

白及须根多酚提取工艺优化及其抗氧化、酪氨酸酶抑制活性研究

陈向阳¹, 宋武¹, 檀小菲¹, 王婷婷¹, 耿玉闯¹, 王卫东², 康清俊³, 吴永祥^{1*}

¹黄山学院 生命与环境科学学院, 黄山 245041; ² 黄山峰源生物科技有限公司, 黄山 245600;

³ 黄山荷琇生物科技有限公司, 黄山 245000

摘要:通过响应面法优化白及须根多酚(polyphenols from fibrous roots of *Bletilla striata*, BRP)的提取工艺,并评价BRP的体外抗氧化、酪氨酸酶抑制活性。以多酚含量为响应值,采用绿色溶剂甘油联合高剪切分散乳化技术(high-shear mixing emulsification technique, HSME)提取BRP,在单因素实验的基础上,采用响应面分析法优化提取工艺参数。以ABTS与DPPH自由基清除能力、还原能力和抑制酪氨酸酶作用为评价指标,研究BRP体外抗氧化、酪氨酸酶抑制活性。结果显示,在剪切时间150 s,料液比1:50(g/mL)的条件下,当甘油浓度为53%,pH为4,剪切转速为16200 rpm,剪切温度为44℃时,BRP提取量最高,为19.02 mg/g。BRP具有良好的DPPH/ABTS自由基清除能力和还原能力,其抗氧化活性与浓度呈显著正相关($P < 0.05$)。BRP和Vc均能显著抑制酪氨酸酶活性,其酪氨酸酶的半抑制浓度(half-inhibition concentration, IC_{50})值分别为0.124和0.287 mg/mL。本研究为白及须根的合理开发利用提供了理论基础。

关键词:白及须根;多酚;抗氧化;高剪切分散乳化技术;酪氨酸酶

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)7-1134-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.7.007

Optimization of extraction process of polyphenols from fibrous roots of *Bletilla striata* and study on its antioxidant and tyrosinase inhibitory activities

CHEN Xiang-yang¹, SONG Wu¹, TAN Xiao-fei¹, WANG Ting-ting¹,
GENG Yu-chuang¹, WANG Wei-dong², KANG Qing-jun³, WU Yong-xiang^{1*}

¹College of Life and Environment Science, Huangshan University, Huangshan 245041, China;

²Huangshan Fengyuan Biological Science and Technology Co., Ltd., Huangshan 245600, China;

³Huangshan Hexiu Biological Science and Technology Co., Ltd., Huangshan 245000, China

Abstract: This study was conducted to optimize the extraction process of polyphenols from fibrous roots of *Bletilla striata* (BRP) by response surface methodology and investigate its antioxidant and tyrosinase inhibitory activities *in vitro*. The method of high-shear mixing emulsification technique (HSME) combined with the green solvent glycerol was used, and on the basis of single-factor test, the extraction process of BRP was optimized by response surface analysis. The antioxidant activity of BRP was examined by reducing power, DPPH and ABTS free radical scavenging assays. Additionally, the tyrosinase inhibitory activity of BRP was explored. The results showed that the optimal process conditions were as follows, shear time of 150 s, solid-liquid ratio of 1:50 g/mL, glycerol concentration of 53%, pH value of 4, shear speed of 16200 rpm and temperature of 44℃. Under these conditions, the content of BRP was 19.12 mg/g. BRP exhibited strong reducing power, DPPH and ABTS free radicals scavenging abilities, and the antioxidant activity demonstrated significant correlations with the content of BRP ($P < 0.05$). Both BRP and Vc exerted potent tyrosinase inhibitory capacities with the IC_{50} values of 0.124 and 0.287 mg/mL, respectively. This research can provide a theoretical basis for the rational development and comprehensive utilization of fibrous

收稿日期:2019-01-17 接受日期:2020-05-28

基金项目:安徽省高校优秀拔尖人才培养项目(gxgnfx2019037);安徽省校企合作实践教育基地项目(2019-sjjd54);国家级大学生创新创业项目(201810375054)

* 通信作者 Tel 86-559-2546552; E-mail: wyx2009sun@aliyun.com

roots of *Bletilla striata*.

