

乙酰化霍山石斛多糖制备工艺及其抗氧化抗肿瘤活性分析

纪俊豪¹, 宋露¹, 杨素素¹, 王芳², 王威², 李国四², 易善勇², 王成³, 韩邦兴², 刘东^{2*}, 高雷雷^{2*}
(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽合肥 230012) (2. 皖西学院安徽省现代中药产业共性技术研究中心, 安徽省中药生态农业工程研究中心, 安徽省大别山中医药研究院, 安徽六安 237000)
(3. 霍山县天下泽雨生物科技有限公司, 安徽六安 237000)

摘要: 为研究乙酰化修饰对霍山石斛多糖 (*Dendrobium huoshanense* polysaccharides, DHP) 活性影响, 该研究通过乙酸酐法修饰得到乙酰化霍山石斛多糖 (Acetylated *Dendrobium huoshanense* polysaccharides, A-DHP) 并优化其制备工艺。以取代度为指标, 结合单因素实验, 使用响应面法优化 DHP 乙酰化条件。采用傅里叶红外光谱 (Fourier Transform Infrared Spectrometer, FT-IR) 与扫描电镜 (Scanning Electron Microscopy, SEM) 分析 A-DHP 的结构特征, 并通过体外实验检测多糖修饰前后抗氧化、抗肿瘤活性变化。结果显示 A-DHP 最佳制备条件为: 反应时间 3.8 h、乙酸酐与多糖投料比 14:1 (mL:g)、反应温度 36 °C, 在此条件下, A-DHP 取代度为 0.226, FT-IR 与 SEM 结果确认 DHP 乙酰化成功。体外抗氧化与体外细胞毒性实验结果表明: DHP 经乙酰化修饰后, 对 ABTS⁺、DPPH 自由基清除能力分别提高 14.91% 与 7.76%, 对 HepG2、C918 细胞增殖抑制作用分别增强 15.90% 与 16.24%。综上乙酰化修饰可提高 DHP 的抗氧化与抗肿瘤活性, 该实验为乙酰化多糖的深入研究提供了理论基础。

关键词: 霍山石斛; 多糖; 乙酰化; 抗氧化活性; 抗肿瘤活性

文章编号: 1673-9078(2026)05-158-166

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.5.0256

Preparation of Acetylated *Dendrobium huoshanense* Polysaccharides and Analysis of Antioxidant and Antitumor Activities

JI Junhao¹, SONG Lu¹, YANG Susu¹, WANG Fang², WANG Wei², LI Guosi², YI Shanyong², WANG Cheng³,
HAN Bangxing², LIU Dong^{2*}, GAO Leilei^{2*}

(1.School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

(2.Generic Technology Research Center for Anhui Traditional Chinese Medicine Industry, Wanxi College; Anhui Engineering Research Center for Eco-agriculture of Traditional Chinese Medicine; Anhui Dabie Mountain Chinese Academy of Medicine, West Anhui University, Lu'an 237000, China)

(3.Huo Shan RainiGrace Biological Technology Development Co., Ltd. Lu'an 237000, China)

引文格式:

纪俊豪,宋露,杨素素,等.乙酰化霍山石斛多糖制备工艺及其抗氧化抗肿瘤活性分析[J].现代食品科技,2026,42(5):158-166.

JI Junhao, SONG Lu, YANG Susu, et al. Preparation of acetylated *Dendrobium huoshanense* polysaccharides and analysis of antioxidant and antitumor activities [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(5): 158-166.

收稿日期: 2025-02-25; 修回日期: 2025-06-11; 接受日期: 2025-06-16

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2023YFC3503804); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-21); 安徽省现代中药产业共性技术研究中心开放课题 (AHTCMGTRC-2023-03)

作者简介: 纪俊豪 (1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药药剂学, E-mail: 15555301060@163.com

通讯作者: 刘东 (1984-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药和天然产物及其纳米药物的制备及质量控制研究, E-mail: liudong3000@126.com;

共同通讯作者: 高雷雷 (1989-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 中药资源开发与利用, E-mail: gaoleilei1989@yeah.net

Abstract: To investigate the effects of acetylation modification on the biological activities of *Dendrobium huoshanense* polysaccharides (DHP), acetylated *D. huoshanense* polysaccharides (A-DHP) were prepared using the acetic anhydride method, and the preparation process was optimized. The degree of substitution was used as the evaluation index, and synthesis conditions were optimized using single-factor experiments and response surface methodology. The structure of A-DHP was characterized using Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and scanning electron microscopy (SEM). Changes in antioxidant and antitumor activities before and after acetylation were evaluated using *in vitro* antioxidant essays and cytotoxicity experiments. The results showed that the optimal preparation conditions were a reaction time of 3.8 h, an acetic anhydride-to-polysaccharide ratio of 14:1 (mL:g), and a reaction temperature of 36 °C. Under these conditions, the degree of substitution of A-DHP reached 0.226. FTIR and SEM analyses confirmed the successful introduction of acetyl groups into the DHP structure. *In vitro* antioxidant assays demonstrated that acetylation increased the scavenging activities against ABTS and DPPH free radicals by 14.91% and 7.76%, respectively. In addition, cytotoxicity assays showed that the inhibitory effects of A-DHP on HepG2 and C918 cells increased by 15.90% and 16.24%, respectively. Overall, acetylation modification effectively enhanced the antioxidant and antitumor activities of DHP. These findings provide a theoretical basis for the further development and application of acetylated polysaccharides.

