

白及花与块茎石油醚部位成分分析及其生物活性的比较研究

罗阳兰^{1a,1b}, 邓百万^{1a,1b*}, 刘军生^{1a,1b}, 张九成², 解修超^{1a,1b}, 柏秋月^{1a,1b}, 周谢明^{1a,1b}(1.陕西理工大学, a.陕西省食用菌工程技术研究中心, b.生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001; 2.汉中市农产品质量安全检测中心, 陕西 汉中 723001)

摘要: 目的 分析白及花和块茎石油醚部位成分及生物活性。方法 以石油醚(60~90 °C)为提取溶剂, 采用索氏提取法提取白及花和块茎脂溶性成分, 采用 GC-MS 分析其化学成分, 通过滤纸片扩散法、CCK8 法和分光光度法分别对其进行抑菌、抗肿瘤和 α -淀粉酶抑制作用研究, 通过检测 DPPH 自由基、ABTS 自由基和羟自由基的清除率考察其体外抗氧化活性。结果 白及花和块茎中共鉴定出 20 种石油醚部位成分, 其中花 11 种, 块茎 19 种, 共有成分 10 种, α -乙酰基- γ -丁内酯(15.20%, 21.84%)和苄醇(12.07%, 24.10%)为主要成分。白及花中石油醚部位成分的抑菌活性高于块茎, 对枯草芽孢杆菌效果最好, 最小抑菌浓度和最小杀菌浓度分别为 0.41, 0.51 g·L⁻¹ 和 0.53, 0.66 g·L⁻¹。当质量浓度为 5.0 mg·mL⁻¹ 时, 白及块茎石油醚部位成分对 A549 细胞的抑制率为 29.451%, 高于花中石油醚部位成分 27.621% 的抑制率, 前者对 α -淀粉酶的 IC₅₀ 为 1.819 mg·mL⁻¹, 后者的 IC₅₀ 为 2.028 mg·mL⁻¹。两者对 DPPH 自由基、ABTS 自由基和羟自由基的清除率均随质量浓度的增大而增大, 当浓度达到 1.0 mg·mL⁻¹ 时, 前者对 ABTS 自由基和羟自由基的清除率分别为 99.67% 和 92.22%, 高于后者 90.07% 和 38.11% 的清除率, 后者对 DPPH 自由基的清除率为 31.23%, 高于前者 18.94% 的清除率, 两者均低于 Vc 的清除率。结论 白及花和块茎中石油醚部位成分主要为酯类和醇类, 2 种石油醚部位成分均具有一定的生物活性, 具有潜在的药用价值, 并可为白及花的资源开发提供参考。

关键词: 白及; 花; 块茎; 石油醚部位成分; 气相色谱-质谱联用; 生物活性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)04-0444-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.04.013

引用本文: 罗阳兰, 邓百万, 刘军生, 等. 白及花与块茎石油醚部位成分分析及其生物活性的比较研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(4): 444-450.

Comparative Research of Bioactivity and Analysis of Petroleum Ether Components in Flower and Tuber of *Bletilla Striata*

LUO Yanglan^{1a,1b}, DENG Baiwan^{1a,1b*}, LIU Junsheng^{1a,1b}, ZHANG Jiucheng², XIE Xiuchao^{1a,1b}, BAI Qiuyue^{1a,1b}, ZHOU Xieming^{1a,1b}(1.Shaanxi University of Technology, a.Shaanxi Provincial Engineering Research Center of Edible & Medicinal Fung, b.School of Biological Science & Engineering, Hanzhong 723001, China; 2.Hanzhong City Test and Inspection Center for Quality and Safety of Agricultural Products, Hanzhong 723001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To analyze the petroleum ether components in flower and tuber of *Bletilla striata* and compare their biological activity. **METHODS** Petroleum ether (60–90 °C) was used to the extraction solvent of soxhlet extraction method to extract petroleum ether components in flower and tuber of *B. striata*. The chemical compositions of petroleum ether components in flower and tuber of *B. striata* were analyzed by GC-MS, and they were also evaluated for antimicrobial activity by paper disc diffusion method, and antitumor activity by CCK8 method, while their antioxidant activity *in vitro* were evaluated by removal ability of DPPH and ABTS and OH free radicals. And their inhibitory effects on alpha amylase were determined by spectrophotometric method. **RESULTS** Twenty kinds of petroleum ether components were identified from flower and tuber of *B. striata*. Flower had 11 kinds of them, and tuber had 19 and there were 10 in common. 2-Acetylbutyrolactone (15.20%, 21.84%) and benzyl alcohol (12.07%, 24.10%) were in the majority. The bacteriostatic activity of petroleum ether components in flower was higher than the petroleum ether components in tuber, especially for *Bacillus subtilis*, the minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentrations were 0.41, 0.51 g·L⁻¹ and 0.53, 0.66 g·L⁻¹ respectively. Inhibition rate of petroleum ether components in tuber on A549 cells was 29.451% and was higher than the petroleum ether components in flower which was 27.621%, when the mass concentration reached 5.0 mg·mL⁻¹. The IC₅₀ of the former on alpha amylase was 1.819 mg·mL⁻¹ and the latter was 2.028 mg·mL⁻¹. The scavenging rate of DPPH free radicals, ABTS free radicals and hydroxyl radical increased with the increase of mass concentration. When the mass concentration reached 1.0 mg·mL⁻¹, the scavenging rates of former on ABTS free radicals and hydroxyl free radical were 99.67% and 92.22% respectively, and were higher than the latter which were 90.07%, 38.11% respectively, while the scavenging rate of latter on DPPH free radicals was 31.23%, and was higher than the former which was 18.94%. But both of them in scavenging rates of DPPH free radicals, ABTS free radicals and hydroxyl radical

