

广东石豆兰多糖的提取工艺及其抗氧化活性

苗永美*,孙佳琦,徐荣华,汪 雁

安徽科技学院生命与健康科学学院,凤阳 233100

摘要:为优化广东石豆兰多糖的提取工艺并评价其抗氧化活性。在单因素试验基础上,采用正交设计和方差分析,研究液料比、提取温度、时间及沉淀多糖的乙醇浓度对石豆兰多糖浸提量的影响并优化了工艺条件,确定最优条件为液料比 50:1 (mL/g),提取温度 90 °C,时间 6 h,醇沉浓度为 95%,此条件下多糖提取量为 79.060 mg/g,RSI 为 0.132%。抗氧化结果表明广东石豆兰多糖的总还原力为 L-抗坏血酸的 3.46%;对 DPPH·、·OH、·O₂⁻自由基半清除浓度 (EC₅₀) 分别为 2769.58, 594.60, 586.94 μg/mL, 其清除能力分别是 L-抗坏血酸的 0.68%、47.17% 和 29.00%;对 Fe²⁺ 的半螯合浓度 (EC₅₀) 为 160.83 μg/mL, 融合能力是 EDTA 的 2.12%。本研究结果为石豆兰多糖的提取及进一步开发利用提供参考依据。

关键词:广东石豆兰;多糖;单因素试验;正交设计;抗氧化性

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)5-0779-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.5.007

Optimization of the extraction process of polysaccharide from *Bublophyllum kwangtungense* and its antioxidant activity

MIAO Yong-mei*, SUN Jia-qi, XU Rong-hua, WANG Yan

College of Life and Health Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China

Abstract: In this experiment, optimization of extraction process of polysaccharide from *Bublophyllum kwangtungense* and its antioxidant activity were studied. On the basis of single factors experiments, orthogonal design and variance analysis were utilized to investigate the effects of liquid-to-solid, extraction temperature and time, ethanol concentration for precipitation on the content of polysaccharide, and optimize the process. The optimal extraction conditions were determined as follows: liquid-to-solid, 50:1 (mL/g); extraction temperature, 90 °C, and extraction time, 6 h; ethanol heavy concentration, 95%. Under the optimal conditions, the yield of polysaccharide of 79.060 mg/g was gained, and the RSD value was 0.132%. Polysaccharide displays good antioxidant activity with that total reducing power is 0.035 times of L-ascorbic acid, and the EC₅₀ values for DPPH, hydroxyl radicals and superoxide anions are 2769.58, 594.60, 586.94 μg/mL, and the clearance ability are 0.68%, 47.17% and 29.00% of L-ascorbic acid respectively. The chelating rate to Fe²⁺ with EC₅₀ values of 160.83 μg/mL, and the chelating ability is 2.12% of EDTA. These results provided a reference for the extraction, further development and utilization of the polysaccharide in *B. kwangtungense*.

Key words: *Bublophyllum kwangtungense*; polysaccharide; single factor experiment; orthogonal design; antioxidant activity

石豆兰属 (*Bublophyllum*) 为兰科最大的属,该属植物全世界约有 1 000 种,主要分布于亚洲、非洲和美洲热带地区。我国有一百多种,主要产于长江流域及其以南各省区,尤以云南南部为多^[1],也有新种逐渐被发现的报道^[2,3]。石豆兰属植物中有些

种类是中草药,常作民间药用的有 15 种,包括广东石豆兰、麦斛等^[1]。石豆兰以全草或假鳞茎或鲜草入药,具有清热、滋阴、消肿、抗癌、抗焦虑等功效^[4]。

植物多糖因有增强和调节机体免疫功能,抗衰老,抗肿瘤,抗辐射等作用而受到广泛的重视^[5]。兰科植物中石斛、天麻、白芨、芋兰、杜鹃兰、石豆兰等都是重要中药材,多糖是其主要药用成分之一。关于兰科植物多糖的研究,不同植物开展的广度和

