

文章编号:1001-6880(2018)6-0915-08

白芨活性成分的抗氧化和对 α -淀粉酶的抑制作用

胡长玉,吴永祥*,吴丽萍,赵成龙,葛超,王雅群

黄山学院生命与环境科学学院,黄山 245041

摘要:采用甲醇回流提取、梯度萃取得到5个不同极性萃取物(正己烷萃取物、二氯甲烷萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和水萃取物),分析萃取物中的总酚、总黄酮含量,以还原能力、对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)和2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)自由基清除能力及 α -淀粉酶抑制作用为评价指标研究其体外抗氧化和降血糖活性,并运用气相色谱-质谱联用(GC-MS)法对甲醇粗提物的化学成分进行鉴定。结果显示:白芨不同极性萃取物中的总酚和总黄酮含量存在显著性差异,二氯甲烷萃取物表现出最高的总酚含量(311.27 ± 0.96 mg/g)和总黄酮含量(22.19 ± 1.47 mg/g)。各萃取物具有较强的抗氧化活性,其还原能力和对DPPH、ABTS自由基清除能力与其浓度呈现良好的线性依赖关系。白芨不同极性萃取物对 α -淀粉酶具有一定的抑制作用,以二氯甲烷萃取物的抑制效果最显著,其 IC_{50} 值为15.75 mg/mL。总酚含量与抗氧化及 α -淀粉酶抑制活性呈显著正相关,表明多酚类物质是白芨发挥作用的物质基础。GC-MS分析了甲醇粗提物并鉴定出15个化合物,占总峰面积量的93.13%,主要化学成分为酯类(53.01%)、芳香族类(28.68%)、有机酸类(8.97%)化合物,表明芳香族类化合物中的多酚类物质是主要的活性成分,酯类、有机酸可能是潜在的活性成分。研究表明,白芨萃取物的生物活性成分含量丰富,具有较好的抗氧化和 α -淀粉酶抑制活性,为白芨的进一步开发利用提供依据。

关键词:白芨;气相色谱-质谱联用(GC-MS);活性成分;抗氧化; α -淀粉酶抑制作用

中图分类号:R284.2;Q946

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.6.001

Antioxidant and α -Amylase Inhibitory Effects of Bioactive Components of *Bletilla striata*

HU Chang-yu, WU Yong-xiang*, WU Li-ping, ZHAO Cheng-long, GE Chao, WANG Ya-qun,

College of Life and Environment Science, Huangshan University, Huangshan 245041, China

Abstract: *Bletilla striata* extracts were prepared by methanol circumfluence extraction. Five fractions of *B. striata* were achieved by extraction with different polar solvents including n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol and water. The fractions were detected by the contents of total phenolics and total flavonoids, reducing power, scavenging DPPH and ABTS free radicals and α -amylase inhibitory activities. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to identify the main constituents of the methanol crude extract. The results showed that there were significant differences in the contents of total phenolics and total flavonoids among different polarity fractions. Dichloromethane fraction exhibited the highest contents of total phenolics (311.27 ± 0.96 mg/g) and total flavonoids (22.19 ± 1.47 mg/g). All the fractions had strong antioxidant capacity such as reducing power, and DPPH, ABTS free radical scavenging abilities. There was a good linear dependence between the antioxidant capacity and the concentration. The fractions also exerted the inhibitory effects on α -amylase. The dichloromethane fraction presented the best α -amylase inhibitory effect with IC_{50} value of 15.75 mg/mL. Total phenolics demonstrated positive correlations with antioxidant and α -amylase inhibitory activities, indicating that polyphenols were the bioactive components of *B. striata*. The methanol crude extract was analyzed by GC-MS, and fifteen compounds representing 93.13% of the total constituents were identified. Esters (53.01%), aromatic series (28.68%), and organic acids (8.97%) were the main components, among which, polyphenols were the

收稿日期:2018-01-06 接受日期:2018-03-13

基金项目:安徽省留学回国人员创新项目择优资助计划重点项目(2017srst1);安徽省高校自然科学研究重点项目(KJ2017A398);博士人才引进启动基金(2016xkjq004)

*通信作者 Tel:86-013855937356;E-mail:wyx2009sun@aliyun.com

major bioactive components, while esters, organic acids might be potential bioactive components. In conclusion, *B. striata* fractions contained high content of bioactive compounds, showed potent antioxidant and α -amylase inhibitory activities. This research was profitable for the study and use of the *B. striata*.

Key words: *Bletilla striata*; cas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); bioactive components; antioxidant; α -amylase inhibitory activity

白芨为兰科植物白芨 *Bletilla striata* (Thunb.)

