

正交设计优化双斛胶囊的总多糖水提取工艺[△]

单冰冰*, 陈 宽, 李 婷, 田富月, 张建永[#](遵义医科大学药学院, 贵州 遵义 563000)

中图分类号 R284.2;R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)18-2508-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.18.11

摘要 目的:优化双斛胶囊总多糖的水提取工艺。方法:对双斛胶囊组方药材金钗石斛和铁皮石斛混合物在以醇提取总生物碱之后进行水提取总多糖。以葡萄糖为对照品,采用硫酸-苯酚法显色处理并在488 nm波长处检测,测定总多糖含量。以干膏得率和总多糖含量计算的综合评分为评价指标,采用单因素试验考察料液比、提取温度、提取时间和提取次数对提取效果的影响;根据单因素试验考察结果,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行设计和试验,进一步优化料液比、提取温度、提取时间、提取次数等条件,并对所得优化工艺进行验证试验。结果:葡萄糖质量浓度在0.041 4~0.207 0 mg/mL范围内与吸光度的线性关系良好($r=0.999 9$);日内、日间RSD为3.61%~8.24%($n=3, n=5$),重复性试验RSD为1.49%($n=6$);平均加样回收率为98.65%(RSD=1.45%, $n=6$)。优化后的水提取工艺为料液比1:25(g/mL)、提取温度100℃、提取时间90 min、提取1次;3次验证试验结果显示,优化工艺所得水提物的平均总多糖含量为379.292 8 mg/g(RSD=1.93%, $n=3$)、平均干膏得率为22.75%(RSD=2.41%, $n=3$)。结论:所建立的硫酸-苯酚法简便,精密度、准确度均良好;优化所得的水提取工艺稳定、可行,可用于双斛胶囊总多糖的提取。

关键词 双斛胶囊;金钗石斛;铁皮石斛;总多糖;硫酸-苯酚法;含量测定;干膏得率;正交试验;工艺优化

Optimization of Water Extraction Technology of Total Polysaccharide of Shuanghu Capsules by Orthogonal Design

SHAN Bingbing, CHEN Kuan, LI Ting, TIAN Fuyue, ZHANG Jianyong (School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 563000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the water extraction technology of total polysaccharide of Shuanghu capsules. METHODS: The total alkaloid was firstly extracted from *Dendrobium nobile* and *Dendrobium officinale* mixture of Shuanghu capsules with ethanol, and then total polysaccharide was extracted with water. Using glucose as control, total polysaccharide was treated with phenol-sulfuric acid method and its content was determined at 488 nm. Using comprehensive score calculated with the yield of the extract and the content of total polysaccharide as index, the effects of material-liquid ratio, extraction temperature, extraction time and times on the extraction were investigated by single factor test. Then $L_9(3^4)$ orthogonal test was used to optimize solid-liquid ratio, extraction temperature, extraction time and extraction times according to the results of single factor test. The optimized technology was validated. RESULTS: The linear range of glucose were 0.041 4-0.207 0 mg/mL ($r=0.999 9$). RSDs of intra-day and inter-day ranged 3.61%-8.24% ($n=3, n=5$), and RSD of repeatability test was 1.49% ($n=6$). Average recovery rate was 98.65% (RSD=1.45%, $n=6$). The optimal water extraction technology included solid-liquid ratio of 1:25 (g/mL), extraction temperature of 100℃, extracting for 90 min, extracting once. Results of validation tests showed that average content of total polysaccharide was 379.292 8 mg/g (RSD=1.93%, $n=3$) and average yield of the extract was 22.75% (RSD=2.41%, $n=3$). CONCLUSIONS: Established phenol-sulphuric acid method is simple, precise and accurate. The optimal water extraction technology is stable and feasible, which can be used for the extraction of total polysaccharides from Shuanghu capsules.

