

超高压提取铁皮石斛多糖工艺优化及其抗氧化活性分析

Optimization of ultra-high pressure extraction technology of polysaccharide from *Dendrobium officinale* and its antioxidant activities

孟继坤 张楠 吴浩 张秀清

MENG Ji-kun ZHANG Nan WU Hao ZHANG Xiu-qing

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

摘要:目的:优化超高压提取铁皮石斛多糖工艺条件,并分析其基本性质及体外抗氧化活性。方法:以铁皮石斛干粉为原料,优化超高压技术提取铁皮石斛多糖工艺条件,分析传统热水浸提法、超高压法两种提取方法下的铁皮石斛多糖的相对分子量与单糖组成,并比较其体外抗氧化活性。结果:超高压提取铁皮石斛多糖的最佳工艺条件为超高压压力 200 MPa,料液比 1:25 (g/mL),保压时间 5 min,此时铁皮石斛多糖得率为 33.3%,比传统热水浸提法提高了 128%,且超高压法提取的多糖蛋白含量和相对分子量下降,甘露糖含量提高,对 DPPH 自由基的清除能力提高。结论:超高压提取的铁皮石斛多糖得率高,体外抗氧化活性较好。

关键词:铁皮石斛;多糖;超高压;体外抗氧化活性

Abstract: Objective: Optimizing the extraction conditions of polysaccharides from *Dendrobium officinale* under ultra-high pressure, improving the yield of polysaccharides, and studying its basic properties and antioxidant activity in vitro. **Methods:** Using *D. officinale* dry powder as raw material, orthogonal experiment was used to optimize the extraction conditions of polysaccharide from *D. officinale* by ultra-high pressure technology. The relative molecular weight and monosaccharide composition of polysaccharides extracted from *D. officinale* by traditional hot water extraction method and ultra-high pressure extraction method were determined, and their antioxidant activities in vitro were compared. **Results:** Under the optimal conditions of 200 MPa, solid-liquid ratio of 1:25 (g/mL) and

treatment time of 5 min, the polysaccharide yield of *D. officinale* was 33.3%, which was 128% higher than that of the traditional hot water extraction method. The protein content and relative molecular weight of the extraction method were decreased, while the mannose content was increased. The scavenging ability of DPPH and other free radicals was improved. **Conclusion:** The polysaccharide extracted from *Dendrobium officinale* under ultra-high pressure has high yield and good antioxidant activity in vitro.

Keywords: *Dendrobium officinale*; polysaccharide; ultra-high pressure; in vitro antioxidant activity

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)又称黑节草,是一种喜阴喜湿的多年生草本植物,属于兰科石斛属,2021 年被列为中国药食同源食品之一,含有多糖、多酚、氨基酸、生物碱、维生素等多种活性成分,其中,多糖是铁皮石斛的主要生理活性成分^[1],具有抗氧化^[2]、免疫调节^[3-4]、抗肿瘤^[5]、降血脂和降血糖^[6-7]等多种生理活性。

最传统且适用范围最广的多糖提取方法为热水浸提法^[8]。目前,为提高铁皮石斛多糖得率及其生物活性,可采用酶^[9]、碱液^[10]、低共熔溶剂^[11]等化学生物方法辅助提取,也可采用超高压^[12]、超声波^[13]、微波^[14]等物理方法,在不引入新物质的前提下促进石斛细胞内多糖溶出。其中,超高压提取法是指常温下将 100~1 000 MPa 的流体静压力作用于反应体系,使植物细胞内外产生较大的压差,从而促进植物多糖转移至提取溶剂中的方法,具有提取时间短、提取效率高、对有效成分结构破坏小等优点^[15-17]。

研究拟以多糖得率为基础评价指标,通过正交试验优化超高压提取铁皮石斛多糖工艺条件,比较传统热水浸提法及超高压提取法对铁皮石斛多糖相对分子量及单

基金项目:贵州省科技计划项目(编号:20204Y070)

作者简介:孟继坤,女,中国农业大学硕士研究生。

通信作者:张秀清(1976—),女,中国农业大学副教授,博士。

E-mail: xiuqingzhang@cau.edu.cn

收稿日期:2022-05-28 改回日期:2022-09-05

糖组成的影响,并分析其体外抗氧化活性,以期为铁皮石斛多糖的产品开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

铁皮石斛:附树方式生长,采自贵州省兴义;

总抗氧化能力试剂盒:南京建成生物工程研究所;

无水乙醇、浓盐酸、浓硫酸、磷酸、苯酚、葡萄糖、硫酸亚铁:化学纯,北京兴津化工厂;

水杨酸:分析纯,西陇化工股份有限公司;

