

黄精蜜炙工艺优化及体内外活性评价

郑娜¹, 李晔^{1,2}, 刘军锋², 唐力英³, 王祝举³, 李卓柯², 张红^{2*}, 孙婷婷^{2*}

1. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069

2. 陕西省中医药研究院, 陕西 西安 710003

3. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700

摘要: 目的 对黄精 *Polygonati Rhizoma* 蜜炙炮制工艺进行筛选, 对其蜜炙前后体内外活性进行评价。方法 采用正交试验考察加蜜量、蒸炙时间和蒸炙次数对蜜炙过程的影响, 采用电子眼技术从外在角度评价黄精蜜炙后的颜色变化, 选取醇溶性浸出物含量、多糖含量结合蜜炙黄精饮片的性状评分进行组合加权评分, 以综合评分作为指标, 优选出蜜炙黄精的最佳炮制工艺参数; 采用铁还原力实验、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 自由基、超氧阴离子自由基和羟基自由基清除法对体外抗氧化活性进行评价; 建立脾虚小鼠模型, 评价蜜炙黄精对脾虚小鼠的调节作用。结果 蜜炙黄精的最佳炮制工艺参数为蜂蜜 (中蜜) 用量为黄精用量的 25%, 蒸炙 5 次, 每次 3 h; 最佳工艺的色度为 $L^* 42.400 \sim 42.900$, $a^* 8.400 \sim 8.600$, $b^* 18.300 \sim 19.900$, $E^*_{ab} 46.900 \sim 47.800$; 体外活性评价显示, 蜜炙黄精、生黄精水提液及其对应水溶性多糖均有一定的铁还原能力, 并能够清除 DPPH 自由基、超氧阴离子及羟基自由基, 其中, 蜜炙黄精抗氧化活性显著优于生黄精, 蜜炙黄精多糖活性最优。体内活性研究表明, 与脾虚小鼠模型组相比, 蜜炙黄精干预后小鼠体质量及胸腺、脾脏指数及脾脏病理损伤均不同程度恢复; 脾虚小鼠血清中胃动素、白细胞介素-1 β 分泌量显著升高 ($P < 0.05$); 肝脏中氧化酶谷胱甘肽、过氧化氢酶及超氧化物歧化酶含量均有一定程度恢复 ($P < 0.05$), 丙二醛含量显著降低 ($P < 0.05$)。其中, 蜜炙黄精对脾虚小鼠调节作用优于生品黄精, 以蜜炙黄精多糖调节作用最佳。结论 筛选的黄精蜜炙炮制工艺稳定、可行; 蜜炙黄精具有抗氧化活性和调节脾虚作用, 可作为一种潜在的抗氧化剂和免疫调节剂; 为黄精蜜炙系列中药、保健品、食品开发提供理论基础。

关键词: 黄精; 蜜炙; 抗氧化; 脾虚; 电子眼技术; 多糖; 胃动素; 白细胞介素-1 β ; 谷胱甘肽; 过氧化氢酶; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)04-1171-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.04.006

Optimization of honey-frying process and evaluation of *in vitro* and *in vivo* activities of *Polygonati Rhizoma*

ZHENG Na¹, LI Ye^{1, 2}, LIU Junfeng², TANG Liying³, WANG Zhuju³, LI Zhuoke², ZHANG Hong², SUN Tingting²

1. School of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China

2. Shaanxi Institute of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China

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

Abstract: Objective To optimize the honey-frying process of Huangjing (*Polygonati Rhizoma*) and evaluate the *in vitro* and *in vivo* activities before and after honey-frying. **Methods** An orthogonal experiment was conducted to investigate the effects of honey amount, steaming time, and steaming frequency on the honey-frying process. An electronic eye technology was used to evaluate the color change of honey-fried *Polygonati Rhizoma* from an external perspective. The optimal honey-frying parameters were determined

收稿日期: 2024-09-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82304727); 国家中医药管理局全国老药工传承工作室 ([2024]255 号); 国家级非物质文化遗产保护资金; 陕西省重点研发计划项目 (2024SF-YBXM-460); 陕西省中医药管理局项目 (2021-QYZL-01); 陕西省中医药管理局项目 (SZY-KJCYC-2023-027); “秦药”研发重点实验室 (2021-QYPT-001)

作者简介: 郑娜 (1998—), 女, 硕士研究生, 从事中药饮片质量标准研究。E-mail: 18700967692@163.com

*通信作者: 张红 (1976—), 研究员, 硕士生导师, 从事中药药效物质基础研究。E-mail: zhanghong919919@163.com

孙婷婷 (1988—), 副研究员, 硕士生导师, 从事中药炮制机制及饮片质量标准研究。E-mail: stltt@126.com

by a combination weighted score based on the content of alcohol-soluble extracts, polysaccharides, and the sensory evaluation of honey-fried *Polygonati Rhizoma* decoction pieces. The antioxidant activity *in vitro* was assessed using the ferric reducing antioxidant power assay, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, superoxide anion radical scavenging assay, and hydroxyl radical scavenging assay. Additionally, a spleen-deficiency mouse model was established to evaluate the regulatory effect of honey-fried *Polygonati Rhizoma* on spleen-deficient mice. **Results** The optimal honey-frying parameters were 25% honey (medium honey) by weight of *Polygonati Rhizoma* steaming five times for 3 h. The optimal chroma of L^* , a^* , b^* and E^*_{ab} for the process were in the ranges of 42.400—42.900, 8.400—8.600, 18.300—19.900, and 46.900—47.800, respectively. The activity tests *in vitro* showed that both honey-fried and raw *Polygonati Rhizoma* water extracts, as well as their corresponding water-soluble polysaccharides, had certain iron-reducing abilities and scavenging effects on DPPH radicals, superoxide anions, and hydroxyl radicals. The antioxidant activity of honey-fried *Polygonati Rhizoma* was significantly higher than that of raw *Polygonati Rhizoma*, with honey-fried *Polygonati Rhizoma* polysaccharides showing the best antioxidant activity. The activity tests *in vivo* demonstrated that compared to the model group, spleen-deficient mice intervened with honey-fried *Polygonati Rhizoma* showed recovery in body weight, thymus and spleen indices, and spleen pathological damage. Serum levels of motilin and interleukin-1 β increased ($P < 0.05$), and the contents of glutathione, catalase, and superoxide dismutase in the liver were partially restored ($P < 0.05$), while malonaldehyde content significantly decreased ($P < 0.05$). Honey-fried *Polygonati Rhizoma* showed superior regulatory effects on spleen-deficient mice compared to the raw *Polygonati Rhizoma*, with honey-fried *Polygonati Rhizoma* polysaccharides exhibiting the best regulatory effect. **Conclusion** The optimized honey-frying process for *Polygonati Rhizoma* is stable and feasible. Honey-fried *Polygonati Rhizoma* demonstrates antioxidant activity and regulatory effects on spleen deficiency, indicating its potential as an antioxidant and immunomodulatory agent. This study provides a theoretical basis for the development of honey-fried *Polygonati Rhizoma*-based traditional Chinese medicine, health products and foods.

Key words: *Polygonati Rhizoma*; honey-frying; antioxidation; spleen deficiency; electronic eye technology; polysaccharides; motilin; interleukin-1 β ; glutathione; catalase; superoxide dismutase; malonaldehyde

黄精 *Polygonati Rhizoma* 为百合科黄精属植物黄精 *Polygonatum sibiricum* Red.、多花黄精 *P. cyrtoneura* Hua 及滇黄精 *P. kingianum* Coll. et Hemsl. 的干燥根茎, 始载于陶弘景的《名医别录》, 列为上品, 其性平、味甘, 入脾、肺、肾经, 具有补脾益气、养阴润肺、滋阴填髓的功效^[1], 且属药食同源的中药。黄精主要分布于陕西、四川、浙江、云南、贵州、湖北等地。《福地记》最早记载黄精产地, 称“陶先生谓之(黄精)西岳(华山一带)佐命是也。”《千金翼方》称黄精是关内道(陕西关中地区)华州(今华县、华阴、潼关一带)唯一上贡药材^[2]。这些记载彰显了陕产黄精 *P. sibiricum* Red. 的道地性, 其亦为陕西省著名“秦药”。

黄精主要含有糖类、黄酮、萜类、生物碱、木脂素、皂苷、微量元素等化学成分, 具有抗氧化、调节免疫力、增强记忆、降血糖、调脂、消炎杀菌、抗癌、抗衰老等功效^[3-5]。由于生黄精存在使舌头麻木和刺激咽喉的不良反应, 因此临床应用前需要炮制处理。黄精常用的炮制方法主要有酒炙、盐炙、醋炙、蜜炙及多种辅料制(如黑豆蒸、熟地蒸、蔓荆蒸)等^[6]。《神农本草经》记载:“‘石蜜、蜂子、蜜蜡’治百病”, 蜜炙黄精的炮制最早出现在清代《目经大成》“卷之三上, 其二(三十六)”载方中,

使用(蜜蒸)黄精^[7]。有研究发现, 蜜炙黄精对急性肺损伤小鼠的肺部保护作用增强^[8]。前期研究发现, 黄精在蜜炙过程中, 饮片颜色会随蒸制时间及蒸制次数的增加逐渐加深, 然而人眼对颜色的判断具有主观性, 不能对细微差异做出准确客观的判断。近年来, 人工智能感官评价技术中的电子眼技术被引入炮制工艺研究中, 该技术可减少主观评判失误, 不仅能更加科学合理地对饮片的炮制程度进行客观评判, 也为实现中药炮制工艺的客观化评价提供了可能。