基金项目: 2016 年陕西省科技厅科技创新工程项目(2016HBGC-07)

作者简介: 罗阳兰, 女, 硕士生 Tel: 18509164645 E-mail: 595059345@qq.com

*通信作者: 邓百万, 男, 硕士, 教授 Tel:

13892611379 E-mail: 2210309868@qq.com

were lower than Vc. **CONCLUSION** Lipids and alcohols are in the majority in petroleum ether components in flower and tuber of *B. striata*. Both of them have significant biological activity. Therefore they have potential medicinal value, and can provide reference for exploiting resources of *B. striata*.

KEYWORDS: *Bletilla striata*; flower; tuber; petroleum ether components; GC-MS; biological activity

白及是兰科白及属植物, 多年生草本, 主要分布在贵州、广西、安徽、四川、云南、陕西和甘肃等地。《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]。现代研究表明, 白及中含有甾类、萜类、多糖、联菲、联苳类以及酯类等上百种活性化合物^[2], 具有清热利湿、收敛止血、消肿生肌的功效^[3-4], 具有抗菌和抗肿瘤^[5]的作用。目前对白及的研究主要集中于其快速繁殖技术^[6]、种质资源遗传多样性^[7]、中药配伍与炮制^[8-9]、块茎中多糖胶的活性和药物开发^[10]等方面。

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。梁引库^[11]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。王振斌等^[12]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。吴健等^[13]利用 GC-MS 技术对白及脂肪酸成分进行分析发现, 白及中有 12 种脂肪酸成分, 以亚油酸、棕榈酸和山萘酸等为主, 是其发挥药效的主要成分。上述研究表明脂溶性成分具有多种生物活性, 是极具潜力的药物来源。白及作为传统中药材, 具有极高的药用价值, 关于其生物活性的研究多集中于块茎中的多糖胶和脂溶性成分等, 而对白及花中脂溶性成分的研究却鲜见报道。本研究采用 GC-MS 技术对白及花和块茎石油醚部位成分进行比较分析, 对抑菌活性、抗肿瘤活性、抗氧化活性及 α -淀粉酶抑制活性进行了比较研究, 以探究白及花和块茎石油醚部位成分的潜在药用价值, 为充分开发、利用白及花药用资源提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

EYELA N100 O 型旋转蒸发器(上海爱郎仪器有限公司); ITQ900 型气相色谱质谱仪(美国热电公司); UV2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司); INFINTE-M200PRO 多功能酶标仪(TECAN); THERMO3110 型二氧化碳培养箱(美国赛默飞公司)。

1.2 材料

白及花与块茎采自陕西省汉中市汉台区汉王

镇(北纬 N33°04'10", 东经 E107°01'38"), 经陕西理工大学杨培君教授鉴定, 属于兰科植物白及 (*Bletilla striata*), 将其晒干后备用。

枯草芽孢杆菌(批号 CMCC63501)、金黄色葡萄球菌(批号 ATCC25925)、大肠埃希菌(批号 ATCC25922)、白色念珠菌(批号 CMCC85021)均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, 实验前复苏传代使用。

CCK-8 试剂盒(上海合研生物科技有限公司, 批号: HY006-3); 维生素 C(Vc, 分析纯, 天津市天新精细化工开发中心, 批号: 20160105); 1,1-二苯基-2-苦肟基(DPPH, Sigma 公司); 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS, 上海生工生物工程股份有限公司); 正己烷(色谱纯)、石油醚(60~90 °C, 分析纯)均产自天津市盛奥化学试剂有限公司; 二甲基亚砜(DMSO, 天津市科密欧化学试剂有限公司)。

