不同提取方法对金钗石斛多糖形貌结构的影响

敖 娇[1]， 鲍家科[2*]， 夏玉吉[3]， 张志宇[2]， 杨芳芳[2]， 杨胜强[1]， 杨 霄[1]
(1. 印江土家族苗族自治县中医院，贵州 印江 555200；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 比较不同提取方法对金钗石斛多糖分子形貌结构的影响。**方法** 采用原子力显微镜观察的方法，获得金钗石斛多糖分子的形貌结构图像，分析比较不同提取方法对其结构形貌的影响。**结果** 在扫描探针显微镜下观察多糖的结构，发现金钗石斛多糖系由大分子链相互连接而形成的结构复杂的网状结构。但酶解反应液经氨水碱化提取生物碱后，再提取的多糖其大部分网状结构的分子链被改变，由复杂的网状结构裂解成为简单的分枝碎片结构；其他提取方法得到的多糖，其形貌结构均无太大差异。对金钗石斛多糖的大分子链进一步放大观察发现，这些大分子链系由球状聚合体结合成“串珠链”，并由串珠链相互缠绕成螺旋状的聚集体而形成。**结论** 本实验初步探讨了提取方法对金钗石斛多糖高级结构的影响，可为进一步研究金钗石斛多糖分子高级结构变化对其生物活性的影响提供参考。

关键词：金钗石斛；多糖；形貌结构；原子力显微镜
中图分类号：R284.2 **文献标志码**：B **文章编号**：1001-1528(2018)07-1648-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.07.046

金钗石斛为药用石斛中的一种，历代诸家本草均予录述，是常用名贵中药材[1]。历版《中国药典》对石斛均有收录，2015 版记载本品“为兰科植物金钗石斛 *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”，其功能主治“益胃生津，滋阴清热。用于热病津伤、口干烦渴、胃阴不足、食少干呕、病后虚热不退、阴虚火旺、骨蒸劳热、目暗不明、筋骨萎软”[2]。多糖是金钗石斛主要活性成分之一，对提高机体免疫力、抗衰老、抗肿瘤等方面有重要作用[3-4]。在前期实验中，发现酶法有助于金钗石斛有效成分的增加，但其多糖的结构是否发生改变，多糖的活性作用是否有影响还未曾探究，因此，本实验借助扫描探针显微镜下的 AFM 模式进一步对不同提取方法下的金钗石斛多糖结构进行了初步观察。

原子力显微镜法（AFM）是测定多糖高级结构的方法之一[5-6]。原理为探针保持弹性悬臂形变而量不变的情况下，针尖会随着样品表面的起伏而上下移动，其轨迹被记录，从而得到了样品表面的形貌。AFM 现已广泛应用在 DNA、蛋白质、磷脂生物膜、多糖等生物大分子以及有机化合物在空气或溶液中的形态观察结构中[7]。目前，对石斛多糖分子形态结构观察研究尚未见报道。

1 仪器与材料

Multimode 8 型扫描探针显微镜（德国 Bruker 公司）；LD-5 型电动离心机（金坛市城东新瑞仪器厂）；DK-98-11 A 型电热恒温水浴锅（天津市泰斯特仪器有限公司）。十六烷基三甲基溴化铵、氯化钠、乙酸乙酯、三氯甲烷、正丁醇、乙醇等均为分析纯；透析袋、云母片均为美国进口产品。pH（4.0～6.0）缓冲液［称取柠檬酸（$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$）适量，加水溶解，配制成 0.1 mol/L 的溶液；称取柠檬酸三钠（$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$）适量，加水溶解，配制成 0.1 mol/L 的溶液；分别取一定体积的 2 种溶液，混合，调 pH 值至 4.0～6.0］。

药材购于贵州省赤水市官渡镇，由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≥6 000 USP-U/mg，20150226）、纤维素酶（酶活力≥15 000.0 U/g，20160408）、果胶酶（酶活力≥50.0 U/g，20150504），3 种酶均由国药集团化学试剂有限公司生产。

