

孙宁云, 姚欣, 张英慧, 等. 鸡蛋花多糖提取工艺优化及生物活性研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(3): 180–187. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050198

SUN Ningyun, YAO Xin, ZHANG Yinghui, et al. Optimization of Extraction Process of Polysaccharides from *Plumeria rubra* L.cv. *Acutifolia* and Evaluation of Biological Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(3): 180–187. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050198

· 工艺技术 ·

鸡蛋花多糖提取工艺优化及生物活性研究

孙宁云¹, 姚欣¹, 张英慧¹, 杨安平², 刘辉^{1,2,*}

(1. 佛山科学技术学院食品科学与工程学院, 广东佛山 528225;

2. 佛山科学技术学院医学院, 广东佛山 528000)

摘要:目的: 优化鸡蛋花 (*Plumeria rubra* L. cv. *Acutifolia*) 多糖的提取工艺, 并对鸡蛋花多糖 (PRLAP) 体外抗氧化、抗菌、抗肿瘤活性进行评价。方法: 通过单因素实验设计正交试验, 确定 PRLAP 的最佳提取条件; 通过测 PRLAP 对 DPPH、ABTS 和 OH 自由基清除能力来评价 PRLAP 的抗氧化活性; 采用微量肉汤稀释法测 PRLAP 对大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的最小抑菌浓度 (minimal inhibit concentration, MIC) 来评价 PRLAP 的抑菌活性; 此外, 通过 CCK-8 法检测 PRLAP 对人黑色素瘤细胞 (A375)、小鼠黑色素瘤细胞 (B16)、人结直肠癌上皮细胞 (DLD-1)、人乳腺癌细胞 (MCF-7) 细胞活力的影响来评价 PRLAP 的抗肿瘤能力。结果: PRLAP 最佳提取条件: 超声功率 264 W、料液比 1:50 (g/mL)、提取时间 40 min、提取温度 35 ℃。此条件下, PRLAP 的得率为 14.01%±0.22%。PRLAP 清除 DPPH、ABTS、OH 自由基的半抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 0.1934、0.2315、2.469 mg/mL。PRLAP 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 分别为 0.391 和 0.195 mg/mL, 对铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌和鲍曼不动杆菌的 MIC 均为 1.562 mg/mL。细胞活力实验结果表明, 在一定浓度范围内, 除 DLD-1 细胞外, PRLAP 对 A375、B16 和 MCF-7 细胞活力有一定的抑制作用且与浓度均呈剂量依赖性, IC₅₀ 分别为 101.3、285.6、423.1 μg/mL。结论: 本文首次对鸡蛋花多糖提取工艺进行了优化, 通过一系列实验证明 PRLAP 具有良好的体外抗氧化、抑菌以及一定的抗肿瘤活性, 为进一步研究开发鸡蛋花提供科学理论支撑。

关键词: 鸡蛋花多糖, 提取工艺, 抗氧化, 抗菌, 抗肿瘤

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)03-0180-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050198

本文网刊:



Optimization of Extraction Process of Polysaccharides from *Plumeria rubra* L.cv. *Acutifolia* and Evaluation of Biological Activity

SUN Ningyun¹, YAO Xin¹, ZHANG Yinghui¹, YANG Anping², LIU Hui^{1,2,*}

(1. School of Food Science and Engineering, Foshan University, Foshan 528225, China;

2. School of Medicine, Foshan University, Foshan 528000, China)

Abstract: Objective: To optimize the extraction process of polysaccharides from *Plumeria rubra* L. cv. *Acutifolia*, and make a comment about antioxidant, antibacterial and anti-tumor activities of *Plumeria* polysaccharide. Methods: The orthogonal experiment was designed by single factor experiment and the optimal extraction conditions were determined. The antioxidant activity was evaluated by measuring its scavenging ability to DPPH, ABTS, and OH free radical assays. The minimum inhibitory concentration of *Plumeria* polysaccharide against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, and *Klebsiella pneumoniae* was measured by the micro broth dilution method to evaluate the antibacterial activity of *Plumeria* polysaccharide. In addition, CCK-8 assay was used to evaluate the

收稿日期: 2021-05-25

基金项目: 广东省自然科学基金 (2019A1515110696); 广东省教育厅自然科学基金 (2019KQNCX171)。

作者简介: 孙宁云 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品功能性成分研究, E-mail: sny0403@163.com。

* 通信作者: 刘辉 (1990-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 天然产物活性成分研究, E-mail: tianmahui2011@163.com。

inhibitory effect of *Plumeria* polysaccharide on human melanoma cells (A375), mouse melanoma cells (B16), human colorectal cancer epithelial cells (DLD-1) and human breast cancer cells (MCF-7). Results: The optimum conditions of *Plumeria* polysaccharide were as follows: Ultrasonic power was 264 W, solid-liquid ratio was 1:50 (g/mL), extraction time was 40 min, extraction temperature was 35 °C. Under these conditions, the yield of *Plumeria* polysaccharide was 14.01%±0.22%. The half-inhibitory concentrations of *Plumeria* polysaccharide in scavenging DPPH, ABTS and OH free radicals were 0.1934, 0.2315 and 2.469 mg/mL, respectively. The minimum inhibitory concentrations of *Plumeria* polysaccharide against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was 0.391 and 0.195 mg/mL, respectively, and the minimum inhibitory concentrations against *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* were all 1.562 mg/mL. The results of cell viability experiments showed that within a certain concentration range, except for DLD-1 cells, *Plumeria* polysaccharide had a certain inhibitory effect on the viability of A375, B16 and MCF-7 cells and was dose-dependent with the concentration, with IC₅₀ of 101.3, 285.6 and 423.1 µg/mL. Conclusion: This article optimizes the extraction process of *Plumeria* polysaccharides for the first time. A series of experiments prove that *Plumeria* polysaccharide has good antioxidant, antibacterial and anti-tumor activities *in vitro*. This research provides a certain data theoretical support for the further development and utilization of *Plumeria*.