Key words: fibrous roots of *Bletilla striata*; polyphenols; antioxidant; high-shear mixing emulsification technique; tyrosinase

白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. P. E 是兰科 (Orchidaceae) 白及属植物, 为传统珍贵中药材, 主产于云南、贵州、安徽、四川、湖北、河南、浙江等地。白及药用历史悠久, 具有抗氧化、抗炎症、抗肿瘤和创伤治愈等作用, 可用于治疗咯血、外伤出血、疮疡肿毒、皮肤皲裂等症状^[1-3]。本课题组前期研究表明^[4,5], 白及块茎的不同极性萃取物具有显著的抗氧化、抑菌和 α -淀粉酶抑制作用, 采用 GC-MS 进行化学成分分析, 揭示白及发挥作用的物质基础是其多酚类物质。白及的块茎是作为传统的药用部位, 在实际的采挖过程中, 白及的须根被刨除而弃之不用, 然而白及须根与块茎的比例高达 1:4 ~ 1:3, 资源被大量浪费^[6]。据统计, 2017 年全国白及种植面积为 2 600 km², 白及总产量约 3 500 t, 白及须根副产物高达了 1 000 t^[7]。研究发现^[8-10], 白及块茎及其须根富含结构相同或相似的化学物质, 其中有些活性成分如多酚、多糖等在须根中的含量远高于块茎, 甚至某些联菲类成分仅存在于须根中, 具有优于块茎的抑菌、抗菌、抗肿瘤等药理作用。

酪氨酸酶 (tyrosinase) 是一种结构复杂的含二价铜离子的金属酶, 广泛存在动植物、微生物以及人体, 与果蔬酶促褐变和人体皮肤黑色素的形成密切相关^[11]。酪氨酸酶抑制剂能够用于化妆品、医药和食品工业等领域。甘油具有低毒性、低成本和无需去除溶剂等优点, 相比于甲醇、丙酮和乙醇等有机提取溶剂, 被视为绿色溶剂, 已被应用于植物中木质素、黄酮类和多酚类化合物的提取^[12]。目前, 国内外学者对白及须根的研究都是基于化学成分鉴定及功效评价, 对白及须根多酚提取工艺优化的研究仍然缺乏, 白及须根多酚的抗氧化、酪氨酸酶抑制作用研究尚未见报道。为合理开发与利用白及须根资源, 本研究采用甘油为提取溶剂, 联合高剪切分散乳化技术, 在单因素实验的基础上, 采用 Box-Behnken 设计方法对 BRP 提取量的二次回归模型进行分析, 采用响应面设计实验对 BRP 提取工艺进行优化, 确定 BRP 的最佳的提取条件, 并探讨 BRP 的体外抗氧化、酪氨酸酶抑制效果。

1 材料与仪器

1.1 实验材料

白及须根, 由黄山峰源生物科技有限公司提供,

2018 年 5 月于安徽省祁门县采集; 甘油 (丰益油脂化学 (上海) 有限公司); 酪氨酸酶 (tyrosinase, 50 000 units)、左旋多巴、丹宁酸 (tannic acid, TA)、维生素 C (Vc) (Sigma-Aldrich 公司); 福林酚试剂、DPPH、ABTS (生工生物工程 (上海) 股份有限公司)。

1.2 仪器

FE28-standard 型精密 pH 计 (梅特勒-托利多国际贸易 (上海) 有限公司); AR124CN 型电子天平 (奥豪斯仪器 (常州) 有限公司); A25 型高剪切分散乳化机 (上海弗鲁克流体机械制造有限公司); SpectraMax-190 型全波长酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); EV341 型旋转蒸发仪 (北京莱伯泰科仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 高剪切分散乳化技术辅助甘油提取白及须根多酚

将白及须根洗净、晾干, 置于 55 °C 烘箱中干燥至恒重, 用高速粉碎机进行破碎, 过 80 目筛, 得到白及须根粉末。取白及须根粉末 0.5 g, 按照料液比 1:40 g/mL 加入用蒸馏水稀释成体积分数为 40% 的甘油, 用 1 mol/L 的盐酸溶液调节 pH 为 5、温度为 50 °C, 以 16 200 rpm 的转速剪切, 时间设定为 150 s 进行提取, 过滤后即得白及须根多酚提取液。

2.2 多酚含量测定

参考文献^[4], 采用 Folin-Ciocalteu 法测定白及须根中的多酚含量。以吸光值 Y 为纵坐标, TA 浓度 X 为横坐标, 绘制标准曲线, 得到回归方程 $Y = 0.0013X + 0.011$ ($R^2 = 0.9931$)。根据下列公式计算白及须根中的多酚含量:

$$\text{多酚含量 (mg/g)} = \frac{c \times N \times V}{m} \quad (1)$$

式中, c : 表示不同提取条件下待测液中多酚浓度, mg/mL; N : 表示提取液到待测液的稀释倍数; V : 表示提取液的体积, mL; m : 表示白及须根的质量, 为 0.5 g。

2.3 单因素实验

2.3.1 甘油浓度对 BRP 提取量的影响

固定料液比为 1:40 (g/mL)、pH 为 5、剪切时间为 150 s、剪切转速为 16 200 rpm、剪切温度为 50 °C, 考察不同甘油体积分数 (0、10%、20%、30%、

