



黄精多糖检测研究进展

章笑寒, 施凯允, 金文闻, 朱圆敏, 陈雪敏, 白云*

华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉430074

*通信作者(baiyunhust@foxmail.com)

摘要: 黄精(*Polygonatum sibiricum*)作为一种药食两用中药材, 在我国有近千年药用历史, 其多重功能与多种成分有关, 其中黄精多糖具有重要的健康价值。本文从黄精生物活性、结构特点、含量检测方面入手, 综述了黄精多糖检测发展过程, 为研究和应用黄精多糖并根据具体需求和条件选择合适检测方法提供依据。

关键词: 黄精多糖; 生物活性; 结构特点; 含量检测

Advances in *Polygonatum* polysaccharides determination

ZHANG Xiaohan, SHI Kaiyun, JIN Wenwen, ZHU Yuanmin, CHEN Xuemin, BAI Yun*

College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

*Corresponding author (baiyunhust@foxmail.com)

Abstract: *Polygonum sibiricum* has been used as food and medicinal herb for nearly one thousand years in our country. Its multiple functions are related to a variety of components, among which polysaccharide has important health value. This article explores the biological activity, structural characteristics, and quantitative determination of *Polygonatum* polysaccharide. It reviews the evolution of detection methods for *Polygonatum* polysaccharide, offering insights for research and application in this field, as well as guidance on selecting suitable detection methods based on specific requirements and circumstances.

Key words: *Polygonatum* polysaccharides; biological activity; structural characteristics; quantitative determination

黄精属(*Polygonatum*)是被子植物百合科的一个属, 多为多年生草本植物, 生长在海拔200~4 000 m阴暗潮湿的地方, 根可作功能食品或药用。世界上黄精属植物约有70种, 主要分布在北半球的中国、日本、韩国、俄罗斯、印度等国家(Huang等2021)。黄精(*P. sibiricum*)是该属代表性功能植物, 应用历史悠久。

黄精所含的化学成分包括多糖、皂苷和黄酮等物质, 以多糖含量最高(刘爽等2021; Xiaowei等2019), 且不同类型的黄精在多糖含量和单糖构成上有所不同, 其中‘鸡头黄精’多糖含量最为丰富

(Cui等2018)。黄精多糖不仅是黄精化学构成中的关键成分, 也是评估黄精品质的核心指标。

现代科学研究中, 对于黄精多糖的研究主要集中在其生物活性、构效关系、检测方法上, 已经取得一定进展, 但是由于黄精多糖成分复杂, 若要更好地明确其活性和功能需要对其进行精确检测。本文主要综述了近年来研究者在黄精多糖检测方面的研究和应用现状, 为进一步研究和应用黄

收稿 2024-04-29 修定 2024-07-19

资助 华中科技大学校企合作项目(20232400)。

精多糖并根据具体的需求和条件选择合适的检测方法提供依据。

1 黄精多糖生物活性

1.1 抗肿瘤

癌症已成为仅次于心血管疾病的全球死亡率第二高的疾病。大量研究表明黄精水提取物或醇提取物,在乳腺癌、肺癌、宫颈癌、胃癌及肝癌等体外实验研究中,均表现出阻滞肿瘤细胞周期、诱导细胞凋亡的作用(张国文等2023)。例如, Xie等(2021)发现持续注射15 d富含多糖的黄精提取液虽然不能显著抑制三阴性乳腺癌肿瘤生长,但能有效降低肿瘤浸润细胞中免疫抑制髓系细胞的百分比,减少脾造血细胞扩张。在癌症治疗中,黄精多糖的主要药理作用途径分为细胞周期阻滞和免疫调节两部分,参与免疫调节的关键信号通路是NF- κ B信号通路(Kocarnik等2022; Guo等2022)。然而,由于缺乏对黄精多糖结构与抗肿瘤活性之间的构效关系的研究,以阐明其治疗癌症的药理机制,制约了相关多糖产品的开发(Gong等2022)。

1.2 抗菌抗炎

黄精多糖已被证明对各种革兰氏阴性菌和阳性菌具有较强的抗菌活性。研究发现黄精多糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、藤黄球菌和枯草芽孢杆菌都具有明显抑制作用,并且抑菌圈直径随着黄精浓度增大而增大,在肾损伤、急性肺损伤和自身免疫性心肌炎模型中均表现出良好的抗炎作用(Hou等2020)。以多花黄精(*P. cyrtonema*)为例, Li等(2021)从其胞浆体中提取的中性多糖的磷酸化衍生物和硫酸酸化衍生物,可以通过抑制病毒附着和进入宿主细胞来体外抑制二型单纯疱疹病毒。在体外,黄精多糖还通过抑制TLR4/NF- κ B通路的作用来抑制炎症,从而减少脂多糖诱导的BEAS-2B细胞凋亡。总的来说,黄精多糖的抗炎作用包括抑制氧化应激以及降低炎症因子水平两种,有潜力作为一种优秀的抗炎补充治疗剂帮助治疗多种疾病。

