

基于柱前衍生-HPLC法研究焦栀子炮制过程单糖组成及含量变化

乔梦如^{1,2}, 王云², 贾哲², 刘艳萍², 宋亚南², 张村^{1,2*}

1. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450008

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700

摘要: **目的** 建立柱前衍生-HPLC法测定焦栀子炮制过程样品中8种单糖(甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖)的含量测定方法,通过分析比较总单糖、结合型单糖和游离单糖的组成及差异,为揭示焦栀子炒制过程颜色褐变机制奠定基础。**方法** 以Phenomenex Luna C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,流动相为100 mmol/L乙酸铵-乙腈(83:17),柱温35℃,体积流量1.0 mL/min的条件下,分别对酸水解糖提取方法、游离糖提取条件进行优化,衍生化后样品进行方法学考察。**结果** 酸水解方法以1.5 mol/L硫酸、100℃水解4.0 h最佳,游离单糖为超声处理15 min。焦栀子炮制过程样品酸水解产物检测出甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖共8种单糖;游离单糖检测出甘露糖、葡萄糖和半乳糖。经方法学验证,8种单糖的精密度、重复性、稳定性、加样回收率均符合方法学要求;酸水解得到的总单糖在种类上、含量上均高于游离单糖,总单糖和结合型单糖部分糖变化基本一致,甘露糖含量呈先降后升的趋势,半乳糖醛酸含量呈降低趋势,总单糖葡萄糖含量呈先升后降趋势,结合型葡萄糖含量呈升高的趋势,其他糖的变化幅度不大。随着炒制程度的加重,过程饮片的结合型单糖的组成类别不变,除结合型半乳糖醛酸外,各结合型单糖比例基本不变。游离葡萄糖和游离半乳糖含量随炮制程度的加深呈降低的趋势,其中游离半乳糖在焦栀子中未检出。**结论** 游离葡萄糖、游离半乳糖和结合型半乳糖醛酸是焦栀子炮制过程中变化最明显的单糖,可为栀子炒焦过程颜色褐变机制的反应物提供参考。

关键词: 焦栀子; 单糖; 柱前衍生化; HPLC; 甘露糖; 鼠李糖; 葡萄糖醛酸; 半乳糖醛酸; 葡萄糖; 半乳糖; 木糖; 阿拉伯糖

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)07-2096-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.07.009

Composition and content change of monosaccharide in *Gardeniae Fructus Praeparatus* during heat processing based on pre-column derivatization HPLC method

QIAO Meng-ru^{1,2}, WANG Yun², JIA Zhe², LIU Yan-ping², SONG Ya-nan², ZHANG Cun^{1,2}

1. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective Reversed-phase-high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) precolumn derivatization was used to determine the monosaccharide composition and content in Jiaozhizi (*Gardeniae Fructus Praeparatus*, GFP) during heat processing. By analyzing and comparing the composition and difference of total monosaccharides, binding monosaccharides and free monosaccharides, the basis was laid for revealing the mechanism of color browning during the heating process of GFP. **Methods** Chromatographic separation was carried out on a Phenomenex Luna C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of 100 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile (83:17) at the flow rate of 1.0 mL/min and the column temperature of 35 °C. Sample pretreatment conditions were optimized by investigating the effect of extraction solvents and methods on the extraction efficiency of monosaccharide used for HPLC quantification. **Results** Total monosaccharides was measured after hydrolysis in 1.5 mol/L

收稿日期: 2022-10-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(81873010); 国家自然科学基金项目(82173979); 中国中医科学院科技创新工程(CI2021A04204); 国家中医药管理局中药炮制技术传承基地项目(国中医药科技中药[2022]59号)

作者简介: 乔梦如(1996—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药炮制研究。Tel: 18737025106 E-mail: 18737025106@163.com

*通信作者: 张村(1969—), 女, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药炮制、中药化学研究。Tel: (010) 64032658 E-mail: zhc95@163.com

sulphuric acid at 100 °C for 4.0 h and free monosaccharide was measured after ultrasonic in water for 15 min. Eight total monosaccharides, including mannose, rhamnose, glucuronic acid, galacturonic acid, glucose, galactose, xylose and arabinose, and three free monosaccharides, including mannose, glucose and galactose, were detected in the GFP during heat processing. The developed HPLC method for the determination of eight monosaccharides was validated in terms of linearity, precision, reproducibility, stability, and recovery of the eight monosaccharide. The total monosaccharides obtained by acid hydrolysis was higher than free monosaccharides in terms of variety and content. The change of total monosaccharide and some sugars of conjugated monosaccharides were basically the same. The mannose content showed a trend of decreasing first and then increasing, the galacturonic acid content showed a trend of decreasing, the total monosaccharose glucose content showed a trend of increasing first and then decreasing, the bound glucose content showed a trend of increasing, other sugars changed little. With the aggravation of the stir-frying degree, the composition of the bound monosaccharides of the processed slices remained unchanged, except for the bound galacturonic acid, the proportion of the bound monosaccharides remained basically unchanged. The content of free glucose and galactose decreased with the deepening of processing, and free galactose was not detected in GFP. **Conclusion** Free glucose, free galactose and bound galacturonic acid were the most obvious monosaccharide in the heat processing of GFP, which can provide clues for the reaction substances of the color browning mechanism of GFP.

