

温敏性低共熔溶剂双水相萃取分离油用牡丹籽粕多糖

张喜峰^{1,2}, 王鑫鑫¹, 张青婷¹, 罗光宏^{2,3}

(1. 河西学院 生命科学与工程学院, 甘肃 张掖 734000; 2. 甘肃省河西走廊特色资源利用重点实验室, 甘肃 张掖 734000; 3. 河西学院 甘肃省微藻工程技术研究中心, 甘肃 张掖 734000)

摘要:采用温敏性低共熔溶剂(DES)双水相萃取分离油用牡丹籽粕多糖,并对其性质进行了研究。以16种DES为提取剂制备油用牡丹籽粕多糖粗提物,优选出DES8(氯化胆碱-乙二醇)作为提取剂,在其含水量50%、固液比1:30、提取温度50℃、提取时间40 min时,多糖得率最高,为96.58 mg/g;采用EOPO/DES双水相体系对多糖提取物进行萃取,当EOPO2500在溶液中终质量分数为55%、萃取温度为45℃时,多糖萃取率最大,为89.56%;将富含多糖的EOPO相进行温度诱导分离,多糖回收率为86.15%。低共熔溶剂制备的多糖相对分子质量主要为67.76 kDa,其由阿拉伯糖、甘露糖和葡萄糖组成,摩尔比为1:2.5:0.78。基于热分离的双水相体系具有环境友好、操作简单、使用方便及组分易回收等优点,可作为多糖萃取分离的有效方法。

关键词:低共熔溶剂;多糖;油用牡丹籽粕;温度诱导双水相

中图分类号:TS229;TQ281

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2020)12-0093-07

Extraction of polysaccharides from oil peony seed meal using a thermosensitive deep eutectic solvents – aqueous two – phase system

ZHANG Xifeng^{1,2}, WANG Xinxin¹, ZHANG Qingting¹, LUO Guanghong^{2,3}

(1. School of Life Science and Engineering, Hexi University, Zhangye 734000, Gansu, China;

2. Key Laboratory of Hexi Corridor Resources Utilization of Gansu, Zhangye 734000, Gansu, China;

3. Gansu Engineering Technology Research Center for Microalgae, Hexi University, Zhangye 734000, Gansu, China)

Abstract: A thermosensitive deep eutectic solvents (DES) – aqueous two – phase system (ATPS) was developed for the extraction and preliminary purification of polysaccharides in oil peony seed meal, and the properties of the polysaccharides were determined. Using 16 kinds of DES as extractants to prepare crude polysaccharides from oil peony seed meal, and DES8 (ChCl – EG) was preferred as an extractant to extract polysaccharides, and the yield of polysaccharides was 96.58 mg/g under the conditions of water content of DES8 50%, ratio of raw material to water 1:30, extraction temperature 50℃, and extraction time 40 min. Then the crude polysaccharides were extracted and preliminarily purified by EOPO/DES – ATPS. When the final mass fraction of EOPO2500 in solution was 55% and the extraction temperature was 45℃, the maximum extraction rate 89.56% was obtained and the recovery rate of polysaccharides was 86.15% after temperature induced separation of EOPO phase rich in polysaccharides. The polysaccharides prepared had a major relative molecular weight of 67.76 kDa, and comprised of

arabinose, mannose and glucose with molar ratio of 1:2.5:0.78. The aqueous two – phase system based on thermal separation had the advantages of friendly environment, simple operation, convenient use and easy recovery of components, and could be used as an effective method for polysaccharides extraction and separation.

收稿日期:2020-03-17;修回日期:2020-07-28

基金项目:甘肃省高校协同创新科技团队支持计划(2017C-17)

作者简介:张喜峰(1982),男,副教授,硕士,研究方向为新型分离技术设计与开发(E-mail)curiouslyxsxd@163.com。

通信作者:罗光宏,教授,硕士(E-mail)luoguanghong@163.com。

Key words: deep eutectic solvents; polysaccharides; oil peony seed meal; temperature induced aqueous two - phase

油用牡丹籽粕为油用牡丹籽榨油后的副产品,通常被作为肥料或动物饲料。然而,油用牡丹籽粕含有蛋白质、芍药苷、丹皮酚、低聚芪类化合物等生物活性成分^[1-2],多糖作为其最重要成分之一,具有抗肿瘤、抗疲劳、抗病毒、抗氧化和免疫调节的药理活性^[3-5]。因此,多糖的开发利用具有重要意义。传统的水提法、酶提取法和碱提取法广泛应用于植物多糖的提取^[6-8]。水提法简单,成本低,但效率不高。酶提取法需要苛刻的操作条件,增加了生产成本。虽然碱提取法能提高多糖的溶出率,但部分多糖可能会发生分解。因此,开发一种绿色、高效的多糖提取方法具有重要意义。