2 方法

2.1 白及块茎与花石油醚部位成分的提取

将样品 40 °C 恒温干燥 48 h 至恒重, 研磨过 40 目筛, 分别称取 10 g(M)白及花和块茎粉末, 用石油醚(60~90 °C)80 °C 索氏提取, 提取时间为 5 h, 连续提取 3 次, 减压回收石油醚, 得石油醚部位成分样品, 称重(m), 加入正己烷溶解后配成 5.0 mg·mL⁻¹ 的石油醚部位成分溶液, 备用。由公式(1)计算得出白及花和块茎石油醚部位成分得率分别为 1.401% 和 0.878%。

$$\text{石油醚部位成分得率(\%)} = \frac{m}{M} \times 100\% \quad (1)$$

2.2 白及花和块茎石油醚部位成分的 GC-MS 测定

2.2.1 供试品溶液的配制^[14] 量取 5.0 mg·mL⁻¹ 石油醚部位成分溶液 5 mL 于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 5 mL 15% KOH-CH₃OH, 75 °C 加热皂化 30 min 直至溶液无油珠, 再加入 15 mL 15% BF₃-CH₃OH, 75 °C 加热甲酯化 30 min, 冷却后移入分液漏斗, 加入 5 mL 正己烷, 混匀, 静置 1 h, 取 4 mL 上清液, 用无水硫酸钠干燥后, 取 2 mL 上清液用正己烷定容至 10 mL, 用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.2.2 色谱条件 HP-5MS 型弹性石英毛细管柱 (30 mm×0.25 mm, 0.25 μm), 程序升温(起始温度为 50 °C, 保持 2 min; 以 3 °C·min⁻¹ 的速度升温至 180 °C, 保持 4 min; 再以 5 °C·min⁻¹ 的速度升温至 280 °C, 保持 15 min), 载气为氦气(99.999%) 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 进样量为 10 μL, 进样温度为 220 °C, 检测器温度为 250 °C, 分流进样, 分流比为 20:1。

2.2.3 质谱条件 EI 离子源 70 eV, 离子源温度为 230 °C, 传输线温度为 250 °C, 溶剂延迟时间为 3 min, 全扫描采集模式, 扫描质量范围 *m/z* 50~550。

2.2.4 定性和定量分析 利用 Nist11.Lib 标准质谱图谱和文献解析, 并结合白及花和块茎石油醚部位成分的保留时间, 确认花和块茎石油醚部位化学成分, 按照峰面积归一化法进行计算, 求出各化学成分的相对质量分数^[15], 比较白及花和块茎石油醚部位成分的不同。

2.3 白及花和块茎石油醚部位成分的生物活性

2.3.1 抑菌活性 采用滤纸片扩散法^[16]研究 2 种石油醚部位成分对致病菌的抑菌效果, 以含 20% DMSO 100 μL 的纸片作为溶剂对照, 含 0.5% 碘伏溶液 100 μL 的纸片作为阳性对照。采用二倍连续梯度稀释法测定最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 以 0.5 mL 生理盐水为空白对照, 同时采用平板转种法^[17]测定最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)。

2.3.2 抗肿瘤活性 将 A₅₄₉ 细胞以 5×10⁴ cfu·mL⁻¹ 浓度接种于 96 孔板中, 每孔 90 μL 细胞悬液, 实验分成阴性对照组、空白组、给药组, 每组设 4 个复孔^[18], 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。依次将浓度为 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg·mL⁻¹ 的白及花和块茎石油醚部位成分溶液各 10 μL 加在各给药组孔板内, 对照组孔板内加入正己烷, 继续培养 24 h。测定时向每孔加入 10 μL CCK8 试剂和 90 μL 无血清培养基, 培养 1 h 后, 用酶标仪测定 450 nm 处吸光度。利用公式(2)计算抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白组}}}{A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}}\right) \times 100\% \quad (2)$$

2.3.3 α-淀粉酶抑制作用的测定 参考文献^[19-20], 稍作修改, 用 DMSO 将 2 种样品配制成 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg·mL⁻¹ 溶液, 取 0.5 mL, 加入 0.5 mL 1 U·mL⁻¹ 的 α-淀粉酶溶液和 1.0 mL 0.25% 的淀粉溶液, 混匀后于 50 °C 恒温水浴反应

10 min。然后加入 1 mL DNS 溶液, 50 °C 恒温水浴反应 5 min, 沸水浴中加热 15 min, 冷却后用 pH 6.6 磷酸缓冲液定容至 10 mL, 测定 575 nm 处吸光度。每样重复 3 次, 取平均值, 按公式(3)计算 α-淀粉酶活性的抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = 1 - \frac{A_S - A_{SB}}{A_C} \times 100\% \quad (3)$$

式中: A_S 为 0.5 mL 样品+0.5 mL α-淀粉酶溶液的样品吸光度; A_{SB} 为 0.5 mL 样品+0.5 mL pH 6.6 磷酸缓冲液(代替 α-淀粉酶溶液)的样品对照组吸光度; A_C 为 0.5 mL DMSO+0.5 mL α-淀粉酶溶液的空白对照组吸光度。

2.3.4 体外抗氧化活性

2.3.4.1 还原能力的测定 参考文献^[21], 稍作修改, 用 DMSO 将 2 种样品及 Vc 配成 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg·mL⁻¹ 的溶液。取 1 mL 上述溶液, 加入 1 mL pH 6.6 磷酸缓冲液, 1 mL 1% 铁氰化钾溶液, 混匀后于 50 °C 水浴中反应 20 min, 加入 1 mL 10% 三氯乙酸, 混匀后取 2 mL, 加超纯水 2 mL 与 200 μL 0.1% 三氯化铁, 静置 10 min, 测定 A_{700} , 同时将铁氰化钾溶液替换成 1 mL 去离子水作为对照组。以 Vc 作为阳性对照, 重复 3 次, 取平均值。

