

正交设计优化双斛胶囊中总生物碱的醇提取工艺^Δ

陈宽*,单冰冰,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 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)14-1909-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.14.08

摘要 目的:优化双斛胶囊总生物碱的醇提取工艺。方法:以石斛碱为对照品,采用酸性染料比色法测定双斛胶囊中主药金钗石斛和铁皮石斛的总生物碱含量。以干膏得率和总生物碱含量计算的综合评分作为评价指标,采用单因素试验考察浸泡时间、乙醇体积分数、提取时间、料液比和提取次数对提取效果的影响;根据单因素试验结果采用 $L_9(3^4)$ 正交试验进一步对乙醇体积分数、提取时间、料液比和提取次数进行优化,并对优化工艺进行验证试验。结果:石斛碱质量浓度在4.16~14.56 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与吸光度呈良好的线性关系($r=0.999\ 2$);重复性试验、精密度试验的RSD均小于5%;平均加样回收率为93.01% (RSD=1.97%, $n=6$)。优化后的醇提取工艺为浸泡12 h后,按乙醇体积分数为70%、料液比为1:12(g/mL)提取28 min,共提取3次;验证试验结果显示,优化工艺所得干膏的平均得率为12.80% (RSD=4.39%, $n=3$),平均生物碱含量为0.359 0 mg/g (RSD=0.66%, $n=3$)。结论:所建立的酸性染料比色法操作简便,精密度和准确度均良好,可用于总生物碱的含量测定;优化的醇提取工艺稳定、可行,可用于双斛胶囊中总生物碱的提取。

关键词 双斛胶囊;金钗石斛;铁皮石斛;单因素试验;正交试验;总生物碱;含量测定;干膏得率

Optimization of the Ethanol Extraction Technology of Total Alkaloids from Shuanghu Capsules by Orthogonal Design

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

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the ethanol extraction technology of total alkaloids from Shuanghu capsules. METHODS: Using dendrobine as control, the contents of total alkaloids from *Dendrobium nobile* and *Dendrobium officinale* in Shuanghu capsules were determined by acidic dyes colorimetry. Using comprehensive scores calculated by the yield of the extract and the contents of total alkaloids as evaluation indexes, the effects of soaking time, ethanol volume fraction, extraction time, solid-liquid ratio and extraction times were investigated with single factor tests. $L_9(3^4)$ orthogonal test was used to optimize ethanol volume fraction, extraction time, solid-liquid ratio and extraction times according to the results of single factor test. The optimized technology was validated. RESULTS: The linear range of dendrobine were 4.16-14.56 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 2$). RSDs of repeatability and precision tests were all lower than 5%. Average recovery tests were 93.01% (RSD=1.97%, $n=6$). The optimal ethanol extraction technology included soaking for 12 h, ethanol volume fraction of 70%, solid-liquid ratio of 1:12 (g/mL), extracting for 28 min, extracting 3 times. Results of validation test showed that the average yield of extract was 12.80% (RSD=4.39%, $n=3$), and the content of alkaloids was 0.359 0 mg/g (RSD=0.66%, $n=3$). CONCLUSIONS: Established acidic dyes colorimetry is simple, precise and accurate, which can be used for the content determination of total alkaloids. The optimized ethanol extraction technology is stable and feasible, and can be used for the extraction of total alkaloids from Shuanghu capsules.

KEYWORDS Shuanghu capsules; *Dendrobium nobile*; *Dendrobium officinale*; Single factor test; Orthogonal test; Total alkaloid; Content determination; Dry extract yield

酒精性肝损伤(Alcoholic liver disease, ALD)是指酒精性脂肪肝、酒精性肝纤维化、酒精性肝炎以及包括酒精性肝硬化在内的因长期大量饮酒等导致的肝中毒性损伤^[1]。目前ALD的发病机制尚未阐明,其治疗方法主

^Δ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);贵州省教育厅科技拔尖人才支持计划(No.黔教合KY字[2017]078)