2 方法与结果

2.1 多糖提取

2.1.1 加水直接提取 称取 1.0 g 金钗石斛药粉，加水 200 mL，90 ℃回流 2 h，取出，过滤，取滤液 20 mL，加乙醇使醇沉浓度为 85%，醇沉过夜，离心，留取沉淀加水溶解，再次醇沉，重复 3 次。

2.1.2 乙酸乙酯提取后，加水提取 称取 1.0 g 金钗石斛药粉，加氨水 8 mL 静置 1 h，加乙酸乙酯 50 mL 回流提取 2 h，过滤，滤渣挥干溶剂，加水 200 mL，90 ℃回流 2 h，

收稿日期：2017-08-11
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，研究方向为中药及民族药质量控制及新药。Tel：15519014220，E-mail：747767518@qq.com
*通信作者：鲍家科（1955—），男，主任药师，研究方向为中药民族药质量控制技术。Tel：13985430537，E-mail：bjk2005@163.com

取出，过滤，取滤液 20 mL，加乙醇使醇沉浓度为 85%，醇沉过夜，离心，留取沉淀加水溶解，再次醇沉，重复 3 次。

2.1.3 木瓜蛋白酶法提取 称取 1.0 g 金钗石斛药粉，加入 pH 5.5 的缓冲液 50 mL，加入 0.10 g 木瓜蛋白酶酶，于振荡器中 45 ℃下酶解 2.0 h（振荡速度为 110 r/min），取出，置 90 ℃水温中灭酶 10 min[8]，冷却，转移至离心管中离心 20 min，倾取上清液，残渣加 10 mL 水洗，离心 10 min，洗涤 2 次，合并上清液，取上清液 20 mL，加乙醇使醇沉浓度为 85%，醇沉过夜，离心，留取沉淀加水溶解，再次醇沉，重复 3 次。

2.1.4 纤维素酶法提取 称取 1.0 g 金钗石斛药粉，加入 pH 5.0 的缓冲液 40 mL，加入 0.30 g 纤维素酶，于振荡器中 50 ℃下酶解 2.0 h（振荡速度为 110 r/min），取出，置 90 ℃水温中灭酶 10 min，冷却，转移至离心管中离心 20 min，倾取上清液，残渣加 10 mL 水洗，离心 10 min，洗涤 2 次，合并上清液，取上清液 20 mL，加乙醇使醇沉浓度为 85%，醇沉过夜，离心，留取沉淀加水溶解，再次醇沉，重复 3 次。

2.1.5 木瓜蛋白酶联合提取生物碱和多糖 称取 1.0 g 金钗石斛药粉，加入 pH 5.5 的缓冲液 50 mL，加入 0.10 g 纤维素酶，于振荡器中 45 ℃下酶解 2.0 h（110 r/min），取出，置 90 ℃水温中灭酶 10 min，冷却，转移至离心管中离心 20 min，倾取上清液，残渣加 10 mL 水洗，离心 10 min，洗涤 2 次，合并上清液，加适量氨水调 pH 12～13，加与上清液等量的乙酸乙酯萃取，萃取 2 次，合并乙酸乙酯层，挥干备用（生物碱提取）；取水层 20 mL，加乙醇使醇沉浓度为 85%，醇沉过夜，离心，留取沉淀加水溶解，再次醇沉，重复 3 次。

2.1.6 纤维素酶联合提取生物碱和多糖 称取 1.0 g 金钗石斛药粉，加入 pH 5.0 的缓冲液 40 mL，加入 0.30 g 纤维素酶，于振荡器中 50 ℃下酶解 2.0 h（110 r/min），取出，置 90 ℃水温中灭酶 10 min，冷却，转移至离心管中离心 20 min，倾取上清液，残渣加 10 mL 水洗，离心 10 min，洗涤 2 次，合并上清液，加适量氨水调 pH 12～13，加与上清液等量的乙酸乙酯萃取，萃取 2 次，合并乙酸乙酯层，挥干备用（生物碱提取）；取水层 20 mL，加乙醇使醇沉浓度为 85%，醇沉过夜，离心，留取沉淀加水溶解，再次醇沉，重复 3 次。