目前, 黄精炮制研究主要集中于九蒸九制品及酒炙品炮制工艺筛选及相关药效评价^[9-10]。对于如何运用电子眼技术筛选“秦药”黄精蜜炙炮制工艺, 以及探究蜜炙黄精体外抗氧化活性及其调节脾虚作用的研究未见有深入报道。本研究以“秦药”黄精为研究对象, 运用电子眼技术, 以色度值量化判断黄精蜜炙后颜色变化, 采用正交试验以醇溶性浸出物、多糖含量及蜜炙黄精饮片的性状评分的组合加权评分为指标, 优选蜜炙黄精最佳炮制工艺参数; 同时, 对最优工艺所得蜜炙黄精抗氧化活性及脾虚调节作用进行评价。本研究旨在拓宽“秦药”黄精炮制的应用范畴, 为蜜炙黄精相关保健品、食品及药品的开发提供理论基础, 同时也为“秦药”

黄精资源开发利用提供研究支撑。

1 仪器与材料

1.1 仪器

U-2910型紫外可见分光光度计,株式会社日立制作所;VA400型IRIS视觉分析仪,阿默思上海仪器贸易有限公司;SN-1530-801015型酶标仪,赛默飞世尔科技公司;DFT-200A型高速万能粉碎机,温岭市林大机械有限公司;Alpha 2-4 LDplus 21385型冻干机,德国Christ公司;CKX53型倒置显微镜,日本Olympus公司;HH-6A型电热数显恒温水浴锅,天津市泰斯特仪器有限公司;XM-P22H型无级调功超声波清洗机,小美超声仪器有限公司;101型电热鼓风干燥箱,北京市永光明医疗仪器厂;SQP型电子分析天平,北京赛多利斯科学仪器有限公司;JM-B20001型电子天平,余姚市铭铭称重校验设备有限公司;TH-2010S型低温高速离心机、TL2010S型中通量组织研磨机,北京鼎昊源科技有限公司。

1.2 药品与试剂

对照品无水葡萄糖(批号CHB201122,质量分数 $\geq 98\%$)购自成都克洛玛生物科技有限公司;葱酮(批号20150511),购自国药集团化学试剂有限公司;蜂蜜(批号GB14963)购于福建乐之食品有限公司;Tris(批号20240511)购于Marie-Curie-Str.3公司;维生素C片(批号230514)购于山西太原药业有限公司;璞太和牌番泻叶(批号240201)购于陕西康超康健药业有限公司;补中益气丸(批号230370)购于兰州佛慈制药股份有限公司;丙二醛(批号20240422)、过氧化氢酶(catalase, Cat, 批号20240422)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD, 批号2040417)及还原型谷胱甘肽(批号20240420)试剂盒均购于南京建成生物工程研究所;小鼠白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β , 批号FN240129)、胃动素(批号JN19674)试剂盒购于武汉菲恩生物科技有限公司;其余试剂均购于国药集团化学试剂有限公司,为化学纯;所用水为双蒸水。

1.3 药材

黄精鲜药材购买于陕西省汉中市略阳县黄精GAP生产基地,经陕西省中医药研究院张红研究员鉴定,为百合科黄精属植物黄精*P. sibiricum* Red.的新鲜根茎。

1.4 动物

雄性Balb/c小鼠88只(6~8周龄),体质量

18~22 g,购于成都达硕实验动物有限公司,生产合格证号:SCXK(川)2020-0030。实验动物于温度(22 \pm 2) $^{\circ}$ C、相对湿度(50 \pm 3)%、12h/12h光照/黑暗环境下饲养。本研究所开展动物实验得到陕西省中医药研究院动物伦理委员会批准,动物伦理委员会批准号为SYDWLL-SQ-01。

2 方法与结果

2.1 生黄精及蜜炙黄精饮片的制备

2.1.1 黄精饮片生品 将鲜黄精药材去除须根及虫蛀霉变部分,洗净,晾晒至表面无水分,切厚片(2~4 mm),50~70 $^{\circ}$ C烘箱干燥,即得黄精饮片生品(SP)。

2.1.2 蜜炙黄精饮片 取SP 100 g,备用。取适量蜂蜜,置锅中炼制为中蜜^[1],如以加蜜量为黄精饮片质量的20%,蒸制5次为例,则每次加入4 g蜂蜜,每份炼蜜中加入10~20 mL、温度为50 $^{\circ}$ C的热水,搅拌至蜜充分溶化,加入到SP中,拌匀,闷润12 h,待蜂蜜水被黄精吸尽后,置于炖药罐中,密闭,隔水炖3~5 h,期间每隔1 h进行翻动1次,炖煮结束取出,放入50~70 $^{\circ}$ C烘箱烘至不黏手,继续加入第2份炼蜜水溶液(第2~5份蜂蜜均用10~20 mL热水溶解),拌匀,闷润,按照上述步骤重复操作4~6次,即得蜜炙黄精饮片。将生黄精饮片及蜜炙黄精饮片干燥,粉碎成细粉,备用。

2.2 正交试验设计考察黄精蜜炙炮制工艺

2.2.1 正交试验设计 称取SP 100 g,编号S0,平行9份,编号S1~S9,按照“2.1.2”项下方法制备蜜炙黄精饮片,称取与黄精生饮片一定比例的中蜜,加入一定量热水进行搅拌呈均匀溶液,将黄精生饮片用蜂蜜水溶液进行闷润10~12 h至蜂蜜水被黄精饮片吸尽,按正交表L₉(3⁴)中每个试验号试验,制得不同蜜炙黄精饮片,将不同试验号饮片在50~70 $^{\circ}$ C条件下干燥,并分别进行粉碎,过5号筛。按照正交试验原理进行试验设计,以蜂蜜用量、蒸炙时间、蒸炙次数为考察因素A、B和C,根据各指标重要程度,以醇溶性浸出物含量、黄精多糖含量及蜜炙黄精饮片的外观性状评分(性状及色度值)的综合评分(Y)为评价指标,采用L₉(3⁴)正交设计进行试验。试验因素与水平见表1,外观性状评分及色度评分标准见表2,外观如图1所示。Y具体计算方法见公式(1)。

$$Y=0.7 \times [0.2 \times (S_{1i} - S_{1min}) / (S_{1max} - S_{1min}) + 0.8 \times (S_{2i} - S_{2min}) / (S_{2max} - S_{2min})] + 0.3 \times (S_{3i} - S_{3min}) / (S_{3max} - S_{3min}) \quad (1)$$

表1 蜜炙黄精炮制工艺 L₉(3⁴)正交试验的因素水平、试验设计与结果

Table 1 L₉(3⁴) orthogonal test factor level, experimental design and results of processing technology of honey-fried *Polygonati Rhizoma*

| 试验号 | A/% | B/h | C/次 | D(空白) | L* | a* | b* | E* _{ab} | 浸出物/% | 多糖/% | 外观性状评分 | 综合评分 |
|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------------|-------|------|--------|-------|
| 1 | 15(1) | 3(1) | 4(1) | (1) | 45.114 | 12.472 | 25.105 | 53.114 | 70.62 | 5.39 | 1 | 40.97 |
| 2 | 15(1) | 4(2) | 5(2) | (2) | 42.841 | 8.573 | 19.392 | 47.800 | 67.72 | 5.78 | 5 | 74.19 |
| 3 | 15(1) | 5(3) | 6(3) | (3) | 41.510 | 9.324 | 18.691 | 46.469 | 65.88 | 6.26 | 3 | 66.48 |
| 4 | 20(2) | 3(1) | 5(2) | (3) | 43.232 | 8.806 | 20.811 | 48.782 | 73.14 | 5.57 | 4 | 72.40 |
| 5 | 20(2) | 4(2) | 6(3) | (1) | 37.550 | 9.447 | 12.510 | 40.691 | 68.68 | 4.99 | 2 | 35.71 |
| 6 | 20(2) | 5(3) | 4(1) | (2) | 42.191 | 8.768 | 19.848 | 47.444 | 72.56 | 3.98 | 3 | 27.88 |
| 7 | 25(3) | 3(1) | 6(3) | (2) | 42.002 | 9.157 | 19.636 | 47.261 | 70.62 | 5.67 | 3 | 62.30 |
| 8 | 25(3) | 4(2) | 4(1) | (3) | 43.186 | 9.025 | 20.562 | 48.675 | 71.50 | 5.83 | 4 | 75.11 |
| 9 | 25(3) | 5(3) | 5(2) | (1) | 42.407 | 8.457 | 18.304 | 46.957 | 70.28 | 6.46 | 5 | 94.48 |
| K ₁ | 181.64 | 175.67 | 143.96 | 171.16 | | | | | | | | |
| K ₂ | 135.99 | 185.01 | 241.07 | 164.37 | | | | | | | | |
| K ₃ | 231.89 | 188.84 | 164.49 | 213.99 | | | | | | | | |
| R | 95.90 | 13.17 | 97.11 | 49.62 | | | | | | | | |

