

- vascular endothelial cell mediated by P38 MAPK pathway[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2021, 41(12): 439-449.
- [6] 周丽娜, 姚卫峰, 柳佳, 等. 侧柏炭不同溶剂提取物对LPS诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(22): 3933-3938.
- [7] Younis W H, Al-Rawi N H, Mohamed M A, et al. Molecular events on tooth socket healing in diabetic rabbits[J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2013, 51(8): 932-936.
- [8] Pan K Y, Shen M P, Ye Z H, et al. Inhibitive effects of anti-oxidative vitamins on mannitol-induced apoptosis of vascular endothelial cells[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2006, 7(10): 825-829.
- [9] 袁萍, 邹学敏, 余明东, 等. 茶多酚对甲醛致人内皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. *南华大学学报(医学版)*, 2010, 38(6): 746-749.
- [10] 杨丽, 温雅心, 刘洋, 等. 大黄炭加热过程颜色特征与14种化学成分含量变化关系研究[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(17): 4230-4237.
- [11] 赵宏苏, 赵茹, 乔金为, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别绿萼梅质量标志物的评价研究[J]. *中草药*, 2022, 53(5): 1345-1353.
- [12] 王志萍, 李林杰, 王昱涵, 等. 基于灰色关联度的金母颗粒抗炎作用的谱效关系研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2023, 34(5): 675-683.
- [13] 肖瑞瑶, 滕攀攀, 胡超, 等. 偏最小二乘回归分析应用于中药谱效关系的研究进展[J]. *辽宁化工*, 2020, 49(3): 303-305.
- [14] 金雅晴, 祖勉, 洪永凯, 等. 基于网络药理学的香薷治疗流感作用机制研究[J]. *军事医学*, 2022, 46(9): 691-698.
- [15] 朱诗塔, 雷鹏, 李新中, 等. 掌叶大黄不同炮制品指纹图谱与其止血作用的灰关联度分析[J]. *中南药学*, 2009, 7(1): 55-58.
- [16] 曾亮. 大黄及其不同炮制品中6种元素的含量测定[J]. *广东微量元素科学*, 2007, 14(6): 48-49.
- [17] 赵晓波. 大黄炮制方法对其药理作用影响[J]. *医学理论与实践*, 2020, 33(8): 1246-1247.
- [18] 王君. 大黄不同炮制品对其药效的影响[J]. *天津药学*, 2010, 22(1): 53-55.
- [19] 周慧, 雷玉华, 张复贵, 等. 儿茶素基于MEK/ERK信号通路对老年冠心病大鼠内皮功能的作用机制研究[J]. *疑难病杂志*, 2021, 20(4): 353-357.
- [20] 赵玲, 陈建平, 李琳, 等. 5-羟甲基糠醛抗氧化性及其抗细胞增殖活性的研究[J]. *现代食品科技*, 2013, 29(11): 2638-2642.

## 白及提取工艺优化及其抗氧化、酪氨酸酶抑制活性评价

王珊珊<sup>1</sup>, 罗益远<sup>2,3</sup>, 谢叶菲<sup>2</sup>, 蒋新苗<sup>2</sup>, 潘萍<sup>2,3</sup>, 秦昆明<sup>1\*</sup>, 陈宏降<sup>2,3\*</sup>

(1. 江苏海洋大学药学院, 江苏连云港 222005; 2. 浙江药科职业大学中药学院, 浙江宁波 315500; 3. 宁波市中药资源综合开发利用重点实验室, 浙江宁波 315500)

**摘要:** 目的 优化白及提取工艺, 并考察其抗氧化、酪氨酸酶抑制活性。方法 在单因素试验基础上, 以超声时间、乙醇体积分数、料液比为影响因素, 天麻素、原儿茶醛、对羟基苯甲醛、1, 4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯-2-葡萄糖苷、1, 4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯、山药素Ⅲ、二氢赤素、3'-O-甲基山药素Ⅲ总提取量为评价指标, Box-Behnken 响应面法优化提取工艺。测定提取物对 DPPH、ABTS<sup>+</sup> 自由基的清除作用, 以及对酪氨酸酶的抑制活性。**结果** 最佳条件为超声时间 49 min, 乙醇体积分数 55%, 料液比 1:30, 提取次数 2 次, 总提取量为 13.18 mg/g。提取物对 DPPH、ABTS<sup>+</sup> 自由基及酪氨酸酶的 IC<sub>50</sub> 分别为 10.12、314.07、1.70 μg/g。**结论** 该方法简便、可靠、稳定, 可用于提取抗氧化、酪氨酸酶抑制活性较强的白及。

**关键词:** 白及; 提取工艺; 抗氧化活性; 酪氨酸酶抑制活性; Box-Behnken 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2025)07-2171-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.07.006

