

铁皮石斛低温干燥抑制其水溶性多糖的聚合反应

邢丽, 马厚雨, 江凌, 缪冶炼

(南京工业大学食品与轻工学院, 江苏南京 211800)

摘要: 本研究旨在探明干燥温度对铁皮石斛中多糖分子结构和抗氧化活性的影响。分别以新鲜铁皮石斛、以及 60、100 和 140 °C 热风干燥铁皮石斛为实验材料, 通过提取和纯化制备水溶性石斛多糖 FDOP、60 DOP、100 DOP 和 140 DOP, 然后对石斛多糖进行分子结构分析和抗氧化活性测定。FDOP 和 60 DOP 的还原端含量分别为 1.82%、1.70%。然而, 100 DOP 和 140 DOP 的还原端含量分别降低至 1.42%、1.10%。各铁皮石斛多糖主要由甘露糖和葡萄糖组成, 单糖摩尔比与干燥温度之间无明显的关联。随着干燥温度的升高, 石斛多糖的分子量分布曲线向大分子量方向偏移。FDOP、60 DOP、100 DOP 和 140 DOP 中分子量 $10^3 \sim 10^6$ u 的多糖组分质量比分别为 70.68%、67.70%、62.24% 和 58.11%。在 UV 光谱的 280 nm 处, FDOP、60 DOP、100 DOP 没有吸收峰, 而 140 DOP 有吸收峰。分子量 $10^3 \sim 10^6$ u 的多糖组分、还原端较多的铁皮石斛多糖具有较大的自由基清除能力和还原力。在铁皮石斛干燥中, 60 °C 的温度有利于抑制多糖的聚合反应, 保持多糖的抗氧化活性。本研究为石斛功能食品的生产及利用提供了技术数据和理论依据。

关键词: 铁皮石斛; 多糖; 干燥温度; 分子结构; 抗氧化活性

文章篇号: 1673-9078(2020)07-88-95

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.7.0010

Low-temperature Drying of *Dendrobium officinale* Inhibit Polymerization of Water-soluble Polysaccharides

XING Li, MA Hou-yu, JIANG Ling, MIAO Ye-lian

(College of Food Science and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 211800, China)

Abstract: The present study was carried out to investigate the effects of drying temperature on the molecular structure and antioxidant activity of the polysaccharides in *Dendrobium officinale*. Four types of water-soluble polysaccharides from *D. officinale*, i.e., FDOP, 60 DOP, 100 DOP and 140 DOP, were prepared through extraction and purification after hot air drying of fresh *D. officinale*, and *D. officinale* at 60 °C, 100 °C, 140 °C, respectively. Molecular structure and antioxidant activity of the polysaccharides from *D. officinale* were analyzed. It was found that the contents of the reducing end were 1.82% and 1.70% for FDOP and 60 DOP, respectively, but decreased to 1.42% for 100 DOP and 1.10% for 140 DOP. Each *D. officinale* polysaccharide was composed mainly of mannose and glucose. No obvious correlation was found between drying temperature and the molar ratio of monosaccharides. As the drying temperature increased, the molecular weight distribution curve of *D. officinale* polysaccharides shifted towards high molecular weight. The mass ratios of the polysaccharide fractions within the molecular weight range of $10^3 \sim 10^6$ u were 70.68%, 67.70%, 62.24% and 58.11%, respectively, for FDOP, 60 DOP, 100 DOP and 140 DOP. At 280 nm of the UV spectra, 140 DOP had an absorption peak whilst FDOP, 60 DOP and 100 DOP hadn't. The polysaccharide constituents with the molecular weights in the range of $10^3 \sim 10^6$ u and containing more reducing ends showed higher free radical scavenging ability and reducing power. During the drying of *Dendrobium officinale*, the drying temperature set at 60 °C facilitated the suppression of polymerization reaction

引文格式:

邢丽,马厚雨,江凌,等.铁皮石斛低温干燥抑制其水溶性多糖的聚合反应[J].现代食品科技,2020,36(7):88-95

XING Li, MA Hou-yu, JIANG Ling, et al. Low-temperature drying of *Dendrobium officinale* inhibit polymerization of water-soluble polysaccharides [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(7): 88-95

收稿日期: 2020-01-05

基金项目: 江苏省重点研发计划社会发展项目 (BE2016765); 国家重点研发计划项目 (2017YFC1600404)

作者简介: 邢丽 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能性食品

通讯作者: 缪冶炼 (1958-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物活性成分及功能性食品

while retaining the antioxidant activity of its polysaccharides. The present study provides technical data and theoretical basis for the production and utilization of *D. officinale*-containing functional foods.

Key words: *Dendrobium officinale*; polysaccharide; drying temperature; molecular structure; antioxidant activity

石斛多糖具有增强免疫力、抗肿瘤、抗氧化和降血糖^[1,2]等生理活性。其中,石斛多糖的抗氧化活性与单糖组成、糖苷键类型、空间构型、多糖链分支度等分子结构有关^[3,4]。Pan 等^[2]采用沸水浸提和醇沉的方法,分别从霍山石斛、铁皮石斛、金钗石斛和鼓槌石斛中获得石斛多糖。通过小鼠体内试验发现,连续喂食石斛多糖 12 天后,氧化损伤小鼠肝脏和肾脏中超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的酶活、以及谷胱甘肽(GSH)的含量有所提高;不同石斛多糖的黏度和单糖组成有明显差异,对氧化损伤的减轻作用也有所不同。Xing 等^[5]采用热水浸提和分级醇沉的方法,从铁皮石斛分离出 DOP-40、DOP-50、DOP-60 和 DOP-70 等 4 种多糖。这些石斛多糖的 D-甘露糖和 D-葡萄糖的摩尔比不同,重均分子量分别为 999、657、243 和 50 ku。体外抗氧化实验中,抗氧化活性按 DOP-70、DOP-40、DOP-60、DOP-50 的顺序依次减弱。Luo 等^[4]通过热水浸提、醇沉分离、以及纤维素柱和凝胶柱纯化,以铁皮石斛为原料制备石斛多糖 DOP。该 DOP 主要由甘露糖和葡萄糖组成,重均分子量为 8.5 ku,含有 2-O-乙酰氨基葡萄糖、(1→4)- β -D-甘露糖和(1→4)- β -D-葡萄糖残基,并具有良好的 DPPH 自由基和羟自由基清除能力。与石斛多糖类似,黑木耳多糖(Sp)的抗氧化活性也随分子量而变化。抗氧化活性最强的是分子量小于 30 ku 的黑木耳多糖(Sp3),其次是分子量为 30 ku~100 ku 的黑木耳多糖(Sp2)和分子量大于 100 ku 的黑木耳多糖^[6](Sp1)。