收稿日期:2018-10-15 接受日期:2019-04-02

基金项目:校人才稳定项目(SKWD201701);国家级大学生创新训练项目(201710879035);省级大学生创新训练项目(2017S10879040)

*通信作者 E-mail:mym416@163.com

深度不同,石斛^[6]、白芨^[7]、金线莲^[8]、石仙桃^[9]、天麻^[10]等植物体内多糖的研究比较多。石豆兰的研究相对较少,仅对其资源调查^[1]、显微结构特征^[11]、非多糖化学成分的分离鉴定^[12]、药理^[13]等几个方面有少量研究,关于石豆兰多糖的研究尚未见报道。

植物多糖的提取多采用水提法。赵会然等^[14]对云南产的五种兰科植物滇西贝母兰(*Coelogyne calcicola*)、喉红石斛(*Dendrobium christyanum*)、密花毛兰(*Eri spicata*)、镰翅羊耳蒜(*Liparis bootanensis*)、温氏卷瓣兰(*Bulbophyllum wendlandianum*)中的多糖采用传统水提法,苯酚-硫酸法检测,方法稳定、重复性好,并优化了温度、料液比和提取时间等工艺参数。因此本研究采用水溶剂提取、苯酚硫酸法检测,在单因素试验的基础上进行正交设计,考察液料比、提取温度和时间及沉淀多糖的乙醇浓度对多糖提取量的影响。并对广东石豆兰粗多糖的总还原力、DPPH自由基清除率、羟基自由基清除率、超氧阴离子清除率、 Fe^{2+} 螯合率进行测定,评价其抗氧化活性。旨在为石豆兰功能性食品开发和利用提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

石豆兰鲜样,经形态学鉴定属于广东石豆兰

表1 标准曲线的绘制
Table 1 Drawing the standard curve

试验号 No.	0	1	2	3	4	5	6	7	8
葡萄糖标准溶液 Glucose standard solution (mL)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
蒸馏水 Distilled water (mL)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2
6% 苯酚 Phenol (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
98% H_2SO_4 (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

采用赵会然的苯酚-硫酸法^[14],体系略作改动,具体见表1,490 nm处测其吸光度值,绘制标准曲线得回归方程 $A = 0.01C - 0.029$, $R^2 = 0.9964$ 。

样品液按上面步骤得糖浓度,按下式计算多糖提取量:

$$\text{多糖提取量} (\text{mg/g}) = (C \times V \times N) / 1000M$$

式中: C —多糖浓度($\mu\text{g/mL}$), V —提取液总体积(mL), N —稀释倍数, M —干粉重量(g)。

1.3.3 单因素试验

准确称取干粉1.0 g,分别考察液料比、提取温

(*Bulbophyllum kwangtungense*),采自福建屏南鸳鸯猕猴自然保护区。

浓 H_2SO_4 、苯酚、葡萄糖、氯仿、异戊醇、铁氰化钾、三氯乙酸、 FeCl_3 、L-抗坏血酸、甲醇、乙醇、DP-PH、 FeSO_4 、水杨酸、 H_2O_2 、Tris、浓 HCl 、邻苯三酚、菲啰嗪、EDTA。

1.2 仪器

DGG-9140B型电热恒温鼓风干燥箱(上海森信试验仪器有限公司)、QE-100中草药粉碎机(浙江屹立工贸有限公司)、水浴锅(上海司乐仪器有限公司)、R205B旋转蒸发器(上海申顺生物科技有限公司)、ThermoHeraeus Multifuge X1R冷冻离心机、FD-ID-80冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司)、T6新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 多糖提取工艺流程

鳞茎洗净、切片、50℃烘干→粉碎过60目筛→干粉→热水浸提液→离心、取上清液→浓缩→低温醇沉过夜→沉淀溶解→Sevage法去蛋白→多糖溶液→冷冻干燥→粗多糖。

1.3.2 多糖含量的测定

度、提取时间和醇沉浓度4个因素对多糖提取的影响,每个实验重复三次。

1.3.3.1 液料比的选择

按液料比20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、100:1加入蒸馏水,80℃水浴提取3 h,80%乙醇沉淀多糖。

