

冯思敏, 廖伟先, 潘杰峰, 等. 铁皮石斛多糖的低共熔溶剂提取工艺优化 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(3): 218–225. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050089

FENG Simin, LIAO Weixian, PAN Jiefeng, et al. Optimization of Deep Eutectic Solvent Extraction Process of Polysaccharides from *Dendrobium officinale* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(3): 218–225. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050089

· 工艺技术 ·

铁皮石斛多糖的低共熔溶剂提取工艺优化

冯思敏¹, 廖伟先¹, 潘杰峰², 余佳浩¹, 陈碧莲³, 邵平^{1,*}

(1. 浙江工业大学食品科学与工程学院, 浙江杭州 310014;

2. 浙江工业大学化学工程学院, 浙江杭州 310014;

3. 浙江省食品药品检验研究院, 浙江杭州 310052)

摘要: 为提高铁皮石斛的综合利用率, 建立一种绿色高效的铁皮石斛多糖提取方法。本研究以铁皮石斛多糖提取率为指标, 通过单因素考察了低共熔溶剂浓度、提取温度及液料比对铁皮石斛多糖提取率的影响, 采用响应面设计优化铁皮石斛多糖的提取工艺, 并对纯化后的多糖进行结构分析。结果表明: 响应面优化后得到最佳工艺为低共熔溶剂 (deep eutectic solvent, DES) 浓度 40%、提取温度 80 °C、液料比 110:1 (mL/g), 在此条件下实际提取率为 33.2%±0.28%, 与预测值 33.5% 接近, 多糖的纯度为 56.95%±1.2%。多糖经阴离子交换柱及葡聚糖凝胶柱纯化后, 纯度可达 90.8%, 其单糖主要由葡萄糖和甘露糖构成, 质量比约为 43:37, 此外还含有少量的木糖、鼠李糖、核糖等, 结构中同时含有 α 糖苷键和 β 糖苷键。本研究提供了一种低共熔溶剂提取铁皮石斛多糖的高效绿色提取方案, 具有多糖提取率高及绿色的特点, 为后续铁皮石斛多糖的开发提供了借鉴。

关键词: 铁皮石斛多糖, 低共熔溶剂, 提取工艺, 响应面, 结构

中图分类号: TS201.2; TS202.3 文献标识码: B 文章编号: 1002-0306(2024)03-0218-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050089



本文网刊:

Optimization of Deep Eutectic Solvent Extraction Process of Polysaccharides from *Dendrobium officinale*

FENG Simin¹, LIAO Weixian¹, PAN Jiefeng², YU Jiahao¹, CHEN Bilian³, SHAO Ping^{1,*}

(1. College of Food Science and Technology, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;

2. College of Chemical Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;

3. Zhejiang Institute of Food and Drug Inspection, Hangzhou 310052, China)

Abstract: In order to increase the comprehensive utilization of *Dendrobium officinale*, a green and efficient method for extracting of *Dendrobium officinale* polysaccharides (DOPs) was established. This research used the extraction rate of DOPs as the indicator for the effects of three factors. These included the concentration of deep eutectic solvent (DES), extraction temperature, and liquid-to-material ratio on the efficacy of polysaccharides from *Dendrobium officinale*, using single-factor tests. Response surface methodology (RSM) was employed to optimize the best extraction process of DOPs and the structure of the purified polysaccharides was analyzed. The experimental results showed that the optimal process obtained after RSM was a 40% concentration of DES, an extraction temperature of 80 °C, and a liquid-to-material ratio of 110:1 (mL/g). Under these conditions, the actual extraction rate was 33.2%±0.28%, which was close to the predicted value of 33.5%, and the purity of polysaccharide was 56.95%±1.2%. After purification by anion-exchange column and glucose gel column, the purity could reach 90.8%, and its monosaccharides were mainly composed of glucose and mannose, with a

收稿日期: 2023-05-10

基金项目: 国家食品营养与安全重点研发计划专项 (2023YFF1104100); 浙江省重点研究发展计划项目 (2021C02019); 浙江省自然科学基金项目 (LGD22C200001)。

作者简介: 冯思敏 (1989-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品功能因子开发与营养健康、功能成分载体化设计与制备、功能活性评价与应用, E-mail: fengsimin@zjut.edu.cn。

* 通信作者: 邵平 (1980-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品制造与资源利用、食品安全快速检测与分析, E-mail: pingshao325@zjut.edu.cn。

mass ratio of 43:37. It also contained a small amount of xylose, rhamnose, and ribose, and the structure contained α -glycosidic and β -glycosidic bonds. The present research provides an efficient and green extraction scheme for extracting DOP_s with DES, which has the characteristics of high polysaccharide extraction rate and greenness, providing a reference for the subsequent development of DOPs.

Key words: *Dendrobium officinale* polysaccharides; deep eutectic solvent; extraction process; response surface; structure

铁皮石斛是兰科属草本植物,被称为“九大仙草之首”,含有多钟活性物质,如多糖、氨基酸类和生物碱等^[1]。其中,铁皮石斛多糖是铁皮石斛的主要功能活性成分,具有抗氧化、抗衰老、免疫调节、抗肿瘤和降血糖等作用^[2-5]。因此,建立高效、绿色的铁皮石斛多糖提取工艺有利于铁皮石斛的药食两用价值的开发。邱现创等^[6]通过超声辅助法提取铁皮石斛多糖,提取率可达 25.39%。廖霞等^[7]利用微波辅助结合酶解提取法,铁皮石斛多糖提取率可达 29.40%。李贝贝等^[8]研究了闪式提取法提取铁皮石斛多糖,在最佳优化工艺条件下浸泡 30 min 后,常温下提取 3 次,提取率达到 31.45%。Kui 等^[9]从石斛中提取出了 3 种水溶性多糖,其主要由甘露糖和葡萄糖以不同的比例组成。高云霄等^[10]用热水浸提法从铁皮石斛中提取得到一种以 1,4-链接为主,存在少量 1,2,4-、1,3,4-、1,4,6-分支结构和端基结构的 O-乙酰化葡甘露聚糖。铁皮石斛多糖的结构是其呈现生物活性的基础,选择不同的提取、纯化分离方法,所得到的多糖在单糖组成及多糖结构上会有显著不同,而这往往会直接影响多糖的生物活性。