干燥加工能延长食品的保质期,减小食品材料的体积和重量。然而,干燥也会影响食品材料的组织结构、及其多糖的理化性质和抗氧化活性。Meng 等^[7]分别采用自然晾干、热风干燥(60℃)、真空干燥(60℃, 100 Pa)、红外干燥(60℃)和冷冻干燥(-60℃)方式对新鲜铁皮石斛颗粒(长 1 cm)进行干燥。铁皮石斛颗粒中的多糖、总酚、总黄酮等活性成分的含量均随干燥方式的不同而变化。热风干燥能较好地保留铁皮石斛多糖及其自由基清除能力。本文作者的前期研究结果表明,在 60~100℃的干燥温度范围内,干燥促进了铁皮石斛颗粒中多糖的溶出,较低的干燥温度有利于铁皮石斛颗粒保持组织结构,减少材料收缩,抑制美拉德反应和焦糖化反应,同时产生一定的内部空隙,从而促进其多糖的溶出^[8]。然而,干燥温度对铁皮石斛中多糖的化学组成、分子结构及

抗氧化活性有何影响?干燥后,铁皮石斛多糖抗氧化活性的构效关系怎样?这些问题还有待研究。

本研究旨在探明干燥温度对铁皮石斛中多糖分子结构和抗氧化活性的影响,为石斛功能食品生产及利用提供理论依据。以新鲜铁皮石斛茎为原料,通过 60、100 和 140℃热风干燥制备干燥铁皮石斛,进行石斛多糖的提取和纯化,然后对石斛多糖进行分子结构分析和抗氧化活性测定,讨论石斛多糖抗氧化活性与分子结构之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜铁皮石斛茎原料由南京某公司大棚生产,3 年生,直径为 4~6 mm。新鲜铁皮石斛茎采摘后保存于 5℃低温库中,使用前用剪刀剪成长度约为 5 mm 的颗粒。

无水乙醇、浓硫酸、苯酚、葡萄糖、盐酸、氢氧化钠、三氯乙酸、铁氰化钾、十二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠、七水合硫酸亚铁、三氯化铁、四硼酸钠、焦性没食子酸、30%过氧化氢、咪唑、结晶牛血清蛋白、抗坏血酸(Vc)、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)(纯度≥99%)均为分析纯,购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;葡聚糖标准品(20400、34000、62900、133100、310200、745000 u),购自上海麦克林生化科技有限公司;乙腈、甲醇均为色谱级,购于上海沪试化工有限公司;1,1-二苯基-3-硝基苯肼(DPPH)、鼠李糖(Rha)、木糖(Xyl)、甘露糖(Man)和葡萄糖(Glc)均为标准品,购自美国 Sigma 公司;DEAE-52 纤维素,购自上海源叶生物有限公司;Sephadex G-100 葡聚糖凝胶,购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

GXZ-9140 电热恒温鼓风干燥箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;FZ102 微型植物粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;UV-1900PC 紫外分光光度计,翱艺仪器(上海)有限公司;FD-1A-50 冷冻干燥机,无锡沃信仪器制造有限公司;Waters 1515 凝胶渗透色谱仪,美国 Waters 有限公司;LC-20AT 高效液相色谱仪,岛津企业管理(中国)有限公司;Nicolet iS10

傅立叶变换红外光谱仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。BSZ-100 部分自动收集器, 上海嘉鹏科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 铁皮石斛的干燥

取适量的新鲜铁皮石斛颗粒平铺于培养皿中, 分别在 60、100 和 140 °C 的恒温鼓风干燥箱中干燥 28.5、3.0 和 1.0 h, 获得含水率约为 12% 的干燥铁皮石斛, 粉碎后过 60 目筛作为试样, 新鲜铁皮石斛颗粒用研钵捣碎后作为试样^[8]。

1.3.2 石斛多糖的提取和纯化

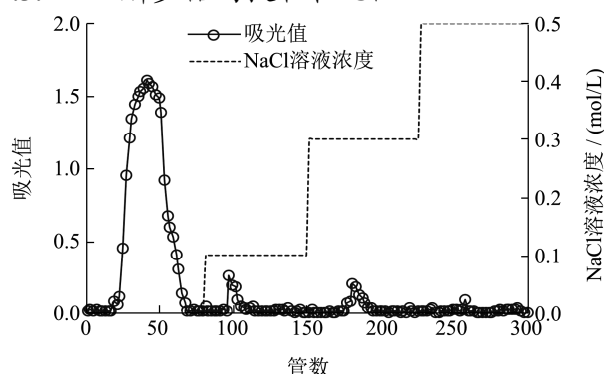


图1 水溶性铁皮石斛粗多糖 DEAE-52 纤维素阴离子交换柱洗脱曲线的一例(新鲜铁皮石斛)