2.3.4.2 DPPH 自由基清除能力的测定 参考文献^[22], 稍作修改, 用 DMSO 将 2 种样品及 Vc 配制成 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg·mL⁻¹ 样品溶液, 取 2 mL 上述溶液, 加入 1 mL 0.2 mmol·L⁻¹ DPPH-99.9% 乙醇溶液, 混匀, 室温暗处放置 10 min, 测定 517 nm 处吸光度, 以 Vc 为阳性对照, 每样重复 3 次, 取平均值, 并按公式(4)计算 DPPH 自由基去除率。

$$\text{清除率}(\%) = 1 - \frac{A_S - A_{SB}}{A_C} \times 100\% \quad (4)$$

式中: A_S 为 2 mL 样品溶液+1 mL DPPH-乙醇溶液的样品吸光度; A_{SB} 为 2 mL 样品溶液+1 mL 99.9% 乙醇溶液的样品对照组吸光度; A_C 为 2 mL DMSO+1 mL 99.9% 乙醇溶液的空白对照组吸光度。

2.3.4.3 ABTS 自由基清除能力的测定 参考文献^[23], 稍作修改, 将 7 mmol·L⁻¹ ABTS 溶液和 2.45 mmol·L⁻¹ 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 A_{734} 为 0.7±0.02。用 DMSO 将 2 种样品和

V_c 配制成 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 样品溶液, 取 1 mL 加入 2 mL ABTS 工作液, 振荡混合, 于暗处放置 5 min 后测定 A_{734} , V_c 为阳性对照。每样重复 3 次, 取平均值, 并按公式计算 ABTS 自由基清除率:

$$\text{清除率}(\%) = 1 - \frac{A_S - A_{SB}}{A_C} \times 100\% \quad (5)$$

式中: A_S 为 1 mL 样品溶液+2 mL ABTS 工作液的样品吸光度; A_{SB} 为 1 mL 样品溶液+2 mL 99.9%乙醇溶液的样品对照组吸收值; A_C 为 1 mL DMSO+2 mL 99.9%乙醇溶液的空白对照组吸光度。

2.3.4.4 羟自由基清除能力的测定 参考文献^[24], 稍作修改, 用 DMSO 将 2 种样品配制成 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 样品溶液, 取 1 mL 分别加入 9 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 和 9 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨酸-乙醇溶液各 2 mL, 最后加 2 mL 1.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 启动反应, 于 37 $^\circ\text{C}$ 反应 30 min, 以去离子水调零, 在波长 510 nm 测定样品吸光度 A_1 ; 另外, 去离子水代替 H_2O_2 重复上述操作, 测定两样品本身的吸光度 A_2 , 同时以水代替两样品溶液, 测定吸光度 A_0 。以 V_c 为阳性对照。每样重复 3 次, 取平均值, 并按公式(6)计算羟自由基清除率。

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = 1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \times 100\% \quad (6)$$

2.4 数据分析

采用 SPSS 22.0, Origin 8.5 软件进行数据分析、图表制作等, 结果取 3 次平行实验的平均值。

3 结果

3.1 GC-MS 对比测定白及花和块茎石油醚部位成分

GC-MS 测定白及花和块茎石油醚部位成分发现, 白及花中含有 11 种化合物, 而白及块茎中含有 19 种化合物, 白及块茎石油醚部位成分中有 10 种化合物与花相同。对白及花和块茎石油醚部位成分化合物进行归类分析发现, 主要含有酯类、醇类、烷类、酚类、芳香族类等。结果见图 1~2, 表 1。

白及块茎中含量较高的成分有 α -乙酰基- γ -丁内酯 (15.20%)、棕榈酸甲酯 (12.51%)、苯醇 (12.07%)、庚酸烯丙酯 (10.71%)、1,6-己二醇 (9.84%)、亚油酸甲酯 (8.14%), 6 种物质的相对含量总和占白及块茎石油醚部位成分的 68.47%。白及花中石油醚部位成分含量较高的成分有苯醇 (24.10%)、 α -乙酰基- γ -丁内酯 (21.84%)、1,6-己二醇 (16.34%)、1-二十七烷醇 (12.34%), 4 种物质的

相对含量总和占白及花中石油醚部位成分的 74.62%。白及块茎中石油醚部位成分含量相较于花中石油醚部位成分含量要低 59.57%。

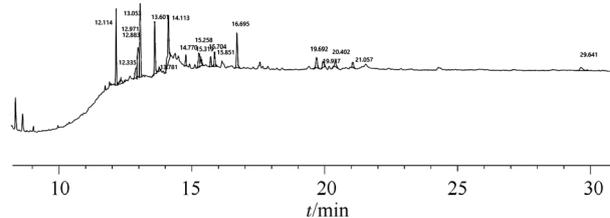


图 1 白及块茎石油醚部位成分总离子色谱

Fig. 1 GC-MS total ion chromatograms of petroleum ether components in tuber of *Bletilla striata*