收稿日期: 2024-09-06

基金项目: 浙江省公益基础研究项目(LTGN23H280004); 浙江省药品监督管理局科技计划项目(2023014); 浙江省教育厅一般项目(Y202352650); 宁波市自然科学基金项目(2021J187, 2023J306)

作者简介: 王珊珊(1997—), 女, 研究方向为药物分析。E-mail: 1479804964@qq.com

\*通信作者: 秦昆明(1985—), 男, 博士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药炮制机理及其质量标准。E-mail: qinkm123@126.com

陈宏降(1983—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中药活性成分及其质量控制。Tel: (0574) 88839203, E-mail: chhj1228@163.com

# Optimization of extraction process for *Bletillae Rhizoma* and evaluation of its anti-oxidant, tyrosinase inhibitory activities

WANG Shan-shan<sup>1</sup>, LUO Yi-yuan<sup>2,3</sup>, XIE Ye-fei<sup>2</sup>, JIANG Xin-miao<sup>2</sup>, PAN Ping<sup>2,3</sup>,  
QIN Kun-ming<sup>1\*</sup>, CHEN Hong-jiang<sup>2,3\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 2. School of Traditional Chinese Materia Medica, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315500, China; 3. Ningbo Municipal Key Laboratory for Comprehensive Development and Utilization of Traditional Chinese Medicine Resources, Ningbo 315500, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To optimize the extraction process for *Bletillae Rhizoma*, and to evaluate its anti-oxidant, tyrosinase inhibitory activities. **METHODS** With ultrasound time, ethanol concentration and solid-liquid ratio as influencing factors, the total extraction content of gastrodin, protocatechualdehyde, *p*-hydroxybenzaldehyde, 1, 4-bis [4- (gluconoxy) benzyl] -2-isobutylmalate-2-glucoside, 1, 4-bis [4- (gluconoxy) benzyl] -2-isobutylmalate, yam III, dihydropinosin and 3'-*O*-methyl yam III as an evaluation index, the extraction process was optimized by Box-Behnken response surface method. Subsequently, the extract's scavenging effects on DPPH, ABTS<sup>+</sup> free radicals, and inhibitory ability on tyrosinase were determined. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 49 min for ultrasound time, 55% for ethanol concentration, 1 : 30 for solid-liquid ratio, and 2 times for extraction frequency, the total extraction content was 13.18 mg/g. The extract demonstrated the IC<sub>50</sub> of 10.12, 314.07 and 1.70 μg/g on DPPH, ABTS<sup>+</sup> free radicals and tyrosinase, respectively. **CONCLUSION** This simple, reliable and stable method can be used for the extraction for *Bletillae Rhizoma* with strong anti-oxidant, tyrosinase inhibitory activities.

**KEY WORDS:** *Bletillae Rhizoma*; extraction process; anti-oxidant activity; tyrosinase inhibitory activity; Box-Behnken response surface method

白及系兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎, 为传统常用中药, 始载于《神农本草经》, 功效收敛止血、消肿生肌, 临床广泛用于治疗咯血、外伤出血、烧烫伤、消化道溃疡等疾病<sup>[1]</sup>, 有着抗肿瘤、抗氧化、美白、抗衰老、免疫调节等药理活性<sup>[2]</sup>, 含有多糖、苹果酸酯类、联苳类、菲类、甾体、三萜等化学成分<sup>[2-5]</sup>。研究表明, 1, 4-二 [4- (葡萄糖氧) 苳基] -2-异丁基苹果酸酯等苹果酸酯类化合物是兰科植物的主要活性物质, 具有益智、延缓衰老等作用<sup>[6-7]</sup>, 2020年版《中国药典》也以其为白及含量测定的指标成分; 3'-*O*-甲基山药素 III、二氢赤松素、山药素 III 等为联苳类化合物, 具有显著的抗炎、抗氧化作用<sup>[8]</sup>; 天麻素是天麻、白及等兰科植物中的主要活性成分, 有着显著的神经保护作用, 可改善认知障碍、神经性疼痛等<sup>[9]</sup>; 原儿茶醛、对羟基苯甲醛等酚酸类成分具有明显的抗氧化、抗炎、镇痛等活性<sup>[10-11]</sup>。本实验以上述成分提取量为评价指标, 采用 Box-Behnken 响应面法优

化白及提取工艺, 并考察其抗氧化、酪氨酸酶抑制活性, 以期为该药材综合开发利用奠定基础。

## 1 材料

1.1 仪器 LC-20ADXR 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司); FA2004 型电子天平 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司); EX-125DZH 型电子分析天平 (奥豪斯仪器常州有限公司); SB-5200DT 超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); MULTISKAN Sky 酶标仪 (美国 Thermo Scientific 公司)。