Fig.1 An example of the elution curves of crude water-soluble *D. officinale* polysaccharides on DEAE-52 cellulose anion exchange column (fresh *D. officinale*)

石斛多糖的提取和纯化参考文献方法^[4]。取 25 g 铁皮石斛试样置于烧杯中, 加入 85% 乙醇(料液比 1:10)脱脂。收集残渣, 60 °C 热水浸提 6 h。冷却至室温后, 5000 r/min 离心 10 min, 收集浸提液。浸提和离心操作重复 3 次, 合并浸提液, 减压浓缩至 1/4 倍体积。用 Sevag 试剂(氯仿:正丁醇=4:1)脱蛋白, 重复 3 次。然后, 在室温条件下用去离子水透析 48 h, 缓慢加入 4 倍体积无水乙醇, 于 4 °C 冰箱静置过夜, 取沉淀物, 冷冻干燥至恒重, 获得粗多糖。

将粗多糖配制成浓度为 100 mg/mL 的粗多糖溶液。取 5 mL 粗多糖溶液过 0.45 μm 滤膜, 加入已平衡好的 DEAE-52 纤维素阴离子交换柱(2.6×100 cm)内, 分别用 0、0.1、0.3、0.5 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 用部分自动收集器收集洗脱液(每管 6 mL), 采用苯酚-硫酸法^[9]测定洗脱液的总糖浓度。图 1 表示水溶性铁皮石斛粗多糖 DEAE-52 纤维素柱洗脱曲线的一例(新鲜铁皮石斛)。3 种不同干燥温度的水溶性铁皮石斛粗多糖洗脱曲线也与图 1 基本相似。粗多糖经 DEAE-52 纤维素柱层析分为 1 个去离

子水洗脱的组分、1 个 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱的组分和 1 个 0.3 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱的组分, 其中去离子水洗脱的多糖组分占据了水溶性铁皮石斛多糖的绝大部分。因此, 本研究将去离子水的的多糖洗脱液合并, 进行浓缩、透析和冷冻干燥, 获得初步纯化多糖。DEAE-52 纤维素柱层析后, 将初步纯化多糖配制成浓度为 100 mg/mL 的多糖溶液; 取 5 mL 初步纯化多糖溶液过 0.45 μm 滤膜, 加入已平衡好的 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱(1.6×60 cm)内, 用去离子水洗脱, 流速为 0.5 mL/min, 用部分自动收集器收集洗脱液(每管 3 mL), 测定洗脱液的总糖浓度; 将所有含糖洗脱液合并, 并进行浓缩、透析和冷冻干燥, 获得纯化铁皮石斛多糖。从新鲜铁皮石斛、以及 60、100 和 140 °C 干燥铁皮石斛中提取和纯化的多糖分别命名为 FDOP、60 DOP、100 DOP 和 140 DOP。

1.3.3 石斛多糖的分子结构分析

1.3.3.1 化学组成分析

铁皮石斛多糖 FDOP、60 DOP、100 DOP 和 140 DOP 的总糖含量采用苯酚-硫酸法^[9]进行测定; 糖醛酸含量采用硫酸-咔唑法^[10]进行测定; 蛋白质含量采用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[11]进行测定; 还原端含量采用 DNS 染色法^[12]进行测定。

1.3.3.2 分子量分布测定

采用高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)测定铁皮石斛多糖的分子量分布^[4]。色谱条件: Waters 1515 凝胶渗透色谱仪配备有 waters 2414 示差检测器和凝胶色谱柱, 凝胶色谱柱采用 Ultrahydrogel TM 1000、250 和 120 (7.8×300 mm) 三柱串联; 流动相为超纯水, 流速为 1 mL/min, 柱温为 60 °C, 进样量为 40 μL。以分子量为 20400、34000、62900、133100、310200、745000 u 的葡聚糖为标准品, 标准曲线方程如式(1)所示:

$$\lg(M_w) = 3.149t - 27.253 (r^2 = 0.998) \quad (1)$$

式中, M_w 为葡聚糖标准品分子量, u; t 为保留时间, min。

铁皮石斛多糖的重均分子量(M_w , u)按式(2)计算:

$$M_w = \frac{\sum C_i \times M_{wi}}{\sum C_i} \quad (2)$$

式中, C_i 为多糖组分 i 的浓度, 在数值上等于该物质在凝胶色谱图上的信号强度, mV; M_{wi} 为多糖组分 i 的分子量, u。

1.3.3.3 单糖组成分析

采用 PMP 柱前衍生液相色谱法测定铁皮石斛多糖的单糖组成^[13,14]。取 1 mL 的 1 g/L 铁皮石斛多糖溶液于具塞试管中, 加入 1 mL 的 4 mol/L 三氟乙酸, 于 110 °C 烘箱中水解 2 h。待试管冷却至室温后, 减压蒸

干。向试管中加入 500 μL 甲醇, 于 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅上蒸干, 重复 3 次。向试管中加入 1 mL 去离子水, 获得多糖水解溶液。取 800 μL 多糖水解溶液于 5 mL 具塞试管中, 加入 480 μL 的 0.3 mol/L NaOH 溶液, 480 μL 的 0.25 mol/L PMP-甲醇溶液, 于 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅上保温 2 h。取出试管, 冷却至室温, 加入 480 μL 的 0.3 mol/L HCl 中和反应体系, 再加入 2 mL 氯仿充分振荡, 重复萃取 3 次。上层水溶液过 0.45 μm 滤膜后, 待测。标准单糖为鼠李糖、木糖、甘露糖和葡萄糖, 标品处理方法同上。

色谱条件: LC-20AT 高效液相色谱仪上配备有 SPD-20A 紫外检测器和 C-18 色谱柱 (5 μm , 4.6 $\times$ 250 mm); 流动相为 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.7) - 乙腈 (体积比为 82:18), 流速为 1 mL/min, 检测波长为 250 nm, 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 20 μL 。

