

AHP-熵权法结合 Box-Behnken 设计-响应面法优选黄精酒制工艺及其炮制前后药效对比研究

石双慧, 王梦琳, 魏晓彤, 马思媛, 胡宇峰, 张婧秋, 王慧楠, 陈梦雨, 刘芊芊, 王英姿*

北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要: 目的 优化酒黄精 wine-processed *Polygonati Rhizoma* 的高压蒸制工艺, 确定最佳工艺参数, 并对酒制前后刺激性、免疫调节及降血糖作用进行研究。方法 以润制时间、蒸制压力、蒸制时间和焖制时间作为考察因素, 以性状、黄精多糖、薯蓣皂苷元、水浸出物、醇浸出物和 5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF) 作为考察指标, 运用 AHP-熵权法结合 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 确定酒黄精炮制工艺条件参数。通过家兔眼刺激性实验, 评价黄精酒制前后的刺激性作用。通过 ip 环磷酰胺建立小鼠免疫抑制模型, 比较黄精酒制前后对免疫调节作用的影响。通过饲喂高脂高糖饲料、ip 链脲佐菌素建立糖尿病小鼠模型, 比较黄精酒制前后对降血糖作用的影响。结果 酒黄精炮制最佳工艺参数为润制时间 5 h、蒸制时间 1 h、蒸制压力 0.06 MPa、焖制时间 7 h。药效实验结果表明, 生黄精具有刺激性, 黄精酒制后对黏膜的刺激作用减弱, 酒黄精提高小鼠免疫力和降血糖的作用均强于生黄精。结论 优选出的酒黄精炮制工艺稳定、合理、可行, 按照此工艺制备的酒黄精, 可以降低其刺激性, 增强免疫调节作用和降血糖作用, 为黄精的炮制工艺研究和临床用药提供参考。

关键词: AHP-熵权法; Box-Behnken 设计-响应面法; 酒黄精; 炮制工艺; 刺激性; 免疫调节; 降血糖作用; 薯蓣皂苷元; 5-羟甲基糠醛

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)14-4467-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.14.007

Optimization of processing technology of wine-processed *Polygonati Rhizoma* by combination of Box-Behnken design-response surface method and AHP-entropy weight method and comparison of efficacy before and after processing

SHI Shuang-hui, WANG Meng-lin, WEI Xiao-tong, MA Si-yuan, HU Yu-feng, ZHANG Jing-qiu, WANG Hui-nan, CHEN Meng-yu, LIU Qian-qian, WANG Ying-zi

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To optimize the high-pressure steaming process of wine-processed Huangjing (*Polygonati Rhizoma*, PR) (wpPR) and determine the best process parameters, and to study the irritation, immune regulation and hypoglycemic effect before and after wine processing. **Methods** Taking the moistening time, steaming pressure, steaming time and stewing time as investigation factors and characteristics, polysaccharide, diosgenin, water extract, alcohol extract and 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) as investigation indexes, the AHP-entropy weight method combined with the Box-Behnken design-response surface method (BBD-RSM) were used to determine the processing parameters of wpPR. The irritating effect of PR before and after processing was evaluated by rabbit eye irritation test. The immunosuppressive model of mice was established by intraperitoneal injection of cyclophosphamide, and compared the effects of PR before and after processing on immune regulation. The model of diabetes mice was established by feeding high fat and high sugar diet and intraperitoneal injection of streptozotocin, and the effect of PR before and after processing on hypoglycemic effect was compared. **Results** The best processing parameters of wpPR was moistening time of 5 h, steaming time of 1 h, steaming pressure of 0.06 MPa and stewing time of 7 h. The results of the pharmacodynamic experiment showed that raw PR was

收稿日期: 2023-01-03

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1707000)

作者简介: 石双慧 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂新技术与中药炮制原理研究。E-mail: a18801377903@163.com

*通信作者: 王英姿 (1975—), 女, 教授, 博士生导师, 博士, 研究方向为中药制剂新技术与中药炮制原理研究。E-mail: wangyzi@sina.com

irritant, the irritation of wpPR on mucous membrane is weakened. The effects of wpPR on improving immunity and lowering blood sugar in mice were stronger than raw PR. **Conclusion** The comprehensive score of wpPR pieces was higher, the process of wpPR was stable, reasonable and feasible. wpPR prepared by this process can reduce irritation, enhance immune function and hypoglycemic effect, which provided a reference for the processing technology research and clinical medication of PR.

Key words: AHP-entropy weight method; Box-Behnken design-response surface methodology; wine-processed *Polygonati Rhizoma*; processing technology; irritation; immunomodulatory; hypoglycemic effect; diosgenin; 5-hydroxymethylfurfural

黄精为百合科黄精属植物滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.、黄精 *P. sibiricum* Red. 或多花黄精 *P. cyrtoneura* Hua 的干燥根茎, 具有补气养阴、健脾、润肺、益肾的功效^[1]。黄精生品直接服用刺人咽喉, 酒制可去除其刺激性, 增强补脾润肺、益肾的功效^[2-5]。《中国药典》2020 年版黄精项下收录了酒黄精饮片, 但对于其具体炮制参数描述均较为笼统, 而且目前各地炮制标准对于酒黄精的炮制工艺不统一, 影响临床疗效, 因此, 建立符合《中国药典》规范及临床要求的酒黄精饮片的炮制工艺非常必要。

现代研究表明, 与常压蒸制相比, 酒黄精高压蒸制不仅便于控制温度、时间等影响因素, 极大地缩短炮制时间, 同时还可以减少活性成分的流失, 增强疗效^[6-8]。多糖在黄精中含量最高, 是《中国药典》2020 年版规定的评价黄精质量的重要指标, 也是黄精发挥免疫调节作用最重要最主要的功能性成分。皂苷是黄精中另一主要药效成分, 目前, 对皂苷类成分的研究主要集中于薯蓣皂苷元^[9-12]。5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF) 是黄精炮制过程中的副产物, 既有药理活性又有毒性^[13-16]。黄精炮制后的外观性状常作为传统鉴别手段, 浸出物体现了药材整体含量水平。因此, 本实验对酒黄精的炮制工艺研究过程中, 以湖南产多花黄精为研究对象, 选择性状、黄精多糖、薯蓣皂苷元、水浸出物、醇浸出物和 5-HMF 为质量控制指标, 首先采用单因素法优选酒黄精饮片炮制工艺, 再采用层次分析法 (analytic hierarchy process, AHP)-熵权法结合 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 优选多花黄精高压蒸制工艺参数并进行验证, 同时对黄精酒制前后的刺激性、免疫调节作用和降血糖作用进行研究, 为建立稳定可控的酒黄精饮片炮制工艺提供参考依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

BSI10S 型万分之一电子天平, 赛多利斯科学仪

器有限公司; YX-280D 型数显手提式灭菌器, 容积 18 L, 合肥华泰医疗设备有限公司; QM-Q5-Y30DW 型电蒸锅, 长沙市全民电器有限公司; DHG-9030A 型电热恒温鼓风干燥箱, 北京北方利辉实验仪器设备有限公司; KH7200DB 型数控超声波清洗机, 昆山禾创超声仪器有限公司; UltiMate 3000 型高效液相色谱仪, 美国赛默飞世尔科技有限公司; 756PC 型紫外-可见分光光度计, 舜宇恒平科学仪器有限公司; HW.SY21-KP6 型智能恒温水浴锅, 北京市长凤仪器仪表公司; ZN-02 型粉碎机, 北京兴时利和科技发展有限公司; A015 型多功能酶标仪, Molecular Devices; XN-1000V[B1]型血液系统分析仪, 德国赛多利斯 (北京) 仪器有限公司; ACCU-CHEK 型血糖仪, 德国 Roche 公司; AU680 型自动生化分析仪, 美国 Beckman Coulter 公司。

1.2 材料

黄精药材, 批号 2020042401, 购于新邵南陌生物科技有限公司, 经北京中医药大学刘春生教授鉴定, 植物基原为百合科黄精属植物多花黄精 *P. cyrtoneura* Hua 的干燥根茎, 验证试验 3 批药材批号分别为 2020042402、2020042403、2020042404。黄酒, 批号 20180812, 酒精度 $\geq 15.5\%$ vol, 购自会稽山绍兴酒股份有限公司。

对照品薯蓣皂苷元 (批号 C10J9Q52616, HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$)、无水葡萄糖 (批号 S22J12H137237, 质量分数 $\geq 98\%$)、5-HMF (批号 Z25N8B49010, HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$) 及试剂环磷酸胺 (批号 X13J11Y115691)、盐酸左旋咪唑 (批号 Y23M9C56327)、印度墨水 (批号 L17S11G124902)、链脲菌素 (批号 S17049)、二甲双胍 (批号 B15A11D121557)、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (批号 S30GR162949), 均购自上海源叶生物科技有限公司, 质量分数均 $\geq 98\%$ 。氯化钠注射液, 批号 2007091901, 购自石家庄四药有限公司。无水碳酸钠 (批号 20191019)、盐酸 (批号 20190426), 均分析纯, 购自北京化工厂。乙腈 (批号 164793)、甲醇 (批号 165503), 均为色谱级, 购自美国赛默飞

