

铁皮石斛多糖提取工艺优化研究

吴迪¹, 蔡成岗^{1,2,3}, 沙如意^{1,2,3}

(1. 浙江科技学院 生物与化学工程学院, 杭州 310023; 2. 浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室, 杭州 310023;
3. 浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心, 杭州 310023)

摘要: 多糖为铁皮石斛中的主要有效成分, 高效浸出有利于其进一步利用。以水为溶剂, 对影响铁皮石斛多糖提取的时间、温度及料液质量比等因素进行了优化研究, 并应用苯酚-硫酸法和 DNS 法考察了铁皮石斛提取液总糖和单糖的提取率, 多糖提取率由两者之差计算得出。单因素实验和正交实验结果表明, 料液质量比 1:120、浸提温度 70 ℃、浸提时间 90 min 时提取铁皮石斛多糖效果最好, 在此工艺条件下, 铁皮石斛多糖提取率为 55.2%。

关键词: 铁皮石斛; 多糖; 提取工艺; 单因素实验; 正交实验

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-8798(2016)06-0444-06

Optimization of polysaccharide extraction conditions of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

WU Di¹, CAI Chenggang^{1,2,3}, SHA Ruyi^{1,2,3}

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory for Chemical and Biological Processing Technology of Farm Produce, Hangzhou 310023, China; 3. Zhejiang Collaborative Innovation Center of Chemical and Biological Manufacturing for Agricultural Biological Resources, Hangzhou 310023, China)

Abstract: Polysaccharide is the most important functional ingredient in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, and it is important to extract the polysaccharides efficiently for the utilization of *D. officinale* Kimura et Migo. The extraction conditions such as extraction time, extraction temperature and the ratio of substrate to extraction solution of polysaccharide from *D. officinale* Kimura et Migo by water using single factor and orthogonal experiments were optimized. The extraction ratio of polysaccharide was calculated by subtract between the total polysaccharide and monosaccharide, which were analyzed by phenol sulfuric acid method and DNS method,

收稿日期: 2016-10-22

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目(201611057014); 浙江科技学院科研启动基金项目(702103E03)

作者简介: 吴迪(1994—), 男, 浙江省湖州人, 2014 级生物工程专业本科生。

通信作者: 蔡成岗, 副教授, 博士, 主要从事食品生物技术研究。

respectively. The single factor experiments results showed that the ratio of substrate to water of 1 : 120, extraction temperature of 70 °C and extraction time of 90 min are the optimal conditions, which are also of the optimal extraction conditions of orthogonal experiments. The identified experiments showed that under the optimal conditions the maximal extraction quantity is of 55.2%.

Keywords: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; polysaccharide; extraction technology; single factor experiment; orthogonal experiment

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)是中国传统名贵中药,历代古籍医书均有记载。《本草纲目》载:“俗方最以补虚,主治伤中,除痹下气,补五脏虚劳羸瘦,强阴益精;厚肠胃,补内绝不足,逐皮肤邪热瘁气,治男子腰脚软弱,健阳,补肾益力,壮筋骨,暖水脏,轻身延年等”;《本草思辨录》认为,石斛,为肾药,为肺药,为肠胃药^[1]。铁皮石斛具养胃生津、润肺止咳、滋阴清热、清音明目之功效,含有多糖、生物碱、菲类、联苄类、萘酮化合物、糖苷类、氨基酸等药理成分^[2-8]。多糖作为铁皮石斛的主要有效成分,药理作用包括增强机体免疫能力、抗氧化、抗衰老、降血糖、养阴生津和抑制肿瘤等^[9-15]。

近年来,铁皮石斛人工栽培面积逐步扩大,受到广泛的关注。其药用主要成分多糖的提取对于铁皮石斛的高效利用和产品开发具有重要意义。目前,国内有研究人员针对铁皮石斛多糖采用水法提取^[16]、酶法提取^[17-19]、超声波提取^[20]等,其中酶法及超声提取法较直接水提法效果更好,多糖质量浓度因铁皮石斛采收季节及生长年份不同而存在一定的差异;在提取实验设计中,采用正交实验^[21]和响应面分析^[16,19]等设计方法,获得了较佳的提取工艺。因铁皮石斛主要在中国栽培,国外对其研究报道较少。鉴于目前铁皮石斛多糖提取工艺条件存在一定的差异,本研究为探讨铁皮石斛中多糖的质量浓度,采用单因素和正交实验方法对铁皮石斛多糖进行了提取的工艺优化研究,以期掌握铁皮石斛中多糖的质量浓度并为后续多糖的构效关系等研究提供一定的参考。