2.2 多糖纯化

2.2.1 Sevag 去蛋白 取“2.1”项下离心后的沉淀，加水溶解，加等体积 Sevag 试剂（三氯甲烷∶正丁醇=5∶1），振摇，静置，除去沉淀下来的变性蛋白，重复 5 次，直至两相交界处无变性蛋白为止[9-10]。

2.2.2 透析法脱盐 将透析袋在沸水中煮沸 15 min，更换水，再煮沸 15 min。取脱去蛋白的水层，加乙醇醇沉，离心取沉淀，适量水溶解，转移至透析袋中，留存透析袋1/3体积不装满，两头用封口夹夹紧，流水透析 2 d，取出，加乙醇醇沉，离心取沉淀，少量水溶解，加入同等体积的 3% 十六烷基三甲基溴化铵（CTAB），静置 12 h 生成沉淀。离心取沉淀，用适量 10% NaCl 溶液溶解，加入乙醇醇沉，离心取沉淀，适量水溶解，流水透析 3 d，离心，取上清液加乙醇醇沉，取沉淀，加水溶解，稀释，得到样品溶液[11-12]。

用塑料滴管取稀释好的样品溶液，滴 1 滴于固定在小铁片的光滑洁净的云母片上，自然晾干，置于扫描探针显微镜下观察。

2.3 多糖形貌结构观察结果 将样品放入磁性样品台中心，调节样平台高度，按“扫描探针显微镜操作规程”相关步骤操作，借助其附带的软件进行分析，获得试验结果并保存图像。结果见图1～6（左边均为平面图，右边均为立体图）。

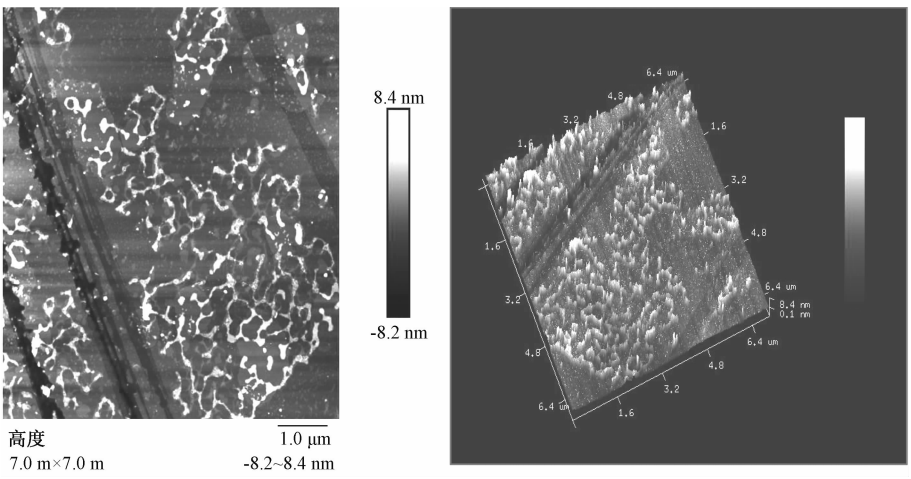

图 1 加水直接提取的多糖结构

金钗石斛直接加水提取的多糖、乙酸乙酯提取生物碱后再提取的多糖以及各种酶法单一提取的多糖，其形貌结构均无太大差异，均是由大分子链相互连接而形成的结构复杂的网状结构。木瓜蛋白酶、纤维素酶酶解反应液经氨水碱化提取生物碱后，再提取的多糖其大部分网状结构的分子链被改变，由复杂的网状结构裂解成为简单的分枝碎