Key words: *Dendrobium huoshanense*; polysaccharides; acetylation; antioxidant activity; antitumor activity

霍山石斛为兰科植物霍山石斛 (*Dendrobium huoshanense*) 新鲜或干燥茎^[1], 作为药食同源中药收载于《中国药典》^[2], 在中药临床处方中常用于治疗肠胃与眼部疾病^[3], 其在民间也常制成茶、汤、粥等形式食用^[1,4]。大量研究已证实霍山石斛富含多种营养成分包括多糖^[5]、黄酮类^[6]、生物碱^[7]等, 其中多糖作为霍山石斛中主要成分, 由甘露糖、半乳糖、木糖等单糖组成^[7,8]。目前已发现霍山石斛多糖具有抗氧化、抗肿瘤和免疫调节等多种价值^[7]。

天然多糖为环保再生资源, 其无生物毒性、可作为分子载体等特殊理化性质, 广泛应用于多个学科^[9-11]。多糖作为大分子聚合物难以被生物体充分利用, 众多研究者通过分子修饰调整多糖分子量、替换取代基团或调整空间构象等方法, 以增加多糖生物学特性, 扩展其应用范围^[12,13]。其中乙酰化是多糖修饰的常用方法, 引入亲脂性乙酰基团使多糖获得两亲性^[14], 从而扩展多糖在有机生物体和各种化学环境中的存在, 提高药理活性^[15,16]。同时乙酸酐法制备乙酰化多糖具有环保、成本低和易于控制等优势, 也被认为是提高多糖生物活性较优方法^[14]。目前已有大量学者使用天然多糖如青钱柳叶多糖、松树茸多糖、油茶籽粕多糖等, 通过乙酰化修饰, 其抗氧化活性得到增强^[17-19]。褐指藻、红球藻多糖乙酰化后抗肿瘤效果显著提升^[20,21]。Liu等^[22]对比了有无乙酰基对多糖抗肿瘤效果的影响, 通过荷瘤小鼠模型发现三种含乙酰基多糖对MFC肿瘤增殖抑制效果均强于无乙酰基多糖。上述研究结果证明乙酰化修饰对多糖活性有重要影响。因此, 该研究通过乙酸酐法合成A-DHP, 采用响应面法优化A-DHP制备工艺, 并评价乙酰化修饰前后DHP抗氧化和抗肿瘤

瘤效果, A-DHP可能在食品与制药领域具有潜在价值, 为霍山石斛的开发利用提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1640 基础培养基、DMEM 基础培养基, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; HepG2 细胞、C918 细胞, 武汉普诺赛生命科技有限公司; CCK-8 试剂盒, 亚科因生物技术有限公司; ABTS、DPPH、试剂盒, 上海源叶生物科技有限公司; 正丁醇、三氯甲烷、氢氧化钠、乙酸酐、三氯化铁、盐酸羟胺、 β -D-葡萄糖五乙酸酯(β -D-Glucose pentaacetate, β -Gp), 上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 仪器与设备

ETB01829 型冷冻干燥机, 德国 Zibus 公司; BioTek 型酶标仪, 美国安捷伦公司; MCO-170 型医用二氧化碳培养箱, 冰山松洋生物科技(大连)有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 DHP提取

将适量霍山石斛于 60 °C 烘箱烘至恒重。取超纯水与霍山石斛粉以投料比 40:1 (mL:g) 混合, 于 80 °C 下恒温搅拌 2 h, 共三次收集滤液, 于 6 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 去除不溶物。滤液于 60 °C 旋转蒸发浓缩后与乙醇按体积分数 1:4 (V:V) 混合, 收集沉淀复溶, 采用 Sevage 试剂(正丁醇与三氯甲烷体积分数为 1:4)^[23] 脱除溶液蛋白, 并利用透析袋(Spectra/Pore,

MWCO 3500) 透析除去低分子杂质, 透析液经冷冻干燥后得到 DHP。经苯酚-浓硫酸法^[24]绘制葡萄糖标准曲线。配置质量浓度 0.1 mg·mL⁻¹ 的 DHP 溶液按标曲方法测得样品吸光度, 多糖质量分数计算公式如下。

$$G = \frac{C_{sample}}{C} \times 100\%$$

(1)

式中:
G——多糖质量分数, %;
 C_{sample} ——样品吸光度带入标曲所得质量浓度, mg·mL⁻¹;
C——样品质量浓度, mg·mL⁻¹。

1.3.2 蛋白质质量分数测定

经考马斯亮蓝法绘制蛋白质标准曲线^[25]。配置质量浓度 1 mg·mL⁻¹ 的 DHP 溶液按标曲方法测得样品吸光度, 蛋白质质量分数计算公式如下。

$$O = \frac{C_{sample}}{C} \times 100\%$$

(2)

式中:
O——蛋白质质量分数, %;
 C_{sample} ——样品吸光度带入标曲所得质量浓度, mg·mL⁻¹;
C——样品质量浓度, mg·mL⁻¹。

1.3.3 A-DHP的制备

参照 Yu 等^[26]方法并略做修改, 取 100 mg DHP, 溶于 10 mL 超纯水中, 使用 1 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液调节多糖溶液至弱碱性, 置于 30 ℃ 水浴中加热。随即交替加入乙酸酐与 NaOH 溶液。乙酸酐共计加入 1 mL, 最终溶液 pH 值至 8, 反应 3 h。用稀盐酸调节溶液 pH 值至 7, 终止反应。之后将反应溶液置于透析袋 (Spectra/Pore, MWCO 3500) 中透析, 冷冻干燥后得 A-DHP。

1.3.4 乙酰基质量分数与取代度测定

使用羟胺比色法测定乙酰基质量分数^[24]。配置 7 mg·mL⁻¹ 的 β -Gp 标准液, 分别移取 0.0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL 标准液每管定容至 10 mL 混匀, 各组避光移取 1 mL, 依次加入 HONH₃Cl 溶液 (0.1 mol·L⁻¹) 与 NaOH 溶液 (1.5 mol·L⁻¹) 各 1 mL, 混匀后静置 20 min, 继续加入 HCl (2 mol·L⁻¹) 1 mL 混匀, 静置 20 min, 再加入 FeCl₃·6H₂O 溶液 (0.37 mol·L⁻¹) 2 mL, 混匀后静置 10 min。于 540 nm 下测得吸光度值。

