

DOI:10.16211/j.issn.1004-390X(n).2017.05.020

铁皮石斛多糖提取工艺及优化研究*

黄丽^{1#}, 文凤娟^{1#}, 李桂琼¹, 郭成鑫¹, 熊娇¹, 何丹¹,
周洋帆¹, 贺飞飞², 文国松^{1**}

(1. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南大学 农学院, 云南 昆明 650091)

摘要:【目的】考察铁皮石斛多糖提取方法及不同产地多糖含量的差异。【方法】采用正交试验设计筛选料液比、提取时间、提取次数对铁皮石斛多糖提取率的影响。【结果】铁皮石斛多糖提取最佳工艺条件为料液比1:40, 提取时间2 h, 提取次数3次; 分析云南省不同产地的铁皮石斛多糖含量, 结果表明景洪勐龙的含量最高, 可达到45.23%。【结论】获得铁皮石斛多糖提取的最佳工艺条件, 不同产地的铁皮石斛多糖含量存在较大差异。

关键词: 铁皮石斛; 多糖; 提取工艺

中图分类号: R 284.2; S 567.2 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X (2017) 05-0884-05

Research on Optimizing Extraction Technology of Polysaccharides from *Dendrobium officinale*

HUANG Li¹, WEN Fengjuan¹, LI Guiqiong¹, GUO Chengxin¹, XIONG Jiao¹,
HE Dan¹, ZHOU Yangfan¹, HE Feifei², WEN Guosong¹

(1. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. College of Agriculture, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: [Purpose] The purpose of this study as to optimize the extraction protocols of polysaccharides from *Dendrobium officinale* and the content difference of polysaccharides in *D. officinale* from different origins. [Method] The extraction efficiency was screened by orthogonal experiment with the ratio of raw materials to solvent, extracting time, and extracting frequency as factors. [Results] The optimal extraction technology was as followis: the ratio of raw materials to solvent was 1:40, the extracting time was 2 h, and extracting frequency was 3 times. According to the content analysis results of polysaccharides in *D. officinale* from Yunnan Province, where the content of the highest Menglong Jinghong reached 45.23%. [Conclusion] The optimum technological conditions were obtained for the extraction of polysaccharides from *D. officinale*, there are some differences in the content of polysaccharide in *D. officinale* from different habitats.

Keywords: *Dendrobium officinale*; polysaccharide; extraction technology

收稿日期: 2016-05-18 修回日期: 2016-06-08 网络出版时间: 2017-09-30 11:00:00

* 基金项目: 农业科技成果转化资金项目 (SQ2013ECF300019)。

作者简介: #对本文贡献等同, 为并列第一作者。黄丽 (1987—), 女, 云南文山人, 在读硕士研究生, 主要从事药用植物资源开发利用研究。E-mail: hl123896@163.com; 文凤娟 (1988—), 女, 湖北天门人, 在读硕士研究生, 主要从事药用植物资源开发利用研究。E-mail: 13886189904@163.com

** 通信作者Corresponding author: 文国松 (1968—), 男, 云南曲靖人, 博士, 研究员, 主要从事分子生物学和微生物技术研究。E-mail: wengs@163.com

网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20170930.1100.020.html

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 是兰科石斛属植物, 石斛属为兰科第二大属, 广泛分布于亚洲的亚热带和热带地区至大洋洲地区, 有 1 000 多种^[1]。在中国发现的有 74 种, 分布于云南、广西、四川、广东、江西等省^[2]。石斛属植物按形态、产地等可分为铁皮、金钗、霍山、黄草、环草、马鞭石斛等数十个品种, 其中以铁皮石斛最为珍贵^[3]。铁皮石斛在中国古代即作为传统中药之一, 具有滋阴清热, 益胃生津等功效^[4], 鲜茎也可直接食用, 或炖汤, 或泡茶, 或浸酒, 还可加工成干品, 即铁皮枫斗。利用现代工艺也开发出了铁皮石斛功能性饮料、复方片剂等现代产品^[3]。铁皮石斛的主要药用有效成分之一是铁皮石斛多糖, 且含量较高, 现代药理研究表明, 铁皮石斛多糖具有较强的抗肿瘤和增强免疫力等功效^[5]。近年来, 天然植物多糖在日化产品领域也有越来越多的应用, 其具有保湿、延缓衰老等功效, 同时也满足了人们在安全性、绿色环保方面的诉求, 符合天然植物草本日化用品发展的趋势, 如石斛多糖、人参多糖、海洋藻类多糖、芦荟多糖^[6-11]。本试验采取苯酚-硫酸法对云南主要铁皮石斛产地中的水溶性铁皮石斛多糖进行了含量测定^[4], 用正交试验设计对铁皮石斛多糖的提取工艺进行优化, 综合考虑料液比、提取时间、提取次数等因素对多糖提取的影响, 优选铁皮石斛多糖提取的最佳工艺条件, 旨在为铁皮石斛今后的开发与利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