* 硕士研究生。研究方向:中药新药研发。E-mail: kuanchen@163.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。E-mail: zhangjianyong2006@126.com

要包括对症用药和引导患者戒酒等^[2]。中医认为,ALD的治疗可从病位和病性两方面入手,其病位在肝,与胆、脾、胃密切相关,湿毒、火热为其主要病性证素^[3]。由此可见,ALD的治疗应注意化湿热、利小便,以达到消热散结、酒邪内解等目的^[4]。祁培宏等医家根据临床经验的自拟方剂、现有上市的中成药及单味药等对ALD均具有一定的治疗效果^[5-6]。

石斛药材来源于兰科植物金钗石斛(*Dendrobium nobile* Lindl.)、鼓槌石斛(*Dendrobium chrysotoxum* Lindl.)或流苏石斛(*Dendrobium fimbriatum* Hook.)的栽培品及

其同属植物近似种的新鲜或干燥茎;铁皮石斛药材来源于兰科植物铁皮石斛(*Dendrobium officinale Kimura Migo*)的干燥茎^[7]。据2015年版《中国药典》(一部)记载,金钗石斛和铁皮石斛均具有益胃生津、滋阴清热之效,可用于治疗热病津伤、口干烦渴、胃阴不足和阴虚火旺等症^[7]。金钗石斛含有生物碱、联苳等成分,主要有效成分为生物碱;铁皮石斛主要含有多糖、氨基酸等成分,其中多糖为其指标性成分^[8-9]。现有研究表明,石斛生物碱可缓解高血脂血症模型大鼠肝脏脂肪变性等症状,而石斛多糖在改善酒精导致的肝功能损伤和脂质代谢紊乱等方面具有一定作用^[10-11],由此推测石斛中的这两类成分有可能发挥协同功效。本课题组在石斛的中医传统治疗应用的经验基础上,结合现代药理学研究成果,优选金钗石斛和铁皮石斛,以两种石斛的优势成分群(即总生物碱和总多糖)作为活性成分,通过现代提取和制剂技术,研制出对亚急性ALD具有缓解和改善作用的双斛胶囊,该制剂根据2015年版《中国药典》(一部)中成人日服量规定^[7],将金钗石斛和铁皮石斛的用量均设为4 g(即两种药材质量比为1:1)。该制剂的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以获得总生物碱部分,将醇提后的药渣再进行水提以获得总多糖部分。笔者在本文中以干膏得率和总生物碱含量为指标,采用正交设计优化双斛胶囊总生物碱的提取工艺,旨在为后期总多糖的提取及双斛胶囊的深入开发奠定工艺基础。

1 材料

1.1 仪器

BT125D型十万分之一电子分析天平[赛多利斯(中国)科学仪器有限公司];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型旋涡涡旋仪(姜堰市康健医疗器具有限公司)。

1.2 药品与试剂

石斛碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111876-201503,纯度:100.0%);无水乙醇、邻苯二甲酸氢钾(成都金山化学试剂有限公司);三氯甲烷、浓盐酸(重庆川东化工有限公司);氨水(重庆茂业化学试剂有限公司);氢氧化钠(国药集团化学试剂公司);溴甲酚绿(天津市大茂化学试剂有限公司);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

金钗石斛(批号:20170324)、铁皮石斛(批号:20170324)由重庆市渝和堂药业有限公司提供并进行鉴

定及检测,均产自云南,均符合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的有关规定。

2 双斛胶囊中总生物碱的含量测定

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 取石斛碱对照品适量,精密称定,加三氯甲烷制成20.80 μg/mL的对照品母液;后续试验取该母液,以三氯甲烷稀释成相应溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液 称取金钗石斛和铁皮石斛粗粉(按质量比1:1混匀,过30目筛,下同)混合物8 g,置于圆底烧瓶中,以一定量、一定体积分数的乙醇浸泡后,加热回流提取数次(具体参数见后续正交试验优选工艺);合并醇提液,放冷,3 500 r/min离心15 min,取上清液,加70%乙醇定容至500 mL,摇匀,于5℃下以3 500 r/min离心15 min;取上清液100 mL,水浴蒸干,残渣用5%稀盐酸70 mL溶解,摇匀,3 500 r/min离心10 min;取上清液,加浓氨水调节pH至10,精密吸取5 mL,用等体积三氯甲烷萃取3次,合并下层,以三氯甲烷稀释定容至25 mL,摇匀,即得。