低共熔溶剂(DES)是由氢键受体(HBAs)和氢键供体(HBDs)按照一定摩尔比形成的混合物,也被称为离子液体(ILs)类似物。除与ILs相似的性质外,DES还具有成本低、制备简单、生物毒性低、生物降解性好等优点^[9-10]。因此,在萃取领域中,DES绿色溶剂替代了一些生物毒性高、生物降解性低的离子液体,广泛应用于植物资源中多种有效成分的提取,如橄榄油渣中的酚类化合物^[11]、槐花中的黄酮^[12]、长春花中的花青素^[13]等。

双水相体系(ATPS)作为一种液-液萃取技术,已广泛应用于食品、医药、化工等领域。目前,已形成了不同类型的ATPS,如PEG/盐^[14]、PEG/葡聚糖^[15]、有机溶剂/盐^[16]、ILs/盐水^[17]、DES/盐水和温敏性聚合物/盐^[18]。与其他ATPS相比,温敏性ATPS不仅保留了ATPS的特性,还可通过改变温度实现ATPS的成相组分和目标化合物分离。环氧乙烷-环氧丙烷共聚物(EOPO)是一种温敏性聚合物,在温度诱导下可实现相分离。目前,基于EOPO的ATPS已广泛应用于苦参碱^[19]、食物中痕量环丙沙星^[18]和天然产物中生物活性成分^[20]的提取。

本文以制备的16种DES为提取剂,研究DES种类、含水量、固液比、提取温度、提取时间对油用牡丹籽粕多糖提取效果的影响,采用热分离ATPS对油用牡丹籽粕多糖进行初步纯化,研究EOPO相对分子质量、终质量分数和萃取温度对多糖萃取效果的影响,通过温度诱导相分离回收多糖和EOPO,并对多糖相对分子质量、组成等进行了分析测定,期为多糖的深度开发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

油用牡丹籽粕,由甘肃牡丹园林工程有限公司提供,经干燥、粉碎、过筛后备用。

苄基三正丙基氯化铵、氯化胆碱、甜菜碱、丙氨酸、尿素、乙二醇、乳酸、甘油、苹果酸、乙酰丙酸、苯乙酸等,上海源叶生物科技有限公司;EOPO(相对分子质量分别为2 000、2 500、2 870,分别记为EOPO2000、EOPO2500、EOPO2870),浙江绿科安化学有限公司;光谱纯溴化钾、葡萄糖标准品、苯酚、浓硫酸等,成都德斯特生物科技有限公司。

PL-203 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司; Nicolet iS50 傅里叶变换红外光谱仪,美国 Thermo Scientific; V1100 紫外可见分光光度计,上海美析仪器有限公司; GC-MS6800 气相色谱质谱联用仪,江苏天瑞仪器股份有限公司; GPC-IR 高效凝胶渗透色谱仪,北京亿路达机电设备有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 DES的制备

参照文献[21]方法,在80℃下,将一定摩尔比的氢键受体(HBAs)和氢键供体(HBDs)混合物加热搅拌一定时间后获得均匀透明的液体,即为DES。具体的HBAs与HBDs摩尔比及含水量为30%的DES黏度和pH如表1所示。

表1 DES的制备条件及产品指标

DES	HBAs	HBDs	摩尔比	pH	黏度/(mPa·s)
DES1	苄基三正丙基氯化铵	尿素	1:3	5.90 ± 0.04	9.86 ± 0.35
DES2	苄基三正丙基氯化铵	乙二醇	1:3	7.30 ± 0.07	10.24 ± 0.20
DES3	苄基三正丙基氯化铵	乳酸	1:3	1.30 ± 0.05	12.24 ± 0.58
DES4	苄基三正丙基氯化铵	甘油	1:3	6.60 ± 0.06	18.13 ± 0.49
DES5	氯化胆碱	苹果酸	1:1	0.55 ± 0.04	15.26 ± 0.36
DES6	氯化胆碱	乙酰丙酸	1:2	0.36 ± 0.06	11.42 ± 0.26