Reichb. f. 的干燥块茎,作为传统中药制剂使用已有两千多年历史。其味苦、甘涩,性微寒,可用于治疗肺伤咳血、疮疡肿毒、外科创伤、胃及消化道溃疡疼痛等症状^[1]。Qu Yan 等^[2]表明白芨的主要活性成分为白芨多糖,在白芨中的含量高达 43.95 ± 0.26%,具有较强的 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基和羟自由基的清除能力。根据文献报道,白芨多糖还具有抑菌、抗肿瘤和增强机体免疫等作用^[3,4],可作为功能性食品成分及膳食营养补充剂。此外白芨中其他主要化学成分还有联苄类、菲类及其衍生物、多酚类、黄酮类等物质^[5-7],具有抗炎症、延缓衰老及促进创伤愈合作用等功效^[8-10]。由此可见,国内外学者对白芨的研究主要集中在白芨多糖及其活性评价方面,对白芨不同萃取物的抗氧化和 α -淀粉酶抑制作用的研究仍然缺乏,主要活性成分的分析与鉴定尚未见报道。

本研究旨在分析白芨不同极性萃取物(正己烷萃取物、二氯甲烷萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和水萃取物)的总酚、总黄酮含量以及抗氧化(还原能力、DPPH、ABTS 自由基清除能力)、 α -淀粉酶抑制作用,探讨总酚、总黄酮含量与抗氧化、 α -淀粉酶抑制活性的相关性,并采用 GC-MS 定性分析提取物中的主要活性成分,为白芨进一步研究提供理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

SpectraMax-190 型全波长酶标仪(美国 Molecular Devices 公司), AllegraX-15R 型台式离心机(美国 Beckman 公司), EV341 型旋转蒸发仪(北京莱伯泰科仪器有限公司), Agilent HP7890-5975C 气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司)。

1.2 实验材料

丹宁酸、Folin-Ciocalteu 试剂、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、维生素 C(Vc)、 α -淀粉酶(来源于猪胰腺)、阿卡波糖等,购自于美国 Sigma-

Aldrich 公司;气相色谱-质谱联用分析用正己烷为色谱纯,购自于德国 Merck 公司;所有分离用有机溶剂均为国产分析纯,购自于南京化学试剂有限公司。白芨,采自安徽省黄山市祁门县,由黄山学院植物学专家潘健博士鉴定为白芨 [*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.] 的干燥块茎。

2 实验方法

2.1 白芨活性成分的提取

将新鲜白芨干燥后粉碎,称取 50.0 g 原料,加入 500 mL 甲醇,在 60 °C 恒温回流提取 3 h,浸提 3 次,过滤后合并滤液,用旋转蒸发仪浓缩,得到白芨甲醇粗提物(methanol extract, ME)9.08 g。将白芨甲醇粗提物混悬于水中,依次用正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇萃取,浓缩并真空冷冻干燥,得到 5 个不同极性萃取物,分别为正己烷萃取物(n-hexane fraction, HF)0.20 g、二氯甲烷萃取物(dichloromethane fraction, DF)0.31 g、乙酸乙酯萃取物(ethyl acetate fraction, EF)0.49 g、正丁醇萃取物(n-butanol fraction, BF)3.78 g 和水萃取物(water fraction, WF)4.03 g。采用以下公式计算各萃取物的提取率:

$$\text{提取率} (\%) = \frac{W_s}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: W_s 为白芨各萃取物的提取量,g; W_0 为甲醇粗提物的提取量,其中 W_0 为 9.08 g。

2.2 总酚含量的测定

采用 Folin-Ciocalteu 法^[11]测定白芨不同极性萃取物的总酚含量。以单宁酸(50~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)为标准品绘制质量浓度-吸光值的标准曲线,得到标准曲线方程为 $Y=0.0022X+0.0034 (R^2=0.9993)$ 。向反应体系中加入白芨不同极性萃取物的样品溶液,于酶标仪 750 nm 处测定吸光度,通过总酚的标准曲线计算各萃取物的总酚含量,其中 1 g 萃取物中的总酚含量以单宁酸当量(Tannic acid equivalent, TAE)计。

2.3 总黄酮含量的测定

采用铝盐显色法^[12]测定白芨各萃取物的总黄

酮含量。以槲皮素(20~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)为标准品绘制质量浓度-吸光值的标准曲线,得到标准曲线方程为 $Y=0.0259X-0.0157$ ($R^2=0.9965$)。向反应体系中加入白芨不同极性萃取物的样品溶液,于波长420 nm处测定吸光度,通过总黄酮的标准曲线计算各萃取物的总黄酮含量,其中1 g萃取物中的总黄酮含量以槲皮素当量(Quercetin equivalent, QE)计。