表2 蜜炙黄精饮片外观性状评分标准及色度评分范围

Table 2 Scoring standard of appearance traits and chromaticity score range of honey-fried *Polygonati Rhizoma* decoction pieces

| 外观性状 | 评分 | 色度值范围 | | | |
|--------------------------------------|----|---------------|-------------|---------------|------------------|
| | | L* | a* | b* | E* _{ab} |
| 外表黑褐色, 中心黑色, 颜色均一, 切面有光泽, 质地柔软 | 5 | 42.400~42.900 | 8.400~8.600 | 18.300~19.900 | 46.900~47.800 |
| 外表黑褐色, 中心黑色, 颜色基本均一, 切面有光泽, 质地柔软 | 4 | 43.100~43.300 | 8.800~9.100 | 20.500~20.900 | 48.600~48.800 |
| 外表棕褐色, 中心棕褐色或黑褐色, 颜色基本均一, 切面有光泽, 质地软 | 3 | 41.500~42.200 | 8.700~9.400 | 18.600~19.900 | 46.400~47.500 |
| 外表棕褐色, 中心黑褐色或黑色, 颜色不均一, 切面无光泽, 质地稍硬 | 2 | 36.400~37.600 | 9.400~9.500 | 11.400~12.600 | 40.600~41.000 |
| 外表棕褐色, 中心棕褐色, 颜色不均一, 切面无光泽, 质地稍硬 | 1 | 45.100及以上 | 12.400及以上 | 24.100及以上 | 52.600及以上 |

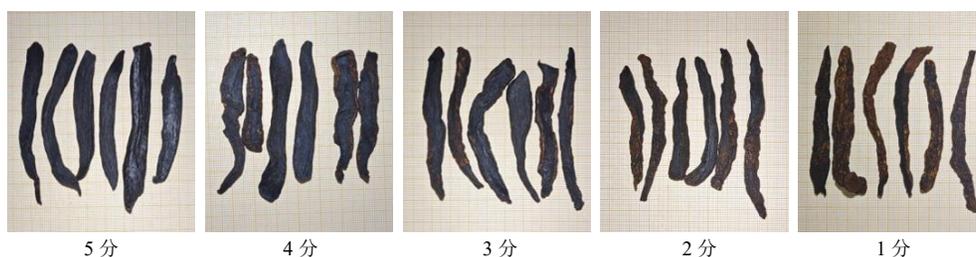


图1 不同蜜炙程度黄精饮片外观

Fig. 1 Appearance of *Polygonati Rhizoma* decoction pieces with different honey-fried degrees

i 表示组别编号, *S*_{1i}、*S*_{2i}、*S*_{3i} 分别对应各组别蜜炙黄精饮片醇溶性浸出物含量、多糖含量及外观性状评分, *S*_{1max}、*S*_{2max}、*S*_{3max} 和 *S*_{1min}、*S*_{2min}、*S*_{3min} 分别对应所有组别蜜炙黄精饮片醇溶性浸出物含量、多糖含量及外观性状评分的最大值和最小值

2.2.2 黄精醇溶性浸出物的测定 精密称取 1~9 个试验号 (S1~S9) 约 2 g 蜜炙黄精饮片粉末, 置 100 mL 锥形瓶中, 加入稀乙醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 静置 1 h 后, 水浴加热回流 1 h。放冷, 再称

定质量, 用稀乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取滤液 25 mL, 置已干燥至恒定质量的蒸发皿中, 在水浴上蒸干后, 于 105 °C 干燥 3 h, 置干燥器中冷却, 精密称定质量, 以干燥品计算供试品中醇溶性浸出物的含量 (每个样品平行制样 2 份, 取平均值)。

2.2.3 黄精多糖含量测定

(1) 对照品溶液的制备: 精密称取无水葡萄糖对照品适量, 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释

至刻度, 摇匀, 制得质量浓度为 0.332 mg/mL 无水葡萄糖对照品溶液。

(2) 线性关系考察: 精密量取无水葡萄糖对照品溶液 0、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.40 mL, 分别置刻度试管中, 分别加蒸馏水至 1.0 mL, 混匀, 缓慢加入 0.2% 蒽酮-硫酸溶液 4 mL, 摇匀, 冷却后置 37 °C 水浴中保温 10 min, 取出, 置冰水浴中冷却 10 min, 取出, 以相应试剂为空白, 在紫外-可见分光光度计上进行测定, 检测波长 582 nm, 每个质量浓度重复 3 次。以 582 nm 处的吸光度 (A) 为纵坐标 (Y), 无水葡萄糖质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程 $Y=32.778X-0.0095$, $r=0.9998$, 结果表明无水葡萄糖在 3.32~26.60 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好的线性关系。

(3) 供试品溶液的制备及多糖含量测定: 取上述蜜炙黄精饮片粉末约 0.25 g, 精密称定, 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, 精密量取 1 mL, 置 10 mL 试管中, 按照“2.2.3 (2)”项下方法, 自“加蒸馏水至 1.0 mL”起, 测定各样品 A 值, 计算蜜炙黄精饮片中黄精多糖含量 (每个样品平行制样 2 份, 取平均值)。

(4) 精密度考察: 分别精密吸取“2.2.3 (1)”项下单一对照品溶液适量, 按“2.2.3 (2)”项下方法操作, 连续测定 6 次, 计算 A 值的 RSD 为 2.20%, 结果表明该仪器精密度良好。

(5) 稳定性考察: 取“2.2.3 (3)”项下供试品溶液适量, 按照“2.2.3 (2)”项下方法操作并进行测定, 分别于操作后 0、4、8、12、20、24 h 测定样品 A 值, 计算其 A 值的 RSD 为 2.08%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

(6) 重复性考察: 取蜜炙黄精饮片粉末, 按照“2.2.3 (3)”项下方法制备供试品溶液, 平行 6 份, 按照“2.2.3 (2)”项下方法操作并进行测定, 计算黄精多糖质量分数的 RSD 为 2.59%, 结果表明该方法重复性良好。

(7) 加样回收率试验: 精密称取 6 份已测知多糖含量的蜜炙黄精样品粉末, 每份 0.125 g, 分别按照 1:1 的比例加入适量无水葡萄糖对照品, 按

“2.2.3 (3)”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.2.3 (2)”项下方法操作并进行测定, 计算得无水葡萄糖的平均加样回收率为 101.49%, RSD 为 2.59%, 结果表明该试验所建立的含量测定方法准确度良好。

2.2.4 电子眼技术分析蜜炙黄精饮片色泽变化

(1) 色度值的测定: 仪器开机稳定后, 将 24 色色彩校正板置于仪器中校正, 调整到合适的镜头曝光度和焦距, 使用 5 nm 光圈, 光源 D65, 同时使用顶部及底部照明, 单一快照模式拍照。将 SP 粉末 (S0) 及炮制后 9 个参数的蜜炙黄精饮片 S1~S9 粉末样品均匀放置于表面皿中采集图像, 采集 3 次后取平均值, 分别记录各个样品的色号及比例。以 L^* (明度)、 a^* (红绿值) 和 b^* (黄蓝值) 3 个指标来表示每个色号, 并计算总色度值。 L^* 的范围由 0~100 对应表示颜色由黑到白, a^* 的数值由正到负对应表示颜色由红到绿, b^* 的数值由正到负对应表示颜色由黄到蓝, 样品的总色度值可以用 E^*_{ab} 表示, 计算公式为 $E^*_{ab}=(L^{*2}+a^{*2}+b^{*2})^{1/2}$, E^*_{ab} 越大, 颜色越浅。

(2) 方法学考察: 为保证颜色分析方法的稳定性和可靠性, 对所建立的方法进行了方法学研究。取样品粉末 (S0) 按照“2.2.4 (1)”项下方法平行测量 6 次, 考察该方法精密度; 取样品粉末 (S0) 6 份按照“2.2.4 (1)”项下方法测量, 考察该方法重复性; 取样品粉末 (S0) 按照“2.2.4 (1)”项下方法分别于 0、2、4、8、12、24 h 测量, 考察该方法稳定性。结果表明, 电子眼测定蜜炙黄精饮片样品的精密度、重复性、稳定性的 L^* 、 a^* 和 b^* 的 RSD 值均小于 3%, 表明该方法具有良好的精密度和重复性, 以及样品在室温下 24 h 内具有良好稳定性。

(3) 色度值变化及分析: 生品黄精饮片样品 S0 和蜜炙黄精饮片样品 S1~S9 粉末的电子眼图像见图 2, 结合表 1 色度值可知, S0 和 S1~S9 的 L^* 分别为 96.974、37.550~55.897, a^* 分别为 -3.397、6.868~12.472, b^* 分别为 13.561、12.510~25.109, E^*_{ab} 分别为 97.976、40.691~58.211。

与生黄精饮片 S0 相比, 黄精蜜炙后 (S1~S9) L^* 整体呈下降趋势, 说明蜜炙后颜色更暗; a^* 整体呈上升趋势且为正值, 说明蜜炙后颜色偏向红色; b^* 整体变化趋势不大, 说明蜜炙饮片与生品饮片颜色均偏向黄色; E^*_{ab} 整体呈下降趋势, 说明蜜炙后颜色加深。即黄精蜜炙后, 整体上明度变暗、红色度值升高、颜色变深, 与图 2 基本相符。