氯化亚铁、Ferrozine 溶液、EDTA:分析纯,上海源叶生物科技有限公司;

甘露糖、鼠李糖、核糖、半乳糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、阿拉伯糖、岩藻糖标准品:纯度 $\geq 99\%$,美国 Sigma 公司;

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH):分析纯,美国 Sigma 公司。

1.1.2 主要仪器设备

真空包装机:JF-1616 型,宁波欧迩有限公司;

超高压系统:FB-110G5 型,上海励途超高压设备有限公司;

高效液相色谱仪:Agilent1200 型,配有示差检测器和 B.03.01 色谱工作站,安捷伦科技有限公司;

液相色谱仪:岛津 LC-20AD 型,日本 Shimadzu 有限公司;

冷冻干燥机:FD-2A 型,北京博医康实验仪器有限公司;

紫外分光光度计:TU-1810PU 型,北京普析通用仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 铁皮石斛原料预处理 参照《中华人民共和国药典:2020 年版》并略有改动^[18]。将铁皮石斛于 60℃ 烘至恒重,粉碎,过 60 目筛,备用。

1.2.2 超高压法提取铁皮石斛多糖 准确称取 10 g 粉末,加入去离子水,抽真空封口,混匀,一定操作压力下进行超高压处理,抽滤,收集提取液。取 5 mL 提取液用于多糖得率测定,其余溶液旋转蒸发,加入 4 倍体积无水乙醇,4℃ 过夜醇沉,6 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀烘干,得超高压提取法铁皮石斛粗多糖 DOP-p。

1.2.3 热水浸提法提取铁皮石斛多糖 准确称取铁皮石斛粉末 0.500 g,加入 5 mL 去离子水及 20 mL 无水乙醇。于 150 W 下超声提取 30 min,6 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀。用 10 mL 80%乙醇洗涤离心至上清无色,用水将沉淀转移至圆底烧瓶,加入 50 mL 去离子水,沸水提取 120 min。趁热抽滤,旋转蒸发,加入 4 倍体积无水乙

醇过夜醇沉,离心,收集沉淀,烘干,得热水浸提法铁皮石斛粗多糖 DOP-w。

1.2.4 多糖得率测定 采用苯酚—硫酸法^[19]。以去离子水作空白对照,绘制葡萄糖标准曲线方程为 $y = 8.2564x - 0.0074$, $R^2 = 0.9996$ 。

1.2.5 蛋白质含量测定 采用考马斯亮蓝法^[20]。绘制蛋白质标准曲线为 $y = 0.005x + 0.0093$, $R^2 = 0.9991$ 。

1.2.6 酶法—化学法联用脱蛋白 参照文献^[21]。

1.2.7 多糖相对分子量测定 采用 GPC 法^[22]。绘制标准葡聚糖曲线方程为 $\lg M_w = -1.0984t + 13.66$ 。

1.2.8 单糖组成分析 采用高效液相法^[23]。

1.2.9 DPPH 自由基清除能力测定 取 500 μL 质量浓度依次为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mg/mL 的 DOP-w 和 DOP-p 多糖提取液,加入 500 μL DPPH 无水乙醇溶液 (0.1 mg/mL),振荡混匀,黑暗中放置 30 min。以蒸馏水为空白溶液,测定 517 nm 处吸光度,用维生素 C 溶液为对照,其质量浓度依次为 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 mg/mL。并按式(1)计算 DPPH 自由基清除率。

$$C_{\text{DPPH}} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

C_{DPPH} ——DPPH 自由基清除率, %;

A_1 ——样品测定吸光度值;

A_2 ——样品溶液本底的吸光度值;

A_0 ——空白对照溶液的吸光度值。

1.2.10 Fe^{3+} 还原能力测定 取 200 μL 质量浓度依次为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mg/mL 的 DOP-w 和 DOP-p 多糖提取液,加入 500 μL 磷酸盐缓冲溶液 (0.2 mol/L, pH 6.6),加入 500 μL 0.01 g/mL 的铁氰化钾溶液,混匀,50℃ 水浴 20 min,加入 500 μL 0.1 g/mL 三氯乙酸离心 10 min,取上清液 500 μL ,依次加入 500 μL 去离子水和 100 μL 0.001 g/mL 三氯化铁溶液,混匀,静置 10 min,测定 700 nm 处吸光度值。以去离子水代替三氯化铁作为空白,用维生素 C 代替样品溶液作对照。并按式(2)计算 Fe^{3+} 还原力。

$$C_{\text{Fe}^{3+}} = A_1 - A_2, \quad (2)$$

式中:

$C_{\text{Fe}^{3+}}$ —— Fe^{3+} 还原力;