2.4 体外抗氧化活性的测定

2.4.1 还原能力的测定

参考文献^[13],稍作改动。将白芨各萃取物及Vc配制成0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL不同浓度的样品溶液。取100 μL 样品,加入100 μL pH 6.6 磷酸缓冲溶液、100 μL 1% 铁氰化钾溶液,混匀后于50 °C水浴中反应20 min。然后加入100 μL 10%三氯乙酸,混合均匀后3 000 rpm离心15 min,取上澄清液100 μL ,加超纯水100 μL 与10 μL 0.1%三氯化铁,静置10 min后测定700 nm处吸光值。同时将样品替换成100 μL 二甲基亚砜作为空白组,将铁氰化钾溶液替换成100 μL 去离子水作为对照组。以Vc为阳性对照,重复3次,取平均值。

2.4.2 DPPH自由基清除能力的测定

参考文献^[14],稍作改动。将白芨各萃取物及Vc配制成0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL不同浓度的样品溶液。取100 μL 样品溶液加入50 μL 0.2 mmol/L DPPH-乙醇溶液,混匀,放置在室温暗处10 min后测定517 nm处吸光值。以Vc为阳性对照,每样重复3次,取平均值,并按下列公式计算DPPH自由基清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s - A_{SB}}{A_c - A_{CB}}\right) \times 100 \quad (2)$$

式中: A_s 为100 μL 样品液+50 μL DPPH溶液的样品组吸光值; A_{SB} 为100 μL 样品液+50 μL 99.9%乙醇溶液的样品对照组吸光值; A_c 为100 μL 二甲基亚砜+50 μL DPPH溶液的空白组吸光值; A_{CB} 为100 μL 二甲基亚砜+50 μL 99.9%乙醇溶液的空白对照组吸光值。

2.4.3 ABTS自由基清除能力的测定

参考文献^[15],稍作改动。将7 mmol/L的ABTS溶液和2.45 mmol/L的过硫酸钾溶液混合,在室温、避光条件下静置过夜,形成ABTS储备液。使用前将ABTS储备液用99.9%乙醇稀释成ABTS工作液,要求在37 °C、734 nm处测定的吸光值为0.7~0.9。将白芨各萃取物及Vc配制成0.1、0.2、0.4、

0.6、0.8、1.0 mg/mL不同浓度的样品溶液。取50 μL 样品溶液加入100 μL ABTS工作液,振荡混匀,放置在暗处5 min后测定734 nm处吸光值。以Vc为阳性对照,每样重复3次,取平均值,并按下列公式计算ABTS自由基清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s - A_{SB}}{A_c - A_{CB}}\right) \times 100 \quad (3)$$

式中: A_s 为50 μL 样品液+100 μL ABTS工作液的样品组吸光值; A_{SB} 为50 μL 样品液+100 μL 99.9%乙醇溶液的样品对照组吸光值; A_c 为50 μL 二甲基亚砜+100 μL ABTS工作液的空白组吸光值; A_{CB} 为50 μL 二甲基亚砜+100 μL 99.9%乙醇溶液的空白对照组吸光值。

2.5 α -淀粉酶抑制作用的测定

参考文献^[16,17],取50 μL 白芨各萃取物溶液,加入50 μL 1unit/mL的 α -淀粉酶溶液与100 μL 0.25%的淀粉溶液,混匀后于37 °C恒温反应10 min。然后加入100 μL DNS溶液,37 °C恒温反应5 min后,在沸水浴中加热15 min,冷却后测定575 nm处吸光值。以阿卡波糖为阳性对照,每样重复3次,取平均值,并按下列公式计算 α -淀粉酶活性的抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s - A_{SB}}{A_c - A_{CB}}\right) \times 100 \quad (4)$$

式中: A_s 为50 μL 样品液+50 μL α -淀粉酶溶液的样品组吸光值; A_{SB} 为50 μL 样品液+50 μL 磷酸缓冲液(替代 α -淀粉酶溶液)的样品对照组吸光值; A_c 为50 μL 二甲基亚砜+50 μL α -淀粉酶溶液的空白组吸光值; A_{CB} 为50 μL 二甲基亚砜+50 μL 磷酸缓冲液(替代 α -淀粉酶溶液)的空白对照组吸光值。

2.6 白芨甲醇粗提物化学成分的GC-MS分析

色谱条件:色谱柱为HP-5 MS(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)的弹性石英毛细管柱;载气为高纯氦气(99.999%),载气流速为1.0 mL/min;不分流进样,进样量为1.0 μL ;升温程序:40 °C保持3 min,以4 °C/min升至160 °C,保持3 min,然后以6 °C/min升至285 °C,保持10 min。质谱条件:离子源为EI,离子源温度为230 °C;四级杆温度为150 °C;电子能量为70 eV;质量扫描范围 m/z 为35~450。

