

[22] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Anal Chem*, 1956, 28(3): 350-356.

[23] 肖月娟, 李润丰, 郑立红, 等. 斑鲮鱼蛋白控制酶解及其酶解物抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(5): 91-97.

[24] Jin L, Guan X, Liu W, *et al.* Characterization and antioxidant activity of a polysaccharide extracted from *Sarcandra glabra* [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 90(1): 524-532.

[25] 温新宝, 苗 芳, 周 乐, 等. 苍耳七提取物的体外抗氧化活性研究 (英文) [J]. 中国天然药物, 2012, 10(3): 190-195.

金钗石斛中生物碱与多糖联合酶提工艺的优化

敖 娇¹, 鲍家科^{2*}, 夏玉吉³

(1. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵州省食品药品审评查验中心, 贵州 贵阳 550004; 3. 四川省食品药品检验检测院, 四川 成都 611731)

摘要: **目的** 优化金钗石斛中生物碱与多糖的联合酶提工艺。**方法** 以加酶量、酶解温度、酶解时间、料液比为影响因素, 石斛碱、总生物碱、多糖含量为评价指标, 正交试验优化联合酶提工艺。**结果** 木瓜蛋白酶提取的最佳条件为加酶量 0.10 g, 酶解温度 45 ℃, 酶解时间 2 h, 料液比 1 : 50, 石斛碱、总生物碱、多糖含量分别为 3.495 5、4.341 8、35.898 7 mg/g; 纤维素酶提取的最佳条件为加酶量 0.30 g, 酶解温度 50 ℃, 酶解时间 2 h, 料液比 1 : 40, 3 种成分含量分别为 3.514 8、4.351 3、36.331 2 mg/g; 果胶酶提取的最佳条件为加酶量 0.45 g, 酶解温度 55 ℃, 酶解时间 2.5 h, 料液比 1 : 40, 3 种成分含量分别为 3.524 4、4.452 8、26.324 2 mg/g。**结论** 该方法稳定、可靠、快速, 可用于联合酶提金钗石斛中生物碱与多糖。

关键词: 金钗石斛; 生物碱; 多糖; 联合酶提; 正交试验

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2018)04-0830-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.04.012

Optimization of combined enzymatic extraction for alkaloids and polysaccharides from *Dendrobium nobile*

AO Jiao¹, BAO Jia-ke^{2*}, XIA Yu-ji³

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; 2. Guizhou Provincial Food and Drug Evaluation and Inspection Center, Guiyang 550004, China; 3. Sichuan Provincial Institute for Food and Drug Control, Chengdu 611731, China)

ABSTRACT: AIM To optimize the combined enzymatic extraction for alkaloids and polysaccharides from *Dendrobium nobile* Lindl. . **METHODS** With enzyme consumption, enzymolysis temperature, enzymolysis time and solid-liquid ratio as influencing factors, contents of dendrobine, total alkaloids and polysaccharides as evaluation indices, orthogonal test was applied to optimizing the combined enzymatic extraction. **RESULTS** The optimal conditions for papain extraction were determined to be 0.10 g for enzyme consumption, 45 ℃ for enzymolysis temperature, 2 h for enzymolysis time, and 1 : 50 for solid-liquid ratio, the contents of dendrobine, total alkaloids and polysaccharides were 3.495 5, 4.341 8 and 35.898 7 mg/g, respectively. The optimal conditions for cellulase extraction were determined to be 0.30 g for enzyme consumption, 50 ℃ for enzymolysis temperature, 2 h for enzymolysis time, and 1 : 40 for solid-liquid ratio, the contents of three constituents were 3.514 8, 4.351 3 and 36.331 2 mg/g, respectively. The optimal conditions for pectinase extraction were determined to be 0.45 g for enzyme consumption, 55 ℃ for

收稿日期: 2017-07-27
基金项目: 贵州省中药标准化技术研究中心项目 (黔科合社字 [2008] 5002)
作者简介: 敖 娇 (1990—), 女, 硕士生, 从事中药及民族药质量控制及新药研究。Tel: 15519014220, E-mail: 747767518@qq.com
* 通信作者: 鲍家科 (1955—), 男, 主任药师, 从事中药及民族药质量控制技术研究。Tel: 13985430537, E-mail: bjk2005@163.com

enzymolysis temperature, 2.5 h for enzymolysis time, and 1 : 40 for solid-liquid ratio, the contents of three constituents were 3.524 4, 4.452 8 and 26.324 2 mg/g, respectively. **CONCLUSION** This stable and reliable method can be used for the rapid combined enzymatic extraction for alkaloids and polysaccharides from *D. nobile*.

