

·方与药·

高金线兰多糖提取工艺优化及抗氧化、免疫调节活性研究

林 焰¹, 林 婷¹, 唐小绘¹, 吴锦忠¹, 郑承剑², 吴岩斌^{1*}

(1.福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122; 2.海军军医大学药学院, 上海 200433)

摘要: 目的 优化高金线兰多糖(polysaccharides of *Anoectochilus elatus* Lindl., AEP)的提取工艺, 观察其抗氧化和免疫调节活性。方法 通过单因素试验和响应面优化试验考察提取温度、料液比、提取时间和提取次数对AEP提取率的影响, 确定热水法提取高金线兰多糖的最佳提取工艺; 采用高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)、PMP柱前衍生化高效液相色谱法(PMP-HPLC)和傅里叶红外光谱法(FT-IR)分析AEP的结构特征; 通过1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)和自由基羟基($\cdot\text{OH}$)清除活性测定AEP的抗氧化活性, 通过检测AEP对巨噬细胞活性、吞噬活性和一氧化氮(NO)及活性氧(ROS)释放的影响, 评估其免疫调节活性。结果 提取温度、提取次数、提取时间和料液比均对热水法提取AEP的提取率有影响, 最佳提取条件为提取温度100℃、料液比1:25 g/mL、提取时间150 min、提取3次, 在此条件下AEP提取率为(9.41±0.19)%。AEP分子量为13 499 Da, 是一种杂多糖, 主要包括甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖等。AEP质量浓度为4 mg/mL时, DPPH和 $\cdot\text{OH}$ 清除率分别为(55.68±0.12)%和(41.29±0.60)%。与空白组比较, 62.5~1 000 $\mu\text{g/mL}$ AEP组细胞存活率无明显下降, 且都在90%以上。与空白组比较, LPS组及125、250、500 $\mu\text{g/mL}$ AEP组细胞吞噬率、NO释放量和ROS生成量均有所提高($P<0.05$); 与125 $\mu\text{g/mL}$ AEP组和250 $\mu\text{g/mL}$ AEP组比较, 500 $\mu\text{g/mL}$ AEP组细胞吞噬率、NO释放量和ROS生成量均更高($P<0.05$)。结论 优化后的提取工艺可提高AEP提取率; 提取的AEP具有良好抗氧化活性和免疫调节能力。

关键词: 高金线兰; 多糖; 响应面优化; 抗氧化; 免疫调节

目前, 全世界约有金线兰属植物40余种, 中国有22种, 其中金线兰 *Anoectochilus roxburghii* 分布较广, 是“福九味”之一金线莲的基原植物^[1-2], 临床上多用于治疗乙型肝炎、手足口病、肺炎等疾病^[3-5]。金线兰属植物形态相似, 较难鉴别, 在民间多被当作金线莲使用, 具有清热解暑、祛风除湿等功效^[6-7]。高金线兰 *Anoectochilus elatus* Lindl. 是课题组在云南省发现的金线兰属植物中国新记录种^[8], 主要含有多糖、内酯苷以及黄酮类成分^[7-9]。

多糖是金线兰属植物主要活性成分之一, 含量占药材干重的10%左右^[10], 具有抗氧化、抗肝损伤、降血糖、抗肿瘤、免疫调节、抗骨质疏松、抗炎、减肥、抗类风湿关节炎等生物活性^[11-12]。研究表明, 金线兰多糖、浙江金线兰多糖和长片金线兰多糖均具有显著的体内抗氧化活性^[13-15]; 此外金线兰多糖也具有良好的免疫调节活性^[16]。课题组前期研究发现高金线兰多糖具有显著的镇痛作用^[9], 但关于高金线兰多糖提取工艺、抗氧化及免疫调节活性等方面有待进一步研究。金线兰属植物多糖类成分常用的提取方法有热水提取法、超声波提取法、微波提取法、酶辅助提取法等^[17], 其中热水提取法操作简单、环保、成本低, 适合产业化生产^[18], 应用最为广泛。本研究通过单因素试验和响应面法探究

热水法提取高金线兰多糖(polysaccharides of *Anoectochilus elatus* Lindl., AEP)的最佳提取条件, 采用高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)、PMP柱前衍生化高效液相色谱法(PMP-HPLC)和傅里叶红外光谱法(FT-IR)分析AEP的结构特征, 并通过体外实验探讨其抗氧化活性及免疫调节活性, 为更好地开发和利用高金线兰多糖提供参考。

1 材料

1.1 实验仪器 多功能酶标仪(湖南博朔生物科技有限公司, 型号: Infinite 200 PRO); 冷冻干燥机(北京松源华兴生物技术有限公司, 型号: 230329 LDGZJ-0210); 高效液相色谱仪-示差折光检测器(美国 Waters 公司, 型号: e2695); 高效液相色谱仪-蒸发光散射检测器(上海通威分析技术有限公司, 型号: EasyEep-3030); 傅里叶红外光谱仪(美国 Thermo Fisher 公司, 型号: Nicolet iS5)。

1.2 药品与试剂 高金线兰种源来自云南省西双版纳傣族自治州, 实验所用样品为栽培品, 由儒兰(福建)生物科技有限公司提供, 经福建中医药大学药学院吴岩斌副研究员鉴定为高金线兰 *Anoectochilus elatus* Lindl. 的全草; D-无水葡萄糖(批号: G2102165)、三氟乙酸(TFA, 批号: H2216262)、苯酚(批号: B2216471)、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP, 批号: B2217151)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; D-阿拉伯糖(批号: Z23D11H135480, 纯度: $\geq 99\%$)、D-(+)-半乳糖醛酸(批号: JB270120, 纯

收稿日期: 2025-07-08; 接受日期: 2025-11-15

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2024J01774); 福建中医药大学校管课题(X2024031)

通信作者: 吴岩斌, E-mail: wxsq1@163.com

DOI: 10.13260/j.cnki.fjtc.2025.12010

度:≥98%)、D-甘露糖(批号:C25D8H51117,纯度:≥98%)、D-葡萄糖醛酸(批号:R09J11H115178,纯度:≥98%)、D(+)-无水葡萄糖(批号:JB316019,纯度:≥98%)、鼠李糖(批号:SA0411GA13,纯度:≥98%)、D-半乳糖(批号:Z22J9H64187,纯度:≥98%)、木糖(批号:B02M6W1,纯度:≥99%)均购自上海源叶生物科技有限公司;脂多糖(LPS, Sigma-Aldrich 公司,批号:1001164401);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH, 京东化成工业株式会社,批号:464RB-GE);维生素C(北京鼎国昌盛生物技术有限公司,批号:1B310330);RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞系(上海富衡生物科技有限公司,货号:FH0328);一氧化氮(NO)检测试剂盒(批号:A060241107)、中性红细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(批号:A175241209)和活性氧(ROS)检测试剂盒(批号:080923240403)均购自上海碧云天生物有限公司。