2.2 检测波长选择

取按“2.1.1”和“2.1.2”项下方法制备的对照品溶液(4.16 μg/mL)和供试品溶液,采用酸性染料比色法^[12]进行显色反应:向对照品溶液或供试品溶液中加入pH 4.5的邻苯二甲酸氢钾缓冲液5.0 mL和0.04%溴甲酚绿溶液2.0 mL,涡旋3 min萃取,静置30 min待分层;取下层萃取液5 mL,加入0.01 mol/L氢氧化钠乙醇溶液1 mL,充分摇匀。采用紫外分光光度计在400~800 nm波长范围内进行光谱扫描,详见图1。结果,两种溶液均在620 nm波长处有最大吸收峰,故选择620 nm作为检测波长。

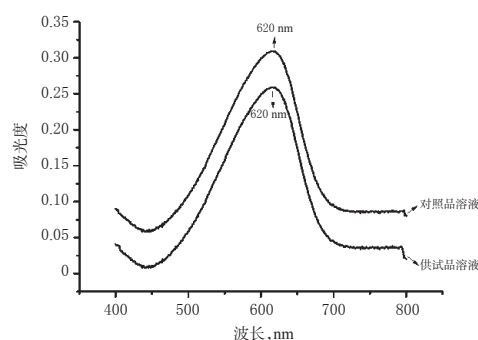


图1 紫外扫描图

Fig 1 UV scanning spectra

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8 g,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,平行操作3次。按“2.2”项下酸性染料比色法“加入pH 4.5的邻苯二甲酸氢钾缓冲液……充分摇匀”步骤处理完毕后第0、5、10、15、20 min时测定吸光度。结果显示,显色反

应完毕 5 min 后吸光度值较不稳定,因此供试品溶液需要在显色反应后 5 min 之内测定。

2.3.2 线性关系考察 精密量取“2.1.1”项下对照品母液 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 mL,分别置于刻度试管中,以三氯甲烷稀释至 10 mL,制成石斛碱质量浓度分别为 4.16、6.24、8.32、10.40、12.48、14.56 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液,按“2.2”项下酸性染料比色法进行显色反应。以三氯甲烷为空白溶剂对照,采用紫外分光光度计于 620 nm 波长处测定各样品溶液的吸光度。以石斛碱质量浓度 ($x, \mu\text{g/mL}$) 为横坐标、吸光度 (y) 为纵坐标,得回归方程为 $y=0.0514x+0.077$ ($r=0.9992$)。结果表明,石斛碱质量浓度在 4.16~14.56 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与吸光度呈良好的线性关系。

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,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,平行操作 3 次。供试品溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,并分别于 3 个不同工作日和每个工作日第 0、4、8、12、24 h 时,按“2.2”项下酸性染料比色法处理后测定,以外标法计算总生物碱含量,分别考察日间与日内精密度。结果,3 个工作日内总生物碱含量的 RSD 为 3.93% ($n=3$);不同工作日当天 5 个时间点总生物碱含量的 RSD 分别为 4.52%、2.94%、3.84% ($n=5$),表明该方法精密度良好。

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,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,平行操作 6 次。按“2.2”项下酸性染料比色法处理后测定,以外标法计算总生物碱含量。结果,总生物碱含量的 RSD 为 0.97% ($n=6$),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,分别加入 1.4526 mg/mL 的石斛碱对照品浓溶液(按“2.1.1”项下对照品母液配制方法新配)1 mL 后,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,平行操作 6 次。按“2.2”项下酸性染料比色法处理后测定,并以外标法计算总生物碱含量及加样回收率。结果,样品中总生物碱的平均加样回收率为 93.01%,RSD 为 1.97% ($n=6$),表明该方法准确度良好,详见表 1。