Key words: *Gardeniae Fructus Praeparatus*; monosaccharide; precolumn derivatization; HPLC; mannose; rhamnose; glucuronic acid; galacturonic acid; glucose; galactose; xylose; arabinose

栀子为茜草科栀子属植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实, 始载于《神农本草经》^[1], 其味苦, 性寒; 归心、肺、三焦经。《中国药典》2020年版^[2]收录了生栀子、炒栀子和焦栀子3个炮制规格, 且焦栀子为单列饮片。生栀子的果皮表面呈红黄色或棕红色, 种子呈深红色或红黄色; 而焦栀子经过炮制后, 果皮外表面呈焦褐色或焦黑色, 果皮内表面和种子表面则呈黄棕色或棕褐色。推测焦栀子炮制过程中的颜色褐变与美拉德反应有关。

美拉德反应, 又称羰胺反应或非酶褐变反应, 是指氨基化合物(包括胺、氨基酸、肽和蛋白质)和羰基化合物(尤其是还原糖)之间发生的缩合、聚合等反应, 最终生成棕色甚至是黑色的大分子物质类黑精。其反应中间产物5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF)与褐变呈正相关性, 颜色变化是美拉德反应最直观的特征^[3-4]。

实验室前期发现, 焦栀子炮制过程中总还原糖、总氨基酸含量均呈下降趋势, 5-HMF含量呈上升趋势, 结合pH值变化, 证明焦栀子炮制过程发生了美拉德反应^[5]。但具体何种还原糖参与了焦栀子炮制过程中的美拉德反应, 还未见报道。因此, 本实验拟对焦栀子炮制过程中还原糖的变化规律进行初步探索。

糖类成分由于其不具有紫外吸收和荧光性质, 较难用传统的检测手段进行分析。柱前衍生是一种常用的衍生化方法, 借助于衍生化试剂, 可使还原糖类物质具有紫外吸收、荧光的性质, 并可降低该

类物质的极性, 更利于该类物质的检测。1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)是常用的衍生化试剂^[6-10]。

本实验以焦栀子炮制过程饮片为研究对象, 以8种常见的还原糖作为标准品, 采用PMP作为衍生化试剂对其进行衍生化标记, 建立HPLC法测定焦栀子炮制过程饮片中还原糖种类及含量的变化, 研究炮制对焦栀子过程样品中酸水解总单糖和游离单糖含量的影响, 并结合化学计量学分析, 初步探明焦栀子过程饮片还原糖的变化规律, 为揭示栀子炒焦过程中的颜色褐变规律奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

CYJ900型电磁炒药机, 北京华林瑞控科技有限公司; KQ-300B型超声清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; LC-20A型高效液相色谱仪, DAD检测器, 日本岛津公司; BS 400S-WEI型十万分之一分析天平, 北京赛多利斯天平有限公司; LD-T100A型高速万能粉碎机, 上海顶帅电器有限公司; H/T16MM型台式高速离心机, 湖南赫西仪器装备有限公司。

1.2 药材与试剂

栀子(批号20200812)购自河北安国市, 产地江西丰城拖船镇, 经中国中医科学院中药研究所张村研究员鉴定, 为茜草科栀子属植物栀子 *G. jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实。焦栀子 *Gardeniae Fructus Praeparatus* 为栀子的炮制加工品, 炮制方法以《中国药典》2020年版为依据, 由北京本草方

源药业有限公司依法中试生产焦栀子碎炒炮制过程样品。

对照品甘露糖(批号 CHB201108)、鼠李糖(批号 CHB210108)、葡萄糖醛酸(批号 CHB201216)、半乳糖醛酸(批号 CHB201205)、葡萄糖(批号 CHB201122)、半乳糖(批号 CHB201204)、木糖(批号 CHB210104)、阿拉伯糖(批号 CHB210611),质量分数均 $\geq 98\%$,由成都克洛玛生物科技有限公司提供;浓硫酸、盐酸,北京市通广精细化工公司;PMP,批号 G2122198,质量分数 $\geq 99\%$,上海阿拉丁生化科技股份有限公司提供;乙酸铵、氢氧化钠,国药集团化学试剂有限公司;水为娃哈哈纯净水,购自杭州娃哈哈集团有限公司;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 焦栀子炮制过程饮片的制备^[11]

焦栀子制备参照《中国药典》2020年版一部、四部,将炒药机温度设定为 $260\text{ }^{\circ}\text{C}$,待炒药机稳定后,投入栀子 10 kg ,开始计时,每隔 1 min 取样(每次取样约 100 g) 1 次,爆鸣声后,每隔 0.5 min 取样 1 次,炒制时间为 15 min ,共计 17 个样品,记为 $J0\sim J16$ (其中 $J0$ 为生栀子)。炮制终点饮片经北京本草方源有限公司老药工(饮片生产操作工石建绿)鉴定符合《中国药典》2020年版焦栀子的性状要求。

2.2 色谱条件

以 Phenomenex Luna C_{18} 柱($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$)为色谱柱;流动相为 100 mmol/L 乙酸铵-乙腈($83:17$),柱温为 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$,体积流量为 1.0 mL/min ,进样量为 $5\text{ }\mu\text{L}$ (酸水解糖)、 $10\text{ }\mu\text{L}$ (游离糖),检测波长为 254 nm 。

2.3 对照品溶液及其衍生化溶液制备^[12-15]

2.3.1 混合对照品溶液的制备 精密称定甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖各单糖对照品适量于 10 mL 量瓶中,加 5% 甲醇水溶解并稀释定容,制成质量浓度分别为 $1\ 000.0$ 、 100.2 、 50.1 、 678.0 、 980.0 、 196.0 、 $1\ 000.0$ 、 $280.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。另取甘露糖适量于量瓶中,加 5% 甲醇水溶液溶解,并稀释定容,得到质量浓度为 $10.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的甘露糖对照品溶液。

2.3.2 混合对照品溶液的衍生化 取“2.3.1”项下混合对照品溶液以及质量浓度为 $10.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的甘露

糖对照品溶液各 0.2 mL ,置于 2.0 mL 离心管中,依次加入 0.3 mol/L NaOH 溶液 0.1 mL 和 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液 0.1 mL ,涡旋混匀,置于 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中衍生化反应 0.5 h ,冷却至室温后加入 0.3 mol/L 盐酸 0.1 mL 进行中和,再加入三氯甲烷 1.0 mL ,涡旋混匀, $5200\times g$ 条件下离心 3 min ,取上清液, $13\ 000\times g$ 条件下离心 3 min ,即得。