Key words: *Plumeria* polysaccharide; extraction process; antioxidant; antibacterial; anti-tumor

鸡蛋花为夹竹桃科(Apocynaceae)鸡蛋花属植物鸡蛋花(*Plumeria rubra* Linn.cv. *Acutifolia*)的干燥花,别名缅栀子、蛋黄花等。原产于墨西哥,在我国主要分布于广东、广西、海南等省区^[1]。鸡蛋花是岭南地区常用药材,具有清热、利湿、解暑之功效。民间常采其泡茶、煲汤,用于消暑。鸡蛋花是“王老吉凉茶”、“五花茶”等广式凉茶的主要配方材料之一^[2]。由于鸡蛋花的特殊香气,其提取物可用作高级化妆品、香皂和食品添加剂。化学成分研究表明鸡蛋花主要含有三萜^[3]、环烯醚萜^[4-5]、黄酮^[6]、糖类、脂肪族类等化合物^[7-8]。现代药理研究表明鸡蛋花提取物具有抗氧化^[6]、抗菌^[9]、抗肿瘤^[10]、降血糖^[11]等活性。多糖是广泛存在于植物、动物和微生物中一种分子结构复杂且庞大的糖类物质,具有抗氧化^[12]、免疫调节^[13]、抗肿瘤^[14]、抗菌^[15]、抗炎^[16]、抗病毒^[17]、降血糖及降血脂^[18-19]等广泛的生物活性。

不同鸡蛋花属的不同部位、不同溶剂提取物具有不同的药理活性,如 *P. acuminata* (leaves) 甲醇提取物具有抗氧化和清除自由基的活性^[20], DAWOOD 等^[21] 从白鸡蛋花(*Plumeria alba* L.) 叶中提取了粗多糖,并证明其具有较强的抗氧化能力。引入我国药食同源的是黄鸡蛋花(*Plumeria rubra* Linn.cv. *Acutifolia*)。广式凉茶具有祛暑败火气,清热解毒、生津止渴的功效。何蓉蓉等^[22] 以王老吉凉茶为药物,通过葡萄糖耐受实验来观察应激和血糖代谢的关系,测定小鼠体内氧化水平和抗氧化能力的变化。结果表明:王老吉凉茶不仅能降低血浆中丙二醛(MDA)的含量,同时能够显著提高体内的抗氧化能力指数(ORAC)水平,可明显缓解机体内的氧化应激状态,改善糖代谢不足。

目前,对鸡蛋花的研究主要集中在环烯醚萜类和挥发油方面,而关于鸡蛋花多糖的研究鲜有报道。因此,本文首次对鸡蛋花多糖提取工艺及抗氧化、抗菌、抗肿瘤活性进行研究,为鸡蛋花在食品、医药方面的进一步开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鸡蛋花干燥花 采于中国科学院南海生物医学药科技产业中心;葡萄糖、苯酚、过硫酸钾、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)、二甲基亚砜 上海麦克林生化科技有限公司;CCK-8 细胞毒性检测试剂盒 亚科因(武汉)生物技术有限公司;LB 培养基 青岛海博生物技术有限公司;DMEM 培养基和胎牛血清 Biological Industries;胰酶、PBS 美国 Gibco 公司;青霉素、链霉素 上海抚生有限公司;菌种(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌) 广东省微生物菌种保藏中心;细胞(A375 细胞、B16 细胞、MCF-7 细胞、DLD-1 细胞) 中国科学院上海细胞中心;其它化学试剂均为分析纯。

060ST 超声波清洗器 深圳市华策科技有限公司;TG16-WS 低温高速离心机 美国 Beckman 公司;UV-2700 紫外分光光度计 岛津企业管理(中国)有限公司;EPOCH 酶标仪 美国 Bio Tek 公司;LRH-150 智能生化培养箱 郑州生元仪器有限公司;BB 5060 二氧化碳培养箱 致微(厦门)仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 鸡蛋花多糖(PRLAP)提取工艺 取鸡蛋花干燥花粉末→石油醚脱脂→超声辅助水提→提取液浓缩→离心→Sevage 法除蛋白质→体积分数 95% 乙醇沉淀→洗涤沉淀→冷冻干燥→鸡蛋花多糖(PRLAP)。

将晒干的鸡蛋花干燥花粉碎,过 60 目筛,得鸡蛋花粉末,取 500 g 鸡蛋花粉末放入 10 L 的三口瓶中,加入 10 倍体积的石油醚进行脱脂、脱色至石油醚颜色接近无色,过滤,将鸡蛋花滤渣放置烘箱中烘干,常温下冷却后,混匀转移到保鲜袋中备用。称取上述处理后的鸡蛋花粉末 1 g 放置于 50 mL 三角瓶

中。在一定超声功率、液料比、提取时间和提取温度下进行 PRLAP 的提取,待提取液冷却到室温,在 10000 r/min 条件下离心 1 min,用 Seavage 法除蛋白质:取 PRLAP 溶液 4 mL,氯仿-正丁醇(预先配制成体积比为 4:1 混合液)溶液 1 mL,置于具塞试管中,充分振摇 30 min 后,10000 r/min 离心 1 min,然后将水相与氯仿相分开,将水相再加入相当于其体积 1/4 的氯仿-正丁醇溶液,重复上述过程,直至蛋白质除掉。将除蛋白后的提取液用 95% 的乙醇 4 ℃ 醇沉 12 h,之后在 10000 r/min 条件下离心 1 min,弃去上清液,将得到的醇沉物溶解于水中,最后冷冻干燥得鸡蛋花多糖。

1.2.2 单因素实验设计 称取 1 g 鸡蛋花粉末 3 份,固定料液比 1:40(g/mL)、提取时间 30 min,提取温度 40 ℃,分别测定超声功率在 216、240、264、288、312 W 时 PRLAP 得率。

称取 1 g 鸡蛋花粉末 3 份,固定超声功率 288 W、提取时间 30 min、提取温度 40 ℃,分别测定料液比在 1:20、1:30、1:40、1:50、1:60(g/mL)时 PRLAP 得率。

称取 1 g 鸡蛋花粉末 3 份,固定超声功率 288 W、料液比 1:50(g/mL)、提取温度 40 ℃,分别测定提取时间在 10、20、30、40、50 min 时 PRLAP 得率。

称取 1 g 鸡蛋花粉末 3 份,固定超声功率 288 W、料液比 1:50(g/mL)、提取时间 40 min,分别测定提取温度在 35、40、45、50、55 ℃ 时 PRLAP 得率。