40%、50%、60%、70%)对BRP提取量的影响。

2.3.2 pH对BRP提取量的影响

固定甘油浓度为40%、料液比为1:40(g/mL)、剪切时间为150 s、剪切转速为16 200 rpm、剪切温度为50 ℃,考察不同pH值(3、4、5、6、7)对BRP提取量的影响。

2.3.3 剪切转速对BRP提取量的影响

固定甘油浓度为40%、料液比为1:40(g/mL)、pH为5、剪切时间为150 s、剪切温度为50 ℃,考察不同剪切转速(10 600、13 400、16 200、19 000、21 800 rpm)对BRP提取量的影响。

2.3.4 剪切时间对BRP提取量的影响

固定甘油浓度为40%、料液比为1:40(g/mL)、pH为5、剪切转速为16 200 rpm、剪切温度为50 ℃,考察不同剪切时间(90、120、150、180、210 s)对BRP提取量的影响。

2.3.5 剪切温度对BRP提取量的影响

固定甘油浓度为40%、料液比为1:40(g/mL)、pH为5、剪切转速为16 200 rpm、剪切时间为150 s,考察不同剪切温度(30、40、50、60、70 ℃)对BRP提取量的影响。

2.3.6 料液比对BRP提取量的影响

固定甘油浓度为40%、pH为5、剪切转速为16 200 rpm、剪切时间为150 s、剪切温度为50 ℃,考察不同料液比(1:20、1:30、1:40、1:50、1:60 g/mL)对BRP提取量的影响。

2.4 响应面实验设计

根据Box-Behnken实验设计原理,以甘油浓度(A)、pH(B)、剪切转速(C)、剪切温度(D)四个显著影响因素作为变量,采用四因素三水平进行响应面实验设计,从而对提取工艺条件进行优化。实验设计与因素水平见表1。

表1 Box-Behnken 实验设计

Table 1 Experimental design of Box-Behnken

水平 Level	因素 Factor			
	A 甘油浓度 Glycerol concentration (%)	B pH	C 剪切转速 Shear speed(rpm)	D 剪切温度 Shear temperature (℃)
-1	40	3	13 400	30
0	50	4	16 200	40
1	60	5	19 000	50

2.5 抗氧化活性的评价

ABTS 自由基清除能力的测定参考文献^[13];DP-PH 自由基清除能力的测定参考文献^[14];还原能力的测定参考文献^[13]。以V_c为阳性对照。

2.6 酪氨酸酶抑制作用的测定

根据Lee等^[15]的测定方法稍加改进,具体如下:向96孔板中依次加入50 μL 70 mM磷酸缓冲液(pH=6.8)、80 μL 10 mM的左旋多巴与50 μL不同浓度的BRP(0.012 5、0.025、0.05、0.1、0.2 mg/mL),混匀后于37 ℃恒温反应5 min。然后加入20 μL 125 unit/mL的酪氨酸酶溶液,37 ℃恒温反应15 min,在酶标仪中于475 nm波长处测定样品组吸光度值。以V_c水溶液为阳性对照,并按照下列公式计算酪氨酸酶抑制率:

$$I = \left(1 - \frac{A_S - A_{SB}}{A_C - A_{CB}}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中,I:表示酪氨酸酶抑制率;A_S:表示样品组吸光度值;A_{SB}:表示样品对照组吸光度值;A_C:表示空

白组吸光度值;A_{CB}:表示空白对照组吸光度值。

2.7 数据的统计学分析

所得数据以平均值±标准差表示。采用Design-Expert 8.0.6软件进行响应面分析。采用Duncan's多重比较法分析结果的差异显著性(P<0.05)。

3 结果与分析

3.1 单因素实验结果

3.1.1 甘油浓度对BRP提取量的影响

由图1所示,BRP提取量随着甘油浓度的增加呈先增加后减少的趋势,当甘油浓度达到50%时,BRP提取量达到最大,为15.85±0.42 mg/g,与未添加甘油组(10.15±0.17 mg/g)相比,多酚提取量增加了56.19%,存在着显著性差异(P<0.05)。这是因为甘油溶液的极性随甘油浓度的变化而变化,导致酚类化合物的溶解度不同,使得多酚提取量发生变化^[12]。当甘油浓度过高时可能由于粘度过大影响多酚的提取,从而导致多酚提取量的降低。因

