

白及花脂溶性成分提取工艺优化 及其生物活性分析

解修超^{1,2}, 刘军生^{1,2}, 罗阳兰^{1,2}, 邓百万^{1,2,*}, 曹乃馨^{1,2}, 贾 娇^{1,2}

(1.陕西理工大学, 陕西省食药菌工程技术研究中心, 陕西汉中 723001;

2.陕西理工大学, 生物科学与工程学院, 陕西汉中 723001)

摘 要:目的:优化白及花中脂溶性成分提取工艺,并初步探究其抑菌、抗肿瘤和抗氧化活性。方法:在单因素实验基础上,运用响应面法优化白及花中脂溶性成分提取工艺,以提高脂溶性成分得率,并通过滤纸片扩散法和 CCK8 法分别研究其抑菌和抗肿瘤活性,通过检测 DPPH 自由基、ABTS 自由基和 OH 自由基的清除率考察其体外抗氧化活性。结果:最佳提取工艺如下:提取时间 2.94 h,提取次数 2 次,料液比为 1:40 时,此条件下脂溶性成分得率的理论值可达到 1.416%,验证试验的平均得率为 $1.401\% \pm 0.112\%$,比优化前提高了 28.49%。生物活性实验表明:白及花脂溶性成分对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)四种致病菌有明显的抑菌效果;经 CCK-8 法测定,脂溶性成分对肺腺癌 A₅₄₉ 细胞的抑制率为 32.115%;而抗氧化实验表明白及花中脂溶性成分对 DPPH 自由基、ABTS 自由基和羟基自由基的 EC₅₀ 分别为 1.63、0.47 和 1.25 mg/mL。结论:优化的提取工艺合理、可行,白及花脂溶性成分生物活性较好,具有潜在的药用价值。

关键词:白及花,脂溶性成分,响应面分析,抗肿瘤活性,抗氧化活性

Optimization of Extraction Process of Liposoluble Components in *Bletilla striata* Flower and Its Biological Activity

XIE Xiu-chao^{1,2}, LIU Jun-sheng^{1,2}, LUO Yang-lan^{1,2}, DENG Bai-wan^{1,2,*}, CAO Nai-xin^{1,2}, JIA Jiao^{1,2}

(1.Shaanxi Provincial Engineering Research Center of Edible & Medicinal Fungi,

Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China;

2.School of Biological Science & Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China)

Abstract: Objective: To optimize the extraction procedure of liposoluble constituents in *Bletilla striata* flower by response surface methodology. And study on its bioactivity such as antibacterial activity, antitumor activity and antioxidant activity. Methods: Response surface methodology was used to design, optimize and verify the extraction procedure of liposoluble constituents in *B. striata* flower on the basis of single-factor experiments, so as to improve the yield of liposoluble component. It was evaluated for antibacterial activity by paper diffusion method, and antitumor activity by CCK8 method, while its antioxidant activity *in vitro* was evaluated by removal ability of DPPH·, ABTS·⁺ and hydroxyl free radicals. Results: The results of optimum extraction condition were as follows: Extraction time 2.94 h, 2 times of extraction, the material-liquid ratio 1:40 g/mL. Under these conditions, the predicted values of the yield of liposoluble components could reach 1.416%, the average yield of the verification test was $1.401\% \pm 0.112\%$, which was 28.49% higher than before. Bioactivity tests showed that: Liposoluble components in *B. striata* flower had significantly inhibitory effect on *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* four kind of pathogenic bacterias, as well as the inhibitory rate of A₅₄₉ cells had raised 32.115% determined by CCK-8 method. It also had inoxidizability and its EC₅₀ was 1.63, 0.47 and 1.25 mg/mL for DPPH free radical, ABTS free radical and hydroxyl radical respectively. Conclusion: The optimized extraction procedure was reasonable and feasible. The liposoluble components in *B. striata* flower had significant biological activity and potential medicinal value.

Key words: *Bletilla striata*; liposoluble components; response surface analysis; antitumor activity; antioxidant activity

中图分类号: TS201.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2019)04-0200-07

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.04.033

收稿日期: 2018-05-03

作者简介: 解修超(1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物资源开发与利用, E-mail: 44557987@qq.com。

* 通讯作者: 邓百万(1978-), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 微生物资源保护与开发利用, E-mail: 2210309868@qq.com。

基金项目: 陕西省科技统筹创新工程计划项目(2016HBGC-07); 秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心自然科学研究项目(QBXT-Z(P)-15-2、QBXT-17-12)。

引文格式:解修超,刘军生,罗阳兰,等.白及花脂溶性成分提取工艺优化及其生物活性分析[J].食品工业科技,2019,40(4):200-206.

