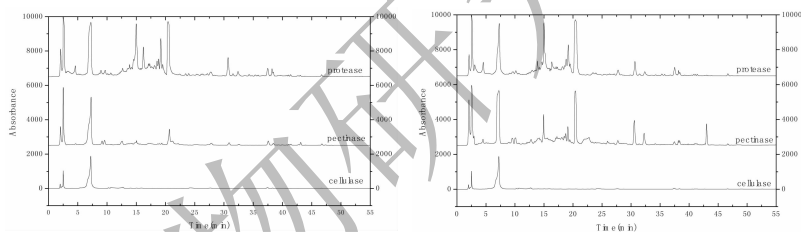


图 1 (a) 粉碎后全酶解法提取的白芨化学成分 (b) 压片后全酶法提取的白芨化学成分

Fig. 1 (a) The chemical compositions obtained with enzymatic hydrolysis method from *Bletilla striata* powder (b) The chemical compositions obtained with enzymatic hydrolysis method from *Bletilla striata* sheets

图 1 为白芨粉碎(a)和压片(b)处理后全酶解法提取的 HPLC 色谱图,从图中可知酸性蛋白酶和纤维素酶对白芨粉和白芨薄片酶解得到的化学成分种类及含量大体一致,但果胶酶对(a)和(b)酶解得到的化学成分差异较大,压片后酶解得到的化学成分明显较粉碎后的丰富。这可能是因为粉碎后加大了酶解液与白芨的接触面积,而酸性蛋白酶对白芨的酶解作用较大,在其酶解完成后,白芨组织遭到极大分解,从而溶出大量的化学物质,但这时再用果胶酶酶解时,大量的酶解液会加速白芨组织的分解,同时也会造成大量的化学物质的降解,而采用压片的方式会大大减弱这种降解作用。酶解法反应条件温和,而压片更有利于保护白芨天然化学成分不被酶解破坏,从而得到丰富的活性物质。

#### 2.1.2 加酶量(白芨质量分数)的影响

##### 2.1.2.1 酸性蛋白酶

5 份白芨(压片,后面相同)各 50 g。酶解液 pH3.2,酶解液用量 500 mL,提取时间 4 h,酶解温度 55 ℃,加酶量分别为 1%、2%、3%、4%、5%。后续操作同 1.3.1, HPLC 检测结果如图 2 所示。

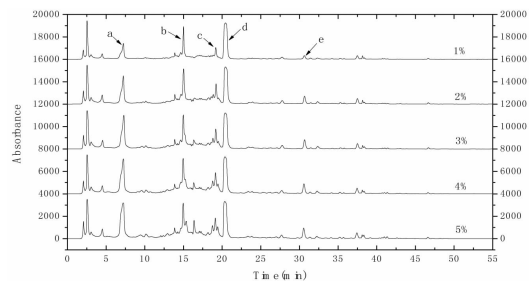


图 2 不同酶用量对酸性蛋白酶提取白芨化学成分的影响

Fig. 2 Effect of different enzyme dosage on chemical compositions obtained with acid protease from *Bletilla striata*