对照NIST08标准谱库,鉴定匹配度高于80%的化学成分,按峰面积归一化法计算出各化学成分的相对含量。

2.7 统计学分析

所得数据以平均值 \pm 标准差表示,运用SPSS 18.0统计分析软件对数据进行分析。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)中的Duncan's多重比较法分析样本间的差异显著性, $P < 0.05$ 表示显著性差异。

3 结果与分析

3.1 白芨不同极性萃取物提取率及总酚、总黄酮含量的分析

由表1可知,白芨各萃取物的提取率及总酚、总黄酮含量存在显著性差异($P < 0.05$)。各萃取物的

提取率在2.20%~44.39%之间,其中正丁醇、水萃取物的提取率较高,分别为41.64%、44.39%。甲醇提取物及各萃取物的总酚含量从大到小排序为二氯甲烷相>乙酸乙酯相>正己烷相>甲醇相>水相>正丁醇相,其中二氯甲烷相从甲醇提取物中分离的总酚高达(311.27 ± 0.96)mg/g,是含量最少的水相(38.80 ± 5.37)mg/g的8.02倍。二氯甲烷相中的总黄酮含量最高,为(22.19 ± 1.47)mg/g,其次为正丁醇相,总黄酮含量为(18.42 ± 0.17)mg/g。结果表明,由于溶剂极性不同对各萃取物的提取率及活性成分组成有较大的影响,白芨的总酚、总黄酮多为低中等极性化合物,主要存在于二氯甲烷相中。

表1 白芨不同极性萃取物的提取率及总酚、总黄酮含量

Table 1 The extraction yields, contents of total phenolics and total flavonoids of different polarity fractions of *B. striata*

萃取物 Fractions	提取率 Extraction yields (%)	总酚含量 Total phenolics (mg/g)	总黄酮含量 Total flavonoids (mg/g)
ME	18.16	69.82 ± 0.58^d	6.62 ± 0.66^d
HF	2.20	78.50 ± 0.51^c	11.17 ± 0.22^c
DF	3.41	311.27 ± 0.96^a	22.19 ± 1.47^a
EF	5.40	116.77 ± 2.19^b	4.68 ± 0.07^e
BF	41.64	38.80 ± 5.37^f	18.42 ± 0.17^b
WF	44.39	54.68 ± 0.32^e	10.77 ± 0.38^c

注:同列不同上标字母表示在统计学上具有显著差异($P < 0.05$)。

Note: Different letters in the same column indicated significant difference ($P < 0.05$).

3.2 白芨不同极性萃取物的抗氧化效果

3.2.1 白芨各萃取物的还原能力

由图1可知,白芨不同极性萃取物均表现出不同程度的还原能力。与阳性对照V_c相比,还原力从大到小排序为V_c>二氯甲烷相>乙酸乙酯相>甲醇相>水相>正己烷相>正丁醇相,当浓度为1.0 mg/mL时,还原能力吸光值分别为 1.36 ± 0.02 、 0.53 ± 0.01 、 0.36 ± 0.004 、 0.31 ± 0.02 、 0.21 ± 0.003 、 0.18 ± 0.003 、 0.09 ± 0.01 。由此可知,二

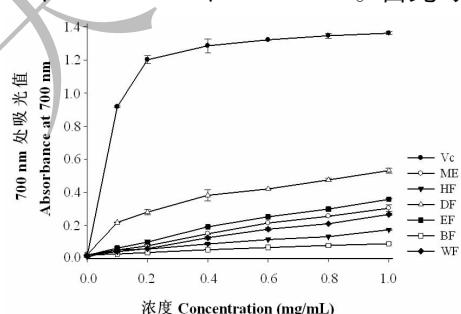


图1 白芨不同极性萃取物的还原能力

Fig. 1 Reducing power of different polarity fractions of *B. striata*

氯甲烷萃取物的还原能力比其它极性萃取物的还原能力相对较好,但都不如V_c显著。

3.2.2 白芨各萃取物对DPPH自由基的清除作用

由图2可知,白芨不同极性萃取物对DPPH自由基均有一定的清除能力,在0.1~1.0 mg/mL内,随着各萃取物浓度的增加,DPPH自由基清除能力不断增强,且呈现良好的剂量-效应关系。DPPH自由基清除能力从大到小排序为V_c>二氯甲烷相>

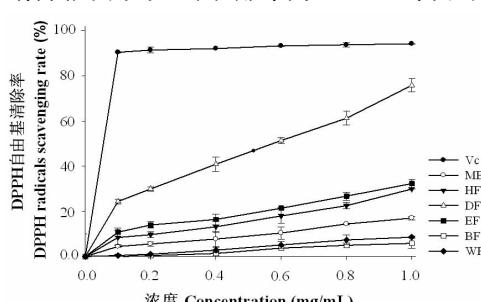


图2 白芨不同极性萃取物对DPPH自由基的清除作用

Fig. 2 Scavenging activity against DPPH free radicals of different polarity fractions of *B. striata*