1.3.3.4 UV 和 IR 光谱分析

UV 光谱分析: 以浓度为 5.0 mg/mL 的铁皮石斛多糖溶液为试样, 在 190~500 nm 范围内进行紫外光谱扫描。

IR 光谱分析: 称取 1.0 mg 铁皮石斛多糖试样于玛瑙研钵中, 研细后与适量的 KBr 粉末混合均匀, 用压片机压成薄片, 于 4000~500 cm^{-1} 范围内进行红外光谱分析^[7]。

1.3.4 石斛多糖的抗氧化活性测定

1.3.4.1 羟自由基清除能力测定

铁皮石斛多糖的羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 清除能力根据文献方法^[5,15]进行测定。在样品管中加入 1 mL 的 9 mmol/L FeSO_4 溶液、1 mL 的 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液、1 mL 的多糖溶液和 1 mL 的 6 mmol/L H_2O_2 溶液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅上保温 1 h。然后, 冷却至室温, 在波长 510 nm 处测定样品管中测试液的吸光值。同时, 以 1 mL 去离子水代替多糖溶液作为空白管, 以 1 mL 无水乙醇代替水杨酸-乙醇溶液作为对照管, 在 510 nm 处测定空白管和对照管中测试液的吸光值。多糖溶液的羟自由基清除率 (η_{OH} , %) 按式 (3) 计算:

$$\eta_{\text{OH}} = \frac{A_b - (A_s - A_c)}{A_b} \times 100\% \quad (3)$$

式中, A_s 、 A_b 和 A_c 分别为样品管、空白管和对照管中测试液在波长 510 nm 处的吸光值。抗坏血酸 (Vc) 为阳性对照。

1.3.4.2 超氧阴离子自由基清除能力测定

铁皮石斛多糖的超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 清除能力根据文献方法^[5,16]进行测定。在样品管中加入 4.5 mL Tris-HCl 溶液 (0.05 mol/L, pH 8.2), 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 保温 20 min。加入 1 mL 多糖溶液、0.4 mL 的 25 mmol/L 邻苯三酚溶液, 混匀后在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 5 min。然后,

加入 1 mL 的 8 mmol/L 盐酸溶液终止反应, 在 299 nm 处测定样品管中测试液的吸光值。同时, 保持其他试剂不变, 以去离子水代替多糖溶液作为空白管, 以去离子水代替邻苯三酚溶液作为对照管, 在 299 nm 处测定空白管和对照管中测试液的吸光值。多糖溶液的超氧阴离子自由基清除率 (η_{O_2} , %) 按式 (4) 计算:

$$\eta_{\text{O}_2} = \frac{A_b - (A_s - A_c)}{A_b} \times 100\% \quad (4)$$

式中, A_s 、 A_b 和 A_c 分别是样品管、空白管和对照管中测试液在波长 299 nm 处的吸光值。使用 Vc 为阳性对照。

1.3.4.3 还原力测定

铁皮石斛多糖的还原力根据文献方法^[5,15]进行测定。在样品管中加入 1 mL 多糖溶液、1 mL 的 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.6) 和 0.5 mL 的 1% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液; 在空白管中加入 1 mL 去离子水、1 mL 的 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.6) 和 0.5 mL 的 1% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液。在波长 700 nm 处测定样品管、空白管中测试液的吸光值。多糖溶液的还原力 (即对 Fe^{3+} 的还原能力) 用样品管和对照管中测试液吸光值之差表示。使用 Vc 为阳性对照。

1.3.5 统计分析

铁皮石斛多糖的总糖、糖醛酸、蛋白质和还原端含量测定、以及多糖抗氧化能力测定重复 3 次, 结果以平均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD) 表示。采用软件 SPSS 20 进行单因素方差分析, $p < 0.05$ 为样本平均值之间存在显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 水溶性铁皮石斛多糖的分子结构特征

2.1.1 化学组成

水溶性铁皮石斛多糖 FDOP、60 DOP、100 DOP 和 140DOP 的总糖、糖醛酸、还原端和蛋白质含量如表 1 所示。各铁皮石斛多糖的总糖含量、糖醛酸含量分别为 91.51%~92.32%、10.29%~11.24%, 均不存在显著性差异 ($p > 0.05$), 这说明干燥温度对总糖和糖醛酸含量没有显著影响。各铁皮石斛多糖仅含有极少的蛋白质含量 (0.05%~0.10%)。与 FDOP、60 DOP 相比, 100 DOP 和 140 DOP 的蛋白质含量有所增加, 这可能是由于干燥温度较高时铁皮石斛中的蛋白质与多糖发生了美拉德反应^[8]。另一方面, FDOP 和 60 DOP 的还原端含量分别为 1.82%、1.70%, 两者基本相同 ($p > 0.05$)。然而, 100 DOP 和 140 DOP 的还原端含量分别降低至 1.42%、1.10%, 两者差异显著 ($p < 0.05$)。还原端含量随着干燥温度的升高而降低, 这可能是因

为多糖在铁皮石斛干燥过程中发生了聚合反应^[17]。

表 1 水溶性铁皮石斛多糖的总糖、糖醛酸、还原端和蛋白质含量（%，平均值±标准偏差）

Table 1 Content of total sugar, uronic acid, reducing end and protein in the water-soluble *D. officinale* polysaccharides (%，Mean±SD)