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	样品中总生物碱含量, mg	对照品加入量, mg	总生物碱测得量, mg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
4.009 3	1.433 3	1.452 6	2.741 9	90.08		
4.011 4	1.434 1	1.452 6	2.809 9	94.72		
4.007 8	1.432 8	1.452 6	2.778 2	92.62	93.01	1.97
4.012 2	1.434 4	1.452 6	2.800 9	94.07		
4.013 1	1.434 7	1.452 6	2.809 9	94.68		
4.013 1	1.434 7	1.452 6	2.769 1	91.86		

3 双石斛胶囊中总生物碱提取工艺的优化

3.1 提取工艺的单因素考察

本研究以综合评分法(以干膏得率和总生物碱含量计算)进行单因素考察。取按“2.1.2”项下方法多次加热

回流提取后合并的醇提液的上清液,倒入已在 105 $^{\circ}\text{C}$ 下达到恒定质量的蒸发皿中,90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸干,105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱放置 3 h,再转移到干燥器中放冷 30 min,称定质量并计算干膏得率。设定总生物碱权重为 7 分、干膏得率权重为 3 分,合计 10 分,按公式计算综合评分:综合评分=(总生物碱含量/总生物碱含量最大值) \times 7+(干膏得率/干膏得率最大值) \times 3。

3.1.1 浸泡时间 称取金钗石斛和铁皮石斛粗粉混合物 8 g,固定乙醇体积分数为 80%、料液比为 1:8、提取时间为 1 h、提取次数为 1 次,分别在不浸泡(0 h)和浸泡 1、2、12、24 h 后加热回流提取。平行操作 3 次,依法测定干膏得率和总生物碱含量,并计算综合评分,结果见图 2A。由图 2A 可知,在浸泡时间 0~12 h 内,随着浸泡时间的增加,综合评分不断提高;当浸泡时间为 12~24 h 时,综合评分有所下降;其中以浸泡 12 h 时所得综合评分最高。因此,本研究选择浸泡时间为 12 h。