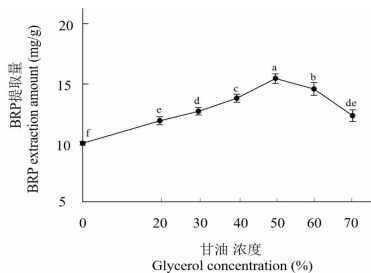


图1 甘油浓度对 BRP 提取量的影响

Fig. 1 Effect of glycerol concentration on the extraction amount of BRP

此,选取甘油浓度 40% ~ 60% 作为响应面实验参考因素。

3.1.2 pH 对 BRP 提取量的影响

由图 2 所示,pH 值在 3 ~ 4 范围时,BRP 提取量与 pH 呈现出正相关,当 pH 为 4 时,BRP 提取量达到最大值,为 16.18 ± 0.14 mg/g,存在着显著性差异 ($P < 0.05$)。当 pH 值大于 4 时,BRP 提取量与 pH 呈现出负相关。这可能由于白及须根多酚富含酚羟基,在较低酸性条件下,多酚性质较为稳定;当 pH 过大时,破坏了多酚的结构,从而导致多酚提取量的降低^[16]。因此,选用 pH 值 3 ~ 5 作为响应面参考因素。

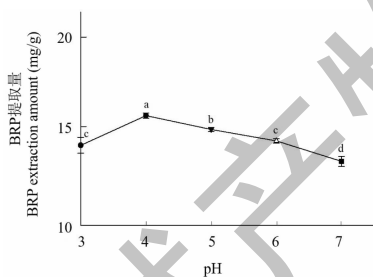


图2 pH 对 BRP 提取量的影响

Fig. 2 Effect of pH on the extraction amount of BRP

3.1.3 剪切转速对 BRP 提取量的影响

由图 3 所示,当剪切转速在 10 600 ~ 16 200 rpm 时,BRP 提取量持续增加,在剪切转速为 16 200 rpm 时,BRP 提取量达到最大值,为 15.72 ± 0.27 mg/g,存在着显著性差异 ($P < 0.05$)。当剪切转速超过 16 200 rpm 时,BRP 提取量不断下降。这可能由于剪切力过大,破坏了多酚类物质(如黄酮母核)的结构,从而影响了 BRP 的得率^[17]。因此,选用剪切转速 13 400 ~ 19 000 rpm 作为响应面参考因素。

3.1.4 剪切时间对 BRP 提取量的影响

由图 4 所示,剪切时间在 90 ~ 150 s 时,增加

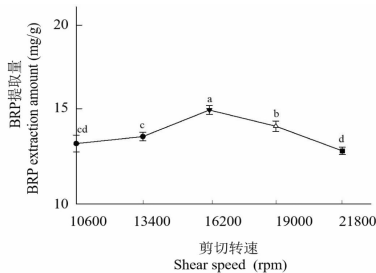


图3 剪切转速对 BRP 提取量的影响

Fig. 3 Effect of shear speed on the extraction amount of BRP

趋势较明显,在 150 s 时,BRP 的提取量达到最大,为 15.73 ± 0.23 mg/g,存在着显著性差异 ($P < 0.05$)。在 150 ~ 210 s 时,变化趋势平缓。这是因为高转速剪切使白及须根细胞壁被有效地破坏,让活性成分可以充分溶于溶液中,从而 BRP 的提取量得到增加^[17]。因此,选用 150 s 作为后续实验的固定条件,但不作为响应面实验考察因素。

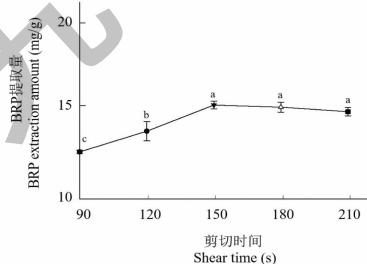


图4 剪切时间对 BRP 提取量的影响

Fig. 4 Effect of shear time on the extraction amount of BRP

3.1.5 剪切温度对 BRP 提取量的影响

由图 5 所示,温度在 30 ~ 40 °C 时,伴随温度的升高 BRP 提取量迅速增加,当温度达到 40 °C 时,BRP 提取量达到最大值,为 16.22 ± 0.19 mg/g,存在着显著性差异 ($P < 0.05$)。当温度继续上升,BRP 提取量转而呈下降趋势,这与多酚类物质的热稳定性相关,高温条件下,多酚类成分会发生降解,导致

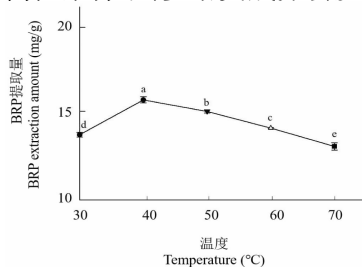


图5 剪切温度对 BRP 提取量的影响

Fig. 5 Effect of shear temperature on the extraction amount of BRP

多酚的含量的降低^[18]。因此,选用温度 30 ~ 50 °C 作为响应面参考因素。

3.1.6 料液比对 BRP 提取量的影响

由图 6 所示,料液比在 1:20 ~ 1:50 g/mL 时,伴随料液比的升高,BRP 提取量快速增加;当料液比继续增加,BRP 提取量增加不明显,料液比为 1:60