1.2.3 正交试验优化 鸡蛋花多糖提取工艺根据单因素实验结果选择超声功率、料液比、提取时间、提取温度为自变量,多糖得率为因变量,进行四因素三水平正交试验,试验因素设置见表 1。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平及编码

Table 1 The factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

水平	因素			
	A超声功率 (W)	B料液比 (g/mL)	C提取时间 (min)	D提取温度 (℃)
1	264	1:40	20	35
2	288	1:50	30	40
3	312	1:60	40	45

1.2.4 PRLAP 的测定

1.2.4.1 葡萄糖标准曲线的绘制 称取真空干燥的葡萄糖标准品 10 mg 定容到 100 mL 容量瓶中,配成 0.1 mg/mL 的葡萄糖标准溶液。分别精密移取葡萄糖标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8 mL 于大试管中,补加蒸馏水至 1 mL,分别加入 1 mL 5% 苯酚,摇匀,再分别加入 5 mL 浓硫酸,于 37 ℃ 水浴静置 30 min,在 488 nm 测吸光值。以葡萄糖浓度 C 为横坐标(mg/mL),吸光值 A 为纵坐标,绘制葡萄糖标准曲线回归方程为: $A=0.0094C+0.0928$, $R^2=0.993$ 。

1.2.4.2 PRLAP 含量测定 采用苯酚—硫酸法^[23]进

行 PRLAP 含量的测定。准确吸取样品溶液 1 mL 于试管中,分别加 5% 苯酚溶液 1 mL,振荡摇匀,再分别加入浓硫酸 5 mL,振荡摇匀,于 37 ℃ 水浴放置 30 min,488 nm 测定吸光值。根据测得的吸光值带入标准曲线回归方程,计算 PRLAP 浓度。根据公式(1)计算 PRLAP 得率。

$$\text{多糖得率}(\%) = \frac{c \times V \times n}{m} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中: c 表示根据吸光度值计算出的鸡蛋花多糖质量浓度, g/mL; V 表示提取液总体积, mL; n 表示稀释倍数; m 表示鸡蛋花取样量, g。

1.2.5 PRLAP 体外抗氧化活性研究

1.2.5.1 DPPH 自由基清除率测定 根据 WANG 等^[24]的方法稍作修改。取不同浓度(0.01562、0.03125、0.0625、0.125、0.25、0.5、1 mg/mL)的 PRLAP 溶液以及相同浓度下的阳性对照 V_C 对 DPPH 自由基清除率进行测定。步骤如下:实验组于 96 孔板中依次加入上述浓度下的 PRLAP 或 V_C 50 μ L、0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液 150 μ L;实验对照组依次加入上述浓度下的 PRLAP 或 V_C 50 μ L、蒸馏水 150 μ L;空白对照组依次加入蒸馏水 50 μ L、0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液 150 μ L。室温避光处理 30 min,517 nm 处测其吸光度,根据公式(2)计算 PRLAP 和 V_C 的清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: A_1 : 不同浓度的 PRLAP 或 V_C 加 DPPH 测得的吸光值; A_2 : 不同浓度的 PRLAP 或 V_C 加水测得的吸光值; A_0 : 只加水和 DPPH 所测得的吸光度值。

1.2.5.2 ABTS 自由基清除率测定 根据 TANG 等^[25]的方法稍作修改。取不同浓度(0.01562、0.03125、0.0625、0.125、0.25、0.5、1 mg/mL)的 PRLAP 溶液以及相同浓度下的阳性对照 V_C 对 ABTS 自由基清除率进行测定。步骤如下:实验组于 96 孔板中依次加入上述浓度下的 PRLAP 或 V_C 50 μ L、7 mmol/L ABTS 和 4.95 mmol/L $K_2S_2O_8$ 混合液 150 μ L;实验对照组依次加入上述浓度下的 PRLAP 或 V_C 50 μ L、蒸馏水 150 μ L;空白对照组依次加入蒸馏水 50 μ L、7 mmol/L ABTS 和 4.95 mmol/L $K_2S_2O_8$ 混合液 150 μ L。室温避光处理 30 min,734 nm 处测其吸光值,根据公式(3)计算 PRLAP 和 V_C 的清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中: A_1 表示不同浓度的 PRLAP 或 V_C 加 ABTS 和 $K_2S_2O_8$ 混合液测得的吸光值; A_2 表示不同浓度的 PRLAP 或 V_C 加水测得的吸光值; A_0 表示只加水和 ABTS 和 $K_2S_2O_8$ 混合液所测得的吸光度值。

1.2.5.3 OH 自由基清除率测定 根据王迦琦等^[26]的方法稍作修改。取不同浓度(0.01562、0.03125、

0.0625、0.125、0.25、0.5、1 mg/mL)的 PRLAP 溶液以及相同浓度下的阳性对照 V_C 对 OH 自由基清除率进行测定。步骤如下:实验组于 96 孔板中依次加入预先配制 9 mmol/L 的 $FeSO_4$ 、上述浓度下的 PRLAP 或 V_C 、9 mmol/L 水杨酸以及 8.8 mmol/L 30% H_2O_2 各 50 μ L;实验对照组依次加入 9 mmol/L 的 $FeSO_4$ 、上述浓度下的 PRLAP 或 V_C 、蒸馏水以及 8.8 mmol/L 30% H_2O_2 各 50 μ L;空白对照组依次加入 9 mmol/L 的 $FeSO_4$ 、蒸馏水、9 mmol/L 水杨酸以及 8.8 mmol/L 30% H_2O_2 各 50 μ L。摇床混匀,室温静置 30 min 后,510 nm 处测其吸光度值,根据公式(4)计算 PRLAP 和 V_C 的清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式(4)}$$

式中: A_1 表示不同浓度的 PRLAP 或 V_C 加入 $FeSO_4$ 、水杨酸、 H_2O_2 测得的吸光值; A_2 表示不同浓度的 PRLAP 或 V_C 加入 $FeSO_4$ 、蒸馏水、 H_2O_2 测得的吸光值; A_0 表示蒸馏水加入 $FeSO_4$ 、水杨酸、 H_2O_2 测得的吸光度值。

