

霍山石斛多糖提取纯化工艺优化

张小辉, 罗建平, 李强明*

(合肥工业大学食品与生物工程学院, 农产品现代加工安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230009)

摘要: **目的** 优化霍山石斛多糖提取纯化工艺。**方法** 在单因素试验基础上, 以料液比、提取时间、提取次数为影响因素, 多糖提取率为评价指标, 正交试验优化提取工艺; 以酶解温度、酶料比、酶解时间为影响因素, 脱除率为评价指标, 正交试验优化淀粉酶脱淀粉工艺、胰蛋白酶除蛋白工艺。再检测精制多糖理化性质。**结果** 最佳提取工艺为液料比 1 : 40、提取时间 2 h、提取次数 2 次, 多糖提取率为 37.60%。最佳脱淀粉工艺为酶解温度 85 ℃、酶料比 6.6 : 1、酶解时间 50 min, 脱除率为 97.91%。最佳脱蛋白工艺为酶解温度 40 ℃、酶料比 3 500 : 1、酶解时间 40 min, 脱除率为 97.73%。精制多糖中碳水化合物含量为 95.77%, 糖醛酸含量为 1.25%, 乙酰基含量为 6.93%, 由甘露糖-葡萄糖 (4.71 : 1) 组成。**结论** 该方法稳定易行, 可用于提取纯化霍山石斛多糖。

关键词: 霍山石斛; 多糖; 提取工艺; 纯化工艺; 正交试验

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)07-2356-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.07.031

霍山石斛 *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng 为兰科多年生草本植物, 可用于治疗热病津伤、口干烦渴、胃阴不足、食少干呕、病后虚热不退、阴虚火旺、骨蒸劳热、目暗不明、筋骨痿软等症^[1], 多糖是该药材重要活性成分^[2-3], 具有免疫调节、保肝、抗炎、抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、降血糖、抗白内障等多种生物活性^[4-14]。目前, 关于霍山石斛多糖提取工艺的研究主要集中于超声提取、微波辅助提取、半仿生提取、亚临界水提取法等方法^[15-18], 但存在操作繁琐、成本高昂、提取率不佳等缺点, 而煎煮法是其传统提取手段, 具有易操作、成本低、效率高等特点, 并且提取后含有大量淀粉和蛋白质, 若不脱除将会影响其生物活性, 但相关报道很少。天然多糖中淀粉的脱除方法主要有柱层析法、透析法、酶法等, 蛋白质的脱除方法主要有 Sevag 法、三氯乙酸法、酶法等^[19], 其中酶法脱除淀粉和蛋白质具有效率高、安全性好、易操作等优势, 应用广泛。因此, 本实验优化霍山石斛多糖提取纯化工艺, 并检测其理化性质, 以期获得提取率、纯度较高的该类成分。

1 材料

1.1 药材 霍山石斛 (编号 201603-DHS, 产地霍山) 购自霍山县天下泽雨生物科技发展有限公司,

经合肥工业大学罗建平教授鉴定为正品。

1.2 试剂 葡萄糖对照品、硫酸、考马斯亮蓝 G-250 (国药集团化学试剂有限公司); 可溶性淀粉 (天津市北方天医化学试剂厂); 碘 (天津市光复科技发展有限公司); 碘化钾、 α -淀粉酶 (货号 A800731) (上海麦克林生化科技股份有限公司); 胰蛋白酶 (Trypsin 1 : 250)、牛血清白蛋白 (BSA) (北京兰杰柯科技有限公司); *N*-苯甲酸-*L*-精氨酸乙酯 (BAEE) (上海阿拉丁生化科技有限公司); 001 型阳离子交换树脂 (上海汇珠树脂有限公司); 苯酚 (天津市大茂化学试剂厂); 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器 CT5RT 离心机 (上海精科天美科学仪器有限公司); V-5000 可见分光光度计 (上海元析仪器有限公司); 超滤离心管 (德国 Merck Millipore 公司); TU-1901 双光束紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司); 雷磁 PHS-3C pH 计 (上海仪电科学仪器有限公司); 安捷伦 1260 Infinity 高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技公司); Spectrim Two 傅里叶变换近红外光谱仪 (珀金埃尔默股份有限公司); 600M 超导核磁共振波谱仪 (德国布鲁克科学仪器公司); Varioskan Flash 酶标仪 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]。

收稿日期: 2025-12-28

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (JZ2024HGTG0319, PA2025GDSK0066); 安徽省科技重大专项 (202303a07020005)