2 方法

2.1 AEP 含量及提取率计算

2.1.1 标准曲线的绘制 精密称取无水葡萄糖对照品 50 mg,置于 100 mL 容量瓶中,加蒸馏水定容至 100 mL 得到 0.5 mg/mL 葡萄糖溶液,将葡萄糖浓度分别稀释至 0.05、0.1、0.15、0.35、0.5 mg/mL。取 200 μL 各浓度葡萄糖溶液加 200 μL 5% 苯酚和 1 mL 浓硫酸,混匀后 95 °C 水浴 20 min,取出冷却至室温。于 490 nm 处测定吸光度,以葡萄糖浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

2.1.2 AEP 供试品溶液的制备 取 2 g 高金线兰粉末,以不同料液比加入蒸馏水,在不同温度下提取相应的时间和次数,提取高金线兰,合并滤液。取 5 mL 滤液,加入 4 倍无水乙醇醇沉,4 °C 静置 12 h,离心,沉淀经纯水复溶并加纯水稀释,即得 AEP 供试品溶液。

2.1.3 多糖提取率计算 参考文献[19],按“2.1.2 项”下的方法得到供试品溶液,于 490 nm 处测定吸光度,代入“2.1.1 项”下得到的标准曲线,计算供试品中多糖质量浓度。多糖提取率计算公式如下:

$$\text{多糖提取率} = \frac{c \times D \times V}{m} \times 100\%$$

注:c 多糖质量浓度/(mg/mL);D 稀释倍数;V 总体积/mL;m 为高金线兰质量/mg

2.2 单因素试验 考察提取温度(60、70、80、90、100 °C)、料液比(1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 g/mL)、提取时间(60、90、120、150、180 min)和提取次数(1、2、3、4、5 次)对 AEP 提取率的影响。

2.3 响应面优化试验设计 根据单因素试验结果,开展 Box-Behnken 法优化实验,响应面设计因素与水平见表 1。

表 1 响应面设计因素与水平表

因素	水平		
	-1	0	1
提取温度/°C	80	90	100
料液比/(g/mL)	1:20	1:25	1:30
提取时间/min	90	120	150
提取次数/次	2	3	4

2.4 AEP 的提取 新鲜高金线兰 60 °C 烘干,粉碎,称取适量粉末,按最佳提取工艺提取,提取液过滤后浓缩至小体积,加入 4 倍体积的无水乙醇,于 4 °C 醇沉 12 h,沉淀用无水乙醇洗涤 3 次,加入适量纯水复溶后冷冻干燥,得到 AEP 冻干粉末。

2.5 相对分子质量测定 采用 HPGPC 法检测 AEP 的相对分子质量。分别称取 2 mg 多糖样品和标准品(Mw:1×10³、5×10⁴、8.0×10⁴、2.7×10⁵、4.1×10⁵和 6.7×10⁵ Da)溶于 1 mL 流动相(0.1 mol/L 的氯化钠)中。流速:0.5 mL/min;柱温:30 °C;检测器:示差检测器(RID);色谱柱:Shodex SB-805(300 mm×8.0 mm,13 μm)和 Shodex SB-802(300 mm×8.0 mm,8 μm)串联;进样体积:60 μL。以标准品的保留时间为横坐标,分子量对数值为纵坐标,绘制标准曲线。将 AEP 的保留时间代入标准曲线,计算 AEP 分子量。

2.6 单糖组成分析

2.6.1 配制混合对照品溶液 称取对照品甘露糖、鼠李糖、半乳糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸各 6 mg 和葡萄糖 10 mg 置于 5 mL 容量瓶中,加超纯水定容,混匀。

2.6.2 多糖水解及衍生化 参考文献[20],采用 PMP-HPLC 法测定样品单糖组成。称取 10 mg AEP,至 5 mL 容量瓶中,1 mL 超纯水溶解,再加入浓度为 4 mol/L 的 TFA 溶液 1 mL,混匀,封口,110 °C 降解 2 h。冷却后,调节 pH 至中性,加入超纯水稀释至 5 mL,得供试品溶液。吸取待测样品溶液和混合对照品溶液各 200 μL,置于 5 mL 离心管中,加入浓度为 0.3 mol/L 的 NaOH 溶液和浓度为 0.5 mol/L 的 PMP 甲醇溶液各 200 μL,混匀,70 °C 水浴 70 min,冷却至室温。加入 200 μL 0.3 mol/L HCl 溶液、200 μL 超纯水,混匀,加入氯仿萃取。重复萃取 3 次,上清经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后备用。

2.6.3 色谱条件 色谱柱:Agilent HC-C18(250 mm×4.6 mm,5 μm);柱温:30 °C;检测波长:250 nm;流动相 A:0.1 mol/L 乙酸铵缓冲溶液,流动相 B:乙腈;梯度洗脱程序[时间(A 相:B 相)]:0~20 min(83:17~81:19 V/V),20~35 min(81:19~82:18 V/V),36~60 min(82:18 V/V~85:15 V/V);流速:1 mL/min;进样量:10 μL。

2.7 傅里叶红外光谱法(FT-IR)分析 将 1 mg AEP 与 100 mg 溴化钾进行混合研磨,压成薄片,用红外光谱仪在 4 000~400 cm^{-1} 范围进行扫描。