低共熔溶剂(deep eutectic solvent, DES)由氢键受体和氢键供体混合而成^[11]。DES 已被证明是一种新型绿色溶剂,具有成本低、易合成、无毒和可生物降解等优异性能^[12-14]。其现已被用于功能成分的提取,如提取槲皮素^[15-16]、提取甜菜碱^[17-18]及提取姜黄素^[19-20],目前,已有部分研究将 DES 的绿色提取工艺用于铁皮石斛总黄酮的提取^[21],但其在铁皮石斛多糖的提取中应用较少。

DES 具有安全性高、价格低廉及绿色等特点,课题组前期对近 40 种不同比例和原料的 DES 进行了筛选,发现基于氯化胆碱及乳酸的 DES 产生的氢键数最多^[22]。因此,本研究选择氯化胆碱与乳酸作为制作 DES 的原料,利用响应面法优化铁皮石斛多糖的提取工艺。在铁皮石斛多糖提取后,进一步研究其单糖组成及可能的分子结构,以期对铁皮石斛多糖的高效提取提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

铁皮石斛 购自云山石斛皮石斛基地;苯酚、浓硫酸、乳酸、鼠李糖(纯度 98%)、半乳糖(98%)、核糖(纯度>99.5%)、木糖(纯度 99%) 国药集团化学试剂有限公司;氯化胆碱、阿拉伯糖(纯度 98%) 杭州吉工生物科技有限公司;无水硫酸钠 杭州双木化工有限公司;DEAE-52 纤维素柱填料、Sephadex G-100

上海源叶生物科技有限公司;葡萄糖(纯度 99.7%)、乙酸酐 杭州邦易化工有限公司;无水乙醇、甘露糖(纯度 99%) 杭州方平化工有限公司;D₂O 安徽泽生科技有限公司;三氟乙酸 德国 Merck 公司;盐酸羟胺、吡啶 上海泰坦科技股份有限公司;所用试剂均为分析纯;实验室用水均为超纯水。

HWS-12 型数显恒温水浴锅 常州智博瑞仪器制造有限公司;P7 型紫外分光光度计 北京高能科迪科技有限公司;RE-52 型旋蒸仪 上海锦赋实验仪器设备有限公司;DDSJ-308A 型电导率测定仪 雷滋仪电科学仪器股份有限公司;Bruker AM-600 型核磁共振 Bruker Physik-AG 公司;Finnigan Trace Ultra-DSQ II 单四级杆气相色谱-质谱联用仪器 Thermo 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 DES 试剂的制备 参考 DES 的制作方法^[23-25]并稍作修改,将氯化胆碱与乳酸以摩尔比 4:1 称量 20 g 氯化胆碱,50 g 乳酸,置于蓝盖瓶中,后加入 21 mL 的去离子水混合,置于 80 ℃ 的数显恒温水浴锅内加热至大部分试剂熔化,再转移至磁力加热搅拌器上,在 80 ℃ 下不断搅拌获得均一透明的液体,即为 DES,然后按照添加水稀释到不同浓度的 DES,贮藏备用。

1.2.2 铁皮石斛粗多糖的提取 称取约 1.00 g 铁皮石斛粉末,按照一定的液料比加入不同浓度的 DES,设定提取温度及提取时间,提取完成后离心(4000 r/min、20 min),取上清液,加入其 4 倍体积的无水乙醇进行沉淀,并常温静置过夜,第二天进行离心去上清液后复溶铁皮石斛粗多糖,利用旋蒸去除乙醇,得到铁皮石斛粗多糖。

1.2.3 单因素实验 以铁皮石斛多糖提取率为指标,参照李佳等^[2]选取 2 h 为本试验的提取时间,温度设置为 70 ℃,液料比为 90:1 mL/g,考察 DES 浓度(20%、30%、40%、50%、60%);DES 浓度为 30%,液料比为 90:1 mL/g,考察提取温度(50、60、70、80、90 ℃);温度设置为 70 ℃,DES 浓度为 30%,考察液料比(50:1、70:1、90:1、110:1、130:1 mL/g)对铁皮石斛多糖提取率的影响。

表 1 响应面设计因素与水平

Table 1 Factors and levels in response surface design

水平	因素		
	A: DES浓度(%)	B: 提取温度(℃)	C: 液料比(mL/g)
-1	30	70	90:1
0	40	80	110:1
1	50	90	130:1

1.2.4 响应面试验 依据单因素实验结果,运用 Design-Expert 8.0.6 软件进行 Box-Behnken 试验,采用三因素三水平(A: DES 浓度、B: 提取温度、C: 液料比)进行响应面试验设计,考察铁皮石斛多糖提取率变化,因素水平设计见表 1。

1.2.5 阴离子交换柱纯化多糖 将所得粗铁皮石斛多糖粉末溶解,用微孔滤膜去除杂质后,经压力泵上样注入 DEAE-52 阴离子交换柱,采用 0、0.05、0.1、0.3、0.5 mol/L 的氯化钠溶液进行梯度洗脱^[13]。利用自动收集器收集洗脱液,每管收集体积为 10 mL。采用苯酚-硫酸法测定每管洗脱液的多糖含量,并测定其在 490 nm 下的紫外分光光度,以管数为横坐标,多糖吸光度为纵坐标,绘制洗脱曲线。合并相同组分洗脱液浓缩冻干,得到纯多糖。

1.2.6 葡聚糖凝胶柱纯化多糖 对经阴离子交换柱纯化后所得的铁皮石斛多糖洗脱组分进行葡聚糖凝胶柱纯化^[14],称取铁皮石斛多糖溶于蒸馏水中,配制成浓度为 10 mg/mL 的溶液,定容后用微孔滤膜过滤,经 Sephadex G-100 凝胶色谱柱进行纯化,用蒸馏水作为洗脱液,用自动收集器收集,每管收集体积 8 mL。采用苯酚-硫酸法测定多糖含量,以管数为横坐标,多糖吸光度为纵坐标,绘制洗脱曲线。收集所得到的多糖溶液进行冻干得到铁皮石斛精多糖。