作者简介: 张小辉 (2001—), 男, 硕士在读, 从事中药、天然药物活性成分研究。E-mail: 1749815867@qq.com

* 通信作者: 李强明 (1989—), 男, 博士, 副教授, 从事中药、天然药物活性成分研究。E-mail: liqm_2010@163.com

2 方法

2.1 前处理 将新鲜药材进行分拣，在60 ℃下烘干至恒重后粉碎，取 200 g 粉末，加入 8 L 95% 乙醇，在 25 ℃下浸提 24 h。

2.2 多糖含量测定 采用苯酚-硫酸法^[11]，分别制备 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg/mL 对照品溶液，各取 1 mL 加到试管中，滴加 0.5 mL 5% 苯酚溶液，摇匀，再迅速加入 2.5 mL 浓硫酸，摇匀，反应 10 min，30 ℃水浴 20~30 min，在 490 nm 波长处测定吸光度，绘制标准曲线，得方程为 $Y=0.082\ 1A-0.006$ ($R^2=0.996\ 5$)，其中 Y 为多糖质量浓度， A 为吸光度，在 0~0.1 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.3 淀粉含量测定 参照文献 [20] 方法，并略作改动。分别精密称取碘化钾 2.0 g、碘 0.1 g，少量蒸馏水完全溶解，定容至 100 mL，摇匀，作为碘试剂，保存于棕色瓶中。精密称取氯化铜 0.1 g，蒸馏水定容至 10 mL；量取 37% 盐酸 9 mL，蒸馏水稀释至 90 mL，将两者混合，作为酶解终止液。用 pH 6.2 的 K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液配制质量浓度分别为 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.12 mg/mL 的淀粉溶液，分别取 5 mL，依次加入酶解终止液、碘试剂各 1 mL，在 580 nm 波长处测定吸光度，绘制标准曲线，得方程为 $Y=0.193\ 3A-0.018\ 4$ ($R^2=0.999\ 7$)，其中 Y 为淀粉质量浓度， A 为吸光度，在 0~0.12 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.4 蛋白质含量测定 精密称取考马斯亮蓝 100 mg，溶于 50 mL 95% 乙醇中，加入 100 mL 85% 磷酸，加水稀释至 1 000 mL，作为考马斯亮蓝溶液。用 pH 8.0 的 K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液配制质量浓度分别为 0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06 mg/mL 的 BSA 溶液，分别取 1 mL，加入 5 mL 考马斯亮蓝溶液，在 595 nm 波长处测定吸光度，绘制标准曲线^[21]，得方程为 $Y=0.158\ 6A-0.168$ ($R^2=0.991\ 7$)，其中 Y 为蛋白质量浓度， A 为吸光度，在 0~0.06 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.5 多糖提取率、淀粉脱除率、蛋白脱除率测定

2.5.1 多糖提取率 公式为多糖提取率= $(n\times c\times V/m)\times 100\%$ ，其中 n 为稀释倍数， c 为溶液质量浓度， V 为提取物定容体积， m 为药材质量。

2.5.2 淀粉脱除率 公式为淀粉脱除率= $[(D_i-D_j)/D_i]\times 100\%$ ，其中 D_i 、 D_j 分别为淀粉酶酶解前后淀粉含量。

2.5.3 蛋白脱除率 公式为蛋白脱除率= $[(R_i-R_j)/R_i]\times 100\%$ ，其中 R_i 、 R_j 分别为胰蛋白酶酶解前后蛋白含量。

2.6 提取工艺优化

2.6.1 多糖提取 准确称取前处理后的药材粉末 1.0 g，置于锥形瓶中，加入一定量水，油浴加热回流提取，定容至 250 mL 量瓶中，取 2 mL，加入 10 mL 无水乙醇沉淀 1 h，离心，除去上清，加入 8 mL 80% 乙醇洗涤 2 次，离心，热水溶解，稀释并定容至 50 mL 量瓶中，取 1 mL，按“2.2”项下方法测定。

2.6.2 单因素试验 固定提取时间 2 h，提取次数 1 次，分别考察不同料液比(1：20、1：30、1：40、1：50、1：60)；固定料液比 1：30，提取次数 1 次，分别考察不同提取时间 (0.25、0.5、1、2、3、4、5 h)；固定料液比 1：30，提取时间 2 h，分别考察不同提取次数 (1、2、3 次)，重复 3 次，取平均值。

2.6.3 正交试验 在单因素试验基础上，采用 $L_9(3^4)$ 正交设计，因素水平见表 1。

表 1 提取工艺正交试验因素水平

水平	A 料液比	B 提取时间/h	C 提取次数/次
1	1：20	0.5	1
2	1：30	1.0	2
3	1：40	2.0	3

2.7 脱淀粉工艺优化

2.7.1 淀粉酶酶解 将“2.6.1”项下多糖溶液制成 pH 6.2 的 K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液，取 1.25 mL (相当于 5 mg 多糖溶液)，加入 3.75 mL pH 6.2 的 K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液，预热 10 min，根据最优工艺进行酶解，结束后立即加入酶解终止液和碘试剂，在 580 nm 波长处测定吸光度。

2.7.2 淀粉酶活性测定 参照文献 [20] 报道，将在 pH 6.2、酶解温度 85 ℃条件下每 1 min 降解 1 mg 淀粉所消耗的酶量定义为 1 个酶活性单位 (单位 U)，1 mL α -淀粉酶溶液中酶活性单位数定义为比活性 (单位 U/mL)，pH 6.2 的缓冲液溶解可溶性淀粉，将其制成质量浓度为 0.1 mg/mL 的淀粉溶液；350 mL pH 6.2 的缓冲液溶解 20 mg α -淀粉酶，将其制成酶液，将两者在 85 ℃下预热 10 min。准备 6 支试管，每管加入 5 mL 淀粉溶液，标准管中不加入酶液，而样品管中分别加入 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mL，85 ℃水浴反应 10 min，立即加入酶解终止液，溶液冷却后加入碘试