2.8 体外抗氧化活性研究

2.8.1 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除活性测定 参考文献[21],分别吸取 1 mL 浓度为 0.125、0.25、0.5、1、2 mg/mL 的 AEP 供试品溶液(供试品组)和维生素 C 溶液(维生素 C 组)置于不同的试管中,分别加入 1 mL 浓度为 0.1 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液,同时设置纯水+DPPH 作为空白组,AEP+无水乙醇溶液作为对照组,混匀后室温避光反应 30 min。在 517 nm 处测得空白组吸光度值 A_0 、供试品组和维生素 C 组吸光度值 A_1 、对照组吸光度值 A_2 ,AEP 对 DPPH 自由基的清除率计算公式如下:

$$\text{DPPH清除率} = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%$$

2.8.2 羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除活性测定 参考文献[21],分别吸取 1 mL 浓度为 0.125、0.25、0.5、1、2 mg/mL 的 AEP 供试品溶液(供试品组)和维生素 C 溶液(维生素 C 组)置于不同的试管中,依次加入 1 mL 浓度为 1.5 mmol/L 的 FeSO_4 溶液、0.3 mL 浓度为 20 mmol/L 的水杨酸钠溶液、0.7 mL 过氧化氢溶液(6 mmol/L),混匀,同时设置纯水+ FeSO_4 +水杨酸钠+过氧化氢作为空白组,AEP+ FeSO_4 +水杨酸钠+纯水作为对照组,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 15 min。在 510 nm 处测空白组吸光度值 A_0 、供试品组和维生素 C 组吸光度值 A_1 、对照组吸光度值 A_2 ,AEP 对 $\cdot\text{OH}$ 清除率计算公式如下:

$$\text{OH}\cdot\text{清除率} = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%$$

2.9 AEP 免疫活性研究

2.9.1 RAW264.7 细胞活性 采用 MTT 法评估 AEP 对 RAW264.7 细胞活性的影响。将细胞以 5 000/孔接种于 96 孔板,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育 24 h,随机分为空白组、LPS 组和不同浓度 AEP 组,每组 3 个复孔,空白组加入 100 μL 培养液,LPS 组加入 100 μL 含 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 的培养液,不同浓度 AEP 组分别添加 100 μL 含 62.5、125、250、500、1 000、2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AEP 的培养液;继续孵育 24 h 后,去除培养基,加入 MTT 溶液孵育 4 h。随后,加入 DMSO 150 μL ,震荡后于 490 nm 处测定吸光度,以空白组吸光度作为参照,计算细胞活性。

2.9.2 RAW264.7 细胞吞噬活性 参考文献[22],将细胞以 5 000 个/孔接种于 96 孔板,孵育 24 h 后随机分为空白组、LPS 组和不同浓度 AEP 组,空白组加入 100 μL 培养液,LPS 组加入 100 μL 含 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

LPS 的培养液,不同浓度 AEP 组分别添加 100 μL 含 125、250、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AEP 的培养液;继续孵育 24 h 后,弃去上清,使用 PBS 溶液清洗 1 次,加入 200 μL 细胞培养基,并加入 20 μL 中性红染色液,细胞培养箱孵育 2 h,去除含有中性红染色液的细胞培养液,用 PBS 溶液洗涤 1 次。随后加入 200 μL 中性红检测裂解液,室温摇床上裂解 10 min,振摇后在 540 nm 处测定吸光度,以空白组吸光度作为参照,计算细胞吞噬率。

2.9.3 NO 释放量 按照“2.9.2”项下分组干预 RAW264.7 细胞后,根据 NO 检测试剂盒说明书,测定 NO 释放量。

2.9.4 ROS 生成 将 RAW264.7 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板,孵育 24 h 后随机分为空白组、LPS 组和不同浓度 AEP 组,空白组加入 2 mL 培养液,LPS 组加入 2 mL 含 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 的培养液,不同浓度 AEP 组分别添加 2 mL 含 125、250、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AEP 的培养液;继续孵育 24 h 后弃去培养基,用 PBS 洗涤 3 次,每孔中加入 DCFH-DA 溶液(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)孵育 30 min。洗涤细胞。根据说明书测定荧光强度,荧光强度越强,表示 ROS 生成越多。

2.10 统计学方法 采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析。计量资料符合正态分布以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差检验,方差齐采用 LSD- t 检验进行多重比较;若方差不齐,则采用 Games-Howell 检验进行多重比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 单因素试验结果 单因素试验结果显示:提取温度在 60~100 $^{\circ}\text{C}$ 区间内,AEP 提取率先升高后平稳,100 $^{\circ}\text{C}$ 时 AEP 提取率达到峰值 7.84%,故选取 80、90、100 $^{\circ}\text{C}$ 提取温度用于优化实验;料液比在 1:15 g/mL~1:35 g/mL 区间内,AEP 提取率先升高后降低最终平稳,1:25 g/mL 时 AEP 提取率达到峰值 7.74%,故选取料液比 1:20 g/mL、1:25 g/mL、1:30 g/mL 用于优化实验;提取时间在 60~180 min 区间内,AEP 提取率先增后减最终平稳,120 min 时 AEP 提取率达峰值 7.59%,150 min 后趋于稳定,故选取提取时间 90、120、150 min 用于优化实验;提取次数在 1~5 次区间内,AEP 提取率先升高后平稳,4 次时 AEP 提取率达到峰值 8.81%,故选取提取次数 2、3、4 次用于优化实验。见图 1。

3.2 响应面试验结果

3.2.1 回归模型的建立与显著性分析 响应面试验优化设计及结果见表 2。采用 Design-Expert 13 软件进行多元回归拟合分析,获得二次多项式回归方程。

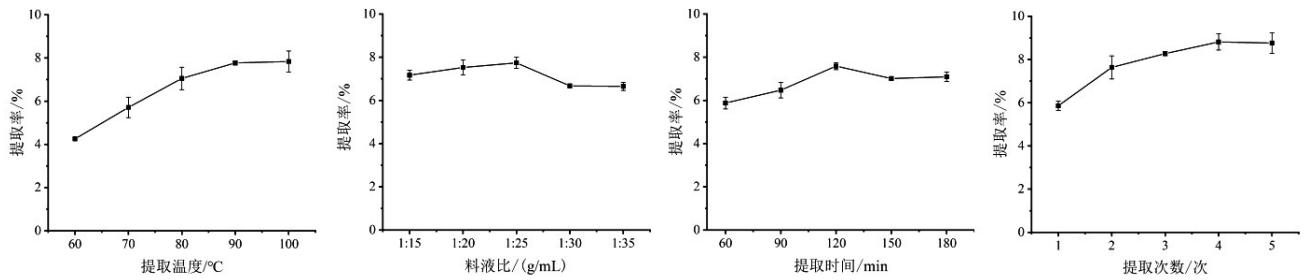


图1 单因素试验结果

表2 响应面优化设计及结果

试验号	提取温度	料液比	提取时间	提取次数	提取率/%	试验号	提取温度	料液比	提取时间	提取次数	提取率/%
1	-1	0	0	1	5.28	16	1	0	0	1	5.83
2	0	0	1	-1	6.89	17	0	0	0	0	8.53
3	1	0	-1	0	5.15	18	0	-1	-1	0	8.60
4	0	0	1	1	8.37	19	1	-1	0	0	7.62
5	0	1	0	1	6.14	20	0	0	0	0	6.98
6	0	0	0	0	9.36	21	0	0	-1	-1	6.14
7	0	-1	0	-1	6.26	22	-1	0	1	0	7.94
8	0	0	-1	1	6.40	23	-1	-1	0	0	6.94
9	1	1	0	0	9.23	24	0	1	1	0	7.84
10	0	0	0	0	6.42	25	0	1	-1	0	9.24
11	1	0	1	0	7.33	26	-1	1	0	0	7.48
12	1	0	0	-1	5.70	27	0	1	0	-1	7.03
13	0	-1	1	0	7.65	28	0	0	0	0	8.95
14	-1	0	0	-1	6.60	29	0	-1	0	1	8.02
15	-1	0	-1	0	8.51						