取 10 mg 多糖充分溶于 10 mL 超纯水中, 配置为 1 mg·mL⁻¹ 的 DHP 溶液, 其余操作步骤同上述。乙酰基质量分数与取代度计算公式如下。

$$W = \frac{C_{sample}}{C} \times 100\%$$

(3)

$$D = \frac{162W}{4300 - (43 - 1)W}$$

(4)

式中:
D——乙酰基取代度;
W——乙酰基质量分数, %;
 C_{sample} ——样品吸光度带入标曲所得质量浓度, mg·mL⁻¹;
C——样品质量浓度, mg·mL⁻¹。

1.3.5 DHP乙酰化单因素实验

1.3.5.1 反应时间对A-DHP取代度的影响

配置质量浓度 10 mg·mL⁻¹ DHP 的溶液, 在反应温度为 30 ℃, 乙酸酐与 DHP 投料比为 10:1 (mL:g) 条件下, 分别于反应时间为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 h 条件下制备 A-DHP 并测定各样品取代度。

1.3.5.2 投料比对A-DHP取代度的影响

配置质量浓度 10 mg·mL⁻¹ DHP 的溶液, 在反应温度为 30 ℃, 反应时间 4.0 h 条件下, 分别于乙酸酐与 DHP 投料比为 5:1、10:1、15:1、20:1、25:1 (mL:g) 条件下制备 A-DHP 并测定各样品取代度。

1.3.5.3 反应温度对A-DHP取代度的影响

配置质量浓度 10 mg·mL⁻¹ DHP 的溶液, 在反应时间 4.0 h, 乙酸酐与 DHP 投料比为 15:1 (mL:g) 条件下, 分别于反应温度在 30、40、50、60、70 ℃ 条件下制备 A-DHP 并测定各样品取代度。

1.3.6 响应模型建立

根据单因素实验选取 A-DHP 制备的优势区间条件, 运用响应面分析软件, 进行 A-DHP 制备工艺优化。以反应时间、乙酸酐与 DHP 投料比、反应温度为自变量, A-DHP 取代度为响应值, 设计三试验因素和三试验水平响应面试验。

表 1 试验因素与水平表

Table 1 Experimental factors and levels table

水平	因素		
	A 反应时间/h	B 投料比(mL:g)	C 反应温度/℃
-1	3	10:1	30
0	4	15:1	40
1	5	20:1	50

1.3.7 FT-IR分析

采用 FT-IR 分析多糖官能团结构, 取一定量 DHP 与 A-DHP 分别与溴化钾粉末研磨均匀压制成片。于 500~4 000 cm⁻¹ 波数范围内扫描。

1.3.8 SEM分析

取一定量 DHP 与 A-DHP 于样品座上, 去除多余样品后喷金, 置于 SEM 观察多糖外表并分析。

1.3.9 ABTS⁺自由基清除率的测定

参照 Rumpf 等^[27]方法并略作修改, 分别移取各质

量浓度样品母液 100 μL 于 96 孔板中, 加入 ABTS 溶液 50 μL , 作为样品实验组, 加入 50 μL 超纯水作为样品对照组。ABTS 溶液 50 μL 加 100 μL 超纯水作为空白对照组, 避光 6 min 后于 734 nm 处测得吸光度值。计算公式如下:

$$B = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\% \quad (5)$$

式中:

B ——ABTS⁺ 自由基清除率, %;

A_0 ——空白组吸光度值;

A_1 ——实验组吸光度值;

A_2 ——样品对照组吸光度值。

1.3.10 DPPH 自由基清除率的测定

参照 Rumpf 等^[27] 方法并略作修改, 同 1.3.9 移取样品, 随后加入 DPPH 溶液 50 μL , 作为样品实验组, 加入 50 μL 超纯水作为样品对照组。DPPH 溶液 50 μL 加 100 μL 超纯水作为空白对照组, 避光 30 min 后于 517 nm 处测得吸光度值。计算公式如下:

$$P = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\% \quad (6)$$

式中:

P ——DPPH 自由基清除率, %;

A_0 ——空白组吸光度值;

A_1 ——实验组吸光度值;

A_2 ——样品对照组吸光度值。

1.3.11 羟基自由基清除能力的测定

参照宫益霞等^[24] 方法并略作修改, 分别取各浓度溶液 50 μL , 分别加入 50 μL 的 6 mmol·L⁻¹ 的 FeSO₄ 溶液、H₂O₂ 溶液和水杨酸溶液于 96 孔板中, 混匀于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 于 510 nm 处测得吸光度值。计算工式如下:

$$H = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\% \quad (7)$$

式中:

H ——羟基自由基清除率, %;

A_0 ——空白组吸光度值;

A_1 ——实验组吸光度值;

A_2 ——样品对照组吸光度值。

1.3.12 体外细胞毒性实验

培养细胞至对数期, 参照孙寒等^[20] 方法并略作修改, 将 100 μL 细胞悬液均匀铺于 96 孔板中 (每孔细胞约 3×10^4 个) 边缘加入 200 μL 的 PBS 缓冲液, 孵育 1 d 后, 移除废液。加入不同质量浓度含多糖培养基 (1、

2、4、8 mg·mL⁻¹) 100 μL 为各实验组, 加入空白培养基 100 μL 作为作对照组, 无细胞孔作为空白组。孵育 1 d 后弃去旧培养基, 每孔加入 100 μL 培养基与 10 μL CCK-8 溶液后避光孵育 3 h, 于 450 nm 处测得吸光度值。细胞存活率计算工式如下:

$$S = \frac{OD_E - OD_K}{OD_C - OD_K} \times 100 \quad (8)$$

式中:

S ——细胞存活率, %;

OD_K ——空白组吸光度值;

OD_E ——实验组吸光度值;

OD_C ——对照组吸光度值。

1.4 数据分析

实验所作图谱采用 Origin 与 GraphPad Prism 软件绘制, 且每次实验均有 3 个重复。统计变量以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 多组间采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 认为具有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 DHP 多糖质量分数测定

配置不同质量浓度葡萄糖标准液, 测得吸光度绘制标准曲线, 得标准曲线回归方程为:

$Y = 0.0073X - 0.0045$, $R^2 = 0.9992$, 经测定, DHP 多糖质量分数为 72.12%。

2.2 DHP 蛋白质质量分数测定

配置不同质量浓度牛血清蛋白标准液, 测得吸光度绘制标准曲线, 得标准曲线回归方程为:

$Y = 0.0043X - 0.0054$, $R^2 = 0.9993$, 经测定, DHP 蛋白质质量分数为 0.41%, 样品几乎不含蛋白质。

2.3 乙酰基质量分数测定

配置不同质量浓度乙酰基标准液, 根据羟胺比色法测得吸光度绘制标准曲线, 标准曲线回归方程为:

$Y = 0.7249X + 0.0468$, $R^2 = 0.9991$

2.4 单因素实验

2.4.1 反应时间对 A-DHP 取代度的影响

根据图 1, 前期随着反应时间的增加多糖取代度显著提高, 但 4 h 后取代度急速下降。可能由于过长的反应时间影响了多糖的稳定性, 或产物 A-DHP 在溶液环境中发生了其他副反应^[22]。

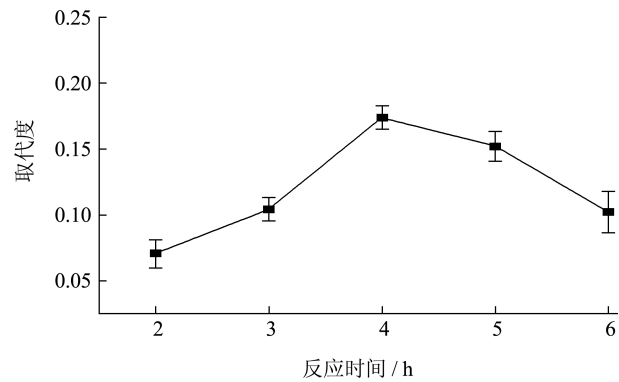


图 1 反应时间对 A-DHP 取代度的影响

Fig.1 The effect of reaction time on the acetylation polysaccharides substitution degree

2.4.2 反应投料比对A-DHP取代度的影响

由图 2 结果可得，随着乙酸酐与 DHP 的投料比增加，乙酸酐电离出更多的乙酸根与多糖碰撞结合的效率上升，取代度逐渐提高。投料比为 15:1 达到最高，之后继续增加投料比，乙酰基取代度显著降低。这可能由于过量的乙酸酐，使整个反应体系处于酸性环境，影响了 A-DHP 的稳定性，增大了其水解速度。

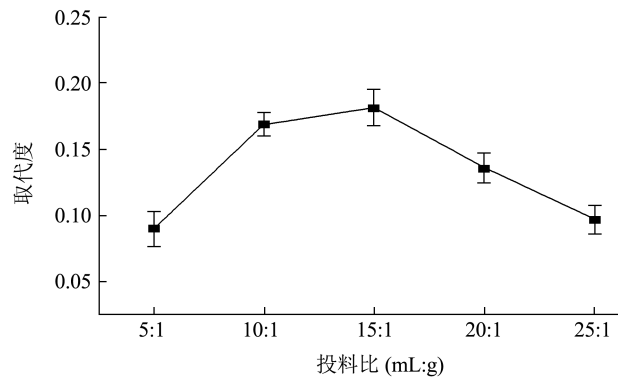


图 2 投料比对 A-DHP 取代度的影响

Fig.2 The effect of feeding ratio on the acetylation polysaccharides substitution degree

2.4.3 反应温度对A-DHP取代度的影响

从图 3 可知，在 30~40 ℃ 内，随温度升高反应体系内部分子平均动能增大，使反应体系中的分子离子更加活跃，缩短各组分达到活化能的时间使结合效率提高，取代度也随之增加。然而当反应温度大于 40 ℃ 之后，乙酰基取代度急速降低。这可能是在温度较高的环境中多糖与氢氧根离子发生脱乙酰基副反应^[22]，使得乙酰基质量分数迅速下降。

2.5 响应模型建立与方差分析

以单因素实验结果为基础，运用响应面法，进行 A-DHP 修饰工艺的优化，优化方案与结果见表 2。根

据实验数据 A-DHP 修饰工艺二次模拟模型方程为：
$$Y=0.2214-0.007A-0.015B-0.0353C+0.0057AB+0.0223AC+0.0023BC-0.0303A^2-0.0388B^2-0.0568C^2$$
。
采用方差分析验证模型。

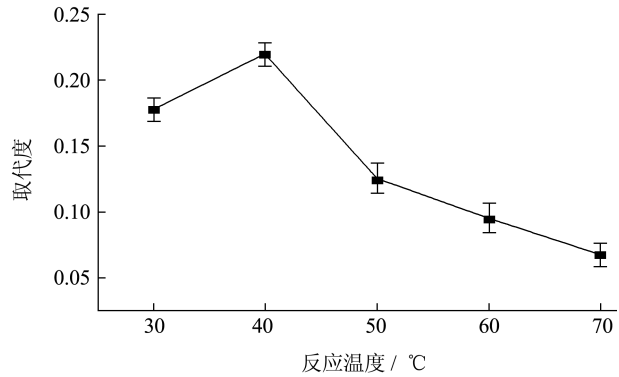


图 3 反应温度对 A-DHP 取代度的影响

Fig.3 The effect of reaction temperature on the acetylation polysaccharides substitution degree

