

基于 RSM 及 PMP-HPLC 特征图谱分析黄精炮制过程中多糖组分含量变化

甘小凤¹, 韦国良^{1#}, 李婷婷¹, 屈曾义¹, 徐 胜¹, 何 敏³, 范宝磊^{1,2*}

1. 湖北科技学院药学院, 湖北 咸宁 437000

2. 湖北省咸宁市咸安区市场监督管理局, 湖北 咸宁 437000

3. 湖北通城县裕丰生态农业开发有限公司, 湖北 通城 437400

摘要:目的 探究单一酶法与复合酶法提取黄精 *Polygonati Rhizoma* 多糖的最优条件; 分析黄精九蒸九晒过程中多糖组分含量的变化, 为黄精和其他中药材的炮制方法提供相应理论依据。方法 响应面 (RSM) 优化酶法提取黄精多糖, 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 柱前衍生法和 HPLC 法对九蒸九晒的姜形黄精、蒸出液中的多糖进行分析, 建立黄精古法炮制以及蒸出液的多糖特征图谱。比较不同酶对黄精中多糖提取效率的影响。结果 单一酶中纤维素酶提取效果最好, 4 种复合酶中纤维素酶与果胶酶结合提取效果最好; 通过 RSM 优化得到最佳提取条件: 纤维素酶在酶解温度为 51 ℃、酶的添加量为 2%、酶解 pH 值为 5.40 的情况下, 精制黄精多糖提取物中多糖总量为 (675.34±0.10) mg/g; PMP-HPLC 检测炮制过的 4 种黄精, 均含有甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖。其中鸡头黄精 *Polygonatum sibiricum*、姜形黄精 *P. cyrtoneura*、竹节黄精 *P. odoratum* 多糖均以葡萄糖为主, 马鞭黄精 *P. filipes* 多糖以甘露糖为主。随着姜形黄精被炮制次数的增加, 各单糖含量先增加后下降再增加后趋于稳定, 以甘露糖、半乳糖变化明显。蒸出液各单糖含量先升高后趋于稳定, 其中甘露糖、葡萄糖的变化明显。结论 研究表明纤维素酶参与的单一酶法和复合酶法提取黄精多糖, 不仅可以提升黄精多糖的提取效率, 也提高黄精多糖纯度; 九蒸九晒会影响黄精中的多糖提取得率; PMP-HPLC 特征图谱能够准确地表征黄精炮制过程中多糖含量的变化, 可用于评价黄精及炮制药材的多糖组分的差异。

关键词: 黄精; 多糖; 特征图谱; 超声辅助提取; 复合酶; 响应面优化

中图分类号: R283.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)20-4932-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.20.014

Study on content of polysaccharide during processing of *Polygonatum sibiricum* by RSM and PMP-HPLC characteristic map technology

GAN Xiao-feng¹, WEI Guo-liang¹, LI Ting-ting¹, QU Zeng-yi¹, XU Sheng¹, HE Min³, FAN Bao-lei^{1,2}

1. School of Pharmacy, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437000, China

2. Market Supervision and Administration Bureau of Xian'an District, Xianning 437000, China

3. Yufeng Ecological Agriculture Development Co., Ltd., Tongcheng 437000, China

Abstract: **Objective** To investigate the best extracting conditions of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides by single and compound enzymatic methods, and to study on the change content of polysaccharide in processing of *P. sibiricum* by steamed and shined for nine times, which provide theoretical basis for processing of *P. sibiricum* and other Chinese herbal medicines. **Methods** Response surface method (RSM) was used to optimize the extraction of polysaccharides in *P. sibiricum*. PMP precolumn derivatization and HPLC characteristic map technology were used to identify and analyze the changes of polysaccharide of *P. sibiricum* being steamed and shined for nine times and establish polysaccharide characteristic map of *P. sibiricum* by ancient processing and distillate. The effect of different enzymes on the extraction efficacy of *P. sibiricum* polysaccharides was also compared. **Results** The extracting effect of cellulase in single enzyme was the best. Moreover, cellulase and pectinase were also the

收稿日期: 2019-08-29

基金项目: 湖北省食品药品监督管理局重点项目 (20180103); 湖北省卫生健康委员会中医药面上项目 (ZY2019M029); 湖北科技学院药学重点学科专项 (2019-20YZ07)

作者简介: 甘小凤 (1999—), 女, 研究方向为天然药物分析。Tel: 13277598681 E-mail: 1271102740@qq.com

*通信作者 范宝磊 (1980—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为天然药物活性物质提取与分析。

Tel: 18986638283 E-mail: fanbl_1211@hbust.edu.cn

#并列第一作者 韦国良 (1998—), 男, 研究方向为天然药物分析。Tel: 15717241901 E-mail: 1045118781@qq.com

most significant factor for extracting polysaccharides from *P. sibiricum* in four complex enzymes. The best extracting conditions for polysaccharide obtaining by RSM as follows: Cellulase temperature was 51 °C, cellulase dosage was 2%, and the total polysaccharide content was (675.34 ± 0.10) mg/g when the pH value of enzymolysis was 5.40. PMP-HPLC was used to detect four processed *P. sibiricum*, which contained mannose, ribose, rhamnose, glucose, and galactose. Glucose had a high proportion in *P. odoratum*, *P. cyrtonea*, and *P. sibiricum* polysaccharide, and *P. filipes* polysaccharide mainly composed of mannose. With the increase of processed times, the content of each monosaccharide increased first, then decreased, then increased and then tended to be stable. The content of mannose and galactose varied greatly. The content of monosaccharides in the distillate increased first and then stabilized, and the content changes of mannose and glucose were obvious. **Conclusion** The extraction efficiency and purity of *P. sibiricum* polysaccharides can be improved by single and compound enzymatic extraction with cellulase, and the extraction yield of polysaccharide in *P. sibiricum* could be affected by steamed and shined for nine times. PMP-HPLC characteristic map technology can be used to determine the content of the polysaccharide in processing of *P. sibiricum* accurately and reproducibly, which can be used for the quality evaluation of *P. sibiricum* and other Chinese herbal medicines.

Key words: *Polygonatum sibiricum* Red.; polysaccharide; characteristic map; ultrasound extraction; complex enzyme; response surface method

黄精 *Polygonati Rhizoma* 为百合科植物滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.、黄精 *P. sibiricum* Red. 或多花黄精 *P. cyrtonea* Hua 的干燥根茎。按形状不同,习称“大黄精”“鸡头黄精”“姜形黄精”^[1]。黄精具有“补脾胃之精,润心肺之燥热”的作用,其味甘,性平,归脾、肺、肾经,具有滋阴润肺、补益脾气的功效^[2],是传统的药食同源性中药,自古被认为是补益类中药中的上品,其化学成分主要为单糖、多糖、多种氨基酸和生物碱等^[3]。多糖是黄精中主要的药效成分,是衡量黄精质量的主要物质,被视为黄精的标志物^[4]。