A_1 ——样品吸光度值;

A_2 ——空白对照溶液的吸光度值。

1.2.11 羟自由基清除能力测定 取 500 μL 不同质量浓度的多糖提取液,依次加入 150 μL 2 mg/mL 的硫酸亚铁水溶液、500 μL 1%过氧化氢溶液及 500 μL 1.5 mg/mL 的水杨酸乙醇溶液后,振荡混匀,37℃ 水浴 1 h,测定 526 nm 处吸光度值;以无水乙醇代替水杨酸乙醇溶液,测定样品溶液本底的吸光度值;以去离子水代替样品溶

液,测定空白对照溶液的吸光度值,用维生素 C 代替样品溶液作对照。并按式(3)计算羟自由基清除率。

$$C_{OH} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%, \tag{3}$$

式中:

C_{OH} ——羟自由基清除率,%;

A_1 ——样品吸光度值;

A_2 ——样品溶液本底的吸光度值;

A_0 ——空白对照溶液的吸光度值。

1.2.12 Fe^{2+} 螯合能力测定 取 1 mL 不同质量浓度的多糖提取液,加入 3.7 mL 去离子水,0.1 mL 2 mmol/L 氯化亚铁溶液,混匀,加入 0.2 mL 5 mmol/L 的 Ferrozine 溶液,室温静置 10 min,测定 562 nm 处吸光值。以去离子水代替样品溶液为空白对照,以去离子水代替氯化亚铁溶液为校准管。用 EDTA 代替样品溶液作对照,其质量浓度依次为 0.01,0.02,0.04,0.06,0.08,0.10 mg/mL。并按式(4)计算 Fe^{2+} 螯合能力。

$$C_{Fe^{2+}} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%, \tag{4}$$

式中:

$C_{Fe^{2+}}$ —— Fe^{2+} 螯合能力,%;

A_1 ——样品吸光度值;

A_2 ——空白对照溶液的吸光度值;

A_0 ——校准管的吸光度值。

1.2.13 总抗氧化能力(T-AOC)测定 根据试剂盒说明书进行,并按式(5)计算总抗氧化能力。

$$U = \frac{4.1 \times (A_1 - A_0)}{0.01 \times 0.5 \times 30}, \tag{5}$$

式中:

U ——总抗氧化能力,U/mL;

A_1 ——样品吸光度值;

A_0 ——空白对照溶液的吸光度值。

1.3 数据处理

采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行数据统计分析及绘图,结果以平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛多糖的超高压提取工艺优化

考察超高压压力、保压时间、料液比 3 个因素对铁皮石斛多糖得率的影响。正交试验因素水平见表 1,正交试

验设计及结果见表 2。

由表 2 可知,各因素对 DOP-p 得率的影响依次为超高压压力>料液比>保压时间,说明超高压压力的影响最大,保压时间的影响最小,各因素在考察范围内均影响显著($P<0.05$)。最优方案为 $A_1B_2C_3$,即最佳提取条件为料液比 1:25 (g/mL),超高压压力 200 MPa,保压时间 5 min。

2.2 两种铁皮石斛多糖基本性质比较

2.2.1 正交试验验证及基本性质比较 由表 3 可知,最佳提取条件下 DOP-p 得率为 33.3%,残渣复提得率为 6.5%,综合计算得经超高压提取石斛粉总得率为 39.8%,远高于中国药典所要求的 25%。优化后的超高压提取方法在得率上相较于传统热水浸提法提高了 128%,且提取

表 1 超高压正交试验因素与水平表

Table 1 Ultra-high pressure orthogonal test factors and level design table

水平	A 超高压压力/MPa	B 保压时间/min	C 料液比(g/mL)
1	200	4	1:15
2	300	5	1:20
3	400	6	1:25

表 2 超高压提取铁皮石斛多糖正交试验结果

Table 2 Orthogonal experiment results of *D. officinale* polysaccharide by ultra-high pressure extraction

试验号	A	B	C	空列	得率/%
1	1	1	1	1	29.4
2	1	2	2	2	29.2
3	1	3	3	3	31.9
4	2	2	3	1	26.9
5	2	3	1	2	23.6
6	2	1	2	3	21.4
7	3	3	2	1	26.7
8	3	1	3	2	31.1
9	3	2	1	3	29.9
k_1	30.1	27.3	27.6	27.7	
k_2	24.0	28.7	25.7	28.0	
k_3	29.2	27.4	30.0	27.7	
R	6.1	1.4	4.3	0.3	

表 3 两种铁皮石斛多糖工艺参数及得率对比

Table 3 Comparison of technological parameters and yield of polysaccharides extracted from *D. officinale* by two methods