评分 1 分的总色度值最高, 颜色最明亮, 总体

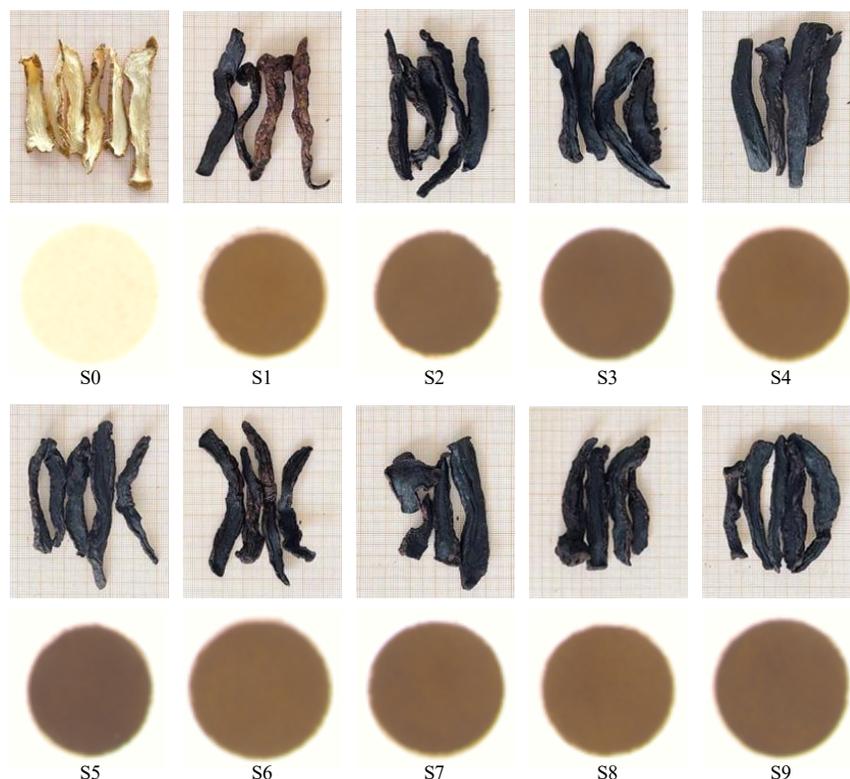


图 2 生品及不同炮制工艺蜜炙黄精饮片外观图及对应的电子眼粉末外观图

Fig. 2 Appearance of raw and honey-fried *Polygonati Rhizoma* decoction pieces and corresponding electronic eye powder appearance

偏红偏蓝；评分 2 分的总色度值最低，颜色暗，但 b^* 最小，总体颜色偏暗黄；评分 5、4、3 分的总色度值低，颜色深暗，总体颜色偏红偏蓝，相比于评分 3、4 分，评分 5 分的饮片颜色均一，质地柔软滋润且断面光泽度最好。色度值分析结果与图 1 主观感受大致相符。

2.2.5 正交设计结果分析 正交实验方案与综合评分结果见表 1，方差分析结果见表 3。由表 1 直观分析可知，根据极差大小决定因素主次顺序为 $A \approx C > B$ ，根据方差分析结果（表 3）可知，蜂蜜用量和蒸制次数影响相对较大，蒸炙时间影响相对较小。综合直观分析与方差分析结果，最终确定最佳炮制工艺为 $A_3B_1C_2$ ，即蜂蜜（中蜜）用量为黄精 25%，蒸炙 3 h，蒸炙 5 次。

表 3 正交试验方差分析

Table 3 Orthogonal test variance analysis

| 方差来源 | 偏差平方和 | 自由度 | F 值 | 显著性 |
|--------|-------------|-----|---------|-----|
| A | 1 533.977 2 | 2 | 3.179 1 | 无 |
| B | 30.594 8 | 2 | 0.063 4 | 无 |
| C | 1 746.258 8 | 2 | 3.619 1 | 无 |
| D (误差) | 482.517 5 | 2 | | |

2.2.6 蜜炙最佳工艺验证试验 对优选的最佳工艺进行验证。取黄精生饮片，每份 100 g，共 3 份，按“2.2.5”项下最优蜜炙黄精炮制工艺制备 3 批最佳蜜炙黄精饮片样品，再按“2.2.2”和“2.2.3”项下方法分别测定醇溶性浸出物含量和多糖含量，并按照“2.2.4”项下方法进行外观性状评分，计算其综合评分。结果见表 4，综合评分平均值为 96.70 (RSD 为 0.64%)，优于正交试验各试验号的结果，说明优选的黄精蜜炙工艺稳定、可行。

表 4 验证试验结果

Table 4 Validation test results

| 试验号 | 醇溶性浸出物/% | 多糖/% | 外观性状评分 | 综合评分 |
|-----|----------|------|--------|-------|
| 1 | 71.68 | 6.53 | 5 | 97.55 |
| 2 | 71.05 | 6.44 | 5 | 96.51 |
| 3 | 70.61 | 6.50 | 5 | 96.02 |

2.3 蜜炙黄精体外抗氧化活性研究

2.3.1 蜜炙黄精和生黄精水提液的制备 分别称取最佳炮制工艺所得的蜜炙黄精和生黄精饮片粉末适量，加 10 倍量水，回流提取 1 h，滤过取滤液，药渣继续加水回流提取 1 h，滤过，合并滤液，回收溶剂，制得含生药量 50 mg/mL 的提取液，分别配

制成不同质量浓度 (0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/mL) 的样品水提液, 备用。

2.3.2 蜜炙黄精和生黄精多糖溶液的制备 分别称取最佳炮制工艺所得蜜炙黄精和生黄精饮片粉末适量, 根据课题组前期研究方法^[12], 加入 12 倍量水, 80 °C 热水提取 2 次, 每次 2 h, 滤过, 合并 2 次滤液, 浓缩至小体积, 按照体积比加入 4 倍量无水乙醇, 静置 12 h, 分离沉淀, 沉淀加水复溶, 采用 Savage 法^[13]除蛋白, 透析, 透析液回收溶剂后冷冻干燥, 即得多糖样品, 并分别配制不同质量浓度 (0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/mL) 的多糖样品溶液, 备用。

2.3.3 铁还原力测定^[14] 分别精密吸取“2.3.1”“2.3.2”项下蜜炙黄精、生黄精水提物及相应多糖溶

液各 0.5 mL, 加入 1% 铁氰化钾溶液 67.5 μL, 50 °C 水浴, 反应 20 min, 反应结束后, 依次加入 10% 三氯乙酸溶液和 0.1% 三氯化铁溶液, 震荡混匀, 以水代替样品为空白对照, 维生素 C 为阳性对照, 用酶标仪于 700 nm 处测定样品 A 值 (每组平行测定 3 次)。结果如表 5 所示, 在质量浓度为 0.5~5.0 mg/mL 时, 蜜炙黄精和生黄精水提液及其相对应多糖的铁还原力均有不同程度地升高, 其中, 蜜炙黄精多糖、水提液铁还原力均优于生黄精。当质量浓度为 5.0 mg/mL 时, 蜜炙黄精多糖、蜜炙黄精水提液、生黄精多糖和生黄精水提液的铁还原力分别为 0.70±0.08、0.26±0.06、0.19±0.02、0.16±0.03。在质量浓度为 5.0 mg/mL 时, 蜜炙黄精多糖样品的铁还原力最强 (P<0.05)。

表 5 蜜炙黄精铁还原力测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Determination results of iron reducing power of honey-fried *Polygonati Rhizoma* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 铁还原力 (A) | | | | | |
|---------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 0.5 mg·mL ⁻¹ | 1.0 mg·mL ⁻¹ | 2.0 mg·mL ⁻¹ | 3.0 mg·mL ⁻¹ | 4.0 mg·mL ⁻¹ | 5.0 mg·mL ⁻¹ |
| 维生素C | 0.68±0.15 | 0.94±0.22 | 1.20±0.56 | 1.61±0.53 | 2.37±0.42 | 3.09±0.75 |
| 蜜炙黄精水提液 | 0.11±0.09 | 0.15±0.12 | 0.21±0.06 | 0.23±0.07 | 0.24±0.04* | 0.26±0.06* |
| 生黄精水提液 | 0.05±0.03 | 0.06±0.09* | 0.08±0.02* | 0.11±0.06* | 0.13±0.05* | 0.16±0.03* |
| 蜜炙黄精多糖 | 0.10±0.10 | 0.18±0.05 | 0.27±0.09 | 0.36±0.06 | 0.51±0.03 | 0.70±0.08 |
| 生黄精多糖 | 0.07±0.50 | 0.08±0.03* | 0.09±0.81* | 0.13±0.16* | 0.15±0.06* | 0.19±0.02* |

与蜜炙黄精多糖组比较: *P<0.05 **P<0.01; 表 6~8 同。

*P<0.05 **P<0.01 vs honey-fried *Polygonati Rhizoma* polysaccharide group; same as tables 6—8.