白及(*Bletilla striata*),兰科白及属,是多年生草本,主产于贵州、四川、湖南、湖北等省。《日华子本草》中记载,“白及止惊邪、血邪,刀箭疮扑损,温热疟疾,血痢,汤火疮,生肌止痛,风痹”^[1]。研究表明,白及中含有甾类、萜类、多糖、联菲、联苄类以及酯类等上百种活性化合物^[2]。

目前对白及的研究主要集中于其组培技术^[3]、中药配伍与炮制^[4]、块茎中多糖胶的活性和药物开发^[5],而对白及花的研究主要集中于其花青素、多糖、黄酮类等活性物质,而对其脂溶性成分的研究鲜见报道。黄进等^[6]研究了6种不同干燥方法对白及花中花青素、多糖、总黄酮和总酚的含量和抗氧化活性的影响。吕婉婉等^[7]研究了白及花中花青素的含量及其抗氧化活性,为制作白及花饮品奠定了基础。研究发现多种药用植物中脂溶性成分具有抗菌、抗肿瘤、抗氧化和降血糖等生物活性。Liang^[8]研究发现巨大蒲公英根中脂溶性成分具有抑菌和体外抗氧化活性,Wang等^[9]研究发现从无花果脂溶性成分中分离的 β -谷甾醇具有较高的抗肿瘤活性。脂溶性成分作为白及花中一类重要化合物,优化其提取工艺,研究其生物活性对充分开发利用其药用资源有重要意义。

本研究采用索氏提取法对白及花中脂溶性成分进行提取,采用Box-Behnken设计分析对脂溶性成分提取工艺影响较大的三个因素即提取时间、提取次数和料液比进行优化,确定最优方案并验证,拟获得经济、科学的提取条件。采用滤纸片扩散法对脂溶性成分抑菌活性进行研究,采用CCK-8法对脂溶性成分抗肿瘤活性进行研究,并采用DPPH法、ABTS法和Fenton法考察其抗氧化活性,以期通过本研究为白及花的深入研究和综合开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

白及(*Bletilla striata*)花 采自陕西省汉中市汉台区汉王镇(北纬N33°04'10" 东经E107°01'38"),将其晒干后备用;人肺腺癌细胞株A₅₄₉ 中国科学院上海细胞生物研究所;枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*,批号CMCC63501)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,批号ATCC25925)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*,批号ATCC25922)、白色念珠菌(*Candida albicans*,批号CMCC85021) 以上菌株由陕西理工大学陕西省资源生物重点实验室菌种保藏中心提供,-80℃低温冰箱冻存;DPPH(1,1-二苯基-2-苦肼基) Sigma公司;ABTS(2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐) 上海生物工程有限公司;正己烷、石油醚(60~90℃)等 均为国产分析纯。

EYELA N100 O型旋转蒸发仪 上海爱郎仪器有限公司;SW-CJ-1D型单人超净工作台 上海苏净实业有限公司;YXQ-LS-50S型高压灭菌锅 上

海博讯实业有限公司医疗设备厂;超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;UV2550型紫外分光光度计 日本岛津公司。

1.2 实验方法

1.2.1 初始提取条件下白及花脂溶性成分的提取 将白及花在烘箱中40℃恒温干燥48h,干燥至恒重,研磨过40目筛,称取8g(M)白及花粉末,用石油醚80℃索氏提取,初始提取条件为2.5h,连续提取3次,料液比为1:20g/mL,减压回收石油醚,得脂溶性成分样品,烘箱中40℃恒温干燥至恒重后称重,记作m,加入正己烷溶解后配成5mg/mL的白及花脂溶性成分母液(LCBS)备用。利用下列公式计算脂溶性成分得率。

$$\text{脂溶性成分得率}(\%) = m \times 100 / M$$

1.2.2 单因素实验

1.2.2.1 提取时间对脂溶性成分得率的影响 固定反应条件为料液比为1:20g/mL,提取次数为3次,考察不同提取时间(1.5、2.5、3.5、4.5、5.5h)对得率的影响。

1.2.2.2 提取次数对脂溶性成分得率的影响 固定反应条件为料液比为1:20g/mL,提取时间为3.5h,考察不同提取次数(1、2、3、4、5次)对得率的影响。

1.2.2.3 料液比对脂溶性成分得率的影响 固定反应条件为提取时间为3.5h,提取次数为3次,考察不同料液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50g/mL)对得率的影响。

1.2.3 响应面法试验 在单因素实验的基础上,根据Box-Behnken的中心组合试验设计原理^[10],选取提取时间(A)、提取次数(B)、料液比(C)为变量,以脂溶性成分得率为响应值,每个变量按低、中、高3个水平分别以-1、0、+1进行编码^[11]。试验因素及水平见表1。

表1 响应面分析因素和水平

Table 1 Factors and levels of response surface analysis

水平	因素		
	A 提取时间(h)	B 提取次数(次)	C 料液比(g/mL)
-1	2.5	2	1:20
0	3.5	3	1:30
1	4.5	4	1:40

1.2.4 白及花脂溶性成分的抗菌活性研究 采用滤纸片扩散法^[12]研究白及花脂溶性成分对致病菌的抑菌效果,以含20%二甲基亚砜100μL的纸片作为溶剂阴性对照,以含25μg/mL青霉素100μL的纸片作为阳性对照,以0.96%生理盐水100μL的纸片为空白对照。利用交叉法测量抑菌圈直径D,抑菌效果(E)按下列公式计算:

$$E = (D_{\text{样品组}} - D_{\text{阴性对照组}}) / (D_{\text{阳性对照组}} - D_{\text{空白对照组}})$$