1.2.7 多糖提取率及纯度测定方法 葡萄糖标准曲线制备:采用苯酚-硫酸法^[26]制作标准曲线,以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线。回归方程为 $y=0.9229x-0.0144$, $R^2=0.9989$ 。按照 1.2.2 的方法提取操作重复 3 次,用苯酚-硫酸法比标准曲线测定总糖含量。参照贾夏等^[27]的 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法测定还原糖的浓度,并计算多糖的纯度。

$$\text{多糖纯度}(\%) = \frac{M_{\text{总}} - M_{\text{还}}}{M} \times 100$$

式中: $M_{\text{总}}$, 总糖的质量, g; $M_{\text{还}}$, 还原糖的质量, g; M , 粗多糖质量, g。

按下列公式计算多糖提取率:

$$\text{多糖提取率}(\%) = \frac{M_{\text{多糖}}}{m} \times 100$$

式中: $M_{\text{多糖}}$, 粗多糖中多糖的质量, g; m , 称取的铁皮石斛粉的质量, g。

1.2.8 铁皮石斛多糖的单糖组成测定 参照 Anna 等^[28]并稍作修改,精确称取 10.0 mg 铁皮石斛多糖至具塞试管,加入 6 mL 2 mol/L 三氟乙酸,密封置于 110 °C 烘箱中水解 2 h,冷却后加入 2 mL 甲醇旋转蒸发,再依次加入盐酸羟胺 10 mg、吡啶 2.5 mL, 90 °C 水浴加热 30 min,冷却后加入乙酸酐 2.5 mL, 90 °C 水浴加热 30 min,冷却,即得多糖衍生物。其余各单糖标准品的制备方法同上。最后进行 GC-MS 测定^[19]。

1.2.9 铁皮石斛多糖的核磁共振测试 参照 Xi 等^[29]

并作修改,精确称取 100.0 mg 干燥的铁皮石斛多糖用 D_2O 溶解后,冷冻干燥,如此反复 3 次,将溶解后的多糖置于核磁管中在 Bruker AM-600 型核磁共振仪上进行均一多糖的核磁谱图测定,扫描时间为 8 h,对其进行 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 分析,得到核磁共振图谱。

1.3 数据处理

采用软件 Design-Expert.V8.0.6.1 进行响应面分析,数据通过 Graphpad Prism 8 软件进行计算绘图。采用多重比较法进行显著性分析($P<0.05$ 表示差异显著)。实验数据为三组数据平均值,以平均值 $\pm$ 标准偏差($\bar{X} \pm SD$)表示。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 DES 浓度对铁皮石斛多糖提取率的影响 DES 浓度的变化对铁皮石斛多糖提取率的影响如图 1 所示。由图 1 可知,铁皮石斛多糖的提取率呈先上升后逐渐下降的趋势,当 DES 的浓度从 20% 升到 40% 时多糖提取率从 15.1% 升到 30.7%,原因可能是随着 DES 浓度的提高,DES 中氢键受体和配体的数量逐渐增加,导致氢键数目会增加^[22],让更多的多糖渗入到提取液中,从而提高了多糖提取率。当 DES 浓度继续提高,多糖的提取率逐渐下降,这是因为 DES 试剂是由氯化胆碱和乳酸配制而成,试剂内部离子力通常较强且黏度较大,不利于溶质的溶出,因此在使用过程中加入适量的蒸馏水来降低溶液的剪切力^[30]。因此在 40%DES 浓度时更有利于铁皮石斛多糖的提取,并选取 DES 浓度为 30%、40%、50% 做响应面试验以确定最佳 DES 浓度。

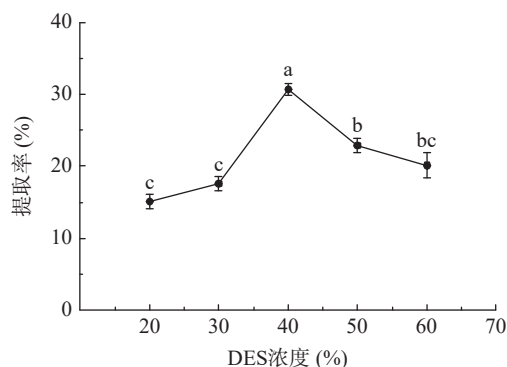


图 1 DES 浓度对铁皮石斛多糖提取率的影响
Fig.1 Effect of DES concentration on the extraction rate of *Dendrobium officinale* polysaccharides
注:不同字母表示差异显著($P<0.05$),图 2、图 3 同。

2.1.2 温度对铁皮石斛多糖提取率的影响 温度变化对铁皮石斛多糖提取率的影响如图 2 所示。由图 2 可知,铁皮石斛多糖的提取率变化呈缓慢上升后下降的趋势,当温度从 50 °C 升高到 80 °C 时,多糖提取率最高,从 14.2% 升高到 23.4%,是因为随着温度的升高,增加了物质的热运动,提高了多糖分子扩散效率,使多糖在整个体系中的溶解更迅速。当温

度继续提升到 90 ℃, 多糖的提取率反而略有下降。一方面, 可能是因温度继续升高时, 铁皮石斛多糖中可能存在热敏性物质, 在温度升高条件下会使得这些成分易变性降解^[31], 另一方面, 较高温度导致蒸发, 影响了溶剂平衡, 从而降低了提取率。因此, 选取提取温度为 70、80、90 ℃ 做响应面试验以确定最佳提取温度。

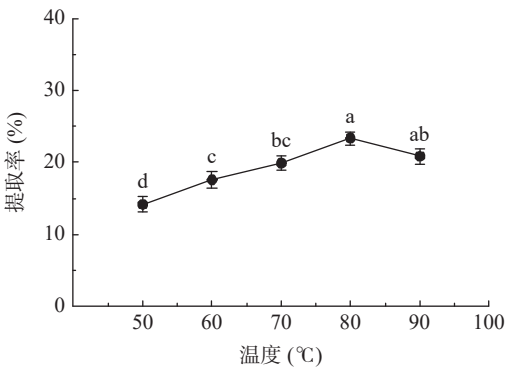


图 2 温度对铁皮石斛多糖提取率的影响
Fig.2 Effect of temperature on the extraction rate of *Dendrobium officinale* polysaccharides

2.1.3 液料比对铁皮石斛多糖提取率的影响 液料比对铁皮石斛多糖提取率的影响如图 3 所示, 铁皮石斛多糖的提取率变化呈现先上升后下降的趋势, 当液料比为 110:1 时提取率最高, 从 18.1% 升高到 32.2%, 可能是由于 DES 为黏稠液体, 在一定范围内, 随着液料比提高, 溶剂与铁皮石斛的接触面积增多, 增加了多糖的溶出, 使得多糖提取率增加; 但溶剂加入过多时, 溶剂用量较大, 铁皮石斛粉与溶剂接触面积不断增大, 溶出了其他杂质, 导致多糖溶解被抑制^[32]。因此, 选取 90:1、110:1、130:1(mL/g) 做响应面试验以确定最佳液料比。采用 DES 不仅对铁皮石斛多糖实现了绿色提取, 同时在提取率上也优于超声辅助、微波辅助结合酶解及闪式提取^[6-8]。