1.3.3.2 提取温度的选择

按液料比60:1加入蒸馏水,分别在60、70、80、90、100℃下水浴提取3 h,80%乙醇沉淀多糖。

1.3.3.3 提取时间的选择

按液料比 60:1 加入蒸馏水, 90 ℃ 下水浴提取 2、3、4、5、6、7 h, 80% 乙醇沉淀多糖。

1.3.3.4 醇沉浓度的选择

按液料比 60:1 加入蒸馏水, 90 ℃ 下提取 6 h 得多糖提取液, 加入乙醇使终浓度分别达到 70%、75%、80%、85%、90%、95%, 冰箱沉淀过夜。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验因素与水平
Table 2 $L_9(3^4)$ Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Levels	因素 Factors			
	A 液料比 Liquid-to-solid (mL/g)	B 提取温度 Extracting temperature (℃)	C 提取时间 Extracting time (h)	D 醇沉浓度 Alcohol concentration (%)
1	50: 1	80	5	85
2	60: 1	90	6	90
3	70: 1	100	7	95

1.3.5 换算因子的计算

醇沉、离心后得到的湿多糖经冷冻干燥, 得干品, 配成 1 mg/mL 的多糖原液, 稀释成 100 μg/mL, 按标准曲线操作步骤得葡萄糖浓度, 按下列公式计算换算因素: $F = C_0/C_1$ 。

C_1 —按方程得出的葡萄糖浓度; C_0 —配制的多糖浓度。经计算得: $F = 100 \mu\text{g}/\text{mL} / 36.73 \mu\text{g}/\text{mL} = 2.72$

1.3.6 抗氧化活性的测定

配制 100 mg/mL 的广东石豆兰多糖溶液, 稀释成 100、200、300、400、500 μg/mL 五个浓度梯度(编号 1~5), 通过五个指标对石豆兰多糖抗氧化活性进行评价。

1.3.6.1 总还原力测定

还原力测定参考 Apati 等的方法^[15], 略作调整。取 1~5 号样品液 1 mL 于试管中, 加入 2.5 mL 0.2 mol/L PBS (pH 6.6) 和 1% 铁氰化钾, 50 ℃ 水浴 20 min, 取出后加入 2.5 mL 10% 三氯乙酸, 摆匀、离心, 吸取 3.5 mL 上清液加入新试管中, 再加 0.5 mL 0.1% 的 FeCl_3 溶液, 摆匀, 静置 4 min, 测 700 nm 吸光度值; 以相同浓度的 L-抗坏血酸做阳性对照。

1.3.6.2 DPPH 自由基清除能力测定

DPPH 自由基清除测定参考 Hatano 等的方法^[16], 略作调整。各试管中分别加入 1~5 号样品液 2.0 mL, 再依次加 2 mL 的 DPPH (0.2 mmol/L), 暗反应 30 min, 测定 517 nm 的吸光度值, 记 A_1 ; 用甲醇代替 DPPH 测定样品的本底吸收, 记 A_2 ; 用蒸馏水代替 DPPH 测定样品的本底吸收, 记 A_0 ;

1.3.4 多糖提取的正交试验

据单因素试验结果, 选择液料比(A)、提取温度(B)、提取时间(C)、醇沉浓度(D)合适水平, 以多糖提取量为指标, 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 对多糖的提取工艺进行优化, 确定最佳工艺条件。

水代替样品作空白对照, 记 A_0 ; L-抗坏血酸做阳性对照, 浓度梯度为样品的 1/10 (编号 1~5), 平行 3 次, 计算清除率(%) = $[1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100$ 。