1.2.6 PRLAP 抑菌活性测定 采用微量肉汤稀释法测 PRLAP 对供试菌的 MIC。具体步骤如下:将大肠杆菌(Eco)、金黄色葡萄球菌(Sau)、铜绿假单胞菌(Pae)、肺炎克雷伯菌(Kpn)、鲍曼不动杆菌(Ab)在牛肉膏蛋白胨培养基接种后,于 37 $^{\circ}C$ 培养 24 h,制备 10^5 CFU/mL 菌悬液和 50 mg/mL PRLAP 溶液。在 96 孔板中进行样品稀释和接种,2~11 孔每孔加入营养肉汤 100 μ L,第 12 孔中加入营养肉汤 200 μ L;第 1 孔中加入 50 mg/mL PRLAP 溶液 200 μ L,倍比稀释至第 10 孔;1~11 孔均加入 100 μ L 菌液;37 $^{\circ}C$ 培养箱孵育 16~18 h。此外需设置色素对照,96 孔板中第 1 孔中加入 50 mg/mL PRLAP 溶液 200 μ L,2~11 孔每孔加入营养肉汤 100 μ L,第 12 孔加入营养肉汤 200 μ L,最后 1~11 孔均加入 100 μ L 菌液,用酶标仪在 600 nm 测吸收值,将试验组 1~10 孔吸光值与色素对照组 1~10 孔吸光值做差,然后将差值与试验组第 11 孔(阳性对照组)和第 12 孔(阴性对照组)结果作比较,差值接近试验组第 12 孔与色素对照第 12 孔之差的最小浓度为 MIC。

1.2.7 PRLAP 对肿瘤细胞活力的影响 采用 CCK-8 法测定 PRLAP 对肿瘤细胞活力抑制率。首先用 DMEM 基础培养基将 PRLAP 配制成 0、3.125、6.25、12.5、25、50、100 μ g/mL 7 个给药浓度。在 37 $^{\circ}C$ 饱和湿度、5% CO_2 条件下培养 A375、DLD-1、B16 和 MCF-7 细胞。取对数生长期的细胞,分装到 96 孔板中,调整细胞浓度使每孔约 5000 个细胞,在 CO_2 培养箱中培养 24 h。取不同浓度(0、3.125、6.25、12.5、25、50、100 μ g/mL)的 PRLAP 溶液,依次从低浓度到高浓度加入 96 孔板中,每孔 100 μ L,在 37 $^{\circ}C$ 培养箱中培养 48 h。吸出孔内溶液,然后向每孔内加入 100 μ L 含 10% CCK-8 试剂的基础培养基,在

37 $^{\circ}C$ 培养箱内培养 1~2 h,用酶标仪在 450 nm 处检测吸收值,根据公式(5)计算细胞活力。

$$\text{细胞活力}(\%) = \frac{A_0 - A_n}{A_0} \times 100 \quad \text{式(5)}$$

式中: A_0 表示空白对照吸光值; A_n 表示加入样品溶液吸光值。

1.3 数据处理

实验结果均为三次平行实验,数据表示为 Mean(平均值) $\pm$ SD(标准差)。并采用 Microsoft Office Excel 2019、SPSS 23.0 及 GraphPad Prism 8 软件进行实验数据的处理、分析及绘图。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 超声功率对 PRLAP 得率的影响 从图 1 可以看出,超声功率在 216~288 W 范围内多糖得率随功率升高而增大,到 288 W 时达到最大值为 $5.24\% \pm 0.12\%$,这是由于超声波的空化作用使细胞易于破碎,有利于多糖析出。当功率超过 288 W 时多糖得率下降,这可能是因为超声功率过大,对细胞的破坏作用增大,使多糖的糖苷键断裂,引起多糖解聚从而使得得率降低^[27-28]。因此,选取 264、288、312 W 进行正交试验。

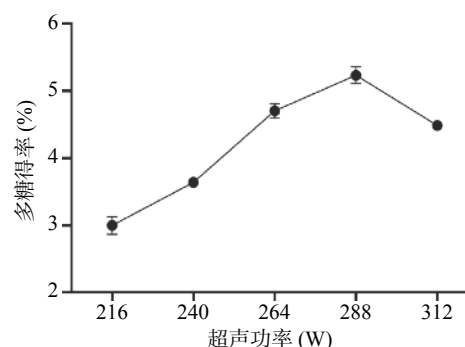


图 1 超声功率对 PRLAP 得率的影响

Fig.1 Effect of ultrasonic power on the yield of PRLAP

2.1.2 料液比对 PRLAP 得率的影响 由图 2 可知,多糖得率随料液比得增大而提高,到 1:50(g/mL) 时达到最大值为 $9.25\% \pm 0.08\%$,之后得率开始下

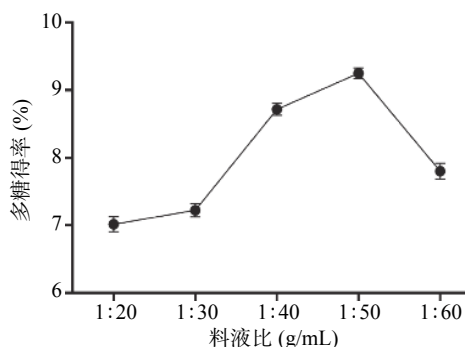


图 2 料液比对 PRLAP 得率的影响

Fig.2 Effect of ratio of raw material to water on the yield of PRLAP

降。原因可能是溶剂与原料的比例越大,植物细胞内部与外部溶剂的浓度差异越大,多糖的扩散速度也越快,更多的多糖分子可溶于水中,从而提高得率。但如果继续增加溶剂与原料的比例,水溶性多糖的浓度也会降低,导致溶剂挥发量增加,能量消耗增加,得率下降^[29]。因此,选取 1:40、1:50、1:60(g/mL)进行正交试验。

2.1.3 提取时间对 PRLAP 得率的影响 从图 3 可以看出,多糖得率在 10~30 min 范围内随时间的增加而提高,随着时间的延长,鸡蛋花细胞破碎使多糖释放,到 30 min 时达到最大值为 9.78%±0.14%,但超声波作用时间过长,空化作用力会使得提取物中部分多糖糖链受到破坏,导致得率下降^[30]。因此选择 20、30、40 min 进行正交试验。