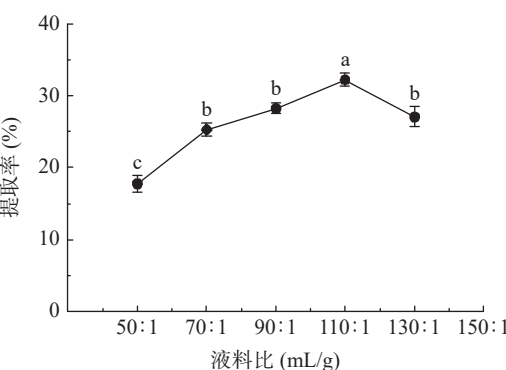


图 3 液料比对铁皮石斛多糖提取率的影响
Fig.3 Effect of liquid-to-material ratio on the extraction rate of *Dendrobium officinale* polysaccharides

2.2 响应面试验

2.2.1 响应面试验设计与结果 在铁皮石斛多糖提取的过程中, 以 DES 浓度、提取温度和液料比为影响因素, 多糖提取率为响应值。试验设计与结果见

表 2 响应面优化试验设计及结果
Table 2 Designs and results of Box-Behnken test

试验号	A: DES浓度	B: 温度	C: 液料比	Y: 提取率(%)
1	-1	1	0	19.5
2	0	0	0	33.9
3	-1	0	1	20.4
4	-1	0	-1	19.1
5	1	-1	0	22.3
6	-1	-1	0	18.3
7	0	0	0	33.6
8	1	1	0	21.8
9	0	-1	1	20.9
10	0	1	-1	20.6
11	0	0	0	33.2
12	1	0	-1	21.9
13	0	0	0	33.2
14	1	0	1	23.8
15	0	1	1	22.3
16	0	0	0	33.7
17	0	-1	-1	19.8

表 2。
2.2.2 响应面二次回归模型的建立与方差分析 由表 2 的试验结果, 用响应面分析软件操作, 得出铁皮石斛多糖提取率为响应值 Y 的回归方程: $Y=33.55+1.56A+0.36B+0.75C-0.42AB+0.14AC+0.13BC-6.29A^2-6.75B^2-5.92C^2$ 。

由表 3 方差分析结果可知, 该模型的 $F=681.25$, 回归模型项 $P<0.0001$, 失拟项 $P>0.05$, 为不显著, 说明试验误差小^[33]。试验结果与模型拟合度好^[34]。由 F 检验可知, 影响铁皮石斛多糖提取率的主次因素为 DES 浓度>液料比>提取温度, 方差分析显示, A、C 对 Y 影响极显著($P<0.001$), B 对 Y 影响显著($P<0.05$), A^2 、 B^2 、 C^2 都是极显著的模型项($P<0.001$)。

表 3 回归模型的方差分析结果
Table 3 Regression model of variance analysis results

来源	平方和	自由度	均方和	F	P
模型	591.32	9	65.70	681.25	<0.0001**
A	19.53	1	19.53	202.51	<0.0001**
B	1.06	1	1.06	10.98	0.0129*
C	4.52	1	4.52	46.82	0.0002**
AB	0.70	1	0.70	7.23	0.0311*
AC	0.076	1	0.076	0.78	0.4053
BC	0.063	1	0.063	0.65	0.4373
A ²	166.80	1	166.80	1729.48	<0.0001**
B ²	191.64	1	191.64	1987.10	<0.0001**
C ²	147.64	1	147.64	1530.83	<0.0001**
残差	0.68	7	0.096		
失拟项	0.31	3	0.10	1.11	0.4445
纯误差	0.37	4	0.092		
总和	591.99	16			

注: *($P<0.05$)表示差异显著; **($P<0.01$)表示差异极显著。

2.2.3 响应面曲面分析因素之间的交互作用 用 Design-Expert 8.6 软件, 对 DES 浓度、提取温度、液料比 3 个因素两两交互, 做不同因素间响应面 3D 图, 响应面图和等高线图可以反映各因素间的相互作用

用及最佳参数。三维图越陡峭^[35],表明相应因素对多糖提取率影响较大。图 4B 等高线图为近圆形可知液料比和 DES 浓度的交互作用对响应值的影响不显著;由图 4C 可知,铁皮石斛多糖的提取率随液料比及提取温度的增加呈先上升后下降的趋势,等高线图对铁皮石斛多糖提取率无显著影响。由图 4 知,两因素交互项 $AB > AC > BC$,其中仅有 AB 的 $P < 0.05$,表明 AB 两因素间交互作用对响应值的影响显著,随着提取温度的升高,分子运动加快,提高了溶剂的渗透能力,提取率随之升高,但温度过高可能会对多糖分子结构产生破坏作用^[36]。

2.2.4 响应面优化与验证实验 利用响应面软件分析显示预测最佳提取工艺条件为 DES 浓度 39.5%、提取温度 80.1 °C、液料比 112.4:1(mL/g),铁皮石斛多糖提取率为 33.5%。根据实际情况调整提取参数为 DES 浓度 40%、提取温度 80 °C、液料比 110:1(mL/g),在此条件下提取 2 h,得出验证结果多糖提取率为 $33.2\% \pm 0.28\%$,拟合度好,误差为 1.7%,充分

验证了模型的准确性,该工艺优化合理、有效。多糖的纯度为 $56.95\% \pm 1.2\%$ 。与传统的提取方法相比较,本文采用 DES 溶剂提取铁皮石斛多糖实现了较高的提取率,陈盛余等^[37]采用微波辅助提取铁皮石斛多糖,其提取率为 9.77%,而王琳等^[38]采用热水浸提法提取铁皮石斛多糖,其提取率为 30.83%,均较 DES 溶剂提取率低,此外本研究提取方法绿色、安全性高,可以为后续的提取提供一种高效绿色的方案。

2.3 阴离子交换柱纯化

如图 5 所示,DOP 纯化后得到 3 个多糖洗脱组分,DOP1 为蒸馏水洗脱得到的组分;DOP-2 为 0.05 mol/L NaCl 溶液洗脱下的组分;DOP-3 为 0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱下的组分。由洗脱图谱可见三个组分均未出现拖尾现象,表明各组分间分离效果较好,与 DOP-2 和 DOP-3 相比较,DOP-1 组分相对含量高,占比为 72.6%。洗脱过程在 260 和 280 nm 波长处未出现特征性吸收峰,这表明其不包含游离的蛋白质和核苷酸^[39],达到初步纯化的效果。

