

· 资源与鉴定 ·

酶解等4种方法用于中药废弃物资源化研究初探(I) ——以脉络宁注射液生产中石斛药渣的多糖资源化研究为例

刘双双^{1,2}, 刘丽芳^{1*}, 朱华旭^{2*}, 郭立玮², 段金康², 潘永兰², 徐向前³

(1. 中国药科大学 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 南京 210009;

2. 南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 南京 210023;

3. 金陵药业股份有限公司 南京金陵制药厂研究所, 南京 210009)

[摘要] 目的:通过4种不同提取方法用于中药生产中废弃物的多糖资源化的比较研究,优选出脉络宁注射液生产废弃物石斛药渣中提取多糖的方法,实现对中药资源的再循环利用。方法:采用酶解法、湿法超微粉碎法、超声法和加热回流法分别提取石斛药渣中石斛多糖,以苯酚-硫酸法测定其多糖提取率;通过单因素考察和正交试验对提取率最高的提取方法进行工艺优选;考察石斛药渣多糖(DDP)对小鼠脾淋巴细胞代谢转化和小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 释放一氧化氮(NO)能力的影响。结果:4种提取方法的多糖提取率分别为0.51%,8.79%,5.34%,3.44%,确定最佳提取方法为酶解;其最佳酶解条件:pH 5.3,料液比1:55,温度50℃,酶活性4000 U·g⁻¹,提取时间300 min;与对照组比较,质量浓度在62.5~125 mg·L⁻¹,DDP显著促进小鼠脾淋巴细胞增殖,DDP与脂多糖(LPS)协同促进作用显著($P < 0.05$, $P < 0.01$),质量浓度为62.5 mg·L⁻¹时,DDP与ConA协同促进作用显著($P < 0.05$),质量浓度在62.5~500 mg·L⁻¹,DDP对小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 产生NO的促进作用极显著($P < 0.01$)。结论:酶解法提取石斛药渣中多糖的工艺简便、得率稳定,具免疫增强作用,具有推广应用价值。

[关键词] 脉络宁注射液; 石斛药渣; 多糖; 资源化; 酶解法; 免疫活性

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)22-0034-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016220034

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160919.1041.018.html>

[网络出版时间] 2016-09-19 10:41

Recycling of Wastes from Traditional Chinese Medicine Production by Wet Ultrafine Grinding Technology and Other Three Methods (I) ——Recycling of Polysaccharide in Mailuoning Injection Production Waste Dendrobii Mobile Dregs

LIU Shuang-shuang^{1,2}, LIU Li-fang^{1*}, ZHU Hua-xu^{2*}, GUO Li-wei²,
DUAN Jin-ao², PAN Yong-lan², XU Xiang-qian³

(1. State Key Laboratory of Active Components of Natural Medicine and Pharmacodynamics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicinal Resource Industrialization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. Nanjing Jinling Pharmaceutical Institute, Jinling Pharmaceutical Co. Ltd., Nanjing 210009, China)

[收稿日期] 20151217(013)

[基金项目] 江苏省科技厅自然科学基金项目(BK2012855);江苏省科技厅产学研联合创新资金——前瞻性研究项目(BY2012036);江苏省六大人才高峰项目(2014-YY-014);江苏省中药资源产业化过程协同创新中心分离平台建设项目(ZDXM-1-6, ZDXM-1-9);江苏省高校优秀学科建设工程资助项目;南京中医药大学校级创新团队项目

[第一作者] 刘双双, 硕士, 从事中药分析的研究, Tel:13260882127, E-mail: shuang_tcp@163.com

[通讯作者] *刘丽芳, 博士, 教授, 从事中药分析方法研究, Tel: 025-86185136, E-mail: liulifang69@126.com;