$$Y=8.49+1.19 \times A+0.0627 \times B+0.4024 \times C+0.7567 \times D-0.3830 \times AB+0.4616 \times AC+0.0601 \times AD-0.0353 \times BC-0.0800 \times BD+0.2613 \times CD-0.4729 \times A^2-1.33 \times B^2-0.4418 \times C^2-0.5827 \times D^2$$

注:A 提取温度;B 料液比;C 提取时间;D 提取次数。

方差分析显示该回归模型极显著($P < 0.0001$),失拟项不显著($P > 0.05$),模型总决定系数 $R^2 = 0.9626$ 、 $R^2_{adj} = 0.9252$,模型准确度高。在回归方程中,提取温度、提取次数和提取时间对AEP提取率影响显著($P < 0.05$),影响程度顺序为:提取温度 > 提取次数 > 提取时间 > 料液比。见表3。

3.2.2 响应面分析 等高线形状和密度可反映曲面陡峭程度及因素间交互作用强度,等高线越密集代表因素间交互作用越强^[23]。响应面分析结果显示:提取温度和料液比、提取温度和时间之间交互作用显著,见图2和图3。提取温度和提取次数、料液比和提取时间、料液比和提取次数、提取时间和提取次数之间交互作用较弱,见图4~7。该结果与方差分析中交叉项数据结果一致。

3.2.3 回归模型验证 根据响应面结果得出最佳工艺条件为提取温度100℃、提取3.35次、提取时间150.00min、料液比1:24.15g/mL,在此条件下AEP提取率理论值为9.96%。基于实际情况,修正多

糖的提取条件为提取温度100℃、料液比1:25g/mL、提取时间150min、提取3次,分别进行3个批次样品的验证试验,结果表明3个批次多糖平均得率为 $(9.41 \pm 0.19)\%$,该模型显示出良好的拟合度,能够真实反映多糖提取条件。

3.3 AEP相对分子质量及单糖组成 AEP的HPG-PC-RID色谱图见图8,以保留时间为横坐标,分子量对数值为纵坐标,获得回归方程 $y = -0.4061x + 16.76$, $R^2 = 0.996$,将保留时间代入方程,得出AEP的相对分子质量为13499Da。HPLC色谱图显示:AEP是一种杂多糖,主要包括甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖,其摩尔比为1:0.76:9.50:42.96:36.26,其中葡萄糖和半乳糖比例较高,见图9。

3.4 FT-IR分析 AEP红外光谱在 3390 cm^{-1} 处有一强吸收带,这是由于O-H的伸缩振动引起的;在 2927 cm^{-1} 处的弱带代表C-H不对称伸缩振动;在 1747 cm^{-1} 处有吸收峰表明含糖醛酸^[9];在 $1200 \sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 之间的吸收峰代表C-O-C伸缩振动,在 7762 cm^{-1} 区域的吸收峰表明AEP有吡喃糖环特征^[11], 889 cm^{-1} 处吸收峰代表的是 α -糖苷键的特征吸收峰。见图10。

表 3 回归模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	39.93	14	2.85	25.75	<0.000 1
提取温度	16.88	1	16.88	152.4	<0.000 1
料液比	0.047 2	1	0.047 2	0.426 5	0.524 3
提取时间	1.94	1	1.94	17.54	0.000 9
提取次数	6.87	1	6.87	62.05	<0.000 1
AB	0.586 8	1	0.586 8	5.3	0.037 2
AC	0.852 4	1	0.852 4	7.7	0.014 9
AD	0.014 4	1	0.014 4	0.130 3	0.723 5
BC	0.005	1	0.005	0.045	0.835
BD	0.025 6	1	0.025 6	0.231 1	0.638 1
CD	0.273	1	0.273	2.47	0.138 7
A ²	1.45	1	1.45	13.1	0.002 8
B ²	11.4	1	11.4	102.95	<0.000 1
C ²	1.27	1	1.27	11.43	0.004 5
D ²	2.2	1	2.2	19.89	0.000 5
残差	1.55	14	0.110 7	—	—
失拟项	1.09	10	0.108 9	0.943 9	0.574 7
纯误差	0.461 5	4	0.115 4	—	—
总和	41.48	28	—	—	—