表 2 响应面试验设计与结果

Table 2 Response surface test design and results				
试验号	因素			取代度
	A	B	C	
1	1	-1	0	0.155 ± 0.004
2	0	1	-1	0.139 ± 0.003
3	-1	0	-1	0.198 ± 0.007
4	-1	1	0	0.138 ± 0.003
5	1	1	0	0.136 ± 0.005
6	0	-1	1	0.107 ± 0.008
7	0	0	0	0.236 ± 0.008
8	-1	0	1	0.068 ± 0.007
9	0	0	0	0.229 ± 0.006
10	0	0	0	0.216 ± 0.015
11	1	0	1	0.115 ± 0.003
12	0	0	0	0.205 ± 0.006
13	0	0	0	0.221 ± 0.026
14	1	0	-1	0.156 ± 0.027
15	0	1	1	0.089 ± 0.011
16	0	-1	-1	0.168 ± 0.008
17	-1	-1	0	0.180 ± 0.011

从表 3 方差分析结果来看，响应面模型 $P<0.0001$ ，表明拟合得到的响应面模型极为显著。同时，失拟项值为 0.3626， $P>0.05$ ，说明水平与因素选择较为合适，其他因素对试验结果干扰程度低。模型的总回归系数 $R^2=0.9715$ ，校正后决定系数 $R^2_{Adj}=0.9349$ ，证明模型拟合程度高，选取的各因素对多糖乙酰化取代度

的作用较为显著。方程变异系数 $CV=7.98\%$ ($<10\%$) 说明数据离散程度较小, 分布较为密集, 模型预测取代度与试验结果取代度之间拟合度较好。其中投料比、反应温度对 DHP 乙酰化取代度有显著影响, 自变量影响顺序为 C (反应温度) $>B$ (投料比) $>A$ (反应时间); 交互项中 AC 对取代度显著影响; 二次项均对 A-DHP 取代度显著影响。

表 3 回归模型方差分析					
Table 3 Analysis of regression model variance					
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.040	9	0.004 4	26.53	0.000 1
<i>A</i>	0.000 1	1	0.000 1	0.36	0.566 7
<i>B</i>	0.001 5	1	0.001 5	8.71	0.021 4
<i>C</i>	0.009 9	1	0.009 9	59.39	0.000 1
<i>AB</i>	0.000 1	1	0.000 1	0.79	0.403 6
<i>AC</i>	0.002 0	1	0.002 0	11.83	0.010 8
<i>BC</i>	0.000 0	1	0.000 0	0.18	0.683 5
<i>A</i> ²	0.003 9	1	0.003 9	23.13	0.001 9
<i>B</i> ²	0.006 3	1	0.006 3	37.92	0.000 5
<i>C</i> ²	0.014	1	0.014	81.23	$<0.000\ 1$
残差	0.001 2	7	0.000 2		
失拟项	0.000 6	3	0.000 2	1.41	0.362 6
净误差	0.000 6	4	0.000 1		
总和	0.041	16			
<i>R</i> ²	0.971 5				
<i>R</i> ² _{Adj}	0.934 9				

注: $P<0.05$ 为差异显著; $P<0.001$ 为差异极显著。

2.6 响应面分析

基于响应面回归模型方差分析结果, 创建反应温度、乙酸酐与多糖投料比和反应时间的交互作用响应面图及等高线图。结果显示, 最佳条件均处于各因素水平范围内。因素交互作用对多糖乙酰化取代度的影响程度可通过等高线轮廓、密集程度及响应曲面起伏幅度等体现。由图 4a 可知, 固定温度为 40 ℃ 时, 伴随投料比和时间水平改变, 多糖乙酰基取代度值变化较为平缓。其等高线线图中核心区域面积较小且为圆形, 判断投料比和时间交互作用不显著。由图 4b 知, 当固定投料比为 15:1 时, 随着反应温度与反应时间水平的增加其对应的响应面曲面较陡峭, 等高线为椭圆状, 因此在固定投料比的条件下温度与时间两因素交互作用显著。图 4c 显示, 当反应时间为 4 h, 随着温度和投料比水平的增加, 其对应的等高线呈现类圆形, 分布不密集, 说明反应温度和投料比交互作用不显著。

上述结果与方差分析结果一致。

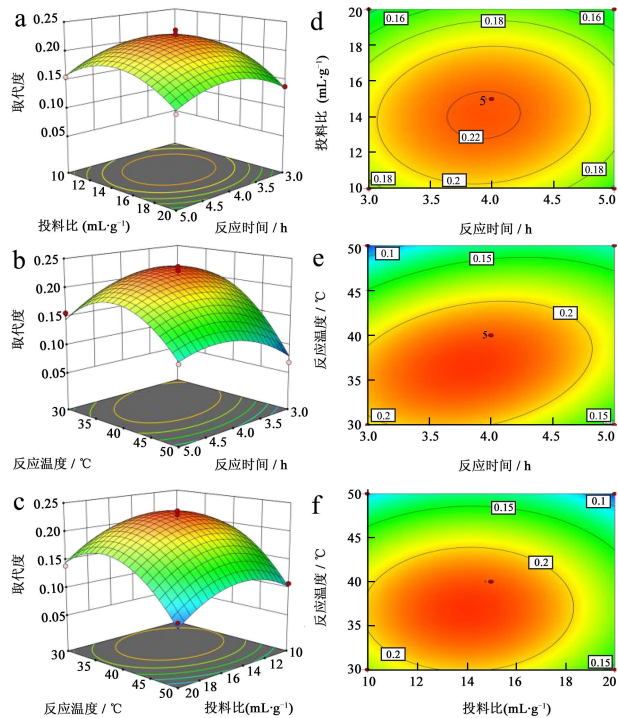


图 4 三因素交互作用 A-DHP 取代度响应曲面与等高线图
Fig.4 DHP acetylation response surface and contour map on three factor interaction