1.2 试剂与药材 天麻素 (批号 AF20100454, 纯度 98%)、原儿茶醛 (批号 YTO1013FB14, 纯度 98%)、1, 4-二 [4- (葡萄糖氧) 苳基] -2-异丁基苹果酸酯-2-葡萄糖苷 (批号 AF21071602, 纯度 98%)、1, 4-二 [4- (葡萄糖氧) 苳基] -2-异丁基苹果酸酯 (批号 PS011098, 纯度 98%)、山药素 III (批号 AFCD1715, 纯度 98%)、二氢赤松素 (批号 AF22032202, 纯度 97%)、3'-*O*-甲基山药素 III (批号 AF21092608, 纯度 98%)、熊果苷 (批

号 AF2104115, 纯度 98%) 对照品均购自成都埃法生物科技股份有限公司; 对羟基苯甲醛 (自制, 纯度 >98%)、1, 1-二苯基-2-苦基肼 (DPPH) 自由基、2, 2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS<sup>+</sup>) 自由基对照品均购自美国 Sigma 公司; 酪氨酸酶、左旋多巴对照品均购自上海麦克林生化科技有限公司; 抗坏血酸对照品购自西陇科学股份有限公司。白及购自江山六禾中药材有限公司, 经浙江药科职业大学罗益远副教授鉴定为兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎。乙腈为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 水为纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

## 2 方法与结果

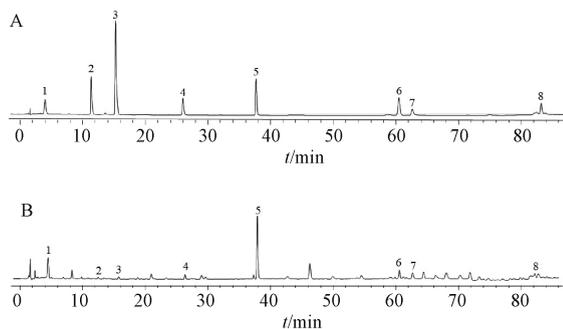
### 2.1 含量测定 采用 HPLC 法。

2.1.1 色谱条件 Agilent-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 0.1% 甲酸 (A) -乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 5%~17% B; 10~12 min, 17%~17.5% B; 12~18 min, 17.5% B; 18~22 min, 17.5%~20% B; 22~27 min, 20% B; 27~40 min, 20%~30% B; 40~50 min, 30% B; 50~60 min, 30%~38% B; 60~65 min, 38% B; 65~75 min, 38%~42% B; 75~85 min, 42%~55% B; 85~90 min, 55% B; 90~94 min, 55%~5% B; 94~96 min, 5% B); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 270 nm; 进样量 10 μL。色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取天麻素、原儿茶醛、对羟基苯甲醛、1, 4-二 [4- (葡萄糖氧) 苄基] -2-异丁基苹果酸酯-2-葡萄糖苷、1, 4-二 [4- (葡萄糖氧) 苄基] -2-异丁基苹果酸酯、山药素 III、二氢赤松素、3'-O-甲基山药素 III 对照品适量, 制成质量浓度分别为 285.00、10.00、12.50、100.00、760.00、60.00、30.00、20.00 μg/mL 的溶液, 即得。

2.1.3 供试品溶液制备 精密称取药材粉末 (过 3 号筛) 0.50 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 15 mL 55% 乙醇, 超声处理 49 min (或按相应工艺进行提取), 共 2 次, 提取液置于 50 mL 量瓶中, 相应溶剂稀释至刻度, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取“2.1.2”项下对照品溶液适量, 50% 甲醇依次稀释 4、8、16、32、64、128、256 倍, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰



注: A 为对照品, B 为供试品。

1. 天麻素 2. 原儿茶醛 3. 对羟基苯甲醛 4. 1, 4-二 [4- (葡萄糖氧) 苄基] -2-异丁基苹果酸酯-2-葡萄糖苷 5. 1, 4-二 [4- (葡萄糖氧) 苄基] -2-异丁基苹果酸酯 6. 山药素 III 7. 二氢赤松素 8. 3'-O-甲基山药素 III
1. gastrodin 2. protocatechualdehyde 3. *p*-hydroxybenzaldehyde 4. 1, 4-bis [4- (gluconoxy) benzyl] -2-isobutylmalate-2-glucoside 5. 1, 4-bis [4- (gluconoxy) benzyl] -2-isobutylmalate 6. yam III 7. dihydropinosin 8. 3'-O-methylyam III

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

面积为纵坐标 (Y) 进行回归, 结果见表 1, 可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/ (μg·mL <sup>-1</sup> )
天麻素	$Y=446.6X+1582.6$	0.9993	4.45~285.00
原儿茶醛	$Y=28676.0X-2974.1$	0.9992	0.16~10.00
对羟基苯甲醛	$Y=90683.0X+355.2$	0.9997	0.20~12.50
1,4-二 [4- (葡萄糖氧) 苄基] -2-异丁基苹果酸酯-2-葡萄糖苷	$Y=3405.6X-5886.4$	0.9991	0.78~100.00
1,4-二 [4- (葡萄糖氧) 苄基] -2-异丁基苹果酸酯	$Y=3724.3X-2786.2$	0.9997	2.97~760.00
山药素 III	$Y=2818.5X-221.7$	0.9991	1.58~60.00
二氢赤松素	$Y=10238.0X-11641.0$	0.9996	0.94~30.00
3'-O-甲基山药素 III	$Y=12407.0X+1210.5$	0.9994	0.06~20.00