世尔科技公司。

1.3 动物

健康雄性新西兰兔 6 只, 体质量 2.0~2.5 kg, 由中国食品药品检定研究院提供, 动物许可证号 SYXK(京)2017-0005, 适应性饲养 3 d 后进行试验。SPF 级健康 BALB/c 系小鼠, 雌雄各半, 体质量 (20±2) g, 购自斯贝福北京动物科技有限公司, 动物许可证号 SYXK(京)2020-0033, 适应性喂养 7 d 后开始实验。SPF 级健康雄性 C₅₇BL/6 系小鼠, 体质量 (20±2) g, 购自斯贝福北京动物科技有限公司, 动物许可证号 SYXK(京)2020-0033。本研究通过北京中医药大学实验动物伦理委员会的批准, 批准号 BUCM-4-2022092704-3106。

2 方法与结果

2.1 酒黄精炮制工艺

取 100 g 黄精原药材, 加 20 g 黄酒拌匀(黄酒用量按照《中国药典》2020 年版^[1]黄精项下酒黄精饮片, “每 100 kg 黄精, 用黄酒 20 kg”), 润制一定时间, 置于高压灭菌器中在一定蒸制压力下蒸制一定时间后, 常压焖制一定时间, 稍晾, 切厚片(2~4 mm), 60 ℃ 鼓风干燥, 即得酒黄精饮片。

2.2 黄精多糖含量测定

依据《中国药典》2020 年版一部黄精项下黄精多糖测定方法进行测定^[1]。

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取无水葡萄糖对照品适量, 加水溶解, 配制成质量浓度为 0.33 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取黄精不同炮制品细粉 0.25 g, 置圆底烧瓶中, 加 80%乙醇 150 mL, 置水浴中加热回流 1 h, 趁热滤过, 残渣用 80%热乙醇洗涤 3 次, 每次 10 mL, 将残渣及滤纸置烧瓶中, 加水 150 mL, 置沸水浴中加热回流 1 h, 趁热滤过, 残渣及烧瓶用热水洗涤 4 次, 每次 10 mL, 合并滤液与洗液, 放冷, 转移至 250 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

2.2.3 线性关系考察 精密量取对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL, 分别置 10 mL 具塞刻度试管中, 各加水至 2.0 mL, 摇匀, 在冰水浴中缓缓滴加 0.2%蒽酮-硫酸溶液至刻度, 混匀, 放冷后置水浴中保温 10 min, 取出, 立即置冰水浴中冷却 10 min, 取出, 以相应试剂为空白, 测定待测溶液的吸光度(*A*)值。以 *A* 值为纵坐标(*Y*), 质量浓度为横坐标(*X*), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得到

无水葡萄糖对照品线性回归方程为 $Y=0.007\ 5\ X+0.045\ 7$, $R^2=0.999\ 5$ 。结果表明, 无水葡萄糖在 16.50~99.20 μg/mL 与 *A* 值呈良好的线性关系。

2.2.4 样品测定 精密称取黄精不同炮制品粉末, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 精密量取 1 mL, 置 10 mL 具塞干燥试管中, 按照“2.2.3”项下方法测定 *A* 值, 根据标准曲线计算供试品溶液中多糖含量。

2.3 薯蓣皂苷元的含量测定^[17-21]

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取薯蓣皂苷元对照品适量, 加甲醇溶解, 配制成质量浓度为 0.41 mg/mL 的对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取过 4 号筛的黄精不同炮制品粉末 2 g, 置于锥形瓶中, 加 50 mL 无水乙醇, 称定质量, 水浴回流提取 4 h, 放置室温后再次称定质量, 用无水乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过。取续滤液 20 mL, 旋干, 残渣加 3 mol/L 的盐酸溶液 80 mL, 沸水浴水解 4 h, 冷却后分别用 20、10、10 mL 石油醚萃取 3 次, 合并萃取液, 加 20 mL 水洗涤 2 次, 减压浓缩后留取残渣, 加甲醇溶解定容至 1 mL 量瓶中, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.3.3 色谱条件 色谱柱为 GL Science Incnsil ODS-3 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (94:6); 检测波长 203 nm; 体积流量 1 mL/min; 柱温 25 ℃; 进样量 10 μL。对照品和样品的色谱图见图 1。

2.3.4 线性关系考察 取“2.3.1”项下薯蓣皂苷元对照品, 稀释成不同质量浓度梯度的系列对照品溶液, 按照“2.3.3”项下色谱条件进行测定, 以峰面积积分值为纵坐标(*Y*), 质量浓度为横坐标(*X*), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得薯蓣皂苷元线性

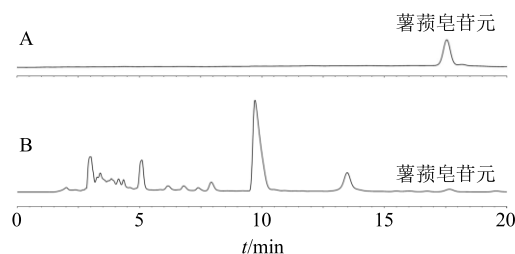


图1 薯蓣皂苷元对照品 (A) 及酒黄精样品 (BBD-RSM 试验第 19 号, B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of diosgenin reference substance (A) and wine-processed *Polygonati Rhizoma* (wpPR) sample (No. 19 of BBD-RSM test, B)

回归方程为 $Y=3.7384X+23.2560$, $R^2=0.9993$, 结果表明薯蓣皂苷元在 $1.71\sim 16.80\text{ }\mu\text{g/mL}$ 与峰面积积分值线性关系良好。

2.3.5 精密度考察 取“2.3.1”项下薯蓣皂苷元对照品溶液, 按照“2.3.3”项下色谱条件连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算其 RSD 值为 0.75%, 表明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性考察 精密称定 BBD-RSM 试验第 19 号酒黄精样品粉末 6 份, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.3.3”项下色谱条件测定峰面积, 计算薯蓣皂苷元质量分数的 RSD 值为 2.10%, 重复性良好。

2.3.7 稳定性考察 精密称定 BBD-RSM 试验第 19 号酒黄精样品粉末, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.3.3”项下色谱条件分别在制备后 0、2、4、6、8、10、12 h 进样, 测定峰面积, 计算其 RSD 值为 1.81%, 表明供试品溶液在 12 h 内具备良好的稳定性。

2.3.8 加样回收率考察 取已测知薯蓣皂苷元含量的 BBD-RSM 试验第 19 号酒黄精样品粉末, 精密称定, 共 6 份, 根据样品中薯蓣皂苷元的含量, 按 1:1 的比例加入薯蓣皂苷元对照品, 按“2.3.2”项下方法操作, 制备 6 份供试品溶液, 按“2.3.3”项下色谱条件测定, 计算加样回收率, 结果平均加样回收率为 98.45%, RSD 值为 2.42%, 表明该方法加样回收率符合规定。

2.3.9 样品测定 精密称取黄精不同炮制品粉末, 按照“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.3.3”项下色谱条件测定各样品中薯蓣皂苷元的含量。

2.4 5-HMF 的含量测定^[22-24]

2.4.1 对照品溶液的制备 精密称取 5-HMF 对照品适量, 用 50% 甲醇溶解并稀释, 制得质量浓度为 0.40 mg/mL 的对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备 精密称取过 3 号筛的黄精不同炮制品粉末 1 g, 置具塞锥形瓶中, 加入 50% 甲醇 25 mL, 在 100 W、50 kHz 的超声条件下提取 25 min, 取出放凉, 用 50% 甲醇补足缺失的质量, 滤过, 取续滤液, 过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜, 即得。

2.4.3 色谱条件 色谱柱为 Agilent Extend-C₁₈ ($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 流动相为甲醇-水 (10:90); 检测波长 285 nm; 体积流量 1 mL/min ; 柱温 $30\text{ }^\circ\text{C}$; 进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。色谱图见图 2。

2.4.4 线性关系考察 精密吸取“2.4.1”项下对照

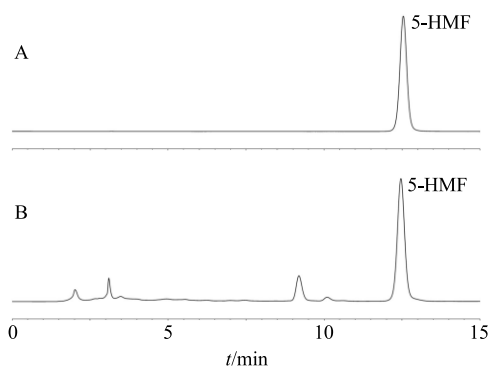


图 2 5-HMF 对照品 (A) 及酒黄精样品 (BBD-RSM 试验第 19 号, B) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of 5-HMF reference substance (A) and wpPR sample (No. 19 of BBD-RSM test, B)

品溶液, 稀释成不同质量浓度梯度的系列对照品溶液, 按照“2.4.3”项下色谱条件分别测定峰面积, 以峰面积积分值为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 所得线性回归方程为 $Y=1\,220.68X-1.50$, $R^2=0.9994$, 结果表明 5-HMF 在 $0.02\sim 0.40\text{ mg/mL}$ 内进样量与峰面积呈良好的线性关系。