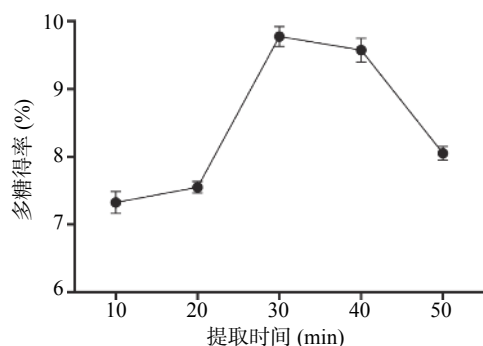


图 3 提取时间对 PRLAP 得率的影响

Fig.3 Effect of extraction time on yield of PRLAP

2.1.4 提取温度对 PRLAP 得率的影响 从图 4 可以看出,鸡蛋花多糖得率在 40 °C 时达到最高值为 13.34%±0.18%,随着温度的升高,多糖溶解度增加,因此多糖得率提高。当提取温度超过 40 °C 时,多糖得率降低;可能是因为较高温度会导致空化气泡数目减少,空化效应减弱从而导致多糖得率降低^[31]。因此,选择 35、40、45 °C 进行正交试验。

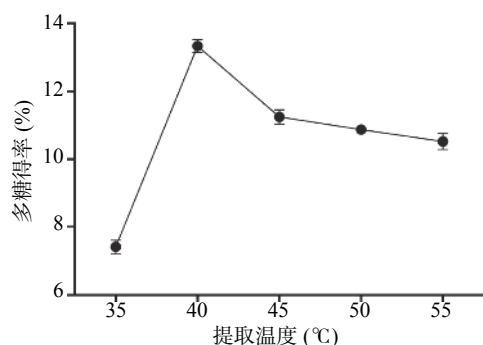


图 4 提取温度对 PRLAP 得率的影响

Fig.4 Effect of extract temperature on yield of PRLAP

2.2 正交试验结果分析

按 1.2.3 给出的水平来设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,得鸡蛋花多糖最佳提取工艺参数,并考察各因素对鸡蛋花多糖得率影响的主次顺序。正交试验结果见表 2,方差分析见表 3。

表 2 正交试验结果

Table 2 Orthogonal experiment results

试验号	A 超声功率	B 料液比	C 提取时间	D 提取温度	得率 (%)
1	1	1	1	1	10.78±0.012
2	1	2	2	2	11.04±0.027
3	1	3	3	3	10.20±0.045
4	2	1	2	3	9.34±0.023
5	2	2	3	1	13.03±0.004
6	2	3	1	2	7.50±0.037
7	3	1	3	2	9.85±0.010
8	3	2	1	3	9.43±0.007
9	3	3	2	1	11.17±0.013
K_1	32.74	29.94	27.99	34.91	
K_2	30.12	33.59	31.50	28.92	
K_3	30.12	29.62	33.66	29.33	
k_1	10.91	9.98	9.33	11.64	
k_2	10.04	11.20	10.50	9.64	
k_3	10.10	9.87	11.22	9.78	
R	0.87	1.32	1.89	2.00	
因素主次	D>C>B>A				
最佳工艺	$A_1B_2C_3D_1$				

表 3 PRLAP 正交试验方差分析

Table 3 Variance analysis of orthogonal experiment of PRLAP

方差来源	III类平方和	自由度	均方	F	P
A 超声功率	3.33	2	1.665	29.82	**
B 料液比	8.262	2	4.131	73.983	**
C 提取时间	16.185	2	8.092	144.918	**
D 提取温度	23.735	2	11.867	212.523	**
误差	1.005	18	0.056		
总计	2926.225	27			
修正后总计	52.517	26			
$R^2=0.981$ (调整后 $R^2=0.972$)					

注: ** $P<0.01$, 表示差异性极显著; * $P<0.05$, 表示差异性显著。

如表 2 所示,通过直观分析得出影响鸡蛋花多糖得率主次因素依次是提取温度(D)>提取时间(C)>料液比(B)>超声功率(A),最佳提取工艺组合为 $A_1B_2C_3D_1$,即超声功率为 264 W、料液比为 1:50(g/mL)、提取时间为 40 min、提取温度为 35 °C。由表 3 方差分析可得,超声功率、料液比、提取时间、提取温度达到极显著水平($P<0.01$),说明主效应存在,四种因素会对鸡蛋花多糖得率产生差异关系。

为了评价最佳提取工艺的稳定性,称取鸡蛋花干燥花粉末 3 g 进行重复实验,多糖提取率分别为 13.95%、13.98% 和 14.11%,平均值为 14.01%±0.22%。相对偏差(RSD)为 1.6%,表明该工艺重复性良好,适合鸡蛋花多糖的提取。

2.3 PRLAP 体外抗氧化活性测定

2.3.1 DPPH 自由基清除能力 由图 5 可知,PRLAP 对 DPPH 的清除作用呈浓度依赖型,在 0.016~0.500 mg/mL 范围内随着浓度的升高清除作用显著增强,质量浓度大于 0.500 mg/mL 后,清除作用增强缓慢,浓度到 1 mg/mL 时清除率可达到 94.44%±0.17%,此浓度下 V_C 对 DPPH 自由基的清除率为

94.95%±0.63%, 这时 PRLAP 对 DPPH 的清除率与 V_C 相当, 说明 PRLAP 具有较强的清除 DPPH 自由基的作用。PRLAP 清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 为 0.1934 mg/mL。DAWOOD 等^[21] 研究表明白鸡蛋花叶多糖浓度在 3 mg/mL 时, 对 DPPH 自由基清除率为 84.18%。由此可知, PRLAP 清除 DPPH 自由基的作用远强于白鸡蛋花叶多糖。PRLAP 可作为抗氧化剂进一步开发利用。