组别	提取压力/MPa	提取时间/min	提取温度/℃	料液比(g/mL)	多糖得率/%	蛋白含量/%
DOP-w	常压	120	99	1:25	14.5	4.6
DOP-p	200	5	室温	1:25	33.3	3.5

时间更短,提取温度更低。因此,超高压提取可以有效提高铁皮石斛多糖得率。此外,DOP-w 的蛋白含量为 4.6%,DOP-p 的蛋白含量为 3.5%,超高压提取法相对传统热水浸提方法降低了铁皮石斛多糖蛋白含量,可能是因为超高压处理的温度更低,处理条件相对更温和,进入糖液中的蛋白质含量相对较低。

2.2.2 相对分子量比较 由图 1 可知,热水提取的多糖 DOP-w 和超高压提取的多糖 DOP-p 均有 3 个峰,DOP-w

的 3 个峰所对应的相对分子量分别为 5.4×10^7 , 1.9×10^5 , 588.9 Da。DOP-p 的 3 个峰所对应的相对分子量分别为 3.2×10^5 , 1.5×10^4 , 527.9 Da,不同提取方式下铁皮石斛多糖的相对分子量存在差异,DOP-p 的相对分子量小于 DOP-w。林平舟^[24]发现,超高压提取的荔枝多糖重均分子量显著小于热水提取法提取的,由 3.20×10^5 下降至 1.9×10^5 ,可能是由于超高压中强烈的机械剪切作用打断了多糖的糖链^[25]。

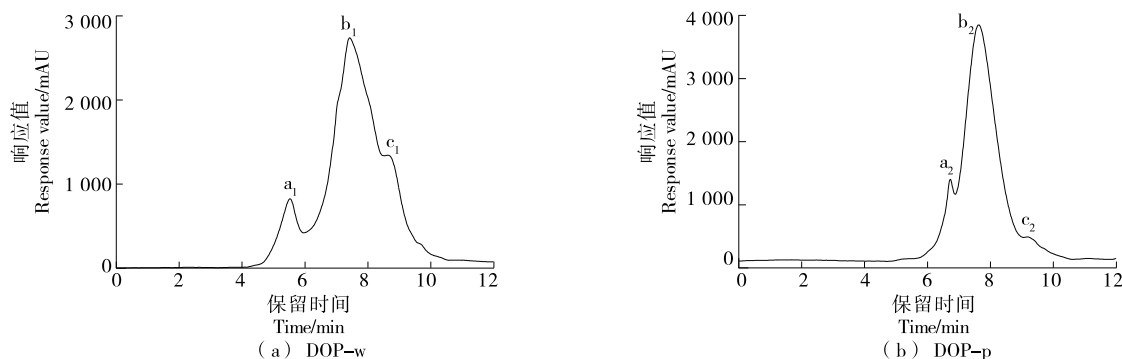


图 1 两种铁皮石斛多糖的相对分子量比较

Figure 1 Comparison of relative molecular weight of polysaccharides extracted from *D. officinale* by two methods

2.2.3 单糖组成比较 由表 4 可知,铁皮石斛多糖 DOP-w 和 DOP-p 为杂多糖,均含有甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖和岩藻糖,DOP-w 还含有一定量的 *N*-乙酰-氨基葡萄糖。其中,铁皮石斛多糖最主要的成分是甘露糖和葡萄糖,DOP-w 的甘露糖和葡萄糖比例为 1.06 : 1,DOP-p 的甘露糖和葡萄糖比例为 1.71 : 1,高于 DOP-w。而甘露糖含量及其与葡萄糖的比例是石斛多糖生理活性的重要因素,国标^[18]规定药用石斛多糖甘露糖含量不得少于 13%。超高压提取的铁皮石斛多糖含有更高的甘露糖可能是其具有更高抗氧化能力的因素之一。

2.3 抗氧化能力

2.3.1 对 DPPH 自由基的清除能力 研究^[26-28]表明,铁皮石斛多糖在体内和体外均具有良好的抗氧化活性,但超高压提取对其活性的影响尚不清晰。由图 2 可知,两种铁皮石斛多糖溶液对 DPPH 自由基的清除能力均与质量浓度呈正相关,但同一质量浓度下的 DOP-w 和 DOP-p 对 DPPH 自由基的清除能力存在差异。维生素 C 对 DPPH 自由基的清除能力远远强于铁皮石斛多糖,当质量浓度为 0.04 mg/mL 时,维生素 C 对 DPPH 自由基的清除率达 90%,但当多糖溶液质量浓度为 3 mg/mL 时,DOP-w 的清除率为 39.7%,DOP-p 的为 53.1%,说明 DOP-p 对 DPPH 自由基的清除能力高于 DOP-w。