2.1.5 精密度试验 取同一份对照品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得天麻素、原儿茶醛、对羟基苯甲醛、1, 4-二 [4- (葡萄糖氧) 苄基] -2-异丁基苹果酸酯-2-葡萄糖苷、1, 4-二 [4- (葡萄糖氧) 苄基] -2-异丁基苹果酸酯、山药素 III、二氢赤松素、3'-O-甲基山药素 III 峰面积 RSD 分别为 3.33%、0.80%、0.74%、1.92%、1.07%、0.43%、2.35%、3.34%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 精密称取同一批药材, 按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 测得天麻素、

原儿茶醛、对羟基苯甲醛、1, 4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯-2-葡萄糖苷、1, 4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯、山药素Ⅲ、二氢赤松素、3'-*O*-甲基山药素Ⅲ提取量 RSD 分别为 2.02%、3.39%、2.59%、1.80%、0.70%、2.82%、3.10%、3.65%，表明该方法重复性良好。

**2.1.7 稳定性试验** 精密称取同一批药材，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，于 0、3、6、9、12、24 h 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得天麻素、原儿茶醛、对羟基苯甲醛、1, 4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯-2-葡萄糖苷、1, 4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯、山药素Ⅲ、二氢赤松素、3'-*O*-甲基山药素Ⅲ提取量 RSD 分别为 3.35%、1.96%、3.24%、1.83%、1.55%、3.37%、1.54%、2.50%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.1.8 加样回收率试验** 精密称取同一批各成分含量已知的药材 0.25 g，加入适量对照品溶液，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，天麻素、原儿茶醛、对羟基苯甲醛、1, 4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯-2-葡萄糖苷、1, 4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯、山药素Ⅲ、二氢赤松素、3'-*O*-甲基山药素Ⅲ平均加样回收率分别为 96.9%、95.3%、102.3%、98.7%、101.1%、100.5%、103.3%、95.7%，RSD 分别为 4.74%、2.95%、4.98%、1.36%、4.29%、2.81%、4.05%、3.43%。

**2.2 单因素试验** 分别对提取时间 (20、30、40、50、60 min)、料液比 (1:10、1:20、1:30、1:40、1:50)、乙醇体积分数 (50%、60%、70%、80%、90%)、提取次数 (1、2、3) 进行考察。

**2.2.1 提取时间** 如图 2A 所示，在 30~60 min 内总提取量随着提取时间延长先升高后降低，为 50 min 时达到最大值。因此，选择 40、50、60 min 进行后续优化。

**2.2.2 料液比** 如图 2B 所示，总提取量随着料液比增加先升高后降低，当 1:30 时达到最大值。因此，选择 1:20、1:30、1:40 进行后续优化。

**2.2.3 乙醇体积分数** 如图 2C 所示，在 50%~60% 内总提取量呈升高趋势，为 60% 时达到最大值。因此，选择 50%、60%、70% 进行后续优化。

**2.2.4 提取次数** 如图 2D 所示，提取次数对提取量的影响较小，为 2 次时达到最大值。因此，固定提取次数为 2 次，不再进行后续优化。

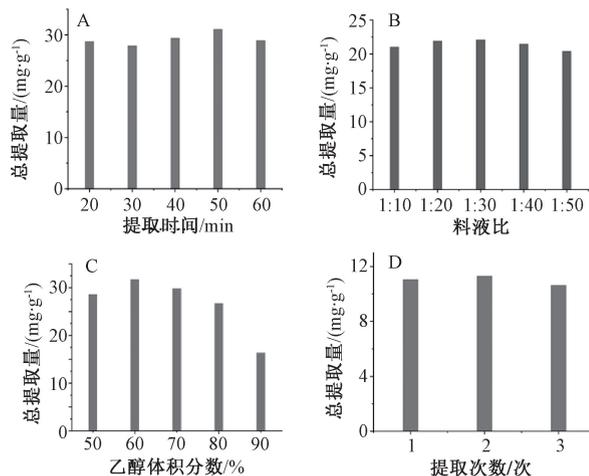


图 2 单因素试验结果

Fig. 2 Results for single factor test

**2.3 Box-Behnken 响应面法** 在单因素试验基础上，选择超声时间 (A)、乙醇体积分数 (B)、料液比 (C) 作为影响因素，各成分总提取量 (Y) 作为评价指标，每个因素设置 3 个水平，采用 Design Expert13.0 软件进行优化，结果见表 2。

