

黄芪和蜜炙黄芪中糖类组分和非糖类组分的差异性研究

赵婷婷¹, 裴科^{1*}, 于子涵¹, 曹岗³, 李慧峰⁴, 孔祥鹏⁴, 张朔生¹, 孙琳¹, 刘玉杰¹, 蔡皓^{2*}

1. 山西中医药大学中药与食品工程学院, 中药炮制山西省重点实验室, 山西 晋中 030619

2. 南京中医药大学药学院, 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 江苏 南京 210023

3. 浙江中医药大学药学院, 中药炮制研究中心, 浙江 杭州 310053

4. 山西中医药大学中药与食品工程学院, 山西省现代中药工程实验室, 山西 晋中 030619

摘要: 目的 比较研究黄芪蜜炙后多糖、单糖、寡糖及非糖类小分子成分的整体变化。方法 结合糖组学和代谢组学, 运用超高效液相-二极管阵列检测器 (ultra high performance liquid-photodiode array detector, UPLC-PDA)、高效液相-蒸发光散射检测器 (ultra high performance liquid-evaporative light scattering detector, HPLC-ELSD)、高效凝胶渗透色谱-蒸发光散射检测器 (high performance gel permeation chromatography-evaporative light scattering detector, HPGPC-ELSD) 和超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱 (ultra high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbit-trap high resolution mass spectrometry, UHPLC-Q-Orbitrap HRMS) 等对黄芪和蜜炙黄芪的多糖、单糖、寡糖以及非糖小分子组分进行分析。结果 黄芪和蜜炙黄芪中均可以找到 3 种相对分子质量的多糖, 但 3 种多糖的重均相对分子质量、相对分子质量分布以及 3 种多糖各自的占比存在差异。黄芪和蜜炙黄芪多糖均含有甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、岩藻糖 7 种单糖, 但两者物质的量比稍有不同 (黄芪 vs 蜜炙黄芪 = 0.70 : 0.20 : 0.85 : 5.67 : 0.44 : 2.04 : 0.32 vs 0.79 : 0.15 : 0.73 : 7.10 : 0.31 : 1.71 : 0.35)。在黄芪和蜜炙黄芪中均能检测到寡糖蔗糖, 蜜炙后蔗糖含量显著下降 ($P < 0.01$)。黄芪和蜜炙黄芪均含有游离单糖果糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖醛酸和岩藻糖, 蜜炙黄芪中的果糖、甘露糖、葡萄糖含量均显著高于黄芪 ($P < 0.05, 0.01$), 而半乳糖醛酸的含量显著低于黄芪 ($P < 0.05$), 岩藻糖含量在黄芪蜜炙后无显著变化。从黄芪和蜜炙黄芪中共筛选出 20 个差异性非糖小分子成分, 主要为皂苷类和黄酮类成分。代表性成分定量分析表明, 与黄芪相比, 蜜炙黄芪中的黄酮类成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、芒柄花苷的含量显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 皂苷类成分黄芪甲苷含量显著增加 ($P < 0.01$)。呋喃醛衍生物 5-羟甲基糠醛在黄芪中未检测到, 在蜜炙黄芪中的含量显著升高 ($P < 0.001$)。

结论 黄芪和蜜炙黄芪的糖类组分与非糖类组分存在显著差异, 这可能是造成黄芪蜜炙后补中益气功效增强的主要原因。

关键词: 黄芪; 蜜炙黄芪; 代谢组学; 糖组学; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 芒柄花素; 5-羟甲基糠醛

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)05-1586-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.05.026

Research on differences between saccharides ingredients and other chemical components of *Astragali Radix* and honey-processed *Astragali Radix*

ZHAO Ting-ting¹, PEI Ke¹, YU Zi-han¹, CAO Gang³, LI Hui-feng⁴, KONG Xiang-peng⁴, ZHANG Shuo-sheng¹, SUN Lin¹, LIU Yu-jie¹, CAI Hao²

1. Shanxi Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, School of Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

2. Engineering Research Center for the Standardization and Standardization of Chinese Medicine Processing, Ministry of Education, School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. Chinese Medicine Processing Research Center, School of Pharmacy, Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou

收稿日期: 2022-12-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82074022); 国家自然科学基金联合基金重点项目 (U21A20410); 科技部“中医药现代化研究”重点研发计划项目子课题 (2019YFC1710800); 山西省应用基础研究项目 (201801D221436); 山西省教育厅科技创新计划项目 (2019L0720); 山西中医药大学科技创新计划项目 (2022PY-YH-13); 山西省中医药管理局科研项目 (2022ZYCY265, 2023ZYCYA033)

作者简介: 赵婷婷 (1997—), 女, 硕士生, 研究方向为中药炮制与物质基础研究。E-mail: 1727584005@qq.com

***通信作者:** 裴科 (1986—), 女, 副教授, 研究方向为中药炮制与物质基础研究。E-mail: peike_pk@126.com

蔡皓 (1966—), 男, 副教授, 研究方向为中药炮制机制及炮制配伍。E-mail: haocai_98@njucm.edu.cn

310053, China

4. Shanxi Modern Chinese Medicine Engineering Laboratory, School of Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

Abstract: Objective The overall variations on polysaccharides, monosaccharides, oligosaccharides and other chemical components were studied when Huangqi (*Astragali Radix*, AR) processed by honey. **Methods** Merging glycomics and metabolomics methods were used to analyze the polysaccharides, monosaccharides, oligosaccharides and other chemical components of *Astragali Radix* and honey processed *Astragali Radix* (HAR) by using ultra high performance liquid-photodiode array detector (UPLC-PDA), ultra high performance liquid-evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD), high performance gel permeation chromatography-evaporative light scattering detector (HPGPC-ELSD) and ultra high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbit-trap high resolution mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS). **Result** Three kinds of polysaccharides found in both AR and HAR, however, the relative molecular weight, molecular weight distribution and proportion of the three polysaccharides in AR and HAR were different. Both AR and HAR polysaccharides contained mannose, rhamnose, galacturonic acid, glucose, galactose, arabinose, and fucose, but their molar ratios were slightly different (AR vs HAR = 0.70 : 0.20 : 0.85 : 5.67 : 0.44 : 2.04 : 0.32 vs 0.79 : 0.15 : 0.73 : 7.10 : 0.31 : 1.71 : 0.35). Oligosaccharides sucrose could be detected in both AR and HAR, but the content was decreased significantly after honey treatment ($P < 0.01$). Free monosaccharides like fructose, mannose, glucose, galacturonic acid and fucose were also detected both in AR and HAR, and the contents of fructose, mannose and glucose were significantly increased after honey treatment ($P < 0.05$, 0.01). At the same time, the content of galacturonic acid ($P < 0.05$) was significantly decreased. There was no significant change in fucose after *Astragali Radix* honey processing. For other chemical components, a total of 20 markers were screened when AR processed by honey, which were mainly saponins and flavonoids. The quantitative analysis results showed that flavonoid components like calycosin-7-*O*- β -D-glucoside, formononetin, and ononin were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01), while the content of astragaloside IV ($P < 0.01$) was significantly increased. As the furfural derivative, 5-hydroxymethylfurfural ($P < 0.001$) was not detected in AR, but significantly increased in HAR. **Conclusion** There are significant differences in saccharides ingredients and other chemical components between AR and HAR, which may be the main reason for the enhanced effect of HAR in tonifying middle and replenishing qi.