2.7 验证试验

根据响应面软件的分析 DHP 乙酰化修饰的最佳条件为: 反应温度 36.47 ℃、反应时间 3.81 h、投料比 14:1, 此时预测的乙酰基取代度为 0.229。在实际操作过程中, 对预测的试验条件稍作修改, 确定的最佳工艺条件为反应温度 36 ℃、反应时间 3.8 h、投料比 1:14, 此时乙酰基取代度为 0.226, 与预测值十分相近, 证明了响应面模拟的最佳工艺条件具有可行性。

2.8 傅里叶红外光谱图分析

如图 5 所示, DHP 和 A-DHP 具有相类似的红外特征吸收峰。在 3 427 cm^{-1} 观察到一个强宽吸收带由多糖内部或分子间 O-H 产生, 位于 2 928 cm^{-1} 处的吸收峰由 C-H 的振动引起。此二峰为高分子糖类的特征吸收峰, 证明乙酰化修饰前后并未对多糖的基本构型造成改变。A-DHP 在 1 733 cm^{-1} 与 1 249 cm^{-1} 处的吸收峰强度明显高于 DHP, 此为多糖酯化羧基 C=O 与多糖类酯基 C-O 引起, 表明霍山石斛多糖乙酰化程度显著提高, 同时证明多糖乙酰基取代的成功^[21]。此外, A-DHP 于 1 634 cm^{-1} 吸收峰强度减低表明多糖酮基含量降低, 由乙酰基与酮基所缩合反应所致。1 401 cm^{-1} 处吸收峰为 C-H 的变角震动, 强度下降, 与 1 030 cm^{-1} 处吸收峰推测多糖吡喃糖环结构减少。

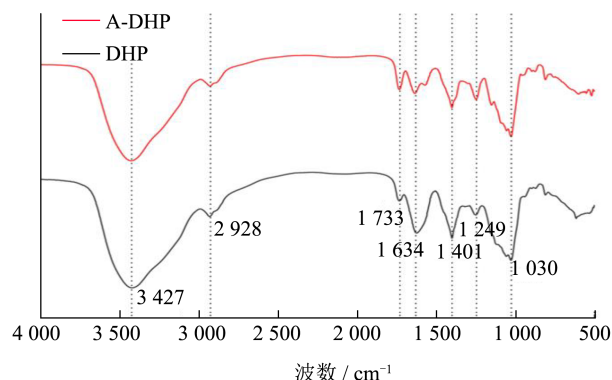


图5 DHP与A-DHP红外吸收光谱图

Fig.5 Infrared absorption spectra of DHP and A-DHP

2.9 扫描电镜分析

通过扫描电子显微镜 (SEM) 观察到 DHP 表面较为光滑平整, 结构紧密。乙酰化修饰后, A-DHP 表面粗糙不平整, 松散不规则。结果显示 DHP 经过乙酰化修饰后微观结构发生改变, 这可能是由于乙酰化修饰使得 DHP 空间结构发生了改变, 糖链间氢键交联程度降低等, 从而引起表面形貌的变化^[21]。

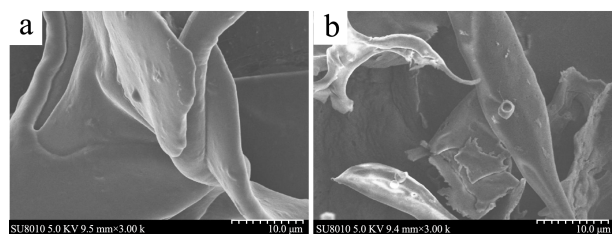


图6 DHP与A-DHP放大3000倍扫描电镜图

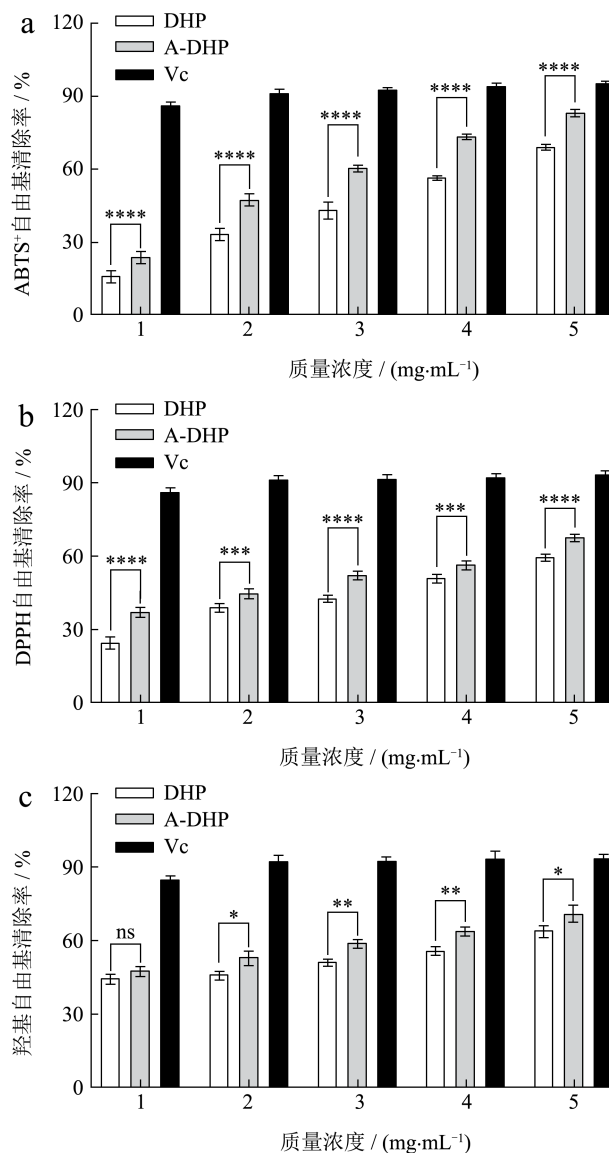
Fig.6 Scanning electron microscopy images of DHP and A-DHP magnified 3000 times