续表 1

DES	HBAs	HBDs	摩尔比	pH	黏度/(mPa·s)
DES7	氯化胆碱	苯乙酸	1:2	0.49 ± 0.08	13.56 ± 0.35
DES8	氯化胆碱	乙二醇	1:2	5.42 ± 0.06	7.02 ± 0.56
DES9	氯化胆碱	甘油	1:2	7.62 ± 0.08	19.26 ± 0.41
DES10	氯化胆碱	尿素	1:2	8.81 ± 0.04	5.29 ± 0.26
DES11	甜菜碱	乳酸	1:1	1.24 ± 0.05	7.82 ± 0.28
DES12	甜菜碱	苹果酸	1:1	2.79 ± 0.03	17.25 ± 0.24
DES13	甜菜碱	乙二醇	1:2	7.96 ± 0.04	11.29 ± 0.26
DES14	甜菜碱	甘油	1:2	7.24 ± 0.03	20.25 ± 0.34
DES15	丙氨酸	乳酸	1:1	3.86 ± 0.04	18.45 ± 0.29
DES16	丙氨酸	苹果酸	1:1	2.56 ± 0.05	25.65 ± 0.28

1.2.2 多糖的提取

取一定量油用牡丹籽粕粉,加入体积分数为90%的乙醇于索氏提取器,在70℃处理4h,以除去大部分脂肪,脱脂后的残渣在40℃干燥后得到脱脂油用牡丹籽粕粉。脱脂油用牡丹籽粕粉与一定含水量的DES按一定固液比混合,超声处理一定时间后,4000 r/min离心10 min,收集上清液,经Sevag法反复多次除蛋白,得多糖粗提液。按照式(1)计算多糖得率(y_1)。

$$y_1 = \frac{C \times V}{m} \quad (1)$$

式中: C 为粗提液多糖的质量浓度,mg/mL; V 为粗提液的体积,mL; m 为油用牡丹籽粕粉的质量,g。

1.2.3 多糖的 EOPO/DES 双水相萃取

取1 mL多糖粗提液,加入一定量EOPO,充分混匀后静置形成ATPs,其中上相为EOPO相,下相为DES相。按照式(2)计算多糖萃取率(y_2)。

$$y_2 = \frac{C_0 V_0}{C_0 V_0 + C_1 V_1} \times 100\% \quad (2)$$

式中: C_0 和 C_1 分别为EOPO相和DES相多糖的质量浓度,mg/mL; V_0 和 V_1 分别为EOPO相和DES相的体积,mL。

1.2.4 多糖的回收

取1.2.3中EOPO相,置于70℃水浴以诱导形成两相,上相主要为EOPO(可重复使用),下相为富含多糖的水相,水相减压浓缩、冷冻干燥后即得多糖(DES-P)。按照式(3)计算多糖回收率(y_3)。

$$y_3 = \frac{C_b V_b}{C_b V_b + C_t V_t} \times 100\% \quad (3)$$

式中: C_t 和 C_b 分别为上相和下相多糖的质量浓度,mg/mL; V_t 和 V_b 分别为上相和下相的体积,mL。

1.2.5 多糖含量的测定

以葡萄糖为标准品采用苯酚硫酸法^[4]测定多

糖含量。

1.2.6 多糖理化特性测定

1.2.6.1 相对分子质量

参考Li等^[22]的方法,在绘制相对分子质量校正标准曲线基础上,采用高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)对多糖的平均相对分子质量进行测定。

1.2.6.2 单糖组成

参考秦春青等^[23]的方法测定多糖的单糖组成。

1.2.6.3 结构表征

采用傅里叶变换红外光谱仪对多糖结构进行表征。多糖用KBr粉末研磨并压入一个直径为1 mm的小球中,在400~4000 cm⁻¹进行测定。

1.2.7 数据统计分析

试验数据采用Duncan多范围试验进行统计分析, $p < 0.05$ 被认为具有统计学意义。所有数据中的误差棒表示3次重复试验的标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 油用牡丹籽粕多糖的DES提取

2.1.1 DES种类对多糖提取效果的影响

固定固液比1:30、DES含水量30%、提取温度50℃、提取时间40 min,研究16种DES对油用牡丹籽粕多糖提取效果的影响,结果如表2所示。

由表2可知,16种DES中,DES8具有最佳油用牡丹籽粕多糖提取效果($p < 0.05$),这可能归因于DES8具有相对较低的黏度和弱酸性。据报道,DES物理特性如溶解度、黏度、表面张力和极性等因素是影响DES提取效果的重要因素^[24],高黏度会阻碍目标化合物在溶液中的扩散,传质效果弱^[25]。此外,DES8中氢键供体乙二醇结构中含有两个羟基,多糖与乙二醇之间的氢键相互作用更强,可以提高多糖得率。因此,选择DES8作为提取剂进行后续研究。