Key words: *Astragali Radix*; honey-processed *Astragali Radix*; metabolomics; glycomics; calycosin-7-*O*- β -D-glucoside; formononetin; 5-hydroxymethylfurfural

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragali membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根, 其味甘, 性温, 归足太阴脾、手太阴肺经; 功效为补中益气、升阳举陷、益卫固表^[1]。黄芪的炮制方法众多, 在历代医书^[2-3]中记载有蜜炙、米炒、酒炒、盐水炒、乳汁炒、米泔水炒、姜汁炒等方法, 其中蜜炙法是记载最多并且沿用至今的炮制方法。蜜炙黄芪最早出现于《华佗神方》^[4], 经过历史长河的筛选, 目前是被《中国药典》2020 版所收录的唯一黄芪炮制品。现代研究证明, 蜂蜜作为中药中常用的一类辅料, 它的添加可提高中药中一些化学成分的稳定性^[5], 同时提高部分活性成分的生物利用度; 此外有研究表明蜂蜜的天然深共晶特性也是其提高中草药功效和安全性的原因之一^[6]。对于黄芪蜜炙后化学成分的变化机制研究, 以往都是以小分子成分的变化规律为主, 有研究发现黄芪在清炒和蜜炙后很多小分子有机物含量下降^[7]。肖满珊^[8]研

究发现黄芪蜜炙后总黄酮类成分有所减少, 总皂苷类成分有所增加。蜂蜜中含有大量的葡萄糖和果糖, 还有少量的蔗糖、麦芽糖^[9]。然而蜜炙之后黄芪中糖类组分的变化目前很少有文献报道, 因此有必要运用糖组学从整体上研究黄芪蜜炙后糖类组分的变化。本研究首次整合糖组学和代谢组学的方法进行了黄芪蜜炙后糖类组分和非糖类组分整体变化的研究, 来观察蜜炙对黄芪各组分的综合影响。

近年来, 代谢组学结合糖组学从整体角度来研究中药炮制前后成分变化的方法被广泛应用于中药研究领域^[10-12], 不同于以往的研究只有一个或者几个指标性成分, 这 2 种方法结合可通过同时分析糖类组分和非糖类组分, 从整体上解释中药炮制前后成分的改变。本实验参考文献方法^[10-11,13], 应用 UPLC (C₁₈) -PDA、HPLC (NH₂) -ELSD、高效凝胶渗透色谱 (HPGPC) -ELSD 和超高效液相色谱质谱 (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS) 等技术, 基于代谢组学和糖组学方法, 对黄芪蜜炙前后的糖类组分和

非糖类组分进行系统的比较研究,为黄芪蜜炙后明确补中益气功效增强的物质基础提供参考。

1 材料

1.1 仪器

HC-2518 型高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);KQ2200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Q-Exactive 型四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Waters 2695 型高效液相色谱仪、Waters 2998 型蒸发光散射器(ELSD)、Acquity UHPL 超高效液相(美国沃特世公司);HH-4 型数显恒温水浴锅(金坛市杰瑞电器有限公司);台式干燥箱(北京中兴伟业世纪仪器有限公司)。

1.2 试剂

乙腈、甲醇(赛默飞世尔科技有限公司)为质谱纯;甲酸(天津市光复精细化工研究所)为色谱纯;1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)购自上海麦克林生化科技有限公司;土蜂蜜(批号 GB14963)购自江西意蜂实业有限公司;超纯水。

对照品 *D*-(+)-木糖(纯度 $\geq 99\%$,批号 D17N9S74410)、*D*-阿拉伯糖(纯度 $\geq 99\%$,批号 Z23D11H135480)、*D*-半乳糖(纯度 $\geq 98\%$,批号 Z22J9H64187)、*D*-(+)-半乳糖醛酸(纯度 $\geq 98\%$,批号 K07J12B133073)、*D*-甘露糖(纯度 $\geq 98\%$,批号 S08J12G137083)、*D*-岩藻糖(纯度 $\geq 98\%$,批号 M23F8K29918)、鼠李糖(纯度 $\geq 98\%$,批号 O12A10K95105)、*D*-果糖(纯度 $\geq 99\%$,批号 J25N10R104151)、蔗糖(纯度 $\geq 98\%$,批号 H22J9R53193)、水苏糖(纯度 $\geq 98\%$,批号 J04D10R104841)、麦芽糖(纯度 $\geq 98\%$,批号 RM0331FC14)、蜜二糖(纯度 $\geq 98\%$,批号 K23M7S15176)、甘露三糖(纯度 $\geq 98\%$,批号 L01J11Y117030)均购自上海源叶生物科技有限公司;右旋糖酐相对分子质量标准(1套,批号 140637-201203)购于中国食品药品检定研究院;*D*-葡萄糖(纯度 $> 98\%$,批号 50-99-7)购于北京索莱宝科技有限公司;芒柄花苷(质量分数 $> 98\%$,批号 201130)购于上海融禾医药科技有限公司;毛蕊异黄酮葡萄糖苷(质量分数 $\geq 98\%$,批号 5240)、芒柄花素(质量分数 $\geq 98\%$,批号 3524)购于上海诗丹德标准技术服务有限公司;黄芪甲苷(质量分数 $\geq 98.5\%$,批号 C10735032)购于上海麦克林生化科

技有限公司;5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF, 质量分数 $\geq 98\%$,批号 H12M9Z61023)购于上海源叶生物科技有限公司。

1.3 药材

黄芪饮片(批号 211004、211005、211009、211012、211015、211020)购自北京同仁堂(四川)健康药业有限公司,经山西中医药大学中药与食品工程学院中药炮制重点实验室张朔生教授鉴定为蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 干燥根的生品饮片。

2 方法与结果

2.1 蜜炙黄芪的制备

取炼蜜,加适量开水稀释,按照《中国药典》2020 年版通则 0213 炮制通则蜜炙法,将炼蜜淋入一定量的生黄芪饮片中,拌匀,闷润 8~10 h,闷透,将闷润好的黄芪置炒锅中,用文火炒至饮片不黏手,搓之即散,颜色深黄,略带焦斑,取出,放凉,备用。

2.2 黄芪和蜜炙黄芪多糖的制备

取黄芪和蜜炙黄芪药材饮片(批号 211004)各 50 g,先后分别加 8、6 倍量的去离子水,在 100 °C 煎煮 2 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩至一定体积,缓缓加入无水乙醇至最终醇体积分数为 70%,静置过夜,抽滤,上清液 60 °C 挥干得小分子成分部位备用,沉淀 60 °C 烘干得黄芪和蜜炙黄芪粗品多糖粉末。

各取半份黄芪和蜜炙黄芪粗品多糖粉末,200 mL 超纯水溶解,加入木瓜蛋白酶 0.05 g (200 U),45 °C 下恒温水浴反应 6 h,加原溶液体积 1/3 量 10% 的三氯乙酸,在冰浴中搅拌 15 min 后静置 30 min,3500 r/min 离心 15 min,弃去沉淀,上清液冷冻干燥得黄芪和蜜炙黄芪总多糖。

2.3 黄芪和蜜炙黄芪多糖的组分表征

2.3.1 黄芪和蜜炙黄芪多糖的重均相对分子质量(M_w)分布范围分析

(1)对照品溶液制备:精密称取 M_w 分别为 180、2700、9750、13 050、36 800、64 650、135 350、300 600、2 000 000 的右旋糖酐对照品适量,用超纯水溶解并定容至 1 mL 的量瓶,配制成质量浓度为 2 mg/mL 的对照品溶液,13 000 r/min 离心 15 min,0.22 μ m 微孔滤膜滤过,供进样分析。