图2为酸性蛋白酶不同酶解用量提取的白芨化学成分 HPLC 色谱图。由图可知酸性蛋白酶提取的化学成分较丰富,尤其以 a、b、c、d、e 五种含量较高。

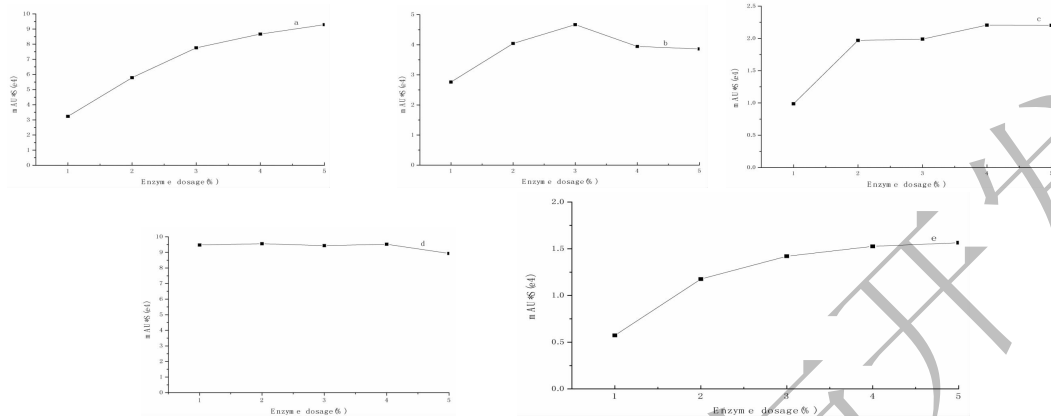


图3 不同酶用量对 a、b、c、d、e 五种物质峰面积的影响

Fig. 3 Effect of different enzyme dosage on peak area of a、b、c、d、e

由图3可知酸性蛋白酶加酶量对 a、b、c、d、e 五种物质峰面积的影响各有不同,其中在加酶量为 5% 时, a 峰面积最大,其次为 4%;加酶量为 3% 时, b 峰面积最大;其次为 4%;加酶量为 4% 时, c 峰面积达最大,随后不在增加;加酶量为 4% 时, d 峰面积达最大,随后下降;加酶量为 4% 以后, e 峰面积几乎不变;综合可知 4% 为酸性蛋白酶提取白芨化学成分最佳酶用量。

#### 2.1.2.2 果胶酶

5 份白芨各 50 g。酶解液 pH3.6,酶解液用量 500 mL,提取时间 4 h,酶解温度 50 ℃,加酶量分别为 1%、2%、3%、4%、5%。后续操作同 1.3.1, HPLC 检测结果如图 4 所示。

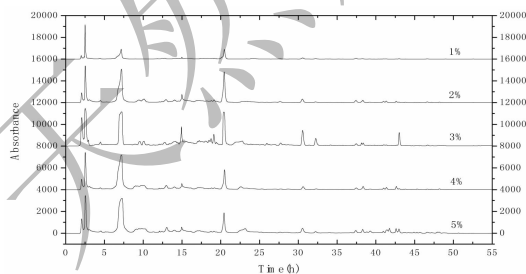


图4 不同酶用量对果胶酶提取白芨化学成分的影响

Fig. 4 Effect of different enzyme dosage on chemical compositions obtained with pectinase from *Bletilla striata*

由图4可知,经酸性蛋白酶提取完后,再利用果胶酶继续提取仍然得到大量的天然化合物,尤其是在加酶量为 3% 时提取的化学成分种类最多,含量最高。

以加酶量为横坐标, a、b、c、d、e 五种物质峰面积为纵坐标,通过峰面积的比较考察加酶量对白芨化学成分的提取效果影响,结果如图 3。

#### 2.1.2.3 纤维素酶

5 份白芨各 50 g。酶解液 pH5.2,酶解液用量 500 mL,提取时间 4 h,酶解温度 50 ℃,加酶量分别为 1%、2%、3%、4%、5%。后续操作同 1.3.1, HPLC 检测结果如图 5 所示。

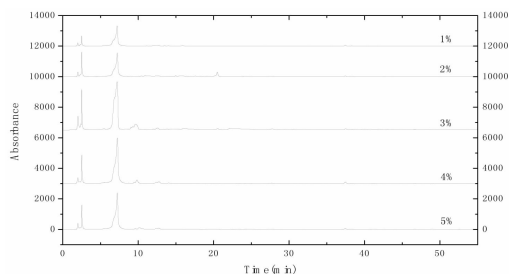


图5 不同酶用量对纤维素酶提取白芨化学成分的影响

Fig. 5 Effect of different enzyme dosage on chemical compositions obtained with cellulase from *Bletilla striata*

由图5可知,继果胶酶提取完后,再利用纤维素酶继续提取剩余白芨,得到的化学成分明显少得多,但仍有大量的 a 峰物质出现,尤其是在加酶量为 3% 时含量最高。

#### 2.1.3 pH 的影响

由加酶量对全酶法提取白芨中化学成分的影响分析结果可知,提取白芨化学成分的最佳酶用量为酸性蛋白酶 4%、果胶酶 3%、纤维素酶 3%。在此基础上继续研究酶解 pH 对白芨化学成分提取的影响。