2.3.2 对 Fe^{3+} 的还原能力 由图 3 可知,DOP-w、DOP-p 对 Fe^{3+} 的还原力均随样品溶液质量浓度的升高而增强,呈明显的剂量效应。当质量浓度为 3 mg/mL 时,DOP-p

表 4 DOP-w 和 DOP-p 的单糖组成

Table 4 Monosaccharide composition of DOP-w and DOP-p

单糖种类	DOP-w	DOP-p
甘露糖	12.683	17.856
核糖	0.097	0.016
鼠李糖	0.120	0.007
葡萄糖醛酸	0.079	0.808
半乳糖醛酸	0.121	0.301
<i>N</i> -乙酰-氨基葡萄糖	0.426	—
葡萄糖	12.013	10.424
半乳糖	0.825	0.204
木糖	0.291	0.034
阿拉伯糖	0.378	0.218
岩藻糖	0.157	0.144

对 Fe^{3+} 的还原能力为 0.15,高于 DOP-w 的 0.14,但其差距在各质量浓度下均不明显,说明两种方法提取的铁皮石斛多糖对 Fe^{3+} 的还原能力差异较小。

2.3.3 对羟自由基清除能力的比较 由图 4 可知,DOP-w 在各质量浓度下对羟自由基的清除能力均高于 DOP-w。当质量浓度为 3 mg/mL 时,DOP-w 对羟基自由基的清除率为 10.0%,DOP-p 的清除率为 14.2%。

2.3.4 对 Fe^{2+} 螯合能力的比较 由图 5 可知,两种铁皮石斛多糖对 Fe^{2+} 的螯合能力均与质量浓度呈正相关,存

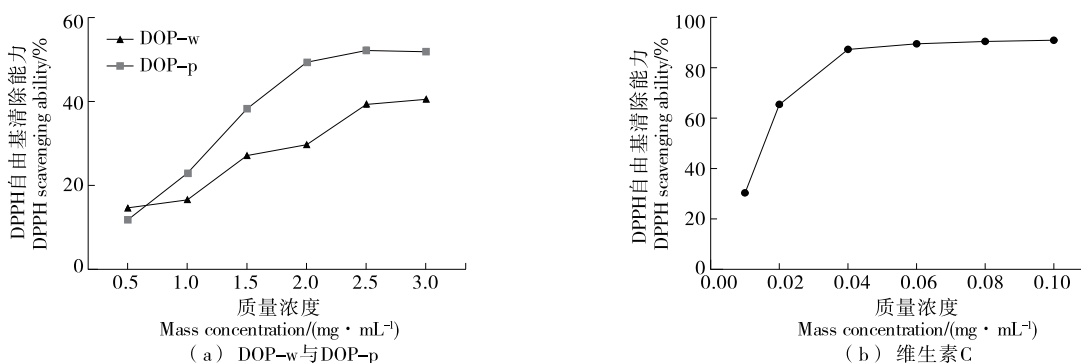


图2 两种铁皮石斛多糖对DPPH自由基清除能力的影响

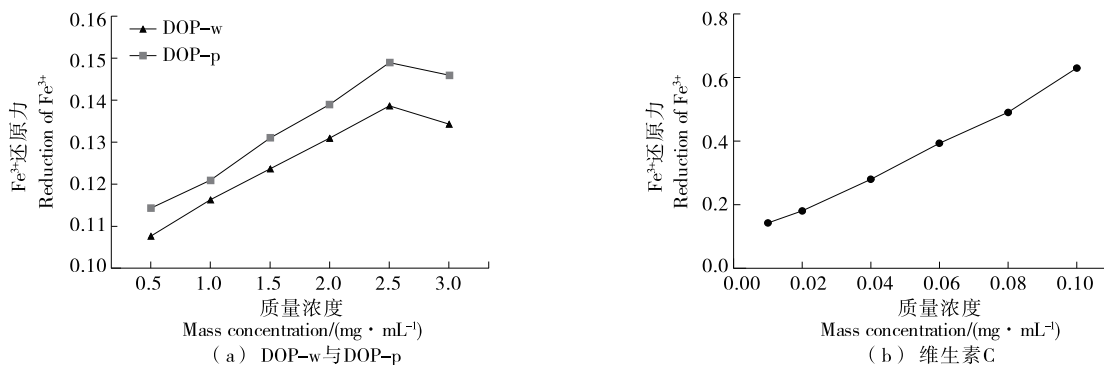
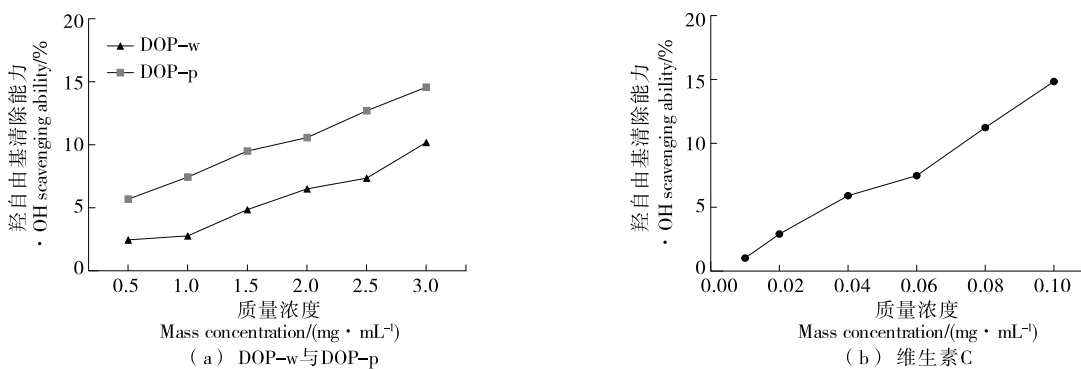
Figure 2 Comparison of DPPH free radical scavenging ability of polysaccharides extracted from *D. officinale* by two methods图3 两种铁皮石斛多糖对Fe³⁺的还原能力Figure 3 Comparison of Fe³⁺ reducing capacity of polysaccharides extracted from *D. officinale* by two methods