1.3.6.3 羟基自由基清除能力测定

各管中分加入 1~5 号样品液 1.0 mL, 再加 9 mmol/L FeSO_4 1 mL, 反应 15 min 后加 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 1 mL, 最后加 8.8 mmol/L H_2O_2 1 mL, 37 ℃ 反应 30 min, 测 510 nm 的吸光度值, 记 A_1 ; 用蒸馏水代替 H_2O_2 测定样品的本底吸收值, 记 A_2 ; 以蒸馏水代替样品, 记 A_0 ; 相同浓度的 L-抗坏血酸做阳性对照; 平行 3 次, 计算清除率(%) = $[1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100$ 。

1.3.6.4 超氧阴离子清除能力测定

各管中分加入 1~5 号样品液 1.0 mL, 再分别加 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.2) 3 mL, 37 ℃ 水浴 20 min, 立即加 37 ℃ 预热的 7 mmol/L 邻苯三酚 1 mL, 迅速摇匀倒入比色皿, 325 nm 处每 30 s 测吸光度值, 连测 4 min, 计算每分钟变化值, 记 A_1 ; 蒸馏水代替样品, 增加值记 A_0 ; 以 1/4 样品浓度的 L-抗坏血酸为阳性对照(编号 1~5); 平行 3 次, 计算清除率(%) = $(1 - A_1/A_0) \times 100$ 。

1.3.6.5 Fe^{2+} 融合率测定

各管中分加入 1~5 号样品液 1.0 mL, 加 0.1 mL 1 mmol/L 的 FeSO_4 摆匀, 静止 15 min, 加入 0.2 mL 菲啰嗪 (2.5 mmol/L)、3.7 mL 蒸馏水, 室温放置 20 min, 562 nm 处测吸光值, 记 A_1 ; 用蒸馏水代替菲啰嗪, 记 A_2 ; 蒸馏水代替样品, 记 A_0 ; 以 1/10 样品浓

度的 EDTA 做阳性对照(编号 1~5);平行 3 次,计算 Fe^{2+} 融合率 (%) = $[1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100$ 。

1.3.7 数据处理

数据分析用 Excel2010 和 SPSS19.0,绘图采用 Origin2018 软件。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 液料比对多糖提取量的影响

从图 1 看出,多糖提取量随液料比增大呈先升后降趋势,在液料比 20:1 时,多糖提取量仅为 25.10 mg/g,多糖得率随液料比增大迅速增加,增加到 60:1 时最高(65.40 mg/g),主要是大的溶剂量增加了物料与溶剂的接触面积、溶液传质推动力和浓度梯度,促使细胞壁破裂,多糖得以释放。当超过 60:1 时,多糖提取率出现缓慢下降趋势,可能是多糖溶出已达饱和,增加溶剂量,不仅消耗能源,且后续纯化浓缩难度增加,导致多糖的损失增大。综合考虑,选择液料比 60:1 (mL/g) 更为合适。