铁皮石斛采自云南省不同产地, 共计 13 个 (表 1)。无水葡萄糖对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 110833-201205); 硫酸 (四川西陇化工有限公司, 批号: 140716); 苯酚 (西陇化工有限公司, 批号: 091016); 无水乙醇 (重庆川东化工 (集团) 有限公司, 批号: 20150401), 所用试剂均为分析纯, 水为去离子水。

岛津 UV2450 紫外可见分光光度计 (岛津企业管理 (中国) 有限公司); SC-2556 低速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

表 1 石斛产地 (品种) 及编号

Tab. 1 Origins (varieties) and No. of the samples			
编号 No.	产地 (品种) origin (variety)	编号 No.	产地 (品种) origin (variety)
S1	普洱宁洱	S8	景洪勐罕
S2	普洱墨江	S9	红河蒙自
S3	保山昌宁	S10	红河屏边
S4	保山腾冲	S11	西双版纳勐海
S5	保山龙陵	S12	德宏瑞丽
S6	景洪勐龙	S13	德宏潞西
S7	景洪嘎洒	—	—

1.2 方法

1.2.1 多糖含量测定

石斛多糖含量测定采用 2015 年版《中国药典》铁皮石斛多糖含量测定方法^[4]。

1.2.1.1 标准曲线的绘制

称取 105 °C 干燥至恒重的无水葡萄糖适量, 加水溶解并稀释制成每 1 mL 中含 0.091 8 mg 的溶液, 即得对照品溶液。量取对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 分别置于 10 mL 具塞试管中并加水补至 1.0 mL, 加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 摇匀, 再加入硫酸 5 mL, 摇匀, 置沸水浴中加热 20 min, 取出, 冰浴中冷却 5 min, 以相应试剂为空白对照, 在 488 nm 的波长处测定吸光度。

1.2.1.2 供试品溶液的制备

称取石斛药粉约 0.3 g, 按照单因素试验及正交设计方案提取, 过滤, 合并滤液, 定容至 250 mL, 摇匀。精密量取 2 mL 提取液于 15 mL 离心管中, 加入无水乙醇 10 mL, 冷藏 1 h, 取出, 离心 (转速为 4 000 r/min) 20 min, 弃去上清液 (必要时过滤), 沉淀加 80% 乙醇洗涤 2 次, 每次 8 mL, 离心, 弃去上清液, 沉淀加热水溶解, 转移至 25 mL 容量瓶中, 放冷, 加水补至刻度, 摇匀, 即得。

1.2.1.3 测定方法

量取供试品溶液 1 mL, 置于 10 mL 具塞试管中, 按照标准曲线制备项下的方法, 加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 测定吸光度, 从标准曲线上按供试品溶液中无水葡萄糖的量, 计算得到最终结果。

1.2.2 单因素试验

设置单因素试验, 考察料液比、提取时间及提取次数对铁皮石斛多糖提取的影响, 所用药材为德宏瑞丽。

1.2.2.1 料液比

称取 0.3 g 铁皮石斛 4 份, 考察料液比 1:20、

1:40、1:60、1:80 对铁皮石斛多糖提取效率的影响, 提取时间 2 h, 提取次数 1 次, 按 1.2.1.3 节方法操作, 测定含量。在上述条件下, 每份平行 3 次, 结果取 3 次测定的平均值。

1.2.2.2 提取时间

称取 0.3 g 铁皮石斛 4 份, 考察提取时间 1、1.5、2、2.5 h 对铁皮石斛多糖提取效率的影响, 料液比 1:40, 提取次数 1 次, 按 1.2.1.3 节方法操作, 测定含量。在上述条件下, 每份平行 3 次, 结果取 3 次测定的平均值。