KEYWORDS Shuanghu capsules; *Dendrobium nobile*; *Dendrobium officinale*; Total polysaccharide; Phenol-sulphuric acid method; Content determination; Yield of extract; Orthogonal test; Technology optimization

流行病学调查结果显示,我国饮酒人群比例和酒精性肝病发病率均呈上升趋势,酒精性肝病已成为我国最主要的慢性肝病之一,其可导致机体多系统、多器官损伤,危害不容小觑^[1]。酒精性肝病最基本的病理状态是

酒精性肝损伤(Alcoholic liver disease, ALD), ALD贯穿于酒精性肝病发生的始终^[2]。但目前ALD的发病机制尚未阐明,西医治疗以戒酒、营养支持及对症治疗为主,尚缺乏特效药物^[3]。中医辨证论治是中医理论的精华,其认为ALD是由酒毒湿热之邪熏蒸肝胆,致痰浊凝聚、肝失调达、气血郁滞、脾胃损伤。虽然中医学者和医家尚未对ALD的辨证进行统一,但治法多以清热化湿、理气化痰、补益肝肾为主^[4-6]。因此,如能在辨证论治的指导原则下,结合现代药理学研究成果,可更有针对性地选择药物,使患者获得更好的疗效。

[△] 基金项目:贵州省科技计划项目(No.黔科合重大专项字[2015]6010-1);贵州省普通高等学校科技拔尖人才支持计划(No.黔教合KY字[2017]078)

* 硕士。研究方向:中药新药研发。电话:0851-28642517。E-mail:494814886@qq.com

[#] 通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药质量评价。电话:0851-28642517。E-mail:zhangjianyong2006@126.com

目前,药用石斛属植物共有40多种,其中金钗石斛和铁皮石斛备受关注^[7]。2015年版《中国药典》(一部)收录了金钗石斛(*Dendrobium nobile* Lindl.)和铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo),两者均具有益胃生津、滋阴清热之功效^[8]。石斛性甘、微寒,归肺、胃、肾经,为常用贵重药材,药用历史悠久,《神农本草经》将其列为上品,可用于热病津伤、口干烦渴、胃阴不足和阴虚火旺等多种病症的治疗^[9]。现代药理学研究表明,石斛具有护肝、抗胃溃疡、降血糖、提高免疫力等作用^[10-11]。上述药用历史和药理学成果均佐证了石斛可对ALD发挥治疗作用。金钗石斛和铁皮石斛的主要活性指标成分分为生物碱和多糖^[12],石斛生物碱可缓解高脂血症大鼠肝脏脂肪变性等症状^[13-14],而石斛多糖则在调节受酒精影响的肝功能和脂质代谢等方面发挥着重要作用^[15-16],这两类成分均对肝脏有一定的保护和调节作用,其药理作用既存在差异又相互关联,从现代药理学角度推测两者配伍可能会发挥协同功效。

基于中医辨证论治的整体观,不局限于某一客观指标的改变,本课题组以金钗石斛和铁皮石斛的优势成分总生物碱和总多糖作为活性成分,通过现代提取和制剂手段,制成一种对亚急性ALD具有改善作用的双石斛胶囊。该制剂根据2015年版《中国药典》(一部)中成人日服用量^[8],将金钗石斛和铁皮石斛的用量均以4g(两种药材质量比为1:1)进行配伍后提取制得。其提取工艺主要分为两个步骤:首先对金钗石斛和铁皮石斛的混合物进行醇提取获得总生物碱成分,再将药渣进行水提取获得总多糖成分。本课题组前期已完成双石斛胶囊总生物碱的醇提取工艺的优化(另文刊出),现以总多糖含量和干膏得率为指标,采用正交设计优化双石斛胶囊总多糖的水提取工艺,为该制剂的深入开发提供依据和参考。

1 材料

1.1 仪器

BT125D型十万分之一电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];FA2004N型电子天平(上海菁海仪器有限公司);TU-1900型紫外-分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);AXTGL16M型高速冷冻离心机(盐城市安信试验仪器有限公司);HH-6型数显恒温水浴锅(上海上登实验设备有限公司);FW135型中药材粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司);XH-B型旋涡混合器(姜堰市康健医疗器具有限公司);BCD-579WE型冰箱(青岛海尔股份有限公司)。

1.2 药品与试剂

葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号:0833-9501,纯度:100.0%);无水乙醇(成都金山化学试剂有限公司);浓硫酸(国药集团化学试剂有限公司);苯酚(上海阿拉丁生化股份有限公司);其余试剂均为分析