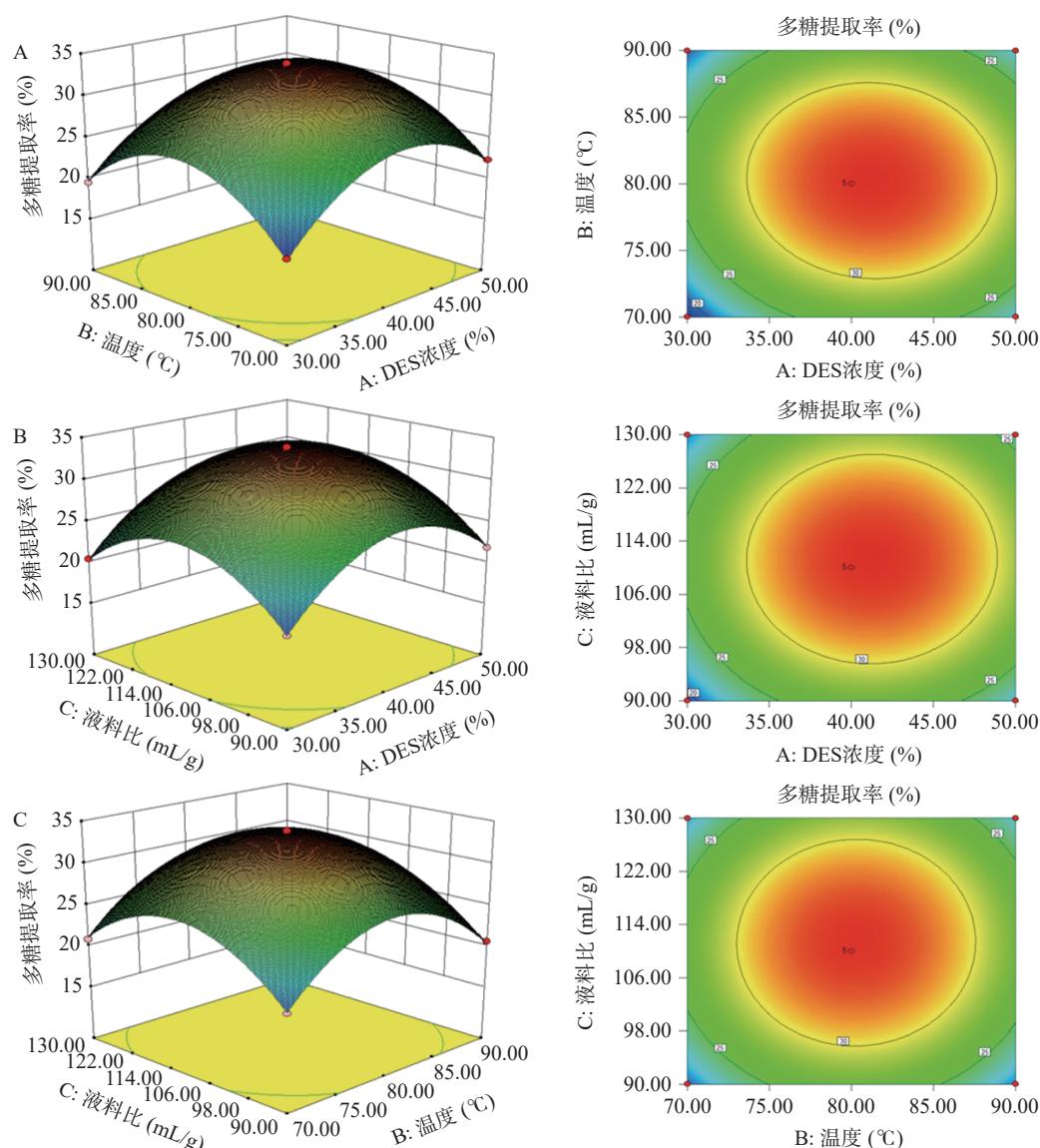


图 4 各因素交互作用对铁皮石斛多糖提取率的影响

Fig.4 Effect of interaction of various factors on the extraction rate of *Dendrobium officinale* polysaccharides

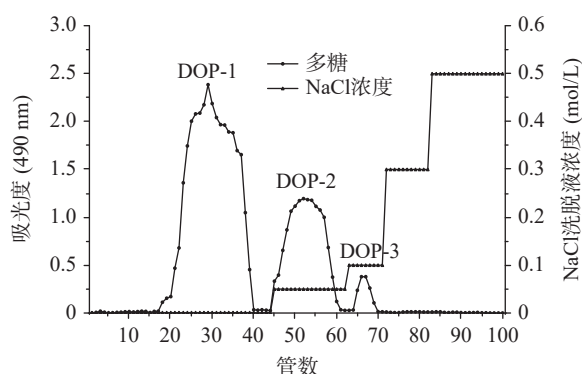


图 5 铁皮石斛粗多糖阴离子交换柱洗脱曲线
Fig.5 Anion exchange column elution curve of crude *Dendrobium officinale* polysaccharides

2.4 葡聚糖凝胶柱纯化

继续采用 Sephadex G-100 色谱柱对 DOP-1 进一步纯化, 结果如图 6 所示。DOP-1 获得一个集中的单峰, 表明其纯度较高。收集 8~30 管 DOP-1 的洗脱液并进行冷冻干燥得到纯化多糖, 测定其纯度为 90.8%, 命名其为 DOP-1-1。

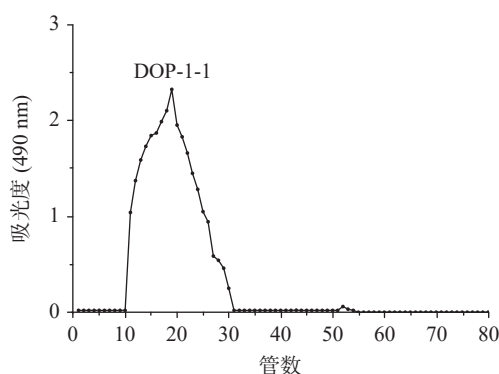


图 6 铁皮石斛多糖的葡聚糖凝胶柱洗脱曲线
Fig.6 Dextran gel column elution profile of *Dendrobium officinale* polysaccharides