剂，在 580 nm 波长处测定吸光度，重复 3 次，取平均值。由于本实验加入 5 mL 质量浓度为 0.1 mg/mL 的淀粉溶液，即 0.5 mg 淀粉，故比活性计算公式为比活性=0.5×（A_s-A_x）/（10×V_e×A_s），其中 A_x 为样品管中吸光度，A_s 为标准管中吸光度，V_e 为溶液体积，结果约为 0.55 U/mL。

2.7.3 单因素试验 取“2.7.2”项下酶液适量，固定酶解时间 40 min，酶解温度 85 ℃，分别考察不同酶料比（1.1：1、2.2：1、3.3：1、4.4：1、5.5：1、6.6：1）；固定酶料比 5.5：1，酶解温度 85 ℃，分别考察不同酶解时间（20、30、40、50、60、70 min）；固定酶料比 5.5：1，酶解时间 40 min，分别考察不同酶解温度（75、80、85、90、95 ℃）。

2.7.4 正交试验 在单因素试验基础上，采用 L₉（3⁴）正交设计，因素水平见表 2。

表 2 脱淀粉工艺正交试验因素水平

水平	A 酶解温度/℃	B 酶料比	C 酶解时间/min
1	80	4.4：1	30
2	85	5.5：1	40
3	90	6.6：1	50

2.8 脱蛋白工艺优化

2.8.1 蛋白酶酶解 将“2.7”项下脱除淀粉的多糖溶液制成 pH 8.0 的 K₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液，每次取出 4 mL（相当于 16 mg 药材粉末所提取的多糖溶液），按照最优工艺酶解后立即放入沸水中水浴灭活，采用 001 型阳离子交换树脂除去胰蛋白酶，糖液用分子量为 3 000 Da 的超滤管进行超滤，除去酶解后的小分子多肽，测定蛋白质含量。

2.8.2 蛋白酶活性测定 参照文献 [22-23] 报道，胰蛋白酶活性单位定义为底物反应液 BAEE，在 pH 8.0、温度 25 ℃ 条件下测定 ΔA₂₅₃，每 1 min 增加 0.001，反应液中酶加入量为 1 个酶活性单位（单位 U），每 1 mg 胰蛋白酶活性为比活性（单位 U/mg）。底物溶液制备方法为在 100 mL pH 8.0 的 K₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液中加入 34 mg BAEE 和 222 mg 无水氯化钙，取出 2 个比色皿，分别作为样品管、参比管，前者中加入 375 μL BAEE 底物溶液和 25 μL 酶液，后者中加入 375 μL BAEE 底物溶液和 25 μL 盐酸，在 253 nm 波长处每 30 s 测定 1 次，共 13 次。以吸光度为纵坐标（A），时间为横坐标（X）进行回归，得方程为 A=0.005 7X+0.127 7（R²=0.993 9），在 0~6.5 min 范围内线性关系良好。比活性计算公式为比活性=(ΔA₂₅₃) ×

C_酶/（0.001×V_酶），其中 C_酶 为酶液浓度，V_酶 为与底物反应时酶液体积，结果约为 550 U/mg。

2.8.3 单因素试验 采用 pH 8.0 的 K₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液将胰蛋白酶制成活性为 5 000 U/mL 的酶液，固定酶解时间 30 min，酶解温度 40 ℃，分别考察不同酶料比（500：1、1 500：1、2 500：1、3 500：1、4 500：1）；固定酶料比 2 500：1，酶解温度 40 ℃，分别考察不同酶解时间（20、30、40、50、60 min）；固定酶料比 2 500：1，酶解时间 30 min，分别考察不同酶解温度（30、40、50、60、70 ℃）。

2.8.4 正交试验 在单因素试验基础上，采用 L₉（3⁴）正交设计，因素水平见表 3。

表 3 脱蛋白工艺正交试验因素水平

水平	A 酶解温度/℃	B 酶料比	C 酶解时间/min
1	40	1 500：1	20
2	50	2 500：1	30
3	60	3 500：1	40

2.9 多糖提取率测定 按最优工艺提取纯化多糖，采用苯酚-硫酸法测定提取率。

2.10 理化性质测定 将提取纯化后的多糖在温度 -50 ℃、压力 20 Pa 条件下冷冻干燥 48 h，即得精制多糖。

2.10.1 碳水化合物含量 按“2.2”项下方法测定。

2.10.2 乙酰基含量 参照文献 [24] 报道，采用羟胺比色法测定。

2.10.3 糖醛酸含量 参照文献 [25] 报道，采用硫酸-咔唑比色法测定。

2.10.4 可溶性蛋白质含量 采用 BCA 蛋白定量法，将多糖制成质量浓度为 10 mg/mL 的溶液，将其与工作液加到 96 孔板中，在 550 nm 波长处测定吸光度，计算含量。

2.10.5 淀粉碘含量 分别称取碘 2 mg、碘化钾 10 mg、精制多糖或淀粉对照品 1 mg，溶于 1 mL 超纯水中，90 ℃ 恒温水浴加热 10 min，以促进络合物形成，反应完成后用超纯水稀释至 25 mL，采用紫外分光光度计在 400~800 nm 波长处进行扫描。

2.10.6 高效凝胶渗透色谱分析 将标准溶液（5.0、25、50、410、670 kDa 葡聚糖）与多糖溶液制成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液。分析条件为 TSK G5000 PWxl 色谱柱（7.8 mm×300 mm）；流动相超纯水；体积流量 0.5 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 20 μL；检测器温度 30 ℃，绘制标准曲线，