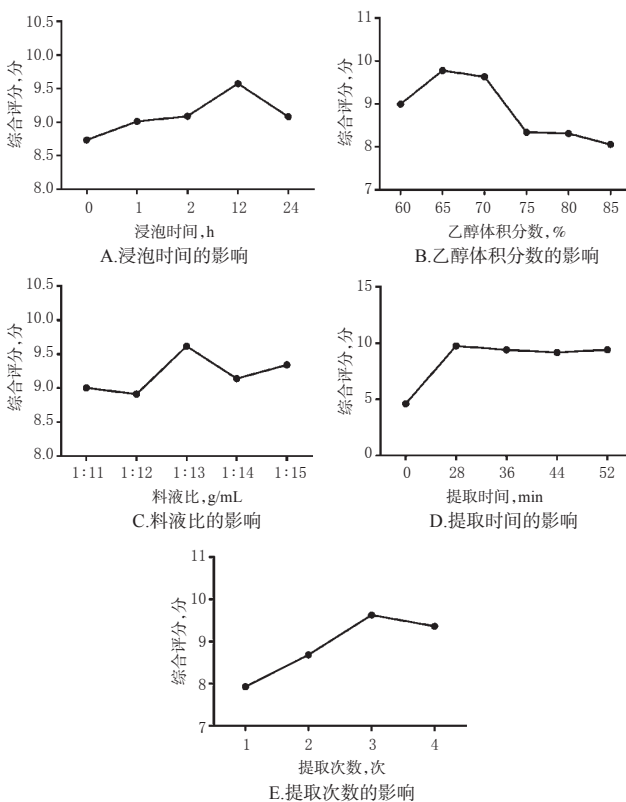


图 2 单因素试验结果

Fig 2 Results of single factor tests

3.1.2 乙醇体积分数 称取金钗石斛和铁皮石斛粗粉混合物 8 g,固定浸泡时间为 12 h、料液比为 1:8、提取时间为 1 h、提取次数为 1 次,分别以体积分数为 60%、65%、70%、75%、80%、85% 的乙醇进行回流提取。平行操作 3 次,依法测定干膏得率和总生物碱含量,并计算综合评分,结果见图 2B。由图 2B 可知,当乙醇体积分数在 60%~70% 时,综合评分较高;其中以乙醇体积分数为 65% 时,所得综合评分最高。因此,本研究选择乙醇体积分数 60%~70% 进行后续正交试验。

3.1.3 料液比 称取金钗石斛和铁皮石斛粗粉混合物 8 g,固定浸泡时间为 12 h、乙醇体积分数为 65%、提取时间为 1 h、提取次数为 1 次,分别以料液比 1:11、1:12、1:13、1:14、1:15(g/mL)回流提取。平行操作 3 次,依法测定干膏得率和总生物碱含量,并计算综合评分,结果见图 2C。由图 2C 可知,当料液比为 1:12~1:13 时,综合评分呈迅速增长的趋势;当料液比降至 1:13 之下时,综合评分有下降的趋势。虽然在料液比低于 1:14 后综合评分又有上升趋势,但考虑溶剂量增加会给后续浓缩操作带来诸多不便,且会造成试剂浪费等,因此综合以上因素,本研究选择料液比为 1:12~1:14 进行后续正交试验。

3.1.4 提取时间 称取金钗石斛和铁皮石斛粗粉混合物 8 g,固定浸泡时间为 12 h、乙醇体积分数为 65%、料液比为 1:13、提取次数为 1 次,分别以不提取(0 min)和提取 28、36、44、52 min 进行回流提取。平行操作 3 次,依法测定干膏得率和总生物碱含量,并计算综合评分,结果见图 2D。由图 2D 可知,当提取时间为 28 min 时,所得综合评分已达最高值。考虑 28 min 已经是较短时间,在后期放大研究中可能提取罐还未加热就已经到达考察的时间,所以没有继续对更短的提取时间进行比较,加之提取 36、44 min 时与提取 28 min 时所得结果很接近,因此综合考虑,本研究选择提取时间为 28~44 min 进行后续正交试验。

3.1.5 提取次数 称取金钗石斛和铁皮石斛粗粉混合物 8 g,固定浸泡时间为 12 h、乙醇体积分数为 65%、料液比为 1:13、提取时间为 28 min,分别回流提取 1、2、3、4 次。平行操作 3 次,依法测定干膏得率和总生物碱含量,并计算综合评分,结果见图 2E。由图 2E 可知,随着提取次数的增加(1~3 次),综合评分也相应升高;当提取第 4 次时,综合评分下降,推测可能是长时间蒸发溶剂导致总生物碱成分受到破坏。因此,本研究选择提取次数为 1~3 次进行正交试验考察。

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,以乙醇体积分数(A)、料液比(B)、提取时间(C)、提取次数(D)为影响因素,以干膏得率和总生物碱含量的综合评分为评价指标,进行醇提取工艺的 $L_9(3^4)$ 正交试验,平行操作 3 次。因素和水平见表 2,正交试验设计和结果见表 3,方差分析结果见表 4。

表 2 因素和水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素			
	A, %	B, g/mL	C, min	D, 次
1	60	1:12	28	1
2	65	1:13	36	2
3	70	1:14	44	3

由表 3 可知,各因素对综合评分的影响大小依次为

表 3 正交试验设计和结果

Tab 3 Design and results of orthogonal tests

实验序号	A	B	C	D	综合评分
1	1	1	1	1	5.65
2	1	2	2	2	7.87
3	1	3	3	3	8.44
4	2	1	2	3	7.54
5	2	2	3	1	5.26
6	2	3	1	2	8.51
7	3	1	3	2	7.89
8	3	2	1	3	8.45
9	3	3	2	1	5.88
K_1	7.320	7.027	7.537	5.597	
K_2	7.103	7.193	7.097	8.090	
K_3	7.407	7.610	7.197	8.143	
R	0.304	0.583	0.440	2.546	