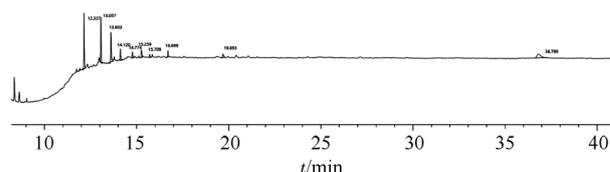


图 2 白及花石油醚部位成分总离子色谱

Fig. 2 GC-MS total ion chromatograms of petroleum ether components in flower of *Bletilla striata*

3.2 白及花和块茎中石油醚部位成分的生物活性对比

3.2.1 抑菌活性对比 实验对照组 DMSO 纸片周围无抑菌环, 表明 DMSO 对细菌和真菌生长无抑制作用。阳性对照组 0.5% 碘伏溶液周围抑菌环均 >1.5 cm, 表明实验方法可行且无误。白及花和块茎石油醚部位成分对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和白色念珠菌均有抑制作用, MIC 分别为 0.41, 1.72, 2.34, 3.47 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 0.53, 1.77, 2.35, 3.53 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, MBC 分别为 0.51, 1.82, 2.46, 4.59 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 0.66, 1.94, 2.48, 4.71 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 说明两者对枯草芽孢杆菌的抑制效果较好, 对埃希式大肠杆菌的抑制效果差距不大。白及花石油醚部位成分相较于白及块茎石油醚部位成分有更好的抑菌活性。

3.2.2 抗肿瘤活性对比 当白及块茎和花中石油醚部位成分的浓度 >1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 对 A_{549} 细胞表现出抑制作用; 随着浓度的增加, 抑制率也随之增加, 但增加的速率呈现出先增大后减小的趋势。当石油醚部位成分溶液浓度 <1.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 两者抑制率无显著差异。而当浓度为 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 白及块茎中石油醚部位成分对 A_{549} 细胞的抑制率为 29.451%, 而花中石油醚部位成分对 A_{549} 细胞抑制率为 27.621%。可见加入不同浓度的 2 种石油醚部位成分溶液后, 两者对 A_{549} 细胞抑制率均随着浓

表 1 白及花和块茎中石油醚部位成分 GC-MS 分析

Tab. 1 GC-MS analysis of petroleum ether components in flower and tuber of *Bletilla striata*

No.	化合物名称	分子式	块茎		花	
			t_R /min	相对质量分数/%	t_R /min	相对质量分数/%
1	苯醇	C ₇ H ₈ O	12.144	12.07	12.144	24.10
2	乙酰丙酸甲酯	C ₆ H ₁₀ O ₃	12.335	2.55	12.337	2.82
3	戊酸苯基酯	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	12.883	3.83	-	-
4	庚酸烯丙酯	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	12.971	10.71	-	-
5	α -乙酰基- γ -丁内酯	C ₆ H ₈ O ₃	13.053	15.20	13.057	21.84
6	1,6-己二醇	C ₆ H ₁₄ O ₂	13.601	9.84	13.603	16.34
7	2-硝基苯基 2,3,4-三-O-乙酰戊并吡喃糖苷	C ₁₇ H ₁₉ NO ₁₀	13.781	1.37	-	-
8	棕榈酸甲酯	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	14.113	12.51	14.120	5.58
9	2,4-二叔丁基苯酚 1	C ₁₄ H ₂₂ O	14.770	1.87	14.774	3.35
10	三乙二醇	C ₆ H ₁₄ O ₄	15.258	3.23	15.259	5.40
11	5-庚基-1H-(1,2,4)-三唑-3-胺	C ₉ H ₁₈ N ₄	15.319	2.57	-	-
12	邻苯二甲酸二乙酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	15.704	2.34	15.709	1.55
13	硬脂酸甲酯	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	15.851	2.89	-	-
14	亚油酸甲酯	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	16.695	8.14	16.699	3.81
15	对叔戊基苯酚	C ₁₁ H ₁₆ O	19.692	3.32	19.693	2.87
16	1,2-苯二甲酸二丁酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	19.937	1.89	-	-
17	三缩四乙二醇	C ₈ H ₁₈ O ₅	20.402	2.15	-	-
18	4,4'-(1,2-二乙基亚乙基)二苯酚	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	21.057	1.63	-	-
19	对苯二酚	C ₆ H ₆ O ₂	29.641	1.89	-	-
20	1-二十七烷醇	-	-	-	36.799	12.34

度增加而逐渐增加, 2 种石油醚部位成分溶液对 A₅₄₉ 细胞增殖的抑制作用呈现出明显的量效关系, 而同等剂量下白及块茎石油醚部位成分大于白及花石油醚部位成分对 A₅₄₉ 细胞的抑制率, 表明白及块茎中石油醚部位成分的抗肿瘤活性大于花中石油醚部位成分的抗肿瘤活性。结果见图 3。