2.5 铁皮石斛的单糖组成分析

采用 GC-MS 对 DOP-1-1 进行单糖组成分析, 多糖的总离子流色谱图如图 7 所示。通过对比标准单糖(图 7A)可知, 铁皮石斛多糖组分主要由葡萄糖和甘露糖单糖组成, 根据峰面积计算葡萄糖和甘露糖的总和占比 80%, 葡萄糖和甘露糖质量比约为 43:37, 此外还含有少量的木糖、鼠李糖、核糖等。表明 DOP-1-1 是一种葡甘露聚糖为主的杂多糖。

2.6 铁皮石斛多糖的核磁共振分析

铁皮石斛多糖的¹H NMR(图 8A)显示 9 个异头氢, 其化学位移 δ 分别为 1.85、2.13、3.29、3.50、3.76、4.07、4.70、5.35、5.45; ¹³C NMR 谱图(图 8B)显示有 7 个信号峰, 其化学位移 δ 分别为 20.28、60.42、69.99、71.54、75.00、76.53、100.16。在 4.070~4.741 ppm 与 4.036~4.703 ppm 处的强烈异头质子信号峰是由 D₂O 中的 HDO 所引起的^[40]。¹H NMR 光谱中 δ 3.76 ppm 和¹³C NMR 光谱中 δ 71.54 ppm 处的强烈信号提示其可能含有(1→3)糖苷键的连接方式^[41]。

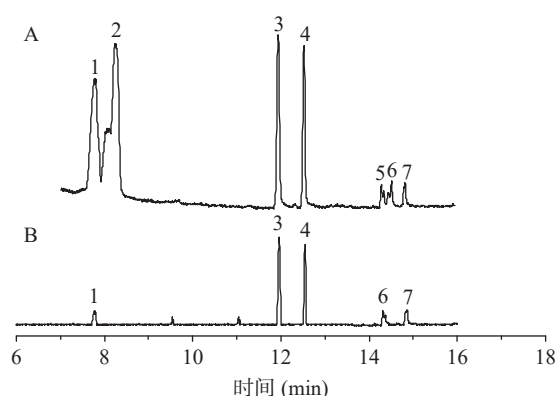


图 7 单糖标准品(A)和铁皮石斛多糖(B)GC-MS 总离子流色谱图

Fig.7 GC-MS total ion flow chromatogram of monosaccharide standard (A) and *Dendrobium officinale* polysaccharides (B)

注: 1.鼠李糖; 2.阿拉伯糖; 3.甘露糖; 4.葡萄糖; 5.半乳糖; 6.核糖; 7.木糖。

¹H NMR 光谱中 δ 3.29 ppm 和¹³C NMR 光谱中 δ 69.99 ppm 处的强烈信号提示多糖中存在(1→4)糖苷键^[27]。在 δ 3.50 ppm 处的信号峰提示提示可能存在(1→2, 4)糖苷键^[42]。¹H NMR 光谱中 δ 5.45 ppm 的化学位移来自 1, 3-Galp 的 H₁。此外¹H NMR 一般用于研究多糖糖苷键的结构特点^[43], α 糖苷键的质子信号通常集中在大于 5 ppm 的位置, 而 β 糖苷键的化学位移一般低于 5 ppm, 表明其同时含有 α 糖苷键和 β 糖苷键。

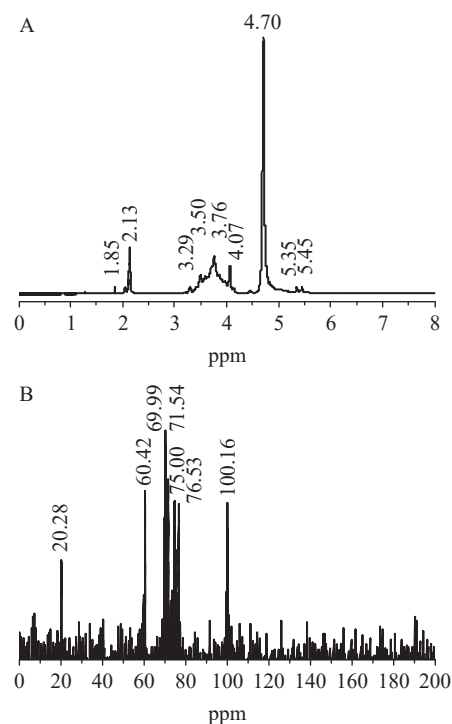


图 8 铁皮石斛多糖的核磁共振图谱
Fig.8 Nuclear magnetic resonance mapping of *Dendrobium officinale* polysaccharides

3 结论

本文通过 DES 溶剂提取铁皮石斛多糖的结果表明, 响应面试验得到最佳提取工艺为 DES 浓度

40%、提取温度 80 ℃、液料比 110:1(mL/g),此条件下铁皮石斛多糖提取率达 33.2%±0.28%,多糖的纯度为 56.95%±1.2%。在纤维素柱与凝胶柱纯化后,多糖的纯度可达 90.8%,多糖组分主要由葡萄糖和甘露糖构成,其质量比约为 43:37,还含有少量的木糖、鼠李糖、核糖等,结构中同时含有 α 糖苷键和 β 糖苷键,采用 DES 法提取多糖,可以有效提高多糖提取率。本研究建立了一套绿色、高效的铁皮石斛多糖提取方法,为后续的铁皮石斛多糖开发提供参考。