(2)供试品溶液制备:精密称取“2.2”项下的黄芪和蜜炙黄芪粗多糖适量,分别加超纯水定容至 1 mL,配制成质量浓度为 15 mg/mL 的供试品溶液。

13 000 r/min 离心 15 min, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 供进样分析。

(3) 色谱条件: 参考文献报道^[10-11,13], 采用 TSK-GEL G4000PW_xL 凝胶柱 (300 mm $\times$ 7.8 mm, 10 μm) 色谱柱, 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 流动相为超纯水, 体积流量 0.5 mL/min, 进样体积 10 μL , ELSD 漂移管温度 115 $^{\circ}\text{C}$, N_2 体积流量 3.2 L/min。

2.3.2 黄芪和蜜炙黄芪多糖的单糖组成分析

(1) 对照品溶液的制备: 取各单糖对照品适量, 精密称定, 分别用超纯水溶解并定容, 制成甘露糖 2.11 mg/mL、鼠李糖 2.01 mg/mL、半乳糖醛酸 2.06 mg/mL、葡萄糖 2.04 mg/mL、阿拉伯糖 2.09 mg/mL、木糖 2.00 mg/mL、岩藻糖 2.03 mg/mL、半乳糖 2.05 mg/mL 的单一对照品溶液。精密吸取各单一对照品溶液 200 μL , 加入氨水溶液和 0.5 mol/L 的 PMP 甲醇溶液各 200 μL , 混合, 70 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 冷却, 加入 200 μL 冰醋酸中和溶液, 再加 1 mL 氯仿萃取 3 次, 有机相弃, 吸取全部上清液稀释 10 倍, 13 000 r/min 离心 15 min, 0.22 μm 微孔滤膜滤过后供进样。

(2) 供试品溶液的制备: 精密称取“2.2”项下的黄芪和蜜炙黄芪总多糖适量, 分别加超纯水定容至 10 mL, 配制成 15 mg/mL 的多糖溶液。精密吸取多糖溶液各 0.5 mL, 加入 3 mol/L 三氟乙酸 3 mL, 封口, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水解 3 h, 冷却, 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘干, 加入 1 mL 超纯水复溶, 即得黄芪和蜜炙黄芪多糖水解液。精密吸取多糖水解液 500 μL , 加入氨水溶液和 0.5 mol/L 的 PMP 甲醇溶液各 100 μL , 混合, 70 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 冷却, 加入 100 μL 冰醋酸中和溶液, 再加 0.5 mL 氯仿萃取 3 次, 有机相弃, 吸取全部上清液稀释 10 倍, 13 000 r/min 离心 15 min, 即得黄芪和蜜炙黄芪多糖水解液衍生化样品, 0.22 μm 微孔滤膜滤过后供进样。

(3) 色谱条件: 参考文献报道^[10-11,13], 采用 Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 设置柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 流动相为乙腈-0.1 mol/L 乙酸铵水溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 15%~20% 乙腈; 5~30 min, 20%~28% 乙腈; 30~31 min, 28%~15% 乙腈; 31~33 min, 15% 乙腈; 体积流量 0.8 mL/min; 进样量 10 μL ; 检测波长 250 nm。

2.3.3 黄芪和蜜炙黄芪中寡糖及果糖的分析

(1) 对照品溶液制备: 取各寡糖及果糖对照品适量, 精密称定, 分别用 60% 乙腈溶解并定容, 制成甘露三糖 1.00 mg/mL、蔗糖 1.22 mg/mL、麦芽糖

1.04 mg/mL、蜜二糖 1.01 mg/mL、水苏糖 1.04 mg/mL、果糖 1.12 mg/mL 的单一对照品溶液。

(2) 供试品溶液制备: 精密称取“2.2”项下黄芪和蜜炙黄芪小分子成分部位适量, 用超纯水溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 配制成 15 mg/mL 的溶液, 精密吸取 1 mL, 60 $^{\circ}\text{C}$ 蒸干, 用 60% 乙腈溶解并定容至 10 mL, 13 000 r/min 离心 15 min, 0.22 μm 微孔滤膜滤过后供进样。

(3) 色谱条件: 参考文献报道^[10-11,13], 采用 Agilent ZORBAX NH₂ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 流动相为乙腈-水 (70:30); 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL ; ELSD 漂移管温度 100 $^{\circ}\text{C}$; N_2 体积流量 3.2 L/min。

2.3.4 黄芪和蜜炙黄芪游离单糖分析 取“2.2”项下黄芪和蜜炙黄芪小分子成分部位 150 mg, 用超纯水溶解并定容至 10 mL 量瓶, 配制成 15 mg/mL 的溶液, 精密吸取 100 μL , 按“2.3.2 (2)”项下方法衍生化制备供试品溶液, 并采用“2.3.2”项下色谱条件进行检测。因果糖为酮糖, 无法进行 PMP 衍生化, 采用“2.3.3 (3)”项下方法进行检测。

2.3.5 单糖和寡糖测定的方法学考察

(1) 线性关系和范围: 分别取衍生化后单糖的混合对照品以及果糖和蔗糖的混合对照品溶液适量, 制备成不同浓度的系列混合对照品溶液, 再分别按照“2.3.2”和“2.3.3”项下色谱条件进样测定, 以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线 [其中果糖和蔗糖以对照品质量浓度的对数为横坐标 (X), 峰面积的对数为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线], 如表 1 所示, 结果表明各成分在各自范围内线性关系良好。

(2) 精密度试验: 称取“2.2”项下的黄芪总多糖和小分子成分部位各 150 mg, 精密称定, 分别按照“2.3.2”项和“2.3.3”项中供试品制备的方法制备供试品溶液, 再分别按照“2.3.2”和“2.3.3”项下色谱条件各连续进样 6 次, 结果表明, 两种供试品溶液各成分峰面积的 RSD 值均小于 2%, 说明该仪器精密度良好。

(3) 重复性试验: 称取“2.2”项下的黄芪总多糖和小分子成分部位各 150 mg, 精密称定, 分别按照“2.3.2”项和“2.3.3”项中供试品制备的方法制备供试品溶液各 6 份, 分别按照“2.3.2”和“2.3.3”项下色谱条件进样测定, 计算各成分的含量并求得 RSD 值, 结果表明两种方法各成分含量的 RSD 值均

表 1 单糖和寡糖的线性关系

Table 1 Linear relation of monosaccharides and oligosaccharide

组分	标准曲线	R^2	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
甘露糖	$Y=5\times 10^7 X-13\ 601$	0.999 1	0.989~253.2
鼠李糖	$Y=2\times 10^7 X+602.29$	0.999 6	0.942~241.2
半乳糖醛酸	$Y=4\times 10^7 X-5\ 390.3$	0.999 0	0.966~247.2
葡萄糖	$Y=2\times 10^7 X+97\ 822$	0.999 2	0.956~244.8
半乳糖	$Y=4\times 10^7 X+2\ 447.8$	0.999 5	0.961~246.0
阿拉伯糖	$Y=5\times 10^7 X-13\ 297$	0.999 0	0.970~248.4
岩藻糖	$Y=2\times 10^7 X-7\ 632.4$	0.999 3	0.952~243.6
果糖	$Y=1.0169 X+7.213\ 6$	0.999 0	12.300~392.0
蔗糖	$Y=1.1349 X+7.422\ 0$	0.999 1	30.500~976.0