表2 DES种类对油用牡丹籽粕多糖提取效果的影响

DES	多糖得率	DES	多糖得率	DES	多糖得率	DES	多糖得率
DES1	64.52 ± 1.26 ⁱ	DES5	55.69 ± 1.41 ^l	DES9	85.64 ± 1.06 ^e	DES13	82.56 ± 1.21 ^d
DES2	72.36 ± 1.35 ^h	DES6	61.25 ± 1.26 ^k	DES10	90.26 ± 1.34 ^b	DES14	79.16 ± 1.29 ^f
DES3	78.59 ± 1.48 ^f	DES7	80.42 ± 1.24 ^e	DES11	75.41 ± 1.08 ^g	DES15	62.45 ± 1.24 ^j
DES4	60.23 ± 1.52 ^k	DES8	96.56 ± 1.09 ^a	DES12	61.23 ± 1.12 ^k	DES16	56.59 ± 1.35 ^l

注:肩标不同表示有显著差异($p < 0.05$),下同。

2.1.2 DES含水量对多糖提取效果的影响

固定固液比 1:30、提取温度 50℃、提取时间 40 min,研究 DES 含水量对油用牡丹籽粕多糖提取效果的影响,结果如图 1 所示。

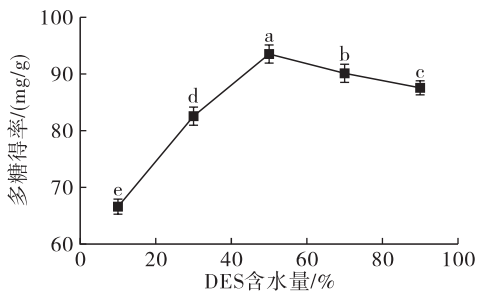


图1 DES含水量对油用牡丹籽粕多糖提取效果的影响

由图 1 可知,随着 DES 含水量由 10% 增加至 50%,多糖得率呈逐渐增加趋势($p < 0.05$),当 DES 含水量继续增加时,多糖得率逐渐下降。可能是因为适量水的加入可降低 DES 的黏度,提高传质效果,但含水量过大会破坏 HBAs、HBDs 和多糖之间的氢键相互作用,导致 DES 的提取能力下降。因此,确定 DES 含水量为 50%。

2.1.3 固液比对多糖提取效果的影响

固定 DES 含水量 50%、提取温度 50℃、提取时间 40 min,研究固液比对油用牡丹籽粕多糖提取效果的影响,结果如图 2 所示。

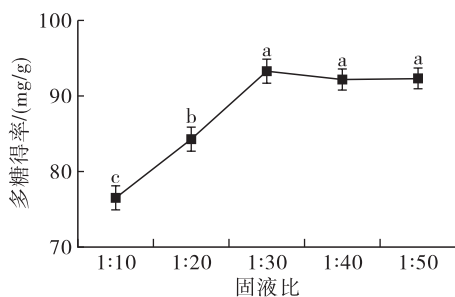


图2 固液比对油用牡丹籽粕多糖提取效果的影响

由图 2 可知,在固液比 1:10 ~ 1:30 的范围内,多糖得率随固液比的增加而增加($p < 0.05$),继续增加固液比时,多糖得率变化不显著($p > 0.05$)。可能是因为固液比较小时,会导致提取量不足,固液比过大会导致浪费,甚至不利于提取。因此,确定固液比为 1:30。

2.1.4 提取温度对多糖提取效果的影响

固定 DES 含水量 50%、固液比 1:30、提取时间 40 min,研究提取温度对油用牡丹籽粕多糖提取效果的影响,结果如图 3 所示。

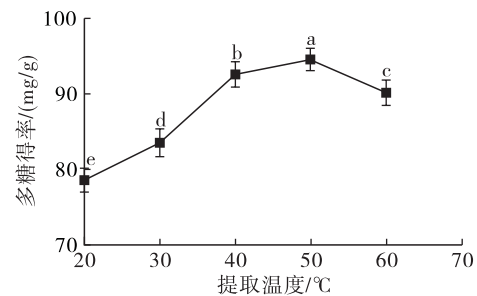


图3 提取温度对油用牡丹籽粕多糖提取效果的影响

由图 3 可知,多糖得率随着提取温度的升高而增加,当提取温度超过 50℃ 后,多糖得率呈下降趋势。可能是因为较高的温度可以加速分子的扩散,使细胞结构更易被破坏,促进多糖溶出,而过高的温度可能引起热敏性物质分解,影响其得率。因此,确定提取温度为 50℃。