表 4 方差分析结果

Tab 4 Results of variance analysis

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P
A	0.146	2	1.000	19.000	>0.05
B	0.542	2	3.712	19.000	>0.05
C	0.319	2	2.185	19.000	>0.05
D	12.705	2	87.021	19.000	<0.05
误差	0.15	2			

$D > B > C > A$, 最优方案为 $A_3B_1C_1D_3$ 。由表 4 可知,除 D 因素对工艺的影响有统计学意义外,其余因素的影响均无统计学意义。综合考虑提取效率和节约能源等因素,结合单因素考察结果,最终将醇提取工艺的最优提取条件确定为 $A_3B_1C_1D_3$,即浸泡 12 h 后,按乙醇体积分数 70%、料液比 1:12(g/mL)提取 28 min,共提取 3 次。

3.2.2 验证试验 称取称取金钗石斛和铁皮石斛粗粉混合物 8 g,混匀,按“3.2.1”项下最优醇提取工艺条件进行提取并计算干膏得率和总生物碱含量,平行操作 3 次。结果,干膏平均得率为 12.80% (RSD=4.39%, $n=3$),总生物碱平均含量为 0.359 0 mg/g (RSD=0.66%, $n=3$),表明优化工艺条件稳定、可行。

4 讨论

本研究采用经典的酸性染料比色法测定总生物碱的含量,其原理为在适当的 pH 条件下生物碱与氯离子结合生成阴离子,而阴离子与酸性染料中的阳离子定量结合成离子对,在一定波长处测定离子对的吸光度可用于间接反映生物碱含量^[13]。由此可见,缓冲液的 pH 值和用量对试验结果至关重要^[14]。本研究参考文献方法^[15-17],采用溴甲酚绿为酸性染料,以 pH 4.5 的邻苯二甲酸氢钾缓冲液 5 mL 调节反应液 pH 值,然后在 620 nm 波长处测定产物离子对的吸光度;同时对显色稳定性进行考察,结果表明供试品溶液需要在显色反应后 5 min 之内测定,以保证结果的准确性。方法学考察结果显示,本研究所建方法简便可行、灵敏度高,可用于双胶胶囊提取物中总生物碱的含量测定。

生物碱是最早从石斛属中分离得到的化学成分,其

中金钗石斛已被证实为含有生物碱的种类最多、含量最高的品种,另外也有文献报道铁皮石斛中存在生物碱^[8-9]。大量研究报道已经证实,石斛生物碱类具有较强的药理活性^[18-21]。目前总生物碱的提取方法较多,主要包括采用有机溶剂加热回流提取、酶法反应、超声提取、微波萃取等^[22-24]。考虑到石斛药材价格较高需避免浪费,而提取工艺越简单则越易药材损耗且成本较低,故本研究采用有机溶剂加热回流提取,提取完成后可回收溶剂从而减少试剂损耗。甲醇和乙醇作为生物碱提取中最常见的有机溶剂,价廉易得,但甲醇毒性较大,故选择乙醇作为总生物碱的提取溶剂^[25]。

本课题组针对双斛胶囊醇提取工艺进行研究,通过单因素试验,初步确定浸泡时间、乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取次数对干膏得率和总生物碱含量的影响。前期实验过程中发现,外界环境如天气变化导致的温湿度差异等对提取效果有一定干扰,因此在较短的时间内完成正交试验考察,将浸泡时间固定为12 h,以减少环境变化的干扰,使实验数据更准确可靠。在单因素考察的基础上,以乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取次数为因素进一步进行正交试验筛选。结果显示,各考察因素对综合评分的影响强弱顺序为提取次数>提取时间>料液比>乙醇体积分数;各因素中以提取次数对综合评分的影响最大,且仅该因素的影响具有统计学意义。

综合考虑因素显著性以及时间、成本等,最终确定双斛胶囊总生物碱的最佳醇提取工艺条件为固定浸泡12 h后,按乙醇体积分数为70%、料液比为1:12(g/mL)提取28 min,共提取3次;验证试验结果表明,该工艺稳定、可行。本研究可为双斛胶囊的下一步开发奠定良好的工艺基础。

参考文献

[1] 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.