得方程为 $\lg M_w = -0.3085X + 10.385$ ($R^2 = 0.9977$), 其中 $\lg M_w$ 为分子量对数值, X 为保留时间, 在 5 000~67 000 Da 范围内线性关系良好。

2.10.7 单糖组成分析 采用 PMP 柱前衍生化-HPLC 法, 先精密称取多糖和单糖对照品适量, 后者包括甘露糖 (Man)、葡萄糖醛酸 (GlcA)、半乳糖醛酸 (GalA)、葡萄糖 (Glc)、半乳糖 (Gal)、阿拉伯糖 (Ara), 以 GlcN-HCl 为内标, 制成质量浓度分别为 6、1、6 mg/mL 的储备液, 取 1 mL 多糖溶液, 与 0.5 mL 3 mol/L HCl 一同加到安瓿瓶中并封口, 在 110 ℃ 下水解 1 h, 反应终止后用 3 mol/L NaOH 溶液将其 pH 调节至中性; 在 10 mL 玻璃试管中加入 400 μL 单糖溶液 (标准品和水解物) 及内标, 再加入等体积 0.3 mol/L NaOH 溶液和 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液, 混匀, 70 ℃ 水浴 100 min, 用等体积 0.3 mol/L HCl 进行酸化处理, 氯仿萃取 3 次, 除去过量衍生化试剂, 离心, 取上清液。分析条件为 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 反向色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-磷酸盐缓冲液 (20 mmol/L, pH = 6.8) (18:82); 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 250 nm; 进样量 20 μL。

2.10.8 紫外检测 将多糖制成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液, 采用紫外可见分光光度计在 190~400 nm 波长处进行扫描。

2.10.9 红外检测 取多糖 5 mg, 与一定量 KBr 进行压片, 在傅里叶红外光谱仪上进行扫描, 扫描范围为 4 000~400 cm⁻¹。

2.10.10 核磁共振分析 取多糖约 100 mg, 溶于 0.5 mL D₂O 中, 冻干循环 3 次以充分交换活泼氢, 加入含葡萄糖硫酸钠盐 (DSS) 的 D₂O, 装到 5 mm 核磁管中, 采用超导核磁共振波谱仪测定。

2.11 数据分析 通过 Graphpad Prism 8 软件进行处理并作图, 统计学分析采用 one-way ANOVA 单因素方差分析和多重比较分析, 结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。所有实验均重复 3 次。

3 结果

3.1 提取工艺单因素试验 由图 1A 可知, 料液比为 1:20~1:30 时提取率升高, 之后程度趋于平缓, 结合实际情况和经济效益, 最终选择 1:30 作为正交试验中心。由图 1B 可知, 提取时间为 0.25~1 h 时提取率升高, 之后程度趋于平缓, 其主要原因是提取时间越长, 多糖溶出越多, 但时间

过长时该类成分含量过高, 导致溶液过于黏稠, 药材粉末成团, 接触面积下降, 导致提取率变化不明显, 最终选择 1 h 作为正交试验中心。由图 1C 可知, 提取次数为 1~2 次时提取率升高, 之后几乎无变化, 最终选择 2 次作为正交试验中心。

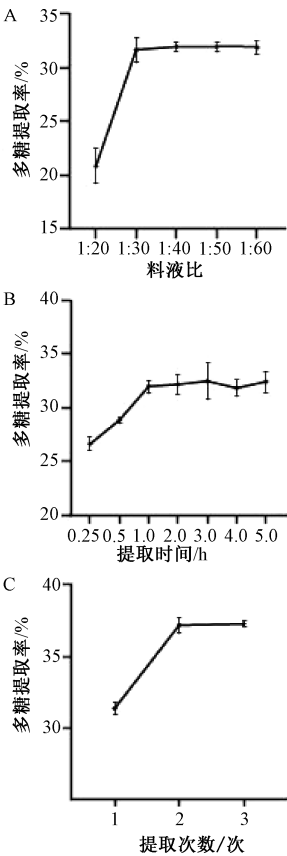


图 1 提取工艺单因素试验结果 (n=3)

3.2 提取工艺正交试验 结果见表 4, 可知各因素影响程度依次为 $A > B > C$ 。

表 4 提取工艺正交试验结果

试验号	A	B	C	D(空白)	多糖提取率/%
1	1	1	1	1	20.73
2	1	2	2	2	31.03
3	1	3	3	3	31.84
4	2	1	2	3	31.15
5	2	2	3	1	34.88
6	2	3	1	2	32.54
7	3	1	3	2	33.67
8	3	2	1	3	32.94
9	3	3	2	1	37.59
K ₁	83.60	85.54	86.20	93.20	—
K ₂	98.57	98.86	99.77	97.24	—
K ₃	104.20	101.97	100.39	95.92	—
k ₁	27.87	28.51	28.73	31.07	—
k ₂	32.86	32.95	33.26	32.41	—
k ₃	34.73	33.99	33.46	31.97	—
R	6.87	5.48	4.73	1.35	—