1.3 抗氧化

研究发现,黄精多糖具备清除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)自

由基和羟基自由基的功能,并且随着多糖浓度上升,其清除效率也相应提高,显示出明确的量效关联(陶爱恩2021)。Li等(2021)通过清除DPPH自由基、亚铁离子自由基、羟基自由基和2,2'-联氨基双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS⁺]自由基,证实了黄精多糖的体外抗氧化活性。

1.4 其他功效

黄精被证明在提升学习和记忆能力方面具有显著作用,特别是对于增强神经突触功能方面有所帮助。据杨晶莹等(2020)的研究报道,黄精制的黄精丸配方能够提升大脑的抗氧化能力,改善神经炎症反应,减少氧化应激引起的 β -淀粉样多肽1-42的积累,保持淀粉样前体蛋白的表达,从而有助于预防阿尔茨海默病的发生。雷升萍等(2017)的研究同样表明,黄精在阿尔茨海默病的治疗中显示出潜在的疗效,它能够降低心肌细胞的凋亡,同时在缺氧复氧引起的H9c2心肌细胞损伤中表现出类似屏障的作用。此外,一些学者的研究已经发现黄精对心脑血管具有调节作用,并可以用于治疗缺血性脑损伤。

2 黄精多糖结构检测

目前,黄精多糖的结构特征和理化性质已从专一性、分子质量、单糖组成、糖键、糖构象、主链和支链鉴定、聚合等角度得到了多方面阐述。从黄精中成功检测出的多糖已超过35种,但只有少数得到了很好的表征。

2.1 分子质量

一般来说,多糖的分子质量以平均分子质量表示。传统用来确定黄精多糖分子质量的方法如光散射法、粘度法等常具有操作复杂、容易产生误差的缺点,目前使用较多的方法是凝胶渗透色谱和高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC),它们都必须使用分子质量已知的标准多糖作为对照。研究表明,黄精多糖分子的质量大多在5.1~322 kDa之间,且可分为5.1~14.2和42~322 kDa两大区间(Wang等2020)。从不同的黄精属植物中能分离得到不同质量的多糖分子,其差异主要受原料、混合物数量、分离设备等因

素影响(Chen等2020; Jiang等2018)。

2.2 单糖组成

单糖组成的测定始于多糖的完全酸水解, 从而产生单糖, 然后是水解产物的衍生化, 最后通过HPLC或气相色谱/质谱(gas chromatography/mass spectrometry, GC/MS)进行检测。Hu等(2021)探索了一种利用超高效液相色谱-四极杆串联质谱法测定黄精多糖中单糖的新方法, 证明黄精多糖多为中性, 主要由甘露糖、半乳糖、葡萄糖和果糖组成; 少数为酸性, 主要由鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖醛酸组成。黄精多糖中单糖组成的不同主要是由于药材来源、加工方法、加工时间、提取溶剂、分离设备和分离流动相的差异(Sun等2020)。

2.3 糖链结构

黄精多糖的糖链结构主要指的是糖苷键的种类及连接方式。甲基化分析是判断糖残基类型及位置最常用的化学方法之一, 其主要过程是将多糖中游离羟基全部甲基化, 然后水解得到部分甲基化的单糖, 将这些单糖还原和乙酰化, 最后用GC/MS推测出糖苷键的连接方式。红外光谱(infrared spectrum, IR)和核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)常与化学分析手段结合使用。其中, 红外光谱基于对干涉后的红外光进行傅里叶变换的原理, 生成代表样品分子结构特征的红外“指纹”光谱, 从而判断和区分不同的分子结构。核磁共振的原理主要是利用原子核在强磁场中发生能级分裂, 吸收外来电磁辐射后发生核自旋能级的跃迁, 即产生核磁共振。NMR分析通过记录高频磁场下质子化学位移来判断多糖的异头构型、糖苷键连接方式和连接顺序等信息。