	总糖	糖醛酸	还原端	蛋白质
FDOP	92.32±3.60 ^a	11.24±0.56 ^a	1.82±0.10 ^a	0.05±0.00 ^c
60DOP	91.94±2.52 ^a	11.00±0.67 ^a	1.70±0.04 ^a	0.05±0.01 ^c
100DOP	91.51±2.22 ^a	10.29±0.44 ^a	1.42±0.11 ^b	0.07±0.01 ^b
140DOP	92.25±2.19 ^a	10.73±0.41 ^a	1.10±0.12 ^c	0.10±0.00 ^a

注：同一列中不同字母代表有显著性差异（*p*<0.05）。

2.1.2 分子量分布

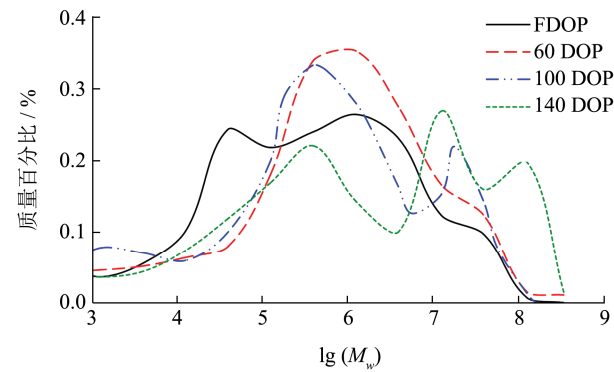


图 2 水溶性铁皮石斛多糖的分子量分布

Fig.2 Molecular weight distribution of water-soluble *D. officinale* polysaccharides

图 2 表示水溶性铁皮石斛多糖的分子量分布。FDOP 中多糖组分的分子量集中在 3.98×10^4 和 1.58×10^6 u 附近。60 DOP 中各多糖组分的分子量集中在 1.00×10^6 u 附近。100 DOP 中各多糖组分的分子量

集中在 6.31×10^5 和 1.99×10^7 u 附近。140 DOP 中各多糖组分的分子量集中在 6.31×10^5 、 1.99×10^7 和 1.00×10^8 u 附近。随着干燥温度的升高，分子量分布曲线向大分子量方向（右侧）偏移。

植物多糖的分子量对抗氧化活性具有重要影响。据文献报道，分子量为 $4.9\times10^4\sim9.0\times10^5$ u 的山苦茶多糖^[13]、以及分子量为 $10^3\sim10^6$ u 的石斛多糖^[5,18]具有较强的抗氧化活性。因此，本研究将铁皮石斛多糖按照 $10^3\text{ u}<M_w<10^6\text{ u}$ 和 $10^6\text{ u}<M_w<10^9\text{ u}$ 的范围划分为 2 个组分，计算各组分的质量比，结果如表 2 所示。FDOP 中 $10^3\text{ u}<M_w<10^6\text{ u}$ 的多糖质量比高达 70.68%，其次为 60 DOP 的 67.70%、100 DOP 的 62.24%和 140 DOP 的 58.11%。相反， $10^6\text{ u}<M_w<10^9\text{ u}$ 的多糖质量比按 FDOP、60 DOP、100 DOP 和 140 DOP 的顺序逐渐增多。随着干燥温度的升高，铁皮石斛多糖的聚合反应逐渐加剧。

表 2 水溶性铁皮石斛多糖中不同分子量多糖组分的质量比（%）

Table 2 Mass ratio of polysaccharide fractions within different molecular weight range in the water-soluble *D. officinale* polysaccharides (%)

	FDOP	60 DOP	100 DOP	140 DOP
$10^3\text{ u}<M_w<10^6\text{ u}$	70.68	67.70	62.24	58.11
$10^6\text{ u}<M_w<10^9\text{ u}$	29.32	32.30	37.76	41.89

2.1.3 单糖组成

表 3 水溶性铁皮石斛多糖中各单糖的摩尔比

Table 3 Molar ratio of monosaccharides in the water-soluble *D. officinale* polysaccharides

	甘露糖	葡萄糖	鼠李糖	木糖
FDOP	2.18	1.00	0.02	0.01
60DOP	2.03	1.00	0.02	0.02
100DOP	2.05	1.00	0.03	0.03
140DOP	2.22	1.00	0.02	0.02

表 3 表示水溶性铁皮石斛多糖中各单糖的摩尔比。在 60~140 ℃ 的干燥温度范围内对铁皮石斛进行干燥，多糖的单糖种类没有改变，但单糖的摩尔比略有变化。甘露糖、葡萄糖、鼠李糖和木糖的摩尔比在

FDOP 中为 2.18:1.00:0.02:0.01，在 60 DOP 中为 2.03:1.00:0.02:0.02，在 100 DOP 中为 2.05:1.00:0.03:0.03，在 140 DOP 中为 2.22:1.00:0.02:0.02。各铁皮石斛多糖主要由甘露糖和葡萄糖组成，单糖摩尔比与干燥温度之间无明显的关联。本研究中铁皮石斛多糖的主要单糖组成与文献^[5]报道一致。

2.1.4 UV 和 IR 光谱

图 3 为水溶性铁皮石斛多糖的紫外（UV）光谱。FDOP、60 DOP、100 DOP 在 280 nm 处没有吸收峰，表明铁皮石斛多糖不含或者含有极少蛋白质^[16]，这与表 1 的数据一致。与 FDOP、60 DOP、100 DOP 不同，140 DOP 在 280 nm 处出现吸收峰，这可能与多糖在 140 ℃ 条件下发生美拉德反应和焦化反应而引起的多