2.2 白芨不同极性萃取对 α -淀粉酶的抑制效果

由图4可以看出,白芨不同极性萃取物对 α -淀粉酶均有一定的抑制作用。 α -淀粉酶抑制作用从大到小排序为二氯甲烷相>水相>甲醇相>乙酸乙酯相>正己烷相>正丁醇相,当浓度为10 mg/mL时,其对 α -淀粉酶的抑制率分别为38.82%、16.85%、11.61%、7.67%、4.25%、4.17%。表明白芨不同乙酸乙酯相>正己烷相>甲醇相>水相>正丁醇相,当浓度为1 mg/mL时,其对DPPH自由基清除率分别为94.20%、75.81%、32.29%、29.86%、16.97%、8.55%、5.79%,说明白芨二氯甲烷萃取物具有较强的DPPH自由基清除能力。结果表明,白芨不同极性萃取物对DPPH自由基清除能力的变化规律与总酚含量的变化规律一致,说明白芨对DPPH自由基清除能力主要来自于白芨中的总酚物质。

3.2.3 白芨各萃取物对ABTS自由基的清除作用

由图3可知,白芨不同极性萃取物均具有较强的ABTS自由基清除能力,各萃取物对ABTS自由基清除率随着其质量浓度的增加,清除作用随之增强。ABTS自由基清除能力从大到小排序为二氯甲烷相

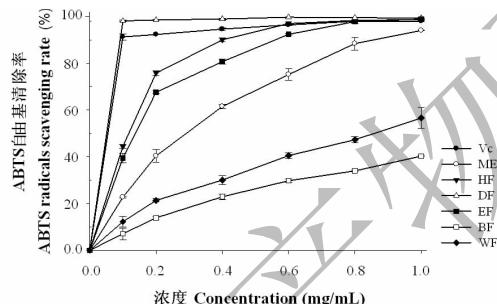


图3 白芨不同极性萃取物对ABTS自由基在清除作用

Fig. 3 Scavenging activity against ABTS free radicals of different polarity fractions of *B. striata*

>Vc>正己烷相>乙酸乙酯相>甲醇相>水相>正丁醇相,其对ABTS自由基清除作用的 IC_{50} 值分别为0.04、0.05、0.12、0.13、0.34、0.95、1.50 mg/mL,说明二氯甲烷萃取物对ABTS自由基的清除作用优于阳性对照Vc。结果表明,白芨二氯甲烷萃取物的抗氧化能力最显著,可能与其高含量的活性成分总酚、总黄酮物质有关。

3.3 白芨不同极性萃取对 α -淀粉酶的抑制效果

由图4可以看出,白芨不同极性萃取物对 α -淀粉酶均有一定的抑制作用。 α -淀粉酶抑制作用从大到小排序为二氯甲烷相>水相>甲醇相>乙酸乙酯相>正己烷相>正丁醇相,当浓度为10 mg/mL时,其对 α -淀粉酶的抑制率分别为38.82%、16.85%、11.61%、7.67%、4.25%、4.17%。表明白芨不同极性萃取物对 α -淀粉酶抑制作用存在较大差异,其中二氯甲烷萃取物的 α -淀粉酶抑制效果最显著($P < 0.05$)。

本实验进一步测定了白芨活性部位二氯甲烷萃取物不同浓度条件下对 α -淀粉酶的抑制作用。由表2可知,在1~20 mg/mL内,二氯甲烷萃取物对

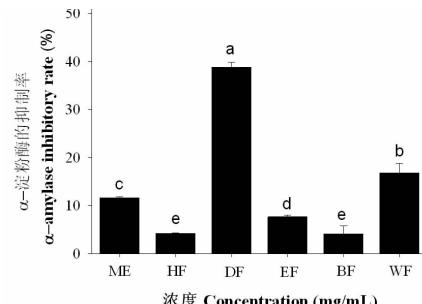


图4 白芨不同极性萃取物对 α -淀粉酶的抑制作用

Fig. 4 α -Amylase inhibitory effect of different polarity fractions of *B. striata*

表2 二氯萃取物对 α -淀粉酶的抑制作用

Table 2 Inhibitory effect of dichloromethane fraction on α -amylase activity

萃取物 Fractions	浓度 Concentration (mg/mL)	抑制率 Inhibitory ability (%)	线性回归方程 Linear regression equation	IC_{50} (mg/mL)
DF	1	8.05 ± 0.25^f	$Y = 2.7053X + 7.384$	15.75
	2	13.64 ± 0.36^e		
	5	20.33 ± 4.24^d		
	10	38.44 ± 1.87^c		
	15	46.40 ± 0.86^b		
	20	60.82 ± 1.53^a		
	阿卡波糖	-		
	-	-	$Y = 51.994X + 28.611$	0.32

注:同列不同字母表示在统计学上具有显著差异($P < 0.05$)。

Note: Different letters in the same column indicated significant difference ($P < 0.05$).