3.2.3 α -淀粉酶抑制能力测定 白及花和块茎石油醚部位成分对 α -淀粉酶均有一定的抑制作用。浓度在 0.1~1.0 mg·mL⁻¹ 内, 随着浓度的增加, α -淀粉酶抑制率不断增加时, 当浓度达到 1.0 mg·mL⁻¹ 时, 对 α -淀粉酶的抑制率分别为 28.246% 和 24.245%。经回归分析得白及块茎石油醚部位成分回归方程为 $y=26.717x+1.394(R^2=0.9919)$, 计算得 IC₅₀ 为 1.819 mg·mL⁻¹; 白及花石油醚部位成分回归方程为 $y=24.490x+0.345(R^2=0.9963)$, 计算得 IC₅₀ 为 2.028 mg·mL⁻¹, 表明白及块茎和花中石油醚部位成分对 α -淀粉酶抑制作用存在较大差异, 块茎石油醚部位成分对 α -淀粉酶抑制效果优于花。结果见图 4。

3.2.4 体外抗氧化活性对比

3.2.4.1 还原能力测定 白及花和块茎石油醚部位成分均表现出不同程度的还原能力, 与阳性对照 Vc 相比, 还原力从大到小排序为 Vc>块茎>花。还原能力随浓度的增加而逐渐增加, 当浓度为 0.1 mg·mL⁻¹ 时, 两者的还原能力大小无显著差异,

但当浓度>0.1 mg·mL⁻¹ 时, 两者的还原能力差距逐渐变大, 当浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 时, 差距最大, 在 700 nm 处测得吸光度分别为 0.300±0.001, 0.150±0.004, 但都远小于 Vc 的还原能力。由图 5 可知, 白及块茎石油醚部位成分的还原能力大于花石油醚部位成分的还原能力, 这可能与块茎中含有更多不饱和脂肪酸和酚类物质有关。

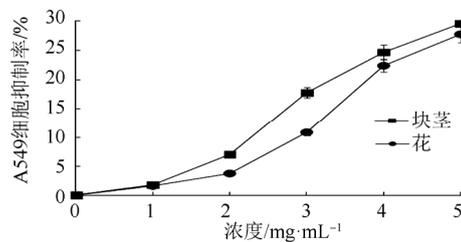


图 3 白及花和块茎石油醚部位成分对 A₅₄₉ 细胞的抑制作用
Fig. 3 The inhibitory effect of petroleum ether components in flower and tuber of *Bletilla striata* on A₅₄₉ cells

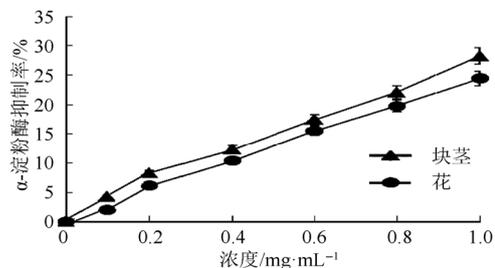


图 4 白及花和块茎石油醚部位成分对 α -淀粉酶的抑制作用
Fig. 4 Inhibitory effect of petroleum ether components in flower and tuber of *Bletilla striata* on α -Amylase

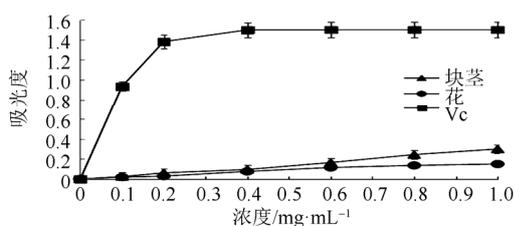


图5 白及块茎和花中石油醚部位成分的还原能力
Fig. 5 Reducing activity of petroleum ether components of tuber and flower of *Bletilla striata*

3.2.4.2 DPPH 自由基清除能力的测定 白及花和块茎石油醚部位成分对 DPPH 自由基均有一定的清除能力, 0.1~1.0 mg·mL⁻¹ 内, 随着浓度的增加, DPPH 自由基清除能力不断增强, 呈现良好的量效关系。DPPH 自由基清除能力从大到小排序为 Vc>花>块茎; 浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 时, 对 DPPH 自由基清除率分别为 92.07%, 31.23%, 18.94%, 说明白及花中的石油醚部位成分具有较强的 DPPH 自由基清除能力, 且大于白及块茎石油醚部位成分对 DPPH 自由基清除能力。结果见图 6。

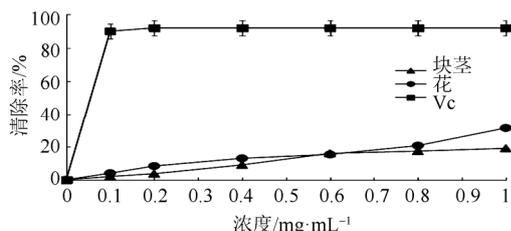


图6 白及块茎和花中石油醚部位成分对 DPPH 自由基在清除作用
Fig. 6 DPPH free radicals scavenging activity of petroleum ether components in tuber and flower of *Bletilla striata*