糖聚合有关^[8]。

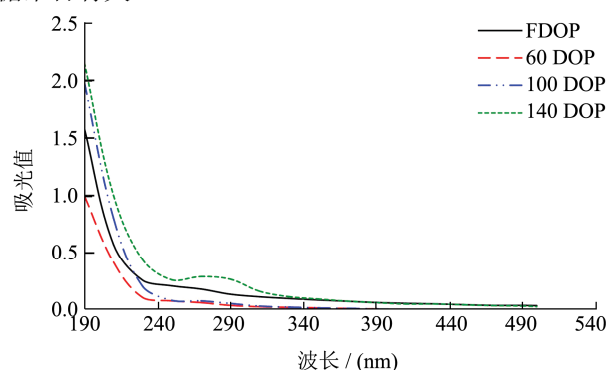


图3 水溶性铁皮石斛多糖的UV光谱

Fig.3 UV spectrum of water-soluble *D. officinale* polysaccharides

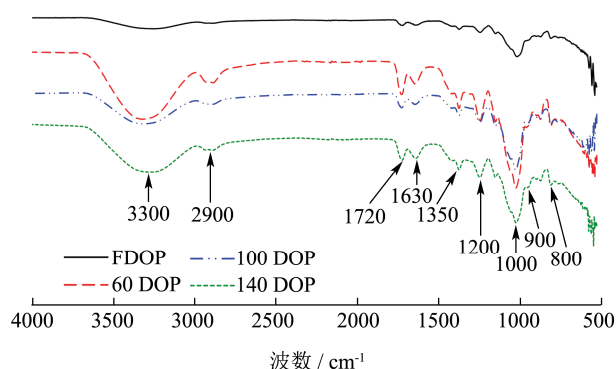


图4 水溶性铁皮石斛多糖的IR光谱

Fig.4 IR spectrum of water-soluble *D. officinale* polysaccharides

图4为水溶性铁皮石斛多糖的红外(IR)光谱。FDOP、60 DOP、100 DOP和140 DOP的红外光谱吸收峰基本相同。在3300 cm⁻¹附近的吸收峰是羟基(O-H)的伸缩振动引起的;2900 cm⁻¹附近是甲基和亚甲基的C-H伸缩振动吸收峰^[16]。1720 cm⁻¹附近的吸收峰是由乙酰基和羧酸上C=O伸缩振动引起的;1630 cm⁻¹附近是结合水的吸收峰;在1350 cm⁻¹附近的吸收峰是由C-H的变角振动引起的;在1200~1000 cm⁻¹之间存在吡喃糖环的特征吸收峰(1147、1061和1020 cm⁻¹)^[19]。在900 cm⁻¹和800 cm⁻¹处的吸收峰表明铁皮石斛多糖中存在β-构型的吡喃糖苷键^[4]。

2.2 水溶性铁皮石斛多糖的抗氧化活性

2.2.1 羟自由基清除能力

羟自由基(·OH)是一种氧化性极强的自由基。多糖清除羟自由基,是由于多糖提供的氢离子(H⁺)与羟自由基结合成H₂O^[4]。图5表示水溶性铁皮石斛多糖对羟自由基的清除能力。羟自由基清除率随多糖浓度的增加而上升,在0~2 g/L多糖浓度范围内的上升幅度较大,而在2~6 g/L多糖浓度范围内的上升幅

度较小。FDOP、60 DOP、100 DOP和140 DOP的羟自由基清除率的多糖浓度为2 g/L时分别为49.85%、4.68%、41.37%和39.52%,在多糖浓度为6 g/L时分别为63.17%、57.47%、49.12%和45.94%。随着干燥温度的升高,铁皮石斛多糖的羟自由基清除能力明显下降($p<0.05$)。

张玥等^[15]以新鲜齿瓣石斛茎为原料,通过水提、醇沉制备粗多糖。体外羟自由基清除实验中,羟自由基清除率在0~5 g/L多糖浓度范围内的上升幅度较大,而在5~10 g/L多糖浓度范围内的上升幅度较小。多糖浓度为6 g/L时,羟自由基清除率为63%。此外,Xing等^[5]以60℃干燥铁皮石斛茎为原料,通过热水浸提、醇沉分级和凝胶柱纯化获得4个多糖组分DOP-40、DOP-50、DOP-60和DOP-70。羟自由基清除率在0~2 g/L的多糖浓度范围内随多糖浓度的增加而上升;与其他多糖组分相比,DOP-70的羟自由基清除率较高。多糖浓度为2 g/L时,DOP-70的羟自由基清除率为45%。新鲜齿瓣石斛多糖、干燥铁皮石斛多糖组分DOP-70的羟自由基清除能力分别与本研究的FDOP和60 DOP相似。

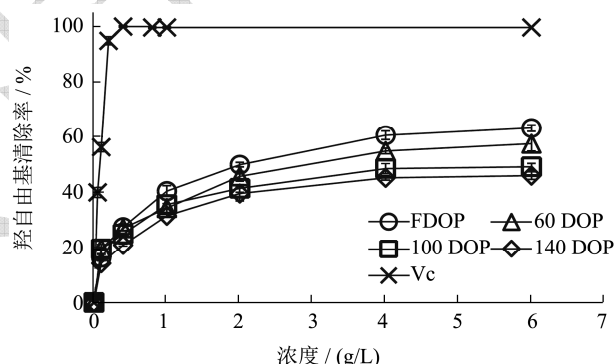


图5 水溶性铁皮石斛多糖对羟自由基的清除能力

Fig.5 Hydroxyl radical scavenging ability of water-soluble *D. officinale* polysaccharides

2.2.2 超氧阴离子自由基清除能力

超氧阴离子(O₂⁻)是人体内其他活性氧自由基的前体。多糖可提供羟基(O-H)或氢离子(H⁺)与超氧阴离子结合成H₂O^[20]。图6表示水溶性铁皮石斛多糖对超氧阴离子自由基的清除能力。超氧阴离子自由基清除率随多糖浓度变化的趋势与羟自由基清除率基本相同。FDOP、60 DOP、100 DOP和140 DOP的超氧阴离子自由基清除率的多糖浓度为2 g/L时分别为43.06%、38.57%、29.34%和26.97%,在多糖浓度为6 g/L时分别为49.22%、43.95%、36.83%和33.80%。随着干燥温度的升高,铁皮石斛多糖的超氧阴离子自由基清除能力明显下降($p<0.05$)。