##### 2.1.3.1 酸性蛋白酶

5 份白芨各 50 g。酶解液用量 500 mL,提取时

间 4 h, 酶解温度 55 °C, 加酶量为 4%, 酶解液 pH 分别为 3.0、3.2、3.4、3.6、4.0。后续操作同 1.3.1, HPLC 检测结果如图 6 所示。

图 6 为不同 pH 条件下酸性蛋白酶提取的化学成分的 HPLC 色谱图, 采用 3.1.1 中方法分析结果如图 7 所示。

由图 7 可知, pH 对 a、b、c、d、e 五种物质峰面积的影响较大, 其中 a 峰的峰面积随着 pH 的上升而升高, 在 pH 为 3.2 以后上升较缓慢; b 峰和 d 峰的峰面积随着 pH 的上升而下降, 尤其是在 pH 3.2

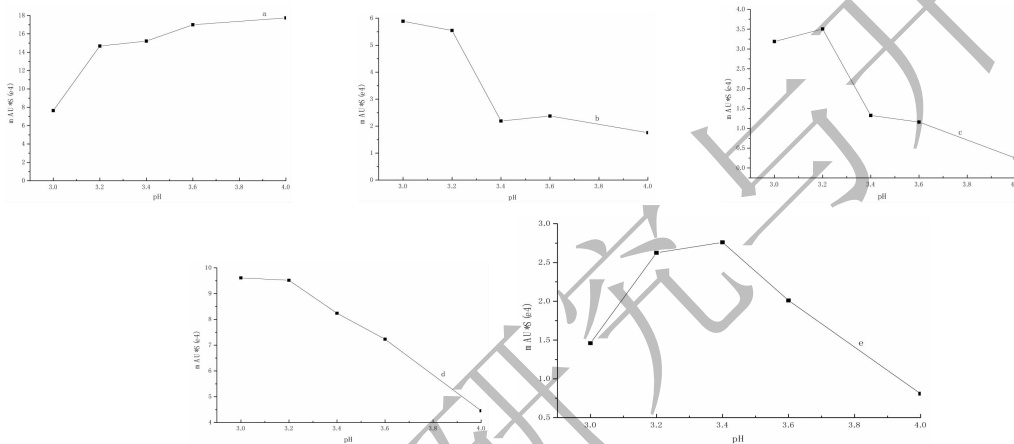


图 7 不同 pH 对 a、b、c、d、e 五种物质峰面积的影响

Fig. 7 Effect of different pH on peak area of a、b、c、d、e

后下降明显; c 峰的峰面积在 pH 3.2 后下降明显; e 峰的峰面积在 pH 3.0 后逐渐上升, 在 pH 3.2 后上升缓慢, 但在 pH 3.4 后下降明显。综合可知酸性蛋白酶酶解白芨的最适 pH 为 3.2。

### 2.1.3.2 果胶酶

5 份白芨各 50 g。酶解液用量 500 mL, 提取时间 4 h, 酶解温度 55 °C, 加酶量为 4%, 酶解液 pH 分别为 3.2、3.6、4.0、4.4、5.0。后续操作同 1.3.1, HPLC 检测结果如图 8 所示。

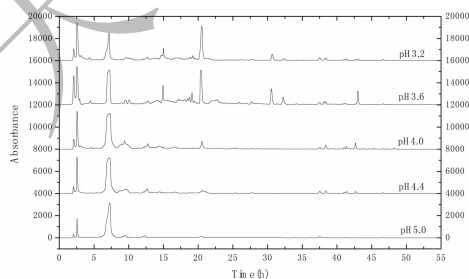


图 8 不同 pH 对果胶酶提取白芨化学成分影响

Fig. 8 Effect of different pH on chemical compositions obtained with pectinase from *Bletilla striata*

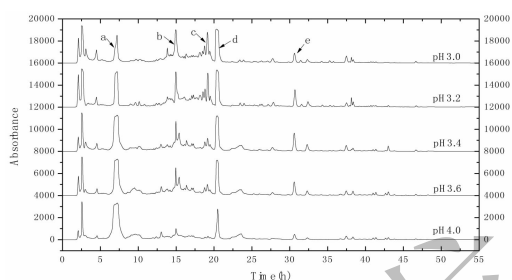


图 6 不同 pH 对酸性蛋白酶提取白芨化学成分的影响  
Fig. 6 Effect of different pH on chemical compositions obtained with acid protease from *Bletilla striata*