KEY WORDS: *Dendrobium nobile* Lindl.; alkaloids; polysaccharides; combined enzymatic extraction; orthogonal test

目前,金钗石斛 *Dendrobium nobile* Lindl. 在制剂开发中已经取得可喜成果,脉络宁注射液、石斛夜光丸、石斛明目丸等药物中均含有该药材,主要用于治疗心脑血管及血栓性疾病、提高免疫功能、降血糖、改善血脂^[1-2]。石斛属植物主要化学成分为生物碱、多糖、酚类等,具有降血糖、抗肿瘤、抗衰老、改善记忆等药理作用^[3-4]。生物碱和多糖是金钗石斛主要活性物质,对心血管、神经系统都有显著作用,其中石斛碱是其特征性成分^[5],在该药材中的含有量远高于其他石斛^[6-7]。

有关报道显示,石斛生物碱和多糖的提取方法大多为溶剂法^[8-9]。酶法正广泛应用于中药化学成分的提取,包括多糖、黄酮、生物碱、萜类、蛋白质、肽类、油类、有机酸等^[10],但目前有关金钗石斛的研究仅有采用纤维素酶对其多糖进行提取^[11],尚未涉及其生物碱,而且未见这两类成分联合提取的报道。因此,本实验将通过正交试验优化金钗石斛中生物碱与多糖的联合酶提工艺,以达到提高提取率、缩短提取时间、合理利用药材资源的目的。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 LC-20AD 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);722S 型分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);XS205 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);PHS-25 型雷磁数显 PH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司);SHA-C 型水浴恒温振荡器(天津市塞得利斯实验分析仪器制造厂);LD-5 型电动离心机(金坛市城东新瑞仪器厂)。

1.2 试剂 石斛碱(111876-201503)、D-无水葡萄糖(110833-201506)对照品均由中国食品药品检定研究院提供。金钗石斛购自贵州省赤水市官渡镇,经杨相波副研究员鉴定为兰科植物金钗石斛 *Dendrobium nobile* Lindl. 的干燥茎。木瓜蛋白酶(酶活力 $\geq 6\ 000\ \text{U/mg}$,20150226)、纤维素酶(酶活力 $\geq 15\ 000\ \text{U/g}$,20160408)、果胶酶(酶活力 $\geq 50.0\ \text{U/g}$,20150504)均由国药集团化学试剂有限公司提供。缓冲液(自制。分别称取柠檬酸、柠檬酸三钠适量,加水溶解配制成 0.1 mol/L 溶

液,将一定体积的两者混合,调 pH 值至 4.0 ~ 6.0,即得)。甲醇为色谱纯(美国天地试剂公司);柠檬酸三钠、柠檬酸、氨水、乙酸乙酯均为分析纯(天津市科密欧化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 提取工艺 称取干燥药材粉末适量,加入一定量缓冲液和酶,于振荡器中恒温酶解一定时间(110 r/min),取出,置于 90 °C 水中灭酶 10 min^[12],离心 20 min,倾取上清液,残渣加 10 mL 水洗涤 2 次,每次 10 min,合并上清液,加适量氨水调 pH 至 12 ~ 13,加入与上清液等量的乙酸乙酯萃取 2 次,合并乙酸乙酯层,挥干,甲醇溶解,转移定容至 10 mL 量瓶中,作为石斛碱、总生物碱供试品溶液;水层转移至 250 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀。精密量取续滤液 10 mL,加无水乙醇 60 mL 摇匀,冷藏过夜后取出,离心(4 000 r/min) 20 min,留取沉淀(必要时滤过),40 mL 80% 乙醇洗涤,离心,重复 1 次,沉淀加热水溶解,转移至 25 mL 量瓶中,待冷却后加水至刻度,摇匀,即得多糖供试品溶液。

2.2 含有量测定

2.2.1 石斛碱 采用 HPLC 法。色谱条件:Welch Xtimate C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×200 mm,5 μm);流动相甲醇-0.002% 三乙胺(47 : 53);检测波长 210 nm;柱温 35 °C;体积流量 1.0 mL/min;进样量 10 μL。