注: 图a为DHP; 图b为A-DHP。

2.10 DHP及A-DHP抗氧化能力分析

如图7所示, DHP 修饰前后, 均具有清除 ABTS^+ 、DPPH、羟基自由基的功效, 当质量浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, Vc、DHP 和 A-DHP 对 ABTS^+ 自由基的清除率分别为 95.17%、65.30% 和 80.21%, 对 DPPH 自由基的清除率分别为 93.47%、59.97% 和 67.73%, 对羟基自由基的清除率分别为 93.95%、64.43% 和 71.14%, 说明多糖乙酰化修饰后抗氧化性得到增强, 且二者具有显著性差异。贾朋贺等^[28]发现乙酰化后蛋黄果多糖对 ABTS^+ 自由基最大清除率提高了 15.03%。李爽等^[29]对蒲公英多糖进行乙酰化修饰后发现质量浓度在 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 乙酰化蒲公英多糖对 DPPH 自由基清除率达到 55.41%, 比修饰前 44.64% 提高了 10.77%。乙酰化后多糖抗氧化活性增加, 其糖链结构发生改变, 外露更多羟基提高溶解度有关, 同时乙酰

基激活了杂原子碳上的氢原子, 影响了电荷密度、氢离子供应能力提高抗氧化能力^[14]。

图7 DHP与A-DHP对 ABTS^+ 、DPPH、羟基自由基清除活性Fig.7 The scavenging activity of DHP and A-DHP on ABTS^+ , DPPH, Hydroxyl free radical

注: 与 DHP 组比较, ns 为无显著性差异, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$ 。

2.11 DHP及A-DHP抗肿瘤活性分析

由图8可知, DHP 及 A-DHP 对 HepG2、C918 肿瘤细胞增殖有一定抑制作用, 且呈现剂量依赖性。当质量浓度达到 $8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时 DHP 与 A-DHP 对 HepG2 和 C918 细胞的抑制率达到了 34.20%、50.46% 和 50.1%、66.7%。其中 IC_{50} 值为 12.82、7.398 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 8.152、5.638 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与 DHP 相比, A-DHP 活性显著提高 ($P < 0.05$)。孙寒等^[20]在三角褐指藻四种改性多糖中筛选抗肿瘤活性后发现, 乙酰化多糖对 Hela 细

胞增殖抑制效果最强。藏颖等^[21]对雨生红球藻多糖进行乙酰化修饰。发现修饰后多糖显著增加了对 HepG2 与 Hela 细胞的抑制作用,使得细胞形态异常且细胞碎片增多。这可能由于多糖经过乙酰基取代后调整多糖链构象与结构等,使得多糖更容易透过肿瘤细胞生物膜被细胞摄取,从而提高抗肿瘤作用。

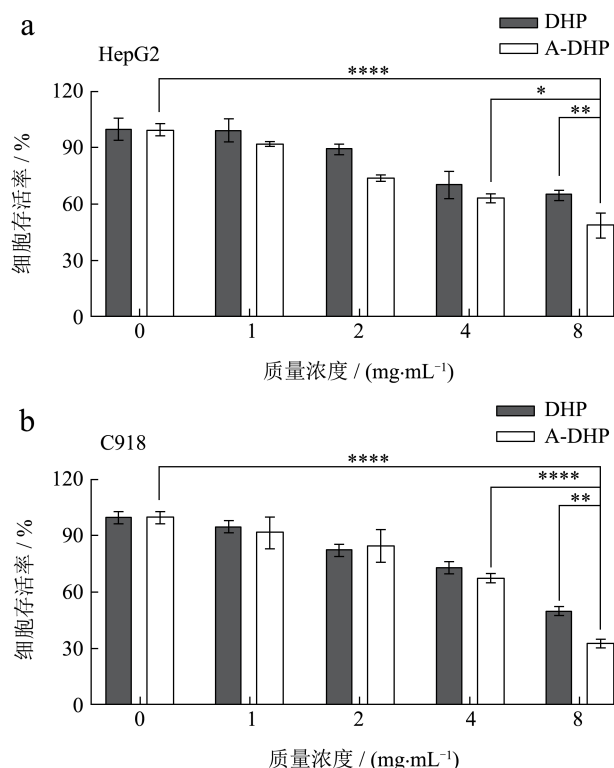


图 8 DHP 与 A-DHP 对 HepG2、C918 细胞增殖影响

Fig.8 The proliferation effects of DHP and A-DHP on HepG2 and C918 cells

注: 与 8 mg·mL⁻¹ 的 A-DHP 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ 。

3 结论

该研究通过单因素实验与响应面法相结合的方法,对 DHP 乙酰化反应条件进行了深入研究。研究发现反应时间、投料比、反应温度对 DHP 乙酰化程度均有影响。基于响应面实验结果,最终确定 A-DHP 的最佳制备条件为反应时间 3.8 h、投料比 14:1、反应温度 36 °C。此时 A-DHP 取代度达到 0.226,且与预期值接近,证明响应面法得到的模型合理可行。该研究进一步评估了 A-DHP 的抗氧化和抗肿瘤活性。通过体外抗氧化实验发现,在质量浓度为 5 mg·mL⁻¹ 时 A-DHP 对 ABTS⁺、DPPH 自由基清除率提高 14.91% 与 7.76%,且呈剂量依赖性。细胞毒性实验结果表明,DHP 及 A-DHP 对 C918、HepG2 等肿瘤细胞增殖有一定抑制作用,且高质量浓度下 A-DHP 对 C918 与 HepG2 细