由图 8 可知, pH 对果胶酶提取的白芨化学成分影响较大, 在 pH 为 3.6 时提取物的化学成分最丰富, 随后随着 pH 的上升提取物的物质种类及含量均明显下降, 所以果胶酶提取白芨化学成分的最适 pH 为 3.6。

### 2.1.3.3 纤维素酶

5 份白芨各 50 g。酶解液用量 500 mL, 提取时间 4 h, 酶解温度 55 °C, 加酶量为 4%, 酶解液 pH 分别为 4.0、4.4、4.8、5.2、6.0。后续操作同 1.3.1, HPLC 检测结果如图 9 所示。

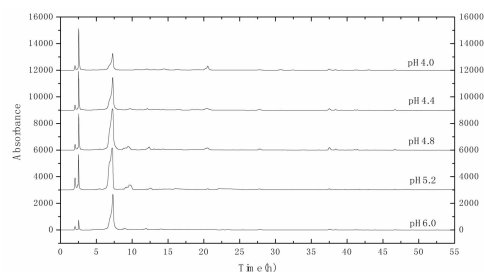


图 9 不同 pH 对纤维素酶提取白芨化学成分的影响

Fig. 9 Effect of different pH on chemical compositions obtained with cellulase from *Bletilla striata*

由图 9 可知,随着 pH 的上升,a 物质峰的峰面积在 pH5.2 前随着 pH 的上升而升高,但在 pH5.2 后下降明显,所以 pH5.2 为继酸性蛋白酶、果胶酶提取后纤维素酶提取白芨剩余固体的最适 pH。

## 2.2 全酶法提取白芨的两种醇沉上清液化学成分分析

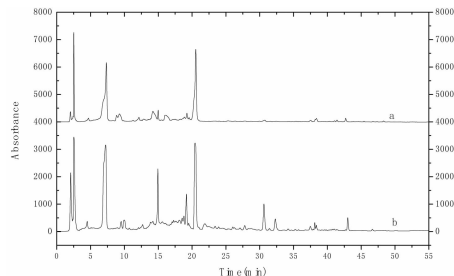


图 10 全酶法提取的两种醇沉上清液中化学成分的比较

Fig. 10 The chemical compositions from the two ethanol supernatant were compared

图 10 为全酶法提取的两种醇沉上清液中化学成分的比较,图中的 a 为酸性蛋白酶、果胶酶、纤维素酶相继提取同一白芨块茎得到的三种提取液,合并混合均匀后进行抽滤,浓缩,醇沉得到的醇沉上清液 HPLC 色谱图,b 为酸性蛋白酶、果胶酶、纤维素酶相继提取同一白芨所得的提取液分别抽滤,浓缩,醇沉得到的三种醇沉上清液的合并混合液的 HPLC 色谱图。由 a,b 色谱图可知将全酶法提取液合并,经浓缩、醇沉得到的上清液中化学成分种类及含量均不如分别将三种酶提取液分别浓缩、醇沉得到的三种醇沉上清液合并后的混合液中化学成分高。这可能是由于三种酶酶解条件不一样,尤其是酶解 pH,所以将三种酶解液合并时造成了体系中 pH 等环境的改变,从而引起酶解液体系中化学物质的种类及含量的下降。

## 2.3 白芨多糖包合物、 $\beta$ -环糊精包合物、白芨多糖的抗氧化活性<sup>[16]</sup> (平行对照)

### 2.3.1 DPPH· 自由基清除活性

取 3 mL 不同浓度的样品溶液置于试管中,加入 1 mL DPPH ( $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L, 50% 乙醇) 溶液,混合均匀,在黑暗中反应 30 min,在 517 nm 测吸光度为  $A_0$ , 1 mL 50% 乙醇代替 DPPH 的吸光度为  $A_c$ , 3 mL 50% 乙醇代替样品溶液的吸光度为  $A_s$ ,  $V_c$  为对照品。每个样品作三次平行,取其平均值。清除率计算公式如下:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s - A_c}{A_0}\right) \times 100$$