纯,水为超纯水。

1.3 药材

金钗石斛、铁皮石斛饮片由重庆市渝和堂药业有限公司提供,均产自云南,批号均为20170801。两者经质检全部符合2015年版《中国药典》(一部、四部)“中药材与饮片”项下石斛和铁皮石斛的性状、鉴别及含量测定有关规定,以及“中药其他方法”项下浸出物测定、杂质检查、灰分测定、二氧化硫残留量测定等有关规定。

2 双石斛胶囊的总多糖含量测定

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 取葡萄糖对照品适量,精密称定,加水制成质量浓度为0.207 0 mg/mL的对照品母液;取该母液,以水逐级稀释成相应质量浓度的对照品溶液,备用。

2.1.2 供试品溶液 称取金钗石斛和铁皮石斛粗粉混合物(按质量比1:1混匀,过30目筛,以下同)8g,置于圆底烧瓶中,按前期研究筛选的最佳醇提工艺提取总生物碱(以下同)。取醇提后的药渣,加水回流提取(具体参数见本文后续正交试验优选水提取工艺),放冷,用少量水分次洗涤容器并用纱布过滤水提液和洗液;合并滤液,置于2 000 mL量瓶中,加水定容,摇匀;以3 500 r/min离心15 min,移取上清液1 mL,加入5倍体积的80%乙醇,于4℃冷藏1 h后,再于4℃下以3 500 r/min离心15 min;取沉淀,用4倍体积的80%乙醇继续洗涤,以3 500 r/min离心15 min,弃去上清液,重复操作2次;取沉淀,加少量热水溶解,放冷,再加水定容至10 mL,摇匀,即得。

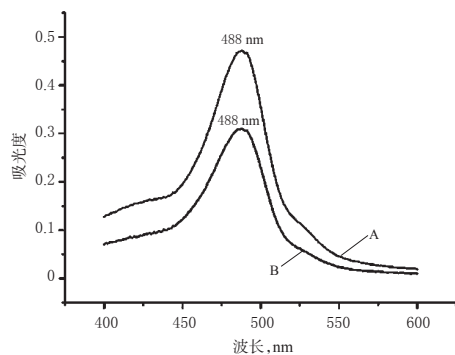
2.2 检测波长的选择

取“2.1”项下制备的对照品溶液(0.124 2 mg/mL)和供试品溶液,采用硫酸-苯酚法^[18,17]进行显色反应:向对照品溶液或供试品溶液中加入5%苯酚溶液0.5 mL(临用时配制),摇匀,再精密加入浓硫酸2.5 mL,摇匀;室温放置5 min后,置沸水浴中加热20 min进行显色反应,取出,置于冰水浴中降温5 min终止反应。以水为空白溶剂对照,采用紫外分光光度计在400~600 nm波长范围内进行光谱扫描。结果,两种溶液均在488 nm波长处有最大吸收峰,故选择488 nm作为测定波长,详见图1。

2.3 方法学考察

2.3.1 显色稳定性考察 称取金钗石斛和铁皮石斛粗粉混合物8g,平行3份,提取总生物碱后取药渣,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下硫酸-苯酚法“加入5%苯酚溶液0.5 mL……置于冰水浴中降温5 min终止反应”步骤处理,分别于处理完毕后第0、30、60、120、240 min时,在488 nm波长处测定吸光度。结果显示,不同时间点样品吸光度的RSD为0.49%($n=5$),表明供试品溶液在显色后的240 min内稳定。

2.3.2 线性关系考察 精密量取“2.1.1”项下对照品母



注: A. 对照品溶液; B. 供试品溶液

Note: A. solution control; B. test sample

图1 紫外扫描图

Fig 1 UV scanning spectra

表1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery tests(n=6)

称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
4.003 2	1 665.249 6	1 663.920 0	3 326.380 0	99.83		
4.002 3	1 664.873 6	1 663.920 0	3 340.632 0	100.71		
4.008 5	1 667.452 6	1 663.920 0	3 278.196 8	96.80		
4.008 8	1 667.577 4	1 663.920 0	3 307.378 0	98.55	98.65	1.45
4.009 3	1 667.785 4	1 663.920 0	3 316.540 0	99.09		
4.004 4	1 665.747 2	1 663.920 0	3 276.060 8	96.89		