图4 两种铁皮石斛多糖对羟自由基清除能力的比较

Figure 4 Comparison of ·OH free radical scavenging ability of polysaccharides extracted from *D. officinale* by two methods

在明显的剂量效应,但同一质量浓度下,DOP-w和DOP-p对Fe²⁺的螯合能力存在差异。EDTA对Fe²⁺的螯合能力远远强于铁皮石斛多糖,当质量浓度为0.1 mg/mL时,EDTA对Fe²⁺的螯合率达87%,而DOP-w在质量浓度为3 mg/mL时的螯合率为56.2%,DOP-p的为60.8%,两种多糖对Fe²⁺的螯合率差异较小,但总体来说,螯合能力大小为DOP-p>DOP-w。

2.3.5 总抗氧化能力(T-AOC)比较 由图6可知,DOP-w

和DOP-p对Fe³⁺的还原力均随样品质量浓度的升高而增强,呈明显的剂量—作用关系。且DOP-p在各质量浓度下的总抗氧化能力均高于DOP-w,说明超高压提取的铁皮石斛多糖的总抗氧化能力强于热水提取法提取的,与Luo等^[29]的结果基本一致。

3 结论

采用正交试验优化了超高压技术提取铁皮石斛多糖的工艺条件,比较了传统热水浸提法、超高压法两种提取

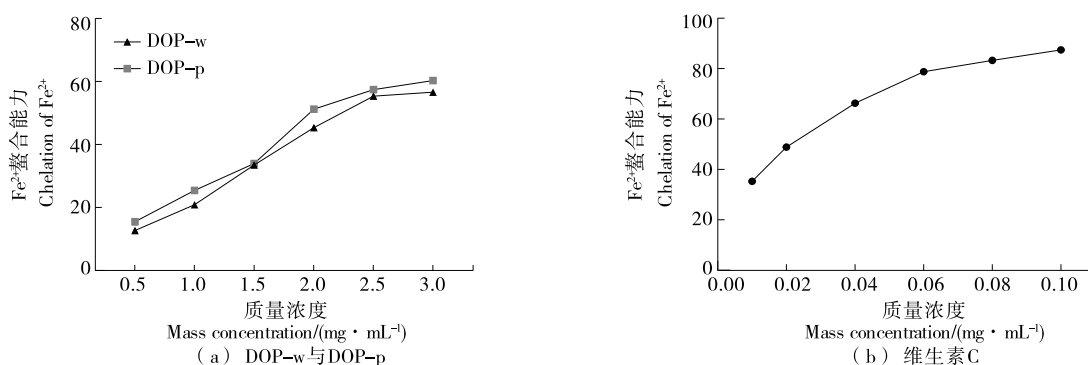
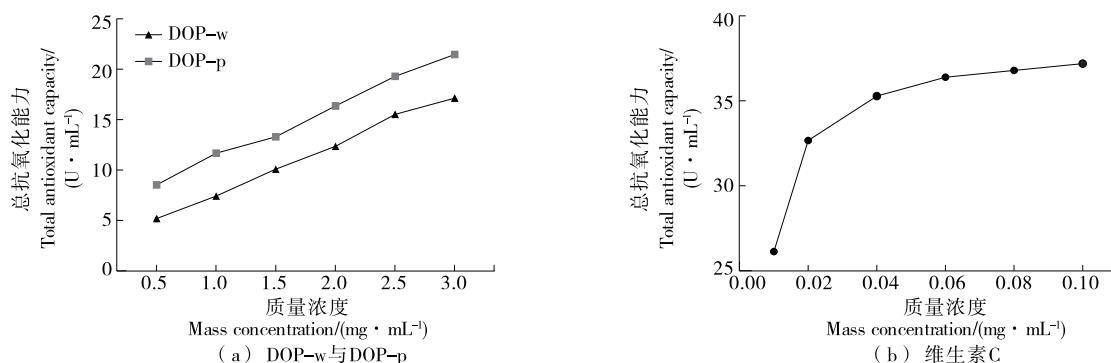
图 5 两种铁皮石斛多糖对 Fe^{2+} 的螯合能力Figure 5 Comparison of Fe^{3+} chelating ability of polysaccharides extracted from *D. officinale* by two methods