小于 2%，说明单糖和寡糖测定方法的重复性较好。

(4) 稳定性试验：用精密度试验中黄芪总多糖和小分子成分部位的样品，按照“2.3.2”和“2.3.3”项下色谱条件，在 2、4、6、8、12、24 h 进样分析，结果表明，各分析物峰面积的 RSD 值均小于 2%，说明 2 种供试品溶液在 24 h 内均稳定。

(5) 加样回收率试验：取“2.2”项下的各成分含量已知的黄芪总多糖和小分子成分部位各 150 mg，精密称定，上述 2 种样品各平行制备 6 份，向黄芪总多糖中加入甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、岩藻糖含量 100% 的对照品溶液，向小分子成分部位中加入果糖和蔗糖含量 100% 的对照品溶液，分别按照“2.3.2”和“2.3.3”项下色谱条件进样测定，得甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、岩藻糖、果糖和蔗糖的平均加样回收率分别为 96.58%、97.38%、98.38%、97.87%、96.69%、99.29%、98.13%、97.58%、97.90%，RSD 分别为 1.85%、2.11%、2.83%、1.04%、1.87%、1.67%、2.78%、1.16%、1.20%。结果说明单糖和寡糖的测定方法准确度良好。

2.3.6 各糖类组分分析结果

(1) 多糖 M_w 分布：以右旋糖苷对照品保留时间为横坐标， M_w 的对数值为纵坐标，得线性回归方程 $\lg M_w = 12.084 - 0.453\ 6\ t$ ， $R^2 = 0.997\ 1$ 。黄芪和蜜炙黄芪多糖色谱图见图 1，根据对照品线性回归方程计算黄芪多糖 M_w 分布范围为 $266 \sim 1.65 \times 10^9$ ，有 3 个明显的色谱峰， M_w 分别为 3.64×10^6 、 4.25×10^3 、623，根据峰面积计算其相对含量分别为 54.55%、14.05%、31.41%；蜜炙黄芪多糖 M_w 分布范围为 $200 \sim 1.36 \times 10^9$ ，同样有 3 个主要色谱峰， M_w 分别为 2.34×10^6 、 4.03×10^3 、642，相对含量分别为 55.24%、6.92%、37.85%，如图 2 所示。

多糖最基本的特征是多糖相对分子质量的分布，相对分子质量的改变意味着多糖性质的改变。因此，本实验采用多分散系数 (α)^[14] ($\alpha = M_w/M_n$)，将多糖的相对分子质量进行量化处理 ($M_n = \sum H_i / \sum H_i / M_i$ ， $M_w = \sum H_i M_i / \sum H_i$ ， M_n 为数均相对分子质量； H_i 为供试品在保留时间 i 的响应值； M_i 为样品 i 的相对分子质量，即供试品在保留时间 i 的相对分子质量)。最后计算得黄芪和蜜炙黄芪 3 种多糖的 α 分别为 5.098、7.889、1.089 和 7.742、5.288、1.085。

(2) 黄芪和蜜炙黄芪多糖的单糖组成分析结果：

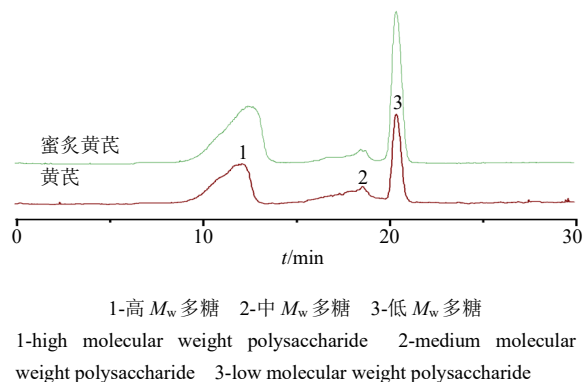


图 1 黄芪和蜜炙黄芪多糖的 HPGPC 图
Fig. 1 HPGPC chromatograms of polysaccharides of AR and HAR

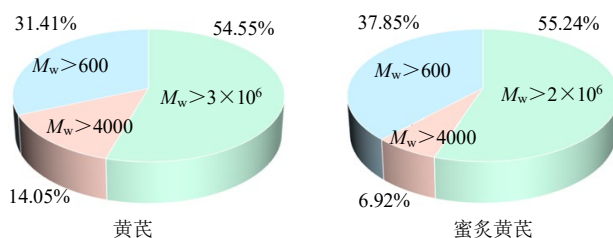


图 2 黄芪和蜜炙黄芪多糖不同相对分子质量占比
Fig. 2 Different molecular weight proportions of AR and HAR

通过与单糖的混合对照品色谱图保留时间进行比较(图 3), 黄芪和蜜炙黄芪多糖均含有甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、岩藻糖等, 采用标准曲线法计算各单糖的含量, 并换算成相对物质的量比, 生黄芪多糖中各个单糖物质的量比为 0.70:0.20:0.85:5.67:0.44:2.04:0.32, 炙黄芪中各个单糖物质的量比为 0.79:0.15:0.73:7.10:0.31:1.71:0.35, 结果表明黄芪和蜜炙黄芪各单糖组成无明显差别, 而蜜炙黄芪多糖中葡萄糖含量比例上升。

(3) 黄芪和蜜炙黄芪寡糖分析结果: 黄芪和蜜炙黄芪均含有蔗糖(图 4), 采用标准曲线法计算蔗糖含量, 结果表明黄芪在蜜炙后, 蔗糖含量由 (197.74 ± 26.32) mg/g 显著下降至 (147.22 ± 20.86) mg/g ($P < 0.001$)。

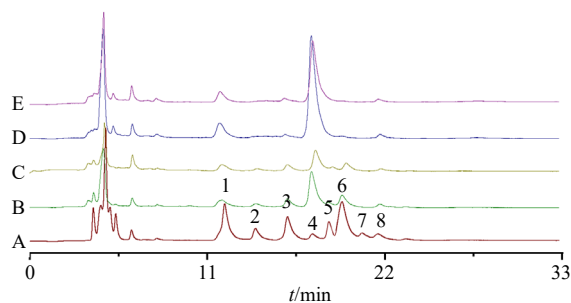
(4) 黄芪和蜜炙黄芪游离单糖分析结果: 黄芪和蜜炙黄芪均含有甘露糖、半乳糖醛酸、葡萄糖和岩藻糖(图 3)。用标准曲线法计算样品中游离单糖的

含量, 由表 2 可见, 蜜炙黄芪中果糖、甘露糖、葡萄糖含量显著高于黄芪 ($P < 0.05$ 、 0.01), 而半乳糖醛酸的含量显著低于黄芪 ($P < 0.05$)。

2.4 黄芪和蜜炙黄芪非糖小分子组分表征

2.4.1 对照品溶液的制备 取黄芪甲苷、芒柄花苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、5-HMF 对照品适量, 精密称定, 用甲醇溶解并定容, 混合, 再用倍半稀释法制成含黄芪甲苷 0.011 mg/mL、芒柄花苷 0.099 mg/mL、芒柄花素 0.010 mg/mL、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 0.010 mg/mL、5-HMF 0.099 mg/mL 的混合对照品溶液。