1 实验方法

1.1 实验材料

铁皮石斛,购自市场,为3年生铁皮石斛鲜条。葡萄糖、浓硫酸、苯酚、酒石酸钾钠、3,5-二硝基水杨酸、氢氧化钠、亚硫酸氢钠等均为分析纯,购自华东医药股份有限公司器材化剂分公司;水为去离子水。

1.2 实验设备

水浴锅,江苏金坛良友实验仪器厂;台式高速冷冻离心机,德国希格玛(SIGMA)公司;粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;紫外可见分光光度计(UV-5500PC),上海元析仪器有限公司;电子天平(PL303),梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.3 提取工艺

石斛鲜条→切碎→60 °C烘干→磨粉→过筛→称样→水浴提取→定容→离心→上清液备用→糖质量浓度测定。

1.4 糖浓度测定

单糖质量浓度测定采用DNS法^[22](3,5-二硝基水杨酸比色法),总糖质量浓度测定采用苯酚-硫酸法^[23],多糖提取率以总糖提取率减去单糖提取率进行计算。

1.4.1 DNS法

分别取标准溶液0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL于25 mL试管中,分别准确加入DNS试剂2 mL,沸水浴加热2 min,流水冷却,用水补足到25 mL,在540 nm波长下测定吸光度值,以质量浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线,并建立方程。

1.4.2 苯酚硫酸法

分别取标准溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,各以水补至2.0 mL,然后先后加入1.0 mL苯酚(5%质量

浓度)和 5.0 mL 浓硫酸,混合后静置 10 min,摇匀并于室温下放置 20 min,于 490 nm 下测定吸光度值,空白实验以 1.0 mL 水代替样品进行,并绘制吸光度为纵坐标、葡萄糖质量浓度为横坐标的标准曲线,建立回归方程。

1.5 单因素实验

1.5.1 料液质量比的确定

精密称取 0.2 g 铁皮石斛粉末,在浸提温度 60 ℃、浸提时间 90 min 条件下,研究 1 : 90、1 : 120 和 1 : 150 料液质量比对提取效果的影响。

1.5.2 浸提温度的确定

精密称取 0.2 g 铁皮石斛粉末,在最佳料液质量比条件下,以蒸馏水为溶剂,在 50、70、90 ℃ 温度下浸提 90 min,测定提取效果。

1.5.3 浸提时间的确定

精密称取 0.2 g 铁皮石斛粉末,在最佳料液质量比和浸提温度条件下,以蒸馏水为溶剂,研究浸提时间 60、90、120 min 对铁皮石斛多糖提取效果的影响。

1.6 正交实验

以单因素实验得出的最佳料液质量比、浸提温度和浸提时间为中心点,设计正交实验,因素和水平如表 1 所示。

表 1 正交实验因素和水平
Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	料液质量比 A	浸提温度/℃ B	浸提时间/min C
1	1 : 90	50	60
2	1 : 120	70	90
3	1 : 150	90	120

2 结果与讨论

2.1 标准曲线

2.1.1 DNS 法标准曲线

DNS 法标准曲线方程为 $y=0.742x+0.015(R^2=0.998)$, R 为相关系数),该线性方程说明在图 1 所示的质量浓度范围内葡萄糖质量浓度与吸光度有良好的线性关系。

2.1.2 苯酚-硫酸法标准曲线

苯酚-硫酸法标准曲线方程为 $y=0.876x+0.027(R^2=0.997)$,该线性方程说明在图 2 所示的质量浓度范围内葡萄糖质量浓度与吸光度有良好的线性关系。