3 双料胶囊的总多糖提取工艺优化

3.1 提取工艺的单因素考察

参照文献方法^[18-19]并结合预试验结果,本研究以综合评分法(以总多糖含量和干膏得率计算)进行单因素试验。总多糖含量测定按“2”项下方法进行。取按“2.1.2”项下方法提取获得的总多糖水提液样品200 mL,置于105℃恒质量的蒸发皿中,90℃水浴蒸干,然后在105℃烘箱中干燥3 h,再转移至干燥器中冷却30 min,称定质量并计算干膏得率。设定总多糖含量权重为7分、干膏得率权重为3分(合计10分)依据,按公式计算综合评分:综合评分=(总多糖含量/总多糖含量最大值)×7+(干膏得率/干膏得率最大值)×3。

3.1.1 料液比的考察 称取金钗石斛和铁皮石斛粗粉混合物8 g,提取总生物碱后取药渣,固定提取温度为90℃、提取时间为60 min、提取次数为1次,按药材的原质量分别以料液比1:25、1:30、1:35、1:40、1:45(g/mL,下同)加水,进行加热回流提取,平行操作3次。按前述方法测定总多糖含量和干膏得率,计算综合评分,结果见图2A。由图2A可知,综合评分在料液比为1:25~1:30范围内时呈上升趋势,且在料液比为1:30时达到最大值,随后呈下降趋势。综合以上因素,选择料液比为1:25~1:35进行后续正交试验考察。

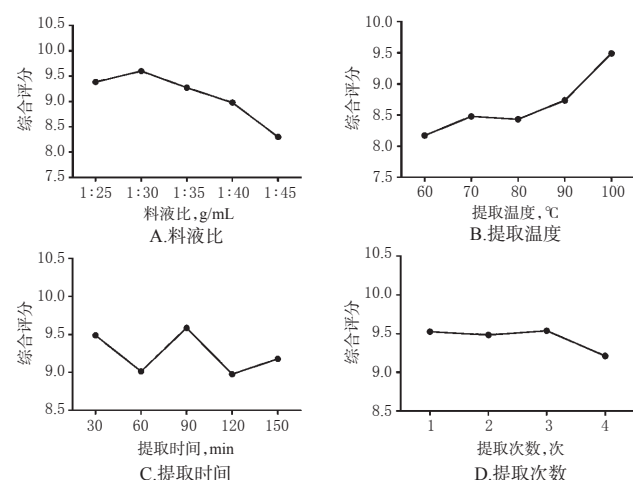


图2 不同因素对提取效果的影响

Fig 2 Effects of different factors on extraction

3.1.2 提取温度的考察 称取金钗石斛和铁皮石斛粗粉混合物8 g,提取总生物碱后取药渣,固定料液比为

液0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL,分别置于刻度试管中,以水稀释至0.5 mL,制成葡萄糖质量浓度分别为0.041 4、0.082 8、0.124 2、0.165 6、0.207 0 mg/mL的系列对照品溶液,按“2.2”项下硫酸-苯酚法进行显色反应。以水为空白溶剂对照,在488 nm波长处测定吸光度。以葡萄糖质量浓度(X, mg/mL)为横坐标、吸光度值(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $Y=3.929 4X+0.001$ ($r=0.999 9$)。结果表明,葡萄糖质量浓度在0.041 4~0.207 0 mg/mL范围内与吸光度的线性关系良好。

2.3.3 精密度试验 称取金钗石斛和铁皮石斛粗粉混合物8 g,提取总生物碱后取药渣,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,于4℃保存。分别于3个不同工作日和每个工作日第0、4、8、12、24 h时,取该供试品溶液,按“2.2”项下硫酸-苯酚法处理后测定,并以外标法计算总多糖含量,分别考察日间与日内精密度。结果,总多糖含量日间RSD为8.24% ($n=3$),日内RSD分别为3.61%、7.50%、5.05% ($n=5$),表明供试品溶液在日间(1~3 d)和日内(0~24 h)均较不稳定,故该供试品溶液需现配现用。