1.2.5 白及花脂溶性成分的抗肿瘤活性研究 实验

分成阴性对照组、空白组和给药组,每组设4个复孔^[13];阴性对照组、给药组加入浓度为 5×10^4 cfu/mL人肺腺癌细胞株 A₅₄₉ 细胞悬液于96孔板中,每孔90 μ L细胞悬液;空白组不加细胞加等量培养基;以上各组置于37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中培养24 h。取10 μ L用正己烷配制的1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/mL的LCBS溶液加在各给药组孔板内,对照组孔板内加入正己烷,空白组内加入培养基,于37 $^{\circ}$ C继续培养,分别于24、48、72 h时测定1次^[14]。测定时向每孔加入10 μ L CCK-8试剂和90 μ L无血清培养基,于37 $^{\circ}$ C培养1 h,用酶标仪测定各孔OD₄₅₀值。利用公式计算抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = [1 - (\text{OD}_{\text{给药组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}})] \times 100$$

1.2.6 白及花脂溶性成分的抗氧化活性分析

1.2.6.1 还原能力测定 参考文献[15],稍作修改,用DMSO将白及花样品配成0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL不同浓度的样品溶液,取1 mL样品,加入1 mL pH6.6磷酸缓冲液,1 mL 1%铁氰化钾溶液,混匀后于50 $^{\circ}$ C水浴中反应20 min然后加入1 mL 10%三氯乙酸,混匀后取上清液2 mL,加超纯水2 mL与200 μ L 0.1%三氯化铁,静置10 min后,测定OD₇₀₀,同时将样品替换成1 mL二甲基亚砜作为空白组,将铁氰化钾溶液替换成1 mL去离子水作为对照组,重复3次,取平均值。

1.2.6.2 DPPH自由基清除能力的测定 参考文献[16],稍作修改,用DMSO将白及花样品配制成0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL不同浓度的样品溶液,取2 mL样品溶液加入1 mL 0.2 mmol/L DPPH-99.9%乙醇溶液,混匀,放置在室温暗处10 min后测定517 nm处吸光值,每样重复3次,取平均值,并按下列公式计算DPPH自由基去除率。

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_s - A_{SB}) / (A_c - A_{CB})] \times 100$$

式中: A_s 为2 mL样品液+1 mL DPPH-乙醇溶液的样品吸光值; A_{SB} 为2 mL样品液+1 mL 99.9%乙醇溶液的样品对照组吸光值; A_c 为2 mL二甲基亚砜+1 mL DPPH-99.9%乙醇溶液的空白组吸光值; A_{CB} 为2 mL二甲基亚砜+1 mL 99.9%乙醇溶液的空白对照组吸光值。

1.2.6.3 ABTS自由基清除能力的测定 参考文献[17],稍作修改,将7 mmol/L的ABTS溶液和2.45 mmol/L的过硫酸钾溶液等体积混合,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(约稀释50倍),即OD₇₃₄为 0.7 ± 0.02 。用DMSO将白及花样品配制成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 μ L样品溶入1000 μ L ABTS工作液,振荡混合,放置于暗处5 min后测定OD₇₃₄,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:

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_s - A_{SB}) / (A_c - A_{CB})] \times 100$$

式中: A_s 为1 mL样品液+2 mL ABTS工作液的样品吸光值; A_{SB} 为1 mL样品+2 mL 99.9%乙醇溶液的样品对照组吸收值; A_c 为1 mL二甲基亚砜+2 mL

ABTS工作液的空白组吸光值; A_{CB} 为1 mL二甲基亚砜+2 mL 99.9%乙醇溶液的空白对照组吸光值。

1.2.6.4 羟自由基清除作用 参考文献[18],稍作修改,用DMSO将白及花样品配制成0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL溶液,分别加入9 mmol/L FeSO₄和9 mmol/L水杨酸-乙醇溶液各2 mL,最后加1.2 mmol/L H₂O₂ 2 mL启动反应,于37 $^{\circ}$ C反应30 min,以去离子水调零在波长510 nm测定样品浓度吸光度 A_1 ;另外,去离子水代替H₂O₂重复上述操作,测白及样品本身的吸光值 A_2 ,同时以水代替白及花样品溶液,测定吸光度 A_0 。

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

1.3 数据处理

数据计算和绘图用Origin 8.5软件进行,方差分析和数据变异采用Design-Expert 8.0.6、SPSS 21.0软件进行,比较不同处理间差异采用单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 初始提取条件下白及花脂溶性成分得率

由脂溶性成分得率公式可得,在初始提取条件下,白及花脂溶性成分得率为 $1.102\% \pm 0.105\%$ 。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 提取时间对脂溶性成分得率的影响 由图1可知,白及花脂溶性成分得率随提取时间的增加而增加,提取时间较短时,脂溶性物质无法完全溶解出来,得率较低。当提取时间到3.5 h时脂溶性成分得率迅速增加,得率为1.232%,3.5 h后脂溶性成分得率上升趋势趋于平缓,说明脂溶性物质基本溶解完全,故选取最佳提取时间为3.5 h。