3.2.4.3 ABTS 自由基清除能力的测定 白及花和块茎石油醚部位成分均具有较强的 ABTS 自由基清除能力, 随着其质量浓度的增加, 清除作用也随之增强。ABTS 自由基清除能力从大到小排序为块茎>花>Vc, 浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 时, 对 ABTS 自由基清除率分别为 100%, 99.67%, 90.07%, 说明块茎石油醚部位成分对 ABTS 自由基的清除作用优于花石油醚部位成分。结果见图 7。

3.2.4.4 羟自由基清除能力的测定 白及花和块茎石油醚部位成分和 Vc 均具有明显的清除羟自由基作用, 且随着浓度的增加不断增加, 对羟自由基的清除能力也逐渐增强。羟自由基清除能力从大到小排序为 Vc>块茎>花, 浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 时, 对羟自由基清除率分别为 100%, 92.22%,

38.11%。结果见图 8。

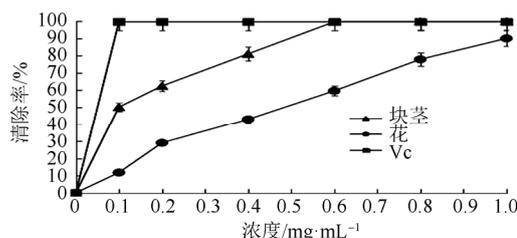


图7 白及块茎和花中石油醚部位成分对 ABTS 自由基的清除作用
Fig. 7 ABTS free radicals scavenging activity of petroleum ether components in tuber and flower of *Bletilla striata*

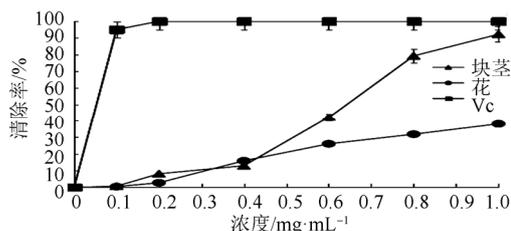


图8 白及块茎和花中石油醚部位成分对羟自由基的清除作用
Fig. 8 Hydroxyl free radical scavenging activity of petroleum ether components in tuber and flower of *Bletilla striata*

4 讨论

GC-MS 分析发现白及花和块茎石油醚部位成分约有 20 种, 主要含有酯类、醇类、烷类、酚类、芳香族类等, 共有 10 种相同成分, 其中棕榈酸、亚油酸和硬脂酸与吴健等的报道一致, 其余化合物均为首次在白及中发现。白及块茎中石油醚部位成分种类高于而花中石油醚部位成分种类, 但白及花中石油醚部位成分含量比块茎高 59.57%, 尤其是苯醇和 α -乙酰基- γ -丁内酯这 2 种重要的中间产物含量较高, 可为白及花的资源开发提供依据。同时抗氧化结果显示, 白及的石油醚部位成分均具有一定的抗氧化活性, 白及块茎中石油醚部位成分的总还原能力大于白及花中石油醚部位成分的总还原能力, 这可能是因为白及块茎中的亚油酸等不饱和脂肪酸和庚酸烯丙酯中的不饱和键表现出一定的还原能力。同时亚油酸属于多不饱和脂肪酸, 临床实验发现, 多不饱和脂肪酸具有抗炎症、抗肿瘤、调节血脂、提高免疫力、预防心血管疾病及治疗精神分裂症等多种生理功能^[25], 因此亚油酸、棕榈酸等成分可能是白及石油醚部位成分发挥药效的重要组成成分^[13]。

白及花石油醚部位成分对 4 种致病菌的抑制效果均高于白及块茎石油醚部位成分, 对枯草芽

孢杆菌抑制效果最好,其MIC和MBC分别为0.41, 0.51, 0.53, 0.66 g·L⁻¹, 可为天然抗菌药物的开发提供新材料。当浓度为5.0 mg·mL⁻¹时,白及块茎中石油醚部位成分对A₅₄₉细胞的抑制率为29.451%,高于花中石油醚部位成分27.621%的抑制率,前者对α-淀粉酶的IC₅₀为1.819 mg·mL⁻¹,后者的IC₅₀为2.028 mg·mL⁻¹,表明白及块茎和花中石油醚部位成分均有明显的抑制α-淀粉酶的作用。由此可见,白及花和块茎石油醚部位成分均具有抑菌活性、抗肿瘤活性、抗氧化活性和α-淀粉酶抑制作用,花中石油醚部位成分的含量多于块茎,且白及花在食品等工业中也有一定的发展潜力^[26],加大对白及花的研究力度对白及资源的开发利用具有重要意义。

此外,白及石油醚部位成分的组成较为复杂,本实验仅对总石油醚部位成分进行分析鉴定和部分生物活性进行考察,对单体的分离和活性有待进一步研究。

REFERENCES

[1] SUN D F, SHI J S, ZHANG W M, et al. Research progress on polysaccharide gum of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb.f [J]. J Food Sci(食品科学), 2009, 30(3): 296-298.