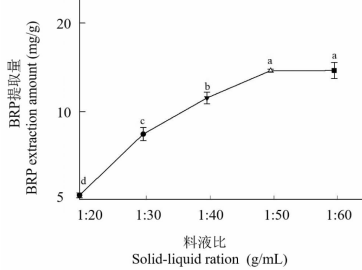


图 6 料液比对 BRP 提取量的影响

Fig. 6 Effect of solid-liquid ration on the extraction amount of BRP

g/mL 时,BRP 提取量达到最大,为 15.97 ± 0.68 mg/g。这是因为增加料液比,可以使样品与溶剂充分接触,促进更多活性物质溶于溶液中,有助于多酚提取率的提高^[19],当料液比在 1:50 g/mL 时,已达到平衡,在继续增加料液比对多酚的提取量影响可以忽略不计。因此,可以选用 1:50 g/mL 作为后续实验的固定条件,但不作为响应面实验考察因素。

3.2 响应面实验结果

3.2.1 Box-Behnken 实验设计与结果分析

单因素实验结果表明,提取条件为甘油浓度占 50%、pH 值为 4、剪切转速为 16 200 rpm、剪切时间为 150 s、剪切温度为 40 °C、料液比为 1:50 g/mL 时,白及须根多酚的提取量均达到最大。固定剪切时间 150 s、料液比 1:50 g/mL 的条件下,以白及须根多酚提取量为响应值(Y),响应面分析方案与结果见表 2。

表 2 多酚提取的响应面实验结果

Table 2 The results of polyphenols by response surface methodology

实验号 No.	A (%)	B	C (rpm)	D (°C)	Y (mg/g)
1	50	4	13 400	30	16.26
2	50	4	16 200	40	18.91
3	50	5	16 200	50	18.62
4	50	4	19 000	30	17.23
5	50	3	19 000	40	17.99
6	60	5	16 200	40	18.04
7	50	4	16 200	40	18.64
8	50	5	19 000	40	17.26
9	60	4	19 000	40	18.10
10	50	3	13 400	40	17.01
11	40	4	13 400	40	15.68
12	40	4	16 200	30	16.56
13	50	5	16 200	30	17.52
14	40	5	16 200	40	17.69
15	40	4	19 000	40	17.94
16	50	4	19 000	50	18.63
17	50	3	16 200	50	18.22
18	50	5	13 400	40	18.65
19	60	4	16 200	50	18.32
20	50	4	16 200	40	19.73
21	50	4	16 200	40	19.28
22	50	3	16 200	30	16.74

续表 2(Continued Tab. 2)

实验号 No.	A(%)	B	C(rpm)	D(°C)	Y(mg/g)
23	60	4	16 200	30	17.59
24	60	4	13 400	40	18.42
25	40	4	16 200	50	18.34
26	50	4	16 200	40	18.72
27	60	3	16 200	40	18.48
28	50	4	13 400	50	17.59
29	40	3	16 200	40	15.81

3.2.2 回归方程的建立与显著性检验

以白及须根多酚提取量为响应值(Y),得到多酚提取量对各影响因素的二次多项式回归模型为:
 $Y = 19.06 + 0.58A + 0.29B + 0.30C + 0.65D - 0.58AB - 0.65AC - 0.26AD - 0.59BC - 0.095BD + 0.018CD - 0.77A^2 - 0.64B^2 - 0.80C^2 - 0.69D^2$ 。

经统计学分析可知,该实验选用的模型极显著($P < 0.01$),变异系数 $CV = 2.46\% < 5\%$,说明模型实验预测性高、稳定性好。方差的失拟项不显著(P

$= 0.5795 > 0.05$),表明模型选择合适。因此,实验真实点对结果的分析可用回归方差进行代替。

据表 3 显示,在此实验设计中,一次项 A、B、C 和 D 对 BRP 提取量的影响均达到显著水平($P < 0.05$)。从显著性检验 P 值的大小可以得到各因素对 BRP 提取量影响的顺序为温度(D) > 甘油浓度(A) > 剪切转速(C) > pH(B)。由图 7 可知,甘油浓度和 pH、甘油浓度和剪切转速、pH 和剪切转速的交互作用对 BRP 提取量影响是显著的。