迄今为止, 黄精多糖已被确定具有半乳聚糖、果聚糖、葡甘露聚糖、甘露半乳聚糖和阿拉伯半乳聚糖的结构。然而由于提取方法和色谱柱的不同, 各种研究报道的黄精多糖结构也不同。如Yelithao等(2016)从黄精中分离到多糖, 通过单糖组成、分子质量、甲基化分析和 ^1H NMR对其结构进行了鉴定, 证明其的结构以1,4-Manp和1,4-Glcp为骨架, 终止于1,5-Araf, Gal和Glc残基与甘露糖残基的O-6相连。Wang等(2022)从黄精中分离出一种具有神经保护活性的同质多糖, 其重复单元包含2,1-

β -D-Fruf、1,6- α -D-Glcp、1,4- β -D-Manp和1,6- β -D-Glcp组成的主干, 以及一个由2,1,6- β -D-Fruf、2- β -D-Fruf和2,6- β -D-Fruf组成的分支。连接位点位于2,1- β -D-Fruf的C-6位置。通过红外色谱技术、核磁共振技术、甲基化分析能对其结构进行进一步详细解读。

2.4 高级结构

目前, 黄精多糖的高阶结构特性仍处于初级研究阶段, 已知的是糖的形态通常表现为多孔的片状结构和多分支的聚集结构(Li等2021)。借助二维核磁共振谱、X单晶衍射、刚果红测定等方法得出的数据资料, 学者可以通过使用计算机来模拟黄精多糖在空间上的构象分布, 这为黄精多糖的结构分析开辟了全新的研究方向。

3 黄精多糖含量检测方法

3.1 检测前预处理

传统的黄精多糖提取是利用水作为溶剂来实现的。目前, 提取黄精多糖已经发展出了更多新方法, 如酶解提取, 或与超声波提取和微波提取等多种技术联用。黄精多糖具有重要的生物学功能, 如抗氧化、免疫调节和降血脂功能。不同的提取方法对它们的结构和活性有影响。有研究采用热水提取、碱提取、超声波辅助提取、酶辅助提取、微波辅助提取和冻融辅助提取六种提取方法提取黄精多糖, 并分析了它们的构效关系。结果表明, 六种黄精多糖具有相似的官能团组成、热稳定性和糖苷键组成。因此可以认为提取方法对含量检测影响较小(Yuan等2019)。

经过粗提, 提取液中除了多糖还含有多种杂质, 包括蛋白质、色素、寡糖以及维生素等。在实际应用过程当中, 这些杂质可能会干扰黄精多糖的活性成分, 或导致其检测精度降低, 因此需要对黄精粗多糖进行提纯处理, 以便排除干扰。对于黄精多糖中所含的色素, 常见的脱色剂包括活性炭、双氧水、树脂等。活性炭具有发达的孔隙结构, 对提取液内的色素具有较强的吸附能力, 尤其是有机杂质。但同时活性炭对部分大分子物质包括多糖也具有吸附作用, 因此会造成黄精多糖含量的损失。双氧水是一种氧化型漂白剂, 在降解色素时具有专一性, 不会破坏黄精多糖的结构(王莹等

2021)。用于脱色的树脂通常也具有多孔结构, 高度结构化的表面可以固定色素, 而黄精多糖随流动相流出(梁引库和吴三桥2012)。

Sevage法(氯仿-正丁醇或氯仿-戊醇)是常用的除去粗黄精多糖中蛋白杂质的方法之一。Sevage法成本低, 适用范围广, 通过使蛋白质变性而沉淀来达到分离纯化的目的。但该方法耗时较长, 且有使多糖结构和活性发生改变的风险, 还会造成一定的含量损失(刘小攀等2016)。三氯乙酸使用也较为广泛, 它具有较强的酸性, 可使蛋白质失活形成不可逆的沉淀而被除去, 具有效率高、易操作等特点, 但也会造成一定损失。此外, 木瓜蛋白酶法是一种较为温和的除蛋白方法, 其高特异性能在很大程度上保护多糖的结构(施伽等2017)。

目前也有文献报道一种先用乙醇沉淀多糖排除小分子物质干扰, 再除蛋白进行测定的方法(李毅等2006), 尤其对于包含多个多糖成分的粗多糖样品来说, 合理选择和安排前处理步骤是十分必要的。

3.2 黄精多糖检测——比色法

比色法因操作简便, 在分析多糖含量中被广泛使用。其原理是将浓硫酸与多糖样品混合进行水解反应, 生成寡糖和单糖, 与显色剂发生显色反应后, 利用比较或测量生产的有色物质溶液的颜色深度来确定待测组分的含量(李计萍2014; 刘丹2008)。下述前两种方法使用最多, 最后一种主要用于测量还原糖含量。