2.4 栀子样品酸水解提取方法考察

2.4.1 水解用酸种类和浓度的考察 试验前期考察了 0.5 、 1.0 、 2.0 、 3.0 、 4.0 mol/L 的硫酸、盐酸溶液,水解生栀子粉末($J0$)后对总单糖含量(8个单糖含量的总和)的影响,结果发现 3 mol/L 盐酸和 1 mol/L 硫酸水解的总单糖含量相当,考虑到盐酸沸点低、易挥发,在水解过程中浓度难以控制,易污染环境;因此,本研究选择硫酸作为酸水解试剂(表1)。在此基础上,考察了硫酸的水解浓度(0.5 、 1.0 、 1.5 、 2.0 、 3.0 、 4.0 mol/L)对栀子粉末($J0$ 和 $J13$)水解后总单糖含量的影响,结果发现 1.5 mol/L 硫酸时,生栀子和焦栀子中总单糖含量最大(表2),因此,选择硫酸的水解酸度为 1.5 mol/L 。

2.4.2 水解温度和水解时间的考察 试验考察了不同水解温度(80 、 90 、 100 、 110 、 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$)、不同水解时间(0.5 、 1.0 、 2.0 、 4.0 、 6.0 、 8.0 h)对栀子粉末样品水解的影响,结果发现,在水浴中生栀子和焦栀子样品中总单糖含量随着温度的升高而升高,即 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下总单糖含量最高;而在油浴中生栀子和焦栀子样品中总单糖含量随着温度的升高呈现先增大后减小的趋势, $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时总单糖含量最大。与 $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ 油浴相比, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴下生栀子、焦栀子总单糖含量较大(表3)。而且水浴比油浴操作简便、

表1 不同硫酸、盐酸浓度水解后栀子粉末样品中总单糖含量测定结果

Table 1 Determination of total monosaccharide contents of *Gardeniae Fructus* (GF) in samples after hydrolysis with different concentrations of sulfuric acid and hydrochloric acid

酸浓度/ ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	总单糖质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	
	硫酸	盐酸
0.5	47.96	30.26
1.0	58.13	44.33
2.0	56.44	51.51
3.0	45.74	58.33
4.0	1.40	60.42

表2 不同硫酸浓度下水解后生栀子、焦栀子粉末样品中总单糖含量测定结果

Table 2 Determination of total monosaccharide content of GF and GFP at different sulfuric acid concentrations

硫酸浓度/ (mol·L ⁻¹)	总单糖质量分数/(mg·g ⁻¹)	
	生栀子	焦栀子
0.5	47.96	47.14
1.0	57.98	52.42
1.5	60.67	55.37
2.0	55.85	52.91
3.0	45.74	47.83
4.0	1.40	0.53

表3 水浴、油浴中不同温度下生栀子、焦栀子样品中总单糖含量测定结果

Table 3 Determination results of total monosaccharide content of GF and GFP at different temperatures in water bath and oil bath

加热方式	水解温度/℃	总单糖质量分数/(mg·g ⁻¹)	
		生栀子	焦栀子
水浴	80.0	43.52	39.65
	90.0	50.78	46.50
	100.0	60.67	55.37
油浴	100.0	51.55	49.10
	110.0	55.72	51.45
	120.0	31.16	30.69

安全性相对较高,故最终选择水浴 100 °C 酸水解。在此基础上,发现随着水解时间的延长,生栀子和焦栀子总单糖含量都呈先增大后减小的趋势(表4),最终选择栀子粉末的多糖水解时间为 4.0 h。

表4 沸水浴中不同水解时间下生栀子、焦栀子样品中总单糖含量测定结果

Table 4 Determination of total monosaccharide content of GF and GFP in boiling water bath at different hydrolysis time

水解时间/h	总单糖质量分数/(mg·g ⁻¹)	
	生栀子	焦栀子
0.5	43.11	32.94
1.0	49.12	35.81
2.0	55.77	39.28
4.0	57.60	40.91
6.0	55.75	38.91
8.0	53.61	36.79

2.5 栀子样品中游离单糖提取方法的考察

实验比较了超声提取(15、30、45 min)和加热回流提取(1、2、3 h)对栀子样品中总游离单糖含量的影响,结果发现超声提取的生栀子和焦栀子样品中总游离单糖的 RSD 小于 3.0%;加热回流下生栀子样品中总游离单糖的 RSD 小于 5.0%,焦栀子样品中总游离单糖的 RSD 为 11.41%(表5、6)。考虑到超声提取操作简便、平行性相对于加热回流提取较好,且加热回流时间长会促进多糖水解为单糖,导致游离单糖定量不准确。实验最终选取游离单糖的提取方法为超声处理 15 min。

表5 超声提取不同时间下生栀子、焦栀子样品中总游离单糖含量测定结果

Table 5 Determination of total free monosaccharide content of GF and GFP at different time by ultrasonic extraction

提取时间/min	总游离单糖质量分数/(mg·g ⁻¹)	
	生栀子	焦栀子
15	16.22	3.42
30	15.76	3.43
45	15.86	3.45

表6 加热回流提取不同时间下生栀子、焦栀子样品中总游离单糖含量测定结果

Table 6 Determination of total free monosaccharide content of GF and GFP at different time by heating and reflux extraction

提取时间/h	总游离单糖质量分数/(mg·g ⁻¹)	
	生栀子	焦栀子
1	17.14	4.22
2	15.96	4.77
3	17.51	5.37

2.6 焦栀子炮制过程中饮片酸水解总单糖和游离单糖样品溶液制备及衍生化

2.6.1 酸水解总单糖供试品溶液的制备及衍生化 精密称取栀子粉末(过4号筛)0.2 g,加入 2.0 mL 1.5 mol/L 硫酸溶液,密封后置于沸水浴中水解 4.0 h,取出,冷却至室温,加入 4.0 mol/L NaOH 溶液调 pH 值至略偏碱性,再定容至 10 mL 量瓶中,得酸水解液。取水解液 0.2 mL,按“2.3.2”项下方法衍生化后即得酸水解总单糖供试品溶液。

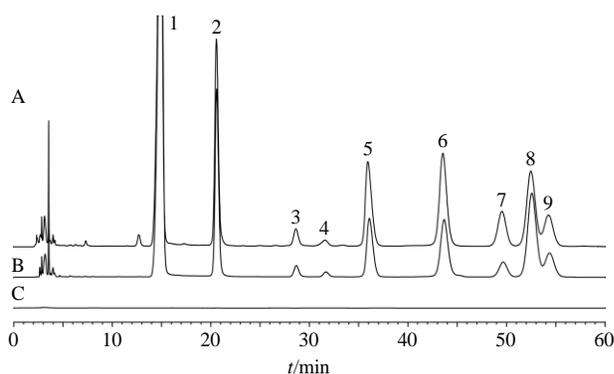
2.6.2 游离单糖供试品溶液的制备及衍生化 精密称取栀子粉末(过4号筛)1.0 g,置具塞锥形瓶中,