1.2.2.3 提取次数

称取 0.3 g 铁皮石斛 4 份, 考察提取次数分别为 1、2、3、4 次对铁皮石斛多糖提取效率的影响, 料液比 1:40, 提取时间 2 h, 按 1.2.1.3 节方法操作, 测定含量。在上述条件下, 每份平行 3 次, 结果取 3 次测定的平均值。

1.2.3 正交试验

在单因素试验的基础上, 利用正交试验设计对铁皮石斛多糖提取条件进行优化。本试验为 3 因素 3 水平试验, 选用正交表 $L_9 (3^4)$ 进行设计, 试验设计及所选用因素和水平见表 2, 所用药材为德宏瑞丽。

表 2 正交试验表 $L_9 (3^4)$
Tab. 2 $L_9 (3^4)$ orthogonal test design

水平 level	A	B	C
	料液比 (g:mL) solid-liquid ratio	提取时间/h extraction time	提取次数 extraction frequency
1	1:20	1	1
2	1:40	1.5	2
3	1:60	2	3

1.2.4 数据分析

采用 Excel 2007 版进行数据整理, 正交试验的方差分析在 SPSS 17.0 中实现, 选择 General Linear Model-Univariate 进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线的绘制

以吸光度为纵坐标 y , 葡萄糖浓度为横坐标 x , 绘制标准曲线 (图 1), 得到线性回归方程 $y = 9.8324x - 0.0037$, 相关系数 $r^2 = 0.9998$ 。结果表明: 葡萄糖质量浓度在 0.0184 ~ 0.0918 mg/mL 范围内, 线性关系良好。

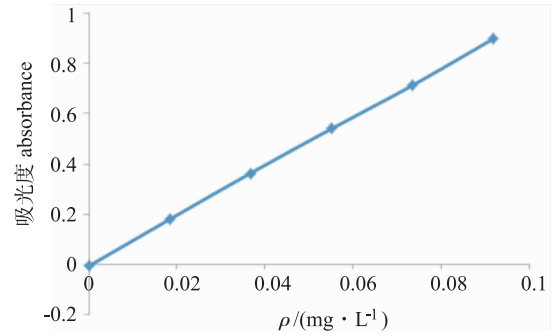


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Standard curve of glucose control solution

2.2 单因素试验结果

单因素试验结果分别见表 3 ~ 5。

表 3 料液比对铁皮石斛多糖提取率的影响

Tab. 3 The relationship between solid-liquid ratio and extraction efficiency of polysaccharides

料液比 (g:mL) solid-liquid ratio	提取时间/h extraction time	提取次数 extraction frequency	提取率/% extraction rate
1:20	2	1	25.11
1:40	2	1	27.12
1:60	2	1	28.43
1:80	2	1	28.24

表 4 提取时间对铁皮石斛多糖提取率的影响

Tab. 4 The relationship between extraction time and extraction efficiency of polysaccharides

提取时间/h extraction time	料液比 (g:mL) solid-liquid ratio	提取次数 extraction frequency	提取率/% extraction rate
1.0	1:40	1	25.32
1.5	1:40	1	26.61
2.0	1:40	1	27.12
2.5	1:40	1	27.11

表 5 提取次数对铁皮石斛提取率的影响

Tab. 5 The relationship between extraction frequency and extraction efficiency of polysaccharides

提取次数 extraction frequency	料液比 (g:mL) solid-liquid ratio	提取时间/ hextraction frequency	提取率/% extraction rate
1	1:40	2	27.12
2	1:40	2	29.23
3	1:40	2	32.60
4	1:40	2	32.66

料液比、提取时间及提取次数均能显著影响铁皮石斛多糖提取的效率。随着溶剂用量的提高会增加多糖的得率, 在 1:60 时多糖提取率最高, 继续增大溶剂用量其提取率反而降低。不同的提取时间与不同提取次数单因素试验结果相似, 随着提取次数和时间的增加, 多糖的提取率增加, 但提取时间达到 2 h 以后, 溶出的多糖增加不明显, 而提取次数大于 3 次以后, 提取率增加不明显。