2.1.5 提取时间对多糖提取效果的影响

固定 DES 含水量 50%、固液比 1:30、提取温度 50℃,研究提取时间对油用牡丹籽粕多糖提取效果的影响,结果如图 4 所示。

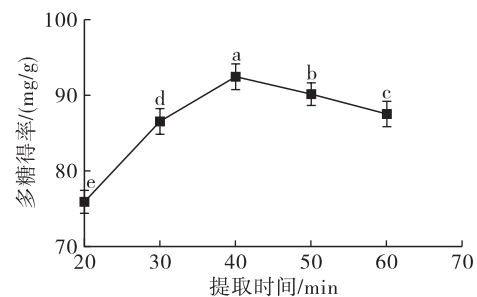


图4 提取时间对油用牡丹籽粕多糖提取效果的影响

由图 4 可知,多糖得率在 20 ~ 40 min 范围内随提取时间延长逐渐增加($p < 0.05$),而后随着提取时间的继续延长而降低。此现象归因于多糖在一定时间内溶出率提高,但过长的提取时间可能会破坏多糖的结构,降低其得率。因此,确定 40 min 为最佳的提取时间。

在以 DES8 为提取剂、DES 含水量 50%、固液比 1:30、提取温度 50℃、提取时间 40 min 下按 1.2.2 进行多糖提取,测得多糖得率为 96.58 mg/g。

2.2 EOPO/DES 双水相萃取多糖

2.2.1 EOPO 相对分子质量对多糖萃取效果的影响

取 1 mL 多糖粗提液,加入 EOPO 使其在溶液中终质量分数为 55%,在萃取温度为 45℃ 条件下,研究 EOPO 相对分子质量对多糖萃取效果的影响,结果见图 5。

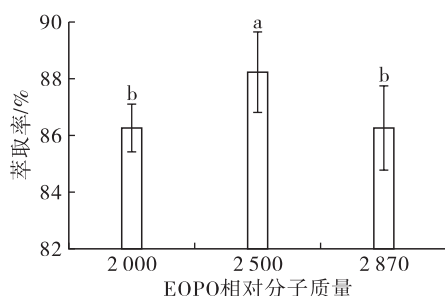


图 5 EOPO 相对分子质量对多糖萃取效果的影响

EOPO 相对分子质量不同,其黏性也不同,从而影响双水相体系成相能力。由图 5 可知,在双水相体系中,相对分子质量为 2500 的 EOPO 形成的双水相体系多糖萃取率最高,且与其他两种相对分子质量的 EOPO 相比,具有显著差异($p < 0.05$),这归因于 EOPO 的链长、极性和黏度共同影响双水相萃取效果。因此,确定采用 EOPO2500 进行后续试验。

2.2.2 EOPO2500 终质量分数对多糖萃取效果的影响

取 1 mL 多糖粗提液,加入不同量的 EOPO2500 使其形成不同终质量分数,在萃取温度为 45℃ 条件下,研究 EOPO2500 终质量分数对多糖萃取效果的影响,结果见图 6。

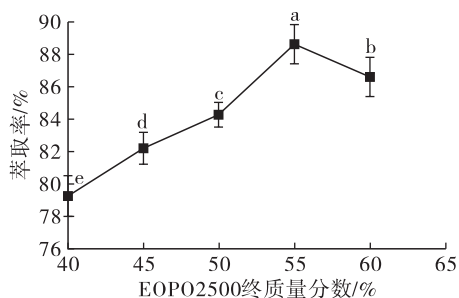


图 6 EOPO2500 终质量分数对多糖萃取效果的影响

由图 6 可知,多糖萃取率随着 EOPO2500 终质量分数逐渐增加而增加,当 EOPO 终质量分数为 55% 时,多糖萃取率达到最大。可能是因为较高质量分数的 EOPO 增加了多糖与 EOPO 间的接触面

积,促进多糖优先分配在 EOPO 相。随着 EOPO 终质量分数的继续增加,多糖萃取率略有下降,可能是由于高质量分数下共聚物的熵效应和体积排阻效应的结果。另外,过高的质量分数导致其黏度较大,不利于多糖富集在 EOPO 相。因此,确定 EOPO2500 终质量分数为 55%。