精密加水 20 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 15 min, 冷却后补足减失的质量, 滤过。取滤液 0.2 mL, 按“2.3.2”项下方法衍生化后, 即得游离单糖供试品溶液。

2.7 方法学考察

2.7.1 专属性考察 分别配置空白溶剂、混合对照品溶液、供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样测定。8 种单糖衍生物的色谱峰可达到基线分离, 且达到定量限要求。样品中的其他成分对单糖组分的检测无干扰, 阿拉伯糖的分离度 > 1.0, 其他各成分的分离度 > 1.5, 该方法具有良好的专属性, 结果见图 1。

2.7.2 线性关系考察及检测限、定量限的测定 取衍生化后混合对照品溶液分别进样 1、3、5、7、9、



1-PMP 2-甘露糖 3-鼠李糖 4-葡萄糖醛酸 5-半乳糖醛酸 6-葡萄糖 7-半乳糖 8-木糖 9-阿拉伯糖, 图 2~4 同
1-PMP 2-mannose 3-rhamnose 4-glucuronic acid 5-galacturonic acid 6-glucose 7-galactose 8-xylose 9-arabinose, same as figures 2-4

图 1 梔子粉末供试品溶液 (J0, A)、混合对照品溶液 (B) 和空白溶剂 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of GF powder test solution (J0, A), mixed reference substances (B) and blank solvent (C)

11、15、20、25 μL。另取衍生化后的甘露糖对照品溶液, 分别进样 1、3、5、11、15、20、25、30 μL 依法测定, 以进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 并计算回归方程; 分别以信噪比 (S/N) 3 : 1 和 10 : 1 作为标准, 测得各单糖的检测限及定量限。结果见表 7。

2.7.3 精密度试验 精密称取生梔子样品 (J0) 粉末 0.2 g, 按“2.6”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算得到上述 8 种单糖甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖峰面积的 RSD 分别为 0.12%、0.21%、0.99%、0.23%、0.53%、0.37%、0.28%、0.55%, 结果显示, 8 种单糖的精密度 RSD 均 ≤ 0.99%, 符合方法学要求。

2.7.4 重复性试验 精密称取生梔子样品 (J0) 粉末 6 份, 每份 0.2 g, 按“2.6”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算样品中各指标成分含量, 计算其 RSD。结果显示, 样品中甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖质量分数分别为 56.96、8.17、3.06、42.75、86.88、17.82、38.34、16.29 mg/g, RSD 分别为 1.48%、1.86%、4.28%、2.46%、2.42%、2.54%、2.60%、2.15%, 8 种单糖的重复性 RSD 均 ≤ 4.26%, 符合方法学要求。

2.7.5 稳定性试验 精密称取生梔子样品 (J0) 粉末, 按“2.6”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0、4、8、12、16、20、24 h, 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算得到上述 8 种单糖甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖峰面积的 RSD 分别为 1.17%、0.85%、1.27%、1.65%、2.10%、1.91%、1.86%、

表 7 对照品线性回归方程、检测限、定量限测定结果

Table 7 Linear regression equation, limit of detection and limit of quantitation results of control products

单糖	回归方程	线性范围/μg	r	检测限/μg	定量限/μg
甘露糖	$Y=2\ 993\ 991.50 X-610\ 353.85$	1.000 0~25.000 0	0.999 9	0.001 5	0.005 0
甘露糖 (游离型)	$Y=3\ 658\ 009.88 X-41\ 524.97$	0.010 0~0.300 0	0.999 3	0.001 5	0.005 0
鼠李糖	$Y=2\ 427\ 855.02 X-102\ 930.33$	0.100 2~2.505 0	0.999 9	0.001 0	0.005 0
葡萄糖醛酸	$Y=2\ 520\ 213.00 X-80\ 254.94$	0.050 1~1.252 5	0.999 7	0.001 5	0.006 0
半乳糖醛酸	$Y=2\ 453\ 841.34 X-289\ 278.27$	0.678 0~16.950 0	0.999 9	0.002 5	0.008 1
葡萄糖	$Y=1\ 768\ 787.53 X-507\ 018.46$	0.980 0~24.500 0	0.999 8	0.003 6	0.011 8
半乳糖	$Y=3\ 556\ 670.41 X-342\ 735.71$	0.196 0~4.900 0	0.999 2	0.0016	0.004 7
木糖	$Y=3\ 650\ 947.16 X-548\ 798.27$	1.000 0~25.000 0	0.999 9	0.002 2	0.006 7
阿拉伯糖	$Y=2\ 599\ 139.81 X+48\ 956.31$	0.280 0~7.000 0	0.999 9	0.001 7	0.005 6

2.09%，结果显示，8种单糖的稳定性RSD均 $\leq 2.1\%$ ，表明供试品溶液的稳定性良好。

2.7.6 加样回收率试验 取已测定各单糖含量的9份生栀子(J0)供试品溶液，按低、中、高质量浓度，每份加入各单糖混合对照品溶液，按“2.2”项下色谱条件进样，计算加样回收率及其RSD，结果显示，8种单糖甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖的平均加样回收率分别为102.16%、99.32%、100.50%、103.15%、100.84%、99.55%、99.63%、101.59%，均在99.32%~103.15%，RSD分别为1.81%、0.68%、0.64%、0.51%、1.55%、1.13%、0.77%、1.71%，均在0.64%~1.81%。

2.8 样品含量测定

取焦栀子炮制过程样品17个，按“2.6”项下制备供试品溶液，依法进样分析。结果见图2~5。

焦栀子炮制过程样品中游离甘露糖含量呈先升高后降低的趋势，焦栀子含量大于生栀子；游离葡萄糖和半乳糖随着炮制程度的加深，含量均呈降低的趋势，3种糖变化幅度大小顺序为游离葡萄糖>游离半乳糖>游离甘露糖。