2.2.2 总生物碱 采用酸性染料比色法。取 0.2 mL 供试品溶液用二氯甲烷稀释至 25 mL,摇匀,取 10 mL 至干燥洁净的分液漏斗中,依次加入 pH 4.9 缓冲液 5 mL、0.04% 溴甲酚绿溶液 2 mL,剧烈振荡 3 min 后静置 30 min,下层经二氯甲烷浸润过的干燥棉花滤过,取 5 mL 续滤液,加入含 0.01 mol/L NaOH 的无水乙醇 1.0 mL,摇匀。取二氯甲烷 10 mL,同法操作,作为空白对照。在分光光度计上于 621 nm 波长处测定吸光度,计算含有量。

2.2.3 多糖 采用苯酚-硫酸法。精密量取供试品溶液 1 mL,精密加入 1 mL 5% 苯酚溶液(临用配

制), 摇匀后再加入 5 mL 硫酸, 摇匀, 于沸水浴中加热 20 min, 取出, 于冰浴中冷却 5 min。以相应试剂(水)为空白, 同法操作, 作为空白对照。在 487 nm 波长处测定吸光度, 计算含有量。

2.3 正交试验 根据前期单因素试验结果可知, pH 值对酶提的影响程度不如其他因素明显。在最佳 pH 值的条件下, 选择加酶量(A)、酶解温度(B)、酶解时间(C)、料液比(D)作为影响因素, 石斛碱、总生物碱、多糖含有量为评价指标, 采用正交试验结合综合平衡法^[13-14]优化酶提工艺。

2.3.1 木瓜蛋白酶 因素水平见表 1, 试验设计与结果见表 2, 方差分析见表 3。由此可知, 各因素对石斛碱含有量的影响程度依次为 D>B>C>A, 总生物碱含有量依次为 D>B>A>C, 多糖含有量依次为 D>B>C>A, 即因素 D(料液比)对三者提取效果均有显著影响, 最优提取条件均为 A₂B₁C₂D₃, 即加酶量 0.10 g, 酶解温度 45 ℃, 酶解时间 2 h, 料液比 1:50。

表 1 木瓜蛋白酶因素水平				
Tab. 1 Factors and levels for papain				
水平	A 加酶量/g	B 酶解温度/℃	C 酶解时间/h	D 料液比
1	0.05	45	1.5	1:30
2	0.10	50	2.0	1:40
3	0.15	55	2.5	1:50

表 2 木瓜蛋白酶试验设计与结果					
Tab. 2 Design and results of tests for papain					
试验号	A	B	C	D	含有量/(mg·g ⁻¹)
					石斛碱 总生物碱 多糖
1	1	1	1	1	3.208 8 4.044 9 34.123 1
2	1	2	2	2	3.408 8 4.272 0 35.237 8
3	1	3	3	3	3.407 2 4.189 4 34.114 2
4	2	1	2	3	3.495 5 4.341 8 35.898 7
5	2	2	3	1	3.212 1 4.064 3 33.587 2
6	2	3	1	2	3.370 2 4.230 4 35.004 3
7	3	1	3	2	3.459 9 4.192 5 35.123 2
8	3	2	1	3	3.366 3 4.216 3 35.457 8
9	3	3	2	1	3.190 7 3.952 8 33.588 2
均值 1	3.342	3.388	3.315	3.204	
均值 2	3.359	3.329	3.365	3.413	
均值 3	3.339	3.323	3.360	3.423	
极差	0.020	0.065	0.050	0.219	
均值 1	4.169	4.193	4.164	4.021	
均值 2	4.212	4.184	4.189	4.232	
均值 3	4.121	4.124	4.149	4.249	
极差	0.091	0.069	0.040	0.228	
均值 1	34.492	35.048	34.862	33.766	
均值 2	34.830	34.761	34.908	35.122	
均值 3	34.723	34.236	34.275	35.157	
极差	0.338	0.812	0.633	1.391	

表 3 木瓜蛋白酶方差分析					
Tab. 3 Analysis of variance for papain					
指标	来源	离均差平方和	自由度	F 比	P 值
石斛碱	B	0.008	2	8.000	>0.05
	C	0.005	2	5.000	<0.05
	D	0.092	2	92.000	<0.05
	误差(A)	0.001	2	—	—
总生物碱	A	0.013	2	6.500	<0.05
	B	0.008	2	4.000	<0.05
	D	0.097	2	48.500	<0.05
	误差(C)	0.002	2	—	—
多糖	B	1.019	2	5.693	<0.05
	C	0.748	2	4.179	<0.05
	D	3.773	2	21.078	<0.05
	误差(A)	0.180	2	—	—
注: F _{0.05} (2, 2) = 19.00, F _{0.01} (2, 2) = 99.00					