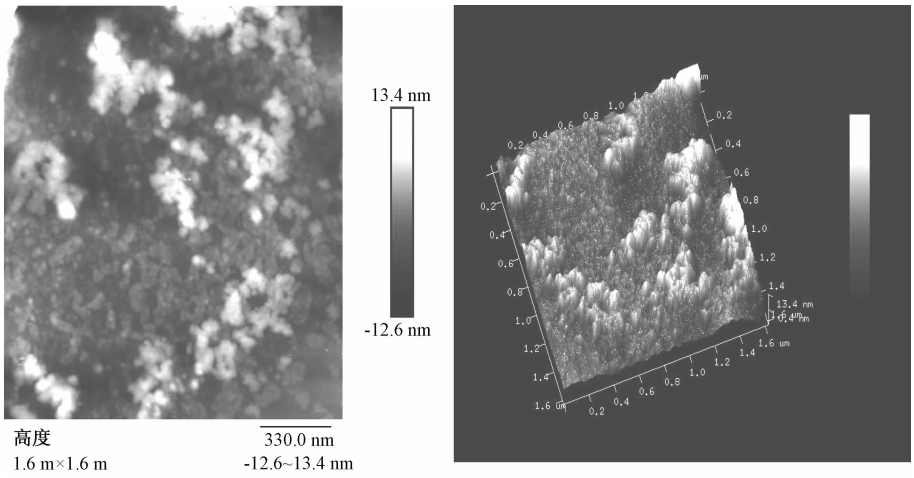

图 2 乙酸乙酯提取后加水提取的多糖结构

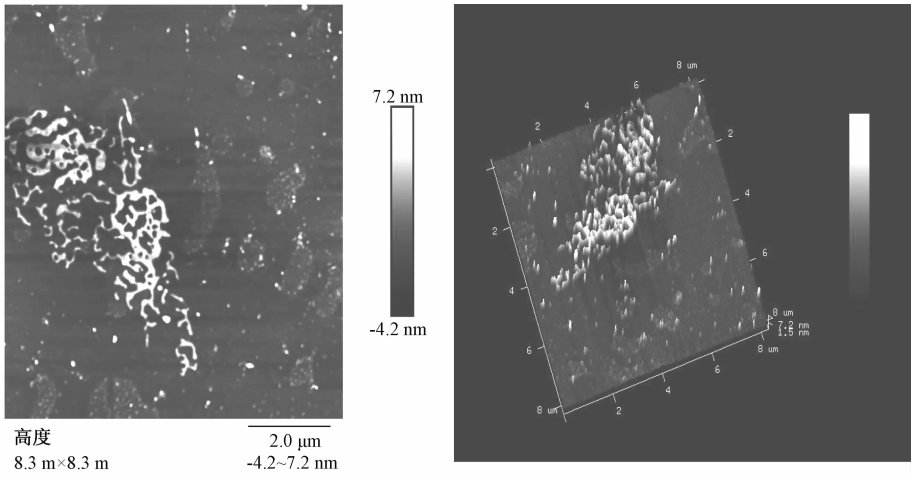

图 3 木瓜蛋白酶提取的多糖结构

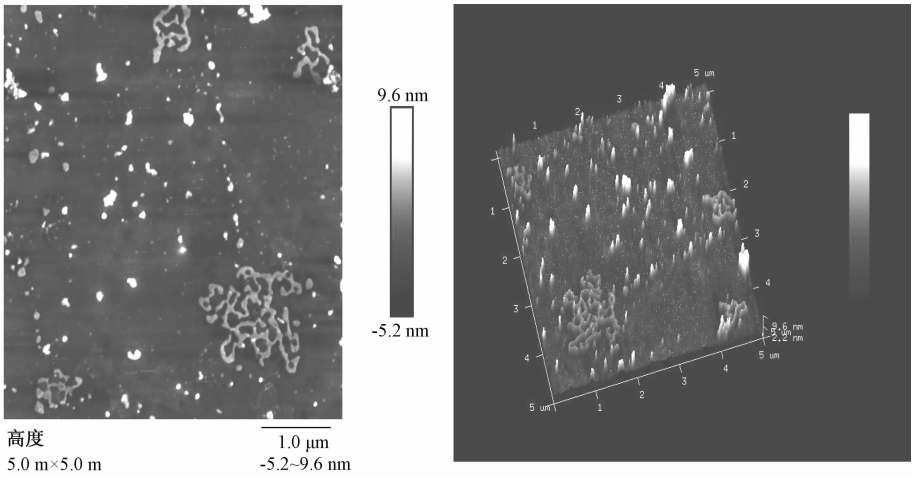

图 4 纤维素酶提取的多糖结构

片结构。

经对多糖的大分子链进一步放大观察发现，这些大分子链系由球状聚合体结合成“串珠链”，并由串珠链相互缠绕成螺旋状的聚集体而形成。

3 讨论

酶法应用于植物药的提取，主要原理为利用酶与植物细胞作用，使纤维素、果胶等一些物质发生降解，破坏细胞的细胞壁结构而有助于有效成分溶出[13]，多糖、黄酮、

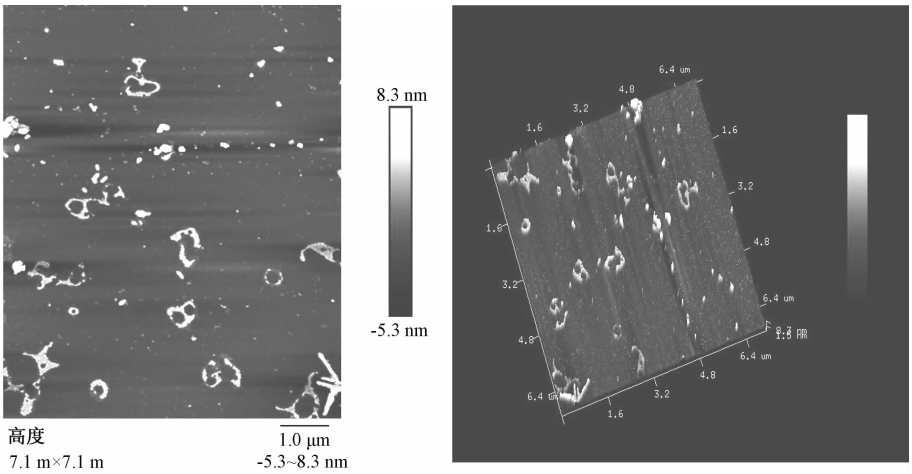

图 5 木瓜蛋白酶提取后加有机溶剂萃取生物碱，水层沉淀的多糖结构

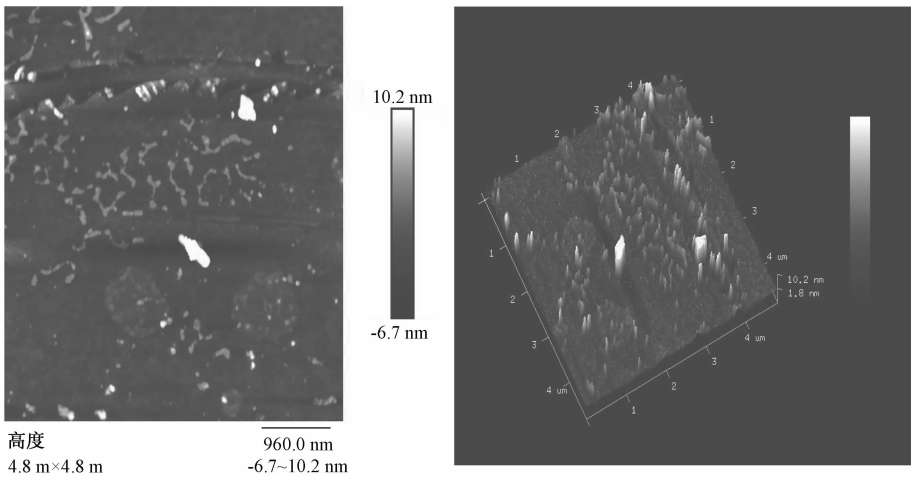

图 6 纤维素酶提取后加有机溶剂萃取生物碱，水层沉淀的多糖结构

生物碱类、萜类、蛋白质及肽类、油类、有机酸类等多种化学成分的提取均已有文献报道[14]，本实验利用 AFM 在酶法提取的基础上进一步探究多糖形貌结构有无变化。AFM 被应用到很多领域，观察的对象可在空气或各种溶剂体系中直接观察[15]，可对多糖等大分子表面形态结构进行观察，在多糖的结构观察实验中，由于是纳米级范围的观察，载体选择建议平整光滑的云母片较好。