注: A 提取温度; B 料液比; C 提取时间; D 提取次数。

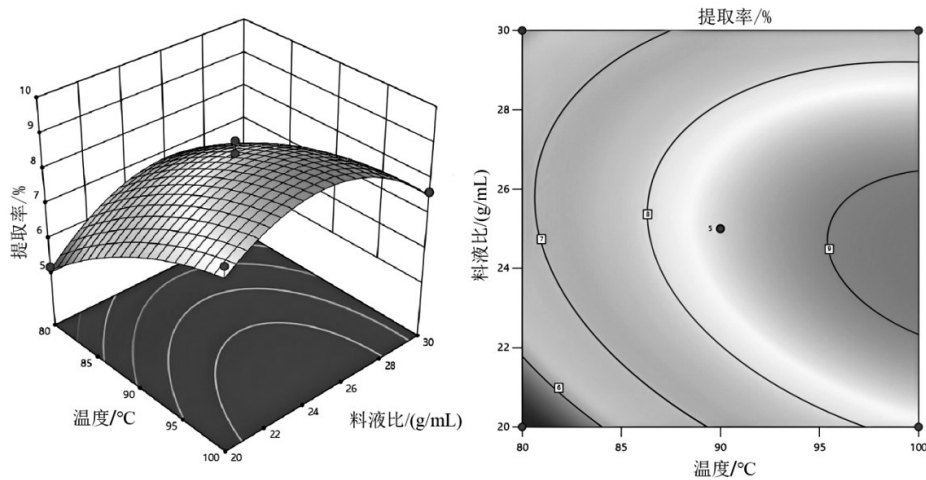


图 2 提取温度和料液比对多糖得率影响的响应面图与等高线图

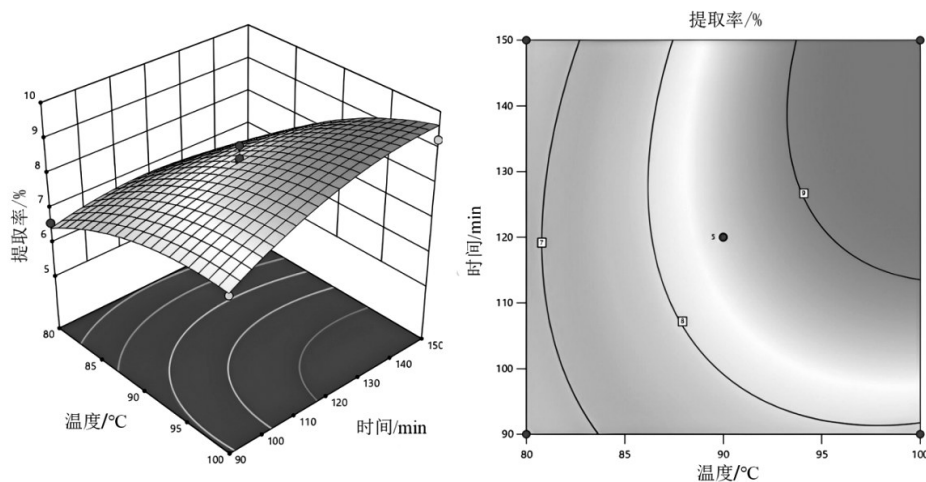


图 3 提取温度和提取时间对多糖得率影响的响应面图与等高线图

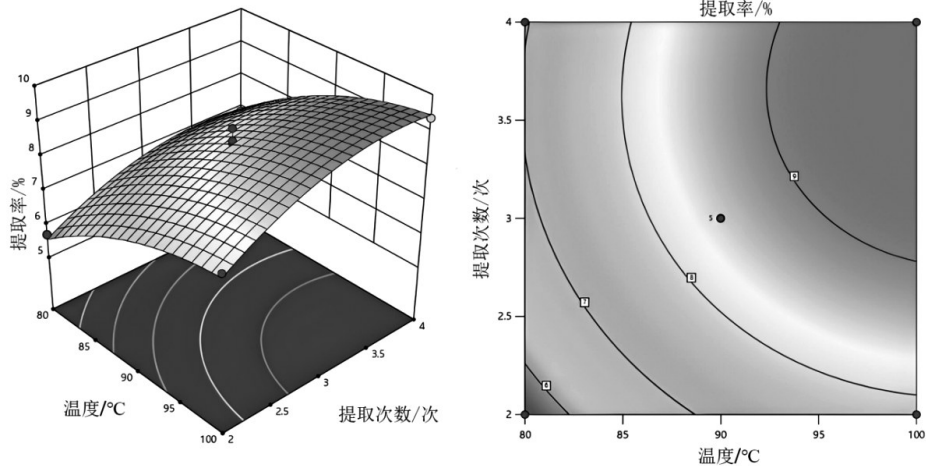


图 4 提取温度和提取次数对多糖得率影响的响应面图与等高线图

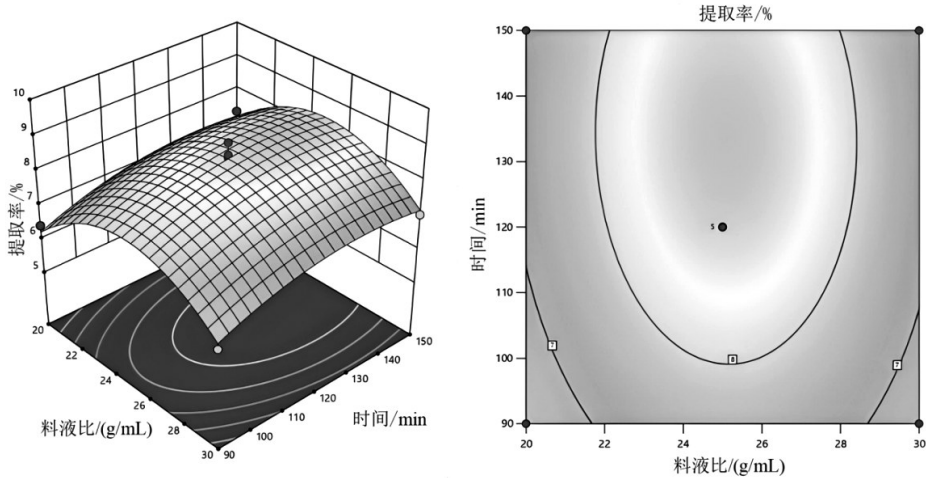


图 5 料液比和提取时间对多糖得率影响的响应面图与等高线图

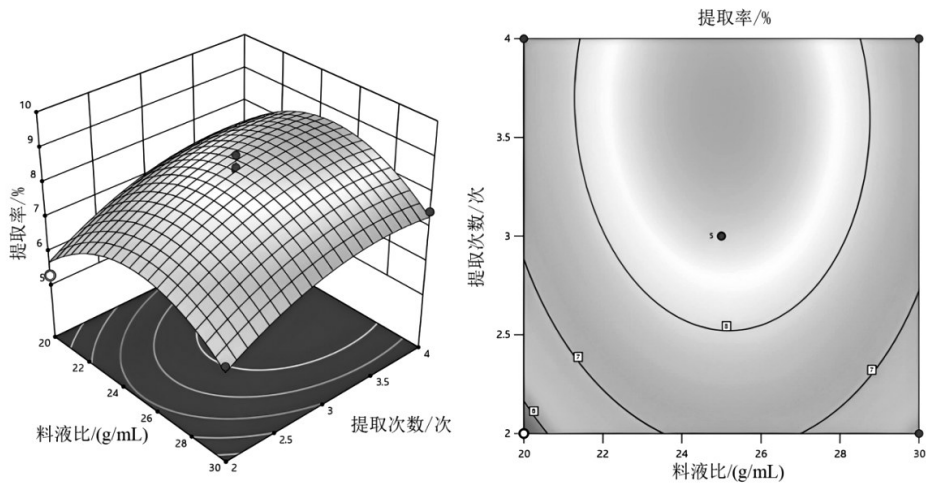


图 6 料液比和提取次数对多糖得率影响的响应面图与等高线图

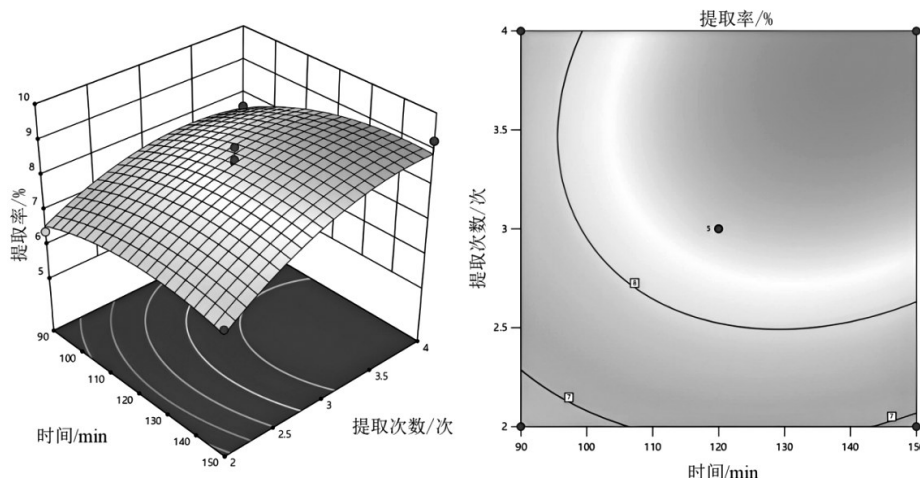


图 7 提取时间和提取次数对多糖得率影响的响应面图与等高线图

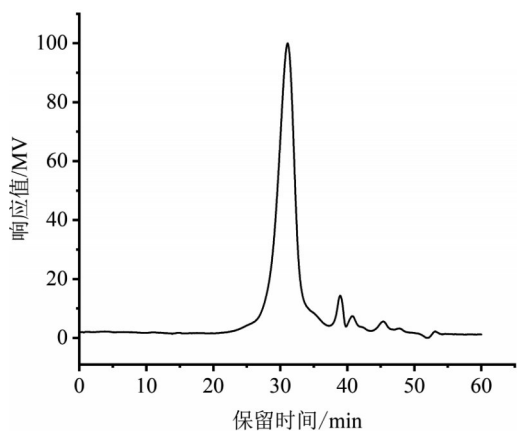


