

金钗石斛低聚糖提取工艺优化及其抗氧化活性

渠婷, 马朝阳, 王洪新

5 (江南大学食品学院, 国家功能食品工程技术研究中心, 无锡 214122)

摘要: 为了综合的利用开发金钗石斛这一珍贵中草药, 研究金钗石斛低聚糖提取工艺及其抗氧化活性。采用热水提取法提取金钗石斛低聚糖, 以 Box-Behnken 试验设计结合响应面法优化了提取工艺条件, 确定最佳工艺条件为提取时间 87min, 提取温度 52℃, 料液比 1:48(g/ml)。10 在该条件下, 金钗石斛低聚糖得率为 12.932%, 与预测值 12.9429% 基本一致。抗氧化研究结果表明金钗石斛低聚糖具有明显的清除自由基的作用, 其清除能力表现为浓度依赖性, 当质量浓度为 2.0mg/ml 时, 对 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐自由基和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基的清除率分别达到 97.97% 和 67.80%, 远高于同浓度下金钗石斛多糖对这两种自由基的清除率。

15 **关键词:** 响应面法; 金钗石斛低聚糖; 抗氧化
中图分类号: TS201.2

Optimization of Extraction Process and Antioxidant Capacity of Oligosaccharide from *Dendrobium Nobile*

20 Qu Ting, Ma Chaoyang, Wang Hongxin

(National Engineering Research Center for Functional Food. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122)

Abstract: *Dendrobium Nobile* oligosaccharide was extracted and its antioxidant experiment was carried out to provide the guideline for the efficient utilization and development of *Dendrobium Nobile* resource. Hot water was used to extract *Dendrobium Nobile* oligosaccharide and extraction conditions were optimized by employing response surface methodology based on Box-Behnken design as extraction time of 87min, extraction temperature of 52℃ and liquid-to-solid ratio of 1:48(g/ml). The extraction yield of crude oligosaccharide under the optimized conditions was 12.93%, which is basically the same as the value 12.932% predicted by Box-Behnken model. The antioxidant experimental results showed that free radical scavenging rate of the obtained oligosaccharide was 97.97% for the ABTS+• and 67.80% for DPPH at the concentration of 2.0mg/ml, which is higher than those of polysaccharide from *Dendrobium Nobile* at the same concentration.)

Key words: response surface methodology; oligosaccharide; antioxidant capacity

35 0 引言

石斛 (*Dendrobium nobile* Lindl) 是兰科石斛属植物多种药物的总称, 位居四大仙草之首, 最早记载出现于《神农本草经》, 根据李时珍的《本草纲目》对于石斛描述, 石斛具有去湿除痹, 降气, 补五脏虚弱, 强健形体, 滋阴的作用。现在医学发现, 石斛中主要的功效成分^[1~5]为多糖和石斛碱, 石斛具有降血糖^{[6][7]}、降血脂^[8]和抗氧化^{[2][6][9]}等作用。低聚糖

40 (Oligosaccharides), 又称为寡糖, 是单糖通过糖苷键连接起来形成的具有直链或者分支链的低度聚合糖, 一般是指含有 2~10 个单糖的聚合物。现已有报道证实功能性低聚糖具有促

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (JUSRP51501); 金钗石斛资源精深加工系列产品的研究与开发 (150035)

作者简介: 渠婷 (1991—), 女, 在读硕士, 研究方向为食品功能因子和功能食品研究开发

通信联系人: 王洪新 (1964—), 男, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为食品功能因子和功能食品研究开发. E-mail: hxwang@jiangnan.edu.cn

进肠道益生菌生长、改善人体内环境、增强机体免疫力、抗氧化等活性,具有良好的发展前景^[10-13]。近年来,我国对于石斛多糖和生物碱的研究颇多,研究成果也颇为丰富,但对于