2.4.5 精密度考察 取“2.4.1”项下的 5-HMF 对照品溶液, 按照“2.4.3”项下色谱条件操作, 连续进样 6 次, 测定 5-HMF 峰面积, 计算得其 RSD 值为 1.63%, 结果表明仪器精密度良好。

2.4.6 重复性考察 精密称定 BBD-RSM 试验第 19 号酒黄精样品粉末 6 份, 按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.4.3”项下色谱条件测定峰面积, 计算得 5-HMF 质量分数的 RSD 值为 1.61%, 色谱条件重复性良好。

2.4.7 稳定性考察 精密称定 BBD-RSM 试验第 19 号酒黄精样品粉末, 按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.4.3”项下色谱条件分别在制备后 0、2、4、6、8、10、12 h 进样, 测定峰面积, 计算其 RSD 值为 1.65%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4.8 加样回收率考察 取已测知 5-HMF 含量的 BBD-RSM 试验第 19 号酒黄精样品, 精密称定, 共 6 份, 根据样品中 5-HMF 的含量, 按 1:1 的比例加入 5-HMF 对照品, 按“2.4.2”项下方法操作, 制备 6 份供试品溶液, 按“2.4.3”项下色谱条件测定, 计算得 5-HMF 的平均加样回收率为 98.770%, RSD 值为 1.82%, 方法加样回收率良好。

2.4.9 样品测定 精密称取黄精不同炮制品粉末,

按照“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.4.3”项下色谱条件测定各样品中 5-HMF 的含量。

2.5 浸出物的含量测定

参照《中国药典》2020 年版^[1]浸出物测定法(通则 2201)中的热浸法,测定水溶性浸出物及醇溶性浸出物含量。

2.6 酒黄精炮制工艺的单因素试验

酒制法是黄精的传统炮制方法,也是现行药典中规定的炮制方法。《中国药典》2020 年版收载的酒黄精炮制方法为“每 100 kg 黄精,用黄酒 20 kg,照酒炖法或酒蒸法炖透或蒸透,稍晾,切厚片,干燥”^[1],但具体参数缺乏量化指标。研究发现,润制时间、蒸制压力、蒸制时间、焖制时间等因素均对酒黄精的质量产生一定影响^[5-7,25]。因此,本实验选择润制时间、蒸制压力、蒸制时间、焖制时间作为酒黄精炮制工艺的考察因素,以酒黄精性状以及黄

精多糖、薯蓣皂苷元、水溶性浸出物、醇溶性浸出物和 5-HMF 含量作为评价指标,进行单因素考察研究。

2.6.1 不同润制时间考察 称取黄精原药材 4 份,每份 100 g,在 20%的加黄剂量下分别润制 3、4、5、6 h,置于高压蒸汽灭菌锅中,在 0.04 MPa 压力下,蒸制 2 h,焖制 8 h。按照《中国药典》2020 年版酒黄精饮片性状项下规定:“表面棕褐色至黑色,有光泽,中心棕色至浅褐色,可见筋脉小点,质较柔软。味甜,微有酒香气”^[1],进行性状鉴别,并依次测定黄精多糖、薯蓣皂苷元、水浸出物、醇浸出物和 5-HMF 含量,结果见表 1。润制时间为 4 h 时,酒黄精饮片性状与《中国药典》2020 年版描述一致,黄精多糖、薯蓣皂苷元含量最高,因此,在进行后续 BBD-RSM 设计时,选择 4 h 作为润制时间的中心点。

表 1 不同润制时间对酒黄精性状和评价指标含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of different moistening time on properties and content of evaluation index of wpPR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

润制时间/h	颜色	气味	口感	醇浸出物/%	水浸出物/%	黄精多糖/(mg·g ⁻¹)	薯蓣皂苷元/(μg·g ⁻¹)	5-HMF/(mg·g ⁻¹)
3	黑褐色	略有酒香气	味甜微苦	65.51±0.61	68.16±1.20	48.58±0.06	31.42±0.72	0.70±0.01
4	亮黑色	有酒香气	味甜微苦	56.08±0.48	59.28±1.37	61.16±0.03	58.09±1.00	2.03±0.32
5	棕褐色	略有酒香气	味甜	70.29±0.99	70.62±0.98	47.36±0.05	27.84±0.16	0.31±0.01
6	棕褐色	略有酒香气	味甜微苦	64.34±0.17	64.34±1.72	44.89±0.05	30.31±0.76	0.49±0.01

2.6.2 不同蒸制压力考察 称取黄精原药材 4 份,每份 100 g,在 20%的加黄剂量下润制 4 h,置于高压蒸汽灭菌锅中,分别在 0.02、0.04、0.06、0.08 MPa 压力下,蒸制 2 h,焖制 8 h,进行性状鉴别,并依次测定黄精多糖、薯蓣皂苷元、水浸出物、醇浸出物和 5-HMF 含量,结果见表 2。蒸制压力为 0.04 MPa 时,酒黄精饮片性状与《中国药典》2020 年版描述一致,黄精多糖最高,薯蓣皂苷元、醇浸出物和水浸出物较高。因此,在进行后续 BBD-RSM 设计时,选择 0.04 MPa 作为蒸制压力的中心点。

2.6.3 不同蒸制时间考察 称取黄精原药材 4 份,每份 100 g,在 20%的加黄剂量下润制 4 h,置于高

压蒸汽灭菌锅中,在 0.04 MPa 压力下,分别蒸制 1、2、3、4 h,焖制 8 h,进行性状鉴别,并依次测定黄精多糖、薯蓣皂苷元、水浸出物、醇浸出物和 5-HMF 含量,结果见表 3。蒸制时间为 2 h 时,酒黄精饮片性状与《中国药典》2020 年版描述一致,薯蓣皂苷元、水浸出物最高,黄精多糖、醇浸出物较高。因此,选择 2 h 为后续 BBD-RSM 设计中蒸制时间的中心点。

2.6.4 焖制时间考察 称取黄精原药材 4 份,每份 100 g,在 20%的加黄剂量下润制 4 h,置于高压蒸汽灭菌锅中,在 0.04 MPa 压力下,蒸制 2 h,分别焖制 7、8、9、10 h,进行性状鉴别,并依次测定黄

表 2 不同蒸制压力对酒黄精性状和评价指标含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of different steaming pressures on properties and content of evaluation index of wpPR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

蒸制压力/MPa	颜色	气味	口感	醇浸出物/%	水浸出物/%	黄精多糖/(mg·g ⁻¹)	薯蓣皂苷元/(μg·g ⁻¹)	5-HMF/(mg·g ⁻¹)
0.02	棕褐色	略有酒香气	味甜	62.04±0.57	62.81±0.62	59.43±0.01	51.30±0.80	0.86±0.01
0.04	亮黑色	有酒香气	味甜微苦	56.08±0.48	59.28±1.37	61.16±0.03	58.09±1.00	2.03±0.03
0.06	亮黑色	略有酒香气	味甜微苦	52.54±0.79	54.67±1.24	59.33±0.04	58.09±0.82	1.63±0.03
0.08	亮黑色	略有酒香气	味甜微苦	58.81±0.83	63.79±0.87	53.14±0.03	49.58±23.05	3.75±0.04

表 3 不同蒸制时间对酒黄精性状和评价指标含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Effect of different steaming time on properties and content of evaluation index of wpPR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

蒸制时间/h	颜色	气味	口感	醇浸出物/%	水浸出物/%	黄精多糖/(mg·g ⁻¹)	薯蓣皂苷元/(μg·g ⁻¹)	5-HMF/(mg·g ⁻¹)
1	亮黑色	略有酒香气	味甜微苦	57.04±0.08	58.34±1.02	52.09±0.03	36.61±0.98	0.49±0.01
2	亮黑色	有酒香气	味甜微苦	56.08±0.48	59.28±1.37	61.16±0.03	58.09±1.00	2.03±0.03
3	黑褐色	略有酒香气	味甜微苦	52.20±1.10	58.95±1.39	62.53±0.02	27.90±0.15	1.68±0.02
4	亮黑色	略有酒香气	味甜微苦	59.12±0.95	55.67±1.20	50.37±0.04	45.59±0.61	2.33±0.05

精多糖、薯蓣皂苷元、水浸出物、醇浸出物和 5-HMF 含量, 结果见表 4。结果表明, 焖制时间为 8 h 时, 酒黄精饮片性状与《中国药典》2020 年版描述一致, 黄精多糖、醇浸出物含量最高, 水浸出物和薯蓣皂苷元较高。因此, 选择 8 h 为后续 BBD-RSM 设计中焖制时间的中心点。

2.7 基于 AHP-熵权法结合 BBD-RSM 法优化酒黄精炮制工艺

2.7.1 AHP 法计算各评价指标的权重系数^[26-27]

本实验以黄精多糖、醇溶性浸出物、水溶性浸出物、5-HMF、薯蓣皂苷元含量为评价指标, 根据影响酒黄精指标间的相互关系及重要程度, 确定各指标先后顺序: 黄精多糖>醇浸出物=水浸出物>5-HMF>薯蓣皂苷元。采用 1-9 标度法构成评价指标两两比较的优先矩阵, 并计算各指标权重系数 (W_{j1}), 结果见表 5。