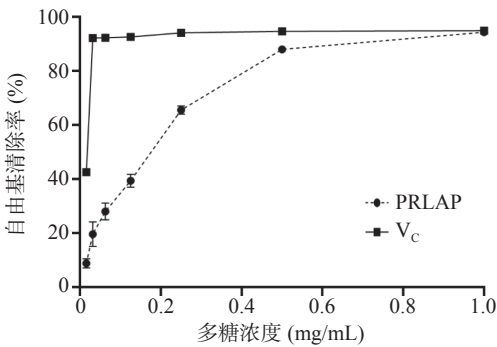


图 5 PRLAP 和 V_C 对 DPPH 自由基清除率的影响
Fig.5 Effect of PRLAP and Vc on DPPH free radical scavenging rated

2.3.2 ABTS 自由基清除能力 由图 6 可知, PRLAP 在 0.016~0.500 mg/mL 范围内随着浓度的升高对 ABTS 自由基清除率显著增强, 质量浓度大于 0.500 mg/mL 后, 清除作用趋于平缓, 多糖浓度为 1 mg/mL 时其对 ABTS 自由基的清除作用与 V_C 接近, 说明 PRLAP 对 ABTS 自由基的清除能力较强。PRLAP 清除 ABTS 自由基的 IC₅₀ 为 0.2315 mg/mL。由此可知, PRLAP 对 ABTS 自由基和 DPPH 自由基都具有较强的清除能力, 这与文献报道的金针菇多糖^[24] 具有相似的抗氧化活性。

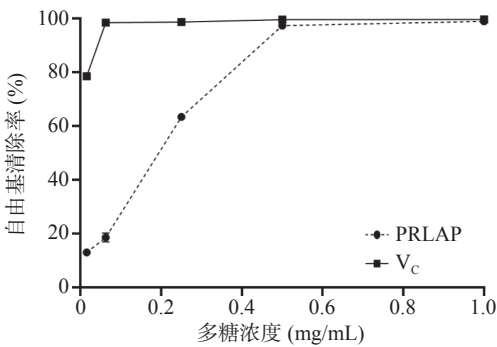


图 6 PRLAP 和 V_C 对 ABTS 自由基清除率的影响
Fig.6 Effect of PRLAP and Vc on ABTS free radical scavenging rated

2.3.3 OH 自由基清除能力 由图 7 可知, PRLAP 对 OH 自由基具有一定的清除能力, 随着 PRLAP 浓度升高, 清除率增强。当浓度为 1 mg/mL 时 OH 自由基清除率可达到 35.38%±3.20%, 其清除效果与文献报道的绿球藻多糖^[32] 和滑子菇多糖^[33] 相当。PRLAP 清除 OH 自由基的 IC₅₀ 为 2.469 mg/mL。虽然 PRLAP 对 OH 自由基清除效果弱于 V_C, 但具有

一定的清除作用。上述可知, PRLAP 对 ABTS 自由基和 DPPH 自由基具有较强的清除作用, 而对 OH 自由基清除效果较弱, 这是因为多糖含有较多羟基, 可提供质子与 ABTS 自由基和 DPPH 自由基反应, 达到抗氧化作用^[34]。而 OH 自由基通常是以氧化其它物质(亲电加成反应)而达到清除作用^[35], 因此 PRLAP 对 OH 自由基的清除作用弱于 ABTS 自由基和 DPPH 自由基。

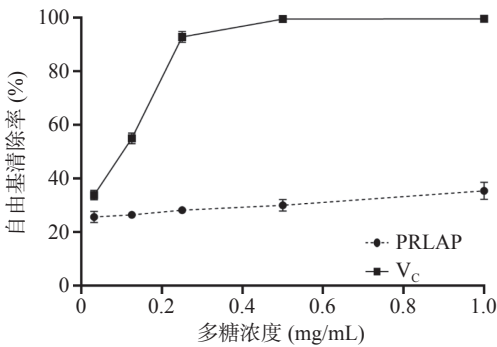


图 7 PRLAP 和 V_C 对 OH 自由基清除率的影响
Fig.7 Effect of PRLAP and Vc on OH free radical scavenging rated

2.4 PRLAP 体外抗菌活性评价

由表 4 可知, 五种菌种的 MIC 顺序为铜绿假单胞菌=肺炎克雷伯菌=鲍曼不动杆菌>大肠杆菌>金黄色葡萄球菌, 金黄色葡萄球菌的 MIC 最低为 0.195 mg/mL, 大肠杆菌的 MIC 相对较低为 0.391 mg/mL, PRLAP 对铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌的 MIC 相同均为 1.562 mg/mL。结果表明 PRLAP 对以上五种菌种都有一定的抑制作用, 其中对金黄色葡萄球菌的抑制效果最好。该结果与 THIN 等^[36] 提取的 *Plumeria acutifolia* Poir. 茎皮水提物抑菌活性具有一致性, 其对金黄色葡萄球菌抑菌效果最好, 抑菌圈为 12 mm。

表 4 PRLAP 的 MIC	
Table 4 Minimum inhibitory concentration of PRLAP	
供试菌种	PRLAP浓度(mg/mL)
	50 25 12.5 6.25 3.125 1.562 0.781 0.391 0.195 0.098
大肠杆菌	— — — — — — — — ++ +++
金黄色葡萄球菌	— — — — — — — — — ++
铜绿假单胞菌	— — — — — — ++ +++ ++++ ++++
肺炎克雷伯菌	— — — — — — ++ +++ ++++ ++++
鲍曼不动杆菌	— — — — — — ++ +++ ++++ ++++

注: “—”无菌生长; “+”与菌落呈正相关。

2.5 PRLAP 体外抗肿瘤活性评价

从图 8 可以看出, 在 3.125~100 μg/mL 浓度范围内, A375、B16、MCF-7 细胞活力与多糖溶液浓度呈剂量依赖性, 随多糖浓度的增大而减小且与对照组相比具有显著性差异($P<0.05$), 说明 PRLAP 对这三种肿瘤细胞增殖具有一定的抑制作用, 其中对 MCF-7 细胞活力抑制效果与 DAWOOD 等^[37] 研究结果近

似,在 6.25~100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内短穗鱼尾葵果实和丛榈果实多糖对 MCF-7 细胞活力都有较好的抑制作用。而 DLD-1 细胞活力与空白对照相比变化不大, PRLAP 对 DLD-1 细胞增殖抑制效果不明显,说明在此浓度范围内 DLD-1 对 PRLAP 不敏感。经计算 A375、B16、MCF-7 细胞的 IC_{50} 值分别为 101.3、285.6、423.1 $\mu\text{g/mL}$ 。