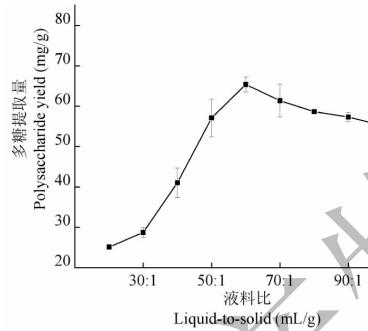


图 1 液料比对多糖提取量的影响

Fig. 1 Effect of liquid-to-solid on polysaccharide yield

2.1.2 提取温度对多糖提取量的影响

从图 2 看出,60~90 ℃ 范围内,多糖浸提量逐渐升高,可能是因为高温加快了溶剂的渗透和溶质

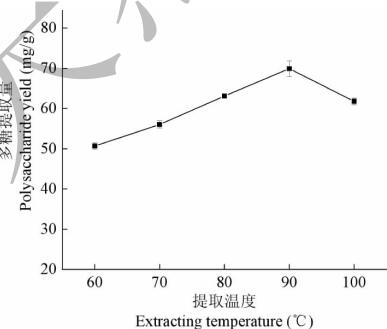


图 2 提取温度对多糖提取量的影响

Fig. 2 Effect of extracting temperature on polysaccharide yield

的扩散,利于多糖的溶出,90 ℃ 时提取量最高(69.92 mg/g);但随着温度继续升高,多糖提取量反而下降,可能由于过高的温度加大了蛋白质凝固使多糖不易溶出,或者部分多糖发生了水解,又增加了杂质的溶出量。因此,温度以 90 ℃ 为最佳。

2.1.3 提取时间对多糖浸提量的影响

由图 3 得知,多糖提取量随着时间延长而升高,5 h 后迅速增加,6 h 时最高(74.99 mg/g);时间过长不利于多糖的提取,可能是因为提取早期多糖的扩散速率逐渐增大,随着溶质在两相中浓度梯度差减小,扩散速度会越来越慢,待达到饱和后,多糖含量不再增加,如果继续加热提取,多糖会发生缩合、降解、氧化等化学反应,此外原料中的凝固蛋白质也不利于多糖的溶出,最终导致多糖得率下降。因此,提取时间 6 h 为宜。

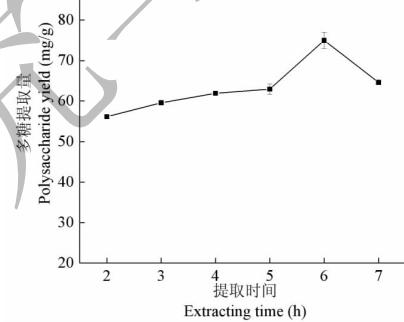


图 3 提取时间对总黄酮浸提量的影响

Fig. 3 Effects of extracting time on polysaccharide yield

2.1.4 醇沉浓度对多糖提取量的影响

从图 4 看出,随着沉淀多糖所用乙醇浓度的提高,多糖得率逐渐升高,当乙醇浓度超过 80% 时,多糖得率增加缓慢,95% 酒精浓度沉淀出的多糖比 90% 酒精浓度只增加了 3.19%,因此,选择 90%~95% 的乙醇浓度沉淀石豆兰多糖均能得到理想结果。

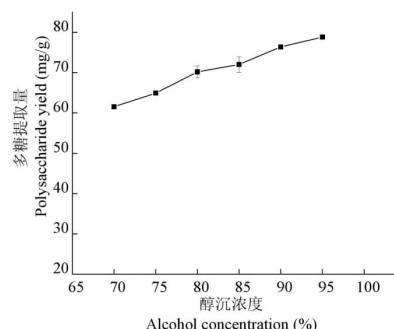


图 4 醇沉浓度对多糖提取量的影响

Fig. 4 Effect of the alcohol concentration on polysaccharide yield

2.2 正交试验

2.2.1 正交试验结果与分析

根据表3中R值大小可知,对多糖提取率的影响程度依次为:提取时间>提取温度>醇沉浓度>液料比,最佳提取工艺为A₁B₂C₂D₃,即液料比为50:

1(mL/g),温度为90℃,时间为6 h,醇沉浓度为95%。方差分析结果(表4)显示,四个因素的F值均大于F_{0.01},说明四个因素对多糖提取率的影响都达到了极显著水平。

表3 L₉(3⁴)正交试验结果Table 3 L₉(3⁴) orthogonal experimental results

试验号 Test number	因素及水平 Factors and levels				多糖提取率 Polysaccharide yield (mg/g)
	A 液料比 Liquid-to-solid (mL/g)	B 提取温度 Extracting temperature (℃)	C 提取时间 Extracting time (h)	D 醇沉浓度 Alcohol concentration (%)	
1	1	1	1	1	68.092
2	1	2	2	2	77.219
3	1	3	3	3	71.385
4	2	1	2	3	74.558
5	2	2	3	1	70.400
6	2	3	1	2	69.313
7	3	1	3	2	67.484
8	3	2	1	3	73.125
9	3	3	2	1	70.260
K ₁	72.232	70.045	70.177	69.584	
K ₂	71.424	73.581	74.012	71.339	
K ₃	70.290	70.320	69.756	73.023	
R	1.942	3.537	4.256	3.439	