α -淀粉酶的抑制作用随其浓度的增大而增加,这表明二氯甲烷萃取物对 α -淀粉酶的抑制作用与其活性成分含量有关。二氯甲烷萃取物质量浓度(X)与抑制率(Y)间的回归方程为: $Y = 2.7053X + 7.384$ ($R^2 = 0.9886$);阳性对照阿卡波糖质量浓度(X)与抑制率(Y)间的回归方程为: $Y = 51.994X + 28.611$ ($R^2 = 0.9972$)。二氯甲烷萃取物和阿卡波糖对 α -淀粉酶抑制作用的 IC_{50} 值分别为15.75 mg/mL、0.32 mg/mL。

3.4 白芨萃取物的总酚、总黄酮含量与抗氧化、 α -淀粉酶抑制作用的相关性分析

表3 白芨萃取物的总酚、总黄酮含量与抗氧化、 α -淀粉酶抑制作用的相关性分析

Table 3 Correlation analysis between total phenolic, flavonoid contents and antioxidant, α -amylase inhibitory activities of *B. striata*

项目 Items	总酚 Total phenolic	总黄酮 Total flavonoid	还原能力 Reducing power	DPPH ⁺ · 清除能力 DPPH · scavenging ability	ABTS ⁺ · 清除能力 ABTS · scavenging ability	α -淀粉酶抑制作用 α -Amylase inhibitory activity
总酚 Total phenolic	1					
总黄酮 Total flavonoid	0.540	1				
还原能力 Reducing power	0.874 *	0.142	1			
DPPH ⁺ · 清除能力 DPPH · scavenging ability	0.976 **	0.454	0.833 *	1		
ABTS ⁺ · 清除能力 ABTS · scavenging ability	0.964 **	0.466	0.806	0.997 **	1	
α -淀粉酶抑制作用 α -Amylase inhibitory activity	0.887 *	0.571	0.853 *	0.789	0.780	1

注: * 表示显著相关性 ($P < 0.05$); ** 表示极显著相关性 ($P < 0.01$)。

Note: * indicated significant difference ($P < 0.05$); ** indicated significant difference ($P < 0.01$)。

3.5 白芨甲醇粗提物化学成分的GC-MS分析

对白芨甲醇粗提物的主要化学成分进行了GC-MS分析,总离子流图谱如图5所示。运用NIST08质谱库对照,从甲醇粗提物中鉴定出15个化合物,占总峰面积量的93.13%。由表4可知,甲醇粗提物含有酯类、有机酸类、烯类、芳香族类、酮类等,以酯类、芳香族类、有机酸类为主,其中含有3种酯类化合物(53.01%)、6种芳香族类化合物(28.68%)、2种有机酸类化合物(8.97%)。甲醇粗提物中相对含量在1%以上的化合物共8个,分别为癸二酸二异辛酯(49.94%)、4-氟苯酚(16.07%)、2-甲基丙烯酸(8.64%)、(+)-反式-3,4-二甲基-2-苯基四氢-1,4-噻嗪(5.35%)、(-)-顺式-3,4-二甲基-2-苯基四氢-1,4-噻嗪(4.33%)、5,7二羧基-辛酸甲酯(2.52%)、3-甲酚(1.58%)、2-十九烷酮(1.01%)。

由表3可知,白芨各萃取物的总酚含量与其还原能力、DPPH自由基清除能力、ABTS自由基清除能力、 α -淀粉酶抑制作用之间呈显著正相关,相关系数(r)分别为0.874 ($P < 0.05$)、0.976 ($P < 0.01$)、0.964 ($P < 0.01$)、0.887 ($P < 0.05$),表明白芨萃取物中总酚含量越高,该萃取部位的抗氧化、 α -淀粉酶抑制活性越强。白芨的总黄酮含量与抗氧化、 α -淀粉酶抑制作用无显著相关性。结果表明,白芨各萃取物的总酚物质是其抗氧化、 α -淀粉酶抑制活性的物质基础。