*朱华旭, 博士, 研究员, 从事基于化学结构的中药制药过程分离技术研究, Tel:13813966309, E-mail: huaxu72@126.com

[Abstract] Objective: To compare four different extraction methods for recycling wastes from traditional Chinese medicine production, in order to select the optimal method to extract polysaccharide from Mailuoning injection production waste *Dendrobii Mobile dregs*. **Method:** The four methods, namely wet ultrafine grinding method, enzyme method, ultrasonic method, heating reflux method, were adopted. The polysaccharide extraction rate was detected by phenol sulfuric acid colorimetry; the process with the highest extraction rate was determined by single factor and orthogonal test; the effect of *Dendrobii Mobile dregs* polysaccharide (DDP) on the proliferation and transformation of lymphocytes in mouse and the NO release of macrophage RAW264.7 were investigated. **Result:** The polysaccharide extraction rates of *Dendrobii Mobile dregs* by the above four different methods were 0.51%, 8.79%, 5.34%, 3.44%, respectively. The optimal extraction method was determined to be the enzymolysis; its optimal enzymolysis conditions were pH at 5.3, solid-liquid ratio at 55, temperature at 50 °C, enzyme dosage of 4 000 U·g⁻¹, extraction time of 300 minutes. Compared with control group, DDP significantly enhanced the proliferation of splenic lymphocytes at concentrations between 62.5-125 mg·L⁻¹, with an obvious synergistic effect between DDP and lipopolysaccharide (LPS) ($P < 0.05$, $P < 0.01$); at the concentration of 62.5 mg·L⁻¹, DDP showed a significant synergistic effect with ConA ($P < 0.05$); at concentrations between 62.5-500 mg·L⁻¹, DDP played a notable role in promoting NO release of mouse macrophage RAW264.7 ($P < 0.01$). **Conclusion:** Enzyme extraction process of polysaccharide from *Dendrobii Mobile dregs* was simple and stable, with the effect in immune enhancement, and worth clinical promotion.

[Key words] Mailuoning injection; *Dendrobii Mobile dregs*; polysaccharide; resource; enzyme extraction method; immune activity

脉络宁注射液为国家级中药保护品种,由金陵药业股份有限公司南京金陵制药厂生产,是防治血栓性闭塞性血管病的中药复方注射液,为国家基本药物目录所保留的 8 个中药注射液品种之一,已成为全国中医院急诊必备药品。脉络宁注射液由牛膝、玄参、石斛、金银花 4 味中药组成,均为临床常用中药;根据中国药材市场网报道,4 味中药的供应日趋紧张,价格逐年上扬。其中,石斛属于国家二类保护植物,石斛属植物已被列入《濒危野生动植物国际贸易公约》附录类,国家对其采收、经营、进出口进行严格限制和管理,预计未来几年中药材石斛将供不应求^[1]。

石斛始载于《神农本草经》,为珍贵中药材,应用历史悠久,具有益胃生津,滋阴清热的功效。石斛中含有多糖、生物碱等化学成分,这些成分与石斛的抗肿瘤、调节免疫、降血糖、降血压等药理作用密切相关^[2-4]。2015 年版《中国药典》所收载石斛为兰科植物金钗石斛 *Dendrobium nobile*, 鼓槌石斛 *D. chrysotosum* 或流苏石斛 *D. fimbriatum* 的栽培品及其同属植物近似种的新鲜或干燥茎^[5]。脉络宁注射液中使用的石斛药材为流苏石斛。流苏石斛主要成分有菲类、黄酮类、多糖类化合物^[6-7],其多糖具有较强的抗氧化、抗炎抗肿瘤、增强免疫能力等作用,有较高的药用价值^[8]。

中药生产中所得药渣,通常被作为废弃物处理,然而,鉴于生产过程中,因原料药材基源各异,入药部位与组织结构不同、化学组成多元,机械加工性能差距大等特点,废弃物中往往还残留大量有效成分。故本文首次以脉络宁注射液生产过程中,经水提之后的石斛药渣作为研究对象,对其多糖成分提取进行优化考察,并初步研究其免疫活性,以期将其制备成免疫调节剂,实现对石斛资源的再次开发利用。实现一种“生产-使用-回收-资源化”的新循环经济理念,构建中药制药生产过程的“清洁工艺”^[9-10],为中药资源的可持续利用提供实验依据。

1 材料

石斛药渣取自金陵药业脉络宁注射液提取后的混合药渣,自然晾晒,除去杂质,牛膝,金银花和玄参碎屑。经南京中医药大学中药资源教研室吴启南教授鉴定,为兰科植物流苏石斛 *D. fimbriatum* 的干燥茎。

BFM-T6BI 型贝利超微粉碎机(济南倍力粉体技术工程有限公司), Allegra64R Centrifuge 型高速冷冻离心机(美国贝克曼库尔特有限公司), RE-1002 型旋转蒸发仪(南京金正教学仪器有限公司), GX-20 型多功能粉碎机(浙江高鑫工贸有限公司), SHZ-D(III)型循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂), Libro AEL-40SM 型 1/10 万电子分析天平