中药多糖是一类重要生物活性物质,既具有免疫调节,又具有抗肿瘤、抗氧化、调血脂等功效^[5-8]。多糖的提取方法包括热水浸提醇沉法、酸碱提取法、酶解提取法等。多糖的结构是支撑其生物活性的基础,多糖的表征需要分析单糖的组成。目前,分析多糖的方法主要有气相色谱法(GC)^[9]、高效液相色谱法(HPLC)^[10-11]和质谱法(MS)^[12]等。HPLC 柱前衍生法测定单糖简便、快捷,已被科学家们广泛地应用于中药多糖的鉴定与分析。

黄精作为一款药食两用的中药材,未经炮制的黄精“刺人喉咙”无法食用,需要经过炮制后才能入药。已有多种古籍记载了黄精的诸多炮制方法,如单蒸、重蒸、九蒸九晒、酒蒸、黑豆酒制等^[13],对黄精的炮制以蒸煮法为主。许多学者曾对黄精多糖的提取及分析进行了研究^[14-15],但因古法炮制耗时耗力,以致于对其炮制品中活性成分的提取和分析研究较少^[16]。

随着医药领域的不断发展,黄精多糖的提取工艺和黄精的炮制工艺发生了明显变化。本实验采用

响应面(RSM)优化酶辅助法提取黄精多糖的同时,对九蒸九晒的姜形黄精、九次姜形黄精蒸出液和现代工艺炮制的马鞭黄精 *P. filipes* Merr. ex C. Jeffrey et McEwan、竹节黄精 *P. odoratum* (Mill.) Druce、姜形黄精 *P. cyrtonea* Hua 和鸡头黄精 *P. sibiricum* Red. 中各多糖组分含量的变化进行研究,利用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生化,采用 HPLC 进行测定分析,建立起九蒸九晒黄精的特征图谱,为阐明其炮制机制以及黄精在炮制过程中多糖活性成分的变化奠定物质基础。本实验的黄精多糖研究路线图见图 1。

1 仪器与材料

1.1 仪器

岛津 HPLC-16 高效液相色谱仪,岛津仪器有限公司; LGJ-10 A 冷冻干燥器,上海贺帆仪器有限公司; HR/20 M 冷冻离心机,湖南赫西仪器装备有限公司; SHZ-D (III) 循环水式多用真空泵,郑州博科仪器设备有限公司; KQ 3200 DB 型数控超声波清洗器,昆山市测试仪器有限公司; UV-2700 紫外分光光度计,日本岛津公司; HH-65 数显恒温水浴锅,江苏金坛市亿通电子有限公司; RE-5299 旋转蒸发器,郑州市亚荣仪器有限公司; FA 2004 B 电子天平,上海越平科学仪器有限公司。

1.2 试剂

纤维素酶、胃蛋白酶和果胶酶,国药集团化学试剂有限公司; 标准品甘露糖(Man, 批号 G1820156)、木糖(Xyl, 批号 J1620058)、半乳糖醛酸(GalUA, 批号 G1810145)、葡萄糖(Glc, 批号 K1622049)、核糖(Rib, 批号 G1811036)、半乳糖(Gal, 批号 K1706732)、岩藻糖(Fuc, 批号

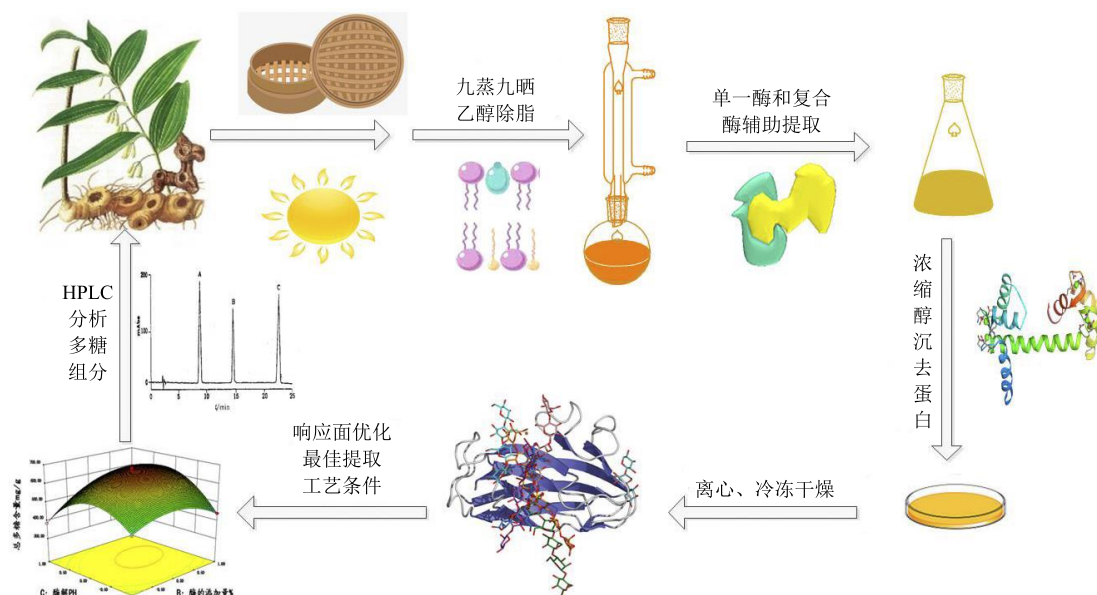


图 1 黄精多糖研究路线图

Fig. 1 Summary of research on *P. sibiricum* polysaccharide

G1812026)、葡萄糖醛酸 (GlcUA, 批号 J1709924) 和鼠李糖 (Rha, 批号 G1720456), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 以上单糖质量分数均大于 98%; 其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 药材

咸宁通城黄精 (湿) 产自咸宁通城金山通城县裕丰生态农业开发有限公司, 采用 50 °C 减压干燥; 黄精 (干) 产自安徽亳州康慧中药有限责任公司。黄精样品经过湖北科技学院肖若蕾副教授鉴定, 确定为百合科黄精属植物长梗黄精 *Polygonatum filipes* Merr. ex C. Jeffrey et McEwan (马鞭黄精)、玉竹 *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce (竹节黄精)、多花黄精 *Polygonatum cyrtoneura* Hua (姜形黄精) 和黄精 *Polygonatum sibiricum* Red. (鸡头黄精)。

九蒸九晒炮制: 姜形黄精 (湿) 洗净后放入蒸锅蒸制 12 h 停火, 在蒸笼焖过夜, 第 2 天取出晒干, 即为蒸晒 1 次的样品, 如此反复操作, 得蒸、晒 1 次至 9 次的样品。

2 方法与结果

2.1 黄精总多糖提取

2.1.1 提取工艺 黄精→除脂^[17]→酶解→提取 (热水提取、超声提取^[18]、超声酶辅助提)→浓缩 (至原体积的 1/4~1/3)→醇沉^[18] (加入 4 倍体积的无水乙醇)→离心→除蛋白^[19] (氯仿-正丁醇, 体积比 4:1)→再次醇沉→得到的粗多糖溶于 5 mL 纯水, 冷冻干燥→得到精制黄精多糖。