2.3 正交试验结果

正交试验结果及方差分析见表 6~7。

表 6 正交试验结果

Tab. 6 $L_9(3^4)$ orthogonal test results

处理 treatment	料液比 (g:mL) solid-liquid ratio	提取时间/h extraction time	提取次数 extraction frequency	提取率/% extraction rate
1	1:20	1.0	1	23.13
2	1:20	1.5	2	28.42
3	1:20	2.0	3	32.24
4	1:40	1.0	2	29.04
5	1:40	1.5	3	32.58
6	1:40	2.0	1	28.75
7	1:60	1.0	3	30.72
8	1:60	1.5	1	24.87
9	1:60	2.0	2	32.89
K1	83.79	82.89	76.75	
K2	90.37	85.87	90.35	
K3	88.48	93.88	95.54	
R	6.58	10.99	18.79	

表 7 方差分析表

Tab. 7 Variance analysis of orthogonal test

方差来源 source of variation	离均差平方和 sum ofsquares	自由度 degreeof freedom	方差 mean of square	F 值 F value	显著性 显著性 significance
A	7.6516	2	3.8258	7.2229	>0.05
B	21.5356	2	10.7678	20.3290	<0.05
C	62.7734	2	31.3867	59.2562	<0.05
误差 error	1.0594	2	0.5297		
总和 total	93.0200	8		$F_{0.05(2,2)}=19.00$; $F_{0.01(2,2)}=99.00$	

通过正交试验结果可见: 各因素对铁皮石斛多糖提取的影响大小为 C>B>A, 即 C 因素(提取次数)影响最大, 其次为 B 因素(提取时间), A

因素(料液比)影响最小。石斛多糖提取的各因素的最佳组合为 A2B3C3, 即提取料液比为 1:40, 提取时间 2 h, 提取次数 3 次。采用最佳提取工艺 A2B3C3 进行 3 次重复试验, 获得的多糖含量平均为 32.98%, 说明工艺稳定, 可行。

2.4 不同产地铁皮石斛多糖含量测定

在对铁皮石斛多糖提取工艺进行优化的基础上, 按 2.1 节工艺条件对不同产地铁皮石斛的多糖含量进行含量测定, 旨在为不同产地石斛的质量评价提供依据和方法, 结果如表 8 所示。

检测结果表明: 干品中石斛多糖含量除 S8(景洪勐罕)外均大于 30%, 均符合中国药典规定不低于 25% 标准, 方差分析表明不同产地铁皮石斛多糖含量存在差异。S8(景洪勐罕)产地多糖含量仅 23.21%, 低于药典标准。而 S1(普洱宁洱)、S2(普洱墨江)、S3(保山昌宁)、S6(景洪勐龙)和 S7(景洪嘎洒)5 个产地的铁皮石斛多糖含量较高, 均大于 40%, 远高于药典标准。

表 8 不同产地铁皮石斛多糖含量(w)

Tab. 8 Dendrobium polysaccharide content (w) of different habitats

样品编号 No.	w/%	RSD/%
S1	40.27 ± 3.04 cd	4.63
S2	40.19 ± 0.95 cd	2.38
S3	42.81 ± 1.85 de	3.17
S4	34.08 ± 1.42 b	3.42
S5	36.28 ± 0.08 bc	1.24
S6	45.23 ± 2.06 e	3.19
S7	42.52 ± 1.52 de	2.51
S8	23.21 ± 0.80 a	2.85
S9	33.49 ± 0.12 b	2.16
S10	34.23 ± 0.48 b	2.32
S11	34.18 ± 0.52 b	2.51
S12	32.85 ± 1.12 b	2.35
S13	33.85 ± 0.86 b	3.71

注: 表中不同小写字母表示差异达 5% 显著水平。

Note: Different lowercase letters in the table indicate significant difference ($P < 0.05$).