石斛中所含的低聚糖鲜有报道。因此,本研究探究了石斛低聚糖溶液提取技术,通过响应面法考察各试验条件对低聚糖得率的影响,并确定最佳工艺参数。并对所得低聚糖进行纯化试验,用其纯品进行抗氧化试验,以期对石斛低聚糖的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用金钗石斛,来自于贵州赤水国礼石斛有限公司;无水乙醇、无水葡萄糖、苯酚、氢氧化钠、亚硫酸氢钠、酒石酸钾钠、3,5-二硝基水杨酸购自国药集团化学试剂有限公司;维生素 C/抗坏血酸标准品、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐购自西格玛奥德里奇(上海)贸易公司;实验用水为蒸馏水;其余所用试剂均为分析纯。

试验仪器 UV-2100 紫外可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;HH-4G 恒温水浴锅,常州赛普实验仪器厂;SHZ-III 循环水式真空泵,上海姜强仪器有限公司;FW80 高速粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;AR224CN 电子天平,奥豪斯仪器(常州)有限公司;BC-R206 旋转蒸发仪,上海贝凯生物化工设备有限公司;DL-5-B 低速离心机,上海安亭科学仪器有限公司;SCIENTZ-10N 冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 石斛低聚糖的提取工艺流程

石斛切断、打碎——石斛粉与乙醇溶剂混合——提取——离心、抽滤——定容100ml。

1.2.2 溶剂浸提法提取石斛低聚糖单因素实验

①浸提温度对石斛低聚糖得率的影响

称取1g石斛粉于三角烧瓶中,选取乙醇浓度(体积分数)15%,料液比1:40,浸提时间50min,测定浸提温度分别为40℃、50℃、60℃、70℃、80℃时的石斛低聚糖得率。

②浸提时间对石斛低聚糖得率的影响

称取1g石斛粉于三角烧瓶中,选取乙醇浓度(体积分数)15%,料液比1:40、浸提温度60℃,测定浸提时间分别为20min、30min、40min、50min、60min时的石斛低聚糖得率。

③料液比对石斛低聚糖得率的影响

称取1g石斛粉于三角烧瓶中,选取乙醇浓度(体积分数)15%、浸提温度60℃、浸提时间50min,测定料液比分别为1:20、1:30、1:40、1:50、1:60时的石斛低聚糖得率。

1.2.3 响应面优化实验

在单因素实验结果的基础上,根据Box-Behnken 中心组合设计原理,采用响应面法^[14]对金钗石斛低聚糖提取工艺进行3因素3水平的优化,并按最佳提取条件进行验证试验。

1.2.4 分析方法

总糖、多糖、还原糖的测定:采用3,5-二硝基水杨酸(DNS)法^[15],以葡萄糖为标准品;

金钗石斛低聚糖的率=100*(总糖-多糖-还原糖)/石斛粉质量

1.2.5 金钗石斛低聚糖的脱色及纯化

80 将提取的金钗石斛低聚糖溶液浓缩后,在45℃下使用AB-8树脂进行脱色和初步纯化,得粗低聚糖,然后使用分子量为500D的透析袋透析后浓缩冷冻干燥,得脱色除单糖后的金钗石斛低聚糖。

1.2.6 ABTS⁺自由基清除能力的测定

85 以VC为对照品,进行ABTS⁺自由基清除能力的测定^[9]。将7mmol/l的ABTS水溶液与2.45mmol/l的过硫酸钾溶液等比例混合,在暗处反应16h,得ABTS⁺离子溶液,维生素C溶液作为对照品。将离子溶液在使用前放在波长为734nm波长的紫外分光光度计中,把吸光度调整为0.700±0.02,室温下维持30min。取2.0ml的ABTS溶液加入0.1ml的待测样品,室温下混匀反应6min后,于734nm波长处测定吸光值,清除率公式为:

$$\text{ABTS清除率}(\%) = A_0 - (A_1 - A_2) / A_0,$$

90 其中, A₀: ABTS溶液在波长734nm的吸光值

A₁: 样品与ABTS反应后在波长734nm处的吸光值

A₂: 样品在波长734nm处的吸光值

其中所有空白品均为无水乙醇代替。

1.2.7 DPPH 自由基清除能力测定

95 以VC为对照品,进行DPPH自由基清除能力测定^[2]。用无水乙醇配置成0.1mmol/l的DPPH溶液,维生素C溶液作为对照品。2.0mlDPPH溶液中加入3.0ml不同浓度梯度的低聚糖溶液或者VC对照品,室温下暗处反应30min,然后在517nm波长下测定吸光值。清除率公式为:

$$\text{DPPH清除率}(\%) = A_0 - (A_1 - A_2) / A_0$$

其中, A₀: 无样品影响的DPPH在波长517nm的吸光值

A₁: 样品与DPPH反应后的在波长在517nm处的吸光值

100 A₂: 样品在波长517nm处的吸光值

其中所有空白品均为无水乙醇代替。

1.3 数据分析

单因素实验数据采用SPSS软件进行统计分析,响应面分析由Design Expert软件完成。

2 实验结果与分析

105 2.1 提取单因素实验结果

提取温度对低聚糖的率的影响如图1,得率在60℃时达到最大值,40~60℃范围内,随着温度升高,得率也越来越高,70~80℃范围内呈明显下降趋势,这可能是因为随着温度升高使溶剂粘度降低,分子运动加快,从而加快生物活性物质的溶出,但是当温度过高时会使热敏性化合物降解为小分子化合物,导致得率降低。

110 提取时间对低聚糖得率的影响如图2所示,提取时间从40min延长至80min的过程中,得率有明显的升高,在80min时达到最大值,80min后又呈下降趋势,这可能是因为随着时间的延长,低聚糖等活性物质结构遭到破坏,故选取80min作为响应面的一个中心点。

115 料液比对低聚糖得率的影响如图3, 料液比从1:20 (g/ml) 到1:50 (g/ml) 的过程中, 随着料液比的增大, 得率也明显增加, 1:50 (g/ml) 之后, 随着料液比的继续增大, 得率趋于停止, 但能耗及成本会随溶剂用量的增大而增加, 这说明加大提取容积的用量只能在一定程度上提高得率, 所以选择1:40~1:60 (g/ml) 范围内。

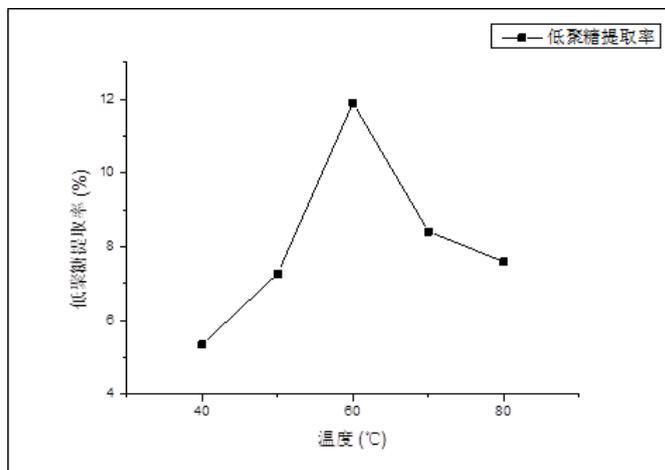


图1 温度对于低聚糖提取率的影响

Fig.1 Influence of extraction temperature on the yield of Dendrobium Nobile oligosaccharide

120

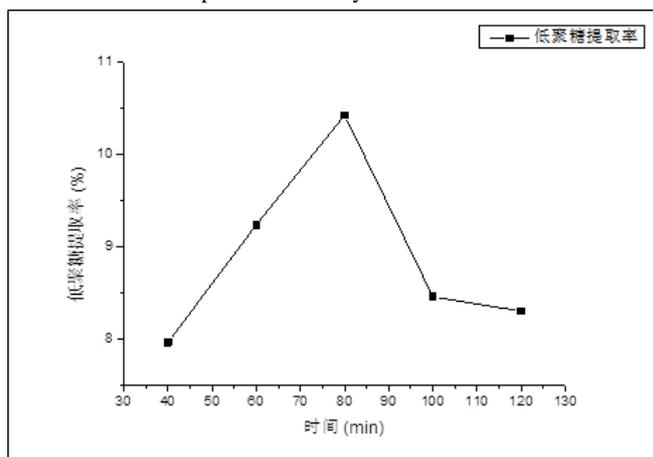


图2 提取时间对于低聚糖提取率的影响

Fig.2 Influence of extraction time on the yield of Dendrobium Nobile oligosaccharide