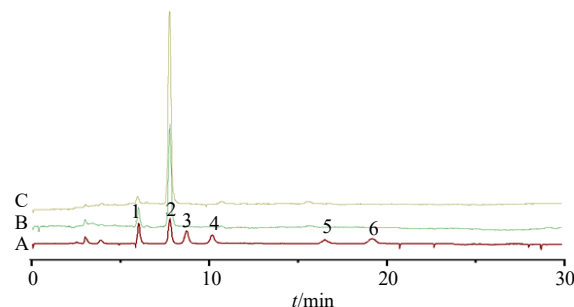
2.4.2 供试品溶液的制备 取黄芪药材饮片(批号 211004、211005、211009、211012、211015、211020)共 6 批, 按“2.1”项下方法炮制蜜炙黄芪饮片, 并按“2.2”项下方法制备黄芪和蜜炙黄芪的小分子部位, 得黄芪和蜜炙黄芪小分子部位各 6 批, 每批制备 2 份(共 12 份)供试品溶液。各取黄芪和蜜炙黄芪小分子部位适量, 加甲醇配制成 5 mg/mL 的溶液, 再吸取 1 mL, 过 ODS 固相萃取小柱后定容至 10



A-单糖混合对照品 B-蜜炙黄芪多糖水解液 C-黄芪多糖水解液 D-蜜炙黄芪游离单糖 E-黄芪游离单糖 1-甘露糖 2-鼠李糖 3-半乳糖醛酸 4-葡萄糖 5-半乳糖 6-阿拉伯糖 7-木糖 8-岩藻糖
A-mixed reference substance of monosaccharides B-polysaccharide hydrolysate of HAR C-polysaccharide hydrolysate of AR D-free monosaccharides of HAR E-free monosaccharides of AR 1-mannose 2-rhamnose 3-galacturonic 4-glucose 5-galactose 6-arabinose 7-xylose 8-fucose

图 3 黄芪和蜜炙黄芪中单糖的 UPLC 图

Fig.3 UPLC chromatograms of monosaccharides of AR and HAR



A-寡糖及果糖混合对照品 B-蜜炙黄芪样品 C-生黄芪样品 1-果糖 2-蔗糖 3-麦芽糖 4-蜜二糖 5-甘露三糖 6-水苏糖
A-mixed reference substance of oligosaccharide and fructose B-HAR C-AR 1-fructose 2-sucrose 3-maltose 4-melibiose 5-manninotriose 6-stachyose

图 4 黄芪和蜜炙黄芪中寡糖和果糖的 HPLC 图

Fig.4 HPLC chromatograms of oligosaccharides and fructose in AR and HAR

表 2 黄芪和蜜炙黄芪中游离单糖的含量 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Table 2 Contents of free monosaccharides in AR and HAR ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	果糖	甘露糖	半乳糖醛酸	葡萄糖	岩藻糖
黄芪	9.16 ± 1.65	18.76 ± 0.30	6.47 ± 0.14	133.05 ± 9.16	4.14 ± 0.12
蜜炙黄芪	49.74 ± 8.63**	24.30 ± 0.33*	5.87 ± 0.30*	290.78 ± 16.82**	4.51 ± 0.17

与黄芪比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 表 4 同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs AR, same as table 4

mL, 13 000 r/min 离心 15 min, 同样的方法共制备黄芪和蜜炙黄芪小分子部位供试品溶液各 12 份, 0.22 μm 微孔滤膜滤过后进样。

2.4.3 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 分析 采用代谢组学策略对黄芪和蜜炙黄芪中的差异性非糖小分子进行筛选, 对代表性成分进行定量分析, 其中 5-HMF 由于其弱离子化, 采用 UPLC-PDA 检测。

(1) 色谱条件: ACQUITY UPLC BEH C_{18} 柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈溶液 (B), 梯度洗脱 0~0.5 min, 5%A; 0.5~1.5 min, 5%~15%A; 1.5~4.5 min, 15%~30%A; 4.5~7 min, 30%~60%A; 7~11 min, 60%~70%A; 11~12 min, 70%~100%A; 12~13 min, 100%A; 13~13.5 min, 100%~5%A; 13.5~16 min, 5%A; 体积流量 0.3 mL/min, 进样量 1 μL , 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 2 μL 。5-HMF 的检测波长 283 nm。

(2) 质谱条件: 采用电喷雾离子源 (ESI), 正、负离子同时采集, 鞘气体积流量 40 arb, 辅助气体积流量 5 arb, 喷雾电压 3.2 kV, 毛细管温度 320 $^{\circ}\text{C}$, 辅助气加热温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 高压环形离子导入装置电压 (S-Lens RF Level) 为 50。检测模式采用全扫描/数据依赖二级扫描 (Full MS/dd-MS²), 扫描范围为 m/z 100~1000, 一级质量分辨率为 70 000 FWHM, 二级分辨率 17 500 FWHM, 碰撞能量为 30 eV。

2.4.4 数据采集与处理 采用 Compound Discoverer 3.3 软件对质谱数据进行峰提取、峰匹配、保留时间对齐、碎片离子采集及峰面积归一化等处理, 再结合 mz-Cloud、Chempider 数据库进行成分鉴定和匹配。将处理的数据导入 SIMCA 14.1 软件进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)。统计学分析采用 SPSS 26.0 软件。

2.4.5 差异性成分分析 运用 SIMCA 14.1 软件分析, 将数据 Par 标准化后, 去除离群值, 得到正、负离子模式下生黄芪和蜜炙黄芪的 PCA 图、OPLS-DA 图和 S-plot 图, 由图 5 可知, 黄芪组和蜜炙黄芪组可明显区分, 说明 2 组之间的非糖小分子成分存在差异。以 $\text{VIP}>1$, t 检验 ($P<0.05$), 分子离子的相对质量偏差在 $\pm 5\times 10^{-6}$ 以内, mz-Cloud 数据库成分鉴定匹配得分大于 70% 为标准来筛选黄芪和蜜炙黄芪之间的显著性差异成分, 再结合相关文献, 最后共鉴定出 20 个差异性成分 (图 6、表 3), 其中黄酮类成分 6 个, 皂苷类成分 8 个。表 3 中的差异倍数 (fold change) 大于 1 表示与黄芪相比, 蜜炙黄芪中的含量水平上调, 小于 1 表示水平下调。将鉴定出的 20 个差异性成分的峰面积归一化数据进行热图分析, 结果见图 7。