为了考察不同提取条件对多糖结构形貌的影响，本实验在相同条件下对直接加水提取多糖，乙酸乙酯提取生物碱后加水提取多糖，直接用酶法提取多糖，酶法联合提取生物碱和多糖 6 种方法所提取多糖的形貌结构进行了初步观察。结果显示加入氨水浸润与乙酸乙酯回流提取过程只是促进生物碱的溶出，对药材中的多糖结构几乎无影响；直接用酶法提取多糖对其结构无影响；酶法联合提取生物碱与多糖过程中，由于酶解使多糖分子溶解于反应液中，加入氨水碱化水溶液使多糖结构发生了改变，复杂的网状结构裂解成简单的分枝碎片结构。

多糖的形貌结构取决于单糖组成的数量和比例，糖链断裂形成小分子多糖后，其具体单糖组成、分布比例以及生物活性可能会发生变化。本实验首次对金钗石斛的不同方法所提取多糖的形貌结构进行了初步观察，由于多糖本身的理化性质，得出利用水或者酶液提取得到的多糖结构均为网状，但当在含有多糖溶液中再加入碱进一步萃取、分离出生物碱后，多糖结构会发生改变，呈分枝碎片状。此外，多糖结构的裂解对于生物活性是正相关作用还是负相关作用，或者是产生新的生物活性等假设暂且不得而知，本实验结果可为今后对其活性的探究打下基础，起到一定的参考作用。

由于是初步探究，实验过程并未收集各种方法所得的干燥多糖进行定量观察，因而未统一各种方法下多糖的浓度，也未对提取的多糖进行分子量测定，仅仅选用提取溶液，借助原子力显微镜初步观察了金钗石斛多糖形貌结构。因此，每种方法下观察的多糖标尺并不统一；即使不同方法下所得的均为网状多糖，但其是否即为某一特定的多糖，其活性是否均一样都还未曾进行考证。今后还需进一步完善，使得结论更有说服力与参考价值。

参考文献：

[1] 滕建北，万德光，王孝勋. 石斛名实及功效的本草考证[J]. 中药材，2013，36(11)：1876-1880.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：92-93.
[3] 屈小媛，武玉祥，张久磊. 石斛化学成分与药理活性研究进展[J]. 天津农业科学，2015，21(4)：19-23.