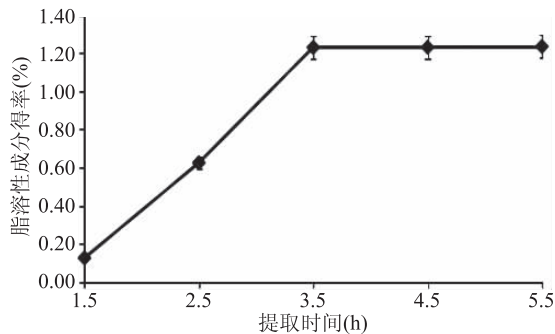


图1 提取时间对白及花脂溶性成分得率的影响

Fig.1 Effect of extract time on the yield of liposoluble constituents of *B.striata* flower

2.2.2 提取次数对脂溶性成分得率的影响 由图2可见,白及花的脂溶性成分得率随次数的增加呈现出逐渐增加的趋势,当提取次数少于3次时,脂溶性成分得率增加较为明显,当提取次数达到第3次时得率为1.458%,第3次提取后的得率已经基本平稳,这可能是脂溶性物质以充分溶解与溶剂中的缘故,继续增加次数也不会增加得率,故提取次数选择最佳为3次。

2.2.3 料液比对脂溶性成分得率的影响 由图3可见,随着溶剂用量的逐渐增大,白及花脂溶性成分得率也随着上升,料液比达到1:30 g/mL后,白及花脂

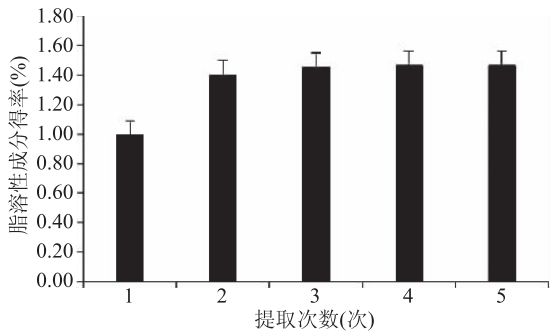


图2 提取次数对白及花脂溶性成分得率的影响

Fig.2 Effect of frequencies on the yield of liposoluble constituents of *B.striata* flower

溶性成分得率上升速度渐趋缓慢。这主要是由于随着溶剂用量增加,传质动力增加,白及花脂溶性成分更容易溶出。但在实际实验过程中,溶剂用量过小时,提取液过少,不利于后续的过滤分离工作;而溶剂用量过大时,会使后续的浓缩工艺耗时长、耗能多。故选取料液比 1:30 g/mL 为宜。

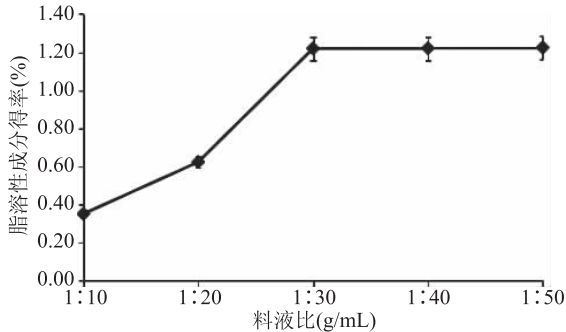


图3 料液比对白及花脂溶性成分得率的影响

Fig.3 Effect of solid-liquid ratio

on the yield of liposoluble constituents of *B.striata* flower

2.3 响应面试验数据分析

2.3.1 试验设计方案及结果 根据单因素实验结果,由 Design-Expert 8.0.6 统计分析软件设计出的实验方案及实验结果如表 2 所示,以脂溶性成分得率为响应值(Y),以提取时间(A)、提取次数(B)、料液比(C)为自变量,建立 3 因素 3 水平中心组合实验设计共包括 15 个实验方案,其中有 3 个中心实验点,用以计算实验误差。

2.3.2 回归方程拟合及方差分析 采用 Design-Expert8.0.6 软件对所得数据进行二次回归分析,分析结果见表 3,对各因素回归拟合后,得到二次回归方程如下:

$$Y = 1.35 + 0.17A + 0.15B - 0.055C + 0.22AB - 0.18AC - 0.052BC - 0.10A^2 - 0.27B^2 - 0.21C^2$$

回归模型的 $R^2 = 0.9859$, $R^2_{Adj} = 0.9750$,由方差分析可知回归方程模型在 $\alpha = 0.01$ 水平上回归显著,失拟项的 $p = 0.4228 > 0.1$,失拟不显著,并且一次项、平方项、交叉项均对响应值有显著性影响,因此模型选择正确。决定系数 $R^2 = 0.9859$,说明模型可以解释 98.59% 的试验所得脂溶性成分得率的变化与提取时间、提取次数、料液比的关系,由此可见,此试验模型