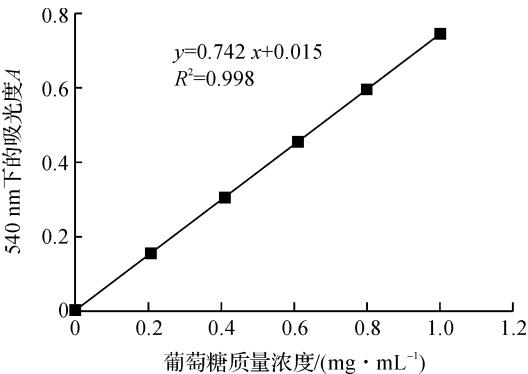


图 1 DNS 法测定还原糖标准曲线

Fig. 1 Standard curve for reducing carbohydrate analysis by DNS method

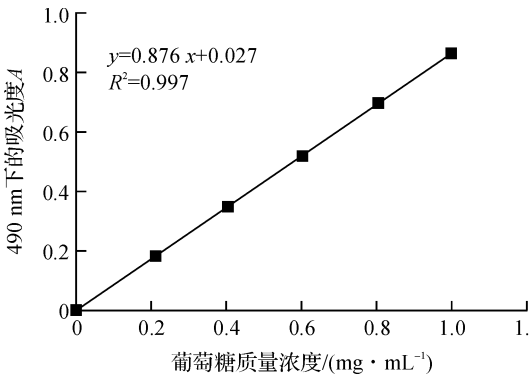


图 2 苯酚-硫酸法测定总糖标准曲线

Fig. 2 Standard curve for total carbohydrate analysis by phenol-sulfate method

2.2 单因素实验结果与分析

2.2.1 料液质量比对铁皮石斛多糖提取率的影响

选择料液质量比 1 : 90,1 : 120,1 : 150 三个水平,考查不同料液质量比对铁皮石斛多糖提取率的影响,将所有提取液定容至 250 mL 后离心,多糖提取率用百分数表示。实验结果见表 2。

表 2 料液质量比对提取效果的影响
Table 2 Effects of substrate and liquid ratio on extraction results

料液质量比	总糖提取率/%	单糖提取率/%	多糖提取率/%
1 : 90	77.9	35.7	42.2
1 : 120	94.7	43.4	51.3
1 : 150	59.4	30.7	28.7

由表 2 可见,料液质量比的增加会增加铁皮石斛多糖的溶出量。当料液质量比为 1 : 120 时,总糖提取率和单糖提取率均最高,多糖提取率也达到最高值 51.3%。由此结果可知,料液质量比为 1 : 120 时提取效果最好。

2.2.2 浸提温度对铁皮石斛多糖提取率的影响

选择浸提温度 50、70、90 ℃ 三个水平,考查不同浸提温度对铁皮石斛多糖提取率的影响,实验结果见表 3。

表 3 浸提温度对提取效果的影响
Table 3 Effects of temperature on extraction results

浸提温度/℃	总糖提取率/%	单糖提取率/%	多糖提取率/%
50	80.5	32.5	48.0
70	96.9	42.1	54.8
90	59.1	30.7	28.4

由表 3 可知,浸提效果随着温度升高呈现先增加后下降的趋势,当浸提温度为 70 ℃ 时,铁皮石斛总糖提取率和单糖提取率均最高,多糖提取率也达到最高值 54.8%。但随着温度的升高,多糖的提取率却有所下降,故浸提温度为 70 ℃ 时铁皮石斛多糖提取效果最好。

2.2.3 浸提时间对铁皮石斛多糖提取率的影响

浸提时间选择 60、90、120 min 三个水平,考查不同浸提时间对铁皮石斛多糖提取率的影响,实验结果见表 4。

表 4 浸提时间对提取效果的影响
Table 4 Effects of time on extraction results

浸提时间/min	总糖提取率/%	单糖提取率/%	多糖提取率/%
60	59.7	30.2	29.5
90	96.4	43.7	52.7
120	70.2	35.6	34.6

由表 4 可见,浸提时间的增加会增加多糖的溶出量,但并不是浸提时间越长,提取效果越好,当浸提时间达到 120 min 时,铁皮石斛多糖提取率反而降低,仅 34.6%。当浸提时间为 90 min 时,铁皮石斛总糖提取率和单糖提取率均最高,多糖提取率也达到最高值 52.7%。故浸提时间初步定为 90 min。

2.3 铁皮石斛多糖提取的最佳工艺条件

本研究以铁皮石斛多糖为指标,以单因素实验中获得的最适提取条件为基础,再以正交实验方法进行优化。实验中以水为提取溶剂,确定料液质量比、浸提时间和浸提温度对提取效果的影响。取铁皮石