[2] 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.

[3] 梁卫.酒精性肝病的中医辨证规律研究[D].南京:南京中医药大学,2013.

[4] 左军,唐明哲,韩淑丽,等.中医药治疗酒精性肝损伤的研究进展[J].中医药信息,2017,34(3):124-128.

[5] 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):140-142.

[6] 张优琴,王智巍,卞俊,等.中药治疗酒精性肝病的研究进展[J].海军医学杂志,2017,38(4):381-384.

[7] 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.

[8] 余芳,郑萍.金钗石斛多糖提取纯化工艺研究进展[J].江苏调味副食品,2016,2(1):1-2.

[9] 孙恒,胡强,金航,等.铁皮石斛化学成分及药理活性研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(11):225-234.

[10] 李胜立.6种石斛多糖对酒精性肝损伤干预作用的比较研究[D].合肥:合肥工业大学,2013.

[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] 敖茂宏,刘海,吴明开.酸性染料比色法测定不同产地流苏石斛中总生物碱的含量[J].江苏农业科学,2012,40(10):282-283.

[13] 刘喜纲,刘翠哲,常金花.应用酸性染料比色法测定总生物碱的含量[J].中国药房,2007,18(11):875-876.

[14] 邓燕莉,罗金波,黄甜,等.酸性染料比色法定量检测荷叶总生物碱[J].食品与机械,2011,27(4):90-93.

[15] 诸燕,张爱莲,何伯伟,等.铁皮石斛总生物碱含量变异规律[J].中国中药杂志,2010,35(18):2388-2391.

[16] 徐作英,严伟,廖晓康,等.栽培金钗石斛形态鉴别和总生物碱含量研究[J].四川师范大学学报(自然科学版),2010,33(3):361-365.

[17] 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.

[18] HU Y, REN J, WANG L, et al. Protective effects of total alkaloids from *Dendrobium crepidatum*, against LPS-induced acute lung injury in mice and its chemical components[J]. *Phytochemistry*, 2018. DOI: 10.1016/j.phytochem.2018.02.006.

[19] LI Y, LI F, GONG Q, et al. Inhibitory effects of *Dendrobium* alkaloids on memory impairment induced by lipopolysaccharide in rats[J]. *Planta Medica*, 2011, 77(2):117-121.

[20] NIE J, TIAN Y, ZHANG Y, et al. *Dendrobium* alkaloids prevent A β 25-35-induced neuronal and synaptic loss via promoting neurotrophic factors expression in mice[J]. *Peer J*, 2016. DOI:10.7717/peerj.2739.

[21] NG TB, LIU J, WONG JH, et al. Review of research on *Dendrobium*, a prized folk medicine[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(5):1795-1803.

[22] 张露月,娄在祥,寇兴然,等.离子液体超声微波协同萃取金钗石斛总黄酮和石斛碱的研究[J].中药材,2017,40(1):152-157.

[23] 张利,范明才,冯喜文,等.铁皮石斛中石斛多糖与石斛碱的纤维素酶法提取研究[J].化学研究与应用,2011,23(3):356-359.

[24] 刘红,董海丽.超声波辅助提取金钗石斛生物碱工艺优化[J].湖北农业科学,2013,52(8):1903-1904.

[25] 杨雅欣,冯小翠,徐仕娟,等.紫金龙总生物碱回流提取工艺的优化[J].中成药,2018,40(8):1859-1861.

(收稿日期:2019-01-20 修回日期:2019-05-16)

(编辑:段思怡)