表 2 响应面分析试验方案及结果

Table 2 Response surface analysis design and result data

实验号	A	B	C	Y 得率(%)
1	-1	0	1	0.959 ± 0.065
2	1	0	1	1.005 ± 0.048
3	0	0	0	1.251 ± 0.082
4	1	-1	0	0.742 ± 0.076
5	1	1	0	1.452 ± 0.039
6	0	-1	-1	0.713 ± 0.055
7	-1	-1	0	0.926 ± 0.068
8	0	-1	1	0.698 ± 0.057
9	0	0	0	1.352 ± 0.057
10	0	1	1	0.902 ± 0.055
11	-1	1	0	0.763 ± 0.062
12	0	1	-1	1.125 ± 0.045
13	-1	0	-1	0.695 ± 0.071
14	1	0	-1	1.469 ± 0.043
15	0	0	0	1.401 ± 0.061

是可靠的。另外从 F 值可看出,各因素对脂溶性成分得率的影响顺序: A > B > C,即提取时间 > 提取次数 > 料液比。

2.3.3 响应面图分析 根据回归方程绘制白及花脂溶性成分得率随各因素变化的响应曲面图^[19]。每个响应曲面分别代表着两个独立因素间的相互作用,另一个因素保持在编码水平的 0 水平^[20]。等高线的形状可以反映出各因素间交互作用的强弱,若等高线为鞍型或椭圆形,表示两者交互作用显著;若等高线为圆形,表示两者交互作用不显著。

图 4 结果显示,交互项提取时间和提取次数的等高线为椭圆形说明两者交互作用对白及花脂溶性成分得率影响显著($p < 0.05$),这与表 3 方差分析中回归模型系数显著性检验结果一致。提取时间的曲面相对于提取次数较陡,说明提取时间对白及花脂溶性成分得率的影响比提取次数大。

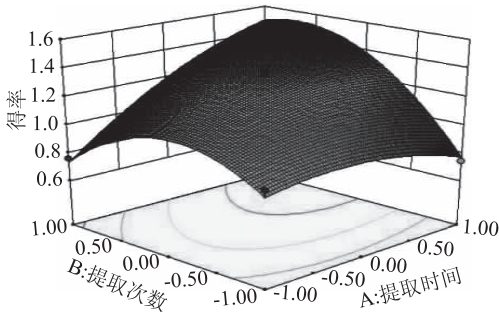


图 4 Y=f(AB)响应面

Fig.4 Response surface of Y=f(AB)

图 5 结果显示,交互项提取时间和料液比的等高线为鞍形说明两者交互作用对白及花脂溶性成分得率影响显著($p < 0.05$),这与表 3 方差分析中回归模型系数显著性检验结果一致。提取时间的曲面相对于料液比较陡,说明提取时间对白及花脂溶性成分得率的影响比料液比大。

图 6 结果显示,交互项提取次数和料液比的等

表3 回归方程的方差分析结果
Table 3 Regression analysis data

方差来源	自由度	平方和	均方差	F 值	p 值	显著性
A	1	0.22	0.22	54.69	0.0002	***
B	1	0.17	0.17	42.13	0.0003	***
C	1	0.024	0.024	5.98	0.0445	*
AB	1	0.19	0.19	47.48	0.0002	***
AC	1	0.13	0.13	33.02	0.0007	***
BC	1	0.011	0.011	2.70	0.1446	
A ²	1	0.043	0.043	10.83	0.0133	*
B ²	1	0.32	0.32	78.82	0.0001	***
C ²	1	0.19	0.19	47.53	0.0002	***
模型	9	1.35	0.15	37.40	0.0001	***
残差	7	0.028	0.010			
失拟项	3	0.013	0.008	1.18	0.4228	
纯误差	4	0.015	0.001			
总值	16	1.38				

注: *** 差异极显著($p < 0.001$); ** 差异高度显著($p < 0.01$); * 差异显著($p < 0.05$)。

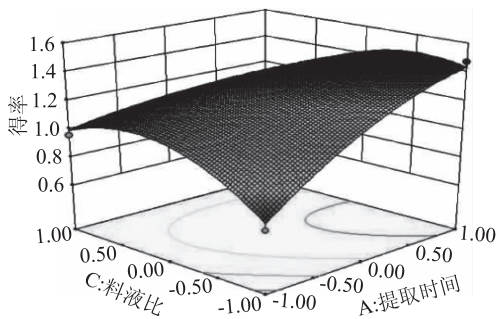


图5 Y = f(AC) 响应面
Fig.5 Response surface of Y = f(AC)

高线为圆形说明两者交互作用对白及花脂溶性成分得率影响不显著($p > 0.05$),这与表3 方差分析中回归模型系数显著性检验结果一致。提取次数的曲面相对于料液比较陡,说明提取次数对白及花脂溶性成分得率的影响比料液比大。

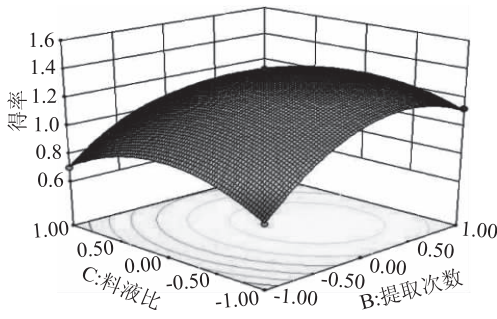


图6 Y = f(BC) 响应面
Fig.6 Response surface of Y = f(BC)