方差分析见表 5，可知因素 *A* 具有显著影响 ($P<0.05$)，而 *B*、*C* 无显著影响 ($P>0.05$)；各因素影响程度依次为 $A>B>C$ ，与表 4 一致； C_2 、 C_3 *k* 值差异不明显。综合成本与提取率，确定最优工艺为 $A_3B_3C_2$ ，即料液比 1：40，提取时间 2 h，提取次数 2 次。

表 5 提取工艺方差分析结果

来源	离均差平方和	自由度	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
<i>A</i>	0.007 557	2	26.670 644	<0.05
<i>B</i>	0.005 075	2	17.909 543	>0.05
<i>C</i>	0.004 286	2	15.125 322	>0.05
<i>D</i> (误差)	0.000 283	2	—	—

按上述优化工艺进行 3 批验证试验，测得平均多糖提取率为 37.60%，表明该工艺稳定可行。

3.3 脱淀粉工艺单因素试验 结果如图 2 所示。由图 2A 可知，酶解温度为 75~85 ℃时淀粉脱除率升高，之后反而降低，最终选择 85 ℃作为正交试验中心。由图 2B 可知，酶料比为 1.1：1~5.5：1 时淀粉脱除率升高，之后变化不明显，最终选择 5.5：1 作为正交试验中心。由图 2C 可知，酶解 40 min 时淀粉脱除率达到最大值，最终选择 40 min 作为正交试验中心。

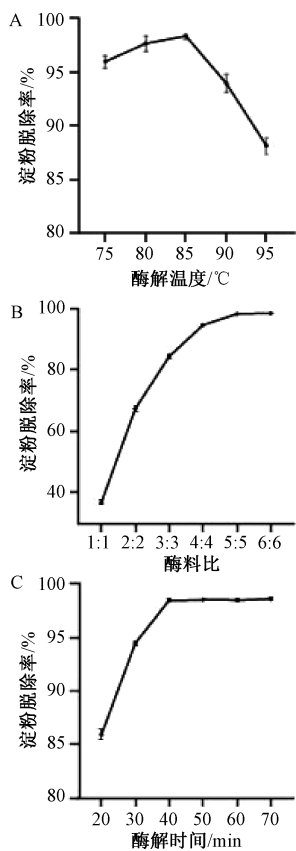


图 2 脱淀粉工艺单因素试验结果 ($n=3$)

3.4 脱淀粉工艺正交试验 结果见表 6，可知各因素影响程度依次为 $C>B>A$ 。

表 6 脱淀粉工艺正交试验结果

试验号	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i> (空白)	淀粉脱除率/%
1	1	1	1	1	87.57
2	1	2	2	2	94.96
3	1	3	3	3	97.84
4	2	1	2	3	94.40
5	2	2	3	1	97.78
6	2	3	1	2	89.95
7	3	1	3	2	92.39
8	3	2	1	3	86.57
9	3	3	2	1	97.09
K_1	280.37	274.36	264.15	282.38	—
K_2	282.07	279.31	286.45	277.31	—
K_3	276.12	284.89	287.95	278.87	—
k_1	93.46	91.45	88.05	94.13	—
k_2	94.02	93.10	95.48	92.44	—
k_3	92.04	94.96	95.98	92.96	—
<i>R</i>	1.98	3.51	7.93	1.69	—

方差分析见表 7，可知因素 *C* 具有显著影响 ($P<0.05$)，而 *A*、*B* 无显著影响 ($P>0.05$)；各因素影响程度依次为 $C>B>A$ ，与表 6 一致。结合 *k* 值，确定最优工艺为 $A_2B_3C_3$ ，即酶解温度 85 ℃，酶料比 6.6：1，酶解时间 50 min。

表 7 脱淀粉工艺方差分析结果

来源	离均差平方和	自由度	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
<i>A</i>	0.000 627	2	1.392 947	>0.05
<i>B</i>	0.001 848	2	4.106 375	>0.05
<i>C</i>	0.011 846	2	26.323 581	<0.05
<i>D</i> (误差)	0.000 450	2	—	—

按上述优化工艺进行 3 批验证试验，测得平均淀粉脱除率为 97.91%，表明该工艺稳定可行。

3.5 脱蛋白工艺单因素试验 由图 3A 可知，酶解温度为 30~40 ℃时蛋白脱除率升高，40~60 ℃时略微降低，60~70 ℃时显著降低，故推测可能在 40~60 ℃范围内最合适，最终选择 50 ℃作为正交试验中心。由图 3B 可知，酶料比为 500：1~2 500：1 时蛋白脱除率升高，之后无明显变化，最终选择 2 500：1 作为正交试验中心。由 3C 可知，酶解时间超过 30 min 后蛋白脱除率无明显变化，最终选择 30 min 作为正交试验中心。

3.6 脱蛋白工艺正交试验 结果见表 8，可知各因素影响程度依次为 $B>C>A$ 。

方差分析见表 9，可知因素 *B*、*C* 具有显著影响 ($P<0.05$)，而 *A* 无显著影响 ($P>0.05$)；各因素影响程度依次为 $B>C>A$ ，与表 8 一致。结合 *k* 值，确定最优工艺为 $A_1B_3C_3$ ，即酶解温度 40 ℃，酶料比 3 500：1，酶解时间 40 min。