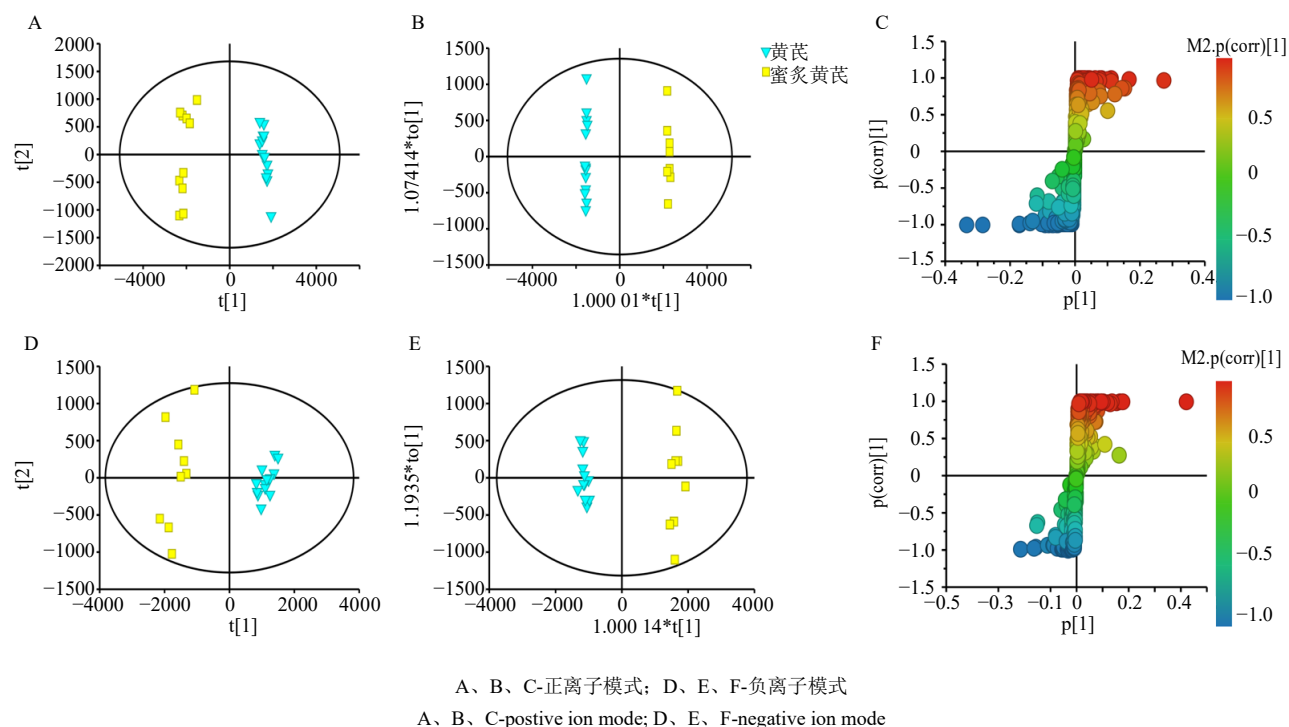


图 5 正、负离子模式下黄芪和蜜炙黄芪的 PCA 图 (A、D)、OPLS-DA 图 (B、E)、S-plot 图 (C、F)
Fig. 5 PCA plot (A、D)、OPLS-DA plot (B、E)、S-plot diagram (C、F) of AR and HAR in positive ion mode and negative ion mode

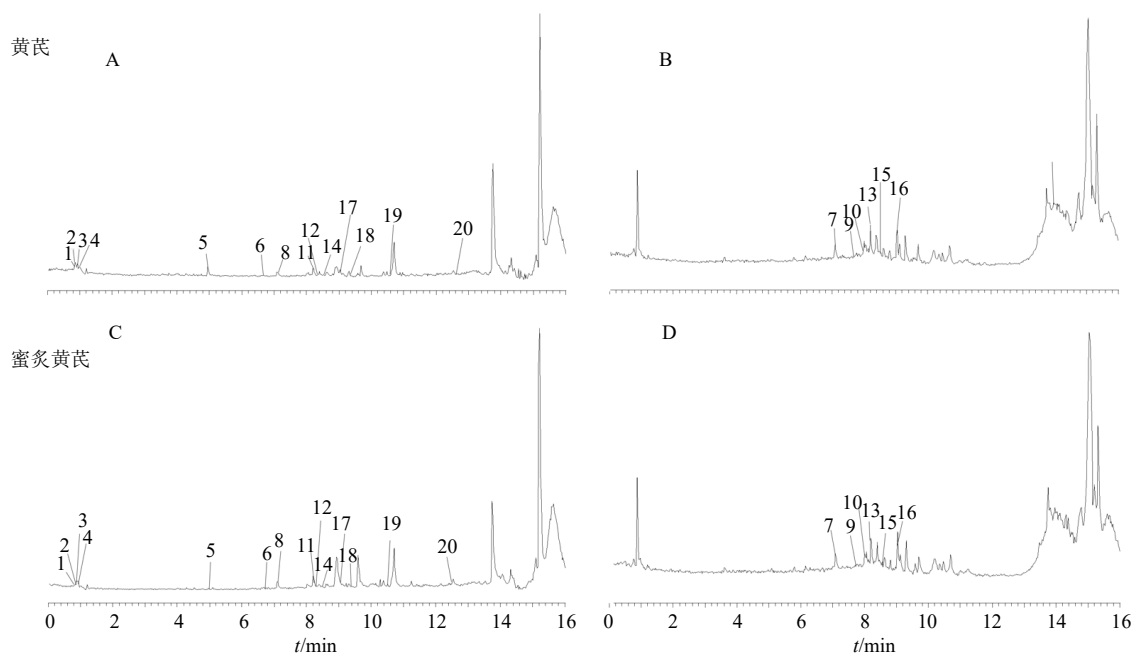


图 6 正 (A、C)、负 (B、D) 离子模式下黄芪 (A、B) 和蜜炙黄芪 (C、D) 的 TIC 图

Fig. 6 TIC chromatograms of AR (A、B) and HAR (C、D) in positive ion mode (A、C) and negative ion mode (B、D)

2.4.6 代表性成分含量测定 采用外标一点法计算样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、芒柄花素、黄芪甲苷和 5-HMF 的含量。由表 4 可知黄酮类成分和皂苷类成分在黄芪和蜜炙黄芪中含量差异较大。与黄芪相比,蜜炙黄芪中的黄酮类成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、芒柄花苷含量明显降低 ($P<0.05$ 、 0.01),皂苷类成分黄芪甲苷显著增加 ($P<0.01$)。呋喃醛衍生物 5-HMF 在黄芪中未检测到,在蜜炙黄芪中的含量显著升高 ($P<0.001$)。

3 讨论

本研究结合糖组学 (UPLC-PDA、HPLC-ELSD、HPGPC-ELSD) 和代谢组学 (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS) 技术,分析比较了黄芪和蜜炙黄芪中的糖类组分和非糖小分子组分的差异。

黄芪多糖部位通过色谱分析发现含有重均 M_w 分别为 3.64×10^6 、 4.25×10^3 、623 的 3 种多糖,蜜炙黄芪多糖部位含有重均 M_w 分别为 2.34×10^6 、 4.03×10^3 、642 的 3 种多糖,说明黄芪多糖中 M_w 最大的组分 ($M_w=3.64 \times 10^6$) 的重均 M_w 要大于蜜炙黄芪中 M_w 最大的多糖组分 ($M_w=2.34 \times 10^6$),同时黄芪和蜜炙黄芪多糖中 M_w 最大组分的多分散系数分别为 5.098、7.742,说明相比于蜜炙黄芪,生品黄芪该组分更加均一,其原因可能为炮制过程中高 M_w 多糖裂解成较小 M_w 的多糖^[23-24],导致 M_w 降低,同时组分更加不均一。蜜炙黄芪中重均 M_w

为 642 的多糖组分占比要大于生品黄芪,重均 M_w 为 4.03×10^3 的多糖组分占比要小于生品黄芪,其原因可能为炮制过程中的加热因素对重均 M_w 为 4.03×10^3 的多糖影响较大,其发生降解,导致相对分子质量降低;而重均 M_w 为 2.34×10^6 的多糖变化较小。

通过分析发现,与黄芪相比蜜炙黄芪中果糖含量升高了 5 倍,葡萄糖含量升高了 2 倍。其原因为蜂蜜本身含有大量的果糖、葡萄糖和少量的蔗糖。而蜜炙黄芪中蔗糖的含量显著降低,可能存在以下两方面的原因,一方面为炮制所用蜂蜜为炼蜜,在炼蜜过程中其少量的蔗糖已经发生了水解、糖基化以及美拉德反应,另一方面为黄芪炮制过程中存在的水分和加热因素使蔗糖水解为果糖和葡萄糖,并发生了糖基化和美拉德反应^[25],产生了 5-HMF 等呋喃醛衍生物^[10,12],使蔗糖降解,最终导致蜂蜜中少量蔗糖的引入不足以抵消其炮制过程中的转化和降解。查阅文献发现^[26-27],炼蜜随着时间的延长和温度的增加,5-HMF 的含量也随之增加^[28],果糖较之于葡萄糖和蔗糖,更易转化为 5-HMF,因此加蜜炮制后 5-HMF 的含量会更高^[29]。现代研究结果表明,5-HMF 具有保护肝细胞^[30]、抗炎和抗氧化^[31]等作用。