2.2.3 萃取温度对多糖萃取效果的影响

取 1 mL 多糖粗提液,加入 EOPO2500 使其终质量分数为 55%,研究萃取温度对多糖萃取效果的影响,结果如图 7 所示。

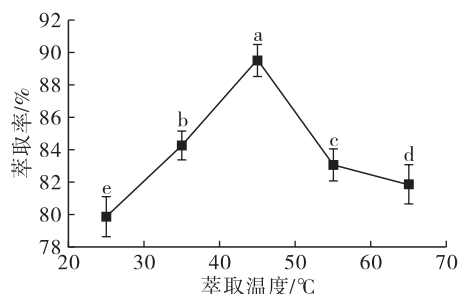


图 7 萃取温度对多糖萃取效果的影响

由图 7 可知,随萃取温度升高多糖萃取率增大,当萃取温度超过 45℃ 时,多糖萃取率呈下降趋势。适当升高温度可以降低黏度,加速目标化合物在两相间的分布。但随着萃取温度不断升高,EOPO 相饱和度增加,多糖的自由空间减小,降低了多糖萃取率。同时,EOPO 是一种温度敏感性的聚合物,其浊点约在 70℃^[26]。当萃取温度持续接近浊点时,EOPO 与多糖分离,阻碍多糖进入 EOPO 相。因此,确定萃取温度为 45℃。

在 EOPO/DES 体系中,当 EOPO2500 终质量分数为 55%、萃取温度为 45℃ 时,多糖萃取率最高,为 89.56%。

2.3 多糖的回收率

按 1.2.4 回收多糖,测得多糖回收率为 86.15%。

2.4 多糖化学组成和结构特征

经测定,DES-P 的纯度为 76.59%,蛋白质含量为 1.29%。结果表明,采用 DES 双水相提取油用牡丹籽粕多糖是一种有效的提取方法。

由 HPGPC 测定的 DES-P 的相对分子质量分布如图 8 所示。由图 8 可知,DES-P 由两个对称的峰组成,表明二者属于不同种类。由校正曲线建立的回归方程为 $\log M_w = -0.3411X + 9.8942$ (M_w 为平均相对分子质量, X 为洗脱时间),相关系数(R^2)为 0.9929。根据该方程计算 DES-P 的两个对称峰平均相对分子质量分别为 67.76 kDa (88.26%) 和 2.26 kDa (11.74%)。

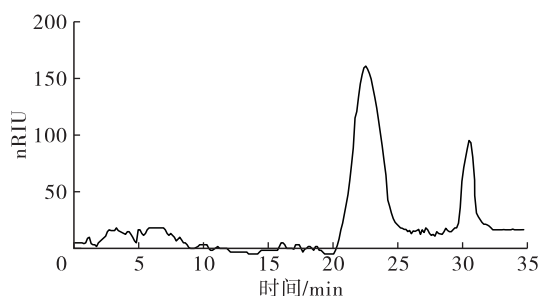


图8 DES-P 相对分子质量分布

DES-P 的总离子流图如图9所示,通过与单糖标准品的保留时间进行比较,确定DES-P主要由阿拉伯糖、甘露糖和葡萄糖组成,其摩尔比为1:2.5:0.78。

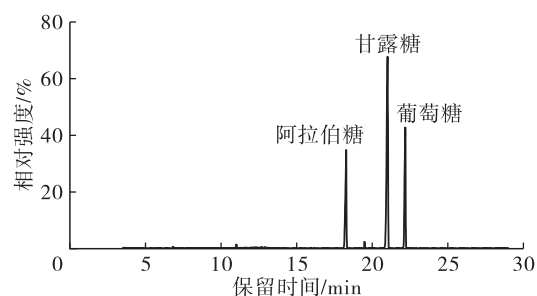


图9 DES-P 的总离子流图

DES-P 的红外光谱谱图如图10所示。由图10可知:在 3424 、 2921 cm^{-1} 处的强吸收峰归因于O—H和C—H的拉伸振动; 1643 、 1414 cm^{-1} 左右吸收峰归因于羧基和羰基的存在; $1000 \sim 1200$ cm^{-1} 吸收峰表明DES-P存在C—O—C和C—O—H; 855 cm^{-1} 左右吸收峰归因于多糖中 β -糖苷键。