2.3.4 DPPH 自由基清除能力测定^[15] 分别精密吸取“2.3.1”“2.3.2”项下蜜炙黄精、生黄精水提物及相应多糖溶液各 1.5 mL, 分别加入用无水乙醇配制成质量浓度为 0.07 mg/mL 的 DPPH 溶液 2 mL, 震荡混匀, 避光反应 20 min, 用酶标仪测定 517 nm 处的 A 值 (A_j); 纯水代替样品为空白对照, A 值记为 A₀; 纯水代替 DPPH 为背景组, A 值记为 A_i; 按照公式 (2) 计算 DPPH 的清除率, 每组平行测定 3 次。结果如表 6 所示, 维生素 C 在质量浓度较小时, 对 DPPH 自由基的清除率已经接近 90%。在质量浓

度为 0.5~5.0 mg/mL 时, 蜜炙黄精和生黄精水提液及其对应多糖对 DPPH 自由基的清除率均有不同程度升高。当质量浓度为 5.0 mg/mL 时, 蜜炙黄精多糖、蜜炙黄精水提液、生黄精多糖、生黄精水提液对 DPPH 自由基的清除率分别为 (76.87±2.13)%、(74.98±0.38)%、(13.50±0.21)%、(25.89±1.61)%, 其中, 以蜜炙黄精多糖对 DPPH 自由基的清除能力最强。

$$\text{清除率} = 1 - (A_j - A_i) / A_0 \quad (2)$$

2.3.5 超氧阴离子自由基清除能力测定^[16] 取 250

表 6 蜜炙黄精 DPPH 自由基清除能力测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Determination results of free radical scavenging ability of honey-fried *Polygonati Rhizoma* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | DPPH 自由基清除率/% | | | | | |
|---------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 0.5 mg·mL ⁻¹ | 1.0 mg·mL ⁻¹ | 2.0 mg·mL ⁻¹ | 3.0 mg·mL ⁻¹ | 4.0 mg·mL ⁻¹ | 5.0 mg·mL ⁻¹ |
| 维生素C | 74.34±0.43 | 85.80±0.20 | 86.01±0.58 | 86.08±0.08 | 86.21±0.21 | 88.21±0.21 |
| 蜜炙黄精水提液 | 16.61±0.79* | 28.90±0.22* | 51.94±1.76 | 64.59±0.67 | 73.15±0.34 | 74.98±0.38 |
| 生黄精水提液 | 9.41±1.03** | 9.41±9.19** | 10.27±0.92** | 16.58±0.86** | 21.38±7.35** | 25.89±1.60** |
| 蜜炙黄精多糖 | 31.24±4.99 | 56.80±0.65 | 75.74±0.26 | 76.66±0.81 | 76.68±0.13 | 76.87±2.13 |
| 生黄精多糖 | 4.25±2.50** | 7.27±0.43** | 8.63±0.81** | 11.25±0.26** | 11.31±1.96** | 13.50±0.21** |

mL 0.1 mol/mL Tris, 加入 114.5 mL 0.1 mol/mL 盐酸, 加水稀释至 500 mL 配制成 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2), 分别精密吸取“2.3.1”“2.3.2”项下蜜炙黄精、生黄精水提物及相应多糖溶液各 0.25 mL, 加入 1.85 mL Tris-HCl 缓冲液, 25 °C 水浴 20 min, 再加入 0.125 mL 邻苯三酚 (25 mmol/L), 继续水浴 5 min, 再加入 0.25 mL HCl (1.2 mol/L) 终止反应。用酶标仪测定 325 nm 处 A 值, 记为 A_j ; 以纯水代替样品为空白对照, A 值记为 A_0 ; 纯水代替邻苯三酚为背景, A 值记为 A_i ; 按式 (2) 计算超氧阴离子自由基的清除率, 每组平行测定 3 次。结果如表 7 所示, 在质量浓度为 0.5~5.0 mg/mL 时, 蜜炙黄精和生黄精水提液、多糖超氧阴离子清除率均不同程度升高并呈质量浓度相关性。当质量浓度为 5.0 mg/mL 时, 蜜炙黄精多糖、蜜炙黄精水提液、生黄精多糖、生

黄精水提液对超氧阴离子的清除率分别为 (35.65 ± 0.77) %、(30.05 ± 0.89) %、(27.34 ± 1.39) %、(21.68 ± 1.78) %, 其中, 蜜炙黄精多糖对超氧阴离子的清除率最高。

2.3.6 羟基自由基清除能力测定^[17] 精密吸取“2.3.1”“2.3.2”项下蜜炙黄精、生黄精水提物及相应多糖溶液各 0.25 mL 于试管中, 依次加入 0.25 mL 硫酸亚铁 (9 mmol/L)、水杨酸乙醇 (9 mmol/L) 和 0.25 mL 过氧化氢溶液 (8.8 mmol/L), 均匀混合后置于 37 °C 水浴 30 min, 用酶标仪测定 510 nm 处 A 值, 记为 A_j ; 纯水代替样品为空白对照, A 值记为 A_0 ; 纯水代替过氧化氢为背景组, A 值记为 A_i ; 以维生素 C 为阳性对照。按照式 (2) 计算羟基自由基的清除率, 每组平行测定 3 次。结果如表 8 所示, 在质量浓度为 0.5~5.0 mg/mL 时, 蜜炙黄精和生黄精水提液、

表 7 蜜炙黄精超氧阴离子自由基清除能力测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Determination results of superoxide anion radical scavenging ability of honey-fried *Polygonati Rhizoma* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 超氧阴离子自由基清除率/% | | | | | |
|---------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 0.5 mg·mL ⁻¹ | 1.0 mg·mL ⁻¹ | 2.0 mg·mL ⁻¹ | 3.0 mg·mL ⁻¹ | 4.0 mg·mL ⁻¹ | 5.0 mg·mL ⁻¹ |
| 维生素C | 40.92 ± 0.85 | 42.96 ± 8.45 | 48.30 ± 6.68 | 55.25 ± 1.38 | 63.63 ± 3.04 | 86.23 ± 1.01 |
| 蜜炙黄精水提液 | 19.74 ± 0.53* | 22.36 ± 4.29 | 25.30 ± 2.47 | 26.26 ± 0.32 | 27.80 ± 1.48 | 30.05 ± 0.89 |
| 生黄精水提液 | 12.46 ± 0.15** | 13.45 ± 0.48** | 15.84 ± 1.42** | 19.31 ± 0.67** | 22.20 ± 1.26* | 21.68 ± 1.78* |
| 蜜炙黄精多糖 | 28.36 ± 4.80 | 30.12 ± 5.41 | 32.21 ± 2.29 | 33.13 ± 3.59 | 34.11 ± 1.91 | 35.65 ± 0.77 |
| 生黄精多糖 | 15.78 ± 2.25* | 20.62 ± 0.48* | 22.59 ± 0.46 | 24.86 ± 1.67 | 25.67 ± 1.89 | 27.34 ± 1.39* |

表 8 蜜炙黄精羟基自由基清除能力测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Determination results of hydroxyl radical scavenging ability of honey-fried *Polygonati Rhizoma* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 羟基自由基清除率/% | | | | | |
|---------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 0.5 mg·mL ⁻¹ | 1.0 mg·mL ⁻¹ | 2.0 mg·mL ⁻¹ | 3.0 mg·mL ⁻¹ | 4.0 mg·mL ⁻¹ | 5.0 mg·mL ⁻¹ |
| 维生素C | 11.38 ± 4.93 | 17.15 ± 4.22 | 25.47 ± 4.58 | 36.50 ± 3.84 | 66.55 ± 0.90 | 99.83 ± 0.10 |
| 蜜炙黄精水提液 | 16.75 ± 2.97 | 17.22 ± 0.65 | 18.56 ± 2.19 | 23.16 ± 2.33 | 25.80 ± 0.90* | 27.82 ± 2.07* |
| 生黄精水提液 | 3.22 ± 1.54** | 3.67 ± 3.17** | 4.74 ± 2.66** | 10.05 ± 1.51* | 12.03 ± 0.96* | 12.59 ± 4.50** |
| 蜜炙黄精多糖 | 17.51 ± 1.78 | 19.17 ± 4.00 | 22.30 ± 4.00 | 29.15 ± 1.46 | 43.13 ± 0.75 | 44.89 ± 1.28 |
| 生黄精多糖 | 6.19 ± 1.85 | 6.23 ± 0.67* | 8.36 ± 1.91* | 10.64 ± 2.47* | 12.12 ± 2.16* | 14.20 ± 0.97** |

多糖对羟基自由基的清除能力逐渐增强。当质量浓度为 5.0 mg/mL 时, 蜜炙黄精多糖、蜜炙黄精水提液、生黄精多糖及生黄精水提液对羟基自由基的清除率分别为 (44.89 ± 1.28) %、(27.82 ± 2.07) %、(14.20 ± 0.97) %、(12.59 ± 4.50) %, 其中, 蜜炙黄精多糖对羟基自由基的清除率显著高于其余各组 ($P < 0.05, 0.01$)。

2.4 蜜炙黄精对脾虚模型小鼠抗氧化及免疫调节作用研究

2.4.1 小鼠模型建立及给药 雄性 Balb/c 小鼠购入

后于动物中心饲养, 饲养环境温度 (25 ± 2) °C, 湿度 (50 ± 5) %, 12 h 光照/12 h 黑暗交替, 自由饮水、摄食。动物适应性饲养 7 d 后分为对照组, 模型组, 蜜炙黄精水提液高、低剂量 (1.950、0.970 g/kg) 组, 生黄精水提高、低剂量 (1.950、0.970 g/kg) 组, 蜜炙黄精多糖高、低剂量 (0.800、0.400 g/kg) 组, 生黄精多糖高、低剂量 (0.800、0.400 g/kg) 组, 阳性对照补中益气丸 (0.100 g/kg) 组, 每组 8 只, 各组给药剂量按照课题组前期实验给药^[18], 并于每天同一时间称定小鼠体质量。除对照组外, 其余各