(日本岛津仪器有限公司)。

98% 浓硫酸(上海凌峰化学试剂有限公司,批号 81007);5% 苯酚(广州金华大化学试剂有限公司,批号 20150119);无水葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号 7B8L-257Z);纤维素酶(上海瑞生生物科技有限公司,酶活性 $400 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$,批号 9012548);RPMI 1640, DMEM 培养液(上海源培生物科技有限公司,批号分别为 G40307, K40308),红细胞裂解液(Biosharp 公司,批号 65098010);双抗,胰酶(Sigma 公司,批号分别为 H20210, B40301);一氧化氮(NO)测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 S0021);三氯甲烷、无水乙醇、正丁醇(分析纯);水为超纯水。

雄性 KM 小鼠,SPF 级,体重(20 ± 2)g,由上海杰思捷动物有限公司提供,合格证号 SCXK(沪)2015-0006。RAW 264.7 细胞株,由中国科学院细胞库提供(编号 56622)。

2 方法

2.1 多糖的测定方法

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取葡萄糖对照品 5.57 mg,置于 50.00 mL 量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 $0.114 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖溶液。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密吸取上述对照品储备液 0.20, 0.60, 1.00, 1.40, 1.80 mL, 分别置于 10 mL 具塞试管中,分别向试管中精密加入蒸馏水 1.80, 1.40, 1.00, 0.60, 0.20 mL, 5% 的苯酚溶液 1.00 mL, 浓硫酸 5.00 mL, 摇匀, 室温放置 30 min, 以蒸馏水为空白, 于 490 nm 波长处测其吸光度 $A^{[11]}$ 。以葡萄糖对照品质量浓度为横坐标, 以吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 得线性回归方程 $A = 8.2423C - 0.0093 (r = 0.9996)$ 。结果表明葡萄糖在 $0.02228 \sim 0.10026 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。多糖含量和提取率见计算公式。

多糖含量 $w = c \cdot f \cdot v / m \times 100\%$;

提取率 $\eta = w \cdot m_1 / M \times 100\%$

其中, c 为多糖质量浓度, f 为稀释倍数, v 为样品溶液体积, m 为称取粗多糖样品质量, m_1 粗多糖总质量, M 称取药材质量。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 湿法超微粉碎法 脉络宁石斛药渣粉碎, 过 60 目筛, 备用。精密称取石斛药渣 40.00 g, 浸泡 3 h, 加入蒸馏水 800 mL, 超微粉碎 30 min, 洗涤 2 次并合并提取液, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液浓缩至适当体积, 加无水乙醇调至醇体积浓度

80%, 静置 24 h, 收集沉淀, 冷冻干燥, 即为石斛药渣粗多糖(DDP)。

2.2.2 酶解法 精密称取石斛药渣 1.00 g 置于锥形瓶中, 加入 pH 5.00 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液 50 mL, 酶活性 $4000 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, 恒温摇床, 300 min, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 。取提取液 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液浓缩至适当体积, 加无水乙醇调至醇体积浓度 80%, 静置 24 h, 收集沉淀, 冷冻干燥, 即得 DDP^[12]。

2.2.3 超声法 精密称取石斛药渣 10.00 g, 加蒸馏水 200 mL 浸泡 30 min, 然后在 800 W, $50 \text{ }^\circ\text{C}$, 超声提取 40 min。提取液 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液浓缩至适当体积, 加无水乙醇调至醇浓度 80%, 静置 24 h, 收集沉淀, 冷冻干燥, 即得 DDP。

2.2.4 加热回流法 精密称取石斛药渣 10.00 g 于圆底烧瓶中, 加入蒸馏水 200 mL, 第 1 次加热提取 4 h, 第 2 次加热提取 2 h, 合并 2 次提取液, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液浓缩至适当体积, 加无水乙醇调至醇浓度 80%, 静置 24 h, 收集沉淀, 冷冻干燥, 即得 DDP。

2.3 样品多糖含量测定 精密吸取 2 mL 粗多糖溶液, 置于 10 mL 具塞试管中, 按 2.1.2 项相同操作条件, 在 490 nm 下测其 A , 按回归方程计算出 4 种提取方法提取 DDP 的提取率。

2.4 多糖酶解初提条件筛选

2.4.1 缓冲溶液 pH 对多糖提取率的影响 精密称取石斛药渣 1.00 g, 平行试验 3 份, 料液比 1:50, 提取时间 240 min, 速率 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 温度 $50 \text{ }^\circ\text{C}$, 酶活性 $4000 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, 分别在缓冲液 pH 为 4.00, 4.50, 5.00, 5.50, 6.00 下振荡提取 1 次, 按照 2.2.2 项和 2.3 项操作方法测定各组多糖提取率。