2.1.2 超声酶辅助提取

(1) 单一酶: 分别精密称取样品质量 1% 的纤维素酶、果胶酶、胃蛋白酶加入各等份黄精多糖溶液中, 含有纤维素酶 (pH 5.00)、果胶酶 (pH 3.00) 的黄精多糖溶液在 50 °C 恒温水浴 60 min, 含有胃蛋白酶 (pH 2.20) 的黄精多糖溶液则在 37 °C 恒温水浴 60 min, 进行酶解。酶解 60 min 后, 进行相应的提取实验。超声提取条件为料液比 1:30, 提取温度 52 °C, 提取时间 60 min, 超声功率 70 W。分别得到 3 种酶辅助提取的黄精粗多糖, 将其按照相同适宜的比例配制多糖溶液, 将所得的黄精多糖溶液按照苯酚-硫酸法^[20]处理后, 最后进行 UV 法测定 3 种酶辅助提取所得的黄精多糖的总多糖含量, 得出最适提取黄精多糖的酶。

(2) 复合酶: 纤维素酶-果胶酶、纤维素酶-胃蛋白酶、果胶酶-胃蛋白酶、纤维素酶-果胶酶-胃蛋白酶 4 种复合酶组合按适宜条件进行黄精多糖的提取^[21]。纤维素酶的最适 pH 值在 4.00~5.00, 最适温度 40~60 °C; 果胶酶的最适 pH 值在 3.00~3.50, 最适温度 50 °C; 胃蛋白酶的最适 pH 值在 1.00~4.00, 最适温度 37 °C。因此考虑到 3 种酶的最适温度与最适 pH 值差异较大, 故 4 种组合酶采用的最适温度为 50 °C, 最适 pH 值为 4.00, 水浴恒温酶解 1 h。后续实验操作与单一酶的实验操作相同。

2.2 苯酚-硫酸法测定黄精总多糖含量

2.2.1 Glc 标准溶液的配制及标准曲线的绘制 精

密称取 100 mg Glc 于烧杯中,溶解后,置于 100 mL 量瓶中,去离子水定容至刻度。即得 1.00 mg/mL 的 Glc 标准溶液。用移液管精密量取一定量体积 1.00 mg/mL Glc 母液,加入去离子水定容,配制成 0.01、0.02、0.04、0.05、0.06、0.07 mg/mL 的 Glc 标准溶液。各取 1.00 mL 后加入 1.00 mL 6% 苯酚溶液,再迅速滴加 6.00 mL 浓硫酸,边加边振摇,15~20 min 冷却至室温,在 490 nm 处检测吸光度值。通过绘制 Glc 的吸光度-质量浓度标准曲线,得到回归方程为 $Y=10.261 X+0.084 9$, $r^2=0.992$ 。

2.2.2 样品中黄精多糖含量测定结果 通过苯酚-硫酸法测定各种酶辅助提取姜形黄精(干)中多糖总量及提取率见表 1。超声辅助酶提取与传统酶法提取进行比较,传统的热水辅助酶提取,温度达到一定程度使细胞失水涨破。超声与酶一起作用于细胞壁,作用条件温和,超声辅助酶提取所得到的黄精多糖纯度高,干燥所得到的多糖所含的杂质少。并且酶在不同的温度及 pH 值等条件下所拥有的酶活力不同,酶解细胞,释放出多糖分子的速率也不

相同。加入纤维素酶或者果胶酶,所得到的多糖总量相对于加入胃蛋白酶所得到的多糖总量高。即使胃蛋白酶,在最适宜的温度、缓冲液下所提取到的黄精多糖,其蛋白质的比重高,多糖纯度低。复合酶组合中有纤维素酶的加入也会提高多糖总量,效果最好的是纤维素和果胶酶组合。因此纤维素酶与果胶酶是黄精多糖提取的最佳酶选。复合酶的加入要综合考虑酶的多种因素,才使得 2 种酶发挥出最大的效果,若其中一种酶占优势,与另一种酶存在强竞争,那么所得到多糖总含量,与只加入单一种类的酶比较变化不大。因此,综合考虑提取率和多糖总量,确定黄精提取的提取方法为超声纤维素酶辅助提取,通过设计 Box-Behnken 响应面(RSM)试验对该方法影响酶作用的因素进行优化。

2.3 RSM 优化多糖提取条件

2.3.1 RSM 优化黄精多糖的提取条件 在上述单一酶与复合酶预试验的基础上,选择影响姜形黄精多糖质量分数(Y)的 3 个因素即酶解温度(A)、酶的添加量(B)、酶解 pH 值(C)进行考察,按照 Box-Behnken 响应面试验设计方案,共 17 个试验点,其中 5 个为零点,每组重复 3 次。试验设计因素水平及结果见表 2。2 项式回归模型系数的方差分析结果见表 3。结果显示 A(酶解温度)、B(酶的添加量)因素对 Y 有极显著的影响。各因素影响的重要性依次为 $A>B>C$ 。该试验回归方程的模型拟合程度达极显著水平($P<0.000 1$),失拟项无显著性($P>0.05$)。结果表明该模型所设计的黄精多糖样品预测实验模型拟合程度良好,且模型与试验值误差小,对优化黄精多糖的提取条件具有一定的分析意义。模型相关系数($r^2=0.978 4$)和校正相关系数($r^2_{adj}=0.950 6$)均较高,说明模型拟合程度良好,黄精总多糖的预测值与实测值之间有较好的相关性,试验误差小,回归方程代替试验真实点分析和预测黄精总多糖。因此,可用此模型回归方程预测黄精多糖的提取结果。

通过 Design-Expert 8.0.6 软件,以酶解温度、酶的添加量和酶解 pH 值对 Y 的影响得到的三维曲面图见图 2。3 个因素的两两因素为考察对象,做出因素间相互作用对 Y 的响应面,见图 2。响应面坡面越陡峭表明响应面受实验因素变化就越大,响应面坡面越平缓则相反。由图可见两两因素交互响应面坡面陡峭顺序为 $AC>BC>AB$ 。在图 2-AB 中酶解温度和酶的添加量的等高线的形状为圆形,说明

表 1 样品中多糖总量和提取率测定结果

Table 1 Total polysaccharide content and extraction rate of samples

分组	多糖提取率/%	多糖总量/(mg·g ⁻¹)
H-E	17.17	462.07
U-E	4.72	835.20
H-X	9.82	820.31
H-G	2.12	651.51
H-W	2.46	248.36
U-X-G	6.58	985.72
U-X-W	8.87	731.30
U-W-G	6.21	472.08
U-X-W-G	6.80	894.86

H-E: 热水提取; U-E: 超声提取; H-X: 热水纤维素酶辅助提取; H-G: 热水果胶酶辅助提取; H-W: 热水胃蛋白酶辅助提取; U-X-G: 超声纤维素酶-果胶酶辅助提取; U-X-W: 超声纤维素酶-胃蛋白酶辅助提取; U-W-G: 超声胃蛋白酶-果胶酶辅助提取; U-X-W-G: 超声纤维素酶-蛋白酶-果胶酶提取

H-E: hot water extracted polysaccharide; U-E: ultrasonic extracted polysaccharide; H-X: cellulase extracted polysaccharide under hot water; H-G: pectinase extracted polysaccharide under hot water; H-W: pepsase extracted polysaccharide under hot water; U-X-G: cellulase and pectinase extracted polysaccharide under ultrasonic; U-X-W: cellulase and pepsase extracted polysaccharide under ultrasonic; U-W-G: pepsase and pectinase extracted polysaccharide under ultrasonic; U-X-W-G: cellulase, pepsase and pectinase extracted polysaccharide under ultrasonic