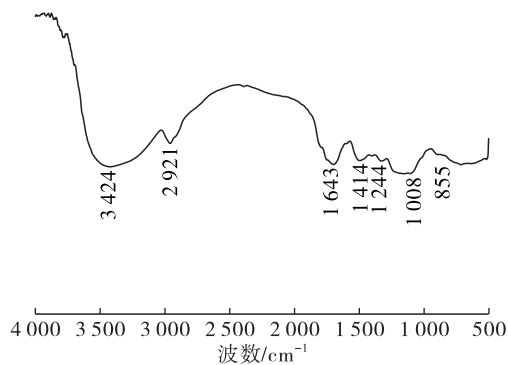


图10 DES-P 红外光谱图

3 结论

在本研究中,构建了一种基于温度敏感性低共熔溶剂双水相萃取分离油用牡丹籽粕多糖的方法,采用DES(氯化胆碱-乙二醇)作为最佳提取剂,当其含水量50%,固液比1:30、提取温度 50°C 、提取时间40 min时,多糖得率为 96.58 mg/g。随后,采用EOPO/DES双水相萃取分离多糖,当EOPO2500终质量分数为55%、萃取温度为 45°C 时,多糖在

EOPO相萃取率为89.56%;将EOPO相在 70°C 水浴进行温度诱导分相,实现了多糖的回收,回收率为86.15%;所制备的多糖(DES-P)的平均相对分子质量分别为67.76 kDa(88.26%)和2.26 kDa(11.74%),由阿拉伯糖、甘露糖和葡萄糖组成,三者摩尔比为1:2.5:0.78。温敏性低共熔溶剂双水相体系ATPS具有环境友好、萃取能力强、操作简单、效率高、组分便于回收等特性,可作为多糖萃取分离的有效方法。

参考文献:

- [1] 陈君红. 油用牡丹籽化学成分分析及提取制备工艺研究[D]. 陕西汉中:陕西理工大学, 2018.
- [2] 刘普, 李小方, 牛亚琪, 等. 油用牡丹籽饼粕低聚芪类化合物提取工艺及活性研究[J]. 中国粮油学报, 2016, 31(6): 79-85.
- [3] ZHANG F, SHI J J, THAKUR K, et al. Anti-cancerous potential of polysaccharide fractions extracted from peony seed dreg on various human cancer cell lines via cell cycle arrest and apoptosis[J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 102.
- [4] SHI J J, ZHANG J G, SUN Y H, et al. Physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides sequentially extracted from peony seed dreg[J]. Int J Biol Macromol, 2016, 91: 23-30.
- [5] TANG Y, ZHU Z Y, PAN L C, et al. Structure analysis and anti-fatigue activity of a polysaccharide from *Lepidium meyenii* Walp [J]. Nat Prod Res, 2019, 33(17): 2480-2489.
- [6] ZHOU J, ZOU P, JING C, et al. Chemical characterization and bioactivities of polysaccharides from *Apocynum venetum* leaves extracted by different solvents [J]. J Food Meas Character, 2019, 14(2): 1-10.
- [7] CHAI Y, KAN L, ZHAO M. Enzymatic extraction optimization, anti-HBV and antioxidant activities of polysaccharides from *Viscum coloratum* (Kom.) Nakai[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 134: 588-594.
- [8] CHEN X, CHEN G, WANG Z, et al. A comparison of a polysaccharide extracted from ginger (*Zingiber officinale*) stems and leaves using different methods: preparation, structure characteristics, and biological activities[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 151: 635-649.
- [9] PAIVA A, CRAVEIRO R, AROSO I, et al. Natural deep eutectic solvents - solvents for the 21st century [J]. ACS Sustain Chem Eng, 2014, 2(5): 1063-1071.
- [10] TANG B, ROW K H. Recent developments in deep eutectic solvents in chemical sciences [J]. Monatsh Chem Chem Mon, 2013, 144(10): 1427-1454.
- [11] GARCÍA A, RODRÍGUEZ - JUAN E, RODRÍGUEZ - GUTIÉRREZ G, et al. Extraction of phenolic compounds