查阅文献发现多糖作为黄芪中的重要生物活性成分,通过降低血糖、改善胰岛素抵抗、抑制胰岛 β 细胞凋亡等机制预防和治疗糖尿病及其并发症^[32-34]。对于蜜炙黄芪中多糖类组分在炮制过程中发生的

表 3 黄芪和蜜炙黄芪中非糖小分子差异性成分

Table 3 Differential non-sugar small molecules of AR and HAR

峰号	化合物	分子式	加合离子	m/z	t_R/min	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子	P 值	差异倍数	变化方向
1	精氨酸 ^[15]	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	[M+H] ⁺	175.119	0.84	0.70	116.071, 158.092	1.67×10^{-27}	0.25	↓
2	亮氨酸 ^[15]	C ₆ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺	132.102	0.85	1.74	132.102	2.94×10^{-4}	2.36	↑
3	脯氨酸 ^[16]	C ₅ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	116.071	0.90	2.93	116.071	2.87×10^{-3}	0.64	↓
4	腺苷 ^[17]	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	[M+H] ⁺	268.104	0.92	-0.45	136.063, 268.104	8.13×10^{-7}	0.31	↓
5	毛蕊异黄酮葡萄糖苷 ^[15]	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	[M+H] ⁺	447.129	5.10	0.27	285.076, 447.129	3.12×10^{-19}	0.50	↓
6	芒柄花苷 ^[18]	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	[M+H] ⁺	431.134	6.69	0.35	269.081, 431.134	1.71×10^{-18}	0.63	↓
7	汉黄芩素 ^[17]	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	283.061	7.10	-0.07	268.037, 283.061	2.69×10^{-18}	0.56	↓
8	毛蕊异黄酮 ^[17]	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺	285.076	7.11	-0.09	269.081, 285.076	1.16×10^{-20}	0.57	↓
9	未知物	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	[M-H] ⁻	327.218	7.74	0.36		1.36×10^{-10}	1.80	↑
10	黄芪甲苷 ^[19]	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	[M+HCOO] ⁻	829.459	8.07	0.16	475.125, 829.459	2.35×10^{-14}	1.43	↑
11	芒柄花素 ^[18]	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	269.081	8.22	-0.21	254.057, 269.081	5.12×10^{-19}	0.61	↓
12	黄芪紫檀烷 ^[16]	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	[M+H] ⁺	301.107	8.36	0.73	124.087, 269.081	1.60×10^{-3}	0.75	↓
13	异黄芪皂苷 II ^[19]	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	[M+HCOO] ⁻	871.470	8.38	-0.94	307.856, 825.470	3.13×10^{-16}	3.27	↑
14	大豆皂苷 Bb ^[8]	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	[M+H] ⁺	943.527	8.45	-0.16	635.416, 781.473	1.01×10^{-5}	2.71	↑
15	未知物	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	[M-H] ⁻	329.234	8.49	0.49		2.19×10^{-19}	2.31	↑
16	黄芪皂苷 I ^[20]	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	[M+HCOO] ⁻	913.480	9.03	-0.99	807.450, 913.480	8.55×10^{-10}	2.63	↑
17	astragaloside I isomer ^[8]	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	[M+Na] ⁺	891.472	9.05	0.40	473.363, 851.479	4.62×10^{-4}	2.24	↑
18	异黄芪皂苷 I ^[8]	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	[M+H] ⁺	869.489	9.31	1.48	833.469, 851.480	1.44×10^{-5}	3.31	↑
19	乙酰黄芪苷 ^[8]	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₇	[M+Na] ⁺	933.482	10.48	0.84	713.427, 893.489	6.43×10^{-5}	2.95	↑
20	邻苯二甲酸二丁脂 ^[21-22]	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	[M+H] ⁺	279.159	12.54	-0.12	205.086	2.31×10^{-7}	0.75	↓

↑上调 ↓下调

↑up-regulation ↓down-regulation

表 4 黄芪和蜜炙黄芪中代表性非糖小分子成分的含量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)Table 4 Comparison of representative non-sugar small molecules of AR and HAR ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	芒柄花素	芒柄花苷	黄芪甲苷	5-HMF
黄芪	146.29 ± 4.38	311.15 ± 8.03	69.67 ± 2.40	111.29 ± 4.60	0
蜜炙黄芪	94.02 ± 5.11**	242.94 ± 7.76*	55.07 ± 2.91*	280.53 ± 9.18**	676.10 ± 23.47***

M_w 、 M_n 分布以及含量的变化, 会对黄芪的功效产生何种影响还需要进一步深入的研究。糖类组分中的蔗糖在机体中经蔗糖酶水解生成单糖, 可使血糖升高, 可能引发胰岛素抵抗, 对各器官组织产生毒性作用, 导致糖尿病及并发症的发生^[35-36]。研究发现, 蔗糖比单体果糖和葡萄糖更能引起严重的糖脂代谢异常^[37]。本实验结果表明, 黄芪蜜炙后蔗糖含量下降, 而果糖和葡萄糖含量明显上升。果糖不仅是一种提供热量的己糖, 还可能潜在影响机体行为和参与某些代谢途径^[38], 包括中枢系统、肝脏代谢、炎

症反应、肠道微生物群和骨骼肌基因表达等^[39]。对于非糖类组分, 蜜炙黄芪中毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、芒柄花苷等多种黄酮及其苷类成分含量下降, 而黄芪甲苷、异黄芪皂苷 II、大豆皂苷 Bb 等多种皂苷类成分含量上升。其原因可能是炮制过程中黄酮类成分结构发生了转化导致其含量降低, 而炮制使皂苷类成分更易煎出因此含量上升。