2.7.2 AHP-熵权法计算复合权重^[26,28-29] 根据熵权法公式计算权重系数 (W_{j2}), 醇浸出物、水浸出物、

表 4 不同焖制时间对酒黄精性状和评价指标含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Effect of different braising time on properties and content of evaluation index of wpPR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

焖制时间/h	颜色	气味	口感	醇浸出物/%	水浸出物/%	黄精多糖/(mg·g ⁻¹)	薯蓣皂苷元/(μg·g ⁻¹)	5-HMF/(mg·g ⁻¹)
7	亮黑色	略有酒香气	味甜微苦	52.53±0.83	60.74±1.69	50.97±0.06	73.64±1.44	0.89±0.01
8	亮黑色	有酒香气	味甜微苦	56.08±0.48	59.28±1.37	61.16±0.03	58.09±1.00	2.03±0.03
9	黑褐色	略有酒香气	味甜微苦	46.48±0.50	50.22±0.62	51.38±0.05	70.92±0.13	1.48±0.01
10	亮黑色	略有酒香气	味甜微苦	54.51±0.69	58.17±0.93	57.98±0.03	26.31±0.42	1.51±0.02

表 5 指标成对比较的判断优先矩阵

Table 5 Decision matrix of paired comparison on indexes

权重指标	醇浸出物	水浸出物	黄精多糖	薯蓣皂苷元	5-HMF	W_{j1}
醇浸出物	1	1	1/2	3	2	0.21
水浸出物	1	1	1/2	3	2	0.21
黄精多糖	2	2	1	6	4	0.41
薯蓣皂苷元	1/3	1/3	1/6	1	2/3	0.07
5-HMF	1/2	1/2	1/4	3/2	1	0.10

黄精多糖、薯蓣皂苷元、5-HMF 的权重系数 W_{j2} 分别为 0.131 7、0.152 4、0.175 0、0.374 9、0.166 0。根据公式计算复合权重 W_j , 醇浸出物、水浸出物、黄精多糖、薯蓣皂苷元、5-HMF 的复合权重 W_j 依次为 0.156 3、0.181 0、0.415 7、0.148 4、0.098 6。

$$W_j = W_{j1} W_{j2} / \sum_{j=1}^m W_{j1} W_{j2}$$

2.7.3 综合评分计算^[26,30-31] 按公式计算酒黄精各指标成分的综合评分。

$$Y = \sum_{i=1}^m (100 W_j X_i) / X_{j\max}$$

X_j 为各指标含量, $X_{j\max}$ 为各指标含量最大值

2.7.4 BBD-RSM 试验设计及结果 根据单因素试验考察结果, 选择润制时间 (X_1)、蒸制时间 (X_2)、蒸制压力 (X_3) 和焖制时间 (X_4) 4 个因素为自变量, 以黄精多糖、薯蓣皂苷元、水浸出物、醇浸出物和 5-HMF 含量综合评分为因变量, 采用 4 因素 3 水平的 BBD-RSM 设计方法, 考察各因素对酒黄精炮制工艺的影响。每个因素设置高、中、低 3 个水平, 分别记作-1、0、+1, 利用 Design-Expert 11 软件进行多元回归拟合, BBD-RSM 因素水平、试验设计及结果见表 6。

表 6 BBD-RSM 因素水平、试验设计及结果

Table 6 Level of factors, test design and results of BBD-RSM

序号	X_1/h	X_2/h	X_3/MPa	X_4/h	醇浸出物/%	水浸出物/%	黄精多糖/($mg \cdot g^{-1}$)	薯蓣皂苷元/($\mu g \cdot g^{-1}$)	5-HMF/($mg \cdot g^{-1}$)	综合评分
1	5 (+1)	2 (0)	0.04 (0)	9 (+1)	62.39	61.72	26.25	18.60	1.03	55.18
2	4 (0)	3 (+1)	0.04 (0)	7 (-1)	70.30	67.95	18.77	18.30	1.41	56.09
3	3 (-1)	1 (-1)	0.04 (0)	8 (0)	67.50	66.49	38.53	9.78	0.50	57.37
4	5 (+1)	3 (+1)	0.04 (0)	8 (0)	68.39	66.48	42.75	10.13	0.33	58.78
5	4 (0)	2 (0)	0.02 (-1)	9 (+1)	62.37	58.59	47.51	16.14	0.37	60.76
6	4 (0)	1 (-1)	0.04 (0)	9 (+1)	59.21	57.16	50.84	16.05	0.41	61.61
7	4 (0)	2 (0)	0.06 (+1)	9 (+1)	62.03	60.17	46.80	15.68	0.52	61.63
8	5 (+1)	2 (0)	0.02 (-1)	8 (0)	53.47	55.57	51.89	15.12	1.06	61.93
9	4 (0)	3 (+1)	0.06 (+1)	8 (0)	55.92	54.16	53.24	14.72	0.87	61.94
10	4 (0)	1 (-1)	0.02 (-1)	8 (0)	67.66	63.27	47.12	13.63	0.40	62.00
11	3 (-1)	2 (0)	0.04 (0)	7 (-1)	62.05	61.41	36.82	16.44	2.47	63.22
12	5 (+1)	2 (0)	0.06 (+1)	8 (0)	59.60	60.65	49.62	17.09	0.63	63.22
13	3 (-1)	2 (0)	0.04 (0)	9 (+1)	44.74	49.21	63.21	15.08	1.11	63.74
14	5 (+1)	2 (0)	0.04 (0)	7 (-1)	60.98	59.70	48.17	15.42	1.66	65.01
15	4 (0)	2 (0)	0.02 (-1)	7 (-1)	64.00	63.07	60.28	10.69	0.39	65.82
16	3 (-1)	2 (0)	0.06 (+1)	8 (0)	59.48	66.38	65.14	9.41	0.32	67.06
17	4 (0)	3 (+1)	0.04 (0)	9 (+1)	66.84	69.00	50.25	24.69	0.65	71.26
18	4 (0)	2 (0)	0.06 (+1)	7 (-1)	65.64	63.23	70.78	8.67	1.01	72.05
19	4 (0)	2 (0)	0.04 (0)	8 (0)	56.50	58.30	61.46	19.40	2.01	72.82
20	5 (+1)	1 (-1)	0.04 (0)	8 (0)	63.36	60.90	60.73	21.60	1.02	72.88
21	3 (-1)	3 (+1)	0.04 (0)	8 (0)	56.18	58.70	61.20	19.59	2.02	73.27
22	3 (-1)	2 (0)	0.02 (-1)	8 (0)	56.08	58.28	61.20	20.52	2.00	73.57
23	4 (0)	2 (0)	0.04 (0)	8 (0)	67.57	65.49	55.92	28.89	0.15	73.72
24	4 (0)	1 (-1)	0.06 (+1)	8 (0)	55.55	60.84	60.84	20.61	2.07	74.19
25	4 (0)	3 (+1)	0.02 (-1)	8 (0)	56.08	59.28	61.09	21.59	2.04	74.41
26	4 (0)	1 (-1)	0.04 (0)	7 (-1)	65.49	66.13	72.41	16.65	0.50	76.02
27	4 (0)	2 (0)	0.04 (0)	8 (0)	59.29	56.88	65.24	15.05	3.12	76.31
28	4 (0)	2 (0)	0.04 (0)	8 (0)	66.75	66.10	75.75	10.23	1.09	76.40
29	4 (0)	2 (0)	0.04 (0)	8 (0)	64.91	63.12	88.49	21.49	1.13	86.68

2.7.5 模型拟合 采用 Design Expert 11 软件对比各模型拟合参数, 建立醇浸出物、水浸出物、黄精多糖、薯蓣皂苷元和 5-HMF 的综合评分 (Y) 对润制时间 (X_1)、蒸制时间 (X_2)、蒸制压力 (X_3) 和焖制时间 (X_4) 的二次回归模型方程: $Y=77.19-1.77 X_1-0.69 X_2+0.13 X_3-2.00 X_4-7.50 X_1 X_2+1.95 X_1 X_3-2.59 X_1 X_4-6.17 X_2 X_3+7.39 X_2 X_4-1.34 X_3 X_4-7.23 X_1^2-4.16 X_2^2-4.31 X_3^2-7.59 X_4^2$, 二项式拟合方程的 $R^2=0.852 1$, $P=0.001 2<0.01$, 失拟项 $P=0.902 2>0.05$, 表明二次多项式回归模型拟合度较高, 可靠性较强。因此, 选用该模型对酒黄精炮制

工艺进行预测和分析具有一定的合理性和可行性。该回归模型中 $X_1 X_2$ 、 $X_2 X_3$ 、 $X_2 X_4$ 、 X_1^2 、 X_4^2 项的 $P<0.01$, 表明因素 X_1 与因素 X_4 对综合评分的线性效应应具有统计学意义, 因素 X_2 与因素 X_1 、 X_3 、 X_4 之间均有显著的交互作用。结果见表 7。

2.7.6 最佳工艺条件的预测 采用 Design-Expert 11 软件, 根据拟合方程预测酒黄精炮制工艺的最佳条件, 同时绘制 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 对综合评分的响应面图, 具体见图 3。以综合评分最大值为优化目标, 预测的最优炮制工艺为润制时间 4.68 h、蒸制时间 1 h、蒸制压力 0.06 MPa、焖制时间 7.18 h, 根据试