斛粉末 0.2 g,按照设定的方法提取后定容至 250 mL 并离心,测定总糖和单糖的提取率,以两者之差作为多糖提取率。实验结果如表 5 所示。

表 5 正交实验结果
Table 5 Results of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	总糖提取率/%	单糖提取率/%	多糖提取率/%
1	1	1	1	76.0	37.1	38.9
2	1	2	2	77.8	36.6	41.2
3	1	3	3	74.8	32.7	42.1
4	2	1	2	84.5	34.3	50.2
5	2	2	3	90.0	40.0	50.0
6	2	3	1	87.8	38.2	49.6
7	3	1	3	74.6	34.9	39.7
8	3	2	1	87.8	48.9	38.9
9	3	3	2	73.9	41.5	42.4
K_{1j}	122.2	128.8	127.4			
K_{2j}	149.8	134.1	133.8			
K_{3j}	120.9	130.0	131.7			
$K_{1j/3}$	40.7	42.9	42.5			
$K_{2j/3}$	49.9	44.7	44.6			
$K_{3j/3}$	40.3	43.3	43.9			
极差 R	9.20	0.42	2.12			
最佳组合	$A_2C_2B_2$					

由正交实验极差分析可知,因素主次顺序为 A、C 和 B,影响结果的因素依次为料液质量比、浸提时间和浸提温度。最佳组合是 $A_2C_2B_2$,即提取工艺参数料液质量比为 1 : 120,浸提温度为 70 ℃,浸提时间为 90 min(图 3)。按照正交实验结果进行验证实验,铁皮石斛多糖得率为 55.2%。

3 结 语

铁皮石斛作为名贵中药材具有多种功能,多糖为其主要有效成分。目前,研究人员采用水法、酶法和超声波提取等手段进行了提取工艺研究,结果存在一定的差异。本研究采用单因素和正交实验的方法对铁皮石斛多糖的提取工艺进行了优化,单因素实验设计有利于获得选定的各个因素对提取效果的影响。在此基础上,采用正交实验设计考察各个因素之间的相互作用。单因素和正交实验结果都表明,料液质量比 1 : 120,浸提温度 70 ℃,提取时间 90 min 时多糖提取效果最好。单因素和正交实验结果一致,可能是因为在实验设计中选择的各因素水平之间差值较大,在后续实验中可以将各因素的水平值进一步细化。正交实验还说明,对铁皮石斛中多糖提取效果影响的因素大小依次为料液质量比、浸提时间和浸提温度,在最佳条件下铁皮石斛多糖提取率为 55.2%。后续研究需要在确定铁皮石斛原料、水分含量的基础上,结合其他辅助提取手段,进一步对最佳提取工艺进行优化,在此基础上开展铁皮石斛多糖的分离和结构分析等方面的继续研究工作,以便为铁皮石斛的综合利用和精深加工寻找科学依据。

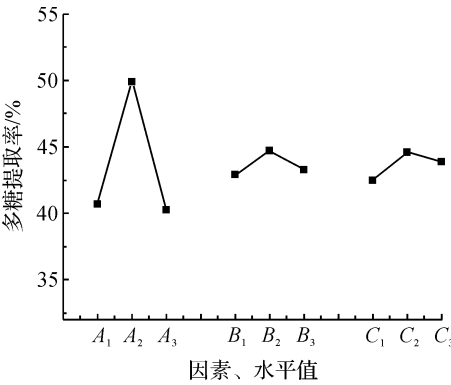


图3 因素、水平对多糖提取效果的影响
Fig.3 Effects of factors and levels on extraction results of polysaccharide