表4 方差分析

Table 4 Analysis of variance

方差来源 Sources of variation	平方和 Sum of square	自由度 Freedom	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Significant
A 液料比 Liquid-to-solid	17.659	2	8.830	100.354	0.000
B 提取温度 Extracting temperature	70.459	2	35.230	400.402	0.000
C 提取时间 Extracting time	99.693	2	49.846	566.530	0.000
D 醇沉浓度 Alcohol concentration	53.100	2	26.550	301.756	0.000
误差 Error	1.584	18	0.088		

注:F_{0.05}(2,2)=19.00,F_{0.01}(2,2)=99.00。

Note:F_{0.05}(2,2)=19.00,F_{0.01}(2,2)=99.00.

2.2.2 最优工艺的验证性

按照正交设计优化出的最佳工艺条件A₁B₂C₂D₃进行提取,平行三次,结果见表5,多糖平均提取率为79.060 mg/g, RSD值为0.132% (n=

3)。计算结果表明,该提取工艺稳定可行。

2.3 多糖的抗氧化性

2.3.1 总还原力

以L-抗坏血酸为对照,测定广东石豆兰多糖的

表 5 验证性试验
Table 5 Verification test

试验号 Test number	多糖提取率 Polysaccharide yield (mg/g)	平均值 Mean value	RSD Relative standard deviation (%)
1	79.176		
2	78.975	79.060	0.132
3	79.027		

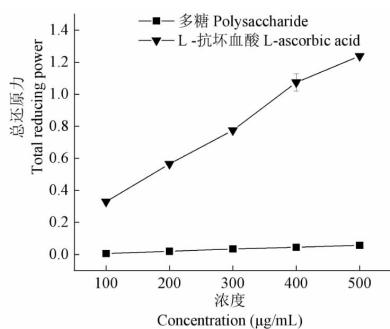


图 5 多糖的总还原力

Fig. 5 Total reducing power of polysaccharide

总还原力,结果见图 5。总还原力随多糖浓度增加而升高,但低于同浓度的 L-抗坏血酸,还原力为 0.5 对应的多糖和 L-抗坏血酸质量浓度 $A_{0.5}$ 分别是 5 061、174.87 $\mu\text{g}/\text{mL}$,其还原力为 L-抗坏血酸的 3.46%。总还原力是反映潜在抗氧化活性的重要指标,由此可见广东石豆兰多糖的还原力较小。

2.3.2 对 DPPH 自由基的清除能力

多糖和 L-抗坏血酸对 DPPH 自由基的清除能力如图 6 所示,随着浓度的升高,清除率都呈上升趋势,但多糖上升缓慢,500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 比 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的多糖对 DPPH 自由基清除率只提高了 26.44%,大大

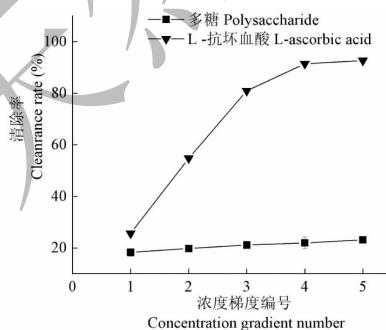


图 6 多糖对 DPPH 自由基的清除效果

Fig. 6 Scavenging capacity to DPPH free radical of polysaccharide

低于阳性对照,多糖和 L-抗坏血酸对 DPPH 自由基清除率达到 50% 时所需的效应浓度 (EC_{50}) 分别为 2769.58、18.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$,得出多糖清除 DPPH 自由基的能力是 L-抗坏血酸 0.68%。