表 2 响应面试验设计因素水平与结果 ($n = 3$)Table 2 Factors and levels and results of response surface test design ($n = 3$)

试验号	A/°C	B/%	C	Y/(mg·g ⁻¹)	试验号	A/°C	B/%	C	Y/(mg·g ⁻¹)
1	50 (0)	1.0 (-1)	4.50 (-1)	467.90	10	50 (0)	2.0 (0)	5.25 (0)	680.22
2	45 (-1)	2.0 (0)	6.00 (1)	334.54	11	55 (1)	2.0 (0)	6.00 (1)	517.03
3	55 (1)	2.0 (0)	4.50 (-1)	368.47	12	50 (0)	1.0 (-1)	6.00 (1)	385.11
4	55 (1)	3.0 (1)	5.25 (0)	597.62	13	45 (-1)	2.0 (0)	4.50 (-1)	449.29
5	50 (0)	3.0 (1)	4.50 (-1)	440.28	14	50 (0)	2.0 (0)	5.25 (0)	667.83
6	50 (0)	2.0 (0)	5.25 (0)	685.49	15	45 (-1)	3.0 (1)	5.25 (0)	419.92
7	55 (1)	1.0 (-1)	5.25 (0)	488.85	16	50 (0)	2.0 (0)	5.25 (0)	642.50
8	50 (0)	3.0 (1)	6.00 (1)	557.47	17	45 (-1)	1.0 (-1)	5.25 (0)	395.74
9	50 (0)	2.0 (0)	5.25 (0)	650.36					

表 3 2 项式回归模型方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis of binomial regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	均方	F	P 值
模型	224 900.00	9	24 992.55	35.18	<0.000 1	A ²	58 183.54	1	58 183.54	81.90	<0.000 1
A	17 342.67	1	17 342.67	24.41	0.001 7	B ²	21 945.76	1	21 945.76	30.89	0.000 9
B	9 638.97	1	9 638.97	13.57	0.007 8	C ²	71 590.97	1	71 590.97	100.77	<0.000 1
C	581.58	1	581.58	0.82	0.395 7	总残差	4 973.15	7	710.45		
AB	1 788.87	1	1 788.87	2.52	0.156 6	失拟项	3 593.46	3	1 197.82	3.47	0.130 2
AC	17 333.04	1	17 333.04	24.40	0.001 7	纯误差	1 379.69	4	344.92		
BC	9 998.00	1	9 998.00	14.07	0.007 2	总和	229 900.00	16			

$P < 0.05$, 显著差异; $P < 0.01$, 极显著差异

$P < 0.05$, significant difference; $P < 0.01$, highly significant difference

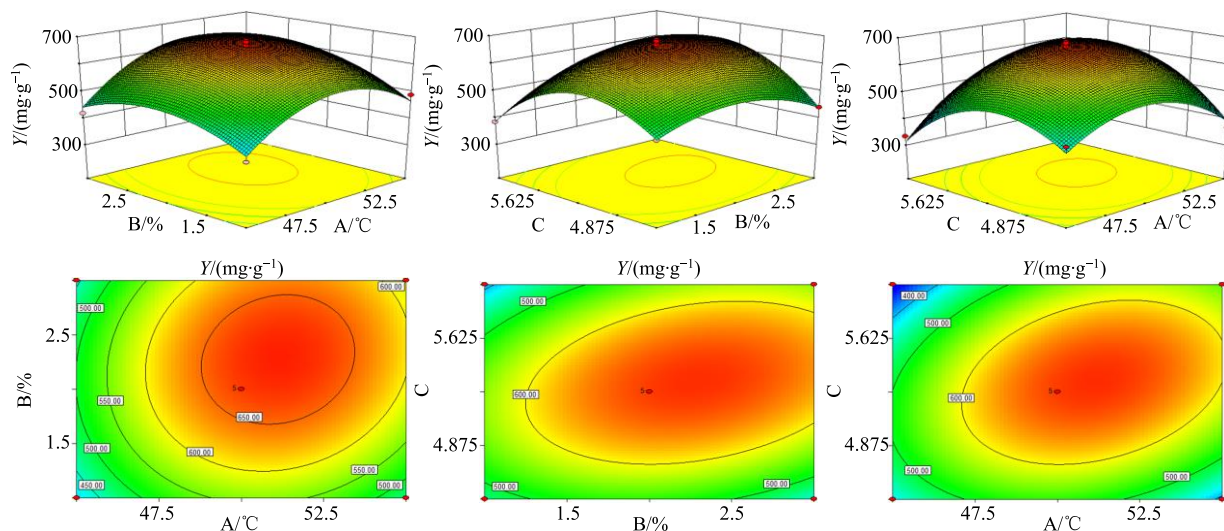


图 2 酶解温度和酶添加量以及酶解 pH 值对黄精多糖质量分数影响的响应面和等高线

Fig. 2 Response surface and contour plot of effect of enzymolysis temperature, enzyme dosage and enzymolysis pH value on total polysaccharides content of *P. sibiricum*

交互作用不显著。而图 2-BC 和图 2-AC 中等高线的形状为椭圆形, 说明酶解 pH 值和酶的添加量、酶解温度和酶解 pH 值的交互作用显著。酶解温度和

酶解 pH 值的响应面的坡面越陡且等高线为椭圆形时, 两者关联性好、交互作用强对 Y 影响最大。

2.3.2 试验结果验证 对回归模型进行预测得到黄

精多糖酶辅助提取最佳工艺为酶解温度 51.38 ℃、酶的添加量 2.34%、酶解 pH 值为 5.38, 精制黄精多糖提取物中的 Y 理论值为 678.28 mg/g。为检验模型预测的准确性, 结合实验实际操作, 选取酶解温度 51 ℃、酶添加量 2%、酶解 pH 值 5.40 进行 3 次平行实验, 取平均值, 得到精制黄精多糖提取物中 Y 为 (675.34 ± 0.10) mg/g。实验结果与最佳理论条件下所得的结果接近, 说明拟合良好、参数可靠。

2.4 黄精多糖组分 PMP-HPLC 法测定与分析

所用黄精多糖为按“2.3.2”项条件提取得到的。

2.4.1 色谱条件 色谱柱为岛津 Inertsil ODS-3 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 配备型号为 SPD-16 紫外检测器; 流动相为 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (含 0.1% 乙酸)-乙腈 (81:19), 等度洗脱, 柱温及检测器温度 40 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 250 nm; 进样量 10 μL。

2.4.2 对照品溶液的制备 分别精密称取 9 种单糖各 10 mg, 加纯水配制成 9 种单糖混合对照品溶液 (各单糖质量浓度约为 0.5 mg/L)。精密量取 200 μL 混合对照品溶液于离心管中, 再加入 200 μL 0.50 mol/L PMP 甲醇溶液 (现配现用) 于离心管中, 充分摇匀, 在 70 ℃ 水浴条件下反应 30 min, 反应完全后将其冷却至室温, 再逐步滴加 10% 冰醋酸溶液调节溶液 pH 值至中性, 边滴加边振摇, 充分混匀。混匀后加 1.00 mL 氯仿, 超声萃取掉过多的 PMP, 10 min 后弃去有机层, 此操作重复 4 次, 8 000 r/min 下离心 7 min, 上层清液为对照品溶液, 待测。