4 讨论

不同萃取溶剂的极性对白芨中的总酚和总黄酮含量以及抗氧化活性有显著性的影响。在5个不同

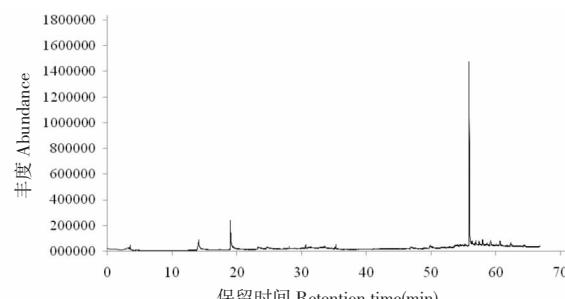


图5 白芨甲醇提物的GC-MS总离子流图

Fig. 5 Total ion chromatogram of methanol crude extract of *B. striata*

表4 白芨甲醇粗提物的化学成分及其相对含量

Table 4 Chemical constituents and relative contents of methanol crude extract of *B. striata*

序号 No.	保留时间 Retention time (min)	化合物 Compounds	分子式 Formula	分子量 Molecule mass	相对含量 Relative contents (%)
1	14.1282	2-甲基丙烯酸 2-Methylpropenoic acid	C ₄ H ₆ O ₂	86.09	8.64
2	18.9952	4-氟苯酚 4-Fluorophenol	C ₆ H ₅ FO	112.10	16.07
3	19.3999	棋盤花辛城 Zygacine	C ₂₉ H ₄₅ NO ₈	535.67	0.29
4	23.3173	2-十九烷酮 2-Nonadecanone	C ₁₉ H ₃₈ O	282.50	1.01
5	28.0545	香树烯 Alloaromadendren	C ₁₅ H ₂₄	204.35	0.65
6	30.6229	2,6-二叔丁基苯酚 2,6-Bis(1,1-Dimethylethyl) phenol	C ₁₄ H ₂₂ O	206.32	0.88
7	35.2927	3-甲酚 3-Methylphenol	C ₇ H ₈ O	108.14	1.58
8	46.853	亚油酸 Linoleic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.45	0.33
9	49.8468	4,4'-氧化偶氮苯甲醚 4,4'-Azoxyanisole	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₃	258.27	0.47
10	53.7124	4-氯查耳酮 4-Chlorochalcone	C ₁₅ H ₁₁ ClO	242.70	0.52
11	54.5062	三甲苯磷酸酯 Phosphoric acid, tris(3-methylphenyl) ester	C ₂₁ H ₂₁ O ₄ P	368.36	0.55
12	55.8864	癸二酸二异辛酯 Dioctyl sebacate	C ₂₆ H ₅₀ O ₄	426.67	49.94
13	56.3326	5,7 二羧基-辛酸甲酯 5,7-Dioxooctanoic acid, methyl ester	C ₉ H ₁₄ O ₄	186.21	2.52
14	57.9567	(+) - 反式-3,4-二甲基-2-苯基四氢-1,4-噻嗪 (+) - trans-3,4-Dimethyl-2-phenyltetrahydro-1,4-thiazine	C ₁₂ H ₁₇ NS	207.11	5.35
15	60.634	(-) - 顺式-3,4-二甲基-2-苯基四氢-1,4-噻嗪 (-) - cis-3,4-Dimethyl-2-phenyltetrahydro-1,4-thiazine	C ₁₂ H ₁₇ NS	207.11	4.33

极性萃取物中,二氯甲烷萃取物表现出最高的总酚含量,且具有最显著的还原能力和对DPPH、ABTS自由基的清除能力,表明总酚物质是白芨中主要的抗氧化活性成分。总酚物质的抗氧化作用是通过酚羟基与自由基反应形成共振稳定的半醌式自由基结构,从而阻止自由基的传递所引起的终端连锁反应,达到有效的自由基清除效果^[18]。

α -淀粉酶参与生物体的糖代谢,是碳水化合物消化吸收的关键酶,能水解 α -1,4 糖苷键,消化淀粉,促进糖吸收。因此,抑制 α -淀粉酶活性可有效控制血糖水平,达到控制和治疗肥胖、糖尿病的目的。研究发现植物资源中含有的总酚、黄酮、多糖、酯类等化合物是 α -淀粉酶抑制剂的主要活性成分^[19,20]。实验表明,白芨二氯甲烷萃取物对 α -淀粉酶的抑制活性最显著。通过相关性分析,得到白芨各萃取物中总酚含量与其抗氧化及 α -淀粉酶抑制活性呈显著正相关,表明总酚类物质是白芨发挥作用的物质基础。同时本研究分析了白芨粗提物的主要化学成分,定性得到15个化合物,占总峰面积量的93.13%,以酯类化合物(53.01%)、芳香族类化合物(28.68%)、有机酸类化合物(8.97%)为主,表

明芳香族类化合物中的多酚类物质是主要的活性成分,酯类、有机酸可能是其潜在的活性成分。

综上所述,白芨的生物活性成分含量丰富,具有较好的体外抗氧化和 α -淀粉酶抑制作用,揭示了白芨具有潜在的降血糖作用,而提取物中高含量的总酚是其发挥作用的物质基础。但未知的是哪种成分发挥主要作用,需进一步分离纯化,以筛选出更加明确有效的抗氧化和 α -淀粉酶抑制活性成分。