2.4.2 料液比对多糖提取率的影响 精密称取石斛药渣 1.00 g, 平行试验 3 份, 振荡温度 $50 \text{ }^\circ\text{C}$, 提取时间 240 min, 速率 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 酶活性 $4000 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, pH 5.00, 料液比 1:20, 1:35, 1:50, 1:65, 1:80, 分别超声提取 1 次。按照 2.4.1 项操作方法测定各组多糖提取率。

2.4.3 提取温度对多糖提取率的影响 精密称取石斛药渣 1.00 g, 平行试验 3 份, 料液比 1:50, 提取时间 240 min, 速率 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 酶活性 $4000 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, pH 5.00, 分别在温度 40, 45, 50, 55, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 下振荡提取 1 次。按照 2.4.1 项操作方法测定各组多糖提取率。

2.4.4 酶用量对多糖提取率的影响 精密称取石斛药渣 1.00 g, 平行试验 3 份, 在料液比 1:40, 速率

100 r·min⁻¹, 温度 50 ℃ 时, pH 5.00, 提取时间 24 min 下, 分别在酶活性 0, 2 000, 4 000, 6 000, 8 000 U·g⁻¹ 下振荡提取 1 次。按照 2.4.1 项操作方法测定各组多糖提取率。

2.4.5 提取时间对多糖提取率的影响 精密称取石斛药渣 1.00 g, 平行试验 3 份, 料液比 1:50, 速率 100 r·min⁻¹, 温度 50 ℃ 时, pH 5.00, 酶活性 4 000 U·g⁻¹, 分别在提取时间 120, 180, 240, 300, 360 min 振荡提取 1 次。按照 2.4.1 项操作方法测定各组多糖提取率。

2.5 正交设计法优化石斛药渣多糖酶解提取工艺 按 3 个因素, 每个因素 3 水平进行优化实验, 精密称取石斛药渣 1.00 g, 进行 9 次正交试验, 每个实验 3 次平行, 按正交表 L₉(3⁴) 进行正交试验, 按照表 1 的因素水平进行酶解提取, 并按照 2.4.1 项操作方法测定各组多糖提取率。

表 1 石斛药渣多糖酶解提取因素水平

Table 1 Polysaccharide extraction rates of level of form factors

水平	A pH	B 料液比	C/U·g ⁻¹ 酶活性
1	4.70	1:45	3 000
2	5.00	1:50	4 000
3	5.30	1:55	5 000

2.6 验证试验 平行精密称取石斛药渣粉末 1.00 g 3 份, 分别按供试品的制备方法在最佳工艺条件下操作, 按 2.3 操作, 测定石斛药渣多糖的提取率。

2.7 DPS 体外免疫活性研究

2.7.1 体外刺激小鼠脾淋巴细胞增殖实验 按照参考文献[13]的方法进行小鼠脾淋巴细胞悬液的制备, 取纯化后的脾淋巴细胞悬液, 调整细胞密度为 1 × 10⁶ 个/mL, 于 96 孔细胞培养板中阳性孔和实验孔中均加入单细胞悬液 100 μL, 置 5% CO₂ 37 ℃ 培养箱中连续培养 24 h 后, 于空白孔、阳性孔和实验孔中分别加入 RPMI 1640 培养基, ConA(终质量浓度 5 mg·L⁻¹) 和不同质量浓度的 DDP(终质量浓度分别为 62.5, 125, 250, 500 mg·L⁻¹), 每组设 3 个复孔。连续培养 48 h 后, 加入 WST-8 溶液, 培养 2 h 后, 酶联免疫检测仪于 450 nm 下测 A^[14], 并计算免疫刺激指数(SI)。其中, SI = A_{实验组} / A_{空白组}。

2.7.2 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞体外转化实验 取纯化后的脾淋巴细胞悬液, 调整细胞密度为 1 × 10⁶ 个/mL, 96 孔细胞培养板中阳性孔和实验孔中均加入 100 μL 单细胞悬液, 置 5% CO₂ 37 ℃ 培养箱中连续培养 24 h 后, 于阳性孔和实验孔均加入