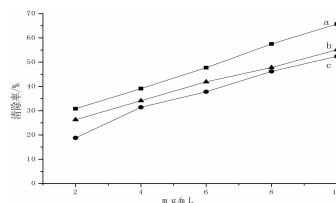


图 11 DPPH· 自由基清除活性

Fig. 11 The clearing function of DPPH·

DPPH· 是一种稳定的以氮为中心的自由基,常被用于抗氧化成分体外抗氧化性能的评价。DPPH· 自由基在 517 nm 处有一强吸收,当有自由基清除剂存在时,与其单电子配对使其吸收逐渐消失,褪色程度与接收的电子数量呈定量关系。从图 11 可看出,白芨多糖包合物(a)、 $\beta$ -环糊精包合物(c)、白芨多糖(b)对 DPPH· 的清除率随着浓度的增加而增大。当三种物质从浓度 2mg/mL-10mg/mL 时, DPPH 的清除率范围分别为 30.8%-65.7%、18.8%-52.4%、26.3%-55.1%。结果表明,三种物质在高浓度下对 DPPH 自由基的清除效果明显,其清除率大小为白芨多糖包合物 > 白芨多糖 >  $\beta$ -环糊精包合物,说明利用白芨多糖包合全酶法提取物能增加其清除 DPPH· 自由基的能力。然而,0.01 mg/mL Vc 对 DPPH 自由基的清除率为 77.7%,明显高于这三种物质,可能是这三种物质的电子供给能力较弱引起的。

### 2.3.2 羟自由基( $\cdot$ OH)清除活性

将 1.5 mL  $\text{FeSO}_4$  (1.5 mmol/L), 0.5 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  (6 mmol/L), 0.5 mL 水杨酸钠 (20 mmol/L) 分别加入到 1 mL 不同浓度的 80% 乙醇样品溶液中, 37 °C 水浴培养 1 h, 在 562 nm 测水杨酸盐混合物的吸光度。每个样品作三次平行,取其平均值。清除率计算公式如下:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s - A_c}{A_0}\right) \times 100$$

其中,  $A_s$ : 含样品的吸光度;  $A_c$ : 不含水杨酸钠的吸光度, 80% 乙醇溶液代替;  $A_0$ : 不含样品的吸光度, 80% 乙醇溶液代替。

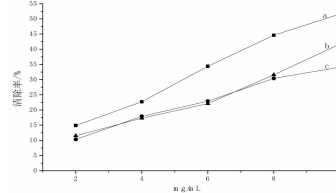


图 12 羟自由基( $\cdot$ OH)清除活性

Fig. 12 The clearing function of  $\cdot$ OH

羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )是人体新陈代谢过程中产生对生物体毒性最强、危害最大的一种可使组织中的糖类、氨基酸、蛋白质、核酸等发生氧化,遭受损伤和破坏,导致细胞坏死或突变;此外皮肤衰老、肿瘤等均与羟自由基的活性有关,因此,对羟自由基的清除具有重要的意义。图 12 显示的是在 2 mg/mL-10 mg/mL 浓度下的白芨多糖包合物(a)、白芨多糖(b)、 $\beta$ -环糊精包合物(c)对羟自由基的清除能力曲线。由图 12 可知,三种物质对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率随着浓度的增加而增大,其清除率大小为白芨多糖包合物 > 白芨多糖 >  $\beta$ -环糊精包合物。

### 2.3.3 超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )清除活性

4.5 mL 0.05 mol/L Tris-HCL 缓冲液(pH = 8.2)置于 25 °C 环境下平衡 20 min,分别加入 1 mL 不同浓度的样品溶液,0.4 mL 25 mmol/L 邻苯三酚溶液,混合均匀后反应 4 min,加入 2~3 滴 8 mol/L HCl 终止反应,在 325 nm 测其吸光度。清除率计算公式如下:

$$\text{清除率}(\%) = \left( \frac{A_0 - A_i}{A_0} \right) \times 100$$

其中, $A_0$ 为以相同体积的蒸馏水代替样品液作为空白对照组吸光度。

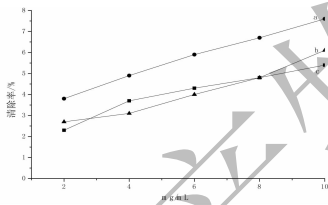


图 13 超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )清除活性

Fig. 13 The clearing function of  $\text{O}_2^{\cdot-}$

$\text{O}_2^{\cdot-}$ 与衰老、肿瘤、炎症、外源物代谢等生物学过程密切相关。在 2 mg/mL ~ 10 mg/mL 浓度下的 $\beta$ -环糊精包合物(a)、白芨多糖(b)、白芨多糖包合物(c)对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基的清除能力曲线如图 13 所示。该试验体系是邻苯三酚自氧化过程产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,所以显示的三种物质体系对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基的清除能力较弱,但仍有一定的清除活性,其清除率大小为 $\beta$ -环糊精包合物 > 白芨多糖 > 白芨多糖包合物。