2.4.3 供试品溶液的制备 准确称取 2.00 mg 黄精多糖放入 10.00 mL 的螺纹顶空瓶, 加入 5.00 mL 盐酸溶液 (2.00 mol/L), 密封后混匀, 然后在 90 ℃ 下水解 3 h^[22], 冷却至室温后, 8 000 r/min 离心 7 min, 上层清液待衍生化^[23]。精密量取 200 μL 黄精多糖水解液和氨水溶液于离心管中, 再加入 200 μL 0.50 mol/L PMP 甲醇溶液 (现配现用) 于离心管中, 充分摇匀, 在 70 ℃ 水浴条件下反应 30 min, 反应

完全后将其冷却至室温, 再逐步滴加 10% 冰醋酸溶液调节溶液 pH 值至中性, 边滴加边振摇, 充分混匀。混匀后加 1.00 mL 氯仿, 超声萃取除去过多的 PMP, 10 min 后弃去有机层, 此操作重复 4 次, 8 000 r/min 离心 7 min, 上层清液为供试样品溶液, 待测。

2.4.4 PMP-HPLC 分析方法优化 查阅诸多文献及多次进行预试验, 发现除了流动相种类外, 流动相 pH 值、乙腈体积分数对分离效果也颇有影响, 因此将实验分为等度洗脱和梯度洗脱进行考察。通过乙酰胺溶液、50% 甲醇溶液、乙腈-磷酸盐缓冲液 (pH 6.8、pH 6.9、加入 0.1% 乙酸溶液), 这几种不同流动相进行实验。结果分离效果为乙腈-磷酸盐缓冲液 > 乙酰胺溶液 > 50% 甲醇溶液, 因此选用乙腈-磷酸盐缓冲液进行等度洗脱和梯度洗脱, 其中加入乙酸溶液的流动相分离效果最好, 因为单糖中 GlcUA、GalUA 是弱酸性的, 采用反向色谱法分析分离弱酸多糖样品时, 流动相中加入 0.1% 乙酸, 可以抑制多糖的解离, 增强组分在固定相上的保留, 并改善峰形。等度洗脱乙腈体积分数分别为 17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%, 其中发现分离效果最好的是等度洗脱, 乙腈-磷酸盐缓冲液 (加入 0.1% 乙酸溶液) 体积比为 19:81, 其中 9 种单糖的分离度均大于 1.5。图 3 为混合单糖标准品在 5 种不同乙腈体积分数下通过等度洗脱得到的 HPLC 图, 流动相为 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液-乙腈, 进样量 10 μL, 体积流量为 1 mL/min, 等度洗脱。

由图 3 可知, 虽然 21%、20% 乙腈的分离度较好, 但与 22% 乙腈的色谱图一样, 三者均未出现 10 个色谱峰, 对比之下分离效果最好的 18% 乙腈和 19% 乙腈, 均出 10 个色谱峰, 且分离度也是 5 组中最好的。将 18% 乙腈和 19% 乙腈的分离度进行比较, 发现乙腈体积分数为 19% 时, 有 6 个峰的分离度大于 1.5, 乙腈体积分数为 18% 时, 仅有 5 个峰大于 1.5。因此得到乙腈的最优体积分数为 19%, 其能够让混合单糖标准品达到较好分离的效果。

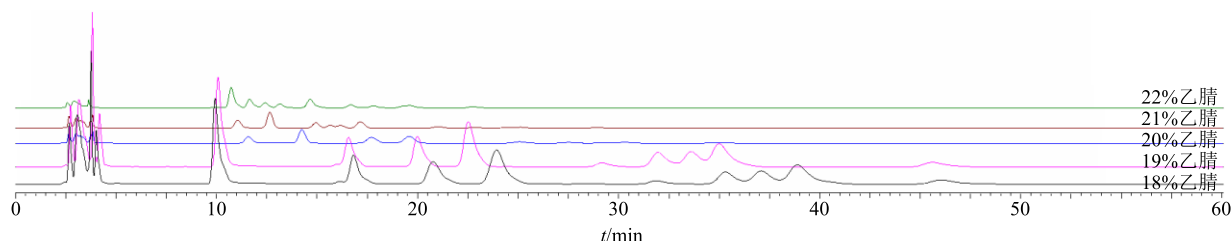
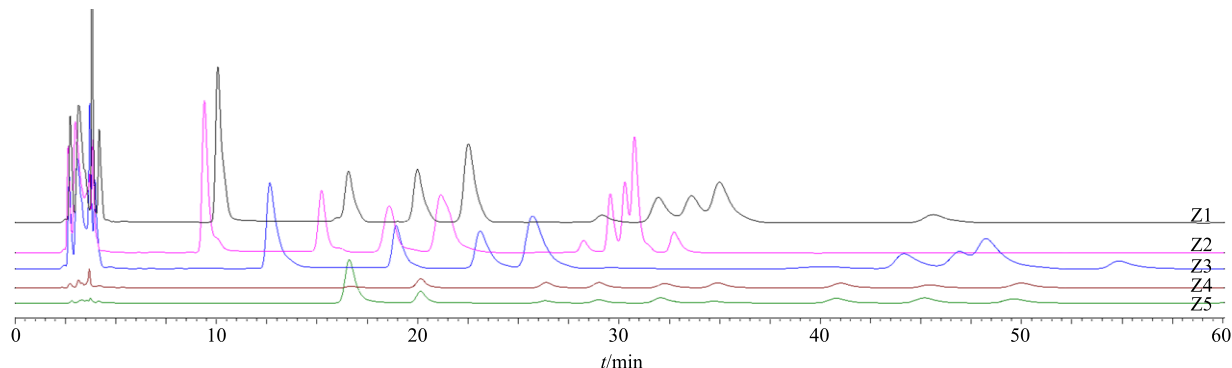


图 3 在不同体积分数乙腈下的混合单糖标准品 HPLC 色谱对照图

Fig. 3 HPLC of nine mixed monosaccharides under different concentrations of acetonitrile

图 4 为混合单糖标准品 HPLC 图, 等度洗脱, 乙腈体积分数均为 19%, 其中标准品的质量浓度和磷酸盐缓冲液的浓度及组成不同。从图 4 中可以看出, 出峰时间最早的是 Z2, 但其出峰效果不好, 出现双峰和少了峰, 各单糖的峰没有分开; 其次是 Z1

和 Z3, 两者色谱峰均出现了 10 个色谱峰, 但出现了双峰和拖尾的现象, 相比 Z1~Z3, 分离效果较好的为 Z4 和 Z5。将二者的分离度进行对比, 两者的分离度均大于 1.5, 且 Z5 中 8 个色谱峰的分离度大于 Z4, 这说明 Z5 的分离效果最好。