图 8 AEP HPGPC-RID 色谱图

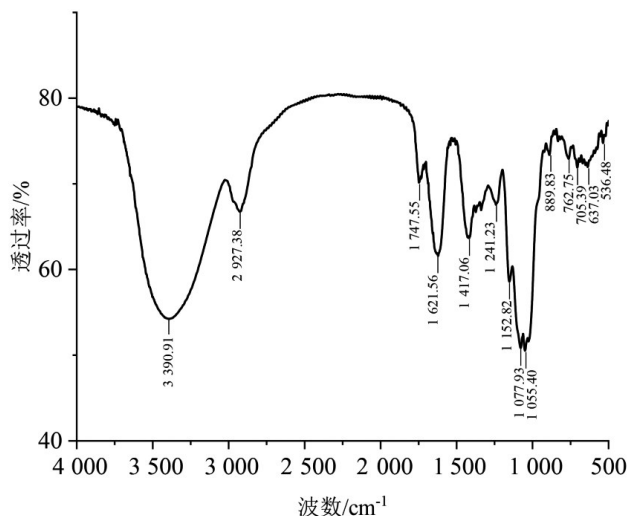
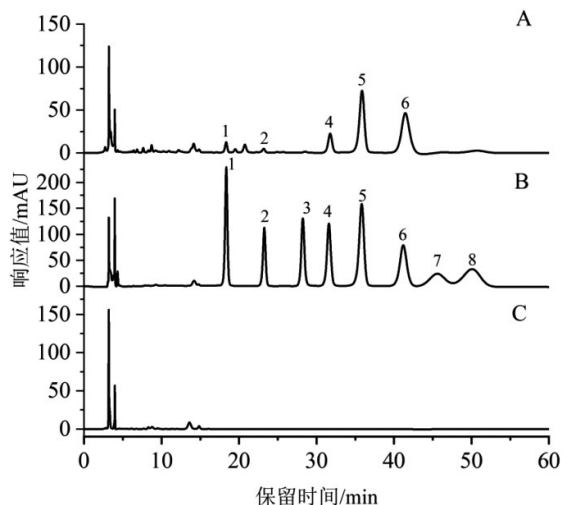


图 10 AEP 红外光谱图



注:A 水解物;B 混合单糖对照品;C PMP 衍生溶液;1 甘露糖;2 鼠李糖;3 葡萄糖醛酸;4 半乳糖醛酸;5 葡萄糖;6 半乳糖;7 木糖;8 阿拉伯糖。

图 9 AEP 水解物、混合单糖对照品和 PMP 衍生溶液的 HPLC 色谱图

3.5 AEP 体外抗氧化活性 在 0.125~4 mg/mL 浓度范围内,AEP 的 DPPH 和 ·OH 清除能力随浓度升高。AEP 浓度为 4 mg/mL 时,DPPH 清除率为 (55.68±0.12)%,·OH 清除率为 (41.29±0.60)%,具有较好的抗氧化作用。见图 11。

3.6 AEP 免疫活性研究结果

3.6.1 不同浓度 AEP 对细胞活性的影响比较 与空白组比较,62.5~1 000 μg/mL AEP 组细胞存活率无明显下降,且都在 90% 以上,见表 4。因此本研究选择 125、250、500 μg/mL 浓度的 AEP 进行后续免疫活性研究。