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:265.
- [2] 黄民权,阮金月. 6种石斛属植物水溶性多糖的单糖组分分析[J]. 中国中医药杂志,1997,22(2):74.
- [3] 杨虹,王顺春,王峰涛,等. 铁皮石斛多糖的研究[J]. 中国药学杂志,2004,39(4):254.
- [4] 董群,方积年. 多糖在医药领域中的应用[J]. 中国药学杂志,2001,36(10):649.
- [5] FRNAZ G. Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts[J]. Plant Medical, 1989, 55(6): 493.
- [6] XIANG L, STEPHEN SZE C W, NG T B, et al. Polysaccharides of *Dendrobium officinale* inhibit TNF- α -induced apoptosis in A-253 cell line[J]. Inflammation Research, 2013, 62(3):313.
- [7] 何铁光,杨丽涛,李杨瑞,等. 铁皮石斛原球茎多糖 DCPPla-1 的理化性质及抗肿瘤活性[J]. 天然产物研究与开发, 2007,19(4):578.
- [8] 蒋玉兰,罗建平. 药用石斛多糖药理活性及化学结构研究进展[J]. 时珍国医国药,2011,22(12):2986.
- [9] 何铁光,杨丽涛,李杨瑞,等. 铁皮石斛原球茎多糖 DCP3c-1 的分离纯化及结构初步分析[J]. 分析测试学报,2008, 27(2):143.
- [10] 罗慧玲,蔡体育,陈巧伦,等. 石斛多糖增强脐带血和肿瘤病人外周血 LAK 细胞体外杀伤作用的研究[J]. 癌症,2000, 19(12):1124.
- [11] 张红玉,戴关海,马翠,等. 铁皮石斛多糖对 S₁₈₀ 肉瘤小鼠免疫调节功能的影响[J]. 浙江中医杂志,2009,44(5):380.
- [12] 李钦,陈爱君,张信岳. 铁皮石斛颗粒增强免疫功能作用研究[J]. 中药药理与临床,2008,24(1):53.
- [13] 张中建,阎小伟. 铁皮石斛制剂免疫调节作用的实验研究[J]. 食品研究与开发,2004,25(2):34.
- [14] 夏春东,廖学才,李守良,等. 石斛药用概述[J]. 实用中医药杂志,1998,14(4):45.
- [15] 郭勇,程晓磊. 石斛在恶性肿瘤治疗中的作用[J]. 浙江中西医结合杂志,2007,17(7):454.
- [16] 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.
- [17] 尚喜雨. 水提法·酶法提取铁皮石斛多糖的比较研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(18):9787.
- [18] 张利,范明才,冯喜文,等. 铁皮石斛中石斛多糖与石斛碱的纤维素酶法提取研究[J]. 化学研究与应用,2011,23(3):356.
- [19] 胡建楣,李静玲,冯鹏,等. Box-Behnken 设计优化铁皮石斛中多糖复合酶法提取工艺[J]. 中药材,2014,37(1):130.
- [20] 叶余原. 超声法提取铁皮石斛多糖工艺的研究[J]. 中药材,2009,32(4):617.
- [21] 王培培,鲁芹飞,陈建南,等. 正交实验法优化铁皮石斛多糖的提取工艺[J]. 时珍国医国药,2012,23(11):2781.
- [22] 张媛媛,张彬. 苯酚-硫酸法与蒽酮-硫酸法测定绿茶茶多糖的比较研究[J]. 食品科学,2016,37(4):158.
- [23] 赵凯,许鹏举,谷广烨. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. 食品科学,2008,29(8):534.

~~~~~  
(上接第 443 页)

- [7] 张爱清,王岑. 融合 MOOC 以学生为中心的高等数学改革探索[J]. 教育教学论坛,2016(51):131.
- [8] 王圣祥,张玲. 慕课对大学数学课程教学的挑战[J]. 滁州学院学报,2014,16(2):123.
- [9] 李栋,杨道宇. 慕课课程结构探议[J]. 教育理论与实践,2015,35(23):48.
- [10] 李华,龚艺,纪娟,等. 面向 MOOC 的学习管理系统框架设计[J]. 现代远程教育研究,2013(3):28.
- [11] 叶伦强. 基于 Camtasia Studio 的慕课教学视频设计与制作[J]. 西南民族大学学报(自然科学版),2015,41(5):599.
- [12] 张一川,钱扬义. 国内外“微课”资源建设与应用进展[J]. 远程教育杂志,2013(6):26.
- [13] 陈坚林. 大数据时代的慕课与外语教学研究:挑战与机遇[J]. 外语电化教学,2015,41(1):3.
- [14] 赵腾,张焰,张东霞. 智能配电网大数据应用技术与前景分析[J]. 电网技术,2014,38(12):3305.
- [15] 孟小峰,慈祥. 大数据管理:概念、技术与挑战[J]. 计算机研究与发展,2013,50(1):146.
- [16] 丁杰,潘晨光,田源. 基于 crtmpserver 的手机直播系统[J]. 计算机工程与设计,2014,35(9):3173.