### 2.3.4 $\text{Fe}^{3+}$ 还原力测定

1 mL 不同浓度的样品溶液添加到 2.5 mL 磷酸缓冲液(0.2 mol/L, pH = 6.6)中,加入 2.5 mL  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (1% W/V),在 50 °C 水浴培养 20 min,加入 2.5 mL 三氯乙酸(10% W/V)混合以后 3000 rpm,

离心 10 min,取上清液 2.5 mL 于试管中,向其加入 2.5 mL 水,0.5 mL  $\text{FeCl}_3$  (0.1% W/V),10 min 后在 700 nm 处测其吸光度。

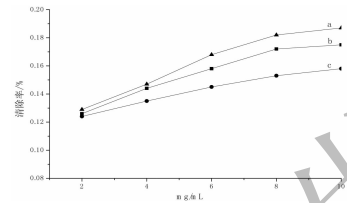


图 14  $\text{Fe}^{3+}$ 还原力测定

Fig. 14 The reducing of  $\text{Fe}^{3+}$

研究报道,抗氧化剂和还原能力有直接关联。还原性质通常认为与二羟丙稀醛的存在相连,二羟丙稀醛可以提供氢原子通过阻断自由基链而发挥抗氧化作用或与过氧化物前体反应阻止过氧化物的产生。所以,物质的还原能力可能是抗氧化剂活性的明显指标。图 14 显示的是 2 mg/mL ~ 10 mg/mL 浓度下白芨多糖(a)、白芨多糖包合物(b)、 $\beta$ -环糊精包合物(c)的还原能力,其吸光值越大,还原力越强,抗氧化效果越好。由图 14 可知,随着浓度的增加,三种物质的还原能力也相应增加,在 8 mg/mL 后增加缓慢。

## 3 讨论

全酶解法提取白芨中天然化合物及其包合物的抗氧化活性试验结果表明,白芨压片后酶解得到的化学物质较粉碎酶解得到的丰富;全酶解法提取白芨的最适 pH 为酸性蛋白酶 3.2、果胶酶 3.6、纤维素酶 5.2;最适加酶量为酸性蛋白酶 4%、果胶酶 3%、纤维素酶 3%;白芨多糖和 $\beta$ -环糊精对白芨全酶解法提取物均有较好的包合作用,且二者包合物均具有良好的抗氧化活性。虽然全酶解法对白芨中的天然化合物提取效果较好,但提取的化学成分种类较多,组成较复杂,而目前尚未见到白芨提取物的 HPLC 分析相关报道,所以对白芨全酶解法提取物的化学成分鉴定和分离仍需进一步的研究,以为白芨酶法提取物的进一步开发利用提供科学依据。

### 参考文献

- 1 Sun LL (孙乐乐), Yang YH (杨永红), Liu JK (刘军凯), et al. Research on materia medica of *Bletilla striata*. *J Chin Med Mat* (中药材), 2010, 33: 1965-1967.
- 2 Cao Q (曹琦), Wang XP (王学平). The biological charac-