2.3.3 对羟基自由基的清除能力

多糖对羟基自由基清除能力如图 7 所示,随浓度增大,清除能力逐渐增强,基本呈线性增长;多糖和 L-抗坏血酸对羟基自由基的 EC_{50} 分别为 594.60、280.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$,得出多糖清除羟基自由基的能力是 L-抗坏血酸的 47.17%。

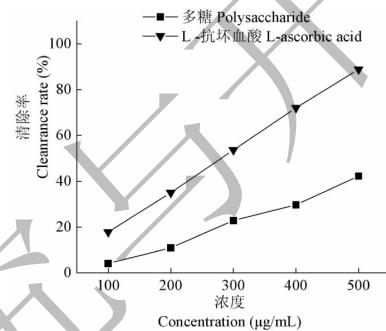


图 7 多糖对羟基自由基的清除效果

Fig. 7 Scavenging capacity to hydroxy free radical of polysaccharide

2.3.4 对超氧阴离子清除能力

多糖对超氧阴离子清除能力如图 8 所示,随着浓度的增大,清除率逐渐提高,多糖的清除率稍高于 1/4 相同浓度的 L-抗坏血酸的清除率,多糖和 L-抗坏血酸对超氧阴离子的 EC_{50} 分别为 586.94、170.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,得出多糖对超氧阴离子的清除能力是 L-抗坏血酸的 29.00%。

2.3.5 对 Fe^{2+} 的螯合能力

如图 9 所示,多糖对 Fe^{2+} 有一定的螯合能力,随着浓度升高,对 Fe^{2+} 的螯合能力逐渐增强,当浓度达到 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后,螯合能力上升减缓;所试

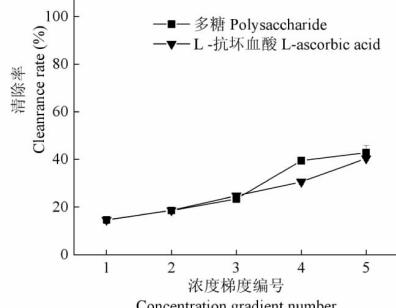


图 8 多糖对超氧阴离子的清除效果

Fig. 8 Scavenging capacity to superoxide anion of polysaccharide

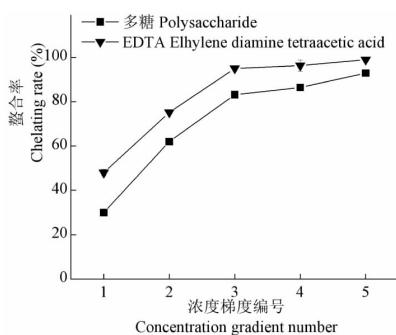


图9 多糖对 Fe^{2+} 的螯合率

Fig. 9 Chelating rate to Fe^{2+} of polysaccharide

的浓度范围内,多糖的螯合率低于 $1/10$ 相同浓度 EDTA 的螯合率;多糖和 EDTA 对的 Fe^{2+} 的螯合率 EC₅₀ 分别为 $160.83\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $3.41\ \mu\text{g}/\text{mL}$,得出多糖对 Fe^{2+} 的螯合力是 EDTA 的 2.12% 。

3 结论

本试验在参考前人研究基础上选用热水法提取石豆兰多糖,采用单因素结合正交试验设计,四个因素对多糖的提取率的影响依次为提取时间 > 提取温度 > 醇沉浓度 > 液料比,正交试验优化出的最佳工艺为 A₁B₂C₂D₃,即液料比为 50:1 (mL/g),提物温度为 90 ℃,提取时间为 6 h,醇沉浓度为 95%,此工艺下,多糖的提取量为 79.060 mg/g, RSD 值为 0.132%。