胞抑制率提高 15.90% 与 16.24%。综上,当 DHP 通过化学修饰引入乙酰基时,其抗氧化、抗肿瘤活性均有一定提升,然而仍需进一步探索多糖结构与活性的之间的机制,该研究结果为 DHP 深入研究提供了方向和参考。

参考文献

- [1] WANG Y H. Traditional uses, chemical constituents, pharmacological activities, and toxicological effects of *Dendrobium* leaves: A review [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 270: 113851.
- [2] 国家药典委员会. 中国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [3] YAO L, FANG J, ZHAO J, et al. *Dendrobium huoshanense* in the treatment of ulcerative colitis: Network pharmacology and experimental validation [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2024, 323: 117729.
- [4] DENG Y, CHEN L X, HAN B X, et al. Qualitative and quantitative analysis of specific polysaccharides in *Dendrobium huoshanense* by using saccharide mapping and chromatographic methods [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, 129: 163-171.
- [5] WANG H Y, LI Q M, YU N J, et al. *Dendrobium huoshanense* polysaccharide regulates hepatic glucose homeostasis and pancreatic beta-cell function in type 2 diabetic mice [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 211: 39-48.
- [6] YUAN Y, ZUO J, ZHANG H, et al. Integration of transcriptome and metabolome provides new insights to flavonoids biosynthesis in *Dendrobium huoshanense* [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 850090.
- [7] GAO L, WANG F, HOU T, et al. *Dendrobium huoshanense* C.Z.Tang et S.J.Cheng: A review of its traditional uses, phytochemistry, and pharmacology [J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 920823.
- [8] ZHANG X, FANG J, GE R, et al. Regulation of glucolipid metabolism in mice using *Dendrobium huoshanense* extract and PI3k/Akt signaling pathway activation [J]. Journal of Food Biochemistry, 2023, 2023: 1-12.
- [9] SALEHIZADEH H, YAN N, FARNOOD R. Recent advances in polysaccharide bio-based flocculants [J]. Biotechnology Advances, 2018, 36(1): 92-119.
- [10] PLUCINSKI A, LYU Z, SCHMIDT B. Polysaccharide nanoparticles: from fabrication to applications [J]. Journal of Materials Chemistry B, 2021, 9(35): 7030-7062.
- [11] NAI J, ZHANG C, SHAO H, et al. Extraction, structure, pharmacological activities and drug carrier applications of *Angelica sinensis* polysaccharide [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 183: 2337-2353.
- [12] XIE L, SHEN M, HONG Y, et al. Chemical modifications of polysaccharides and their anti-tumor activities [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 229: 115436.
- [13] MEHBOOB S, ALI T M, SHEIKH M, et al. Effects of cross linking and/or acetylation on sorghum starch and film characteristics [J].

- International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 155: 786-794.
- [14] WANG X, WANG Z, SHEN M, et al. Acetylated polysaccharides: Synthesis, physicochemical properties, bioactivities, and food applications [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2024, 64(15): 4849-4864.
- [15] CHAKKA V P, ZHOU T. Carboxymethylation of polysaccharides: Synthesis and bioactivities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 165: 2425-2431.
- [16] CHEN F, HUANG G. Preparation and immunological activity of polysaccharides and their derivatives [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 112: 211-216.
- [17] 王之珺,张柳婧,钟莹霞,等.青钱柳多糖的乙酰化修饰及抗氧化活性[J].食品科学,2015,36(21):6-9.
- [18] 徐田甜,陈义勇.松树茸多糖乙酰化修饰工艺及其抗氧化活性[J].食品与发酵工业,2017,43(4):164-170.
- [19] 杨建安,张超,文焱炳,等.油茶籽粕多糖不同分子修饰产物的抗氧化活性[J].中国油脂,2022,47(10):143-148.
- [20] 孙寒,刘松,宁紫月,等.几种化学修饰的三角褐指藻胞内多糖对宫颈癌Hela细胞增殖的抑制效果比较[J].现代食品科技,2024, 40(7):8-16.
- [21] 藏颖,梁钟文,刘松,等.化学修饰对雨生红球藻多糖体外抗肿瘤活性的影响[J].食品科技,2024,49(2):203-210.
- [22] LIU B, LI Q M, SHANG Z Z, et al. Anti-gastric cancer activity of cultivated *Dendrobium huoshanense* stem polysaccharide in tumor-bearing mice: Effects of molecular weight and O-acetyl group [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 192: 590-599.
- [23] PAN L H, LI X F, WANG M N, et al. Comparison of hypoglycemic and antioxidative effects of polysaccharides from four different *Dendrobium* species [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 64: 420-427.
- [24] 宫益霞,孔凡星,卢玉婷,等.辽东槲木芽多糖乙酰化修饰工艺及其抗氧化活性研究[J].中国食品添加剂,2024,35(1):162-170.
- [25] 冯薇,李静洁,李紫薇,等.鬼臼多糖的提取、结构表征及其生物活性[J/OL].精细化工,1-18[2025-11-05].
- [26] YU B, LIN B, HUANG G. Preparation of acetylated grapefruit peel polysaccharide [J]. Chemistry & Biodiversity, 2023, 20(7): e202300167.
- [27] RUMPF J, BURGER R, SCHULZE M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 233: 123470.
- [28] 贾朋贺,田铁男,徐晓军,等.乙酰化蛋黄果多糖及其抗氧化活性研究[J].热带作物学报,2022,43(9):1862-1869.
- [29] 李爽,赵宏,王宇亮,等.蒲公英多糖乙酰化修饰、体外抗氧化及抑菌作用研究[J].食品工业科技,2022,43(3):18-25.