表 7 二次多项式方程模型方差分析

Table 7 Variance analysis of quadratic polynomial equation model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
回归模型	1 378.78	14	98.49	5.76	0.00	极显著	X_3X_4	7.17	1	7.17	0.42	0.53	
X_1	37.60	1	37.60	2.20	0.16		X_1^2	339.28	1	339.28	19.85	0.00	
X_2	5.77	1	5.77	0.34	0.57		X_2^2	112.09	1	112.09	6.56	0.02	
X_3	0.22	1	0.22	0.01	0.91		X_3^2	120.58	1	120.58	7.05	0.02	
X_4	48.07	1	48.07	2.81	0.12		X_4^2	373.32	1	373.32	21.84	0.00	
X_1X_2	224.98	1	224.98	13.16	0.00		剩余	239.29	14	17.09			
X_1X_3	15.21	1	15.21	0.89	0.36		失拟项	116.57	10	11.66	0.38	0.90	不显著
X_1X_4	26.77	1	26.77	1.57	0.23		误差	122.72	4	30.68			
X_2X_3	152.16	1	152.16	8.90	0.01		总和	1 618.10	28				
X_2X_4	218.63	1	218.63	12.79	0.00								

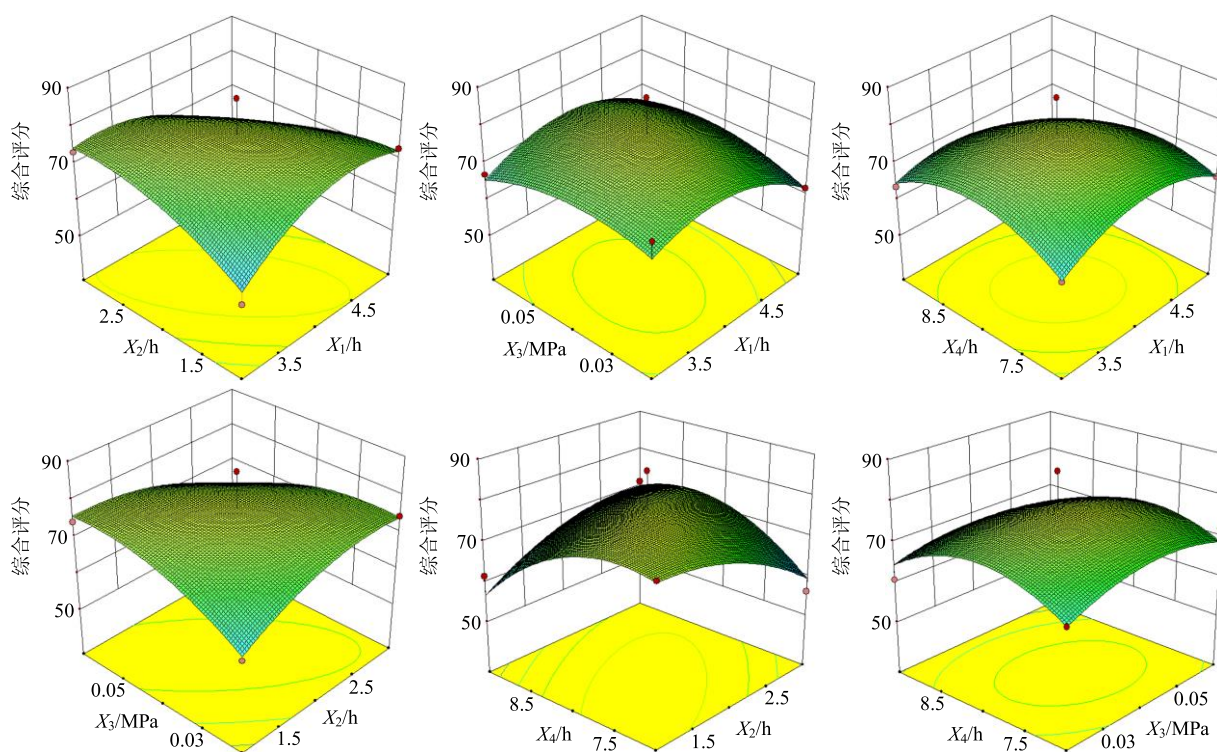


图 3 各因素交互作用的三维响应面图

Fig. 3 3D response surface of interaction between various factors

验结果结合生产实际, 确定酒黄精最佳炮制工艺为润制时间 5 h、蒸制时间 1 h、蒸制压力 0.06 MPa、焖制时间 7 h。

2.7.7 验证试验 根据优选出的酒黄精最佳炮制工艺, 每 100 克黄精原药材, 加 20 g 黄酒拌匀, 润制 5 h, 置于高压灭菌器中在 0.06 MPa 蒸制压力下蒸制 1 h 后, 常压焖制 7 h, 稍晾, 切厚片 (2~4 mm), 60 °C 鼓风干燥, 炮制 3 批酒黄精饮片, 测定醇浸出物、水浸出物、黄精多糖、薯蓣皂苷元和 5-HMF 的含量, 实验结果见表 8, 可知, 3 批酒黄精饮片的综

合评分分别为 82.00、82.91、83.76, 平均综合评分为 82.89, RSD=1.06%, 预测值为 82.73, 即综合评分实际值与预测值的偏差控制在 ±3% 以内, 说明酒黄精炮制工艺进行响应面优化具有一定的稳定性和可靠性, 能制备出品质优良、质量稳定可控的酒黄精饮片。

2.8 黄精酒制前后刺激性比较

2.8.1 供试药物制备方法 取生黄精饮片适量, 加 10 倍体积的蒸馏水回流提取 3 次, 每次 1 h, 趁热滤过, 将滤液合并浓缩至 1.0 g/mL, 给药前用蒸馏

表 8 验证试验结果

Table 8 Validation of experimental results

序号	醇浸出物/%	水浸出物/%	黄精多糖/(mg·g ⁻¹)	薯蓣皂苷元/(μg·g ⁻¹)	5-HMF/(mg·g ⁻¹)	综合评分	预测值	偏差/%	RSD/%
1	62.60	61.60	80.56	23.67	0.31	82.00	82.73	-0.89	1.06
2	63.50	63.75	80.77	22.93	0.38	82.91		0.21	
3	64.02	61.32	80.21	22.75	0.65	83.76		1.24	

水稀释到所需质量浓度,即得生黄精提取液,于 4 ℃ 保存备用。取最佳炮制工艺制备的酒黄精饮片适量,按上述方法制备即得酒黄精提取液。

2.8.2 分组与给药 取雄性新西兰兔 6 只,适应性饲养 3 d 后,给药前检查家兔双眼角膜、虹膜及结膜的情况,如有病变者剔除不用。分别取“2.8.1”项下生黄精和酒黄精提取液的稀释液(0.5 g/mL) 0.1 mL,采用自身对照法,将提取液滴入一侧兔眼结膜囊内,作用时间 10 s,2 min 后立即取生理盐水冲洗,另一侧兔眼滴加等量生理盐水作为对照,观察记录兔眼角膜、虹膜、结膜等局部反应及恢复情况,按照 Draize 评分标准判断生黄精和酒黄精提取液对兔眼的刺激^[32-33]。

2.8.3 结果 生黄精提取液和酒黄精提取液对兔眼的刺激强度评分结果见图 4,结果表明,与空白对照组相比,生黄精组对兔眼的刺激性作用较明显,主要表现为血管充血,虹膜和角膜部位均出现炎症、水肿现象。酒黄精组均未见明显结膜充血、结膜水肿、虹膜损害和角膜损害等现象,各组均未见其他毒性反应。



图 4 家兔眼刺激性实验结果

Fig. 4 Results of eye irritation test in rabbits

2.9 黄精酒制前后对免疫调节作用影响研究

2.9.1 供试药物制备方法 提取液的制备同“2.8.1”项下方法。

2.9.2 动物分组及给药处理方法 取 BALB/c 系小鼠,适应性喂养 1 周后,随机分为空白对照组、模型对照组、阳性对照组和生黄精低、中、高剂量组及酒黄精低、中、高剂量组,每组 6 只。按照小鼠与成人体表面积换算方法进行剂量换算^[34-35],设置生黄精和酒黄精低、中、高 3 个剂量组,剂量分别为 2.5、5.0、10.0 g/kg。除空白组注射生理盐水外,

其余组均 ip 80 mg/kg 环磷酰胺 3 d,建立小鼠免疫抑制模型。造模完成后,空白组和模型组 ig 生理盐水,阳性药组 ig 剂量 40 mg/kg 的盐酸左旋咪唑,给药组按照不同的剂量 ig,每日 1 次,连续 20 d。