铁皮石斛多糖组分DOP-40、DOP-50、DOP-60

和 DOP-70 的超氧阴离子自由基清除实验中^[5], 超氧阴离子自由基清除率在 0~2 g/L 多糖浓度范围内随多糖浓度的增加而上升; 与其他多糖组分相比, DOP-70 的超氧阴离子自由基清除率较高。多糖浓度为 2 g/L 时, DOP-70 的超氧阴离子自由基清除率为 40%, 与本研究的 60 DOP 相似。

2.2.3 还原力

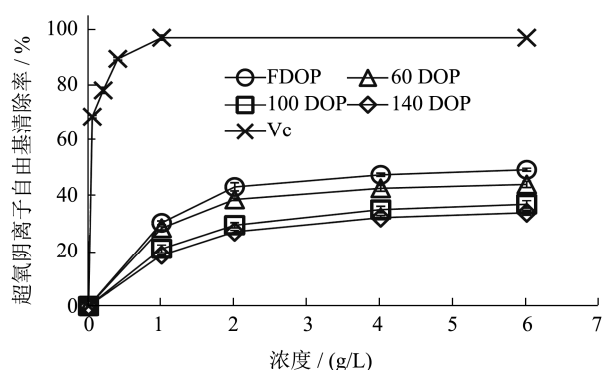


图 6 水溶性铁皮石斛多糖对超氧阴离子自由基的清除能力

Fig.6 Superoxide anion radical scavenging ability of water-soluble *D. officinale* polysaccharides

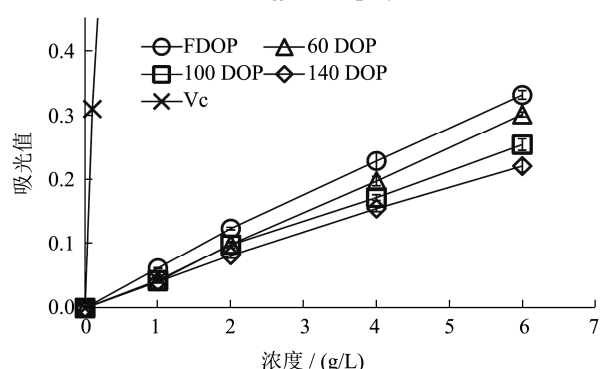


图 7 水溶性铁皮石斛多糖对 Fe^{3+} 的还原能力

Fig.7 Reducing power of water-soluble *D. officinale* polysaccharides on Fe^{3+}

图 7 表示水溶性铁皮石斛多糖对 Fe^{3+} 的还原力。该图中, 吸光值越大, 则铁皮石斛多糖对 Fe^{3+} 的还原力越强。在 0~6 g/L 的多糖浓度范围内, FDOP、60 DOP、100 DOP 和 140 DOP 的吸光值均随着多糖浓度的增加呈线性上升。当多糖浓度为 6 g/L 时, FDOP、60 DOP、100 DOP 和 140 DOP 的吸光值分别为 0.33、0.30、0.26 和 0.22。由此可见, 随着干燥温度的升高, 铁皮石斛多糖对 Fe^{3+} 的还原力明显下降 ($p < 0.05$)。

齿瓣石斛多糖的还原力测定结果^[15]表明, 吸光值在 0~6 g/L 多糖浓度范围内的上升幅度较大, 而在 6~10 g/L 多糖浓度范围内的上升幅度较小。多糖浓度为 6 g/L 时, 齿瓣石斛多糖的吸光值为 0.33, 与本研究的 60 DOP 相似。

2.3 多糖抗氧化活性的构效关系

植物多糖的单糖组成、分子量和抗氧化活性在干燥中会发生变化。Wang 等^[16]采用热水浸提绿茶多糖 (TPS), 然后采用冷冻干燥 (-40~-40 °C, 48 h)、真空干燥 (60 °C, 24 h)、喷雾干燥 (进口温度 160 °C, 出口温度 80~85 °C) 和微波干燥 (3 kW, 50 °C, 20 min) 方式对绿茶多糖提取液进行干燥, 获得 4 种多糖 TPS-F、TPS-V、TPS-S、TPS-M。这 4 种多糖均含有鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖、木糖、半乳糖、甘露糖、半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸, 但其摩尔比不同。对于 DPPH 自由基的清除能力, TPS-V 最强, TPS-M、TPS-F、TPS-S 依次减弱; 对于超氧阴离子的清除能力, TPS-F、TPS-V 和 TPS-M 基本相同, 而 TPS-S 较弱。Ahmadi 等^[21]采用热水浸提橡子粗多糖 (AP), 然后进行热风干燥 (室温, 24 h; 60 °C, 8 h; 80 °C, 6 h; 100 °C, 6 h)、真空干燥 (0.06 MPa, 40 °C, 24 h; 60 °C, 24 h)、冷冻干燥 (-55 °C, 30 h), 获得 4 种热风干燥橡子多糖 (AP-H), 2 种真空干燥橡子多糖 (AP-V) 和 1 种冷冻干燥橡子多糖 (AP-F)。抗氧化试验结果表明, 干燥使多糖的结晶构象发生了变化; 80 °C 和 100 °C 热风干燥的 AP-H 展现较好的抗氧化活性。Zhao 等^[19]指出, 较高的干燥温度会使枸杞多糖的黏度较大, DPPH 自由基清除能力较低。