2.3.2 纤维素酶 因素水平见表 4, 试验设计与结果见表 5, 方差分析见表 6。由此可知, 各因素对石斛碱含有量的影响程度依次为 D>B>A>C, 总生物碱含有量依次为 D>B>C>A, 多糖含有量依次为 D>C>B>A, 即因素 D(料液比)对三者提取效果均有显著影响, 最优提取条件均为 A₁B₂C₂D₂, 即加酶量 0.30 g, 酶解温度 50 ℃, 酶解时间 2 h, 料液比 1:40。

表 4 纤维素酶因素水平				
Tab. 4 Factors and levels for cellulase				
水平	A 加酶量/g	B 酶解温度/℃	C 酶解时间/h	D 料液比
1	0.30	45	1.5	1:30
2	0.35	50	2.0	1:40
3	0.40	55	2.5	1:50

表 5 纤维素酶试验设计与结果					
Tab. 5 Design and results of tests for cellulase					
试验号	A	B	C	D	含有量/(mg·g ⁻¹)
					石斛碱 总生物碱 多糖
1	1	1	1	1	3.358 4 4.211 9 33.212 4
2	1	2	2	2	3.514 8 4.351 3 36.331 2
3	1	3	3	3	3.208 9 4.042 4 35.008 6
4	2	1	2	3	3.273 9 4.117 4 34.889 6
5	2	2	3	1	3.381 6 4.244 3 33.518 7
6	2	3	1	2	3.380 5 4.234 2 36.089 6
7	3	1	3	2	3.453 2 4.309 7 36.087 5
8	3	2	1	3	3.281 5 4.095 9 34.883 2
9	3	3	2	1	3.289 7 4.148 4 33.523 3
均值 1	3.361	3.362	3.340	3.343	
均值 2	3.345	3.393	3.359	3.450	
均值 3	3.341	3.293	3.348	3.255	
极差	0.020	0.100	0.019	0.195	
均值 1	4.202	4.213	4.181	4.202	
均值 2	4.199	4.231	4.206	4.298	
均值 3	4.185	4.142	4.199	4.085	
极差	0.017	0.089	0.025	0.213	
均值 1	34.851	34.730	34.728	33.418	
均值 2	34.833	34.911	34.915	36.169	
均值 3	34.831	34.874	34.872	34.927	
极差	0.020	0.181	0.187	2.751	

表 6 纤维素酶方差分析

Tab. 6 Analysis of variance for cellulase					
指标	来源	离均差平方和	自由度	F 比	P 值
石斛碱	A	0.001	2	1.000	—
	B	0.016	2	16.000	—
	D	0.057	2	57.000	<0.05
	误差 (C)	0.001	2	—	—
总生物碱	B	0.013	2	13.000	—
	C	0.001	2	1.000	—
	D	0.068	2	68.000	<0.05
	误差 (A)	0.001	2	—	—
多糖	B	0.055	2	55.000	<0.05
	C	0.057	2	57.000	<0.05
	D	11.390	2	11 390.000	<0.01
	误差 (A)	0.001	2	—	—

注： $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$, $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

2.3.3 果胶酶 因素水平见表 7，试验设计与结果见表 8，方差分析见表 9。由此可知，各因素对石斛碱、总生物碱含有量的影响程度均依次为 $D > B > A > C$ ，最优提取条件为 $A_1B_3C_1D_2$ ；多糖含有量依次为 $D > B > C > A$ ，最优提取条件为 $A_1B_3C_1D_3$ ，故无论是生物碱还是多糖，其优化条件均不同，并且未在正交表中，故再分别作进一步筛选。

表 7 果胶酶因素水平

Tab. 7 Factors and levels for pectinase				
水平	A 加酶量/g	B 酶解温度/℃	C 酶解时间/h	D 料液比
1	0.45	45	2.5	1 : 30
2	0.50	50	3.0	1 : 40
3	0.55	55	3.5	1 : 50