- teristics and resources conservation of medicinal *Rhizoma Bletilla*. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2015, 43: 175-176.
- 3 Li FH (李付惠). Research progress on *Bletilla striata*. *J Wen Shan Univ* (文山学院学报), 2016, 29(6): 8-10.
  - 4 Lin FL (林福林), Yang CY (杨昌云), Yang WW (杨薇薇), et al. The survey of modern studies of *Bletilla striata*. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2013, 33: 571-572.
  - 5 Zhang LF (张龙霏), Hu JH (胡晶红), Zhang YQ (张永清). Research progress on pharmacological action of *Bletilla rhizoma*. *Mod Chi Med* (中国现代中药), 2014, 16(1): 83-86.
  - 6 Yang L (仰莲), Peng C (彭成), Li XH (李小红), et al. Progress of study on chemical constituents and bioactivity of Baiji. *Pharmacy and Clinics of Chin Mat Med* (中药与临床), 2014, 5(6): 59-63.
  - 7 Sun AJ (孙爱静), Pang SQ (庞素秋), Wang GQ (王国权). Advances of chemical constituents and pharmacological activities of *Bletilla striata*. *GCM* (环球中医药), 2016, 9: 507-510.
  - 8 Tao AL (陶阿丽), Jin YD (金耀东), Liu JQ (刘金旗), et al. Advances of chemical constituents, pharmacological activities and clinical application of *Bletilla striata*. *Jiangsu Agric Sci* (江苏农业科学), 2013, 41(11): 6-9.
  - 9 Wang YJ (王永杰), Huang WZ (黄伟振), Zhang JZ (张娇振) et al. The therapeutic effect of The therapeutic effect of *Bletilla striata* extracts on LPS-induced acute lung injury by regulation of inflammation and oxidation. *From RSC Advances*, 2016, 6: 89338-89346.
  - 10 Sun AJ (孙爱静), Liu JQ (刘杰庆), Pang SQ (庞素秋) et al. Two novel phenanthraquinones with anti-cancer activity isolated from *Bletilla striata*. *From Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26: 2375-2379.
  - 11 Zhao WC (赵文昌), Song LJ (宋丽军), Xu JH (许健煌). Application of natural macromolecule polysaccharide from *Bletilla striata* in drug preparation. *Pharmacy Today* (今日药学), 2010, 20(3): 2-3.
  - 12 Zhao N (赵宁), Cheng YC (程玉钊), Li WZ (李伟泽), et al. Preparation and properties of sea buckthorn oil gel emulsion with *Bletilla striata* polysaccharide as skeletal material. *Chin Oils & Fats* (中国油脂), 2016, 41(6): 79-82.
  - 13 Zhang YS (张宇思), Sun DF (孙达锋), Zhu CL (朱昌玲). Studies on bletilla oral ulcer film. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), 2014, 33(4): 68-70.
  - 14 Zhu CL (朱昌玲), Sun DF (孙达锋). Studies on *Bletilla* oral ulcer film. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), 2015, 34(2): 67-58.
  - 15 Zhang XM (张雪梅), Xie JR (谢金芮), Chen YF (陈玉甫), et al. Extraction of chlorogenic acid from folium cortex eucommiae by enzymatic hydrolysis method and determination of its content. *Chin Brew* (中国酿造), 2016, 35: 149-151.
  - 16 Kong LS (孔令嫻). The studies on extraction technology and efficacy of *Bletilla striata* polysaccharide. Shanghai: Shanghai Institute of Applied Technology Msc., 2014. 34-37.
  - 17 Xiao X (肖雄), Tang JB (唐健波), Yao J (姚佳), et al. The antioxidant activities of different polarity extracts from *Bletilla striata* in vitro. *J Moun Agric& Bio* (山地农业生物学报), 2013, 32: 146-149.
  - 18 Sheng Q (沈奇), Sheng XQ (沈小青), Wu GR (吴国荣). Study on the anti-lipid peroxidation of embedded chlorogenic acid in dandelion. *J Nanjing Nor Univ, Nat Sci* (南京师大学报, 自科版), 2010, 33(3): 81-83.
  - 19 Lv CX (吕长鑫), Li MM (李萌萌), Xu XM (徐晓明), et al. Optimization of enzymatic extraction conditions for *Bletilla striata* polysaccharide by response surface methodology. *J Food Sci* (食品科学), 2013, 34(2): 6-10.
  - 20 Jin CG (金辰光), Chen RZ (陈瑞战), Tan L (谭莉), et al. Optimization of multi-enzymatic extraction of polysaccharides from *Prunella vulgaris* L. *J Changchun Nor Univ* (长春师范大学学报), 2016, 35(2): 49-53.
  - 21 Wu Q (吴琼), Yu SY (于淑艳), Zou XF (邹险峰), et al. Ultrasonic-assisted pectinase extraction of polysaccharide from *Auricularia polytricha*. *Food R & D* (食品研究与开发), 2014, 35(10): 33-36.