本研究酸水解法得到的总单糖由游离型和结合

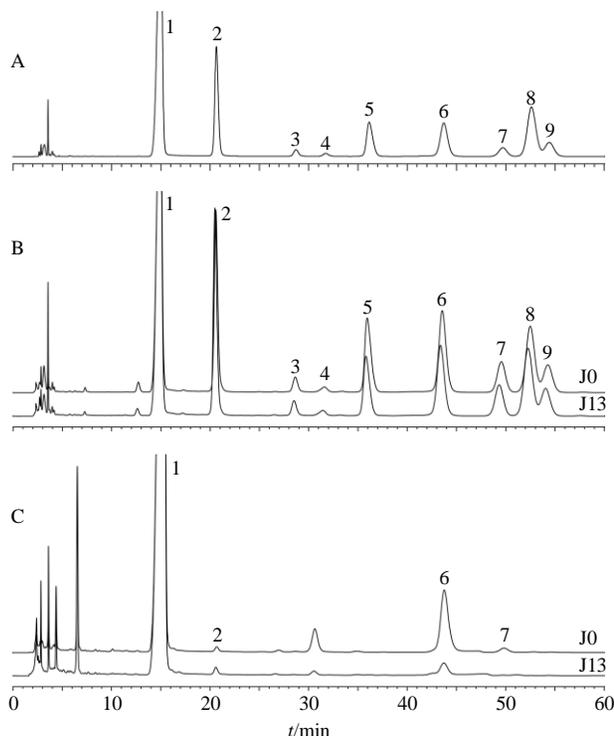


图2 混合对照品(A)、酸水解总单糖供试品溶液(B)和游离单糖供试品溶液(C)的HPLC图

Fig. 2 HPLC of mixed reference substances (A), acid hydrolyzed total monosaccharide test solution (B) and free monosaccharide test solution (C)

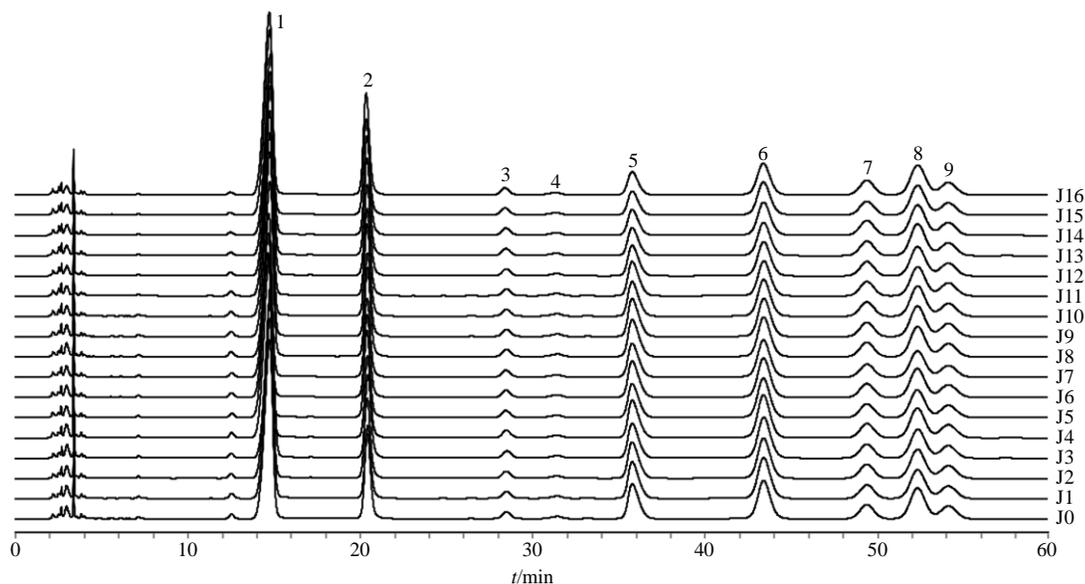


图3 酸水解栀子炮制过程样品中总单糖的图谱变化

Fig. 3 Atlas change of total monosaccharides in GF processed by acid hydrolysis

型组成，结合型单糖（即总单糖与游离单糖之差）随着炮制程度的加深，部分糖的变化趋势同总单糖。如结合型鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖醛酸变化趋势同总单糖；结合型葡萄糖含量则呈略微升高的趋势。随着炮制

程度的加深，过程饮片的结合型单糖的组成类别不变，除结合型半乳糖醛酸外，各结合型单糖比例基本不变（图6）。由糖的变化推测焦栀子中的结合型半乳糖醛酸、游离葡萄糖和游离半乳糖参与了美拉德反应。