ConA 10 μL(终质量浓度 5 mg·L⁻¹)^[15], 并分别加入 RPMI 1640 培养基和不同质量浓度的 DDP(终质量浓度分别为 62.5, 125, 250, 500 mg·L⁻¹), 每组设 3 个复孔。连续培养 48 h 后, 按 2.6.1 项所述测定各细胞培养孔 A₄₅₀。

2.7.3 LPS 诱导的小鼠淋巴细胞体外转化实验 方法同 2.7.2, 丝裂原以 5 mg·L⁻¹ LPS 代替 ConA。

2.8 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 释放 NO 能力的检测 将巨噬细胞 RAW264.7 以 5 × 10⁵ 个/mL 的密度接种到 24 孔培养板中, 每孔 500 μL, 置 5% CO₂, 37 ℃ 培养箱中连续培养 24 h 后更换细胞培养液。于空白孔、阳性孔和实验孔中分别加入 DMEM 完全培养基, LPS(15 mg·L⁻¹) 和不同质量浓度的 DDP(终质量浓度分别为 62.5, 125, 250, 500 mg·L⁻¹), 每组设 3 个复孔。作用巨噬细胞 RAW264.7 24 h 后收集各孔中的细胞培养上清^[16], 按照 NO 测定试剂盒操作步骤测定 NO 含量。

2.9 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, *t* 检验采用 SPSS 19.0 统计软件完成。以 *P* < 0.05 表示差异显著。

3 结果

3.1 4 种提取方法提取石斛药渣多糖 酶解法提取石斛药渣多糖的提取率明显高于其他 3 组, 故采用单因素考察和正交设计优化石斛药渣多糖的酶解工艺。见表 2。

表 2 4 种提取方法的石斛多糖提取率

Table 2 Polysaccharide extraction rates of four extraction methods

No.	提取方法	得率/%
1	湿法超微粉碎法	0.51
2	酶解法	8.99
3	超声法	5.34
4	加热回流法	3.44

3.2 多糖酶解条件筛选 结果表明, 随着缓冲液 pH 的升高, 多糖提取率也随之增加, 当缓冲液 pH 5.0 时提取率最高, 在缓冲液 pH 5.0 后, 多糖提取率反而迅速降低, 说明 pH 5.0 是纤维素酶最适 pH。图 1A 随着料液比的增加, 多糖提取率也随之增加, 当料液比为 1:50 时提取率最高, 料液比在 1:50 后, 多糖提取反而缓慢下降, 故选取提取料液比 1:50 为最佳料液比。图 1B 随着温度的升高, 多糖提取率也随着增加, 当温度为 50 ℃ 时提取率最高, 50 ~ 55 ℃ 多糖提取率稳定, 温度在 55 ℃ 后, 多糖提取率迅

速下降,推测纤维素酶在 55 ℃ 后失活,故选取温度为 50 ℃ 为最佳提取温度。图 1C 在酶活性 4 000 U·g⁻¹ 前多糖提取率随着酶活性的增加而增加,4 000 U·g⁻¹ 为最大值,之后进入平台期。可能是当酶浓度升高到一定程度,酶分子过于饱和,一部分酶分子没有机会与底物结合,底物被水解的速度降低,影响产物的释放^[17],故选择酶活性 4 000 U·g⁻¹ 为最佳酶活性。图 1D 随着时间的增加,多糖提取率也随着增加,当提取时间为 300 min 时,多糖提取率最高,在提取时间 300 min 后,多糖提取率反而降低,可能是因为随着溶出的多糖增加,它与酶解反应附属产物发生了反应,故选择提取时间 300 min 为最佳提取时间,见图 1E。