通过 Design Expert13.0 软件对表 2 数据进行多元回归拟合，得方程为  $Y = -66.414 2 + 0.908 8A + 6.179 7B + 9.039 1C + 0.016 7AB - 0.071 9AC - 0.001 9BC - 0.018 6A^2 - 0.063 8B^2 - 6.065 1C^2$ ，方差分析见表 3。由此可知，模型  $P < 0.05$ ，具有高度显著性；失拟项  $P > 0.05$ ，表明未知因素对结果影响较小；决定系数  $R^2$  为 0.879 5，校正决定系数  $R^2_{adj}$  为 0.724 7，表明模型拟合程度良好；变异系数 (CV) 为 3.67%，表明模型置信度较高，能反映真实值<sup>[12]</sup>；因素 B、C、 $B^2$ 、 $C^2$  有显著或极显著影响 ( $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ )，表明简单的线性关系不能直接反映各因素影响；各因素影响程度依次为  $B > C > A$ 。响应面分析见图 3。

**2.4 验证试验** 图 3 显示，最优工艺为提取时间 48.10 min，乙醇体积分数 54.74%，料液比 1:30.45，总提取量为 12.97 mg/g，考虑到可操作性，将其修正为提取时间 49 min，乙醇体积分数 55%，料液比 1:30。按上述优化工艺进行 3 批验证试验，测得总提取量分别为 13.14、13.38、12.98 mg/g，平均值为 13.17 mg/g，RSD 为 1.53%，与预测值 12.97 mg/g 接近，表明模型具有较高的准确度和良好的预测性。

表2 Box-Behnken 响应面法设计与结果

Tab. 2 Design and results for Box-Behnken response surface method

试验号	A 提取时间/ min	B 乙醇体积 分数/%	C 料液比	提取量/(mg·g <sup>-1</sup> )								Y 总提取量/ (mg·g <sup>-1</sup> )
				1	2	3	4	5	6	7	8	
1	60	60	1:40	3.588	0.109	0.032	1.336	5.571	0.876	0.495	0.130	12.14
2	40	50	1:30	3.890	0.106	0.031	1.320	5.462	0.789	0.431	0.046	12.08
3	40	60	1:40	3.612	0.111	0.033	1.316	5.595	0.935	0.498	0.124	12.22
4	60	60	1:20	3.201	0.101	0.030	1.286	5.106	0.847	0.448	0.071	11.09
5	50	70	1:40	2.298	0.109	0.034	1.310	5.470	0.964	0.496	0.070	10.75
6	60	50	1:30	3.527	0.114	0.032	1.355	5.502	0.857	0.429	0.068	11.88
7	50	50	1:40	3.710	0.107	0.032	1.606	5.658	0.835	0.430	0.081	12.46
8	50	60	1:30	3.566	0.111	0.033	1.336	5.474	0.927	0.468	0.236	12.15
9	50	60	1:30	3.616	0.111	0.033	1.329	5.801	0.904	0.469	0.173	12.44
10	50	60	1:30	3.495	0.110	0.033	1.324	5.457	0.912	0.478	0.282	12.09
11	60	70	1:30	2.438	0.109	0.031	1.237	6.024	1.020	0.445	0.065	11.37
12	50	70	1:20	2.053	0.101	0.031	1.255	5.160	0.691	0.434	0.087	9.81
13	40	70	1:30	3.023	0.104	0.030	1.205	5.048	0.848	0.448	0.184	10.89
14	50	60	1:30	3.365	0.090	0.033	1.329	5.625	0.927	0.516	0.154	12.04
15	50	60	1:30	4.565	0.065	0.025	1.319	5.669	0.895	0.461	0.177	13.18
16	40	60	1:20	2.523	0.108	0.031	1.202	5.567	0.854	0.522	0.085	10.89
17	50	50	1:20	3.508	0.105	0.031	1.287	5.114	0.819	0.428	0.222	11.51

注: 1~8 分别为天麻素、原儿茶醛、对羟基苯甲醛、1, 4-二 [4- (葡萄糖氧) 苄基] -2-异丁基苹果酸酯-2-葡萄糖苷、1, 4-二 [4- (葡萄糖氧) 苄基] -2-异丁基苹果酸酯、山药素Ⅲ、二氢赤松素、3'-O-甲基山药素Ⅲ。

表3 方差分析结果

Tab. 3 Results for analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	940.8	9	104.53	5.68	0.016 1
A	2.01	1	2.01	0.109 1	0.750 8
B	326.34	1	326.34	17.73	0.004 0
C	227.2	1	227.2	12.34	0.009 8
AB	11.21	1	11.21	0.608 7	0.460 8
AC	2.07	1	2.07	0.112 4	0.747 2
BC	0.001 4	1	0.001 4	0.000 1	0.993 2
A <sup>2</sup>	14.61	1	14.61	0.793 8	0.402 5
B <sup>2</sup>	171.35	1	171.35	9.31	0.018 6
C <sup>2</sup>	154.89	1	154.89	8.41	0.023 0
残差	128.85	7	18.41	—	—
失拟项	40.1	3	13.37	0.602 4	0.647
纯误差	88.75	4	22.19	—	—
总和	1 069.65	16	—	—	—