Z1-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液, 标准品稀释比 1:50 Z2-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液, 标准品稀释比 1:100 Z3-0.02 mol·L⁻¹ 磷酸盐溶液, pH 6.8, 标准品稀释比 1:50 Z4-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液, 0.1% 乙酸, 标准品稀释比 1:50 Z5-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液, 0.2% 乙酸, 标准品稀释比 1:50

Z1-0.05 mol·L⁻¹ phosphate buffer solution, standard diluted to 1:50 Z2-0.05 mol·L⁻¹ phosphate buffer solution, standard diluted to 1:100 Z3-0.02 mol·L⁻¹ phosphate solution, pH 6.8, standard diluted to 1:50 Z4-0.05 mol·L⁻¹ phosphate buffer solution contained 0.1% acetic acid, standard diluted to 1:50 Z5-0.05 mol·L⁻¹ phosphate buffer solution contained 0.2% acetic acid, standard diluted to 1:50

图 4 在不同标准品质量浓度和磷酸溶液浓度下的混合单糖标准品 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC of nine mixed monosaccharides under different standard concentrations and phosphate buffer concentrations

因此, 通过系列实验得到最优 HPLC 的进样条件: 流动相为 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (含 0.1% 乙酸)-乙腈, 体积比为 81:19, 进样量为 10 μL, 体积流量为 1 mL/min, 柱温为 40 °C, 下述 HPLC 法进样条件均采用该条件。

2.4.5 PMP-HPLC 法测定多糖组分单糖含量的线性关系考察 分别精密称取 5.00 mg 9 种单糖标准品置于 10 mL 量瓶中, 用 5.00 mL 移液管移取 5.00 mL 于量瓶中, 配成 1 mg/mL 的各单糖标准溶液。之后用相应量程的移液枪, 分别从配制的 1.00 mg/mL 标准溶液中吸取 50、200、400、600、800 μL 于 10 mL 量瓶中, 再分别定容, 得到 5、20、40、60、80 μg/mL 的标准溶液。将配制的 9 种标准溶液按照“2.4.2”项方法衍生处理后。进样, 进行 HPLC 检测, 测定其 9 种单糖对应不同质量浓度的色谱峰面积。绘制 9 种单糖的色谱峰面积 (Y)-质量浓度 (X) 标准曲线, 得到 9 种成分的回归方程、相关系数和线性范围分别为 Man $Y=15\,983 X-15\,587$, $r^2=0.996\,9$, 线性范围 5~80 μg/mL; GlcUA $Y=17\,210 X-35\,814$, $r^2=0.980\,5$, 线性范围 5~80 μg/mL; GalUA $Y=9\,254.3 X+642.55$, $r^2=0.995\,1$, 线性范围 5~80 μg/mL; Rib $Y=15\,837 X-26\,548$,

$r^2=0.993\,9$, 线性范围 5~80 μg/mL; Rha $Y=6\,268.7 X-40\,562$, $r^2=0.969\,6$, 线性范围 5~80 μg/mL; Glc $Y=14\,315 X+7\,262.8$, $r^2=0.999\,0$, 线性范围 5~80 μg/mL; Gal $Y=15\,923 X-46\,524$, $r^2=0.987\,9$, 线性范围 5~80 μg/mL; Xyl $Y=20\,964 X-70\,038$, $r^2=0.988\,5$, 线性范围 5~80 μg/mL; Fuc $Y=6\,272.3 X-7\,251.3$, $r^2=0.995\,3$, 线性范围 5~80 μg/mL。

2.4.6 精密度试验 取“2.4.5”项中 40 μg/mL 单糖衍生后的待测液, 连续重复进样 6 次, 计算 9 种单糖峰面积的 RSD。计算结果得到 RSD 分别为 Man 2.29%、GlcUA 2.37%、GalUA 2.17%、Rib 2.56%、Rha 2.49%、Glc 2.25%、Gal 2.75%、Xyl 2.35%、Fuc 1.81%, 可知 9 种单糖的 RSD 均小于 3%, 说明仪器有良好的精密度。

2.4.7 稳定性试验 取 40 μg/mL 衍生后的供试品溶液, 每隔 3 h 进样 5 次, 以及衍生 24 h 后进样, 计算 9 种单糖峰面积的 RSD, 计算结果 RSD 分别为 Man 1.71%、GlcUA 1.62%、GalUA 1.34%、Rib 1.28%、Rha 2.09%、Glc 2.06%、Gal 1.47%、Xyl 1.63%、Fuc 1.44%, 可知 9 种单糖的 RSD 均小于 3%, 说明试验中衍生化的供试品溶液在 24 h 有良好的稳定性。

2.4.8 重复性试验 精密称取 5.00 mg 姜形黄精多糖样品, 按照“2.4.3”项方法制成供试品溶液, 平行制备 6 份, 进样后, 计算样品中通过预试验所确定的 7 种单糖质量分数的 RSD。结果 RSD 分别为 Man 1.46%、GalUA 1.14%、Rib 1.64%、Rha 1.01%、Glc 1.39%、Gal 1.91%、Xyl 1.80%, 可知 7 种单糖的 RSD 均小于 3%, 表明该方法具有良好的重复性。

2.4.9 加样回收率试验 精密量取已测定各成分含量的黄精多糖, 分别加入线性范围内的 3 种不同质量浓度的 9 种单糖混合标准品溶液, 制备供试品溶液 6 份, 进行加样回收试验, 每个样品重复进样 3 次, 所得结果各成分的平均加样回收率分别为 Man 101.32%、GalUA 100.57%、Rib 98.28%、Rha 100.75%、Glc 97.65%、Gal 100.42%、Xyl 100.88%, RSD 分别为 Man 0.16%、GalUA 0.23%、Rib 0.08%、Rha 0.02%、Glc 0.05%、Gal 0.52%、Xyl 0.54%。9 种单糖的平均回收率在 97.00%~101.50%, RSD 均小于 0.54%。

2.4.10 PMP-HPLC 法分析结果 采用“2.4.1”项

下的色谱条件能有效地分离出 9 种不同类型的单糖, 分离度均大于 1.5, 见图 5-A。将图 5-B~E 与 5-A 色谱图中的保留时间进行比较, 便可知道 4 种不同的黄精多糖样品中所含的单糖种类。通过 HPLC 法确定黄精多糖中单糖的种类, 按照“2.4.5”项分别计算出 4 种黄精样品中各单糖的比例。马鞭黄精中有 Man、GalUA、Rib、Rha、Glc、Gal、Xyl, 其比例为 72.5 : 0.5 : 3 : 5 : 15 : 3 : 1; 竹节黄精中有 Glc、Rha、Gal、Man、Xyl、Rib、GalUA, 其比例为 34 : 18 : 19 : 20.1 : 5 : 3.7 : 0.2; 姜形黄精中有 Man、GalUA、Rib、Rha、Glc、Gal、Xyl, 其比例为 3 : 1 : 3 : 24 : 51 : 11 : 7; 鸡头黄精中有 Man、Rib、Rha、Glc、Gal、Xyl, 其比例为 4 : 14 : 17 : 51 : 7 : 7。可见马鞭黄精样品中以 Man 为主, 其次是 Glc; 竹节黄精样品以 Glc 为主, 其次是 Man; 姜形黄精以 Glc 为主, 其次是 Rha; 鸡头黄精主要是以 Glc 为主, 其次是 Rha。其中马鞭黄精是 Man 的含量最高, 竹节黄精、姜形黄精、鸡头黄精中均是 Glc 的含量最高。