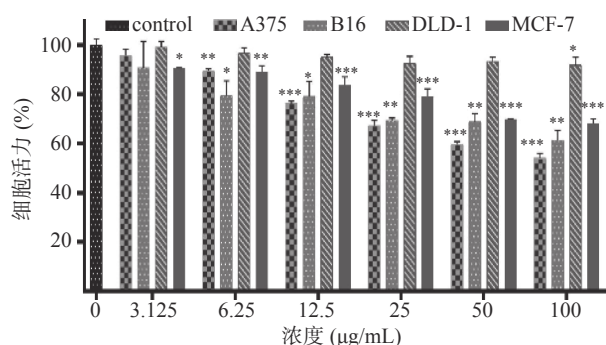


图8 PRLAP对肿瘤细胞活力的影响

Fig.8 Effect of PRLAP on cell viability

注:与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

3 结论

本研究通过单因素实验和 $L_9(3^4)$ 正交试验优化了 PRLAP 提取工艺,分析得出超声功率、料液比、提取时间、提取温度对鸡蛋花多糖得率的影响,并确定了最佳提取工艺:超声功率 264 W、料液比 1:50(g/mL)、提取时间 40 min、提取温度 35 $^{\circ}\text{C}$,在此条件下多糖得率为 $14.01\%\pm 0.22\%$,说明此工艺提取参数可靠,提取效率高,适合 PRLAP 的提取。此外, PRLAP 具有良好的体外抗氧化、抗菌、抗肿瘤活性。抗氧化实验结果表明, PRLAP 对 DPPH、ABTS 自由基具有较强的体外抗氧化活性,当浓度为 1 mg/mL 时, PRLAP 对这两种自由基的清除率可达 90% 以上,接近 V_C 的效果,与 DPPH 和 ABTS 清除率相比 PRLAP 对 OH 自由基的清除能力稍弱,但也具有一定的抑制作用,由此可见, PRLAP 可作为一种潜在天然抗氧化剂应用在食品、医药等领域。此外,通过大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌的 MIC 测定结果可知,鸡蛋花多糖对上述供试菌均有一定的抑制作用, MIC 分别为 0.391、0.195、1.562、1.562、1.562 mg/mL,其中对金黄色葡萄球菌的抑制效果最好,其 MIC 最小。本研究选取了 A375、B16、DLD-1、MCF-7 细胞来检测 PRLAP 对肿瘤细胞增殖的抑制作用,结果表明除 DLD-1 细胞外,此多糖对 A375、B16、MCF-7 细胞活力均有一定的抑制效果,细胞活力随 PRLAP 浓度的增大而减小,但其作用机制还有待深入研究。

本研究主要集中在鸡蛋花多糖提取工艺、体外活性方面。此后还需要对 PRLAP 进行分离纯化和结构鉴定,并进一步研究 PRLAP 与其活性之间的关

系。此外,为了更好地确定 PRLAP 对人体健康的影响,必须进行体内实验和临床研究,使其在食品、医药和医学领域得到更广泛的应用。

参考文献

- [1] 武爱龙, 吴建阳, 卓海容. 鸡蛋花的研究进展[J]. *农业科技通讯*, 2017(7): 55-58. [WU A L, WU J Y, ZHU H R. Research progress of *Plumeria*[J]. *Agricultural Science and Technology Newsletter*, 2017(7): 55-58.]
- [2] 邓仙梅, 刘敬, 谢文琼, 等. 凉茶常用药材鸡蛋花的研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(1): 198-200. [DENG X M, LIU J, XIE W Q, et al. The research progress of medicinal herbs *Plumeria* commonly used herbal tea[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2014, 25(1): 198-200.]
- [3] BACAR J N B, TAN M C S, SHEN C C, et al. Triterpenes from *Plumeria rubra* L. flowers[J]. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 2017, 9(2): 248-252.
- [4] 洪挺, 余勃, 陆豫, 等. 鸡蛋花中化学成分及生物活性研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2011, 23(3): 565-568, 570-589. [HONG T, YU B, LU Y, et al. Research progress on chemical constituents and biological activities of *Plumeria*[J]. *Natural Product Research and Development*, 2011, 23(3): 565-568, 570-589.]
- [5] XIA Y Y, LIN C Z, LU X J, et al. New iridoids from the flowers of *Plumeria rubra* "acutifolia"[J]. *Phytochemistry Letters*, 2018, 25: 81-85.
- [6] MOHAMED ISA S S P, ABLAT A, MOH AMAD J. The antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activity of *Plumeria rubra* flowers[J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 400-417.
- [7] DOBHALL M P, HASAN A M, SHARMA M C, et al. Ferulic acid esters from *Plumeria bicolor*[J]. *Phytochemistry*, 1999, 51(2): 319-321.
- [8] KUMARSHARMA S, KUMAR N, SULTANA S, et al. Chemical constituents from the stem barks of *Plumeria rubra* L.[J]. *Research Journal of Pharmacognosy*, 2018, 5(3): 69-78.
- [9] ALHOZAIMY A G, ALSHEDDI E S, IBRAHIM T A. Biological activity and isolation of compounds from stem bark of *Plumeria acutifolia*[J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2017, 13(Suppl 3): S505-S511.
- [10] YOGESH N. Evaluation of *in vivo* anticancer activity of ethanolic extract of leaf of *Plumeria acutifolia* on daltons ascites lymphoma induced cancer in mice[D]. Komarapalayam: JKK Natraja College of Pharmacy, 2017.
- [11] YADAV A V, UNDALE V R. Antidiabetic effect of *Plumeria rubra* Linn. in streptozotocin induced diabetic rats[J]. *International Journal of Ternational Pharmaceutical Science and Research*, 2017, 8(4): 1806-1812.
- [12] LIU Y, SUN Y Y, HUANG G L. Preparation and antioxidant activities of important traditional plant polysaccharides[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 111: 780-786.
- [13] CHEN F, HUANG G L. Preparation and immunological activity of polysaccharides and their derivatives[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 112: 211-216.
- [14] FU Y, SHI L, DING K. Structure elucidation and anti-tumor activity *in vivo* of a polysaccharide from spores of *Ganoderma lu*