组小鼠均采用 ig 番泻叶 (10 g/kg) 加饥饱失常法^[19] 建立脾虚模型, 连续造模 15 d。从第 8 天开始, 各给药组分别 ig 上述各给药组水溶液, 对照组和模型组 ig 生理盐水, 连续给药 7 d。与对照组相比, 造模小鼠在试验期间出现粪便稀溏、食欲下降、消瘦、四肢冰凉、蜷缩扎堆、精神萎靡等症状, 表明造模成功。

2.4.2 材料收集 末次给药后, 所有小鼠禁食不禁水 12 h, 称体质量后摘眼球取血, 将血样在 4 °C 条件下以 3 500 r/min 离心 (离心半径 8.8 cm) 15 min 制备血清, 分装后置于 -80 °C 冰箱中保存, 待测。剥取胸腺和脾脏组织, 小心剔除脏器表面脂肪组织, 用吸水纸吸净表面血迹, 称定质量, 计算胸腺指数和脾脏指数, 置于 -80 °C 冰箱中保存, 待测。

脏器指数 = 脏器质量 / 体质量

2.4.3 统计学分析 本实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析并采用 Graphpad prism 8.0 软件进行绘图。以 $P < 0.05$ 为差异显著。

2.4.4 对脾虚模型小鼠体质量及脏器指数的影响

(1) 对小鼠体质量的影响: 结果如表 9 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠体质量显著降低 ($P < 0.05$), 其余各组小鼠 ig 番泻叶后均出现不同程度的畏寒肢冷、大便溏稀、消瘦等典型的脾虚症状, 表明脾虚造模成功。与模型组相比, 各给药组小鼠从第 5 天开始体质量均有不同程度的增加, 并呈一定的剂量相关性。实验第 15 天, 各给药组量组小鼠体质量与模型组相比均显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), 其中, 蜜炙黄精多糖高剂量组小鼠体质量显著高于其余各组 ($P < 0.05$)。

(2) 对小鼠脏器指数的影响: 由表 9 可知, 与对照组相比, 模型组小鼠胸腺指数和脾脏指数均显著降低 ($P < 0.05$), 表明脾虚导致小鼠机体免疫功能降低。与模型组相比, 各给药组小鼠胸腺指数和脾脏指数不同程度恢复并呈剂量相关性, 其中, 蜜炙黄精多糖高剂量组对小鼠胸腺指数和脾脏指数的恢复作用显著强于生黄精组 ($P < 0.05$)。

表 9 蜜炙黄精对脾虚小鼠体质量、胸腺指数和脾脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 9 Effects of honey-fried *Polygonati Rhizoma* on body weight, thymus indexes and spleen indexes of spleen deficiency mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量/ (g·kg ⁻¹) | 体质量/g | | | | 胸腺指数/ (mg·g ⁻¹) | 脾脏指数/ (mg·g ⁻¹) |
|---------|------------------------------|------------|-------------|-------------|---------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | | 0 d | 5 d | 10 d | 15 d | | |
| 对照 | - | 20.36±0.20 | 23.74±0.90 | 25.24±0.46 | 26.84±0.42 | 2.36±0.20 | 5.30±0.43 |
| 模型 | - | 20.46±0.41 | 20.98±0.27* | 20.15±1.70* | 18.18±0.60** | 0.47±0.04** | 2.95±0.29** |
| 补中益气丸 | 0.100 | 20.03±0.80 | 20.07±1.65 | 20.58±2.44 | 21.30±1.77# | 0.89±0.22# | 4.34±0.42# |
| 蜜炙黄精水提液 | 1.950 | 20.29±0.83 | 21.19±0.68 | 22.77±0.74# | 23.26±0.70## | 0.78±0.28#& | 3.76±0.50#& |
| | 0.970 | 19.94±0.43 | 20.84±1.72 | 20.96±1.56 | 21.12±0.83#& | 0.65±0.22#& | 3.25±0.09#& |
| 生黄精水提液 | 1.950 | 20.12±1.03 | 20.69±2.27 | 20.89±1.31 | 21.48±1.05#& | 0.59±0.06& | 3.27±0.13& |
| | 0.970 | 20.36±1.11 | 20.38±1.21 | 20.66±1.56 | 21.08±0.98#& | 0.50±0.10& | 3.23±0.20& |
| 蜜炙黄精多糖 | 0.800 | 20.36±0.92 | 22.25±1.76# | 23.78±2.01# | 25.22±2.42## | 1.29±0.26# | 4.10±0.70# |
| | 0.400 | 20.12±1.03 | 21.93±1.03 | 22.18±1.38# | 22.50±1.88## | 0.92±0.42# | 3.40±0.09# |
| 生黄精多糖 | 0.800 | 20.03±0.47 | 20.59±1.07 | 22.75±1.71# | 23.53±1.99## | 0.71±0.19& | 3.58±0.45#& |
| | 0.400 | 20.72±0.76 | 20.63±1.40 | 21.98±2.73 | 22.48±1.96##& | 0.64±0.16& | 3.41±0.69& |

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与蜜炙黄精多糖高剂量组比较: & $P < 0.05$ && $P < 0.01$; 表 10 同。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; & $P < 0.05$ && $P < 0.01$ vs honey-fried *Polygonati Rhizoma* polysaccharide high dose group; same as table 10.

2.4.5 蜜炙黄精对小鼠脾脏和胸腺组织病理形态的影响 将各组小鼠胸腺、脾脏用 4% 多聚甲醛固定, HE 染色后观察组织病理学变化情况。结果如图 3 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠脾脏组织红髓和白髓分界不清, 白髓结构损伤严重, 淋巴细胞减少 (如箭头所示); 与模型组相比, 各给药组和补中益气组小鼠脾脏红髓和白髓分界相对清晰, 淋巴细胞有增

多的趋势, 经对比可知, 蜜炙黄精多糖组恢复作用显著。与对照组相比, 模型组小鼠胸腺组织髓质与质界限模糊且皮质变薄, 胸腺内淋巴细胞分布松散且数量减少 (如箭头所示); 与模型组相比, 各给药组小鼠胸腺皮质较模型组小鼠变厚, 淋巴细胞增多, 以蜜炙黄精多糖组恢复作用明显。说明蜜炙黄精和生黄精 (水提液、多糖)、补中益气丸均可缓解

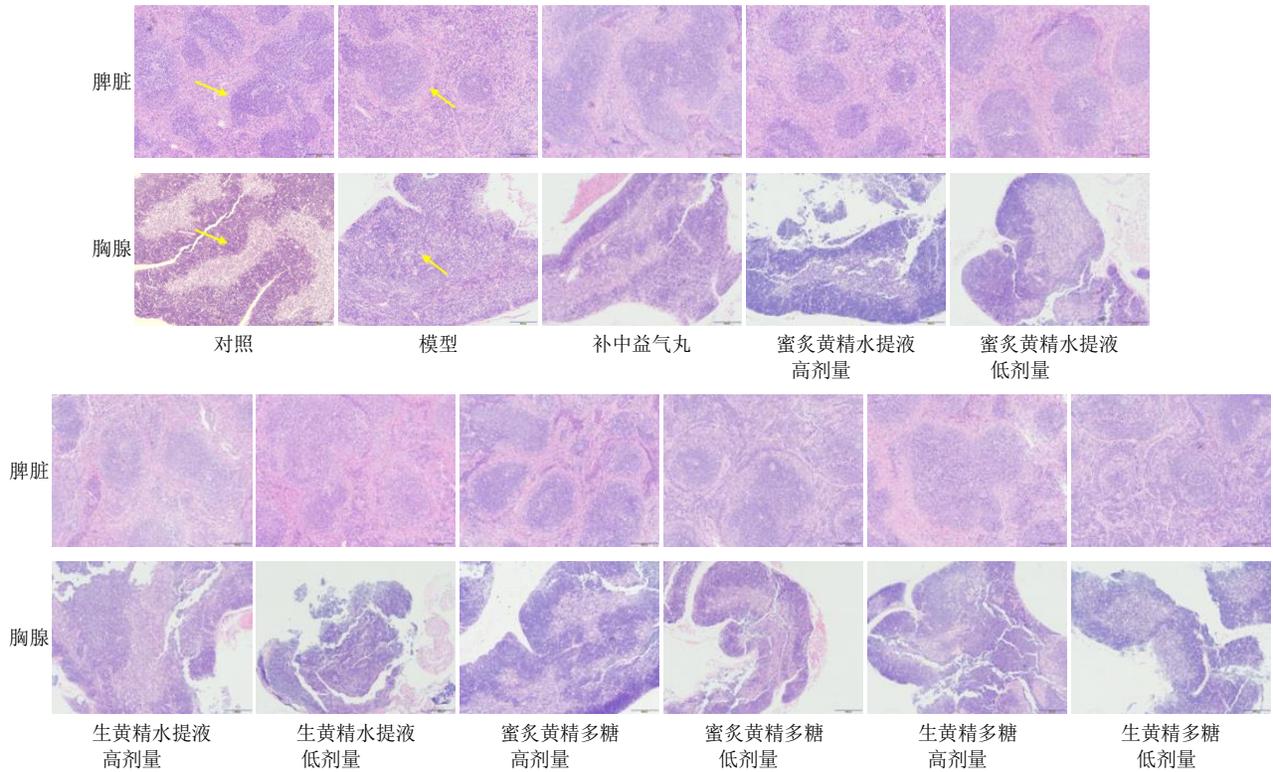


图3 脾脏、胸腺组织 H&E 病理切片结果 (×100)