[4] 安凤娟，何宇新. 金钗石斛多糖的研究进展[J]. 安徽农业科学，2014，42(13)：3857-3862.
[5] 田 华，张义明. 多糖的结构测定及应用[J]. 中国食品添加剂，2012(2)：177-181.
[6] 王小梅，孙润广，郝大鹏，等. 超声提取的麦冬多糖 POJ-U1b 的结构分析及 AFM 观测[J]. 天然产物研究与开发，2016，28(8)：1228-1232.
[7] 张德添，何 昆，张 飒，等. 原子力显微镜发展近况及其应用[J]. 现代仪器，2002(3)：6-9.
[8] 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.
[9] 刘 宁. 金钗石斛质量控制方法研究[D]. 北京：北京中医药大学，2009.
[10] 徐丽媛，李志猛，杨 蕾，等. 菟丝子多糖含量测定方法的研究[J]. 北京中医药大学学报，2011，34(8)：548-551.
[11] 陈 睿，孙润广，王小梅，等. 猪肚菇多糖 WPG1 的相对分子质量测定及原子力显微镜观测[J]. 生物加工过程，2013，11(5)：61-66.
[12] 柳 红，张 静. 南瓜 AP1 多糖结构的分析和原子力显微镜研究[J]. 食品科学，2009，30(5)：55-59.
[13] 余洪波，张晓昱. 酶法在中药提取中的研究进展[J]. 中成药，2005，27(5)：591-593.
[14] 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.
[15] 杨永利，郭守军，叶文斌，等. 银合欢种子多糖微结构的原子力显微镜观察[J]. 食品科学，2012，33(15)：99-102.