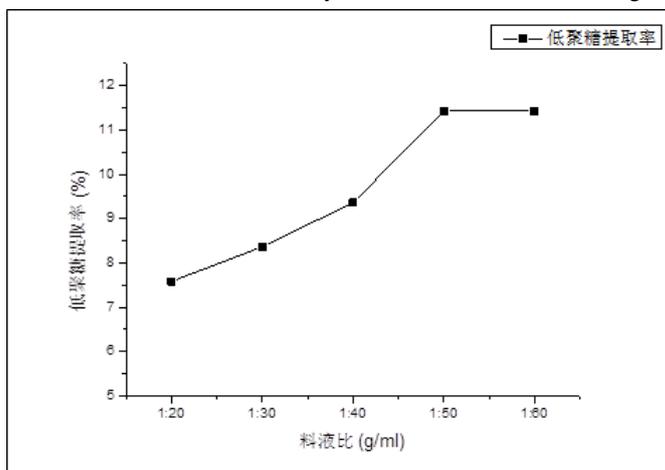


图3 料液比对于低聚糖提取率的影响

125

Fig.3 Influence of extraction liquid-to-solid on the yield of Dendrobium Nobile oligosaccharide

2.2 响应面优化结果分析

根据单因素试验结果，以提取温度、提取时间和料液比4个影响因素为变量，金钗石斛低聚糖得率为响应值，采取3因素3水平响应面实验对金钗石斛低聚糖的提取进行优化。试验因素与水平设计见表1，试验结果见表2。

130

表1 Box-Behnken试验设计

Tab.1 Box-Behnken design

水平	时间 (min)	温度 (°C)	料液比 (g/ml)
1	60	50	1:40
2	80	60	1:50
3	100	70	1:60

2.2.1 低聚糖的率的优化结果

根据实验结果建立以下模型：

$$\text{低聚糖得率} = +12.34 + 0.69 * A - 1.33 * B + 0.76 * C + 1.17 * B * C - 1.54 A^2 - 0.99 * B^2 - 0.81 * C^2$$

135

(式中：A为时间 (min)，B为温度 (°C)，C为料液比 (g/ml))

由表3可知，低聚糖的率的p值为0.0068，表明这个模型较为显著。通过对模型的可信性分析，其决定系数 $R^2=0.9082$ ，表明模型拟合度好；校正决定系数为0.7901.说明有79.01%的实验点可由该模型来解释；精确度为7.976，表明模型准确度高，模型可靠。对于低聚糖模型来说，一次项A、B、C，交互项BC和二次项 A^2 、 B^2 对其影响均显著 ($p < 0.05$)。

140

表2 Box-Behnken 试验设计及结果

Tab.2 Box-Behnken design and results

实验号	A、时间	B、温度	C、料液比	低聚糖得率
1	1	2	3	9.83
2	3	1	2	12.14
3	3	3	2	9.23
4	1	1	2	9.73
5	3	2	3	10.26
6	2	2	2	12.34
7	2	1	3	12.28
8	1	2	1	9.34
9	2	3	1	6.47
10	2	3	3	11.76
11	1	3	2	11.69
12	2	1	1	12.18
13	2	2	2	10.57
14	3	2	1	12.26
15	2	2	2	12.29
16	2	2	2	12.35
17	2	2	2	

表3 回归方程方差分析

Tab.3 Variance analysis of regression equation

项目	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	47.25	9	5.25	7.69	0.0068	显著
A	3.83	1	3.83	5.61	0.0498	显著
B	14.14	1	14.14	20.72	0.0026	显著
C	4.57	1	4.57	6.70	0.0360	显著

AB	0.44	1	0.44	0.65	0.4463	
AC	0.16	1	0.16	0.23	0.6437	
BC	5.50	1	5.50	8.06	0.0251	显著
A ²	9.97	1	9.97	14.61	0.0065	显著
B ²	4.12	1	4.12	6.04	0.0436	显著
C ²	2.73	1	2.73	4.00	0.0856	
残差	4.78	7	0.68			
失拟项	4.78	3	1.59			
净误差	0.000	4	0.000			
总离差	52.03	16				