Fig. 3 H&E pathological sections of spleen and thymus tissue (× 100)

脾虚引起的小鼠免疫器官病理损伤。

2.4.6 蜜炙黄精对脾虚模型小鼠血清中细胞因子胃动素和 IL-1β 水平的影响 取小鼠血清按照 ELISA 试剂盒说明测定小鼠血清中胃动素、IL-1β 分泌水平, 结果如表 10 所示。与对照组相比, 脾虚致模型小鼠血清中胃动素水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 各给药组小鼠血清中胃动素水平均

有不同程度恢复, 蜜炙黄精水提液高剂量组、蜜炙黄精多糖高剂量组、生黄精多糖高剂量组及补中益气丸恢复作用明显, 其中, 蜜炙黄精多糖 (水提物) 高剂量组调节作用最佳, 分别为 (65.54 ± 5.26) ng/L 和 (56.60 ± 2.98) ng/L。以蜜炙黄精多糖高剂量组对脾虚小鼠胃动素恢复作用显著优于生品黄精多糖高剂量组 ($P < 0.05$)。

表 10 蜜炙黄精对脾虚模型小鼠血清中细胞因子胃动素、IL-1β 水平和肝组织中 SOD、Cat、谷胱甘肽、丙二醛水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 10 Effects of honey-fried *Polygonati Rhizoma* on levels of cytokines motilin and IL-1β in serum of mice, and levels of SOD, Cat, glutathione and malonaldehyde in liver tissue of spleen deficiency mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量/ (g·kg ⁻¹) | 胃动素/ (ng·L ⁻¹) | IL-1β/ (ng·L ⁻¹) | SOD/ (U·mg ⁻¹) | Cat/ (U·mg ⁻¹) | 谷胱甘肽/ (μmol·mg ⁻¹) | 丙二醛/ (nmol·mg ⁻¹) |
|---------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| 对照 | - | 76.34 ± 6.33 | 18.88 ± 0.28 | 12.86 ± 1.46 | 77.40 ± 11.10 | 181.09 ± 18.70 | 0.44 ± 0.16 |
| 模型 | - | 47.95 ± 1.77** | 6.50 ± 1.98** | 5.38 ± 0.09** | 41.40 ± 6.67** | 92.09 ± 7.49** | 1.61 ± 0.13** |
| 补中益气丸 | 0.100 | 59.74 ± 3.97# | 15.17 ± 1.44## | 7.55 ± 1.17# | 52.75 ± 1.65# | 128.81 ± 10.05# | 1.08 ± 0.14# |
| 蜜炙黄精水提液 | 1.950 | 56.60 ± 2.98#& | 13.31 ± 2.09##& | 6.83 ± 0.61#& | 52.71 ± 4.73#& | 102.98 ± 4.18#&& | 0.81 ± 0.25# |
| | 0.970 | 54.96 ± 7.90# | 10.96 ± 1.92# | 6.01 ± 0.50& | 46.87 ± 2.82& | 97.99 ± 2.36& | 0.85 ± 0.21# |
| 蜜炙黄精多糖 | 1.950 | 65.54 ± 5.26# | 16.51 ± 1.27### | 10.27 ± 1.87### | 62.94 ± 1.16# | 154.52 ± 16.19### | 0.69 ± 0.11### |
| | 0.970 | 53.70 ± 11.71# | 15.92 ± 2.88### | 9.99 ± 1.35# | 61.78 ± 8.64# | 130.33 ± 13.97### | 0.75 ± 0.12# |
| 生黄精水提液 | 0.800 | 52.42 ± 7.19& | 12.80 ± 0.07###& | 6.76 ± 1.52#& | 48.95 ± 8.84& | 106.31 ± 27.79& | 1.28 ± 0.14#& |
| | 0.400 | 48.45 ± 11.03 | 12.74 ± 2.33### | 5.69 ± 1.81 | 44.85 ± 12.06 | 98.13 ± 12.78 | 1.44 ± 0.23 |
| 生黄精多糖 | 0.800 | 56.25 ± 3.61#& | 13.45 ± 1.96###& | 9.55 ± 0.17### | 57.75 ± 0.65#& | 138.81 ± 16.05###& | 0.82 ± 0.17###& |
| | 0.400 | 53.92 ± 6.74# | 12.33 ± 0.81### | 9.14 ± 0.26# | 57.01 ± 0.40# | 127.75 ± 21.10# | 0.85 ± 0.03# |

与对照组相比,脾虚致模型小鼠血清中 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比,各给药组小鼠血清中 IL-1 β 水平均有不同程度升高,其中,蜜炙黄精多糖高剂量组和生黄精多糖高剂量组 IL-1 β 水平分别为 (16.51 ± 1.27) ng/L 和 (13.45 ± 1.96) ng/L,且均高于相应的水提液高剂量组。经对比可知,蜜炙黄精多糖高剂量组对脾虚小鼠 IL-1 β 恢复作用优于生品黄精多糖高剂量组。

2.4.7 蜜炙黄精对脾虚小鼠肝脏组织中 SOD、Cat、谷胱甘肽及丙二醛水平的影响 精密称取肝组织样品 100 mg,加入 9 倍量生理盐水制备成 10% 的组织匀浆液,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 3 500 r/min 离心(离心半径 8.8 cm) 15 min,取上清液,分别按照相应试剂盒说明书操作,检测肝组织中 SOD、Cat、谷胱甘肽及丙二醛含量。由表 10 可知,与对照组相比,模型组肝脏中 SOD、Cat 及谷胱甘肽活力降低 [(5.38 ± 0.09) U/mg, (41.40 ± 6.67) U/mg, (92.09 ± 7.49) U/mg, $P < 0.01$],表明脾虚可引起小鼠体内发生氧化应激反应且相应氧化酶活力降低。蜜炙黄精、生黄精水提物及相应多糖进行干预后,各组小鼠肝脏中 SOD、Cat 及谷胱甘肽活力均有不同程度恢复,其中以蜜炙黄精多糖组干预作用最优 ($P < 0.05$)。丙二醛结果显示,与对照组相比,模型组小鼠肝脏中丙二醛含量显著升高 [(1.61 ± 0.13) nmol/mg, $P < 0.01$],结果表明脾虚可引起小鼠体内发生氧化应激反应导致肝脏中丙二醛含量异常升高。经蜜炙黄精、生黄精水提物及其相对应的多糖进行干预后,各组小鼠肝脏中丙二醛含量均有不同程度降低,其中,蜜炙黄精多糖高剂量组小鼠肝脏中丙二醛降低了 56.9%,对比可知,蜜炙黄精多糖组对脾虚小鼠肝脏丙二醛升高具有显著抑制作用 ($P < 0.05$)。

3 讨论

历代医药学家通过考量药材在炮制过程中的颜色、形状、味道等性状变化判断饮片的炮制程度及内在品质,但这种评价方式主观性强,药材炮制程度难以量化,炮制“不及”或“太过”均会影响其临床疗效的发挥^[20-21]。20 世纪 60 年代,随着人工智能感官技术的发展,研究者开始不断尝试采用电子眼、电子鼻、电子舌等仿生技术对中药性状特征进行客观化表达,建立起炮制工艺评价新方法,从而确保饮片质量的安全、有效、稳定^[22]。胡嘉懿^[23]采用主观品尝评价与智能感官技术(电子眼、电子鼻、电子舌)对九华黄精蒸制过程中的色泽、气味

及滋味进行量化,探究不同蒸制次数之间九华黄精颜色、滋味、气味的差异及变化。詹慧慧^[24]采用电子舌技术测定 3 种药用黄精炮制前后的味觉值,将饮片味觉与黄精炮制前后糖类成分进行相关性分析,结果显示黄精的甜、酸、咸、鲜与总多糖、果糖含量呈现显著性相关。有学者^[25]采用电子眼技术探究多花黄精酒蒸前后颜色变化与化学成分含量的相关性,结果表明水溶性浸出物、醇溶性浸出物和黄精多糖的含量与总色度值呈显著正相关。本研究将电子眼技术引入“秦药”黄精蜜炙炮制工艺中,采用正交工艺,以醇溶性浸出物、多糖含量及蜜炙黄精饮片的外观性状评分的组合加权评分为指标,优选出蜜炙黄精最佳炮制工艺为蜂蜜(中蜜)用量为黄精质量的 25%,蒸炙 5 次,每次 3 h;最佳工艺的色度为 L^* : 42.400~42.900, a^* : 8.400~8.600, b^* : 18.300~19.900, E^*_{ab} : 46.900~47.800。本研究以数值量化方式说明了黄精蜜炙后饮片颜色由棕黄色逐渐加深过渡为红棕色,再逐渐向“色黑如漆”转变,达到以颜色判断蜜炙黄精饮片炮制程度及质量评价的目的,为性状评价饮片质量的传统经验方法提供一定的理论依据。