本研究中, 水溶性铁皮石斛多糖 FDOP、60 DOP、100 DOP 和 140 DOP 的蛋白质含量极少, 总糖含量、糖醛酸含量、单糖组成和 IR 光谱没有明显差异, 但还原端含量和分子量分布发生了变化。FDOP、60 DOP、100 DOP 和 140 DOP 的还原端含量分别为 1.82%、1.70%、1.42% 和 1.10%, 分子量为 $10^3 \sim 10^6$ u 的多糖组分质量比分别为 70.68%、67.70%、62.24%、58.11%。此外, 140 DOP 的 UV 光谱在 280 nm 处出现吸收峰。由此可以推测, 铁皮石斛的干燥导致了多糖的聚合, 多糖的分子量增大、还原端减少, 从而使得其抗氧化活性下降。在 60~140 °C 的干燥温度范围内, 较低的温度有利于抑制铁皮石斛中多糖的聚合反应, 保持多糖抗氧化活性。这些发现为石斛功能食品的生产及利用提供了技术数据和理论依据。

3 结论

以新鲜铁皮石斛、以及 60、100 和 140 °C 热风干燥铁皮石斛为实验材料, 通过提取和纯化制备水溶性石斛多糖 FDOP、60 DOP、100 DOP 和 140 DOP, 然后对石斛多糖进行分子结构分析和抗氧化活性测

定,得到以下结论:

(1) FDOP 和 60 DOP 的还原端含量分别为 1.82%、1.70%。然而,100 DOP 和 140 DOP 的还原端含量分别降低至 1.42%、1.10%。各石斛多糖主要由甘露糖和葡萄糖组成,单糖摩尔比与干燥温度之间无明显的关联。

(2) 随着干燥温度的升高,石斛多糖的分子量分布曲线向大分子量方向偏移。FDOP、60 DOP、100 DOP 和 140 DOP 中分子量 $10^3 \sim 10^6$ u 的多糖组分质量比分别为 70.68%、67.70%、62.24%和 58.11%。在 UV 光谱的 280 nm 处,FDOP、60 DOP、100 DOP 没有吸收峰,而 140 DOP 有吸收峰。

(3) 分子量 $10^3 \sim 10^6$ u 的多糖组分、还原端较多的铁皮石斛多糖具有较大的自由基清除能力和还原力。在铁皮石斛干燥中,60 °C 的温度有利于抑制多糖的聚合反应,保持多糖的抗氧化活性。

参考文献

- [1] Cakova V, Bonte F, Lobstein A. *Dendrobium*: sources of active ingredients to treat age-related pathologies [J]. Aging and Disease, 2017, 8(6): 827-849
- [2] 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: 420-427
- [3] Leung P H, Zhao S, Ho K P, et al. Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides from mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus Cs-HK1 [J]. Food Chemistry, 2009, 114(4): 1251-1256
- [4] Luo Q, Tang Z, Zhang X, et al. Chemical properties and antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide from *Dendrobium officinale* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 89: 219-227
- [5] Xing S, Zhang X, Ke H, et al. Physicochemical properties of polysaccharides from *Dendrobium officinale* by fractional precipitation and their preliminary antioxidant and anti-HepG2 cells activities *in vitro* [J]. Chemistry Central Journal, 2018, 12: 103
- [6] 朱晓冉,徐颖,李德海,等.酸碱性和分子量对木耳多糖抗氧化活性及相关性的影响[J].现代食品科技,2018,34(3):59-67
ZHU Xiao-ran, XU Ying, LI De-hai, et al. Correlation of the antioxidant activity of polysaccharides from *Auricularia Auricula* with its molecular weight and extracting agent properties [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(3): 59-67
- [7] Meng Q, Fan H, Li Y, et al. Effect of drying methods on physico-chemical properties and antioxidant activity of *Dendrobium officinale* [J]. Journal of Food Measurement & Characterization, 2018, 12(1): 1-10
- [8] 马厚雨,邢丽,缪冶炼.干燥温度对铁皮石斛颗粒中多糖溶出特性的影响[J].现代食品科技,2019,35(4):109-115
MA Hou-yu, XING Li, MIAO Ye-lian. Effects of drying temperature on the dissolving-out properties of polysaccharides in *Dendrobium officinale* particles [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(4): 109-115
- [9] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry, 1956, 28: 350-356
- [10] 张艳荣,刘相阳,于君,等.玉米皮多糖的组成及结构[J].食品科学,2011,32(3):64-67
ZHANG Yan-rong, LIU Xiang-yang, YU Jun, et al. Monosaccharide component and structure of polysaccharides from corn spermoderm [J]. Food Science, 2011, 32(3): 64-67
- [11] Sedmak J J, Grossberg S E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250 [J]. Analytical Biochemistry, 1977, 79(1-2): 544-552
- [12] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428
- [13] 赵谋明,刘敏,林恋竹,等.山苦茶多糖结构表征及抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2015,31(7):61-66
ZHAO Mou-ming, LIU Min, LIN Lian-zhu, et al. Structural characteristics and antioxidant activity of polysaccharides from *Mallotus oblongifolius* [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(7): 61-66
- [14] Liu Y T, You Y X, Li Y W, et al. Characterization of carboxymethylated polysaccharides from *Catathelasma ventricosum* and their antioxidant and antibacterial activities [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 38: 355-362
- [15] 张玥,王东晖,方芳,等.石斛水提上清液活性成分量效关系研究[J].现代食品科技,2017,33(10):72-76
ZHANG Yue, WANG Dong-hui, FANG Fang, et al. Does-effect relationship of active ingredients from supernatant water of *Dendrobium devonianum* paxt [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(10): 72-76
- [16] Wang Y F, Liu Y Y, Huo J L, et al. Effect of different drying methods on chemical composition and bioactivity of tea polysaccharides [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 62: 714-719

(下转第 124 页)