表 8 果胶酶试验设计与结果

Tab. 8 Design and results of tests for pectinase					
试验号	A	B	C	D	含有量/(mg·g ⁻¹)
					石斛碱 总生物碱 多糖
1	1	1	1	1	3.288 5 4.059 6 22.659 0
2	1	2	2	2	3.500 5 4.324 7 25.548 5
3	1	3	3	3	3.411 6 4.212 9 25.157 3
4	2	1	2	3	3.254 1 4.108 4 24.357 1
5	2	2	3	1	3.271 4 4.105 7 22.326 4
6	2	3	1	2	3.517 9 4.352 1 26.258 0
7	3	1	3	2	3.345 4 4.179 1 22.467 3
8	3	2	1	3	3.307 8 4.159 3 26.295 9
9	3	3	2	1	3.328 6 4.129 9 24.154 7
均值 1	3.400	3.296	3.371	3.296	
均值 2	3.348	3.360	3.361	3.455	
均值 3	3.327	3.419	3.343	3.324	
极差	0.073	0.123	0.028	0.159	
均值 1	4.199	4.116	4.190	4.098	
均值 2	4.189	4.197	4.188	4.285	
均值 3	4.156	4.232	4.166	4.160	
极差	0.043	0.116	0.024	0.187	
均值 1	24.455	23.161	25.071	23.047	
均值 2	24.314	24.724	24.687	24.758	
均值 3	24.306	25.190	23.317	25.270	
极差	0.149	2.029	1.754	2.223	

表 9 果胶酶方差分析

Tab. 9 Analysis of variance for pectinase					
指标	来源	离均差平方和	自由度	F 比	P 值
石斛碱	A	0.008	2	8.000	—
	B	0.023	2	23.000	<0.05
	D	0.043	2	43.000	<0.05
	误差 (C)	0.001	2	—	—
总生物碱	A	0.003	2	3.000	—
	B	0.021	2	21.000	<0.05
	D	0.054	2	54.000	<0.05
	误差 (C)	0.001	2	—	—
多糖	B	6.775	2	161.310	<0.01
	C	5.100	2	121.429	<0.01
	D	8.134	2	193.667	<0.01
	误差 (A)	0.042	2	—	—

注： $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$, $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

按照果胶酶提取生物碱的最优条件 $A_1B_3C_1D_2$ 进行提取，与正交试验中生物碱含有量最高的第 6 组 ($A_2B_3C_1D_2$) 进行比较；按照果胶酶提取多糖的最优条件 $A_1B_3C_1D_3$ 进行提取，与正交试验中多糖含有量最高的第 8 组 ($A_3B_2C_1D_3$) 进行比较，各平行 3 份，测得石斛碱、总生物碱、多糖含有量，取平均值，结果见表 10。由表可知，生物碱、多糖含有量在 $A_1B_3C_1D_2$ 条件下均高于 $A_2B_3C_1D_2$ ；在 $A_1B_3C_1D_3$ 条件下，多糖含有量高于 $A_3B_2C_1D_3$ ，但与其他酶提结果比较相对较低，而且生物碱含有量也并非最高。最终确定，果胶酶提取的最优条件为 $A_1B_3C_1D_2$ ，即加酶量 0.45 g，酶解温度 55 ℃，酶解时间 2.5 h，料液比 1 : 40。

表 10 果胶酶提取条件比较

Tab. 10 Comparison of pectinase extraction conditions			
条件	含有量/(mg·g ⁻¹)		
	石斛碱	总生物碱	多糖
$A_1B_3C_1D_2$	3.524 4	4.452 8	26.324 2
$A_3B_2C_1D_3$	3.225 2	4.143 7	28.837 6

2.4 验证试验 见图 1 和表 11。

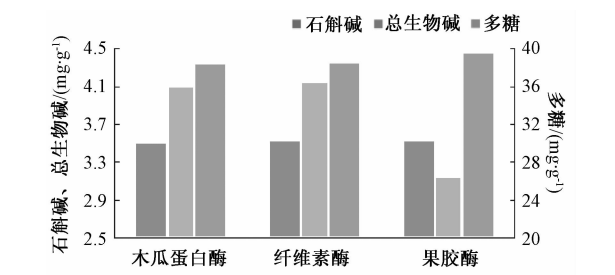


图 1 正交试验柱状图

Fig. 1 Histogram for orthogonal tests

3 讨论

预试验应用邻苯二甲酸氢钾-氢氧化钠、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 均为 5.0) 对木瓜蛋白