3.6.2 5 组细胞吞噬率、NO 释放量和 ROS 生成量比较 见表 5 和图 12。

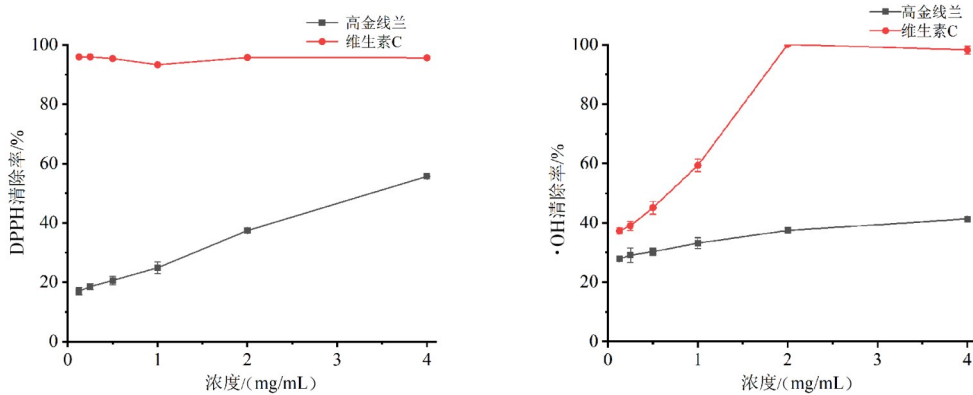


图 11 不同浓度 AEP 对 DPPH 和 ·OH 清除率比较

表 4 不同浓度 AEP 对细胞活性的影响比较 ($\bar{x} \pm s$) %

组别	细胞活力
空白组	100.00 ± 0.00
LPS 组	117.92 ± 4.25 ¹⁾
62.5 μg/mL AEP 组	107.33 ± 3.03
125 μg/mL AEP 组	108.05 ± 0.94
250 μg/mL AEP 组	102.84 ± 0.98
500 μg/mL AEP 组	106.23 ± 8.25
1 000 μg/mL AEP 组	101.16 ± 2.31
2 000 μg/mL AEP 组	89.24 ± 1.36 ¹⁾

注:与空白组比较,1) $P < 0.05$ 。

4 讨论

提取温度、料液比、提取时间和提取次数均对多糖提取率具有影响。温度升高有利于提高多糖

的溶解度、加速分子扩散,从而促进其溶出;但当温度超过一定范围后,多糖溶出趋于平衡,得率不再显著增加,较高的料液比可能导致更多非糖类杂质溶出,干扰多糖的提取效率^[24];同时,在特定提取时间后,多糖溶出可能达到动态平衡,进一步影响最终得率。因此,优化料液比、提取时间及提取次数对提高多糖得率至关重要。本研究通过单因素试验和响应面法优化 AEP 提取工艺,发现提取温度 100 °C、料液比 1:25 g/mL、提取时间 150 min、提取 3 次为最佳条件,在此条件下 AEP 提取率为 9.41 ± 0.19%。AEP 相对分子质量为 13 499 Da,主要由甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖等单糖组成。

表 5 5 组细胞吞噬率、NO 释放量和 ROS 活性氧生成比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞吞噬率/%	NO 释放量/(μmol/L)	ROS 平均荧光强度
空白组	100.00 ± 0.00	6.79 ± 0.03	5.58 ± 1.36
LPS 组	128.36 ± 1.84 ¹⁾	18.66 ± 0.03 ¹⁾	64.82 ± 3.73 ¹⁾
125 μg/mL AEP 组	122.70 ± 4.43 ¹⁾	12.14 ± 0.11 ¹⁾	42.82 ± 6.56 ¹⁾
250 μg/mL AEP 组	123.25 ± 0.82 ¹⁾	12.91 ± 0.57 ¹⁾	47.37 ± 7.36 ¹⁾
500 μg/mL AEP 组	131.80 ± 3.09 ¹⁾²⁾³⁾	14.81 ± 0.64 ¹⁾²⁾³⁾	57.21 ± 2.46 ¹⁾²⁾³⁾

注:与空白组比较,1) $P < 0.05$;与 125 μg/mL AEP 组比较,2) $P < 0.05$;与 250 μg/mL AEP 组比较,3) $P < 0.05$ 。

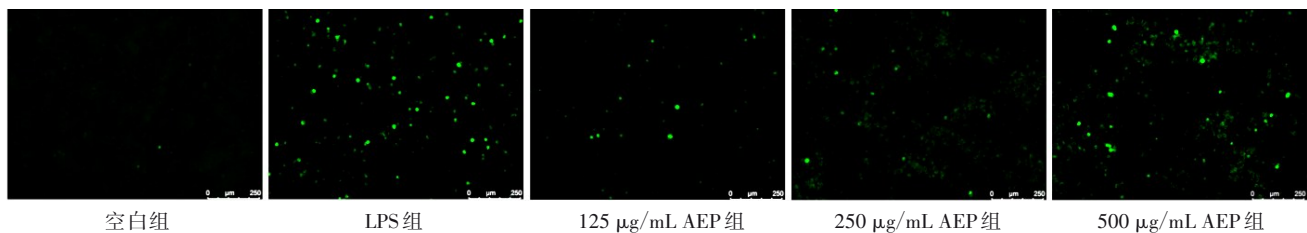


图 12 ROS 活性氧生成荧光图

植物多糖可通过直接清除自由基、抑制脂质过氧化及间接增强抗氧化酶活性、络合金属离子等多种途径发挥抗氧化作用^[25]。本研究通过清除自由基实验,发现 AEP 浓度越大 DPPH 自由基和羟基自由基的清除效果越好,表明 AEP 的抗氧化活性与质量浓度呈正相关。研究显示,多糖的生物活性与

其结构特征(包括相对分子质量、单糖组成、糖苷键类型等)密切相关^[26],如海藻多糖抗氧化活性随其相对分子质量降低而增加^[27];铁皮石斛多糖中糖醛酸含量越高,抗氧化能力越强^[28]。ZHANG 等^[29]从金线兰中分离得到一种均一多糖 ARPP-70a,由葡萄糖和半乳糖组成,两种单糖摩尔比为 1.0:3.2,

多糖分子量为 14.8 kDa,该多糖在浓度 4 mg/mL 时对 DPPH 自由基和羟基自由基的清除效果与 AEP 效果相当。GUO 等^[12]从金线兰中提取得到粗多糖 ARP,由甘露糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和木糖组成,其摩尔比为 1.00:0.50:11.86:2.27:0.69,多糖分子量为 5.90 kDa,该多糖在浓度 4 mg/mL 时对羟基自由基的清除效果优于 AEP。课题组前期从乳突金线兰中分离得到多糖 APP-1a^[30],其相对分子质量约为 2 056 Da,由甘露糖和葡萄糖组成,APP-1a 在浓度 4 mg/mL 时对 DPPH 自由基的清除效果弱于 AEP,但对羟基自由基的清除效果优于 AEP,这可能与不同的抗氧化模型的反应原理不同有关。AEP 与金线兰、乳突金线兰等金线兰属植物多糖的分子量、单糖组成及体外抗氧化存在一定的差异。由此可见,金线兰属植物多糖抗氧化活性可能与其单糖组成、分子量及其分布、苷键类型等有关,但其抗氧化的构效关系仍需进一步研究。