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) regression model

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F	P
模型 Model	24.66	14	1.76	9.11	< 0.000 1 **
A	4.00	1	4.00	20.70	0.000 5 **
B	1.04	1	1.04	5.37	0.036 1 *
C	1.04	1	1.04	5.40	0.035 7 *
D	5.10	1	5.10	26.36	0.000 2 **
AB	1.35	1	1.35	6.96	0.019 5 *
AC	1.66	1	1.66	8.61	0.010 9 *
AD	0.28	1	0.28	1.43	0.252 3
BC	1.40	1	1.40	7.26	0.017 4 *
BD	0.036	1	0.036	0.19	0.672 3
CD	0.001 2	1	0.001 2	0.006	0.937 7
A ²	3.83	1	3.83	19.83	0.000 5 **
B ²	2.63	1	2.63	13.58	0.002 4 **
C ²	4.10	1	4.10	21.21	0.000 4 **
D ²	3.07	1	3.07	15.86	0.001 4 **
残差 Residual	2.71	14	0.19		
失拟项 Lack of fit	1.90	10	0.19	0.93	0.579 5
纯误差 Pure error	0.81	4	0.20		

注: * 表示差异显著($P < 0.05$); ** 表示差异极显著($P < 0.01$)。

Note: * Significant difference at 0.05 level; ** Very significant difference at 0.01 level.

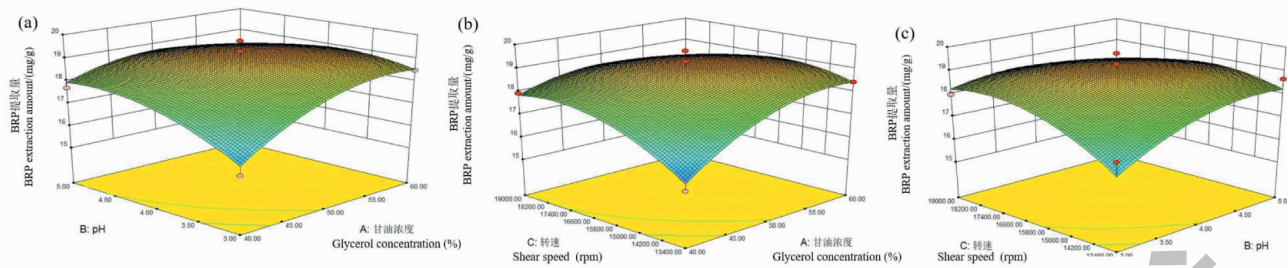


图7 因素交互作用对 BRP 提取量的影响

Fig. 7 Interaction effects of factors on the extraction amount of BRP

3.2.3 最佳工艺条件及验证实验

通过回归模型求解方程,得到最佳的提取条件为:甘油浓度为52.55%,pH为4.05,剪切转速为16387.88 rpm,剪切温度为44.22℃时,预测BRP提取量为19.28 mg/g。但考虑到实际操作的局限性,将提取条件调整为:甘油浓度为53%、pH为4、剪切转速为16200 rpm、剪切温度为44℃。根据此条件进行验证性实验,得到BRP的提取量为 19.02 ± 0.33 mg/g,与预测值19.28 mg/g的相对误差为1.35%,表明此响应面法得到的回归模型具有较好的可靠性。

3.3 BRP 抗氧化活性

3.3.1 BRP 对 ABTS 自由基的清除能力

如表4所示,BRP对ABTS自由基有较强的清除作用,随着BRP质量浓度的增加,BRP对ABTS自由基的清除率逐渐增强,在0.2 mg/mL时,其ABTS自由基清除率时可达到94.39%。BRP和Vc对ABTS自由基清除作用的 IC_{50} 值(指清除率为50%时,所需要样品的有效质量浓度)分别为0.013和0.016 mg/mL,表明白及须根多酚的ABTS自由基清除能力与Vc相当。

表4 BRP 对 ABTS 自由基的清除作用

Table 4 ABTS radical scavenging ability of BRP

样品 Sample	浓度 Concentration (mg/mL)	清除率 Scavenging ability (%)	线性回归方程 Linear regression equation	IC_{50} (mg/mL)
BRP	0.012 5	45.24 ± 1.49^e	$Y = 998.73X + 36.975$	0.013
	0.025	68.27 ± 1.72^d		
	0.05	84.80 ± 0.51^c		
	0.1	89.99 ± 1.36^b		
	0.2	94.39 ± 0.85^a		
Vc	—	—	$Y = 2478.9X + 9.8697$	0.016