图4~图6 直观地反映了各因素对响应值的影

响,在选取的各因素范围内,通过 Design-Expert 8.0.6 对回归模型分析得出,白及花脂溶性成分的最佳提取工艺条件为:提取时间 2.94 h,提取次数 2 次,料液比为 1:40 g/mL。

2.3.4 验证试验 在响应面分析得到最佳工艺此条件下,白及花脂溶性成分得率的理论值可达到 1.416%。为了验证响应面分析的可靠性,采用上述最佳工艺参数进行验证试验,用该参数对样品进行 3 次平行实验,优化后白及花脂溶性成分得率的平均值为 $1.401\% \pm 0.112\%$,相对于初始提取条件下得率提高了 28.49%,表明响应回归方程拟合出的理论值与实际值相吻合,证明了该回归方程的可靠性,为后续的实验提供了优化条件。

2.4 白及花脂溶性成分生物活性研究结果分析

2.4.1 白及花脂溶性成分抗菌活性分析 白及花脂溶性成分对 *Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus*、*Escherichia coli* 和 *Candida albicans* 均有抑制作用,抑菌圈的大小为 13~20 mm(见表 4)。上述研究表明,白及花脂溶性成分对大肠埃希菌的抑制作用最强,其次为枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌,对铜绿假单胞菌无抑制作用,说明白及花脂溶性成分具有潜在的药用价值。

2.4.2 白及花脂溶性成分的抗肿瘤活性分析 如图 7 所示,当 LCBS 的浓度小于 1.0 mg/mL 时,细胞抑制率小于 5%,而当大于 1.0 mg/mL 时,抑制率迅速变大,当浓度为 5 mg/mL 时,最高抑制率为 32.115%,且随着时间的延长抑制率也在变大。可见在加入不同浓度 LCBS 溶液后, A_{549} 细胞抑制率均随着 LCBS 浓度增大而逐渐变大,而在同一浓度水平随着给药时

表4 白及花脂溶性成分抗菌活性分析

Table 4 Antibacterial activity analysis of liposoluble constituents of *B.striata* flower

致病菌株	枯草芽孢杆菌	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	白色念珠菌	铜绿假单胞菌
抗菌效果	++	+++	++	+	-

注:抗菌效果:E < 0.2 “-”, 0.2 < E < 0.6 “+”, 0.6 < E < 1.0 “++”, E > 1.0 “+++”。

间的延长,抑制率也随着增加。可见 LCBS 对 A_{549} 细胞增殖的抑制作用呈现出明显的剂量效应和时间效应关系。

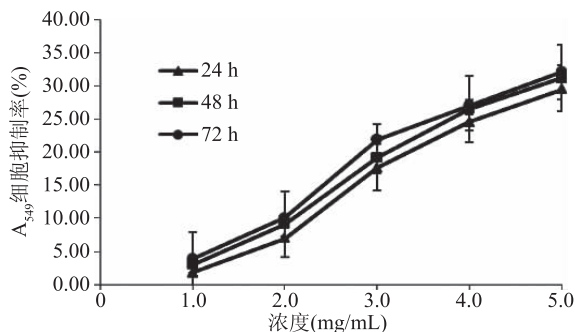


图7 白及花脂溶性成分对 A_{549} 细胞增殖的抑制率

Fig.7 Inhibitory effects of liposoluble constituents of *B. striata* flower on proliferation of A_{549} cells

2.4.3 白及花脂溶性成分的抗氧化活性分析

2.4.3.1 还原能力测定 由图8可知,白及花脂溶性成分具有一定的还原能力,且随质量浓度的升高而逐渐增大,但整体数值变化范围较小,浓度为 1.0 mg/mL 时,OD₇₀₀ 吸光值为 0.15,这可能是因为所提取的白及花脂溶性成分为混合物,纯度低,杂质较多,影响了其活性。

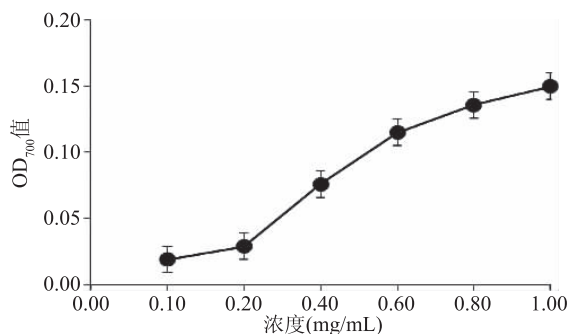


图8 白及花脂溶性成分的还原能力

Fig.8 Reducing power of liposoluble constituents of *B. striata* flower

2.4.3.2 DPPH 自由基清除能力的测定 由图9可知,白及花脂溶性成分具有一定的 DPPH 自由基清除能力,0.1~1.0 mg/mL 内,随着质量浓度的增加,DPPH 自由基清除能力不断增强,呈现良好的剂量效应关系。白及花脂溶性成分的 DPPH 自由基清除率回归方程为 $y = 29.679x + 1.5061$ ($R^2 = 0.9973$), EC_{50} 为 1.63 mg/mL,一般认为某种物质的 EC_{50} 值低于 10 mg/mL,表明其具有较好的抗氧化性^[21],因此白及花中的脂溶性成分具有较强的 DPPH 自由基清除能力。