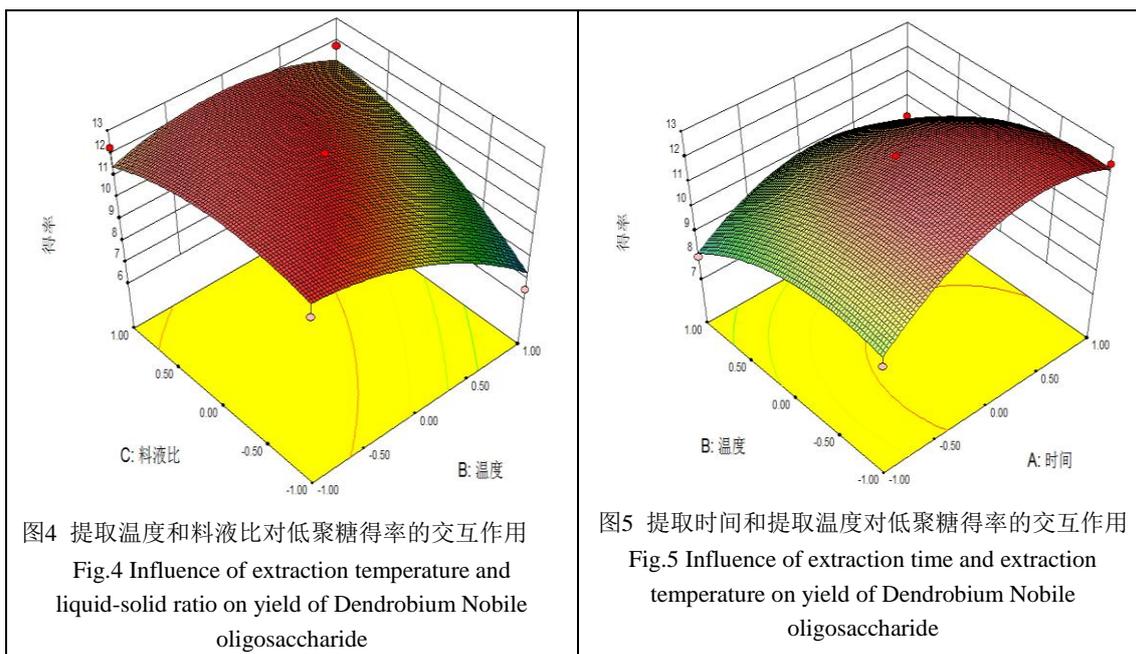
145 R²=0.9082, R²_{Adj}=0.7901, Adeq Precisor=7.976, PRESS=76.45, C.V.%=7.67

2.2.2 各因素对低聚糖得率的交互作用

提取温度和料液比对低聚糖得率有显著的交互作用，如图4所示，当料液比一定时，低聚糖的得率随着提取温度的升高先明显上升，在60℃时达到最大值，从60℃上升到70℃的过程中由有下降的趋势，这可能是由于提取温度过高会使低聚糖有效成分的结构遭到破坏，导致的率下降；当提取温度一定时，低聚糖得率随料液比的增加呈升高最后趋于平缓的趋势，这说明加大提取容积的用量只能在一定程度上提高低聚糖的得率。

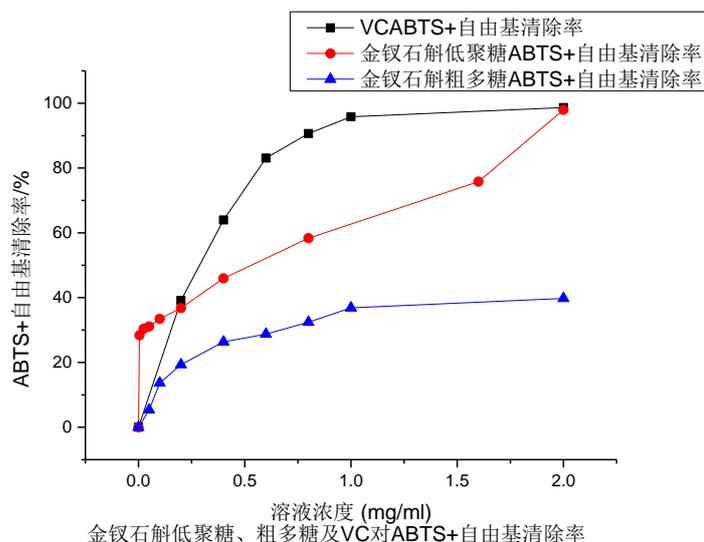
150 提取时间和提取温度对低聚糖得率的交互作用，如图5所示，当提取温度一定时，低聚糖得率随时间的延长先快速升高后有所降低，在80min时达到最大值，这可能是延长提取时间，低聚糖化合物的结构遭到了破坏，是的得率降低；当提取时间一定时，低聚糖的得率随提取温度的升高先上升再下降，这说明在提取过程中合适的提取时间和提取温度可提高低聚糖的得率。