- from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs) [J]. *Food Chem*, 2016, 197: 554 – 561.
- [12] NAM M W, ZHAO J, LEE M S, et al. Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor – made deep eutectic solvents: application to flavonoid extraction from *Flos sophorae* [J]. *Green Chem*, 2015, 17 (3): 1718 – 1727.
- [13] DAI Y, ROZEMA E, VERPOORTE R, et al. Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents[J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1434: 50 – 56.
- [14] FERREIRA G B, EVANGELISTA A F, JUNIOR S, et al. Partitioning optimization of proteins from *Zea mays* malt in ATPS PEG 6000/CaCl₂ [J]. *Braz Arch Biol Technol*, 2007, 50(3): 557 – 564.
- [15] CHEN J P, LEE M S. Enhanced production of *Serratia marcescens* Chitinase in PEG/dextran aqueous two – phase systems[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1995, 17(11): 1021 – 1027.
- [16] OOI C W, TEY B T, HII S L, et al. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt – based aqueous two – phase systems [J]. *Process Biochem*, 2009, 44(10): 1083 – 1087.
- [17] JIANG B, FENG Z, LIU C, et al. Extraction and purification of wheat – esterase using aqueous two – phase systems of ionic liquid and salt[J]. *J Food Sci Technol*, 2015, 52(5): 2878 – 2885.
- [18] 王良, 荆雨众, 逯洋, 等. 温敏性聚合物 EOPO – K₂HPO₄ 双水相浮选高效液相色谱分离/富集食品中痕量的环丙沙星[J]. *分析化学*, 2015, 43(6): 886 – 892.
- [19] 霍清, 周平. 利用 EOPO/盐温度诱导双水相体系分离纯化苦参碱的研究[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(6): 2339 – 2340.
- [20] 范勇. 辣椒精中辣椒碱的提取纯化工艺研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2016.
- [21] GARCÍA G, APARICIO S, ULLAH R, et al. Deep eutectic solvents: physicochemical properties and gas separation applications[J]. *Energ Fuel*, 2015, 29(4): 2616 – 2644.
- [22] LI C, LI X, YOU L, et al. Fractionation, preliminary structural characterization and bioactivities of polysaccharides from *Sargassum pallidum* [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 155: 261 – 270.
- [23] 秦春青, 阮家耀, 王瑞宇, 等. 枇杷叶多糖分离纯化及其单糖组成研究[J]. *中草药*, 2018 (14): 3240 – 3244.
- [24] BUBALO M C, ĆURKO N, TOMAŠEVIĆ M, et al. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents[J]. *Food Chem*, 2016, 200: 159 – 166.
- [25] DUAN L, DOU L, GUO L, et al. Comprehensive evaluation of deep eutectic solvents in extraction of bioactive natural products [J]. *ACS Sustain Chem Eng*, 2016, 4(4): 2405 – 2411.
- [26] DEMBCZYSKI R, BIALAS W, JANKOWSKI T. Recycling of phase components during lysozyme extraction from hen egg white in the EO50PO50/K₂HPO₄ aqueous two – phase system[J]. *Biochem Eng J*, 2010, 51(1/2): 24 – 31.
-
- (上接第 59 页)
- [5] VARGAS – RAMELLA M, MUNEKATA P E S, PATEIRO M, et al. Physicochemical composition and nutritional properties of deer burger enhanced with healthier oils[J]. *Foods*, 2020, 9(5): 119 – 223.
- [6] 李媛媛, 吴雪辉, 段卓. 微波处理对亚麻籽油品质的影响[J]. *中国油脂*, 2015, 40(1): 55 – 58.
- [7] 任海伟, 李雪, 唐学慧. 亚麻籽粒及其油脂的特性分析与营养评价[J]. *食品工业科技*, 2011, 32(6): 143 – 145.
- [8] 韩飞, 马广强, 熊魏, 等. 牛至油增强小鼠免疫功能的实验[J]. *中国医院药学杂志*, 2020, 40(10): 1106 – 1110.
- [9] 王晓林, 戴鹏莹, 邸松, 等. 刺苳参胶囊对小鼠免疫功能的影响[J]. *现代食品*, 2020(5): 162 – 166.
- [10] 史顶聪, 赵宏宇, 佟晓乐, 等. 红景天当归不同配伍对免疫低下小鼠免疫功能的影响[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(5): 28 – 33.
- [11] 喻建辉, 周明良, 余春涛, 等. 蜂胶对调节小鼠免疫功能的影响[J]. *农产品加工*, 2020(10): 22 – 26.
- [12] 陈小英, 曾晏萍, 刘汉儒, 等. 太子参须多糖粗提物对小鼠免疫功能的调节作用[J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2020, 42(4): 56 – 64.
- [13] 杨迪, 李丽杰, 张曾亮, 等. 南极磷虾油灵芝孢子油纳米乳复合物提高小鼠的免疫功能[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(5): 14 – 21, 50.
- [14] 刘威良, 吴白芬, 黄艾祥. 两种提取工艺的辣木籽油对小鼠免疫活性的影响[J]. *中国油脂*, 2020, 45(6): 92 – 96.
- [15] CAO J, ZHANG H H, YANG Z M, et al. Effect of dehydroepiandrosterone on the immune response and gut microbiota in dextran sulfate sodium – induced colitis mice [J]. *Mol Immunol*, 2020, 118: 60 – 72.