2.3.4 重复性试验 称取金钗石斛和铁皮石斛粗粉混合物8 g,平行6份,提取总生物碱后取药渣,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下硫酸-苯酚法处理后测定,以外标法计算总多糖含量。结果,总多糖含量的RSD为1.49% ($n=6$),表明该方法的重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 称取金钗石斛和铁皮石斛粗粉混合物4 g,平行6份,提取总生物碱后取药渣,分别加入16.639 2 mg/mL的葡萄糖对照品浓溶液(按“2.1.1”项下对照品母液配制方法新配)100 mL,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下硫酸-苯酚法处理后测定,以外标法计算总多糖含量及加样回收率。结果,样品中总多糖的平均加样回收率为98.65%,RSD为1.45% ($n=6$),表明该方法准确度良好,详见表1。

1:30(按药材原质量计)、提取时间为60 min、提取次数为1次,分别在60、70、80、90、100℃加热条件下进行回流提取,平行操作3次。按前述方法测定总多糖含量和干膏得率,计算综合评分,结果见图2B。由图2B可知,当提取温度在60~80℃时,综合评分变化不大,趋于平缓;当提取温度为80~100℃时,综合评分上升较快,在100℃条件下综合评分达最高值(由于实验室条件有限,未继续考察更高的温度)。综合以上因素,选择提取温度为80~100℃进行后续正交试验考察。

3.1.3 提取时间的考察 称取金钗石斛和铁皮石斛粗粉混合物8 g,提取总生物碱后取药渣,固定料液比为1:30(按药材原质量计)、提取温度为100℃、提取次数为1次,分别加热回流提取30、60、90、120、150 min,平行操作3次。按前述方法测定总多糖含量和干膏得率,计算综合评分,结果见图2C。由图2C可知,当提取时间为90 min时,综合评分最高;虽然当提取时间在150 min以上时综合评分也有上升趋势,但考虑到时间成本和能源消耗,并未继续选择更长的提取时间进行比较。综合以上因素,选择提取时间为60~120 min进行后续正交试验考察。

3.1.4 提取次数的考察 称取金钗石斛和铁皮石斛粗粉混合物8 g,提取总生物碱后取药渣,固定料液比为1:30(按药材原质量计)、提取温度为100℃、提取总时间为90 min,分别加热回流提取1、2、3、4次,平行操作3次。按前述方法测定总多糖含量和干膏得率,计算综合评分,结果见图2D。由图2D可知,当提取1~3次时,综合评分差异不大,但提取4次时综合评分有下降趋势。综合以上因素,选择提取次数为1~3次进行后续正交试验考察。

3.2 正交试验优化提取工艺

3.2.1 正交试验考察 根据单因素试验结果,以料液比(A)、提取温度(B)、提取时间(C)、提取次数(D)为影响因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行设计和试验,平行操作3次,按前述方法测定总多糖含量和干膏得率,计算综合评分,并以综合评分作为评价指标。因素与水平见表2,正交试验设计与结果见表3,方差分析结果见表4。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	A, g/mL	B, °C	C, min	D, 次
1	1:25	80	60	1
2	1:30	90	90	2
3	1:35	100	120	3

由表3、表4可知,因素水平 $A_1B_3C_2D_1$ 对提取工艺影响相对较大,其中以离差平方和最小的因素项(D)为误差项进行方差分析,根据极值(R)大小,确定A因素(料液比)对提取工艺的影响最大,各因素对综合评分影响的顺序为 $A>C>B>D$;除A因素对工艺的影响有统计

表3 正交试验设计与结果

Tab 3 Design and results of orthogonal tests

试验号	A	B	C	D	综合评分
1	1	1	1	1	9.11
2	1	2	2	2	9.40
3	1	3	3	3	9.57
4	2	1	2	3	9.13
5	2	2	3	1	9.16
6	2	3	1	2	9.19
7	3	1	3	2	8.79
8	3	2	1	3	8.47
9	3	3	2	1	9.24
K_1	9.360	9.013	8.923	9.172	
K_2	9.160	9.011	9.257	9.126	
K_3	8.834	9.331	9.175	9.057	
R	0.526	0.320	0.334	0.115	