参考文献

- 1 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*[J]. *Global Tradit Chin Med*(环球中医药),2016,9:507-511.
- 2 Qu Y,Li CX,Zhang C,*et al.* Optimization of infrared-assisted extraction of *Bletilla striata* polysaccharides based on response surface methodology and their antioxidant activities [J]. *Carbohydrate Polym*,2016,148:345-353.
- 3 Qiu HM(邱红梅),Zhang Y(张颖),Zhou QX(周岐新),*et al.* Regulatory effect of *Bletilla striata* polysaccharide on immune function of mice[J]. *Chin J Biologicals*(中国生物制品学杂志),2011,24:676-678.

- 4 Peng Q, Li M, Xue F, et al. Structure and immunobiological activity of a new polysaccharide from *Bletilla striata* [J]. *Carbohydrate Polym*, 2014, 107:119-123.
- 5 Ma XJ(马先杰), Cui BS(崔保松), Han SW(韩少伟), et al. Chemical constituents from tuber of *Bletilla striata* [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2017, 42:1578-1584.
- 6 Wang LN, He YZ, Zhao QD, et al. Phenolic compounds from *Bletilla striata* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2017, 19:981-986.
- 7 He X, Wang X, Fang J, et al. *Bletilla striata*: medicinal uses, phytochemistry and pharmacological activities [J]. *J Ethno-pharmacol*, 2017, 195:20-38.
- 8 Zhao Y, Niu JJ, Cheng XC, et al. Chemical constituents from *Bletilla striata* and their NO production suppression in RAW 264.7 macrophage cells [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2017, 15:1-6.
- 9 Lee JH, Kim MG, Lee S, et al. Effects of *Bletillae Rhizoma* on the elastase, collagenase, and tyrosinase activities and the procollagen synthesis in Hs68 human fibroblasts [J]. *Korea J Herbology*, 2013, 28:9-14.
- 10 Song Y, Zeng R, Hu L, et al. *In vivo* wound healing and *in vitro* antioxidant activities of *Bletilla striata* phenolic extracts [J]. *Biomed Pharm*, 2017, 93:451-461.
- 11 Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis automation and comparison with manual methods [J]. *Am J Enol Viticult*, 1977, 28:49-55.
- 12 Chang CC, Yang MH, Wen HM, et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods [J]. *J Food Drug Anal*, 2002, 10:178-182.
- 13 Zhang YB(张元波), Zhang M(张敏), Cheng QB(程启斌), et al. Relationship between HPLC fingerprint chromatogram and antioxidant activity of *Forsythia suspense* leaves [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017, 29:629-634.
- 14 Wu YX(吴永祥), Wang X(王祥), Jiang HT(江海涛), et al. Study on total polyphenol content and antioxidant, antimicrobial activities of different polarity fractions of *Chimonanthus salicifolius* Hu leaves [J]. *Food Mach*(食品与机械), 2017, 33:150-154.
- 15 Wu YX(吴永祥), Yang Q(杨庆), Li L(李林), et al. Chemical constituents, antioxidant and antimicrobial effects of volatile oil from *Premna microphylla* leaves [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2018, 30:45-51.
- 16 Liu M(柳梅), Ren X(任璇), Yao YJ(姚玉军), et al. Antioxidant and *in vitro* hypoglycemic activities of polyphenol in Sea Buckthorn leaves [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017, 29:1013-1019.
- 17 Wu YX, Kim YJ, Li S, et al. Anti-obese effects of mulberry (*Morus alba* L.) root bark through the inhibition of digestive enzymes and 3T3-L1 adipocyte differentiation [J]. *Korean J Food Preserv*, 2015, 22:27-35.
- 18 Zhang ZY(张兆远), Ruan HS(阮洪生). Study the *in vitro* antioxidant and α -glucosidase, α -amylase inhibitory activities of extracts of *Fagopyri dibotrys rhizome* [J]. *Pharm Clin Chin Mater Med*(中药药理与临床), 2017, 33:102-106.
- 19 Fei Q, Gao Y, Zhang X, et al. Effect of oolong tea polyphenols, EGCG, and EGCG3" me on pancreatic α -amylase activity *in vitro* [J]. *J Agri Food Chem*, 2014, 62:9507-9514.
- 20 Belhadj S, Bentati O, Elfeki A, et al. Inhibitory activities of *Ulva lactuca* polysaccharides on digestive enzymes related to diabetes and obesity [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2013, 119:81-87.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

广西壮族自治区药用植物园

广西科学院

重庆市药物种植研究所

昆明医科大学药学院