注:同列不同字母表示在统计学上具有显著差异($P < 0.05$),下同。

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

3.3.2 BRP 对 DPPH 自由基的清除能力

如表5所示,BRP对DPPH自由基具有较好的清除作用,在0.0125~0.2 mg/mL浓度内,BRP对DPPH自由基的抑制率分别为28.88%、30.62%、51.58%、72.35%、88.86%,即随BRP质量浓度的增加,DPPH自由基清除率随之增强。BRP和Vc的DPPH自由基清除作用的 IC_{50} 值分别为0.064、0.052 mg/mL。结果表明,白及须根多酚对DPPH自由基清除能力的变化规律与对ABTS自由基清除能力的变化规律一致,说明白及须根的抗氧化能力主要来自于多酚类物质。

3.3.3 BRP 的还原能力

测定白及须根多酚对 Fe^{3+} 的还原力,实际上是对样品的供电子能力进行检验,吸光值越大,表明还原能力越强。如表6所示,BRP具有较好的还原能力,在0.0125~0.2 mg/mL内,BRP的还原能力与浓度有明显的依赖性。BRP和Vc的 IC_{50} 值(指OD值达到0.5时,所需要样品的有效质量浓度)分别为0.166、0.043 mg/mL。

3.4 BRP 对酪氨酸酶的抑制活性

如表7所示,BRP对酪氨酸酶具有显著的抑制活性,在0.0125~0.2000 mg/mL浓度内,BRP对

表 5 BRP 对 DPPH 自由基的清除作用
Table 5 DPPH radical scavenging ability of BRP

样品 Sample	浓度 Concentration (mg/mL)	清除率 Scavenging ability (%)	线性回归方程 Linear regression equation	IC ₅₀ (mg/mL)
BRP	0.012 5	28.88 ± 1.63 ^d	Y = 326.35X + 28.966	0.064
	0.025	30.62 ± 1.81 ^d		
	0.05	51.58 ± 0.85 ^c		
	0.1	71.35 ± 0.96 ^b		
	0.2	88.86 ± 1.83 ^a		
Vc	-	-	Y = 435.6X + 27.561	0.052

表 6 BRP 的还原能力
Table 6 Reducing power of BRP

样品 Sample	浓度 Concentration (mg/mL)	吸光值 Absorbance (700 nm)	线性回归方程 Linear regression equation	IC ₅₀ (mg/mL)
BRP	0.012 5	0.07 ± 0.01 ^c	Y = 2.199 2X + 0.135 5	0.166
	0.025	0.14 ± 0.02 ^d		
	0.05	0.35 ± 0.01 ^e		
	0.1	0.45 ± 0.02 ^b		
	0.2	0.51 ± 0.01 ^a		
Vc	-	-	Y = 9.854 2X + 0.071 5	0.043

酪氨酸酶的抑制率分别为 2.44%、14.52%、32.05%、49.63%、70.82%。BRP 和 Vc 的酪氨酸酶抑制能力与其质量浓度呈显著正相关;BRP 质量浓度(X)与酪氨酸酶抑制能力(Y)间的回归方程为 $Y = 343.65X + 7.2583$,阳性对照 Vc 质量浓度(X)与酪氨酸酶抑制能力(Y)间的回归方程为 $Y = 151.16X +$

6.616 3。BRP 和 Vc 的酪氨酸酶抑制作用 IC₅₀ 值分别为 0.124、0.287 mg/mL。由此可见,白及须根多酚的酪氨酸酶抑制活性优于阳性对照 Vc。研究显示^[20],多酚类物质能够有效抑制酪氨酸酶活性,具有良好的美白作用效果。

表 7 BRP 对酪氨酸酶的抑制作用
Table 7 Tyrosinase inhibitory activity of BRP

样品 Sample	浓度 Concentration (mg/mL)	抑制率 Inhibition ability (%)	线性回归方程 Linear regression equation	IC ₅₀ (mg/mL)
BRP	0.012 5	2.44 ± 1.00 ^c	Y = 343.65X + 7.258 3	0.124
	0.025	14.52 ± 1.08 ^d		
	0.05	32.05 ± 0.50 ^c		
	0.1	49.63 ± 1.27 ^b		
	0.2	70.82 ± 0.94 ^a		
Vc	-	-	Y = 151.16X + 6.616 3	0.287

4 结论

采用绿色溶剂甘油联合高剪切分散乳化技术提取白及须根多酚,并通过响应面分析法优化 BRP 提

取工艺,得到最佳工艺条件为:甘油浓度为 53%、pH 为 4、剪切转速为 16 200 rpm、剪切温度为 44 ℃,在此条件下预测提取量为 19.28 mg/g,实际提取量为

19.02 mg/g, 理论值与实际值相符, 结果可行。因此, 白及须根多酚的提取制备可用此模型, 该模型也为将来白及须根废弃物资源的开发与利用提供参考依据, 具有一定的应用价值。