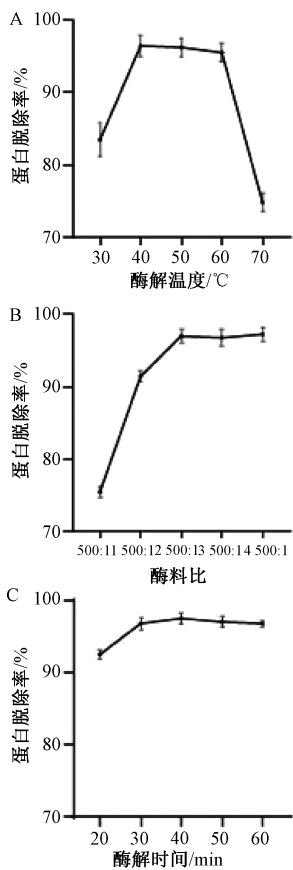


图 3 脱蛋白工艺单因素试验结果 (n=3)

表 8 脱蛋白工艺正交试验结果

试验号	A	B	C	D(空白)	蛋白脱除率/%
1	1	1	1	1	87.20
2	1	2	2	2	93.82
3	1	3	3	3	95.72
4	2	1	2	3	89.80
5	2	2	3	1	94.06
6	2	3	1	2	92.05
7	3	1	3	2	88.86
8	3	2	1	3	90.51
9	3	3	2	1	94.53
K ₁	276.74	265.86	269.76	275.79	—
K ₂	275.91	278.40	278.16	274.73	—
K ₃	273.90	282.30	278.63	276.03	—
k ₁	92.25	88.62	89.92	91.93	—
k ₂	91.97	92.80	92.72	91.58	—
k ₃	91.30	94.10	92.88	92.01	—
R	0.95	5.48	2.96	0.35	—

表 9 脱蛋白工艺方差分析结果

来源	离均差平方和	自由度	F 值	P 值
A	0.000 142	2	4.436 893	>0.05
B	0.004 922	2	153.621 359	<0.05
C	0.001 661	2	51.854 369	<0.05
D(误差)	0.000 032	2	—	—

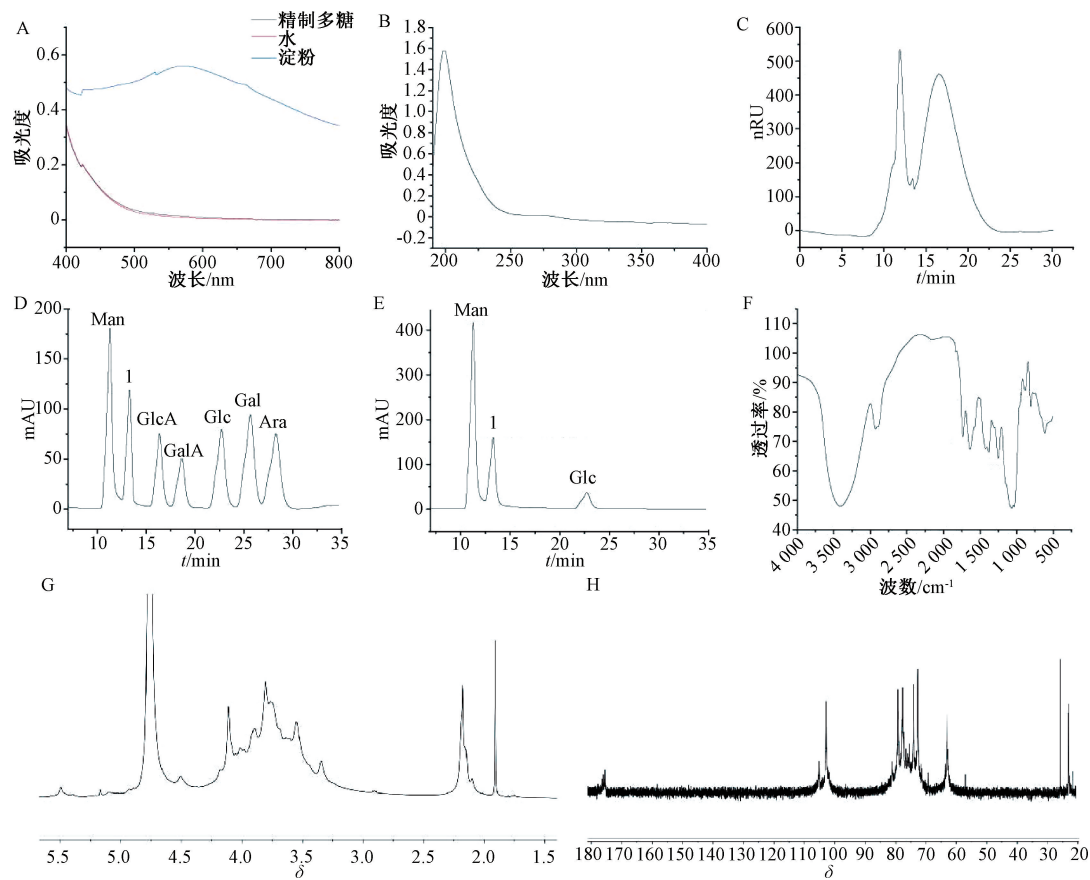
按上述优化工艺进行 3 批验证试验,测得平均蛋白脱除率为 97.73%,表明该工艺稳定可行。