参考文献

- [1] 黄晓君, 聂少平, 王玉婷, 等. 铁皮石斛多糖提取工艺优化及其成分分析[J]. 食品科学, 2013, 34(22): 21–26. [HUANG X J, NIE S P, WANG Y T, et al. Optimization of *Dendrobium ironbark* polysaccharide extraction process and its component analysis[J]. Food Science, 2013, 34(22): 21–26.]
- [2] 李佳, 杨晓丽, 杨小丹, 等. 响应面法优化铁皮石斛多糖的提取及其成分分析[J]. 热带农业科学, 2021, 41(10): 39–49. [LI J, YANG X L, YANG X D, et al. Optimization of *Dendrobium ferrugineum* polysaccharides by response surface method and its component analysis[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2021, 41(10): 39–49.]
- [3] 张小辉, 卫梦尧, 杨永志, 等. 响应面法优化铁皮石斛多糖纯化工艺[J]. 食品工业科技, 2021, 42(16): 177–184. [ZHANG X H, WEI M Y, YANG Y Z, et al. Response surface methodology to optimize the purification process of *Dendrobium ferrugineum* polysaccharides[J]. Food Industry Science and Technology, 2021, 42(16): 177–184.]
- [4] 魏明, 张倩, 钱森和, 等. 不同预处理对铁皮石斛热风干燥特性及品质的影响[J]. 农业工程学报, 2022, 38(8): 281–287. [WEI M, ZHANG Q, QIAN S H, et al. Effects of different pretreatments on the hot air drying characteristics and quality of *Dendrobium*[J]. Journal of Agricultural Engineering, 2022, 38(8): 281–287.]
- [5] 侯天宇, 乔嘉铭, 王琴琴, 等. 不同栽培模式下铁皮石斛多糖提取及抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(1): 164–171. [HOU T Y, QIAO J M, WANG Q Q, et al. Study on polysaccharide extraction and antioxidant activity of *Dendrobium perfringens* under different cultivation patterns[J]. China Food Additives, 2023, 34(1): 164–171.]
- [6] 邱现创, 赵宁, 李晨, 等. 铁皮石斛多糖提取工艺优化及对果蝇抗氧化能力的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(2): 273–280. [QIU X C, ZHAO N, LI C, et al. Optimization of *Dendrobium ironbark* polysaccharide extraction process and its effect on antioxidant capacity of fruit flies[J]. Food Science, 2018, 39(2): 273–280.]
- [7] 廖霞, 王莹, 黄大川, 等. 微波辅助酶法提取铁皮石斛多糖的工艺[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(1): 43–48. [LIAO X, WANG Y, HUANG D C, et al. Process of microwave-assisted enzymatic extraction of *Dendrobium ferrisico* polysaccharides[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2020, 11(1): 43–48.]
- [8] 李贝贝, 陈岳亭, 朱孟夏, 等. 铁皮石斛多糖的闪式提取工艺及质量评价[J]. 药学研究, 2018, 37(5): 270–274. [LI B B, CHEN Y T, ZHU M X, et al. Flash extraction process and quality evaluation of *Dendrobium ferrugineum* polysaccharides[J]. Pharmaceutical Research, 2018, 37(5): 270–274.]
- [9] KUI W W, CHUANG Y, SHENG, N Y, et al. *Dendrobium hancockii* polysaccharides, structure characterization, modification, antioxidant and antibacterial activity[J]. Industrial Crops & Products, 2022, 188: 115565.
- [10] 高云霄, 胡小龙, 王月荣, 等. 铁皮石斛多糖的初级结构分析[J]. 高等学校化学学报, 2018, 39(5): 934–940. [GAO Y X, HU X L, WANG Y R, et al. Primary structure analysis of polysaccharides from *Dendrobium ferrugineum*[J]. Journal of Chemistry in Higher Education, 2018, 39(5): 934–940.]
- [11] LIANG X C, FU Y, CHANG J. Effective separation, recovery and recycling of deep eutectic solvent after biomass fractionation with membrane-based methodology[J]. Separation and Purification Technology, 2019, 210: 409–416.
- [12] ZHANG L J, WANG M S. Optimization of deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Dioscorea opposita* Thunb[J]. Int J Biol Macromol, 2017, 95: 675–681.
- [13] 白冰瑶, 李泉岑, 马欣悦, 等. 响应面法优化超声辅助低共熔溶剂提取红枣多糖工艺[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(18): 122–129. [BAI B Y, LI Q Z, MA X Y, et al. Response surface methodology for optimization of ultrasound-assisted low eutectic solvent extraction of red jujube polysaccharides[J]. Food Research and Development, 2022, 43(18): 122–129.]
- [14] 罗光宏, 王海蓉, 崔晶, 等. 微波辅助低共熔溶剂提取、部分纯化螺旋藻多糖及其体外生物学活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(11): 107–113. [LUO G H, WANG H R, CUI J, et al. Microwave-assisted low eutectic solvent extraction and partial purification of *Spirulina* polysaccharides and their *in vitro* biological activities[J]. Food and Fermentation Industry, 2022, 48(11): 107–113.]
- [15] BALARAMAN H B, SIVASUBRAMANIYAM A, RATHNASAMY S K. High selective purification of quercetin from peanut hull using protic deep eutectic mixture based liquid-liquid microextraction[J]. Microchemical Journal, 2020, 152: 104444.
- [16] ALTUNAY N, ELIK A, UNAL Y, et al. Optimization of an ultrasound-assisted alcohol-based deep eutectic solvent dispersive liquid-phase microextraction for separation and preconcentration of quercetin in wine and food samples with response surface methodology[J]. Journal of Separation Science, 2021, 44: 2006–2014.
- [17] HERNANDES-AGUIRRE O A, MURO C, HERNANDES-ACOSTA E, et al. Extraction and stabilization of betalains from beetroot (*Beta vulgaris*) wastes using deep eutectic solvents[J]. Molecules, 2021, 26(21): 6342.
- [18] ABRANCHES D O, SILVA L P, MARTINS M R, et al. Understanding the formation of deep eutectic solvents: Betaine as a universal hydrogen bond acceptor[J]. Chemsuschem, 2020, 13(18): 4916–4921.
- [19] DOLDLOVA K, BENER M, LALIKOGLU M, et al. Optimization and modeling of microwave-assisted extraction of curcumin and antioxidant compounds from turmeric by using natural deep eutectic solvents[J]. Food Chem, 2021, 353: 129337.
- [20] FUNDA A, ERKAN Y, MUSTAFA S, et al. Vortex assisted deep eutectic solvent (DES)-emulsification liquid-liquid microextraction of trace curcumin in food and herbal tea samples[J]. Food Chemistry, 2018, 243: 442–447.
- [21] 邵宁, 刁洪林, 王薛, 等. 铁皮石斛花总黄酮的绿色提取工艺优化[J]. 食品工业科技, 2021, 42(24): 181–187. [SHAO N, DIAO H L, WANG X, et al. Optimization of green extraction process of total flavonoids from *Dendrobium officinale* flower[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(24): 181–187.]
- [22] MING H S, SI M F, GAO D L, et al. Deep eutectic solvent on extraction of flavonoid glycosides from *Dendrobium officinale* and rapid identification with UPLC-triple-TOF/MS[J]. Food Chemistry, 2023, 401: 134054.