2.9.3 脏器指数测定^[36-37] 将各组小鼠处死并解剖,取出脾脏和胸腺,用生理盐水清洗并用滤纸将表面血迹吸干,准确称定质量,分别计算脾脏指数和胸腺指数。

脾脏指数=脾脏质量/体质量

胸腺指数=胸腺质量/体质量

黄精酒制前后对免疫抑制小鼠胸腺指数、脾脏指数的影响见表 9。与空白对照组比较,模型对照组小鼠胸腺指数、脾脏指数均显著降低($P<0.01$),结合模型对照组小鼠的行为表现及相关形态,说明实验已成功构建小鼠免疫抑制模型。与模型对照组比较,阳性对照组小鼠的脾脏指数、胸腺指数明显升高($P<0.01$)。不同剂量的生黄精、酒黄精组的胸腺指数呈剂量相关性升高,其中酒黄精中、高剂量组还能显著升高胸腺和脾脏指数($P<0.01$)。同

表 9 小鼠免疫脏器指数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 9 Immune organ index of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	胸腺指数/ (mg·g ⁻¹)	脾脏指数/ (mg·g ⁻¹)
空白对照	—	1.537±0.151	4.191±0.199
模型对照	—	1.200±0.085**	3.446±0.215**
阳性对照	0.04	1.449±0.080 ^{##}	3.859±0.081 ^{##}
生黄精	2.5	1.361±0.109 [#]	3.461±0.178
	5.0	1.387±0.083 ^{##}	3.535±0.164
	10.0	1.416±0.042 ^{##}	3.701±0.215
酒黄精	2.5	1.386±0.092 ^{##}	3.652±0.226 [▲]
	5.0	1.429±0.118 ^{##}	3.769±0.063 ^{##▲}
	10.0	1.458±0.050 ^{##}	3.807±0.288 ^{##}

与空白对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型对照组比较: * $P<0.05$

^{##} $P<0.01$; 与生黄精同等给药剂量组比较: [▲] $P<0.05$ ^{▲▲} $P<0.01$, 下表同

** $P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group; [▲] $P<0.05$ ^{▲▲} $P<0.01$ vs equal dosage group of Polygonati Rhizoma, same as below tables

时, 酒黄精低、中剂量组与生黄精低、中剂量组相比, 脾脏指数具有显著性差异 ($P<0.05$)。综上所述, 生黄精组和酒黄精组均可提高小鼠的胸腺指数和脾脏指数, 且提高效果随着给药浓度的增加而增强, 同等给药剂量, 酒黄精组小鼠的胸腺指数、脾脏指数均高于生黄精组, 提示酒黄精可明显提高动物免疫器官功能水平, 且效果优于生黄精。

2.9.4 外周血细胞测定^[38-39] 眼眶取血, 精密移取 20 μL , 用血液分析仪测定全血红细胞 (RBC)、白细胞 (WBC)、血红蛋白 (HGB) 和血小板 (PLT) 值。黄精酒制前后对免疫抑制小鼠外周血细胞的影响见表 10。与空白对照组比较, 模型对照组小鼠 WBC、RBC、HGB 和 PLT 均显著降低 ($P<0.01$)。

与模型对照组比较, 阳性对照组 WBC、RBC、HGB 和 PLT 显著升高 ($P<0.01$); 生黄精低剂量组小鼠 WBC、RBC 显著升高 ($P<0.01$); 生黄精中剂量组 WBC、RBC、PLT 显著升高 ($P<0.01$); 生黄精高剂量组 WBC、RBC、HGB 和 PLT 均显著升高 ($P<0.01$); 酒黄精低剂量组 WBC、RBC 和 HGB 显著升高 ($P<0.05$); 酒黄精中、高剂量组 WBC、RBC、HGB 和 PLT 均显著升高 ($P<0.01$ 、 0.05)。同时, 酒黄精低、中、高剂量组与生黄精低、中、高剂量组相比较 WBC、HGB 有显著性差异 ($P<0.05$)。以上结论提示酒黄精可明显增加免疫抑制模型小鼠的外周血细胞, 且效果优于生黄精。

2.9.5 碳廓清试验 于最后一次给药 1 h 后, 将印

表 10 小鼠外周血白细胞、红细胞、血红蛋白和血小板计数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 10 Counts of WBC, RBC, HGB, and PLT in peripheral blood of mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	WBC/($\times 10^9$ 个·L ⁻¹)	RBC/($\times 10^{12}$ 个·L ⁻¹)	HGB/(g·L ⁻¹)	PLT/($\times 10^9$ 个·L ⁻¹)
空白对照	—	6.450 $\pm$ 0.327	7.553 $\pm$ 0.235	173.500 $\pm$ 3.728	1 169.833 $\pm$ 48.201
模型对照	—	2.100 $\pm$ 0.141**	5.623 $\pm$ 0.134**	144.000 $\pm$ 6.782**	881.000 $\pm$ 50.088**
阳性对照	0.04	3.557 $\pm$ 0.194##	6.920 $\pm$ 0.160##	167.667 $\pm$ 3.933##	1 094.500 $\pm$ 49.919##
生黄精	2.5	2.400 $\pm$ 0.141##	6.650 $\pm$ 0.186##	145.833 $\pm$ 2.229	929.167 $\pm$ 72.430
	5.0	2.583 $\pm$ 0.248##	6.692 $\pm$ 0.154##	148.500 $\pm$ 5.822	967.333 $\pm$ 38.240##
	10.0	3.167 $\pm$ 0.175##	6.825 $\pm$ 0.227##	153.833 $\pm$ 5.307#	1 015.833 $\pm$ 37.477#
酒黄精	2.5	2.767 $\pm$ 0.258##▲	6.672 $\pm$ 0.173##	152.333 $\pm$ 3.445#▲	965.500 $\pm$ 88.600
	5.0	3.133 $\pm$ 0.186##▲	6.723 $\pm$ 0.162##	156.000 $\pm$ 2.828##▲	970.167 $\pm$ 80.253#
	10.0	3.417 $\pm$ 0.194##▲	6.810 $\pm$ 0.107##	161.500 $\pm$ 4.416##▲	1 074.667 $\pm$ 81.259##

度墨汁 (按 1:3 体积比加生理盐水稀释) 注入小鼠尾静脉^[40], 分别于注射后 2 min 和 10 min, 用采血毛细管从眼内眦静脉丛取 20 μL 血样加入配制好的 2 mL 0.1% Na₂CO₃ 溶液中。选择 Na₂CO₃ 溶液作为空白对照, 用酶标仪在 600 nm 处检测 A 值^[41]。不同时间点取样测定值记作 A_1 、 A_2 , 处死小鼠, 解剖取出肝脏和脾脏并称定质量, 按公式计算碳廓清指数 (K) 和吞噬指数 (α)^[42]。

$$K=(\lg A_1-\lg A_2)/(t_2-t_1)$$

$$\alpha=\text{体质量}/(\text{肝质量}+\text{脾质量})\times K^{1/3}$$

黄精酒制前后对免疫抑制小鼠碳粒廓清功能的影响见表 11。与空白对照组比较, 模型对照组小鼠 K 和 α 均显著降低 ($P<0.01$)。与模型对照组比较, 阳性对照组小鼠 K 和 α 均显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。生黄精低、中剂量组 K 均显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), 高剂量组 K 和 α 均显著升高 ($P<0.01$); 酒黄精不同剂量组均能使 K 和 α 显著升高 ($P<0.01$)。同时,

表 11 小鼠碳 K 和 α ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 11 Carbon K and α in mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	K	α
空白对照	—	0.019 $\pm$ 0.001	4.710 $\pm$ 0.063
模型对照	—	0.007 $\pm$ 0.001**	2.727 $\pm$ 0.171**
阳性对照	0.04	0.010 $\pm$ 0.001##	2.985 $\pm$ 0.171#
生黄精	2.5	0.008 $\pm$ 0.001#	2.760 $\pm$ 0.151
	5.0	0.010 $\pm$ 0.001##	2.910 $\pm$ 0.240
	10.0	0.015 $\pm$ 0.001##	3.340 $\pm$ 0.188##
酒黄精	2.5	0.013 $\pm$ 0.001##▲▲	3.280 $\pm$ 0.193##▲▲
	5.0	0.016 $\pm$ 0.001##▲▲	3.309 $\pm$ 0.141##▲▲
	10.0	0.018 $\pm$ 0.001##▲▲	4.012 $\pm$ 0.075##▲▲

酒黄精低、中、高剂量组与生黄精低、中、高剂量组相比较, K 、 α 有显著性差异 ($P<0.01$)。综上所述, 与模型对照组比较, 不同剂量的生黄精组和酒黄精组小鼠的 K 、 α 均有升高, 其中酒黄精可明显

提高免疫抑制小鼠的碳粒廓清功能，且效果优于生黄精。

2.10 黄精酒制前后对降血糖作用影响研究

2.10.1 供试药物制备方法 提取液的制备同“2.8.1”项下方法。

2.10.2 动物分组及给药处理方法 C₅₇BL/6 系小鼠适应性喂养 7 d 后，将小鼠分为空白对照组和造模组，空白对照组饮食正常，造模组饲喂高脂高糖饲料，连续给药 30 d，禁食 12 h 后，造模组 ip 70 mg/kg 剂量 1%链脲佐菌素(溶于 pH 4.4, 0.1 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，现配现用)，72 h 后，断尾取血测定空腹血糖 ≥ 11.1 mmol/L 视为造模成功小鼠，将造模成功的小鼠随机分为模型对照组、阳性对照组和生黄精低、中、高剂量组及酒黄精低、中、高剂量组。空白对照组和模型对照组均 ig 生理盐水，阳性药组按 200 mg/kg 剂量 ig 二甲双胍，生黄精和酒黄精低、中、高剂量组按照不同的剂量 ig，每日 1 次，连续 30 d。