3.7 提取率 按“3.1”至“3.6”项下方法对多糖进行提取、脱淀粉、脱蛋白,重复 3 次,测得其平均提取率为 18.15%,表明该工艺稳定可行。

3.8 理化性质 精制多糖中碳水化合物平均含量为 95.77%,糖醛酸平均含量为 1.25%,乙酰基平均含量为 6.93%。淀粉-碘化钾实验结果显示,精制多糖吸收曲线与淀粉存在显著差异,而与阴性对照(H₂O)的吸收峰高度重叠,表明它不具有淀粉类多糖的结构特征,也不含淀粉,见图 4A。紫外检测结果显示,在 260、280 nm 波长处无明显吸收,表明精制多糖中不含核酸和蛋白质,见图 4B。高效凝胶渗透色谱分析结果显示,石斛精制多糖主要有 2 个组分峰,保留时间分别为 11.90、16.46 min,见图 4C。单糖组成检测结果显示,精制多糖主要由甘露糖(Man)和葡萄糖(Glc)组成,比值为 4.71:1,见图 4D~4E。红外检测结果显示,精制多糖在 3 413 cm⁻¹处的强吸收峰和 2 927 cm⁻¹处的弱吸收峰分别源于 O-H、C-H 伸缩振动;在 1 732、1 253 cm⁻¹处的吸收峰是由乙酰基 C、O 双键和单键的伸缩振动产生;在 883、806 cm⁻¹处的吸收峰表明存在甘露糖,见图 4F。¹H-NMR 检测结果显示,精制多糖 δ 4.50、4.90、4.93、5.09、5.17、5.50 存在异头氢,δ 2.09~2.18 存在乙酰基氢,其他信号分布在 δ 3.34~4.20,见图 4G。¹³C-NMR 检测结果显示,精制多糖 δ 101.7、102.6、102.8、103.0、105.2、105.4 存在异头碳,δ 175.6~177.7 存在乙酰基羰基碳,δ 21.7~25.9 存在乙酰基甲基碳,其他信号分布在 δ 62.6~81.1。

4 结论

本实验提取霍山石斛多糖时采用煎煮法,该方法操作简便,绿色环保,但该类成分提取后仍有淀粉、蛋白质残留,如何有效脱除该类成分是保障多糖纯度的关键。本工艺得到提取率为 18.15%的精制多糖,接近于文献[17]报道的 18.21%,但该文献并未脱除其淀粉和蛋白,而本实验先采用酶法处理,再通过阳离子交换树脂和超滤来除去引入的酶和小分子杂质,为该类成分精制提供了从提取到除杂纯化的一体化流程,并且与 Sevag 法、三氯乙酸法等相比,该方法未加入有害试剂,更适用于实际生产。



1. D (+) -盐酸氨基葡萄糖
图4 霍山石斛精制多糖理化性质

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: 94.

[2] Xu J, Han Q B, Li S L, et al. Chemistry, bioactivity and quality control of *Dendrobium*, a commonly used tonic herb in traditional Chinese medicine[J]. *Phytochem Rev*, 2013, 12(2): 341-367.

[3] Gao L L, Wang F, Hou T T, et al. *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng: A review of its traditional uses, phytochemistry, and pharmacology[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 920823.

[4] 王超群, 李德文, 袁晨琳, 等. 霍山石斛多糖不同组分理化性质及免疫活性的比较研究[J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(13): 160-164.

[5] 徐海军, 方 予, 汪俊涛, 等. 霍山石斛多糖对小鼠的双向免疫调节作用[J]. *免疫学杂志*, 2018, 34(8): 731-736.

[6] 聂春艳, 汪 鹤, 潘利华, 等. 霍山石斛水溶性多糖抗急性酒精性肝损伤研究[J]. *安徽农业科学*, 2017, 45(17): 100-105.

[7] Gu F L, Huang R S, He X M, et al. *Dendrobium huoshanense* polysaccharides prevent inflammatory response of ulcerative colitis rat through inhibiting the NF- κ B signaling pathway[J]. *Chem Biodivers*, 2021, 18(7): e2100130.

[8] Shang Z Z, Qin D Y, Li Q M, et al. *Dendrobium huoshanense* stem polysaccharide ameliorates rheumatoid arthritis in mice via inhibition of inflammatory signaling pathways[J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 258: 117657.

[9] 刘峻麟. 八种石斛初生代谢产物比较研究及霍山石斛多糖抗衰老作用机制初探[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2021.

[10] Ye M J, Liu J L, Deng G H, et al. Protective effects of *Dendrobium huoshanense* polysaccharide on D-gal induced PC12 cells and aging mice, *in vitro* and *in vivo* studies[J]. *J Food Biochem*, 2022, 46(12): e14496.

[11] 刘 冰. 霍山石斛(栽培)多糖化学结构系统解析及抗胃癌活性构效关系研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2019.

[12] 张丹丹, 黄 森, 查学强, 等. 霍山石斛多糖对人胃癌细胞生长的抑制作用[J]. *食品与生物技术学报*, 2014, 33(5): 542-547.

[13] 李秀芳. 霍山石斛和四种药典石斛多糖降血糖活性比较研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2012.

[14] Zha X Q, Luo J P, Luo S Z, et al. Structure identification of a new immunostimulating polysaccharide from the stems of *Dendrobium huoshanense*[J]. *Carbohydr Polym*, 2007, 69(1): 86-93.