2.4.3.3 ABTS 自由基清除能力的测定 由图10可知,白及花脂溶性成分具有较强的 ABTS 自由基清除能力,脂溶性成分对 ABTS 自由基清除率随着其质量浓度的增加而随之增加,成正比例关系。白及花脂溶性成分的 ABTS 自由基清除率回归方程为 $y = 78.493x + 12.846$ ($R^2 = 0.9965$), EC_{50} 为 0.47 mg/mL 说明白及花脂溶性成分具有较强的 ABTS 自由基清除

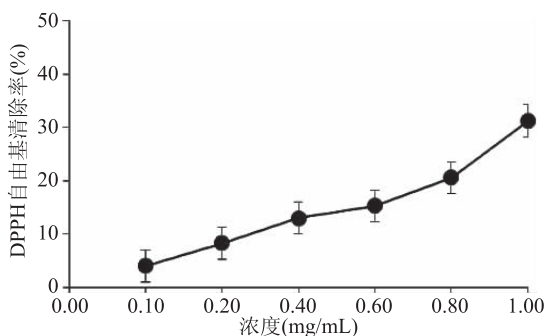


图9 白及花脂溶性成分对 DPPH 自由基的清除率

Fig.9 Scavenging rate of liposoluble constituents of *B. striata* flower on DPPH free radical

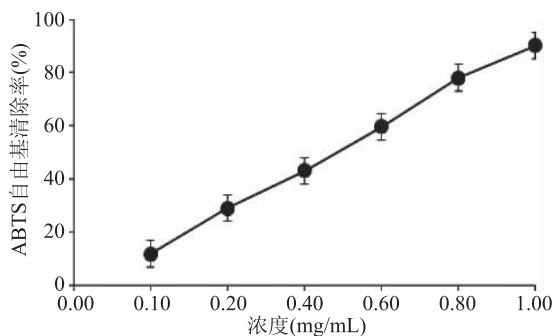


图10 白及花脂溶性成分对 ABTS 自由基在清除作用

Fig.10 Scavenging rate of liposoluble constituents of *B. striata* flower on ABTS free radical

能力。

2.4.3.4 羟自由基清除作用 由图11可知,白及花脂溶性成分具有明显的清除羟自由基作用且随着质量浓度的增加,对羟自由基的清除能力也逐渐增强。当浓度小于 0.2 mg/mL 时,白及花脂溶性成分羟自由基清除能力较小,当大于 0.2 mg/mL 时表现出较强的羟自由基清除能力,羟自由基清除率回归方程为 $y = 41.76x - 2.4184$ ($R^2 = 0.9922$), EC_{50} 为 1.25 mg/mL,表明低浓度的白及花脂溶性成分羟自由基清除作用较小,而高浓度的脂溶性成分对羟自由基有较强的清除作用,在 0.2~1.0 mg/mL 范围内具有剂量效应关系。

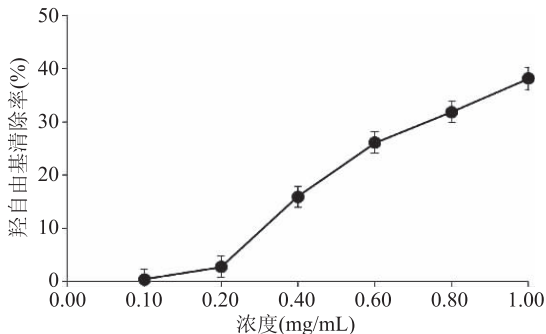


图11 白及花脂溶性成分对羟自由基的清除率

Fig.11 Scavenging activity against hydroxyl free radical of liposoluble constituents of flower of *B. striata*

3 结论

采用 Box- Behnken 设计对白及花脂溶性成分得率的提取工艺进行优化,建立了脂溶性成分得率回

模型,由该模型优化的提取条件为:提取时间 2.94 h,提取次数 2 次,料液比为 1:40 (g/mL),脂溶性成分得率的理论值可达到 1.416%。在此条件下,通过验证试验测得最佳提取工艺条件下脂溶性成分得率为 1.401% ± 0.112%,相对于初始提取条件下得率提高了 28.49%,与模型预测结果相近,进一步验证了模型的可靠性,证明本实验优化的结果,具有实际意义。

对白及花脂溶性成分生物活性的研究结果表明,白及花脂溶性成分对 *Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus*、*Escherichia coli* 和 *Candida albicans* 均有明显抑制作用,并且对 A₅₄₉ 细胞增殖的抑制作用呈现出明显的剂量效应和时间效应关系。白及花脂溶性成分具有一定的还原能力和 DPPH、ABTS、羟自由基清除能力,EC₅₀ 分别为 1.63、0.47 和 1.25 mg/mL,且随质量浓度的升高而逐渐增大,说明白及花脂溶性成分对 ABTS 自由基的清除率大于对 DPPH 自由基和羟自由基的清除率。由此可见,白及花脂溶性成分具有抑菌、抗肿瘤和抗氧化活性,证明其具有潜在的药用价值。