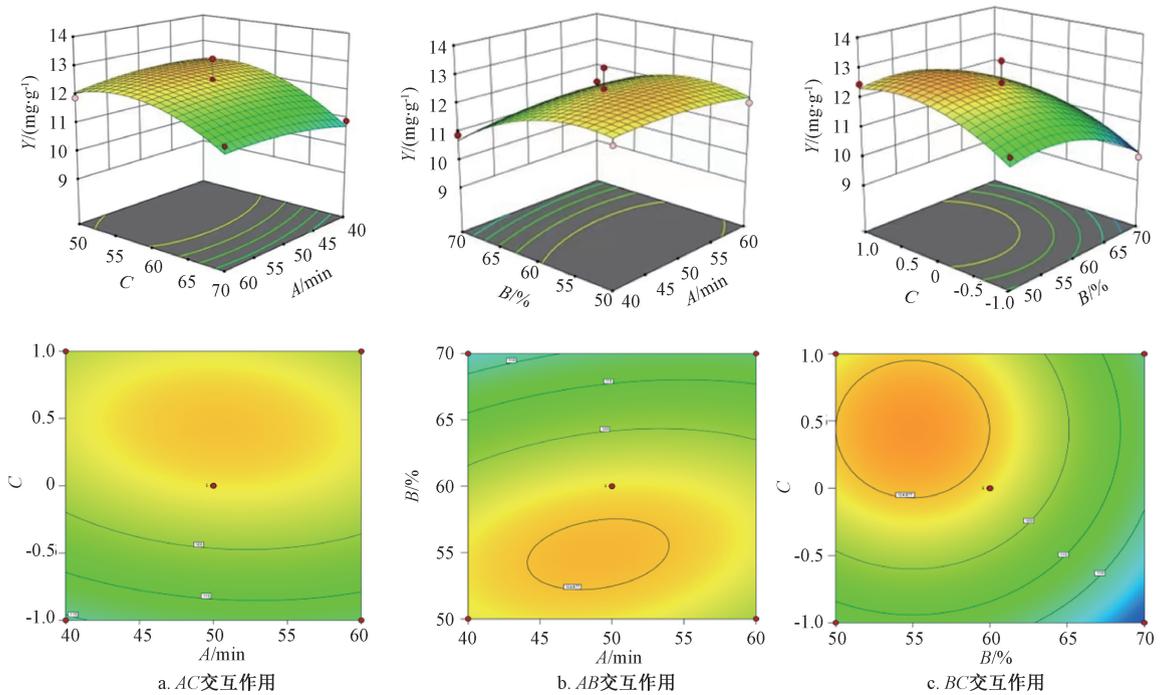
2.5 抗氧化、酪氨酸酶抑制活性研究

2.5.1 DPPH 自由基清除能力 参照文献 [13] 报道, 制备 0.2 mmol/L DPPH 乙醇溶液, 低温避光保存, 现配现用。取不同质量浓度 (5、10、20、40、80 μL/mL) 样品溶液各 100 μL, 置于 96 孔板中, 加入 100 μL DPPH 乙醇溶液, 混匀, 暗处反应 30 min, 在 517 nm 波长处测定吸光度 A<sub>1</sub>, 以无水乙醇代替 DPPH 乙醇溶液, 测定吸光度 A<sub>2</sub>; 以无水乙醇代替样品溶液, 测定吸光度 A<sub>0</sub>, 平行 3 次, 以维生素 C 为阳性对照, 计算 DPPH 自由基清除率, 公式为清除率 =  $\left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$ , 结果

见图 4A。由此可知, 在 10~80 μg/mL 范围内随着提取物质量浓度增加, DPPH 自由基清除率升高, 分别为 26.17%、43.21%、72.44%、92.42%、97.13%, IC<sub>50</sub> 为 10.12 μg/g, 而维生素 C 的 IC<sub>50</sub> 为 3.48 μg/g。