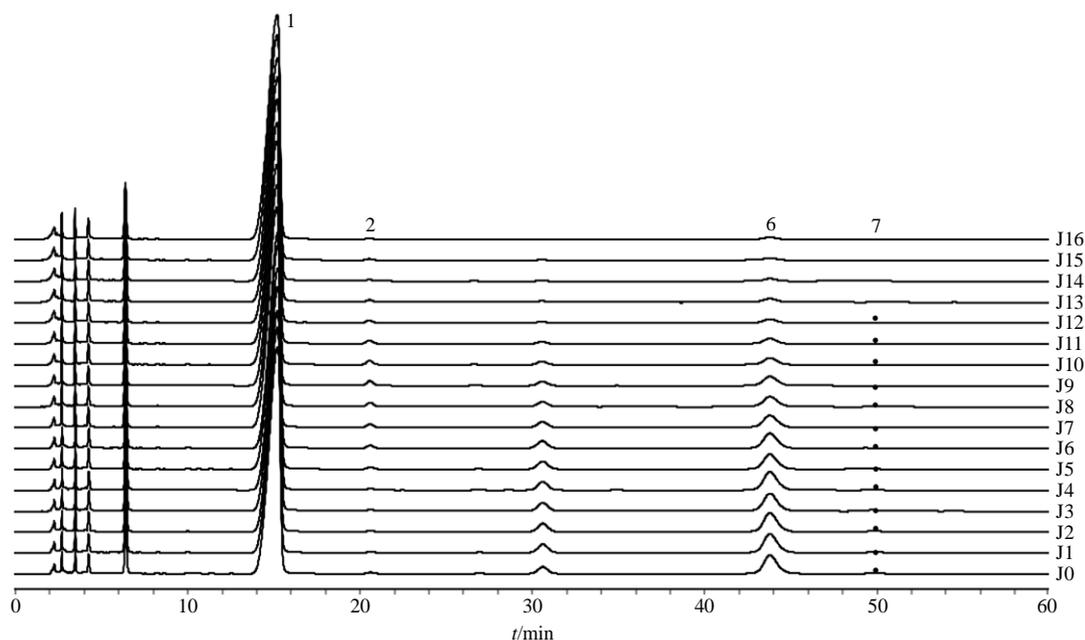


图 4 酸水解栀子炮制过程样品中游离单糖的图谱变化

Fig. 4 Atlas change of free monosaccharides in GF processed by acid hydrolysis

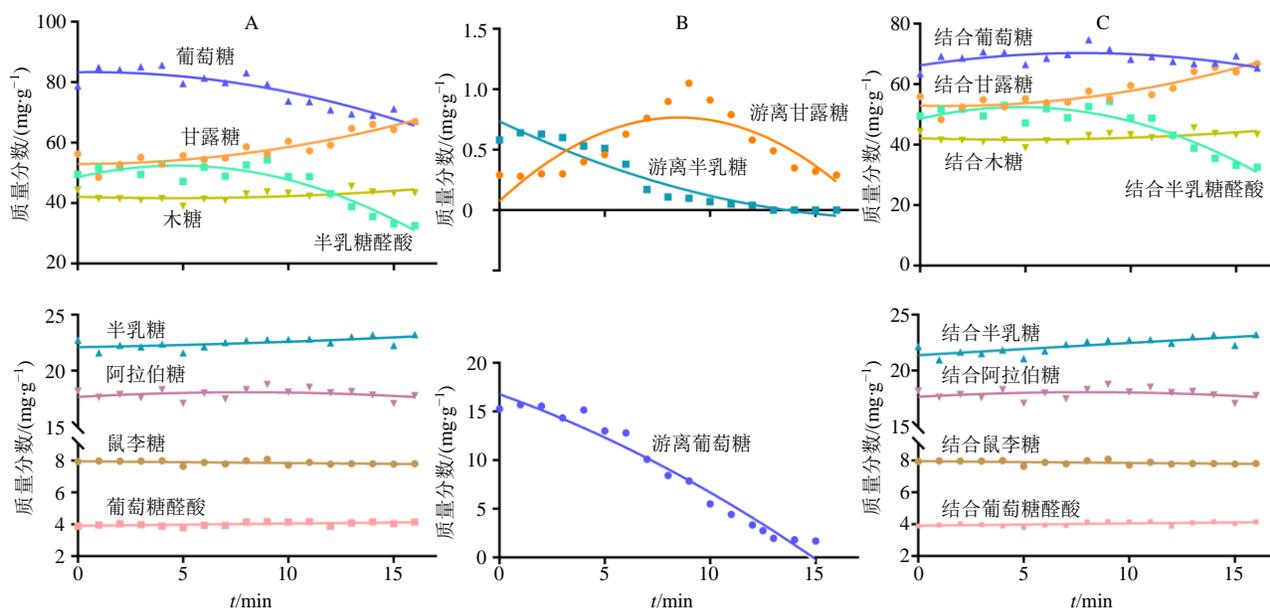


图 5 栀子炮制过程样品中总单糖 (A)、游离单糖 (B)、结合型单糖 (C) 含量变化趋势

Fig. 5 Change trend of total monosaccharides (A), free monosaccharides (B) and bound monosaccharides (C) contents in GF processing samples

2.9 化学计量学分析

2.9.1 层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA) 及主成分分析 (principal component analysis, PCA) 为客观反映焦栀子炮制过程样品的差异性, 将焦栀子炮制过程样品各总单糖含量和游离糖含量测定结果导入 SIMCA 13.0 软件进行 HCA 和 PCA, 结果见图 7-a、b。焦栀子炮制过程样品可划分为 3 个阶段: 炮制前期为 J0~J7, 炮制中期为 J8~J11,

炮制后期为 J12~J16, 说明焦栀子过程样品各总单糖和游离单糖呈 3 个阶段变化, 分为炮制前期、中期和后期, 这与课题组前期的焦栀子过程样品颜色的变化规律基本吻合^[11]。

2.9.2 正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 在 PCA 基础上进行有监督的 OPLS-DA, 进一步寻找焦栀子炮制过程样品的差异标志物。模型 R^2_{Ycum} 、