石豆兰多糖具有一定的抗氧化能力,总还原力为 L-抗坏血酸的 3.46% ;清除 DPPH 自由基的能力较弱,清除羟基自由基和超氧阴离子的能力相对较强,清除能力分别是 L-抗坏血酸的 0.68% 、 47.17% 和 29.00% ;对 Fe^{2+} 的螯合能力是 EDTA 的 2.12% 。

参考文献

- 1 Yi QF, Xing FW, Huang XX, et al. Medicinal plants of *Bulbophyllum* species in China [J]. J Trop & Subtrop Bot (热带亚热带植物学报), 2005, 13(1): 65-69.
- 2 Ma L, Zhai JW, Chen SP, et al. *Bulbophyllum pteroglossum* Schltr. a newly recorded species of *Orchidaceae* from Tibet [J]. J Fujian Agric For Univ: Nat Sci (福建农林大学学报: 自科版), 2017, 46: 402-403.
- 3 Wang XL, Wang CW, Li JW, et al. *Bulbophyllum hirtum* (Sm) Lindl ex Wall — a newly recorded species of *Orchidaceae* in Tibet [J]. For Inven Plan (林业调查规划), 2018, 45(3): 80-82.
- 4 Wu B, Wu DK, Chen JB. *In vitro* anti-tumor experiment on extraction of differnt parts of *Bulbophyllum kwangtungense* [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med (南京中医药大学学报), 2004, 20: 114-115.
- 5 Liu L, Xiao FH. Research progress of polysaccharides from *dendrobium* medicinal plants [J]. Res Pract Chin Med (现代中药研究与实践), 2009, 23(1): 77-80.
- 6 Cui SW, Luo SQ, Zhou JQ, et al. Research advances on *Dendrobium huoshanense* polysaccharide [J]. Food Res & Dev (食品研究与开发), 2018, 39: 207-213.
- 7 Shang J. Progress on extraction of polysaccharide from *Bletilla striata* and its application in food [J]. Mod Food (现代食品), 2018, 1: 124-127.
- 8 Xiao XH, Lin CX, Wu XL, et al. Research advance on chemical constituents and biological activities of *Anoectochilus roxburghii* [J]. Mod Food Sci Tec (现代食品科技), 2018, 34: 267-275.
- 9 Yang HH, Weng HM, Guang YG, et al. Study on extraction and purification of polysaccharides from *Pholidota chinensis* Lindl [J]. Food Sci (食品科学), 2009, 30: 130-133.
- 10 Wang Q, Xiao Y, Zhang RZ, et al. Research progress on extraction, separation, purification and bioactivity of polysaccharides in *Gastrodia elata* Bl. [J]. J Tongren Univ (铜仁学院学报), 2017, 6: 19-24.
- 11 Liu RL, Ma DX, Yu YF. A study on the relationship between the *Bulbophyllum kwangtunense* microscopic structure features and its resistibility to dry eco-habitat [J]. J Hebei Normal Univ: Nat Sci (河北师范大学学报: 自科版), 2008, 32: 817-820.
- 12 Wu B. Studies on the chemical constituents of the plant *Bulbophyllum kwangtungense* [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine (南京中医药大学), 2004.
- 13 Chen YG, Xu JJ, Gao F, Chen YP. Advance on the chemical and pharmacological studies on plants of *Bulbophyllum* genus [J]. J Wuhan Bot Res (武汉植物学研究), 2005, 23: 601-602.
- 14 Zhao HR, Wang YZ, Xu RL, et al. Extraction of polysaccharide and content determination of Yunnan Orchidaceae plants [J]. J Dali Univ (大理大学学报), 2016, 1(4): 26-28.
- 15 Apati P, Szentmihalyi K, Kristo ST, et al. Herbal remedies of solidago-correlation of phytochemical characteristics and antioxidant properties [J]. J Pharm and Bio Anal, 2003, 32: 1045-1053.
- 16 Hatano T, Kagawa H, Yasuhara AT, et al. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and scavenging effects [J]. Chem and Phar Bull, 1988, 36: 2090-2097.