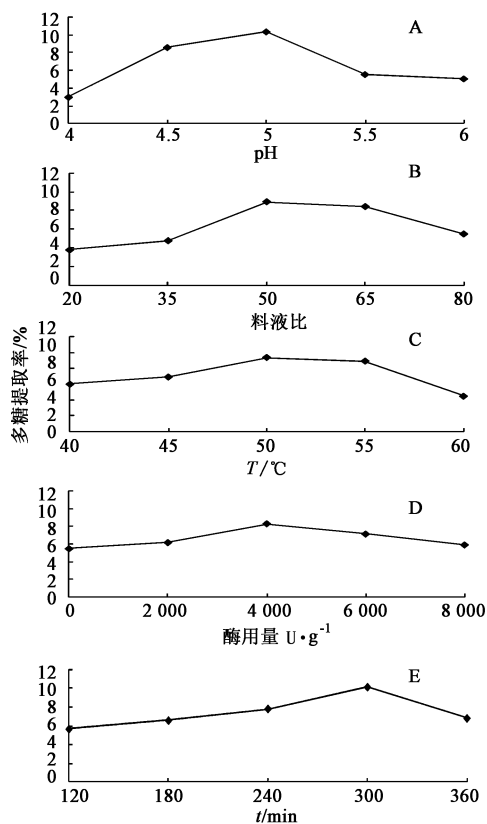


图 1 缓冲溶液 pH、料液比、提取温度、酶用量和提取时间对多糖提取得率的影响

Fig. 1 Effect of buffer solution pH, solid-liquid ratio, temperature, enzyme dosage and extracting time for polysaccharide extraction rate

3.3 正交设计法优化石斛药渣多糖酶解提取工艺

根据酶解单因素实验结果,确定酶解最佳提取温度 50 ℃,最佳提取时间 300 min,此时多糖提取率最高,并可知缓冲溶液 pH,料液比,酶用量是影响酶解提取实验的主要因素。按照表 2 的因素水平进行酶解提取,结果表明采用酶解法提取石斛药渣多糖,以多糖提取率作为考察指标时,各因素对石斛药渣多

糖提取工艺影响的大小为 $C > A > B$,即酶活性 $> \text{pH} > \text{料液比}$;方差分析表明因素 A, B, C 不具显著性差异,确定最佳提取条件为 $A_2B_3C_3$,即最佳方案为 pH 5.0,料液比 1:55,酶活性 4 000 U·g⁻¹。见表 3,4。

表 3 石斛药渣多糖酶解提取正交试验

Table 3 Polysaccharide extraction rates of results orthogonal test

No.	A	B	C	多糖质量分数/%
1	1	1	1	6.44
2	1	2	2	6.29
3	1	3	3	7.95
4	2	1	2	7.51
5	2	2	3	8.99
6	2	3	1	8.40
7	3	1	3	8.54
8	3	2	1	6.01
9	3	3	2	7.35

表 4 石斛药渣多糖酶解提取方差分析

Table 4 Polysaccharide extraction rates of analysis of variance

因素	SS	df	F	P
A	3.144	2	0.046	>0.05
B	0.968	2	0.014	>0.05
C	4.475	2	0.066	>0.05
SE(误差)	68.04	2		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

3.4 验证试验 结果表明在最佳工艺条件下提取石斛药渣多糖含量高且稳定。见表 5。

表 5 石斛药渣多糖酶解提取验证试验结果

Table 5 Polysaccharide extraction rates of results of verification test

No.	DDP 质量分数/%	平均多糖质量分数/%	RSD/%
1	9.12		
2	9.27	9.04	1.05
3	8.99		

3.5 DDP 的体外免疫活性

3.5.1 DDP 对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响 在 62.5 ~ 125 mg·L⁻¹, DDP 显著促进小鼠脾淋巴细胞增殖 ($P < 0.05, P < 0.01$), 随着浓度的增加, 促进作用增强。且 DDP 质量浓度 125 mg·L⁻¹ 时其增强作用优于 T 淋巴细胞分裂原 ConA, 但随后浓度再增加, 促进作用降低, 表现为双向剂量效应关系。见表 6。

3.5.2 DDP 对小鼠脾淋巴细胞体外转化的影响 ConA 和 LPS 分别是小鼠脾淋巴细胞的 T 细胞和 B 细胞的分裂原, 多糖与其协同刺激小鼠脾淋巴细胞能促进细胞的转化^[18]。结果表明 62.5 mg·L⁻¹ 时,

表 6 不同质量浓度 DDP 对小鼠脾脏细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Effect of different concentrations of DDP on proliferation of splenocytes in mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A_{450}	SI
空白	-	0.422 ± 0.013	1.00
ConA	5	0.498 ± 0.032 ¹⁾	1.18
DDP	62.5	0.449 ± 0.004 ¹⁾	1.06
	125	0.560 ± 0.068 ¹⁾	1.33
	250	0.414 ± 0.004	0.98
	500	0.414 ± 0.064	0.98

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

DDP 与 ConA 协同作用能显著促进小鼠脾淋巴细胞转化 ($P < 0.05$), 在 62.5 ~ 125 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, DDP 与 LPS 协同作用能显著促进小鼠脾淋巴细胞转化 ($P < 0.05, P < 0.01$), 浓度也为双向剂量效应关系。见表 7。