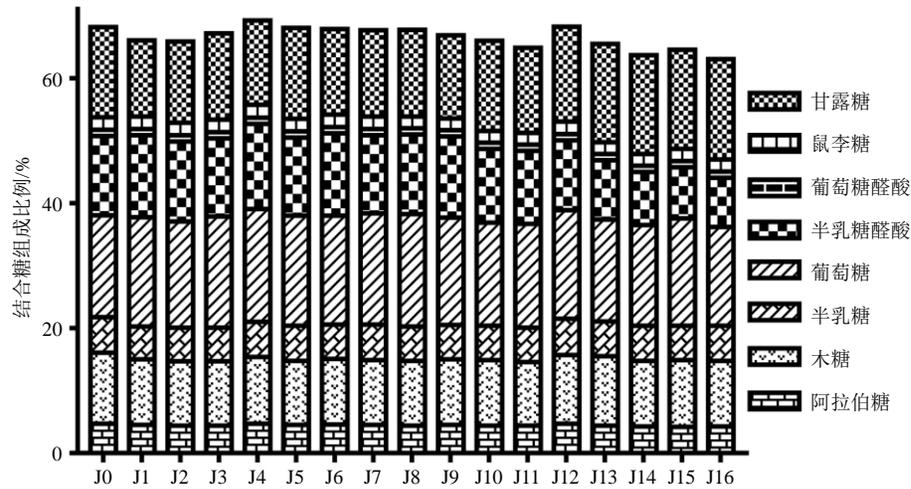


图6 栀子炮制过程样品中各结合糖组成比例

Fig. 6 Proportion of bound sugar in samples of GF during processing

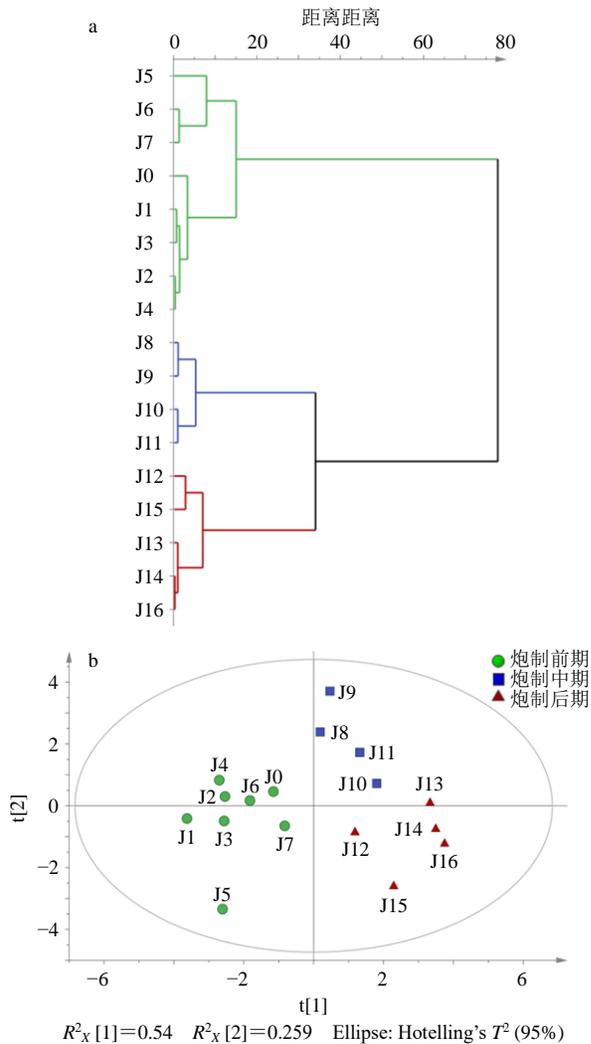


图7 栀子炮制过程样品酸水解后各单糖和游离糖含量的HCA (a) 和PCA (b)

Fig. 7 HCA (a) and PCA (b) of monosaccharide and free monosaccharide content in samples of GF after acid hydrolysis

Q^2_{cum} 分别为 0.804、0.751。表明建立的模型具有较好的拟合度和预测能力，见图 8-a，变量重要性投影值 (variable importance in projection, VIP) 图见图 8-b。因为 $VIP > 1$ 的单糖有游离甘露糖、半乳糖醛酸、游离葡萄糖、游离半乳糖、葡萄糖醛酸、葡

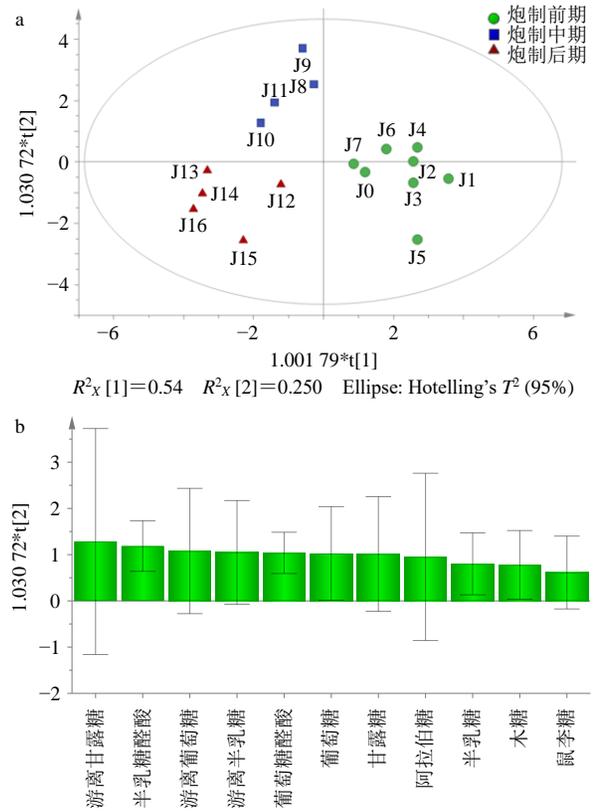


图8 栀子炮制过程样品酸水解后各单糖和游离糖含量的OPLS-DA (a) 以及VIP值 (b)

Fig. 8 OPLS-DA (a) and VIP value (b) of monosaccharide content and free monosaccharide content in samples of GF after acid hydrolysis

葡萄糖、甘露糖等7种成分,考虑到葡萄糖醛酸在整个炮制过程变化并不明显,所以焦栀子炮制过程中差异性标志性成分为游离甘露糖、半乳糖醛酸、游离葡萄糖、游离半乳糖、葡萄糖和甘露糖共6种。

3 讨论

本实验采用饮片粉末直接酸水解的方法分析单糖的组成,简化了传统方式中多糖提取、浓缩、除杂等复杂步骤,减少了多糖的损失,更简便、可靠,可为研究中药的单糖组成提供一定的参考。

结合型单糖反映了栀子中多糖的单糖组成,游离型单糖反映了单糖的原始状态,通过2种糖含量的变化可一定程度反映参与美拉德反应的单糖种类及其存在状态。总单糖和除葡萄糖之外结合型单糖的含量变化趋势一致,部分糖的变化幅度不一。与J0相比,J1~J9中葡萄糖呈升高趋势,升高的幅度不一,变化幅度最小为0.76%,J9~J16呈降低趋势,J16总糖中葡萄糖降低了14.84%;整个炮制过程的结合型葡萄糖呈升高的趋势,但升高的幅度不一,J16中结合型葡萄糖升高了3.00%。由此推测,游离葡萄糖参与了美拉德反应。进一步关联游离葡萄糖含量的变化,印证了这一推测。即在整个炮制过程中,加热炒制引起葡萄糖同时存在着成分转化与破坏过程,在炮制前期和中期前半段,总体上转化大于破坏,栀子中含有的葡萄糖苷类成分易分解成葡萄糖和苷元,或者存在的多糖、寡糖等降解为葡萄糖,造成了葡萄糖含量的升高;炮制中期的后半段和炮制后期,随着炒制程度的加重,破坏大于转化,美拉德反应占主导,造成了葡萄糖含量的降低。栀子中的环烯醚萜苷、二萜色素类成分为葡萄糖或葡萄糖糖苷类成分,这些成分在栀子炒焦过程中变化呈现明显降低趋势,推测上述成分可能也参与了美拉德反应。本研究从葡萄糖存在状态的变化,进一步证实这些成分参与了美拉德反应。