- cidum*(Fr.) Karst[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 141: 693–699.
- [15] KHEMAKHEM I, ABDELHEDI O, TRIGUI I, et al. Structural, antioxidant and antibacterial activities of polysaccharides extracted from olive leaves[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 106: 425–432.
- [16] XIE Z L, WANG Y, HUANG J Q, et al. Anti-inflammatory activity of polysaccharides from *Phellinus linteus* by regulating the NF-kappaB translocation in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 129: 61–67.
- [17] SUN Y H, CHEN X L, ZHANG L L, et al. The antiviral property of *Sargassum fusiforme* polysaccharide for avian leukosis virus subgroup J *in vitro* and *in vivo*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 138: 70–78.
- [18] SHANG H M, ZHAO J C, GUO Y, et al. Extraction, purification, emulsifying property, hypoglycemic activity, and antioxidant activity of polysaccharides from comfrey[J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, 146: 112183–112194.
- [19] WANG W S, SONG X L, GAO Z, et al. Anti-hyperlipidemic, antioxidant and organic protection effects of acidic-extractable polysaccharides from *Dictyophora indusiata*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 129: 281–292.
- [20] SHARMA G, CHAHAR M K, DOBHAR S, et al. Phytochemical constituents, traditional uses, and pharmacological properties of the genus *Plumeria*[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2011, 8(8): 1357–1369.
- [21] DAWOOD D, HASSAN R. Antioxidant activity evaluation of methanolic extract and crude polysaccharides from *Plumeria alba* L. leaves[J]. *Journal of Agricultural Chemistry Biotechnology*, 2015, 6(11): 489–507.
- [22] 何蓉蓉, 栗原博, 宝丽, 等. 王老吉凉茶对应激小鼠糖代谢机能及体内过氧化状态的影响[J]. *中成药*, 2008(8): 1111–1114.
- [HE R R, LI Y B, BAO L, et al. Effect of Wanglaoji Cool Tea on plasma glucometabolism and peroxidative state in stress mice[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2008(8): 1111–1114.]
- [23] 梁雪, 倪秀珍, 汉丽萍. 响应面法优化超声辅助提取桦褐管菌多糖及其抗氧化活性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2019, 30(6): 65–72.
- [LIANG X, NI X Z, HAN L P. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Piptoporus betulinus* by response surface methodology and the study of its antioxidant activity[J]. *China Food Additives*, 2019, 30(6): 65–72.]
- [24] WANG Y F, JIA J X, REN X J, et al. Extraction, preliminary characterization and *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides from *Oudemansiella radicata* mushroom[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120: 1760–1769.
- [25] TANG Q L, HUANG G L. Preparation and antioxidant activities of cuaurbit polysaccharide[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 117(10): 362–365.
- [26] 王迦琦, 许梦然, 高婧文, 等. 北虫草多糖提取工艺优化及其细胞氧化损伤保护作用[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(13): 141–147.
- [WANG J Q, XU M R, GAO J W, et al. Optimization of extraction process of *Cordyceps militaris* polysaccharide and its protective effect on cellular oxidative damage[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(13): 141–147.]
- [27] SUQUILA F A C, SCHEEL G L, DE OLIVEIR F M, et al. Assessment of ultrasound-assisted extraction combined with supra-molecular solvent-based microextraction for highly sensitive cadmium determination in medicinal plant sample by TS-FF-AAS[J]. *Microchemical Journal*, 2019, 145: 1071–1077.
- [28] ZHANG L, ZHOU C S, WANG B, et al. Study of ultrasonic cavitation during extraction of the peanut oil at varying frequencies[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2017, 37: 106–113.
- [29] NUERXIATI R, ABUDUWAILI A, MUTAILIFU P, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction, characterization and biological activities of polysaccharides from *Orchischusua* D. Don (Salep)[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 141: 431–443.
- [30] CHEN R Z, LI Y, DONG H, et al. Optimization of ultrasonic extraction process of polysaccharides from *Ornithogalum caudatum* Ait and evaluation of its biological activities[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2012, 19(6): 1160–1168.
- [31] SURIN S, YOU S G, SEESURIYACHAN P, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from purple glutinous rice bran (*Oryza sativa* L.) and their antioxidant activities[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 1–10.
- [32] 李旭东. 绿球藻多糖的分离纯化、抗氧化和抑菌活性研究[D]. 太原: 山西大学, 2020.
- [LI X D. Study on isolation and purification, antioxidation and antibacterial activity of *Chlorococcum* sp. GD polysaccharide[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2020.]
- [33] 韩丹. 滑子菇多糖提取、结构及体外抗氧化活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2018.
- [HAN D. Extraction structural properties and antioxidant activity of polysaccharides from *Pholiota nameko*[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2018.]
- [34] 李现日, 张杰, 张英美, 等. 金花葵花黄酮提取物不同溶剂萃取物的抗氧化活性[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(11): 120–125.
- [LI X R, ZHANG J, ZHANG Y X, et al. Antioxidant activity of extracts from different polar solvents of flavonoid extract of *Aurea helianthus* flower[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(11): 120–125.]
- [35] 李灵香玉, 马香娟. 羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的特性及其在光化学氧化中的反应机理[J]. *化工技术与开发*, 2006, 4(8): 27–29.
- [LI L X Y, MA X J. Characteristics of hydroxide radical and its reaction mechanism in photochemistry oxidation process[J]. *Technology and Development of Chemical Industry*, 2006, 4(8): 27–29.]
- [36] SINT T T, TUN A A, HTAY M M. Evaluation of antipyretic activity and structural identification of chemical constituent from the bark of *Plumeria acutifolia* Poir.(Tayoke Saga)[J]. 3rd Myanmar Korea Conference Research Journal, 2020, 3(5): 1944–1952.
- [37] DAWOOD D H, ELMONGY M S, NEGM A, et al. Extraction and chemical characterization of novel water-soluble polysaccharides from two palm species and their antioxidant and antitumor activities[J]. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2020, 7(1): 141–158.