155 通过响应面分析，得到金钗石斛低聚糖的最佳提取工艺参数为提取时间为86.6min，提取温度为51.7℃，料液比为1:48.2 (g/ml)，此条件下低聚糖得率达最大值，为12.9429%。为了检验该参数的可行性，且便于操作，以提取时间87min，提取温度52℃，乙醇浓度0，料液比1:48 (g/ml)，进行3次平行试验验证试验，得到的实际平均得率为12.932%，实际得率与理论值相差0.0109%，说明该工艺参数可用于知道金钗石斛低聚糖的提取。



2.3 ABTS⁺自由基清除能力

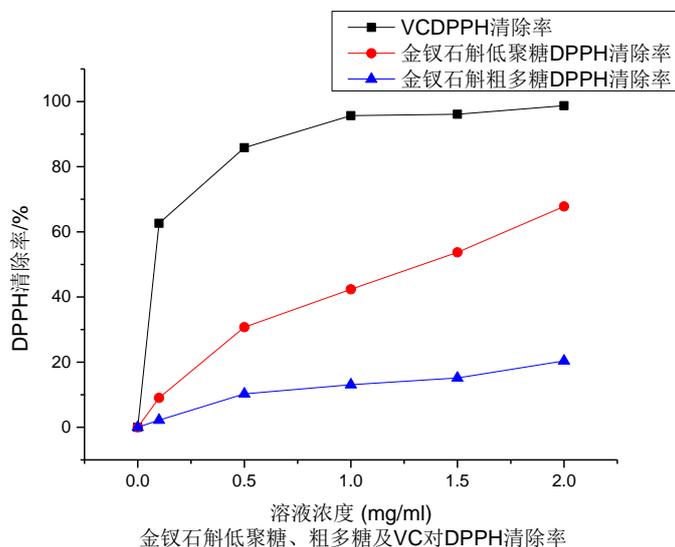
165 ABTS⁺自由基清除实验常作为一种评估样品抗氧化能力的实验用于各种抗氧化物的筛选实验中。由图6可知，随着样品浓度的不断提高（0.005、0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、2.0mg/ml），石斛低聚糖溶液的清除ABTS⁺自由基的能力也是逐渐提高的，当样品浓度达到2mg/ml时，清除率可高达97.97%。与同质量浓度的VC溶液相比，金钗石斛低聚糖在ABTS⁺自由基清除能力上具有显著的效果。与同等浓度金钗石斛粗多糖相比，金钗石斛低聚糖对ABTS⁺自由基清除效果是很明显的。



170

图6 金钗石斛低聚糖、粗多糖及VC对ABTS⁺自由基的清除率

Fig.6 ABTS⁺ scavenging rate of *Dendrobium Nobile* oligosaccharide in comparison with vitamin C and *Dendrobium Nobile* polysaccharides



175

图7 金钗石斛低聚糖、粗多糖及VC对DPPH自由基的清除率

Fig.7 DPPH racial scavenging rate of *Dendrobium Nobile* oligosaccharide in comparison with vitamin C and *Dendrobium Nobile* polysaccharides

2.4 DPPH 自由基清除能力

由图7可知，金钗石斛低聚糖DPPH自由基的清除率随浓度的升高而提高，当金钗石斛低

180 聚糖溶液浓度为2.0mg/ml时,清除率最高可达67.80%。而与同质量浓度的VC相比,金钗石斛低聚糖的DPPH清除能力相对较弱。而与同批量的金钗石斛粗多糖相比,金钗石斛低聚糖在清除DPPH自由基方面还是有显著效果的。