2.10.3 小鼠血糖测定 给药结束后，小鼠采用剪尾的方式取血，利用血糖测定仪进行测定，将测定试纸插入仪器中，试纸自然吸入血样，稳定后读取数值。黄精酒制前后对糖尿病小鼠血糖的影响见表 12。与空白对照组比较，经过高脂饲料联合 STZ 诱导后，模型对照组小鼠的血糖水平显著上升 ($P < 0.01$)；与模型对照组比较，阳性对照组、生黄精和酒黄精不同剂量组的血糖水平表现出降低趋势 ($P < 0.01$ 、 0.05)。

2.10.4 血脂水平测定^[43] 眼眶取血，静置待分层后，离心取血清，采用自动生化分析仪测定总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triacylglycerol, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein

表 12 糖尿病小鼠空腹血糖 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 12 Fasting blood glucose in diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	空腹血糖/(mmol·L ⁻¹)
空白对照	—	6.117±0.194
模型对照	—	17.433±0.528**
阳性对照	0.2	9.550±0.907 ^{##}
生黄精	2.5	16.300±0.490 ^{##}
	5.0	14.717±0.519 ^{##}
	10.0	14.150±0.797 ^{##}
酒黄精	2.5	16.283±0.736 [#]
	5.0	13.950±0.797 ^{##}
	10.0	13.033±0.731 ^{##}

cholesterol, HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 的含量。

黄精酒制前后对糖尿病小鼠血脂的影响见表 13。与空白对照组比较，模型对照组小鼠 TC、LDL-C 和 TG 含量均显著升高 ($P < 0.01$)，HDL-C 含量显著降低 ($P < 0.01$)，说明已成功构建小鼠糖尿病模型。与模型对照组比较，阳性对照组小鼠 TC、LDL-C、TG 含量显著降低，具有统计学意义 ($P < 0.01$)，HDL-C 显著升高 ($P < 0.01$)；同等 5 g/(kg·d) 给药剂量，ig 生黄精和酒黄精提取液的小鼠 TC 含量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)；同等 10 g/(kg·d) 给药剂量，生黄精组小鼠 TC、TG 含量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，酒黄精组小鼠 TC、LDL-C 和 TG 含量显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.05)，HDL-C 含量显著升高 ($P < 0.05$)。同时，与生黄精高剂量组相比，酒黄精高剂量组小鼠 TC、LDL-C 和 TG 含量均有统计学意义 ($P < 0.05$)。综上所述，不同给药剂量的生黄精、酒黄精提取液均可降低小鼠 TC、LDL-C 和 TG

表 13 糖尿病小鼠血脂 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 13 Blood lipids in diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)
空白对照	—	2.498±0.183	3.107±0.178	0.357±0.027	0.822±0.068
模型对照	—	4.235±0.334**	2.508±0.157**	1.838±0.168**	1.990±0.183**
阳性对照	0.2	3.325±0.145 ^{##}	2.893±0.116 ^{##}	0.793±0.072 ^{##}	1.283±0.107 ^{##}
生黄精	2.5	4.095±0.401	2.505±0.183	1.865±0.175	2.030±0.181
	5.0	3.853±0.288 [#]	2.582±0.229	1.815±0.073	1.888±0.182
	10.0	3.690±0.281 [#]	2.622±0.208	1.777±0.063	1.678±0.124 ^{##}
酒黄精	2.5	3.827±0.351	2.608±0.207	1.812±0.103	1.998±0.179
	5.0	3.642±0.139 ^{##}	2.690±0.183	1.702±0.138	1.773±0.161
	10.0	3.405±0.125 ^{##▲}	2.782±0.154 [#]	1.613±0.090 ^{##▲}	1.495±0.138 ^{##▲}

含量,增加 HDL-C 含量,生黄精和酒黄精提取液对 2 型糖尿病小鼠血脂均有一定的改善作用,酒黄精对血脂改善作用优于生黄精。

2.10.5 小鼠脏器指数的测定^[44-45] 将各组小鼠处死并解剖,取出脾脏、肝脏和肾脏,用生理盐水清洗并用滤纸将表面血迹吸干,准确称定质量,按照公式计算脏器指数。

肝脏指数=肝脏质量/体质量

肾脏指数=肾脏质量/体质量

黄精酒制前后对糖尿病小鼠脏器指数的影响见表 14。与空白对照组比较,模型对照组小鼠肝脏指数、肾脏指数和脾脏指数均显著升高 ($P<0.01$),说明糖尿病小鼠出现肝脏肿大、肾脏损伤、水肿,

脾脏体积增大等现象。与模型对照组比较,阳性对照组的脏器指数均显著降低 ($P<0.01$);生黄精高剂量组肝脏指数、脾脏指数显著降低 ($P<0.05$);酒黄精中剂量组能显著降低肝脏指数、肾脏指数和脾脏指数 ($P<0.05$ 、 0.01),高剂量组肾脏指数、脾脏指数显著降低 ($P<0.01$)。

给药剂量为 5 g/(kg·d),酒黄精与生黄精肝脏指数、脾脏指数、肾脏指数有显著性差异 ($P<0.05$);给药剂量为 10 g/(kg·d),黄精酒制前后脾脏指数和肾脏指数有显著性差异 ($P<0.05$),肝脏指数无显著性差异。综上所述,生黄精和酒黄精对脏器指数均有一定的调节作用,酒黄精对胸腺、肾脏和脾脏损伤的抑制作用优于生黄精组。

表 14 糖尿病小鼠脏器指数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 14 Organ index in diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肝脏指数/(mg·g ⁻¹)	肾脏指数/(mg·g ⁻¹)	脾脏指数/(mg·g ⁻¹)
空白对照	—	4.569±0.157	1.307±0.096	0.284±0.024
模型对照	—	5.338±0.349**	1.617±0.101**	0.441±0.036**
阳性对照	0.2	4.654±0.252 ^{##}	1.345±0.114 ^{##}	0.305±0.027 ^{##}
生黄精	2.5	5.222±0.326	1.562±0.088	0.431±0.028
	5.0	5.134±0.244	1.534±0.077	0.414±0.014
	10.0	4.938±0.180 [#]	1.480±0.040	0.398±0.025 [#]
酒黄精	2.5	5.107±0.362	1.510±0.111	0.417±0.032
	5.0	4.283±0.189 ^{##▲}	1.468±0.070 ^{##▲}	0.382±0.031 ^{#▲}
	10.0	4.697±0.382	1.427±0.052 ^{##▲}	0.352±0.025 ^{##▲}

3 讨论

本实验采用 AHP-熵权法结合 BBD-RSM 优化酒黄精炮制工艺参数,可同时兼具决策人的主观判断和待评价各项指标的客观信息^[46],提高了数据的合理性和工艺参数的科学性,可以比较准确地从药效物质的角度更加公正地评价酒黄精工艺的相关参数。验证实验结果表明,在润制时间 5 h、蒸制时间 1 h、蒸制压力 0.06 MPa、闷润时间 7 h 的工艺条件下,酒黄精的指标成分黄精多糖、薯蓣皂苷元、醇浸出物、水浸出物、5-HMF 的平均综合评分为 82.89,与模型理论预测值基本一致,表明该模型准确性高,制备的酒黄精饮片质量稳定,能够较合理地应用于酒黄精炮制工艺的优化,本研究优化的酒黄精炮制工艺只是小试结果,最终的生产工艺仍需要进行中试放大试验进行验证。

黄精生品刺人咽喉,炮制后刺激性减弱,同时能够增强补脾润肺、益肾的作用。在炮制减毒方面,

本研究利用兔眼刺激性试验比较了黄精酒制前后刺激性作用,结果表明,生黄精具有刺激性,酒制后刺激性减弱。有文献认为黏液质是黄精刺激性成分,炮制后黏液质被大量破坏,从而减轻对咽喉的刺激性^[47-48];也有报道炮制后正己醛、茨烯等挥发性成分含量减少,可能是黄精的刺激性成分^[49],但以上均是推测,缺少实验数据证实。胡菊^[14]利用家兔眼刺激性和皮肤刺激性实验筛选出黄精刺激性成分认为可能为黄精针晶,其实验所用的黄精生品由滇黄精鲜品 60 ℃干燥制得,但由于黄精传统加工方法为“黄精鲜品-去杂-洗净-蒸煮-干燥-黄精生品”^[50-52],蒸煮后再干燥的黄精生品是否具有刺激性有待深入研究。

在炮制增效方面,本研究采用 ip 环磷酸胺建立小鼠免疫抑制模型,运用高糖高脂饲料联合小剂量链脲佐菌素构建 2 型糖尿病小鼠模型,比较黄精酒制前后免疫调节和降血糖作用,实验结果表明,黄