3 讨论

铁皮石斛保湿及营养活性物质主要为多糖和

氨基酸类物质, 多糖类物质是生命代谢不可缺少的重要物质, 具有增强免疫特性、抗肿瘤、抗病毒、抗凝血、抗辐射和延缓衰老等生物学功能和极其优秀的吸湿保湿性能^[12], 石斛多糖在功能食品、药品及日化产品领域具有较好应用前景。

在传统的中药材提取工艺中, 料液比多在 1:10 左右, 而由于铁皮石斛中多糖黏稠且含量较高, 采用传统的提取方法, 多糖则无法顺利进行过滤, 而挤压方式过滤难以进行产业化。本研究在石斛多糖提取中, 料液比选择 1:20 ~ 1:60, 并对料液比进行优化, 以料液比 1:40 多糖提取率最佳, 且提取过程中易于过滤, 符合产业化要求。提取次数和提取时间对铁皮石斛多糖提取率的影响较大, 其中提取次数是主要的影响因素, 在生产中应多次提取; 其中提取 2 h 的效果明显优于 1.5 h 和 1 h。考虑到生产效率和成本问题, 提取 2 h 和 3 次提取分别为最优提取时间和提取次数。

不同产地铁皮石斛多糖含量, 以景洪勐龙最高, 景洪勐罕最低。产地相距较远的样品间多糖含量存在差异可能是由于铁皮石斛自然种群存在遗传分化, 而产地相距较近的样品间多糖含量存在较大差异可能是由于生态环境及生物因素(如虫害、群落密度等)的影响。因此, 影响植物类药材品质的因素很复杂, 如种质因素和生境因素、生物因素和非生物因素、物理因素和化学因素^[13-14]。以石斛多糖含量作为考量标准, 本试验既为食品、药品和保健品研究开发提供材料依据, 同时也为不同产地间的石斛多糖药效评价研究奠定了基础。

4 结论

通过正交试验优化铁皮石斛多糖的提取工艺, 提取次数对铁皮石斛多糖提取的影响最大, 最佳工艺参数为料液比 1:40, 提取时间 2 h, 提取次数 3 次。对最佳提取工艺进行重复验证, 该工艺稳定可行, 可用于铁皮石斛多糖的提取。不同产地铁皮石斛多糖含量存在较大差异, 多糖含量除 S8 (景洪勐罕含量 23.21%) 外均大于 30%, 均符合中国药典标准规定不低于 25%。

[参考文献]

- [1] XING X H, CUI S W, NIE S P, et al. A review of isolation process, structural characteristics, and bioactivities of water-soluble polysaccharides from *Dendrobium* plants [J]. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2013, 1 (2): 131.
- [2] LU J J, ZHAO H Y, SUO N N, et al. Genetic linkage maps of *Dendrobium moniliforme* and *D. officinale* based on EST-SSR, SRAP, ISSR and RAPD markers [J]. *Scientia Horticulturae*, 2012, 137 (4): 1.
- [3] 聂少平, 蔡海兰. 铁皮石斛活性成分及其功能研究进展 [J]. *食品科学*, 2012, 33 (23): 356.
- [4] 国家药典委员会. 中国药典 (一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [5] 王世林, 郑光植, 何静波, 等. 黑节草多糖的研究 [J]. *云南植物研究*, 1988, 10 (4): 389.
- [6] 刘敏, 张云, 崔岩. 多糖——一种新型的化妆品保湿剂 [J]. *中国洗涤用品工业*, 2010 (1): 69.
- [7] 周紫燕, 王坦, 洪晓鹏. 抗氧化天然活性多糖 [J]. *日用化学品科学*, 2012, 35 (7): 24.
- [8] 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 (3): 420.
- [9] KIM H J, KIM M H, BYON Y Y, et al. Radioprotective effects of an acidic polysaccharide of *Panax ginseng* on bone marrow cells [J]. *Journal of Veterinary Science*, 2007, 8 (1): 39.
- [10] 武晓丹, 邹翔. 海洋藻类多糖的药理研究 [J]. *哈尔滨商业大学学报 (自然科学版)*, 2005, 21 (2): 136.
- [11] 任海毅, 董银卯, 孟宏, 等. 芦荟保湿活性成分筛选及皮肤适应性研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19 (3): 252.
- [12] 刘颖, 金宏, 程义勇. 多糖生物活性及其作用机制研究进展 [J]. *中国公共卫生*, 2006, 22 (5): 627.
- [13] 萧凤回, 郭玉姣, 王仕玉, 等. 云南主要药用石斛种植区域调查及适宜性初步评价 [J]. *云南农业大学学报 (自然科学)*, 2008, 23 (4): 498.
- [14] 鲁芹飞. 铁皮石斛质量评价及干燥工艺研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014: 79.