3 结论

通过响应面实验模型预测得出金钗石斛低聚糖的最优提取条件为:提取时间为86.6min, 185 提取温度为51.7℃,料液比为1:48.2(g/ml),此条件下低聚糖得率达最大值,为12.9429%。

用水溶液提取的金钗石斛低聚糖,经过一系列的分离纯化后所得的样品进行抗氧化实验,并与石斛粗多糖进行比较,得出,金钗石斛低聚糖具有良好的抗氧化能力,尤其在清除

190 ABTS⁺自由基方面具有显著的效果。其结构与抗氧化活性之间的比较,需进一步更深入的探究。

[参考文献] (References)

- [1] Chen, Y.-G., H. Yu and Y. Liu (2014). "Chemical constituents from *Dendrobium brymerianum* Rchb. f." *Biochemical Systematics and Ecology* 57: 175-177
- 195 [2] Fan, Y., X. He, S. Zhou, A. Luo, T. He and Z. Chun (2009). "Composition analysis and antioxidant activity of polysaccharide from *Dendrobium denneanum*." *Int J Biol Macromol* 45(2): 169-173.
- [3] Rungwichaniwat, P., B. Sritularak and K. Likhitwitayawuid (2014). "Chemical Constituents of *Dendrobium williamsonii*." *Pharmacognosy Journal* 6(3): 36-41.
- [4] Yang, D., L. Y. Liu, Z. Q. Cheng, F. Q. Xu, W. W. Fan, C. T. Zi, F. W. Dong, J. Zhou, Z. T. Ding and J. M. Hu (2015). "Five new phenolic compounds from *Dendrobium aphyllum*." *Fitoterapia* 100: 11-18.
- 200 [5] 张晓敏、孙志荣、陈龙、魏鑫鑫、刘文兰 (2014). "金钗石斛的化学成分的药理作用研究进展." *中国现代应用药学* 第31卷第7期: 4
- [6] Pan, L. H., X. F. Li, M. N. Wang, X. Q. Zha, X. F. Yang, Z. J. Liu, Y. B. Luo and J. P. Luo (2014). "Comparison of hypoglycemic and antioxidative effects of polysaccharides from four different *Dendrobium* species." *Int J Biol Macromol* 64: 420-427
- 205 [7] 吴昊妹、徐建华、陈立钻、孙继军 (2004). "铁皮石斛降血糖作用及其机制的研究." *中国中药杂志* 29(2): 160-163
- [8] 戴亚峰、郑亭、王诗文、黄跃华 (2015). "霍山石斛提取物降血脂作用研究." *安徽农业科学* 43(28): 73-74
- [9] Li X, Lin J, Gao Y and e. al (2012). "Antioxidant activity and mechanism of *Rhizoma Cimicifugae*." *Chemistry Central Journal* 6(1): 1-10
- 210 [10] Chen, X. Y., R. F. Wang and B. Liu (2015). "An update on oligosaccharides and their esters from traditional chinese medicines: chemical structures and biological activities." *Evid Based Complement Alternat Med* 2015: 512675.
- [11] Nobre, C., J. A. Teixeira and L. R. Rodrigues (2015). "New Trends and Technological Challenges in the Industrial Production and Purification of Fructo-oligosaccharides." *Crit Rev Food Sci Nutr* 55(10): 1444-1455.
- 215 [12] Suna Kim, W. K. I. K. H. (2003). "<Optimization of the extraction and purification of oligosaccharides from defatted soybean meal.pdf>." *International Journal of Food Science and Technology*.
- [13] Wang, J., H. H. Huang, Y. F. Cheng and G. M. Yang (2012). "Structure analysis and laxative effects of oligosaccharides isolated from bananas." *J Med Food* 15(10): 930-935.
- [14] 刘露、张雁、张名位、魏振承、张惠娜 (2014). "响应面法优化超声波辅助提取山药低聚糖的工艺研究.." *广东农业科技*.
- 220 [15] 《中华人民共和国药典》2015年版 一部, 1112页, 中国医药科技出版社