精酒制后可以增强免疫调节和降血糖作用。目前,黄精的药效物质基础研究多集中于黄精多糖,《中国药典》2020 年版^[1]也以多糖作为黄精的质量评价指标。由于黄精在炮制过程中发生了美拉德反应,以及多糖发生了水解反应,炮制后多糖含量降低,寡糖和单糖含量升高^[53],并产生了 5-HMF,因此仅以多糖作为质量控制指标并不能完全反映黄精炮制前后的药效差异。寡糖作为糖类研究的重要组成部分,本课题组前期研究发现黄精酒制后多糖含量降低,寡糖含量升高,杨云等^[54]研究发现黄精寡糖具有促进小鼠非特异性免疫的作用,可增强小鼠体液免疫功能,因此有必要对黄精炮制前后寡糖的成分变化和药效进行深入研究,为进一步阐明黄精炮制增效的科学内涵提供研究基础。

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: 319-320.
- [2] 李晶晶, 王洪军, 孟德玉, 等. 黄精炮制的历史沿革研究 [J]. 湖北农业科学, 2020, 59(S1): 171-173.
- [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] 郭信东, 袁小凤, 杨昌贵, 等. 黄精酒制后活性成分的变化研究 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(6): 1366-1368.
- [5] 刘艳艳, 蒋琳, 杨婷宇, 等. 酒黄精现代研究进展 [J]. 广东药科大学学报, 2022, 38(4): 130-134.
- [6] 宋艺君, 郭涛, 马存德, 等. 响应面法优化制黄精高压蒸制工艺研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2018, 20(7): 1261-1267.
- [7] 张婕, 金传山, 吴德玲, 等. 正交试验法优选黄精加压酒蒸工艺研究 [J]. 安徽中医药大学学报, 2014, 33(1): 72-74.
- [8] 王永禄, 王丽瑶, 朱欣佚, 等. 常压蒸制和高压蒸制对酒黄精化学成分的影响研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2014, 34(8): 173-175.
- [9] 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.
- [10] 陈诗丽, 闵可, 杨蓉, 等. 解吸附电晕束电离子谱法快速测定黄精中的薯蓣皂苷元 [J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2022, 45(5): 136-143.
- [11] 王帅, 王丽丽, 房娟娟, 等. 滇黄精酒制过程中颜色与 5 种成分含量变化的相关性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(21): 156-162.
- [12] 钟凌云, 周烨, 龚千锋. 炮制对黄精薯蓣皂苷元影响的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(3): 538-540.
- [13] 东宝花, 蒋云秀, 强梦琴, 等. 黄精炮制沿革及现代研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(11): 213-217.
- [14] 胡菊. 九蒸九晒黄精炮制“缓性增效”原理及产品开发研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2021.
- [15] 李瑞. 黄精产地加工—炮制一体化研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2020.
- [16] 宋艺君, 郭涛, 周晓程. 不同产地黄精经不同方法炮制后多糖、5-羟甲基糠醛的含量变化 [J]. 中国药房, 2017, 28(16): 2256-2258.
- [17] 焦劼, 陈黎明, 孙瑞泽, 等. 不同产地黄精主要化学成分比较及主成分分析 [J]. 中药材, 2016, 39(3): 519-522.
- [18] 孙婷婷, 张红, 李晔, 等. 陕西产黄精不同炮制品中薯蓣皂苷元含量分析 [J]. 中国药师, 2017, 20(1): 158-160.
- [19] 李帆. 九华黄精遗传多样性及 HPLC 特征图谱研究 [D]. 温州: 温州大学, 2021.
- [20] 冯治国, 赵祺, 朱强, 等. 基于熵权法和灰色关联分析法评价安徽省不同产地黄精药材质量 [J]. 中草药, 2021, 52(12): 3689-3695.
- [21] 刘绍欢, 洪迪清, 王世清. 黔产栽培黄精的薯蓣皂苷元含量测定 [J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(5): 44-45.
- [22] 马佳丽, 蒋殷盈, 蒋福升, 等. 九蒸九制多花黄精炮制过程变化研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2020, 44(5): 480-485.
- [23] 殷海霞, 郭秋萍, 平欲晖, 等. HPLC 法同时测定黄精中 5-羟基麦芽酚、5-羟甲基糠醛和黄精碱 A 的含量 [J]. 中国药师, 2018, 21(9): 1683-1686.
- [24] 王蕾, 张语凡, 王鑫, 等. 生川乌片炮制过程中 5-HMF 含量随炮制时间的变化规律研究 [J]. 中医药信息, 2017, 34(3): 17-20.
- [25] 刘露梅, 王能, 陈丹, 等. 基于黄精降血糖功效的酒黄精炮制工艺优选 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(8): 1915-1918.
- [26] 杨婷, 黄莹莹, 方杨冰, 等. 基于 AHP-熵权法结合正交试验设计优选岭南特色饮片制枳壳的发酵工艺及发酵前后成分对比研究 [J]. 中草药, 2022, 53(20): 6443-6450.
- [27] 李娟, 李保安, 方晗, 等. 基于 AHP-熵权法的发明专利价值评估: 以丰田开放专利为例 [J]. 情报杂志, 2020, 39(5): 59-63.
- [28] 胡兆流, 陈秋谷, 王佛长, 等. 基于信息熵理论权重分析的正交设计法优选参鬻愈疮灌肠液水提工艺 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(3): 442-446.
- [29] 王梦珂, 王梦伟, 李蒙恩, 等. 基于 AHP-熵权法的白附子有效成分与颜色值的相关性研究 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(12): 125-131.

- [30] 贾德强, 贺成柱, 丁立利. AHP-熵权法结合 Box-Behnken 响应面法优化当归微波真空干燥工艺研究 [J]. 中国农机化学报, 2023, 44(2): 60-68.
- [31] 王梦伟, 王梦珂, 李蒙恩, 等. 基于 AHP-熵权法的天南星饮片颜色与有效成分相关性研究 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(11): 2648-2652.
- [32] 杨颖. 汉防己碱纳米乳滴眼液的制备及其在兔眼的药代动力学研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2021.
- [33] 何文, 卢朝薇. 伏立康唑磺丁基醚- β -环糊精包合物对兔眼刺激性考察研究 [J]. 中国药师, 2019, 22(11): 2035-2037.
- [34] 唐颖. 七种免疫增强剂及其复方对猪圆环病毒 2 型基因工程疫苗的免疫增强作用研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2017.
- [35] 胡佳莉. 红曲黄精发酵工艺及免疫调节和降血脂作用研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2020.
- [36] 谭辉. 紫山药花青素的提取及口服液的研制 [D]. 成都: 西南交通大学, 2018.
- [37] 李泽, 潘登, 沈建利, 等. 黄精多糖对免疫抑制小鼠免疫功能影响的实验研究 [J]. 药物生物技术, 2013, 20(3): 241-244.
- [38] 龙婷婷. 基于 TLR4-MAPK/NF- κ B 信号通路探讨黄精多糖免疫调节抗肿瘤作用机制研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2018.
- [39] 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.
- [40] 方选, 李昇刚, 扈雪涛, 等. 卡马西平对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国药师, 2011, 14(5): 648-650.
- [41] 涂晓慧. 2,4-D 降解菌的筛选、鉴定及其降解特性研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2015.
- [42] 刘怀永. 沙棘籽油软胶囊功效成分分析及增强免疫功能研究 [D]. 福州: 福建医科大学, 2014.
- [43] 韩笑, 匡宇, 张舜杰, 等. 黄精、桑叶和玉竹配伍的降血糖药效学研究 [J]. 中药与临床, 2018, 9(3): 26-29.
- [44] 王艺. 黄精、滇黄精多糖的结构表征与降血糖活性分析 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2019.
- [45] 王韶君. 山茱萸炮制前后对 2 型糖尿病小鼠的降血糖作用及机制研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2016.
- [46] 王继龙, 魏舒畅, 刘永琦, 等. 基于 G1-熵权法和正交设计优选黄芪百合颗粒的提取纯化工艺 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 596-603.
- [47] 秦宇雯, 张丽萍, 赵祺, 等. 九蒸九晒黄精炮制工艺的研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(21): 5631-5637.
- [48] 钟凌云, 龚千锋, 张的凤, 等. 黄精炮制研究现状分析 [J]. 中药材, 2007, 30(12): 1618-1621.
- [49] 王进, 岳永德, 汤锋, 等. 气质联用法对黄精炮制前后挥发性成分的分析 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(16): 2187-2191.
- [50] 钱红月, 董琦, 肖移生. 江西省黄精加工与炮制的现状与分析 [J]. 中国民族民间医药, 2022, 31(20): 116-118.
- [51] 易方, 刘会. 黄精“产地加工-炮制一体化”的药材及饮片质量研究 [J]. 湖南中医杂志, 2021, 37(6): 173-177.
- [52] 赵君, 孙乐明, 章启东. 黄精产地加工与炮制一体化初步研究 [J]. 亚太传统医药, 2020, 16(9): 61-63.
- [53] Fan B L, Wei G L, Gan X F, *et al.* Study on the varied content of *Polygonatum cyrtoneura* polysaccharides in the processing of steaming and shining for nine times based on HPLC-MS/MS and chemometrics [J]. *Microchem J*, 2020, 159: 105352.
- [54] 杨云, 王爽, 冯云霞, 等. 黄精中小分子糖对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(18): 3447-3450.

[责任编辑 郑礼胜]