[15] 魏 明, 邵 平, 姚 红, 等. 超声波协同纤维素酶法提取霍山石斛多糖的研究[J]. *食品工业科技*, 2009, 30(3):

199-201.

[16] 戴 玮, 罗建平. 霍山石斛多糖的半仿生提取工艺优化与抗炎活性评价[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(23): 151-154; 183.

[17] 黄 森, 查学强, 罗建平, 等. Box-Behnken 法优化提取霍山石斛活性多糖的研究[J]. 中药材, 2007, 30(5): 591-594.

[18] 张炜玲, 王新生, 戴亚峰, 等. 响应面法优化霍山石斛多糖提取工艺[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(12): 7061-7064.

[19] 殷洪梅, 尚 强, 萧 伟. 金银花多糖脱蛋白方法的研究[J]. 中草药, 2010, 41(4): 584-586.

[20] 张雪娇, 田 欢, 刘春叶, 等. 可见分光光度法测定 α -淀粉酶活性[J]. 化学与生物工程, 2020, 37(3): 65-68.

[21] 王琳炜, 欧阳 臻, 张碧娟, 等. 霍山铁皮石斛多糖的脱蛋白工艺及结构分析[J]. 食品科学, 2017, 38(12): 164-170.

[22] 何佳丽, 张金秋, 王思懿, 等. 胰蛋白酶体外筛选天然化合物抗肿瘤活性[J]. 生理学报, 2022, 74(6): 1014-1022.

[23] 黄 科, 林启焰, 杨 迎, 等. 霍山石斛茶饮的制备工艺优化及其免疫调节作用[J]. 食品工业科技, 2023, 44(20): 213-220.

[24] 和梦瑶, 董泽宇, 张兰兰, 等. 不同部位鱼腥草多糖的结构表征与生物活性[J]. 中国食品学报, 2024, 24(3): 276-286.

[25] 胡 木, 欧兰梅, 肖益东. 山药多糖的提取、纯化及结构分析[J]. 食品工业, 2025, 46(8): 48-52.

基于 Nrf2/GPX4 信号通路探讨玉竹多糖对 SAMP8 小鼠脑内铁死亡的影响

刘镇奎¹, 欧阳 银², 陈博威³, 易 健³, 彭 莎², 张文芳³, 肖 岚^{3*}
(1. 香港浸会大学, 香港 999077; 2. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410000; 3. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410000)

摘要: **目的** 探讨玉竹多糖对快速衰老小鼠 (SAMP8) 脑内铁死亡及认知功能的影响。**方法** 将 40 只小鼠随机分为对照组 (SAMR1)、模型组 (SAMP8)、玉竹多糖组、玉竹+抑制剂 (ML385) 组, 连续给药 60 d。Morris 水迷宫实验检测各组小鼠认知功能; HE 染色观察小鼠脑组织病理学情况; 透射电镜观察小鼠海马神经元细胞线粒体形态; 免疫组化法检测小鼠海马 ACSL4、Slc7a11 水平; ELISA 法检测小鼠海马铁死亡相关调控因子 Fe^{2+} 、MDA、GSH 水平和 SOD 活性; Western blot 法检测小鼠海马 Nrf2/GPX4 通路蛋白表达。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠逃逸潜伏期时间延长 ($P<0.01$), 目标象限停留时间缩短 ($P<0.01$), 平台穿越次数减少 ($P<0.01$); 病理损伤及神经元线粒体损伤明显, Fe^{2+} 、MDA 水平和 ACSL4 蛋白表达升高 ($P<0.01$), GSH 水平、SOD 活性、Slc7a11、Nrf2、GPX4 蛋白表达降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 玉竹多糖组逃逸潜伏期时间缩短 ($P<0.05$), 目标象限停留时间延长 ($P<0.01$), 平台穿越次数增多 ($P<0.05$); 病理损伤及神经元线粒体损伤减少, Fe^{2+} 、MDA 水平和 ACSL4 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), GSH 水平、SOD 活性、Slc7a11、Nrf2、GPX4 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与玉竹多糖组比较, 玉竹+抑制剂组小鼠目标象限停留时间缩短 ($P<0.01$), 病理损伤及神经元线粒体损伤明显, Fe^{2+} 、MDA 水平和 ACSL4 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), GSH 水平和 Slc7a11 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 玉竹多糖能够改善 SAMP8 小鼠认知功能损伤, 其作用机制可能与其调控 Nrf2/GPX4 信号通路, 抑制脑内铁死亡水平有关。**关键词:** 玉竹多糖; 快速衰老小鼠 (SAMP8); 铁死亡; Nrf2/GPX4 信号通路; 认知功能
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2026)07-2363-06
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.07.032

收稿日期: 2026-03-26
基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (82204924); 湖南省自然科学基金 (2024JJ8172, 2025JJ80185); 湖南省中医药管理局重点项目 (A2023006)
作者简介: 刘镇奎 (2002—), 男, 硕士在读, 研究方向为中医药防治内科疾病。E-mail: 653533153@qq.com
*** 通信作者:** 肖 岚 (1983—), 女, 博士, 副教授, 从事中药资源与质量标准化研究。E-mail: 23938867@qq.com