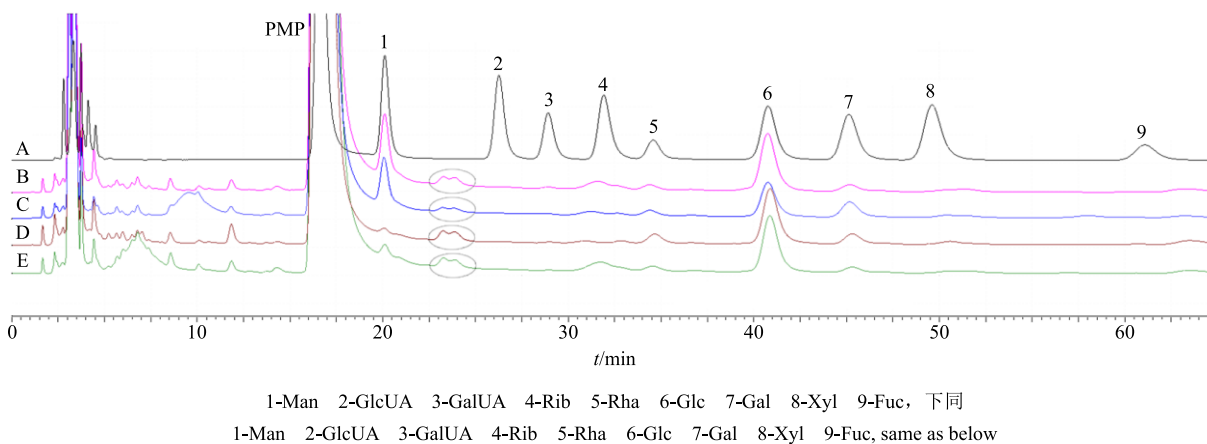


图 5 混合标准品 (A) 与马鞭黄精 (B)、竹节黄精 (C)、姜形黄精 (D)、鸡头黄精 (E) 样品的 HPLC 特征图谱

Fig. 5 HPLC characteristic map of mixed standard (A), *P. filipes* (B), *P. odoratum* (C), *Po. cyrtoneura* (D), and *P. sibiricum* (E) sample

2.5 九蒸九晒黄精多糖和蒸出液中多糖的 PMP 衍生物 HPLC 法分析结果

在九蒸九晒炮制的过程中, 黄精 (干) 的颜色逐渐由黄褐色变为黑褐色。其蒸出液的颜色也在逐步发生变化, 由澄清的黄褐色变为黑褐色, 再次变为澄清的黄褐色, 第 5、6 次蒸出液的颜色最深。将九蒸九晒所炮制黄精 (干), 产生的蒸出液与上述 4 种样品进行相同处理, 共 18 个黄精多糖衍生样品液, 分别进样 10 μ L, 进行 HPLC 检测。从图 6 中可知, 在蒸出液中, 9 次黄精多糖样品与混合单糖

标准品的色谱图对比, 发现 9 次黄精溶液中均没有 Rib 与 Fuc。将其 9 次的峰面积分别进行叠加与比较, 发现其中第 2 次的多糖总量最高。其中单糖的种类也是最多。由炮制的黄精 (干) 提取的黄精粗多糖的色谱图 (图 7) 可知, 共出现了 7 种单糖, 少了 GlcUA 和 Fuc, 单糖含量随着蒸出次数的增加而减少, 其中 Glc 峰面积的降低幅度最大, 但 Gal 的峰面积在显著增加。

由图 8 可知, 炮制的黄精 (干) 比 9 次蒸出液的含糖量低, 在蒸出液中第 2 次的多糖含量最高,

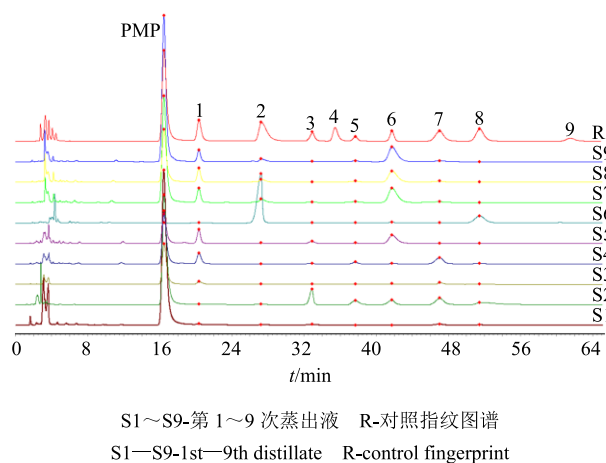


图 6 9 次蒸出液的多糖衍生样品色谱图

Fig. 6 Polysaccharide chromatogram of distillate for nine times

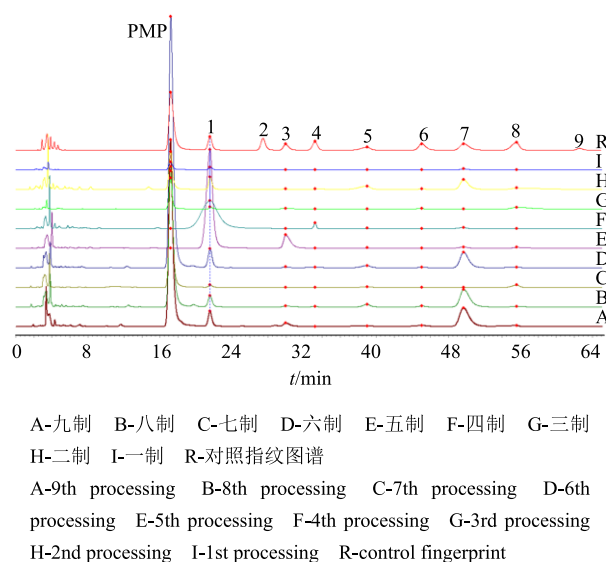
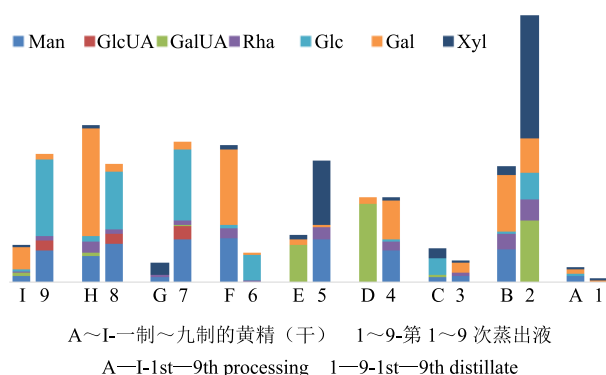


图 7 炮制 9 次的黄精 (干) 衍生样品色谱图及对照图谱

Fig. 7 Polysaccharide chromatogram of *P. sibiricum* being steamed and shined for nine times图 8 炮制 9 次的黄精 (干) 与 9 次蒸出液的单糖含量对比
Fig. 8 Comparison of monosaccharide content between nine distillates and *P. sibiricum* being steamed and shined for nine times