2.5.2 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力 参照文献 [14] 报道, 将 7 mmol/L ABTS<sup>+</sup> 溶液与 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液按 1:1 比例混合, 室温避光保存 12~16 h, pH 7.4 磷酸盐缓冲液稀释约 20 倍。取不同质量浓度 (200、400、750、800、950 μL/mL) 样品溶液各 50 μL, 置于 96 孔板中, 加入 150 μL ABTS<sup>+</sup> 溶液混匀, 暗处反应 5 min, 在 734 nm 波长处测定吸光度 A<sub>1</sub>; 以 150 μL 纯化水代替 ABTS<sup>+</sup> 溶液, 测定吸光度 A<sub>2</sub>; 以 50 μL 纯水代替样品溶液, 测定吸光度 A<sub>0</sub>, 平行 3 次, 以维生素 C 为阳性对照, 计算 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率, 公式为清除率 =  $\left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$ , 结果见图 4B。由此可知, 在 200~950 μg/mL 范围内随着提取物质量浓度增加, ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率升高, 分别为 34.68%、56.56%、76.15%、82.46%、92.60%, IC<sub>50</sub> 为 314.07 μg/g, 而维生素 C 的 IC<sub>50</sub> 为 2.76 μg/g。

2.5.3 酪氨酸酶抑制活性 参照文献 [15-16] 报道, 加入 70 mmol/L pH 6.8 PBS 缓冲液、10 mmol/L 左旋多巴溶液、不同质量浓度 (0.2、22、



注：A、B、C、Y分别为提取时间、乙醇体积分数、料液比、总提取量。上方3张小图为三维曲面图，下方3张小图为等高线图。

图3 各因素响应面图

Fig. 3 Response surface plots for various factors

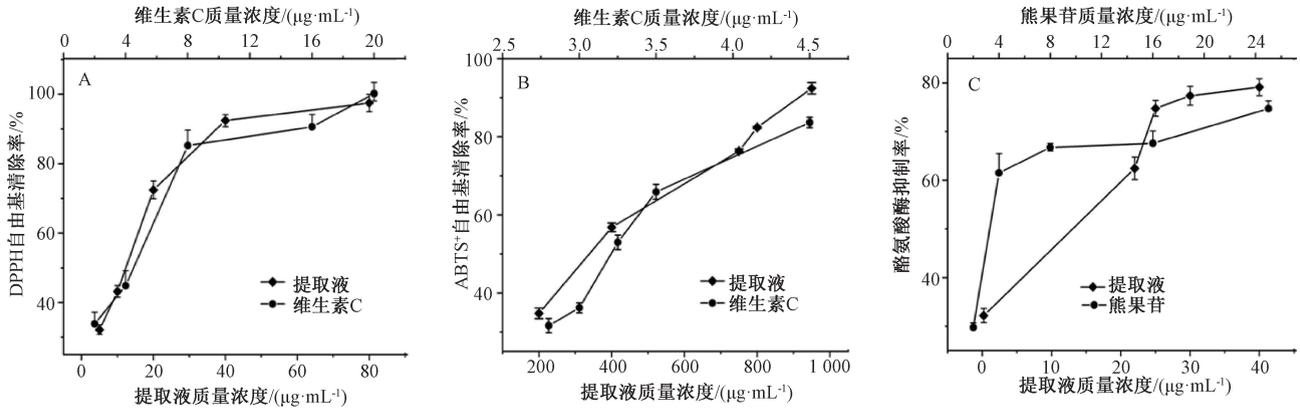


图4 白及提取液抗氧化、酪氨酸酶抑制活性测定结果

Fig. 4 Results for anti-oxidant, tyrosinase inhibitory activities of *Bletillae Rhizoma* extract

25、30、40  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) 样品溶液各 100  $\mu\text{L}$ ，置于 96 孔板中混匀，在 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温装置中反应 5 min，加入 50  $\mu\text{L}$  125 U/mL 酪氨酸酶溶液，37  $^{\circ}\text{C}$  恒温反应 15 min，在 475 nm 波长处测定吸光度 A；以 50  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液代替酪氨酸酶溶液，测定吸光度  $A_0$ ；以 100  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液代替样品溶液，测定吸光度 B；以 150  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液代替样品溶液与酪氨酸酶溶液，测定吸光度  $B_0$ ，平行 3 次，以熊果苷为阳性对照，计算酪氨酸酶抑制率，公式为抑制率 =  $\left(1 - \frac{A - A_0}{B - B_0}\right) \times 100\%$ ，结果见图 4C。由此可知，在 0.20~40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内随着提取物质量浓度增加，

酪氨酸酶抑制率升高，分别为 32.19%、62.42%、74.72%、77.33%、79.12%， $\text{IC}_{50}$  为 1.70  $\mu\text{g}/\text{g}$ ，而熊果苷的  $\text{IC}_{50}$  为 2.57  $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

### 3 讨论与结论

目前，关于白及提取工艺的研究主要集中在多糖<sup>[17-18]</sup>，但该药材还含有大量苹果酸酯类、联苕类、酚酸类等成分，具有显著的止血、抗炎、抗肿瘤、益智、延缓衰老、神经保护等活性<sup>[2,19]</sup>，并且相关报道较少。韩雪<sup>[20]</sup>等基于指纹图谱与多元统计对白及提取工艺进行研究，发现提取溶剂体积分数对其成分种类、含量的影响较大，与本实验结果基本一致。