与J0相比,J1~J7阶段总糖中甘露糖和结合型单糖呈降低趋势,降低变化幅度分别在0.86%~13.62%和1.16%~13.66%;J8~J16中呈升高趋势,升高变化幅度分别在0.04%~19.31%和1.10%~19.43%。游离甘露糖含量总体呈升高趋势,焦栀子含量大于生栀子;由此推测,甘露糖未参与美拉德反应。栀子中的多糖、寡糖在加热过程中分解转化成甘露糖从而导致其含量升高。

因游离单糖中未检出半乳糖醛酸,结合型单糖含量同总糖,与J0相比,J1~J9中呈升高趋势,变

化幅度为0.10%~9.76%;J10~J16中呈降低趋势,变化幅度为1.37%~34.13%。由此推测,半乳糖醛酸可能参与了美拉德反应。在整个炮制过程中,半乳糖醛酸也同时存在着转化与破坏2个过程,在炮制前期和中期前半段,转化>破坏,栀子中含有的多糖、寡糖分解成半乳糖醛酸,造成了半乳糖醛酸的升高,炮制中期的后半段和炮制后期,破坏>转化,美拉德反应占主导,造成了半乳糖醛酸的降低。

因总糖和结合型单糖中的鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖、木糖和阿拉伯糖在炮制过程中的变化不明显,推测上述该糖未参与美拉德反应。游离半乳糖随着炮制程度的加深,含量呈降低的趋势,其在焦栀子中未检出,推测其主要参与美拉德反应,导致了含量的降低。

本课题前期发现焦栀子75%甲醇水提取物对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除率大于生栀子,即焦栀子抗氧化性大于生栀子。与生栀子相比,焦栀子的环烯醚萜苷类和色素类成分呈降低趋势。焦栀子抗氧化性较强可能与美拉德反应产物相关,据报道,美拉德反应产物中含有抗氧化活性的还原酮、呋喃、类黑精等物质,类黑精具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、抗菌等多种生物活性^[16-20]。文献报道和我们研究的结果相吻合。美拉德反应是焦栀子发生褐变的原因之一,后续将对参与焦栀子美拉德反应的其他物质进行更深入的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 魏·吴普等述.清·孙星衍,清·孙冯翼辑.神农本草经[M].北京:科学技术文献出版社,1996:73.
- [2] 中国药典[S].一部.2020:259-260.
- [3] 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.
- [4] 张正伟.杨梅酒颜色劣变与花色苷降解机理的研究[D].无锡:江南大学,2021.
- [5] 刘德鹏,王云,王国,等.焦栀子炮制过程中饮片色泽变化与美拉德反应的相关性分析[J].中国中药杂志,2020,45(10):2382-2388.
- [6] 周礼仕,王毓杰,钟辉云,等.柱前衍生-HPLC法分析葛根与粉葛多糖的单糖组成[J].中药材,2019,42(3):601-603.
- [7] 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.

- [8] Hu J Y, Cheng H, Xu J, *et al.* Determination and analysis of monosaccharides in *Polygonatum cyrtoneuma* Hua polysaccharides from different areas by ultra-high-performance liquid chromatography quadrupole trap tandem mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2021, 44(18): 3506-3515.
- [9] Fan B L, Wei G L, Gan X F, *et al.* Study on the varied content of *Polygonatum cyrtoneuma* polysaccharides in the processing of steaming and shining for nine times based on HPLC-MS/MS and chemometrics [J]. *Microchem J*, 2020, 159: 105352.
- [10] Li P P, Yan Z Y, Chen Y, *et al.* Analysis of monosaccharide composition of water-soluble polysaccharides from *Codium fragile* by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2021, 44(7): 1452-1460.
- [11] 夏梦雨, 王云, 郑颖豪, 等. 基于颜色-成分关联分析比较焦栀子炮制过程不同炒制形态质量变化规律 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(9): 2197-2206.
- [12] 万敏, 米宝丽, 张振秋. 柱前衍生 HPLC 法测定生、炒决明子中七种单糖的含量 [J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(4): 834-837.
- [13] 宋佳, 张振秋, 李峰. 柱前衍生 HPLC 对鹿茸多糖中单糖组成的研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(9): 2227-2230.
- [14] 刘瑞连, 李鑫, 欧少福, 等. 栀子炒制前后有效成分含量测定及其质量评价研究 [J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(12): 2915-2917.
- [15] 余亦婷, 皮文霞, 谢辉, 等. PMP 柱前衍生化-HPLC 法分析不同生长年限黄芪中 6 种单糖的含量 [J]. *中国药房*, 2021, 32(12): 1448-1452.
- [16] 韩易, 赵燕, 徐明生, 等. 美拉德反应产物类黑精的研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2019, 40(9): 339-345.
- [17] 陈立彪. 黑参中类黑精的形成过程与抗氧化性分析 [D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2020.
- [18] 李存. 结晶麦芽美拉德反应产物的初步研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2022.
- [19] Cao J R, Yan H X, Liu L. Optimized preparation and antioxidant activity of glucose-lysine Maillard reaction products [J]. *LWT*, 2022, 161: 113343.
- [20] Zhu Z Y, Zhang Y, Wang W, *et al.* Structural characterisation and antioxidant activity of melanoidins from high-temperature fermented apple [J]. *Int J Food Sci Tech*, 2020, 56(5): 2471-2480.

[责任编辑 郑礼胜]