研究表明,黄精生品水提液及提取物均能改善模型大鼠免疫功能,具有抗氧化、抗疲劳等药理作用^[26-28];多糖为黄精主要生物活性成分,大量研究显示,黄精多糖广泛参与机体调节血糖、血脂、免疫功能、氧化应激等多种生理过程,具有抗氧化、降血糖、降血脂、调节免疫、抗炎抑菌等多种药理作用^[4]。《食疗本草》记载黄精:“蒸之,若生则刺人咽喉,曝使干,不尔朽坏”^[29]。黄精生品具刺激性,临床上必须使用炮制品。现代研究表明,黄精酒炙品可增强 RAW264.7 细胞活力、巨噬细胞吞噬能力、分泌 NO 能力等,还能抑制免疫抑制模型小鼠 IL-2、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等免疫因子的下降^[12,18]。相较于生品黄精,黄精九蒸九制品水提物总抗氧化能力和 DPPH 自由基清除能力显著提高,游泳力竭小鼠肝、肾、脾的糖原含量及 SOD 活力显著提高,丙二醛含量显著降低^[30-31]。目前,对于黄精炮制品抗氧化及免疫活性的探究,多集中于酒炙品及九蒸九制品,而蜜炙黄精相关性研究尚未深入报道。本研究对最佳工艺所得的蜜炙黄精抗氧化及免疫活性展开研究,结果表明,黄精蜜炙具备铁还原能力、清除 DPPH 自由基、超氧阴离子及羟基自由基作用,其中,以蜜炙黄精多糖

抗氧化活性最优。蜜炙黄精（水提物、多糖）对脾虚小鼠体质量减轻、胸腺和脾脏指数降低以及病理学损伤等均有不同程度的恢复作用；对脾虚小鼠血清中胃动素、IL-1 β 分泌量的降低具有回调作用；对脾虚小鼠肝脏中氧化酶谷胱甘肽、Cat、SOD及丙二醛含量的异常变化有调节作用，其中，以蜜炙黄精多糖的调节作用最佳。由此可见，黄精经蜂蜜炮制后，抗氧化及免疫活性调节作用增强，以蜜炙黄精多糖组活性最佳，推测蜜炙黄精中的多糖类成分为其发挥体内外活性的有效成分。

本研究测得生品黄精饮片中多糖质量分数为8.89%，最佳工艺炮制所得的蜜炙黄精饮片多糖质量分数均值为6.49%，这与大量研究黄精炮制后多糖含量降低结果相一致^[32-33]。本研究通过建立小鼠脾虚模型对黄精蜜炙前后体内抗氧化活性等进行评价，结果显示，蜜炙黄精多糖对脾虚小鼠的调节作用优于生品黄精，即便多糖含量减少，药效反而增强，推测这一现象与其饮片中多糖成分的糖组成、相对分子质量、构象等化学结构密切相关。甘青霞^[8]研究发现黄精蜜炙后对肺损伤小鼠肺部的保护作用增强，正是与蜜炙后多糖的单糖组成与比例变化有关。马永强等^[34]研究发现，黄精九蒸九制后，黄精多糖可以在一定程度上提升体外降血糖和抗氧化活性，这可能与其加工过程中黄精多糖中糖醛酸含量增加、单糖组成改变、多糖-蛋白共价复合物的出现等因素有关。Li等^[35]研究发现黄精蒸制后抗氧化活性增强，与蒸制后多糖的物质的量比不同、相对分子质量增多有关，其中2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS]和羟自由基清除活性与甘露糖的物质的量百分含量呈负相关，与阿拉伯糖的物质的量百分含量呈正相关，ABTS自由基清除活性与葡萄糖物质的量百分含量呈正相关。基于以上研究，课题组后期将会对黄精蜜炙前后多糖的理化性质、精细结构特征进行深入分析，以期阐明黄精炮制后有效成分多糖理化性质的变化，深入研究其多糖结构特征与抗氧化活性及免疫调节活性之间的关系。

本研究对“秦药”黄精蜜炙炮制工艺进行研究，并对其抗氧化活性和脾虚调节作用进行了初步评价，不仅为“秦药”蜜炙黄精系列产品的开发及利用提供理论依据，同时也为其他品种“秦药”的炮制工艺研究及活性评价提供了示范。

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.
- [2] 马存德, 常晖, 杨祎辰, 等. 陕西黄精道地性考证 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(7): 887-891.
- [3] 陆佳岑, 薛畅, 姜程曦. 黄精及有效成分抗衰老作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(14): 4732-4739.
- [4] 李蒙, 陈曦, 李宜航, 等. 黄精多糖药理作用研究进展 [J]. 中医药学报, 2024, 52(8): 95-101.
- [5] 边金焕, 杜李继, 王子丽, 等. 黄精多糖与积雪草苷对糖尿病斑马鱼尾鳍再生的药效学研究 [J]. 中国药理学杂志, 2023, 58(7): 592-598.
- [6] 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.
- [7] 清·黄庭镜著. 李怀芝, 郭君双, 郑金生整理. 目经大成 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 214.
- [8] 甘青霞. 蜜制黄精的炮制工艺和质量物质基础研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2021.
- [9] 石双慧, 王梦琳, 魏晓彤, 等. 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 [J]. 中草药, 2023, 54(14): 4467-4480.
- [10] 徐君, 王秋丽, 俞年军, 等. 多花黄精生品及九蒸品粗多糖降糖功效对比研究 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(1): 391-394.
- [11] 李梅花, 刘灿辉, 丁野, 等. 炼蜜的质量标准研究 [J]. 广州化工, 2023, 51(8): 97-99.
- [12] 孙婷婷, 刘洋, 魏明, 等. 黄精酒制前后水溶性多糖抗氧化活性研究 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(2): 78-84.
- [13] 王庆奎, 邢克智, 赵海运, 等. 当归多糖除蛋白质的方法与条件优 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2): 525-526.
- [14] 孙婷婷, 张红, 李晔, 等. 老龙皮多糖及水提物体外抗氧化活性比较 [J]. 中国药师, 2018, 21(9): 1555-1558.
- [15] 冀建伟, 周宇雪, 刘蕾, 等. 厚朴花低聚糖、多糖的分离纯化及其体外抗氧化活性研究 [J]. 中国药房, 2016, 27(34): 4848-4851.
- [16] 王晓静, 张丽, 陈莉华, 等. 湘西野生金樱子多糖的抗氧化活性分析 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(3): 438-443.
- [17] Yang T, Zhang S, Wang R, et al. Polysaccharides from *Rhizoma Panacis Majoris* and its anti-oxidant activity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 86: 756-763.
- [18] Sun T T, Zhang H, Li Y, et al. Physicochemical properties and immunological activities of polysaccharides from both crude and wine-processed *Polygonatum sibiricum* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 143: 255-264.

- [19] 赵兴兵, 吴维佳, 李丹丹, 等. 小鼠脾虚便秘造模对肠道微生物及酶活性的影响 [J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(9): 993-996.
- [20] 韦春冕, 赵艳丽, 李丹丹, 等. 三七“辨状论质”及其品质成因研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(17): 6026-6039.
- [21] 李捷. 基于化学轮廓分析和“辨状论质”对肉苁蓉产地加工与炮制工艺的研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2021.
- [22] 闫蓓蓓, 邵冰梅, 吕志强, 等. 人工智能感官技术在中药炮制研究中的应用 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(11): 2665-2669.
- [23] 胡嘉懿. 产业化蒸制过程中九华黄精的品质评价及降血糖作用差异研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2023.
- [24] 詹慧慧. 基于糖类成分对黄精、玉竹炆法炮制质量分析研究 [D]. 江西: 江西中医药大学, 2022.
- [25] 岳珠珠, 王志成, 姜明瑞, 等. 多花黄精酒蒸过程中色泽与化学成分含量的相关性研究 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(2): 356-359.
- [26] 吴柳花, 吕圭源, 李波, 等. 黄精对长期超负荷游泳致阴虚内热模型大鼠的作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(10): 1886-1891.
- [27] 卢焕俊, 刘思源, 李香兰. 黄精提取液对正常小鼠抗疲劳能力的影响及机制探讨 [J]. 山东医药, 2014, 54(27): 39-41.
- [28] 毛雁, 马兰军, 熊正英. 黄精对力竭训练大鼠血清酶活性及某些生化指标的影响 [J]. 第四军医大学学报, 2007(20): 1842-1844.
- [29] 唐·孟诜, 张鼎著. 食疗本草 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 2.
- [30] 张莉, 刘健, 李强明. 炮制对多花黄精水提物抗氧化活性的影响 [J]. 合肥工业大学学报: 自然科学版, 2023, 46(12): 1711-1716.
- [31] 陈杨杨, 胡慧玲, 奉关妹, 等. 多花黄精炮制前后对游泳力竭小鼠抗疲劳氧化的影响 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(2): 92-96.
- [32] 牛世蓉, 李敏敏, 崔伟业, 等. 高压蒸汽热加工对滇黄精抗氧化及抗炎活性的影响 [J/OL]. 食品工业科技, (2024-09-24) [2024-11-27] doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050440.
- [33] 管彦辉, 梁正维, 施扬, 等. 滇黄精炮制前后化学成分变化研究 [J]. 中草药, 2024, 55(11): 3647-3658.
- [34] 马永强, 张一鹏, 王鑫, 等. 九蒸九制对黄精中 AGEs 含量、多糖结构及体外活性的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(3): 226-234.
- [35] Li Q Y, Zeng J, Gong P X, *et al.* Effect of steaming process on the structural characteristics and antioxidant activities of polysaccharides from *Polygonatum sibiricum* rhizomes [J]. *Glycoconj J*, 2021, 38(5): 561-572.

[责任编辑 郑礼胜]