与均匀设计、正交设计相比, Box-Behnken 响应面法更真实准确, 广泛用于工艺优化中<sup>[21-22]</sup>。本实验采用该方法优化白及提取工艺, 发现其简便、可靠、稳定, 并且所得提取物具有较强的抗氧化、酪氨酸酶抑制活性, 可为该药材综合开发利用奠定基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 107.
- [ 2 ] He X R, Wang X X, Fang J C, et al. *Bletilla striata*: Medicinal uses, phytochemistry and pharmacological activities[J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 195: 20-38.
- [ 3 ] Lee G Y, Cho B O, Shin J Y, et al. Tyrosinase inhibitory components from the seeds of *Cassia tora*[J]. *Arch Pharm Res*, 2018, 41(5): 490-496.
- [ 4 ] 孔伟华, 徐建波, 崔琦, 等. 白及化学成分、药理作用和白及多糖提取工艺的研究进展[J]. 中医药信息, 2021, 38(9): 69-78.
- [ 5 ] Luo Y Y, Wang J, Li S, et al. Discovery and identification of potential anti-melanogenic active constituents of *Bletilla striata* by zebrafish model and molecular docking[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2022, 22(1): 9.
- [ 6 ] 李敏, 郭顺星, 王春兰, 等. 2-异丁基苹果酸葡萄糖氧基苯酯类化合物在兰科植物中的分布特点及药理活性[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(10): 724-726.
- [ 7 ] 刘刚, 刘金梅, 穆开朗, 等. 2-异丁基苹果酸葡萄糖氧基苯酯类对照提取物在白及质量控制中的应用研究[J]. 中草药, 2023, 54(4): 1260-1266.
- [ 8 ] Zhang C C, Ning D D, Pan J L, et al. Anti-inflammatory effect fraction of *Bletilla striata* and its protective effect on LPS-induced acute lung injury[J]. *Mediators Inflamm*, 2021, 2021: 6684120.
- [ 9 ] Xiao G R, Tang R, Yang N, et al. Review on pharmacological effects of gastrodin[J]. *Arch Pharm Res*, 2023, 46(9-10): 744-770.
- [ 10 ] Zhai D H, Lv X F, Chen J M, et al. Recent research progress on natural stilbenes in *Dendrobium* species[J]. *Molecules*, 2022, 27(21): 7233.
- [ 11 ] 李骅轩, 崔淑君, 肖朝江, 等. 厚皮香酚性成分及其镇痛活性[J]. 中成药, 2019, 41(7): 1582-1586.
- [ 12 ] 张群飞, 徐大伦, 杨文鸽. 响应面法优化碱性蛋白酶解解蚌籽的工艺条件[J]. 核农学报, 2014, 28(5): 876-882.
- [ 13 ] 郑亚男, 蔡旭, 邓艾平. 荔枝壳多酚超声辅助双水相提取工艺优化及其体外抗氧化活性研究[J]. 中成药, 2023, 45(12): 4102-4108.
- [ 14 ] 王洁, 侯敏娜, 王梅, 等. 响应面法优化超声提取益母草中多酚工艺及其抗氧化作用研究[J]. 世界中医药, 2023, 18(20): 2872-2877.
- [ 15 ] 郭小莉, 李红娟, 高如意, 等. 人参须浸膏真空带式干燥工艺优化及其总酚对酪氨酸酶的抑制活性[J]. 中成药, 2019, 41(11): 2741-2745.
- [ 16 ] Zhang J C, Wang C T, Wang C T, et al. Understanding the role of extracts from sea buckthorn seed residues in anti-melanogenesis properties on B16F10 melanoma cells[J]. *Food Funct*, 2018, 9(10): 5402-5416.
- [ 17 ] Zhu Z M, Liang T T, Dai G N, et al. Extraction, structural-activity relationships, bioactivities, and application prospects of *Bletilla striata* polysaccharides as ingredients for functional products: A review[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 245: 125407.
- [ 18 ] 王坤堂, 王逸伦, 崔元璐, 等. 白及多糖药理作用及在中药现代制剂领域的研究进展[J]. 中成药, 2023, 45(7): 2281-2287.
- [ 19 ] 赵菲菲, 杨馨, 徐丹, 等. 白及非多糖组分的止血作用及其机制的初步研究[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(8): 1121-1126.
- [ 20 ] 韩雪, 曾庆鸿, 孔娇, 等. 基于指纹图谱与多元统计方法优化白及提取工艺[J]. 黑龙江农业科学, 2021(10): 107-112.
- [ 21 ] 杜义龙, 田孟尧, 李艳荣, 等. 山楂叶中4种黄酮提取工艺的优化[J]. 中成药, 2022, 44(10): 3283-3286.
- [ 22 ] 栗焕焕, 毛莹莹, 张国琴, 等. 响应面分析法优化吴茱萸提取工艺及多指标定量指纹图谱研究[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(11): 5716-5720.