石见穿质量标准的研究

曲 悦， 石友权， 陈 方， 张宝徽， 王桂红， 郑国华， 胡俊杰*
(湖北中医药大学，湖北 武汉 430065)

摘要：目的 建立石见穿的质量标准。**方法** 采用薄层色谱鉴别法、理化鉴别法对石见穿进行定性鉴别；对石见穿水分、总灰分、水溶性浸出物含有量进行测定；采用高效液相色谱法测定石见穿中迷迭香酸含有量。**结果** 石见穿的显微鉴别特征性强，含有氨基酸及甾醇类物质，供试品色谱在与对照品色谱相应的位置上显相同颜色的斑点。药材水分为 9.85% ~10.90%，总灰分为 9.48% ~10.83%，水溶性浸出物为 14.25% ~18.40%。迷迭香酸在 0.104 ~1.036 μg (r =0.999 7) 范围内线性关系良好，加样回收率为 97.6% ~102.4% (RSD = 1.60%)。**结论** 该方法可用于石见穿的质量控制。

关键词： 石见穿；迷迭香酸；高效液相色谱法；薄层色谱鉴别法；理化监别法
中图分类号： R287 **文献标志码：** B **文章编号：** 1001-1528(2018)07-1652-04
doi：10.3969/j.issn.1001-1528.2018.07.047

石见穿为唇形科植物华鼠尾草 *Salvia chinensis Benth* 的干燥全草[1]，始载于《本草纲目》第 21 卷草部有名未用项类，李时珍曰："石见穿，主骨痛，大风痈肿"[2]。石见穿亦名紫参、五凤花、小丹参、月下红、石打穿、活血草等[3]主要分布于湖北、江苏、安徽、江西、湖南、广东、广西、四川、云南等地[4]。石见穿具有散结消肿止痛、理气活血、清热解毒等功效[1]。

石见穿药材曾收载于 1977 年版《中国药典》，其后至现行版本中均未收录该药材的药用标准。研究表明石见穿具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎等作用[5-10]，在湖南、上海、北京、山东等多地均为常用药材。而且，关于石见穿的现有研究也主要集中于药理作用、含有量测定和化学成分方面[11-13]，并未对其进行系统的质量标准研究。本实验对 8 批石见穿药材进行性状鉴定、显微鉴定、理化鉴别，并测定了 8 批药材的水分、灰分和浸出物，建立了迷迭香酸的 HPLC 定量测定方法，制订了石见穿药材的质量标准，为石见穿药材的质量控制和临床合理应用提供科学依据。

1 仪器与材料

戴安 Ultimate3000 高效液相色谱仪、硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工有限公司)；Mettler-Toledo MS105 型分析天

收稿日期： 2017-12-12
基金项目： 湖北省食品药品监督管理局《湖北省中药材质量标准》修订项目（[2015] 28）
作者简介： 曲 悦（1995—），女，硕士生，从事中药及其制剂的物质基础研究。E-mail：queal123@163.com
*通信作者：** 胡俊杰（1984—），男，实验师，从事中药新制剂、新剂型研究。Tel：(027) 68890111，E-mail：hero0712@163.com