体外生物活性实验结果表明, BRP 具有良好的 ABTS、DPPH 自由基清除能力和还原能力, 其抗氧化活性与浓度呈显著正相关。BRP 能显著抑制酪氨酸酶活性, 且抑制效果优于阳性对照 Vc。本研究结果揭示了多酚类物质是白及须根发挥抗氧化、酪氨酸酶抑制作用的物质基础, 表明白及须根多酚在深度开发成美白功能性化妆品领域具有较好的潜力。

参考文献

- 1 He X, Fang J, Wang X, et al. *Bletilla striata*: medicinal uses, phytochemistry and pharmacological activities [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 195:20-38.
- 2 Wang W, Meng H. Cytotoxic, anti-inflammatory and hemostatic spirostane-steroidal saponins from the ethanol extract of the roots of *Bletilla striata* [J]. *Fitoterapia*, 2015, 101:12-18.
- 3 Wang Y, Han S, Li R, et al. Structural characterization and immunological activity of polysaccharides from the tuber of *Bletilla striata* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 122:628-635.
- 4 Hu CY, Wu YX, Wu LP, et al. Antioxidant and α -amylase inhibitory effects of bioactive components of *Bletilla striata* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30:915-922.
- 5 Wu YX, Cheng MH, Jiang HT, et al. Antibacterial activity of fractions and chemical constituents analysis of dichloromethane fraction from *Bletilla striata* [J]. *Food Mach* (食品与机械), 2017, 33(12):76-79.
- 6 Jiang RB, Huang JJ, Li HY, et al. Study the effect of alcohol extract of fibrous root part of *Bletilla striata* on apoptosis of lung adenocarcinoma cancer cell line of A549 [J]. *J Yunnan Univ Tradit Chin Med* (云南中医学院学报), 2015, 38(5):12-21.
- 7 Zhang M, Han TT, Hu CF, et al. Industrialization condition and sustainable development strategies of *Bletillae Rhizoma* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2019, 50:5103-5108.
- 8 Yu HS, Dai BL, Qian CD, et al. Antibacterial activity of chemical constituents isolated from fibrous roots of *Bletilla striata* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2016, 39:544-547.
- 9 Zhou YK, Li WP, Tian SS, et al. Determination of total polyphenol content in different parts of *Rhizoma Bletillae striatae* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2012, 18(10):161-164.
- 10 Chen Z, Zhao Y, Zhang M, et al. Structural characterization and antioxidant activity of a new polysaccharide from *Bletilla striata* fibrous roots [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 227:115362-115369.
- 11 Zhang Y, Liu CW, Liu JB, et al. Research on inhibition of tyrosinase activity by 2,4-thiazolidinedione derivatives [J]. *J Shaoyang Univ* (邵阳学院学报), 2019, 16(2):45-51.
- 12 Huang H, Wang ZN, Li L, et al. Optimization of green extraction process and identification of polyphenols variety from rice bran using glycerol/water system [J]. *Trans Chin Soc Agr Eng* (农业工程学报), 2019, 35:305-312.
- 13 Wu YX, Yang Q, Li L, 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.
- 14 Qu Y, Li C, Zhang C, et al. Optimization of infrared-assisted extraction of *Bletilla striata* polysaccharides based on response surface methodology and their antioxidant activities [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 148:345-353.
- 15 Lee GY, Cho BO, Shin JY, et al. Tyrosinase inhibitory components from the seeds of *Cassia tora* [J]. *Arch Pharm Res*, 2018, 41:490-496.
- 16 Yan Z, Zhang HH, Li YQ, et al. Antioxidant properties and stability of polyphenols in lotus seed hull [J]. *J Chin Inst Food Sci Tech* (中国食品学报), 2019, 19(12):89-95.
- 17 Fan ZL, Lin XF, Wang L, et al. High-speed shear treatment for extraction of polyphenol from raspberries via response surface optimization [J]. *J Food Sci Biotech* (食品与生物技术学报), 2014, 33:355-360.
- 18 Jha P, Das AJ, Deka SC. Optimization of ultrasound and microwave assisted extractions of polyphenols from black rice (*Oryza sativa* cv. Poiréton) husk [J]. *J Food Sci Technol*, 2017, 54:3847-3858.
- 19 Xu HB, Li B, Tang ZS, et al. Optimization of extraction of total flavonoids from *Hovenia acerba* and its xanthine oxidase inhibitory activity [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2019, 31:595-600.
- 20 Fan ZL, Li L, Bai XL, et al. Extraction optimization, antioxidant activity, and tyrosinase inhibitory capacity of polyphenols from *Lonicera japonica* [J]. *Food Sci Nutr*, 2019, 7:1786-1794.