表 11 验证试验结果
Tab. 11 Results of verification tests

酶	因素				含量/(mg·g ⁻¹)			
	加酶量/g	pH 值	提取温度/℃	提取时间/h	料液比	石斛碱	总生物碱	多糖
木瓜蛋白酶	0.10	5.5	45	2.0	1:50	3.495 5	4.341 8	35.898 7
纤维素酶	0.30	5.0	50	2.0	1:40	3.514 8	4.351 3	36.331 2
果胶酶	0.45	4.5	55	2.5	1:40	3.524 4	4.452 8	26.324 2

酶、纤维素酶、果胶酶进行考察，发现在相同 pH 值的不同缓冲液中，每种酶对金钗石斛有效成分的提取效果无明显差异。由于柠檬酸、柠檬酸钠与邻苯二甲酸氢钾相比在水中更易溶解，故最终选择柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。

结合前期单因素试验与正交试验结果发现，与木瓜蛋白酶、纤维素酶相比，果胶酶提取金钗石斛多糖的含有量明显更低，其原因一方面可能是果胶酶主要分解果胶质，对多糖溶出的影响并不大；另一方面，果胶酶活性较低，其加酶量相对较多，而且酶与多糖均溶于水层，对后者有一定吸附作用，在离心过程中有可能两者一起被沉淀。

预试验中参考张利报道的方法^[15]，酶解后对药渣进行生物碱提取，而酶液进行多糖提取，但发现石斛碱出峰极小，甚至不出峰，总生物碱含量也极低；酶液中加入有机溶剂（三氯甲烷、乙酸乙酯）萃取后，石斛碱峰面积增大。进一步考察发现，加入氨水碱化溶液后再萃取生物碱时，石斛碱、总生物碱含量均明显增加，说明酶解过程中随着细胞壁的破坏，生物碱与多糖一部分溶于酶液中，另一部分留在药渣中，通过不断优化提取条件可尽量将药渣中的有效成分都提取出来。

当酶提金钗石斛生物碱时，由于是在酶液中进行，故可能还有少量留在水相，不能保证完全萃取，而且结合前期实验可知，它的成本也可能比溶剂法高。但总体上，该方法过程温和，在节约提取时间的同时提高了成分含有量，值得进一步推广应用。

参考文献：

[1] 王琳, 叶庆生, 刘伟. 金钗石斛研究概况(综述)

[J]. 亚热带植物科学, 2004, 33(2): 73-76.
[2] 张明生. 贵州省中药材现代产业技术体系建设[J]. 山地农业生物学报, 2015, 34(4): 9-12.
[3] 陈晶, 石京山. 金钗石斛生物总碱研究进展[J]. 现代医药卫生, 2016, 32(5): 728-730.
[4] 梁颖敏. 铁皮石斛对雌性衰老小鼠的抗衰老作用及其机理研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.
[5] 张晓敏, 孙志蓉, 陈龙, 等. 金钗石斛的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(7): 895-899.
[6] 陈晓梅, 肖盛元, 郭顺星. 铁皮石斛与金钗石斛化学成分的比较[J]. 中国医学科学院学报, 2006, 28(4): 524-529.
[7] 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.
[8] 刘宁, 孙志蓉, 廖晓康, 等. 不同采收期金钗石斛总生物碱及多糖质量分数的变化[J]. 吉林大学学报(理学版), 2010, 48(3): 511-515.
[9] 黄明进, 罗春丽, 赵致, 等. 贵州兴义四种石斛的多糖和总生物碱含量分析[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(6): 1359-1361.
[10] 王源. 酶工程技术在中药提取中的应用[J]. 山东中医杂志, 2015, 34(8): 614-617.
[11] 张晓敏, 孙志蓉, 朱南南, 等. 纤维素酶提取金钗石斛多糖工艺研究[J]. 中医药信息, 2015, 32(2): 50-53.
[12] 何传波, 魏好程, 熊何健, 等. 枇杷叶多糖酶法提取工艺优化及其离子交换层析纯化[J]. 食品科学, 2016, 37(8): 45-50.
[13] 苑玉凤. 多指标正交试验分析[J]. 湖北汽车工业学院学报, 2005, 19(4): 53-56.
[14] 何为, 薛卫东, 唐斌. 优化试验设计方法及数据分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2016: 64-70.
[15] 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.