并且也高于炮制黄精的一制~九制的多糖总量。在蒸出液中第 7~9 次的多糖总量逐渐趋于平衡,而在炮制黄精八制中 Gal 的含量出现最大值。图 8 也显示了蒸出液及炮制黄精中单糖种类及所占比例的变化,发现炮制黄精九制、八制、六制和二制中 Gal 占比最大,五制、四制中 GalUA 占比最大,蒸出液中第 9、8、7、6 次中 Glc 的占比最大。两者的 Man 均在后期趋于稳定。

3 讨论

从黄精多糖的提取工艺来看,酶的种类及酶水解的适宜条件: pH 值、温度和酶的浓度都对黄精多糖的提取有一定的影响。通过多组、重复、RSM 优化,得出黄精多糖提取效率大小为酶解温度>酶的添加量>酶解 pH 值。提取实验中, RSM 优化的方案: 酶解温度为 51 °C、酶的添加量为 2%、酶解 pH 值为 5.40。多糖总量 (675.34 ± 0.10) mg/g 与 RSM 预测的结果接近。

在对黄精多糖组分进行 HPLC 法分析时要注意流动相的配比、pH 值、温度和柱压等问题。在实验过程中,当温度升高柱压降低,流动相的 pH 值过低过高均会对色谱柱有影响,黄精多糖样品溶液呈弱酸性且 pH 值范围在 3~7,因此在流动相中加入 0.1%乙酸,起到了抑制黄精多糖的解离和增强多糖在固定相上保留的作用;不同流动相对样品的洗脱效果不同,流动相的配比不同洗脱的效果也不同;故样品要进行 HPLC 法分析时,需提前设计预试验找到进样的最优色谱条件,才能保证后续实验进行。本实验找到的最佳色谱条件:柱温及检测器温度为 40 °C,体积流量为 1.0 mL/min,流动相为 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(加入 0.1%乙酸)-乙腈(体积比 81:19),进样量为 10 μ L。该实验条件能较好地分离混合单糖标准液,黄精多糖样品液中的单糖成分。

通过炮制的黄精(干)与蒸出液的多糖样品的色谱图的对比可知,前者含有 Man、Rib、Rha、Glc、Gal、Xyl;后者含有 Man、GlcUA、Rha、Glc、Gal。前者与后者多糖总量的对比可以发现,后者的多糖总量高于前者,说明黄精在蒸制时多糖会从黄精中浸出,不同的单糖浸出的速率不同,其中提取液与蒸出液中的单糖比例也发生了变化。前者中的 Gal 含量多于后者,后者中的 Glc 多于前者。

通过实验最终发现,纤维素酶参与的单一酶法和复合酶法提取黄精多糖,不仅可以提升黄精多糖的提取效率,也提高黄精多糖纯度;PMP-HPLC 特

征图谱能够准确地测定黄精炮制过程中多糖含量的变化,可用于评价黄精及其炮制品多糖组分的差异。对于九蒸九晒所炮制的黄精中总糖含量的研究为中药炮制及临床应用提供了可靠的科学理论依据。该研究为黄精及其他中药的炮制及其主要标志物等药效成分分析及质量评价提供参考。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 张 兴. 轻身延年的黄精 [J]. 中医健康养生, 2018, 4(6): 32-33.
- [3] 戴万生, 赵声兰, 朱智芸, 等. 不同辅料蒸制对滇黄精化学成分含量的影响 [J]. 云南中医中药杂志, 2015, 36(7): 70-72.
- [4] 姜程曦, 张铁军, 陈常青, 等. 黄精的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 1-16.
- [5] 刘 娜. 黄精多糖的分离、鉴定及免疫调节功效研究 [D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [6] Liu T, Wu L, Wang D, *et al.* Role of reactive oxygen species mediated MAPK and NF- κ B activation in *Polygonatum cyrtoneura* lectin induced apoptosis and autophagy in human lung adenocarcinoma A549 cells [J]. *J Biochem*, 2016, 160(6): 315-324.
- [7] 王玉勤, 吴晓岚, 张广新, 等. 黄精多糖对大鼠抗氧化作用的实验研究 [J]. 中国现代医生, 2011, 49(5): 6.
- [8] Yang J X, Wu S, Huang X L, *et al.* Hypolipidemic activity and antiatherosclerotic effect of polysaccharide of *Polygonatum sibiricum* in rabbit model and related cellular mechanisms [J]. *Evid Based Complement Altern Med*, 2015, 2015(3): 1-6.
- [9] 司雄元, 牛子牛, 储思琴, 等. 气相色谱法测定多糖样品中单糖的含量 [J]. 理化检验: 化学分册, 2018, 54(10): 1198-1201.
- [10] 李婷婷, 王雪吟, 胡丹荔, 等. 柱前衍生法测定桂花多糖中的 6 种单糖的含量 [J]. 食品工业, 2019, 40(4): 323-327.
- [11] 申卫红. 灵芝皇胶囊及其组方药材多糖酸水解柱前衍生-HPLC 指纹图谱的共性研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [12] Li H, Bendiak B, Siems W F, *et al.* Determining the isomeric heterogeneity of neutral oligosaccharide-alditols of bovine submaxillary mucin using negative ion traveling wave ion mobility mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2015, 87(4): 2228-2235.
- [13] 孙秀梅, 栾妮娜, 张兆旺. 黄精的炮制历史沿革与现代研究进展 [J]. 山东中医药大学学报, 2008(6): 518-521.
- [14] 杜泽飞, 陶爱恩, 夏从龙, 等. 基于 PMP-HPLC 和化学计量的黄精基原物种多糖差异分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15): 25-29.
- [15] 秦垂新, 曹子丰, 黄绮敏, 等. 黄精多糖水解物柱前衍生 HPLC 指纹图谱 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(11): 65-68.
- [16] 韩 笑, 匡 宇, 赵永艳, 等. 九蒸九晒黄精 5-HMF 含量的变化 [J]. 中药与临床, 2018, 9(3): 4-5.
- [17] 刘 荣, 杨 丽, 李雪莲, 等. 同一植株橘果皮不同生长期多糖的动态积累研究 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(6): 1472-1475.
- [18] 张骆琪, 刘苏伟, 王 飞, 等. 地黄多糖超声提取工艺优化及其抗氧化活性 [J]. 中成药, 2018, 40(12): 2662-2667.
- [19] 施 伽, 杨 浩, 杨思文, 等. 三氯乙酸法脱除黄精多糖中蛋白的工艺优化 [J]. 安徽农学通报, 2017, 23(6): 29-31.
- [20] 马建丽, 李 翔, 段斯庭, 等. 正交试验优化洋葱多糖提取工艺研究 [J]. 中国药业, 2018, 27(22): 5-7.
- [21] 贺胜英, 罗华锋, 王 强. 复合酶提取香菇多糖的研究 [J]. 安徽农业科学, 2012, (13): 7907-7908.
- [22] 和法涛, 刘光鹏, 朱凤涛, 等. 猴头菇多糖的水解及其水解物体外抗氧化活性研究 [J]. 食品工业, 2016, 37(7): 150-154.
- [23] 符梦凡. 枸杞多糖的分离提取及质量鉴定研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2018.