3.2.1 苯酚-硫酸法

有许多学者已经证明, 硫酸用量、显色温度、显色时间等对显色均有一定影响, 故优化显色条件是准确测定药材中多糖含量的前提。其中, Chen等(2023)研究发现, 温度是影响苯酚-硫酸法颜色显影过程的关键参数。若温度控制得当, 它甚至可以掩盖硫酸的添加方式对显影的颜色强度造成的影响。如果通过非常缓慢地加入硫酸和在冰浴中以耗时的方式冷却试管来控制系统温度显然十分耗时。为了提高效率, 他们设计了一种预混试剂, 即在冰浴中混合硫酸和水, 然后向冷酸溶液中加入纯苯酚。将预混试剂一步加入样品后, 将混合物在沸水浴中孵育以显色。该方法的色强重现性好,

可与单独加入硫酸和苯酚或以不同速度加入硫酸和苯酚的颜色相媲美。

现阶段, 苯酚-硫酸法的检测主要依赖于紫外分光光度计。但由于比色槽的数量限制, 这种方法在测定多个样本时操作复杂、耗时, 并且会产生大量的含浓硫酸的废液, 这对操作人员和环境都可能带来不良影响(朱金霞等2016)。酶标仪和紫外分光光度计在测试原理上十分相似(高倩等2019), 但酶标仪的96孔比色使得它能够一次性完成多个样本的测量, 从而显著提升检测效率。因此, 罗春萍(2021)建议使用酶标仪替代紫外分光光度计作为测量工具, 以研究多糖的快速批量检测方法。经过研究, 确定了酶标仪快速定糖法的最佳实验条件为: 波长490 nm、苯酚用量200 μ L、浓硫酸用量700 μ L、反应温度80 $^{\circ}$ C、反应时间10 min。这一方法具有高度的灵敏性和稳定性, 能够在相对较短的时间里完成多糖样本的大规模检测。

苯酚-硫酸法是测量总糖含量方法中使用最为广泛的方法之一, 但不同于组成单一的均多糖, 杂多糖若采用单一单糖制作标准曲线进行测量, 测得的结果均与真实情况存在差异, 因此对照品的选择显得格外重要。目前主要的解决方法包括按照单糖组成比例制成标准溶液或以多糖校正因子来修正, 但后者同样更适合均多糖, 对于杂多糖的准确测量仍旧是相关研究的一个难点(李计萍2014)。

3.2.2 蒽酮-硫酸法

对于蒽酮-硫酸法而言, 其相对苯酚-硫酸法应用和研究较少, 可能主要是由于在试验过程中蒽酮在硫酸中结构易被破坏, 较为繁琐。为此, 刘海英等(2013)探究得出80%硫酸应提前1 h配制, 待其温度与室温一致时, 称取蒽酮立即用于试剂配制, 可以提高实验准确度。

在众多文献中虽然对于蒽酮比色法的描述存在较大差异, 包括蒽酮试剂的用量、硫酸的浓度以及糖显色需时等, 但胡德分等(2023)采用蒽酮-硫酸比色法, 在620 nm波长下, 分别考察显色剂浓度、显色剂用量、显色时间、显色温度的单因素影响, 发现影响吸光度因素顺序为显色剂用量>显色温度>显色时间。另一方面, 现在主流使用的蒽

酮比色法总地来说可以区分为两大类,即外加热法和水合热法。其中外加热法又可分为稀硫酸外加热法和浓硫酸外加热法。刘桂茹(2016)为选定适合的实验室测糖方法,分别采用上述方法对蔗糖标准样品进行测试,结果表明稀硫酸外加热为最合适的实验方法。

3.2.3 3,5-二硝基水杨酸法

3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法是一种在碱性条件下进行的检测方法,可以用来测定还原糖和总糖的含量,并且通过计算多糖含量等于总糖减去还原糖的方式,可以得到多糖的含量(李卫彬等2008)。以张志君等(2012)为例,他们结合DNS法和苯酚-浓硫酸进行实验,所得结果在重复性、精密度、稳定性等方面都达到了预定的标准,因此非常适合用于评估黄精生药材的质量。

此外,邵锦挺等(2012)为了更准确地检测微量样本并快速处理大量样本,对传统的DNS法进行了优化。他们使用酶联免疫测定仪的微盘比色技术来测定多糖水解液中的还原糖含量,这不仅确保了检测的准确性,还有效地减少了样本检测的损耗,并提高了检测的效率。