[2] TAO A L, JIN Y D, LIU J Q, et al. Research progress of chemical constituents, pharmacological action and clinical application of *Bletilla striata* [J]. Jiangsu Agricult Sci(江苏农业科学), 2013, 41(11): 6-9.

[3] KONG L S. The studies on extration technology and efficacy of *Bletilla striata* polysaccharide [D]. Shanghai: Shanghai Institute of Technology, 2015.

[4] MA X J, CUI B S, HAN S W, et al. Chemical constituents from tuber of *Bletilla striata* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42(8): 1578-1584.

[5] LIU M X, SONG T T, YE C, et al. Inhibitory effect of *Bletilla striata* polysaccharide on the proliferation of HepG2 [J]. Asia-Pacific Tradit Med(亚太传统医药), 2018, 14(3): 11-13.

[6] GAO H, WANG Y M, CHEN F J, et al. Effect of different growth regulating regulators on the sterile germination and seedling of *Bletilla striata* [J]. Genom Appl Biol(基因组学与应用生物学), 2017, 36(2): 784-790.

[7] LI J, YANG H, ZHOU T H. Microsatellite primer screening and population genetic diversity of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb.f [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica(西北植物学报), 2016, 36(7): 1343-1350.

[8] WANG C. Preparation and performance studies of chitosan/alginate/*Bletilla Striata* polysaccharide compound hemostatic materials [D]. Guangzhou: Jinan University, 2017.

[9] LIU W L, SONG F R, LIU Z Q, et al. Chemical study on combination taboo of Radix Aconiti with Rhizoma Pinelliae, Fructus Trichosanthis, Bulbus Fritillariae Thunbergli, Radix Ampelopsis and Rhizoma Bletillae [J]. Acta Chim Sin(化学学报), 2010, 68(9): 889-896.

[10] SHI S, HUANG Z, LUO Y, et al. *Bletilla striata* polysaccharide for the treatment of ulcerative colitis in mice [J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 2012, 43(6): 535-540.

[11] LIANG Y K. Analysis, antioxidant activity and bacteriostasis research of Dandelion liposoluble constituents [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2013, 34(12): 153-156, 160.

[12] 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]. Chem Ind Fore Prod(林产化学与工业), 2010, 30(4): 48-52.

[13] WU J, XIANG Z, XU Y, et al. Analysis of fatty acids in *Bletillae Rhizoma* by GC-MS [J]. Food Drug(食品与药品), 2014, 16(6): 428-430.

[14] SHENG P, TANG D P, MIAO L J, et al. GC-MS fingerprints of essential oils of *Ferula ferulaeoides* from diferent habitats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(1): 30-37.

[15] GONG H Y, OU Y T, REAN K. Principal component analysis of essential oils of *Origanum vulgare* L. from different production areas [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(2): 239-243.

[16] 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.

[17] DUAN H B, HUAN C C, LIANG Y K, et al. GC-MS analysis and activity research of liposoluble constituents from *Taraxacum mongolicum* leaves [J]. Chin J Exper Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2018, 24(1): 60-66.

[18] CAI W T. The comparision of MTT and CCK-8 by detecting cytotoxicity of antiviral active components in traditional Chinese medicine [J]. J Hubei Univ(湖北大学学报), 2017, 39(3): 305-310.

[19] HU C Y, WU Y X, WU L P, 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(6): 915-922.

[20] LIU M, REN X, YAO Y J, 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(6): 1013-1019.

[21] WU Q P, QIAO H X, HE H H, et al. Extraction of polysaccharides from residue of *Ginkgo biloba* leaves and study on its anti-oxidant activity [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(1): 9-13.

[22] 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 salicifolicus* Hu leaves [J]. Food Machinery, 2017, 33(8): 150-154.

[23] YANG S H, SONG Y G, WANG J H, et al. *In vitro* antioxidant and free radical scavenging activities of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) Tubers [J]. J Food Sci(食品科学), 2010, 31(17): 166-169.

[24] XIONG L Z, FU B T, WU Y F, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides from seed of *Trichosanthes kirilowii* Maxim [J]. Appl Chem Ind(应用化工), 2015, 4(6): 1008-1011.

[25] HUANG Z F, LU W J, TAN X, et al. Study on the components and antioxidant activities of the liposoluble constituents from *Murdannia nudiflora* (Linn.) Brenan [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(5): 674-677.

[26] LV W W, ZHAO M, QIN H C, et al. Study on determination of anthocyanin from *Bletilla striata* flower and antioxidant activity *in vitro* [J]. Genomics Appl Biol, 2017, 36(12): 5269-5276.

收稿日期: 2018-06-12

(本文责编: 李艳芳)