图 6 两种铁皮石斛多糖的总抗氧化能力比较

Figure 6 Comparison of total antioxidant capacity of polysaccharides extracted from *D. officinale* by two methods

方法下的铁皮石斛多糖的相对分子量及单糖组成,并分析了两种铁皮石斛多糖的体外抗氧化活性。结果表明,超高压技术可以显著提高铁皮石斛干粉的多糖得率。优化后的超高压提取铁皮石斛多糖的工艺条件为超高压压力 200 MPa,料液比 1:25 (g/mL),保压时间 5 min,此条件下铁皮石斛多糖得率为 33.3%,比传统热水浸提法下的提高了 128%。两种提取方法下铁皮石斛多糖的性质不同,超高压法提取的多糖蛋白含量和相对分子量下降,甘露糖含量提高。相较于传统的热水浸提法,超高压提取可以有效提高铁皮石斛多糖的体外抗氧化活性。两种铁皮石斛多糖对 DPPH 自由基、羟自由基均具有一定的清除能力,对 Fe^{3+} 有一定的还原力,对 Fe^{2+} 有一定的螯合能力,两种多糖的体外抗氧化能力为高压提取法铁皮石斛粗多糖 > 热水浸提法铁皮石斛粗多糖,且均与多糖浓度呈正相关,量效关系明显。但提取方法究竟如何影响多糖的结构和抗氧化活性尚未完全明晰,后续可对多糖精细结构及糖链结构进行研究。

参考文献

[1] TANG H X, ZHAO T W, SHENG Y J, et al. *Dendrobium officinale* Kimura et Migo: A review on its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and industrialization[J]. Evidence-

Based Complementray and Alternative Medicine, 2017, 2 017 (3): 7436259.

- [2] AOXUE L. In vitro and in vivo antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide from *Dendrobium denneanum*[J]. Molecules, 2011, 16(2): 1 579-1 592.
- [3] LINJuway, CHANG Y J, YANG W B, et al. The multifaceted effects of polysaccharides isolated from *Dendrobium huoshanense* on immune functions with the induction of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) in monocytes[J]. PLoS One, 2014, 9(4): 1-12.
- [4] XIE S Z, LIU B, ZHANG D D, et al. Intestinal immunomodulating activity and structural characterization of a new polysaccharide from stems of *Dendrobium officinale*[J]. Food Function, 2016, 7 (6): 2 789-2 799.
- [5] LIANG J, LI H L, CHEN J Q, et al. *Dendrobium officinale* polysaccharides alleviate colon tumorigenesis via restoring intestinal barrier function and enhancing anti-tumor immune response[J]. Pharmacological Research, 2019, 148: 104 417-104 429.
- [6] 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.
- [7] 谭青云, 袁永俊, 王丹, 等. 不同提取方式对铁皮石斛多糖及体外降血糖的影响[J]. 食品科技, 2019, 44(6): 202-206.
- TAN Q Y, YUAN Y J WANG D, et al. Effects of different