巨噬细胞是最重要的吞噬细胞,可通过吞噬作用清除病原体(如细菌、病毒等),并将其加工成抗原片段,呈递给 T 细胞,从而启动适应性免疫反应。因此,吞噬能力是评估巨噬细胞功能的一个重要指标^[31]。本研究显示 62.5~1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 AEP 对巨噬细胞无毒性作用;进一步采用中性红细胞吞噬实验,发现 AEP 可促进巨噬细胞的吞噬能力。研究表明,NO 是巨噬细胞杀伤肿瘤细胞以及参与抵抗细菌、真菌和寄生虫等感染的重要炎症因子,因此 NO 生成增加被视为巨噬细胞活化的标志之一^[32]。此外,吞噬细胞在应对病毒或细菌感染时,会通过提高 ROS 水平来有效清除病原体,ROS 的升高在免疫调节过程中具有重要作用^[33]。实验结果显示,AEP 在 125~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内促进巨噬细胞 NO 和 ROS 的分泌,从而促进其活化,且其活化效果与 AEP 浓度有关。这一结果与文献报道中黄精多糖及马齿苋多糖能够增强细胞吞噬功能的结论相似^[34-35]。

综上所述,本研究对 AEP 提取工艺的优化、结构特征及抗氧化和免疫调节作用的研究,为更好地开发和利用 AEP 提供了有益的参考,但其抗氧化、免疫调节作用的机制以及构效关系仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 韩玉,陈慧玲,王硕硕,等. 中国兰科植物新记录种:安南金线兰及其金线莲苷含量测定[J]. 亚热带植物科学,2023,52(5):448-452.
- [2] 福建省食品药品监督管理局. 福建省中药饮片炮制规范[M]. 福州:福建科学技术出版社,2012:143-144.
- [3] 陈峰,陈玮,林恢,等. 金线莲鲜草煎剂治疗肝胆湿热证 HBsAg 阳性慢性 HBV 携带者 49 例[J]. 福建中医药,2016,47(4):20-21.
- [4] 张青龙. 金线莲喷雾剂治疗手足口病口腔溃疡临床观察[J]. 名医,2020(6):221.
- [5] 洪美珠,林恢,苏子剑,等. 金线莲液(喷雾用)联合中药配方颗粒治疗新型冠状病毒肺炎 39 例[J]. 福建中医药,2023,54(1):1-2,6.
- [6] 戴伦凯. 中国药用植物志 第十二卷[M]. 北京:北京大学医学出版社,2013:473-477.
- [7] WU Y B, PENG M C, ZHANG C, et al. Quantitative determination of multi-class bioactive constituents for quality assessment of ten *Anoectochilus*, four *Goodyera* and one *Ludisia* species in China [J]. Chin Herb Med, 2020, 12(4):430-439.
- [8] 吴岩斌,田怀珍,郑丽香,等. 短唇金线兰:中国兰科植物新记录种[J]. 亚热带植物科学,2017,46(3):285-287.
- [9] SHI Y, HE X H, BAI B K, et al. Structural characterization and antinociceptive activity of polysaccharides from *Anoectochilus elatus* [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 233:123542.
- [10] 黄瑞平,黄颖桢,陈菁瑛,等. 不同月龄金线莲多糖和总黄酮含量的比较[J]. 热带生物学报,2012,3(2):174-176.
- [11] LIU Y T, TANG T T, DUAN S Q, et al. The purification, structural characterization and antidiabetic activity of a polysaccharide from *Anoectochilus roxburghii* [J]. Food Funct, 2020, 11(4):3730-3740.
- [12] GUO Y L, YE Q, YANG S L, et al. Therapeutic effects of polysaccharides from *Anoectochilus roxburghii* on type II collagen-induced arthritis in rats [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 122:882-892.
- [13] WU Y B, HE X H, CHEN H L, et al. Extraction and characterization of hepatoprotective polysaccharides from *Anoectochilus roxburghii* against ccl4-induced liver injury via regulating lipid metabolism and the gut microbiota [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 277(Pt 3):134305.
- [14] WU Y B, LIU C, JIANG Y Q, et al. Structural characterization and hepatoprotective effects of polysaccharides from *Anoectochilus zhejiangensis* [J]. Int J Biol Macromol, 2022, 198:111-118.
- [15] 江颖倩,彭梦超,吴建国,等. 长片金线兰多糖对四氯化碳诱导急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中草药,2021,52(19):5932-5938.
- [16] 马玉芳,郑小香,衣伟萌,等. 金线莲多糖对免疫抑制小鼠脾淋巴细胞体外增殖、分泌 NO 及细胞因子的影响[J]. 天然产物研究与开发,2018,30(1):21-26.
- [17] 陈程莉,董全,周宇,等. 金线莲多糖提取及功能研究进展[J]. 食品与机械,2018,34(9):196-200.
- [18] 张盟雨,王静,张应中,等. 水提醇沉法提取油茶饼粕多糖的响应面优化[J]. 林业与环境科学,2019,35(5):1-6.
- [19] 张燕,章扬,陈嘉蕊,等. 玉竹多糖的提取工艺及体外抗氧化活性[J]. 吉首大学学报(自然科学版),2024,45(6):37-43.
- [20] 陈燕燕,张登辉,柏雪,等. 杜仲提取物中多糖的单糖组成分析及 HPLC 指纹图谱建立[J]. 饲料研究,2024,47(24):136-141.
- [21] WEI Q, ZHANG Y H. Ultrasound-assisted polysaccharide extraction from *Cercis chinensis* and properites, antioxidant activity of polysaccharide [J]. Ultrason Sonochem, 2023, 96:106422.
- [22] 牛丹,赵静宇,王喜明,等. 蔓菁粗多糖对 RAW264.7 巨噬细胞的免疫活性影响研究[J]. 农产品加工,2024(23):6-11.
- [23] 王君,陈新,高文彬,等. 响应面法优化超声辅助提取金丝皇菊多糖工艺及生理活性研究[J]. 中国食品添加剂,2022,33(2):100-109.
- [24] 罗雨菲,黄秀壁,苏芬安,等. 姑辽茶粗多糖提取工艺优化及其免疫调节活性评价[J]. 食品工业科技,2024,45(23):161-169.