参考文献

- [1] 孙达锋,史劲松,张卫明,等.白及多糖胶研究进展[J].食品科学,2009,30(3):296-298.
- [2] 陶阿丽,金耀东,刘金旗,等.中药白及化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J].江苏农业科学,2013,41(11):6-9.
- [3] 高晗,王毅敏,陈发菊,等.不同生长调节剂对白及无菌萌发及成苗影响[J].基因组学与应用生物学,2017,36(2):784-790.
- [4] 王超.壳聚糖/海藻酸盐/白及多糖复合止血材料的制备及其性能研究[D].广州:暨南大学,2017.
- [5] 时松,黄振,罗熠,等.白及多糖对小鼠溃疡性结肠炎的治疗作用[J].中国药科大学学报,2012,43(6):535-540.
- [6] 黄进,李娅,邱丽莎,等.不同干燥方法对白及花营养成分和抗氧化活性的影响[J].中国医院药学杂志,2017,37(19):1942-1946.
- [7] 吕婉婉,赵明,秦慧存,等.白及花青素测定与体外抗氧化活性研究[J].基因组学与应用生物学,2017,36(12):5269-5276.
- [8] Liang Y K. Analysis, antioxidant activity and bacteriostasis research of Dandelion liposoluble constituents [J]. Science and

Technology of Food Industry,2013,34(12):153-156,160.

- [9] Wang Z B, Ma H L, Ma X K, et al. Lipid-soluble components from fig residue and its anti-tumor activities *in vitro* [J]. Chemistry and Industry of Forest Product, 2010, 30(4): 48-52.
- [10] 张琳,赵凤平,江敏瑜,等.Box-Behnken 响应面法优选大孔树脂分离纯化三七总皂苷的工艺研究[J/OL].成都中医药大学学报,2017,40(3):57-61,127.
- [11] Ye Z, Wang W, Yuan Q, et al. Box-Behnken design for extraction optimization, characterization and *in vitro* antioxidant activity of *Cicer arietinum* L. hull polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 147(20): 354-364.
- [12] Liu J S, Xie X C, Luo Y L, et al. Escin C from *Aspergillus* sp. EA-LJS80 and its biological activities [J]. Mycosystema, 2018, 37(1): 79-87.
- [13] 蔡文涛. MTT 法和 CCK-8 法检测中药抗病毒活性成分细胞毒性的比较 [J]. 湖北大学学报:自然科学版, 2017, 39(3): 305-310.
- [14] 江翔国,胡勇,张熠,等.七叶皂苷对肺腺癌 A549 细胞的增殖抑制作用 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(3): 599-600.
- [15] Zhang YB, Zhang M, Cheng QB, et al. Relationship between HPLC fingerprint chromatogram and antioxidant activity of *Forsythia suspense* leaves [J]. Natural Product Research and Development, 2017, 29: 629-634.
- [16] Wu Y X, Wang X, Jiang H T, et al. Study on total polyphenol content and antioxidant, antimicrobial activities of different polarity fractions of *Chimonanthus salicifolius* Hu leaves [J]. Food and Machinery, 2017, 33: 150-154.
- [17] 胡长玉,吴永祥,吴丽萍,等.白及活性成分的抗氧化和对 α -淀粉酶的抑制作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(6): 915-922.
- [18] 赵秀玲,刘永杰.地皮菜挥发油的化学成分及抗氧化性研究 [J]. 云南大学学报:自然科学版, 2017, 39(3): 454-462.
- [19] Francos F, Sabu A, Nmapoothiri KM, et al. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, 15(2): 107-115.
- [20] Zheng J, Shao G, Shen X. Synergistic interactions of chemical additives on the strength development of silicate cement by a Box-behnken model optimization [J]. Journal of the Japanese Forestry Society, 2014, 131(22): 285-293.
- [21] 郑义,邵颖,陈安徽,等.益智仁总黄酮超声辅助提取工艺优化及其抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2014, 35(6): 44-49.

(上接第 199 页)

- [22] Sułkowski W W, Pentak D, Nowak K, et al. The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability [J]. Journal of Molecular Structure, 2005, 744(744-747): 737-747.
- [23] Shao X R, Wei X Q, Zhang S, et al. Effects of micro-environmental pH of liposome on chemical stability of loaded drug [J]. Nanoscale Research Letters, 2017, 12(1): 504.
- [24] Musa K H, Abdullah A, Al-Haiqi A. Determination of DPPH free radical scavenging activity: Application of artificial neural networks [J]. Food Chemistry, 2016, 194: 705-711.
- [25] Halliwell B. Free Radicals and Antioxidants: A Personal View

[J]. August 1994: (1) 253-265.

- [26] Müller L, Fröhlich K, Böhm V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay [J]. Food Chemistry, 2011, 129(1): 139-148.
- [27] Asayama K, Aramaki Y, Yoshida T, et al. Permeability changes by peroxidation of unsaturated liposomes with ascorbic acid/Fe²⁺ [J]. Journal of Liposome Research, 2008, 2(2): 275-287.