表 7 不同质量浓度 DDP 对小鼠脾脏细胞转化 A_{450} 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 7 Effect of different concentrations of DDP on mouse splenocyte transformation A_{450} ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	DDP + ConA	DDP + LPS
空白	-	0.396 ± 0.008	0.412 ± 0.023
DDP	62.5	0.524 ± 0.011 ¹⁾	0.560 ± 0.040 ¹⁾
	125	0.418 ± 0.023	0.561 ± 0.005 ²⁾
	250	0.393 ± 0.035	0.372 ± 0.022
	500	0.378 ± 0.012	0.344 ± 0.050

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 9 同)。

3.5.3 DDP 对小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 释放 NO 能力的影响 在 62.5 ~ 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, DDP 促进小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 产生 NO 的作用极显著 ($P < 0.01$), 且随着质量浓度的增高 NO 的释放量增多, 其促进作用与浓度呈正相关。见表 8。

表 8 不同质量浓度 DDP 对小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 释放 NO 能力的影响

Table 8 Effect of different concentrations of DDP on NO release of macrophage RAW264.7 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A_{540}	$\text{NaNO}_2 / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	0.063 ± 0.001	14.67
ConA	5	0.126 ± 0.005 ²⁾	29.33
DDP	62.5	0.110 ± 0.010 ²⁾	25.60
	125	0.143 ± 0.008 ²⁾	33.28
	250	0.188 ± 0.005 ²⁾	43.74
	500	0.242 ± 0.013 ²⁾	56.30

4 讨论

基于本论文所用石斛药材, 为提取过的药材, 要想实现对药渣资源利用, 药渣分类筛选以及采用非常规方法提高药渣中多糖的提取率非常重要。脉络宁注射液制备过程中共得到牛膝、玄参、石斛和金银花 4 味中药混合药渣, 石斛药材质地坚硬, 且投料前未被粉碎, 经水提后仍易于采用干燥风选法从混合药渣中筛选。干燥风选法不仅可以有效剔除混合药渣中的碎屑和湿团, 药渣干燥后, 在当地加装风选机可以进行大量筛选, 实现工业化应用。本文所选用的酶解法、超声法等 4 种方法的技术原理各异, 是造成它们对石斛药渣粗多糖的提取率高低不同的主要原因。其中, 酶解法的粗多糖提取率最高, 这是因为纤维素酶破坏了药材的细胞壁, 促使多糖类成分更容易溶出。超声法省时, 收率高, 且不用加热, 但目标成分在超声作用达到一定时间后, 提取率增加缓慢或呈下降趋势^[19]。其原因可能有两个, 一是在长时间超声作用下, 有效成分发生降解, 致使提取率降低; 二是超声作用时间太长, 使提取粗品中杂质含量增加, 有效成分含量反而降低, 影响提取率的增加。湿法超微粉碎法是干法超微粉碎技术的一种延伸, 该技术在粉碎的同时使溶剂到达植物组织内部, 应用强大机械振动研磨组织, 使其中有效成分溶于溶剂中, 能在很短时间内将中药有效成分提取出来。本论文中该方法的提取率低, 可能是因为药材 (药渣) 粒子的破碎程度较高, 比表面积增大, 表面能变大, 造成对目标成分的较多吸附。传统热回流所需时间长, 耗能大, 并且多糖中的糖肽类物质在提取过程中容易发生结构破坏, 提取效率比较低, 难以实现资源的充分利用。

酶解法提取石斛药渣多糖的提取率最高, 体外免疫活性结果表明酶解得到的多糖具有显著免疫活性。故利用酶所具有的生物催化功能, 通过选择适宜的酶可将中药废弃物及其资源性化学成分转化为高附加值的产物或特定活性化合物, 提升其资源化利用价值^[20]。本论文中纤维素酶的应用可能在目的产物中引入来自植物纤维的单糖、寡糖和多糖。后期我们将应用超滤膜去除单糖和寡糖, 并利用离子交换色谱, 对其多糖进一步分离纯化, 提高它的增强免疫活性。

目前, 中药废弃物的综合利用技术尚处于初级阶段, 研究领域具有明显局限性, 基本上是围绕农业种植业、养殖业方向的居多, 其次是建筑业, 在其他领域的利用研究较少, 特别是中药药渣资源化技术