- extraction methods on polysaccharide from *Dendrobium candidum* and hypoglycemic effect in vitro[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(6): 202-206.
- [8] 王丽霞, 刘孟宗, 王芳, 等. 铁皮石斛多糖提取及抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2019, 30(2): 85-90.
- WANG L X, LIU M Z, WANG F, et al. Study on extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Dendrobium candidum* [J]. China Food Additives, 2019, 30(2): 85-90.
- [9] HU J M, LI J J, PENG F, et al. Optimization of enzymatic extraction of polysaccharide from *Dendrobium officinale* by Box-Behnken design and response surface methodology[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2014, 37(1): 130-133.
- [10] HE L, YAN X T, LIANG J, et al. Comparison of different extraction methods for polysaccharides from *Dendrobium officinale* stem [J]. Carbohydrate Polymers: Scientific and Technological Aspects of Industrially Important Polysaccharides, 2018, 198: 101-108.
- [11] LIANG J, ZENG Y J, WANG H F, et al. Extraction, purification and antioxidant activity of novel polysaccharides from *Dendrobium officinale* by deep eutectic solvents [J]. Natural Product Research, 2018, 22(3): 3 248-3 253.
- [12] 郑晓杰, 李彦坡, 周环, 等. 一种超高压辅助水提取铁皮石斛多糖的方法: CN112300296A[P]. 2021-12-02.
- ZHENG X J, LI Y P, ZHOU H, et al. A method for extraction of polysaccharide from *Dendrobium officinale* by ultra-high pressure assisted water: CN112300296A[P]. 2021-12-02.
- [13] 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 extraction of polysaccharide from *Dendrobium officinale* and its antioxidant effect on *Drosophila melanogaster*[J]. Food Science, 2018, 39(2): 273-280.
- [14] 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. Study on the technology of extracting polysaccharides from dried stems of *Dendrobium officinale* Kimuraet Migo by microwave method [J]. Food Research and Development, 2017, 38(6): 49-52.
- [15] PAN X Q. Study on technology of extracting polysaccharides from *Radix Pseudostellariae* by ultra high pressure[J]. Ningxia Journal of Agriculture and Forestry Science and Technology, 2012, 11: 97-99.
- [16] SUN K K, WEI J. Study on ultra-high pressure assisted extraction of polysaccharides from *Umbilicaria* in Yellow Mountain [J]. Material Science Forum, 2020, 980: 187-196.
- [17] ZONG W, LI C C. Technique condition optimization for ultra high pressure extraction of *Dendrobium* polysaccharide[J]. Journal of Zhengzhou University of Light Industry (Natural Science), 2012, 4: 42-45.
- [18] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2020 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 92-93.
- National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. 2020 Edition. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 92-93.
- [19] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356.
- [20] 王卫国, 吴强, 胡宝坤, 等. 几种测定灰树花多糖中蛋白质含量方法的比较研究[J]. 中国食用菌, 2003, 22(1): 4.
- WANG W G, WU Q, HU B K, et al. Comparative study on determination methods of residual protained in *Grifolan*[J]. Edible Fungi of China, 2003, 22(1): 4.
- [21] ZHOU B Z, XIAO Y P. Deproteinization in preparation of *Gynostemma pentaphyllum* polysaccharide and determination of polysaccharide molecular weight[J]. Journal of Shaanxi Normal University (Natural Science Edition), 2012(1): 69-72.
- [22] YAN J, TAO T, SUN X C, et al. Purification of Tuckahoe polysaccharide and determination of its molecular weight [J]. Chemistry & Bioengineering, 2011(3): 93-95, 99.
- [23] JI C F, CHEN X J, CHENG B C, et al. Monosaccharide composition analysis and content determination of polysaccharides from *asparagus officinalis* [J]. Dalian International Symposia & Exhibition on Chromatography, 2007, 8(1): 44-48.
- [24] 林平舟. 水溶性荔枝多糖的超高压提取技术及其结构和生物活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2017: 63-64.
- LIN P Z. Extraction technology, structure and biological activity of water-soluble lychee polysaccharide under ultra-high pressure[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017: 63-64.
- [25] 邵佩, 庄虎, 谢超, 等. 超声辅助提取红豆多糖及其生物活性研究[J]. 食品与机械, 2021, 37(2): 173-178.
- SHAO P, ZHUANG H, XIE C, et al. Study on ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from red bean polysaccharides and its biological activity[J]. Food & Machinery, 2021, 37(2): 172-178.
- [26] ZHANG Y, ZHANG L H, LIU J J, et al. *Dendrobium officinale* leaves as a new antioxidant source[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 37: 400-415.
- [27] MIAO Y X, LIAO M X, SUN A H, et al. Study on optimum extraction of polysaccharides from flowers of *Dendrobium officinale* and its antioxidant activity in vitro[J]. Food Research and Development, 2019(2): 60-64.
- [28] TANG H Q, WEI Y, CHEN H, et al. Experimental study on the effect of *Dendrobium officinale* on the antioxidant ability of mice [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2014, 21: 52-54.
- [29] LUO Q L, TANG Z H, ZHANG X F, et al. Chemical properties and antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide from *Dendrobium officinale* [J]. International Journal of Biological Macromolecules Structure Function & Interactions, 2016, 89: 219-227.