表4 方差分析结果

Tab 4 Results of variance analysis

因素	离差平方和	自由度	F比	F临界值	P
A	0.423	2	21.150	19.000	<0.05
B	0.204	2	10.200	19.000	>0.05
C	0.182	2	9.100	19.000	>0.05
D(误差)	0.020	2	1.000	19.000	>0.05

学意义外,其余因素的影响均无统计学意义。综合考虑提取效率和试验条件等因素,结合单因素考察结果,确定总多糖水提取工艺的最佳工艺条件为 $A_1B_3C_2D_1$,即料液比为1:25(g/mL)、提取温度为100℃、提取时间为90 min、提取1次。

3.2.2 验证试验 称取金钗石斛和铁皮石斛粗粉混合物8 g,提取总生物碱后取药渣,按“3.2.1”项下最佳工艺条件进行水提取及干燥,平行操作3次。按前述方法测定并计算水提物样品中的总多糖含量和干膏得率。结果,平均总多糖含量为379.292 8 mg/g(RSD=1.93%, $n=3$),平均干膏得率为22.75%(RSD=2.41%, $n=3$),表明优选水提取工艺条件稳定、合理、可行。

4 讨论

多糖是一种结构复杂的生物大分子,是由多个单糖分子缩合形成糖苷键,并以糖苷键进行线性或分枝连接而成的糖类化合物,是许多中药如灵芝、人参等中的活性成分^[20]。目前,多糖提取方法有加热提取法、微波提取法、超声波辅助水提法、酶解辅助提取法等^[21]。但多糖经过超声或微波处理后其糖苷键可能会发生断裂;酶解辅助提取法虽然提取率较高,但酶反应条件要求严格,会增加生产成本,且目前尚停留在实验室研究阶段,暂不能直接用于工厂规模化生产^[22]。本研究采用的水提取法是目前最常用的多糖提取方法,工艺条件简单、易控制。综合考虑石斛药材的昂贵价格,从降低生产成本的角度,本课题组对双斛胶囊的2种组方药材中的两类主要成分采用先醇提取总生物碱,然后水提取总多糖的步骤进行提取。本研究是在前期醇提取总生物碱的

优化提取工艺确定后,对其药渣进行总多糖的水提工艺优化研究,旨在最大程度地保留2种石斛药材的有效成分。

目前,多糖含量的测定方法一般有比色法、滴定法、高效液相色谱法等,其中比色法应用最广泛,主要包括硫酸-苯酚法、硫酸蒽酮法和3,5-二硝基水杨酸法等^[20,23]。多糖比色法抗干扰能力较弱,药材的不同产地、对照品的选择、反应温度和时间等因素都会对多糖含量测定结果产生一定的干扰^[20,23]。故本研究参考文献中报道较多的石斛多糖含量测定方法^[24-25],以葡萄糖为对照品,采用硫酸苯酚法进行多糖含量测定,并对含量测定方法进行方法学验证。结果显示,供试品溶液的日间精密度和日内精密度RSD值均偏大,提示经硫酸、苯酚处理后的水提液样品稳定性不佳,因此应尽快完成提取工艺的操作,减少存储等外界条件对总多糖含量的干扰,并且供试品溶液需现配现用,以确保其有效成分的稳定。

本研究对醇提取总生物碱后的药渣进行水提取工艺考察,首先通过单因素试验初步确定料液比、提取温度、提取时间、提取次数对总多糖含量和干膏得率(以两者计算的综合评分为评价指标)的影响。在单因素考察结果的基础上进行正交设计优化,确定各因素对综合评分的影响程度排序为料液比>提取时间>提取温度>提取次数,其中料液比对综合评分的影响最为显著($P<0.05$)。综合考虑其他因素,如提取温度越高时多糖含量越高、不同提取时间条件下综合评分差异不大、提取次数增多会对后续浓缩干燥带来诸多不便等情况,最终确定最佳水提取工艺为料液比1:25(g/mL)、提取温度100℃、提取时间90min、提取1次。经验证试验表明,该提取工艺稳定、可行,可为双石斛胶囊的下一步开发利用奠定良好的基础。

综上所述,本研究所建立的硫酸苯酚法简便,精密度、准确度均良好;优化所得的水提取工艺稳定、可行,可用于双石斛胶囊总多糖的提取。

参考文献

[1] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组,中国医师协会脂肪性肝病专家委员会.酒精性肝病防治指南:2018更新版[J].中华肝脏病杂志,2018,26(3):188-194.