- [23] 谢苗, 卞小妮, 张鑫, 等. 低共熔溶剂提取灵芝多糖的工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(5): 123-129. [XIE M, QI X N, ZHANG X, et al. Process optimization and antioxidant activity of eutectic solvent extraction of *Ganoderma lucidum* polysaccharides[J]. Food Research and Development, 2022, 43(5): 123-129.]
- [24] 刘玉坤, 刘凌雯, 孔晶, 等. 天然低共熔溶剂超声辅助高效提取海茸多酚与多糖的研究[J]. 当代化工研究, 2023(4): 74-76. [LIU Y K, LIU L W, KONG J, et al. Ultrasonically assisted and efficient extraction of polyphenols and polysaccharides from sea mushrooms with natural low eutectic solvents[J]. Contemporary Chemical Research, 2023(4): 74-76.]
- [25] 刘旭, 孟继坤, 葛鑫会, 等. 低共熔溶剂提取的黄精多糖性质分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(11): 52-57. [LIU X, MENG J K, GE X H, et al. Analysis of the properties of polysaccharides extracted by low eutectic solvent from *Flos Chrysanthemi*[J]. Food Industry Science and Technology, 2022, 43(11): 52-57.]
- [26] 孙晓玲. 蒽酮-硫酸法测定秋葵多糖条件的优化[J]. 中国食品添加剂, 2019, 30(9): 154-158. [SUN X L. Optimization of conditions for determination of okra polysaccharide by anthrone-sulfuric acid method[J]. China Food Additives, 2019, 30(9): 154-158.]
- [27] 贾夏, 赵娜. 不同干制方式对香菇多糖和还原糖含量的影响[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(2): 396-397. [JIA X, ZHAO N. Effects of different drying methods on the content of shiitake polysaccharides and reducing sugars[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2011, 39(2): 396-397.]
- [28] ANNA N K, RIMA Z S, SERGEY A I, et al. Revision of the O-polysaccharide structure of *Yersinia pseudotuberculosis* O: 1b[J]. Carbohydrate Research, 2009, 344: 2421-2423.
- [29] XI M L, KE S L, SHENG Y, et al. A novel pectic polysaccharide of jujube pomace: Structural analysis and intracellular antioxidant activities[J]. Antioxidants, 2020, 9(127): 1-16.
- [30] SARAVANA P S, CHO Y N, WOO H C, et al. Green and efficient extraction of polysaccharides from brown seaweed by adding deep eutectic solvent in subcritical water hydrolysis[J]. Journal of Cleaner Production, 2018, 198: 1474-1484.
- [31] 闫生辉, 李兴奎, 高玉红. 响应面法优化超声辅助提取河阴石榴多糖工艺研究[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(23): 5987-5991. [YAN S H, LI X K, GAO Y H. Study on optimized ultrasonic-assisted extraction of pomegranate polysaccharides from Heyin by response surface method[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2015, 54(23): 5987-5991.]
- [32] 黄秀红, 刘丽辰, 阮怿航, 等. 响应面优化低共熔溶剂提取乌龙茶多糖的研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(11): 96-103. [HUANG X H, LIU L C, RUAN Y H, et al. Study on extraction of Oolong tea polysaccharides from eutectic solvent with optimized response surface[J]. Food Research and Development, 2020, 41(11): 96-103.]
- [33] 梁庆祥, 赵杨, 周欣, 等. 单因素试验结合响应面分析法优化杜仲最佳提取工艺[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(5): 859-865. [LUAN Q X, ZHAO Y, ZHOU X, et al. Optimization of optimal extraction process of *Eucommia eucommia* by univariate experiment combined with response surface analysis[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2013, 33(5): 859-865.]
- [34] 李晶峰, 邱慧, 杨小倩, 等. 响应面法优化龟甲蛋白提取工艺及其对 MC3T3-E1 细胞增殖活性[J]. 食品工业科技, 2021, 42(2): 302-309. [LI J F, ZHI H, YANG X Q, et al. Optimization of tortoiseshell protein extraction process and its proliferative activity on MC3T3-E1 cells by response surface method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(2): 302-309.]
- [35] 朱和权, 冯进, 李春阳, 等. 响应面法优化白首乌多糖超声辅助提取工艺及其结构表征[J]. 食品工业科技, 2021, 42(10): 153-159. [ZHU H Q, FENG J, LI C Y, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction process and structural characterization of Baishou Wu polysaccharide by response surface method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(10): 153-159.]
- [36] 孙连立, 刘露, 裴运林, 等. 猴面包树果多糖超声辅助提取及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(8): 40-47. [SUN L L, LIU L, PEI Y L, et al. Ultrasonic-assisted extraction of baobab fructopolysaccharides and their antioxidant activity[J]. Food Research and Development, 2018, 39(8): 40-47.]
- [37] 陈盛余, 赵丹丹, 谢瑜, 等. 铁皮石斛多糖的微波辅助提取工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(6): 49-52. [CHEN S Y, ZHAO D D, XIE Y, et al. Research on microwave-assisted extraction process of *Dendrobium officinale* polysaccharides[J]. Food Research and Development, 2017, 38(6): 49-52.]
- [38] 王琳, 李巧玉, 杨丹, 等. 响应曲面法优化铁皮石斛鲜条多糖提取工艺[J]. 浙江农业科学, 2016, 57(9): 1473-1477. [WANG L, LI Q Y, YANG D, et al. Optimization of polysaccharide extraction process from fresh strips of *Dendrobium officinale* by response surface method[J]. Zhejiang Agricultural Science, 2016, 57(9): 1473-1477.]
- [39] SEBASTIAN H O, JORGE R W, GONZALO G P, et al. Influence of chemical composition and structural properties on the surface behavior and foam properties of tofu-whey concentrates in acid medium[J]. Food Research International, 2020, 128: 108772.
- [40] 申世安. 滇重楼多糖的分离纯化与结构鉴定及其生物活性研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2017. [SHEN S A. Separation and purification and structure identification of Yunnan Chonglou polyphenols and their biological activities[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2017.]
- [41] 唐伟敏. 芫菁多糖与玛咖多糖的化学结构及其抗疲劳作用比较研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017. [TANG W M. Comparative studies on chemical structure and anti-fatigue effect of polysaccharides both from turnip and maca[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017.]
- [42] FRANTISEK F, DANIEL K, DANIEL K, et al. Structural dynamics of lytic polysaccharide monooxygenase during catalysis[J]. Biomolecules, 2020, 10(241): 1-18.
- [43] XIAO L L, JING J X, XUE Q Z, et al. Structural identification and sulfated modification of an antiglycation *Dendrobium huoshanense* polysaccharide[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 106: 247-254.