在医学上的研究更是凤毛麟角。本文及其后续研究将围绕国家中药保护品种——脉络宁注射液的废弃物资源化,以中医药学、民族医药学与资源学理论为指导,通过利用价值发现技术如药效评价、保健功能评价、兽药活性评价、农药效应评价等,发现大生产过程产生的非药用部位、加工过程形成的下脚料,以及中药材深加工产业过程中形成的大量废渣、废水的可利用价值,基于现代分离技术,实现废弃物的多途径、多层次综合利用,探索成本可控的中药废弃物资源化循环利用经济模式,提升资源利用效率,促进中药资源产业化过程中由传统工艺向生态工艺转化,实现中药资源产业的可持续发展^[21-23]。

[参考文献]

[1] 段金廛,吴启南,宿树兰. 2012-2013年我国中药及天然药物资源研究进展与学科建设[J]. 中国现代中药,2014,41(9):693-703.

[2] 邵曰凤,胡长青. 石斛属植物化学成分和药理活性研究现状[J]. 天然产物研究与开发,2012,14(B12):121,152.

[3] Wang J H, Luo J P, Zha X Q, et al. Comparison of antitumor activities of different polysaccharide fractions from the stems of *Dendrobium nobile* Lindl [J]. Carbohydr Polym,2010,79(1):114-118.

[4] 凌志扬,房玉良. 石斛的化学成分及药理作用[J]. 中国当代医药,2012,15(9):13-19.

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

[6] 毕志明. 流苏石斛化学成分研究[J]. 药学学报,2003,38(7):526-529.

[7] Xu F Q, Xu F C, Hou B, et al. Cytotoxic bibenzyl dimers from the stems of *Dendrobium fimbriatum* Hook [J]. Bioorg Med Chem Lett,2014,24(22):5268-5273.

[8] Xing X H, Cui S W, Nie S P, et al. A review of isolation process, structural characteristics, and bioactivities of water-soluble polysaccharides from *Dendrobium* plants[J]. Bio Carbohy Diet Fib,2013,1(2):131-147.

[9] 董海丽,刘红. 湿法超微粉碎提取石斛多糖的研究[J]. 北方园艺,2013(15):150-152.

[10] 丁安伟,王振月. 中药资源综合利用及产品开发[M]. 北京:中国中医药出版社,2013:124.

[11] 殷红梅,尚强,萧伟. 金银花多糖脱蛋白方法的研究[J]. 中草药,2010,41(1):584-586.

[12] 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.

[13] Ren Z, He C, Fan Y, et al. Immune-enhancing activity of polysaccharides from *Cyrtomium macrophyllum* [J]. Int J Bio Macromol,2014,70:590-595.

[14] 陈璋辉,陈云龙,吴涛,等. 细茎石斛多糖 DMP4a-1 的结构特性及免疫活性研究[J]. 中国药学杂志,2005,40(23):1781-1784.

[15] Zhang W, Song D, Xu D, et al. Characterization of polysaccharides with antioxidant and immunological activities from *Rhizoma Acori Tatarinowii* [J]. Carbohydr Polym,2015,133:154-162.

[16] Cui H Y, Chang L W, Yu R W, et al. The polysaccharide isolated from *Pleurotus nebrodensis* (PN-S) shows immune-stimulating activity in RAW264.7 macrophages [J]. CJNM,2015,13(5):355-360.

[17] 叶陈丽,贺帅,曹伟灵,等. 中药提取分离新技术的研究进展[J]. 中草药,2015,46(3):457-464.

[18] Sun W, Meng K, Qi C, et al. Immune-enhancing activity of polysaccharides isolated from *Atractylodis macrocephalae* Koidz [J]. Carbohydr Polym, 2015, 126(17):91-96.

[19] 吴素萍,徐建宁. 酶法提取枸杞多糖的研究[J]. 食品科技,2007(8):114-117.

[20] 段金廛,宿树兰,郭盛,等. 中药废弃物的转化增效资源化模式及其研究与实践[J]. 中国中药杂志,2013,38(23):3991-3995.

[21] 段金廛. 中药废弃物的资源化利用[M]. 北京:中国中医药出版社,2014:218-219.

[22] 赵振坤,王淑玲,丁刘涛,等. 中药药渣再利用研究进展[J]. 杭州师范大学学报:自然科学版,2012,11(1):38-42.

[23] 朱华旭,段金廛,郭立玮,等. 基于膜科学技术的中药废弃物资源化原理及其应用实践[J]. 中国中药杂志,2014,39(9):1728-1732.

[责任编辑 邹晓翠]