[2] 殷晓轩,尹常健.酒精性肝病中医用药规律探讨[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(12):285-287.

[3] 罗晨,杨嘉恩,梁惠卿.酒精性肝病中西医辨治研究进展[J].医学信息:下旬刊,2018,31(15):16-19.

[4] 安国辉,秦璇,赵瑞占.单味中药防治酒精性肝损伤实验研究概况[J].中西医结合肝病杂志,2014,24(3):189-192.

[5] 刘宇飞,潘军英,滕林,等.酒精性肝损伤中医药用药特点研究[J].中医药信息,2016,33(3):126-128.

[6] 庞树朝,郭卉.中医药治疗酒精性肝病研究述评[J].世界

中西医结合杂志,2016,11(1):140-145.

[7] 徐琼,陈素红,吕圭源.3种不同石斛的化学成分及相关药理学研究进展[J].亚太传统医药,2010,6(4):115-118.

[8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:92-93,282-283.

[9] 秦子芳,谭晓妍,宁慧娟,等.不同生长年限铁皮石斛多糖含量与特性分析[J].食品科学,2018,39(6):189-192.

[10] 张雪琴,赵庭梅,刘静,等.石斛化学成分及药理作用研究进展[J].中草药,2018,49(13):3174-3182.

[11] TEIXEIRA DA SILVA JA, NG TB. The medicinal and pharmaceutical importance of *Dendrobium* species[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(6):2227-2239.

[12] 徐云燕,王令仪,黄彬,等.不同生长期金钗石斛和铁皮石斛中总生物碱及多糖的比较[J].华西药学杂志,2014,29(3):288-291.

[13] LAM Y, NG TB, YAO RM, et al. Evaluation of chemical constituents and important mechanism of pharmacological biology in *Dendrobium* plants[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015. DOI:10.1155/2015/841752.

[14] 周威,夏杰,孙文博,等.金钗石斛的化学成分和药理作用研究现状[J].中国新药杂志,2017,26(22):2693-2700.

[15] TANG H, ZHAO T, SHENG Y, et al. *Dendrobium officinale* Kimura et Migo: a review on its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and industrialization[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017. DOI:10.1155/2017/7436259.

[16] 钱明雪,李胜立,李凡,等.6种石斛多糖抗亚急性酒精性肝损伤作用的比较[J].中国药学杂志,2015,50(24):2117-2123.

[17] 颜寿,赵庭梅,张雪琴,等.合江金钗石斛在不同采收期时多糖和石斛碱含量的比较[J].中国药房,2018,29(1):73-77.

[18] 李计萍.中药新药研究中多糖含量测定方法探讨[J].中国中药杂志,2014,39(17):3392-3394.

[19] 周思静,刘桂君,周敏,等.石斛多糖的研究进展[J].食品科学,2018,39(21):316-322.

[20] 华允芬.铁皮石斛多糖成分研究[D].杭州:浙江大学,2005.

[21] 邹荣灿,王乾,孙俊,等.国内近10年铁皮石斛多糖研究进展[J].食品研究与开发,2018,39(12):209-214.

[22] 王洪云,李铭.酶技术在石斛多糖提取中的应用[J].云南中医中药杂志,2014,35(6):81-83.

[23] 孙晓燕,蔡昌利,徐丽莉,等.多糖含量测定方法的比较[J].现代中药研究与实践,2015,29(3):58-62.

[24] 敖娇,鲍家科,夏玉吉.金钗石斛中生物碱与多糖含量的测定[J].中成药,2017,39(8):1736-1739.

[25] 戴忠华,樊柳园,朱华,等.广西产铁皮石斛药材多糖含量与生物量变化研究[J].中华中医药学刊,2018,36(8):1829-1833.

(收稿日期:2019-05-07 修回日期:2019-08-07)
(编辑:段思怡)