本课题组前期研究表明黄芪中的多糖和皂苷类成分能明显促进机体物质能量代谢^[20]。但多糖作为

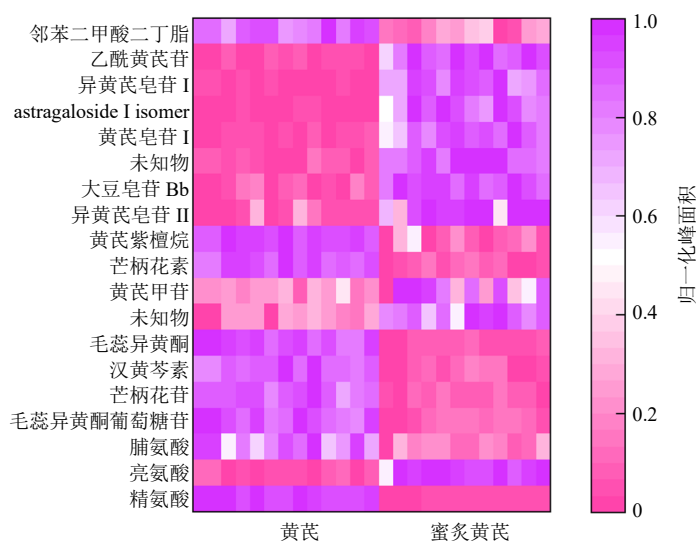


图 7 黄芪和蜜炙黄芪的差异成分热图分析

Fig. 7 Heat map analysis of differential components in AR and HAR

大分子化合物, 空间构型复杂, 本实验对多糖部分的研究还无法充分阐释黄芪蜜炙后多糖结构改变的机制以及其与药效的关系。因此, 黄芪蜜炙后具有显著差异性的糖类组分和非糖类组分在整体上对蜜炙黄芪药效的影响还需要进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 315.
- [2] 焦红红, 陈杰, 白德涛, 等. 黄芪炮制历史沿革研究 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(7): 899-905.
- [3] 周倩, 孙立立, 张乐林. 黄芪炮制历史沿革及现代研究 [J]. 中成药, 2014, 36(1): 157-159.
- [4] (汉) 华佗元化撰. (唐) 孙思邈编集. 彭静山点校. 王春月整理. 华佗神医秘传 [M]. 2 版. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2010: 9.
- [5] 李兴尚, 陈佳, 徐自升, 等. 黄芪炮制前后相关化学成分的变化研究 [J]. 中国药房, 2012, 23(15): 1399-1402.
- [6] Dai Y T, Jin R N, Verpoorte R, *et al.* Natural deep eutectic characteristics of honey improve the bioactivity and safety of traditional medicines [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 250: 112460.
- [7] 蔡金坊, 代云桃, 肖永庆, 等. 系统评价蜜炙对黄芪药效物质基础的改变 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(8): 47-52.
- [8] 肖满珊. 蜜炙黄芪化学成分分析及作用于脾气虚大鼠的药效学评价 [D]. 广州: 广东药学院, 2015.
- [9] 李先端, 钟银燕, 顾雪竹, 等. 中药炮制辅料蜂蜜中葡萄糖、果糖、蔗糖的含量测定 [J]. 中成药, 2008, 30(6): 885-888.
- [10] 张晓亚, 徐金娣, 许军, 等. 整合糖组与代谢组学方法比较蒸制和酒炖熟地黄化学成分 [J]. 中草药, 2021, 52(6): 1591-1600.
- [11] Li K, Cao Y X, Jiao S M, *et al.* Structural characterization and immune activity screening of polysaccharides with different molecular weights from *Astragali Radix* [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 582091.
- [12] 孟祥龙, 王勃, 胡聪, 等. 基于 HPLC-MS 及网络药理学探讨熟地黄炮制过程与美拉德反应的相关性 [J]. 中药材, 2020, 43(1): 61-70.
- [13] 石丽霞, 李科, 焦思明, 等. 黄芪活性多糖 APS-II 的酸降解及其降解寡糖的结构和免疫活性研究 [J]. 药学报, 2021, 56(8): 2266-2275.
- [14] 张蕊鑫, 王智慧, 丛威, 等. 一种用高效凝胶渗透色谱测试褐藻胶分子量及分子量分布的方法 [J]. 过程工程学报, 2020, 20(1): 99-107.
- [15] 许如玲, 范君婷, 董惠敏, 等. 经典名方黄芪桂枝五物汤标准煎液化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS 分析 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(23): 5614-5630.
- [16] 李蓉蓉. 基于液质联用技术的恒山黄芪中特征成分研究 [D]. 太原: 山西大学, 2021.
- [17] 朱赞斐, 谭善忠, 王洪兰, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的益气健脾颗粒化学成分分析 [J]. 中草药, 2022, 53(12): 3601-3613.
- [18] 施怀生, 毕小凤, 史宪海. UPLC-Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用分析黄芪根及其茎叶中黄酮和皂苷类成分 [J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(3): 357-361.
- [19] 李蓉蓉, 游蓉丽, 秦雪梅, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术快速识别芪蛭络胶囊化学成分 [J]. 中国

- 中药杂志, 2020, 45(20): 4918-4928.
- [20] 曹丽珑, 裴科, 刘瑞, 等. 基于“部位扣除”的黄芪温热效应导致“上火”反应的物质基础及机制研究 [J]. 中草药, 2022, 53(14): 4350-4364.
- [21] 孙洁雯, 李燕敏, 杨克玉, 等. 干黄芪中挥发性成分的提取与分析 [J]. 化学研究与应用, 2015, 27(9): 1361-1366.
- [22] 窦筱艳, 王静, 孙静, 等. 高效液相色谱-三重四级杆/复合线性离子阱质谱法测定饮用水中 22 种邻苯二甲酸酯 [J]. 中国环境监测, 2020, 36(4): 132-138.
- [23] 李婵艺. 蜜炙黄芪多糖的制备及对 DSS 诱导结肠炎小鼠的影响 [D]. 广州: 广东药科大学, 2019.
- [24] 吴嘉彩. 蜜炙黄芪多糖的分离纯化、结构表征及对 4 种益生菌的影响 [D]. 广州: 广东药科大学, 2021.
- [25] 薛澄. 基于“交联呈色—美拉德”和“糖水解”反应的熟地黄“黑如漆、甜如饴”炮制机制研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2021.
- [26] 周倩, 孙立立. 蜜炙对甘草化学成分影响研究 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(10): 768-772.
- [27] 杨海玲, 吴丽丹, 谢鹏, 等. UPLC 法比较骨碎补不同炮制品中柚皮苷、5-羟甲基糠醛含量 [J]. 中药材, 2016, 39(11): 2509-2512.
- [28] 钟银燕, 毛淑杰, 顾雪竹, 等. 中药炮制辅料蜂蜜中 5-羟甲基糠醛的含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(20): 2203-2206.
- [29] 刘潇潇, 杨立伟, 于江泳, 等. HPLC 法测定参芪扶正注射液中 5-羟甲基糠醛的含量及其来源的初步探讨 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(4): 639-642.
- [30] 姜泽群, 马艳霞, 段煜, 等. 山茱萸羟甲基糠醛对肿瘤坏死因子 α 致肝细胞凋亡的保护作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(3): 591-594.
- [31] Kong F H, Lee B H, Wei K. 5-hydroxymethylfurfural mitigates lipopolysaccharide-stimulated inflammation via suppression of MAPK, NF- κ B and mTOR activation in RAW 264.7 cells [J]. *Molecules*, 2019, 24(2): 275.
- [32] 邓海鸥, 林凯, 黎映兰, 等. 黄芪多糖对老年早期糖尿病肾病者 TNF- α 、IL-6 和免疫功能的影响 [J]. 中药材, 2014, 37(4): 713-716.
- [33] 叶婷, 马国庆, 魏明慧, 等. 黄芪多糖对糖尿病心肌病大鼠 AMPK-mTOR 通路的调控机制研究 [J]. 世界中医药, 2022, 17(7): 977-982.
- [34] Zheng Y J, Ren W Y, Zhang L N, *et al.* A review of the pharmacological action of *Astragalus* polysaccharide [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 349.
- [35] 姜婷. 三叶片干预健康人服用蔗糖后降糖作用及机制研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2020.
- [36] 曹征, 谢连娣, 范宗静, 等. 黄芪多糖联合 lncRNA TUG1 沉默对缺血再灌注人冠状动脉内皮细胞凋亡的影响 [J]. 世界中医药, 2021, 16(21): 3185-3190.
- [37] 赵艳艳. 蔗糖以及单体果糖和葡萄糖对大鼠糖脂代谢的影响研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- [38] Moulin S, Seematter G, Seyssel K. Fructose use in clinical nutrition: Metabolic effects and potential consequences [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2017, 20(4): 272-278.
- [39] Dekker M J, Su Q, Baker C, *et al.* Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 299(5): E685-E694.

[责任编辑 王文倩]