3.3 黄精多糖检测——色谱法

与比色法相比,色谱法在测定准确性上表现得更为出色,并且随着色谱技术的持续进步,色谱法已逐渐取得更重要的地位。色谱法又称层析法,其分离原理是根据待测混合物中的各个成分具有的不同物理属性,导致它们与固定相和流动相之间的作用力产生差异。各溶质在两相做相对移动时进行多次平衡,最终相互分离进入检测器。通过放大各组成部分产生的离子流信号,这些信号在记录器上被展示为相应的色谱峰,从而实现了对本样进行详细分析的目标(曹环礼2009)。

3.3.1 气相色谱检测法

气相色谱是以气体作为流动相的分配色谱,可以分为两种类型:气固色谱(gas-solid chromatography, GSC)和气液色谱(gas-liquid chromatography, GLC)。GSC方法的基本原理在于固体材料(即吸附剂)表面的吸附差异。吸附的发生是由于非特异性(定向、诱导和分散)和特异性相互作用(络合、

氢键等)。GLC分离原理是由于气体目标与固定相相互作用的结果而导致的物理化学分离(Mametov等2021)。

气相色谱技术能够对多糖的成分和含量进行定性和定量分析,通常是通过多糖酸水解或甲醇醇解,并采用衍生物法来提高其挥发性。在进行GC分析时,糖可以分为三甲基硅醚衍生物和糖衍生物两种类型的衍生物(王静等2001)。

由于气相色谱系统体积庞大,大多数仪器都是固定的,只有少数仪器可以用车辆运输。而由于气相色谱分析的广泛适用性,将大量样品运输到实验室同样也需要耗费许多时间和资源,这些因素促进研究人员开始思考如何实现GC系统小型化的问题。为了将桌面气相色谱装置转换成便携式现场系统,应用微机电系统(MEMS)技术是解决方法之一。另一方面,随着现代分析系统需要,探索制备涂层的新方法也是建立新的、选择性更强且成本更低的气相色谱技术的新思路(Mametov等2021)。

3.3.2 凝胶渗透色谱检测法

凝胶渗透色谱(gel permeation chromatography, GPC)也称作体积排斥色谱,它用高度多孔性的、非离子型的凝胶小球将溶液中多分散的聚合物逐级分开,配合分子质量检测器使用即可得到分子质量分布;用相应的多糖作标准品,也可同时实现多糖的含量测定(陈芸芸等2005; López-Barajas等1998)。

3.3.3 离子色谱检测法

离子色谱(ion chromatography, IC)法是以低交换容量的离子交换树脂为固定相对离子性物质进行分离,用电导检测器连续检测流出物电导变化的一种色谱方法(何连军等2017)。该方法无需衍生前处理、操作简便,是目前比较认可的一种多糖含量测定方法之一。然而一些研究者发现,在使用该方法时,如果多糖的水解温度和时间控制不当,易导致果糖降解,从而影响检测结果(李静等2012)。

传统的离子色谱法测定多糖含量的研究中大多使用常规的湿法消解方法,即采用硫酸或三氟乙酸在高温下消解3~12 h (Xie等2013; Zhao等

2020)。近年来,微波消解技术作为一种快速、简单的样品前处理方法逐渐受到关注并发展起来(Bizzi等2017)。通过联用这两种方法既能大大缩短样品的水解时间又具有较高的灵敏度,但对仪器及试剂要求高(颀东妹等2022)。

3.3.4 HPLC检测法

HPLC是一种利用液体流动相、高压输液系统对试样进行分析的方法。在该方法中,具有不同极性的单一溶剂或混合溶剂被泵入色谱柱中,各成分分离后进入检测器进行检测。该方法分辨率高,重现性好,特别适用于某些热敏性糖类和多糖分子质量的检测;在测定多糖含量时展现出了良好的稳定性、高效的分离能力和快速的测定速度,但其检测器(示差折光检测器)的灵敏度较低,限制了其广泛应用(杨浩2012)。

在进行HPLC分析研究时,由于糖类本身不具有紫外吸收和荧光吸收的特点,一般需要先对其进行衍生化处理。常用的糖类紫外衍生化试剂之一是1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolinone, PMP), PMP柱前衍生法即在样品上柱前需经历硫酸或三氟乙酸水解和PMP衍生的过程(Vojvodić等2022)。但应用该方法时存在前处理耗时、长时间强酸高温环境易引起目标物质不稳定等缺点。为了缩减样品前处理时间,提高目标物质的专属性与稳定性,有学者尝试建立微波消解技术前处理样品法与PMP柱前衍生-HPLC法进行联用,所得结果准确、可靠、适用性强(燕梦雨等2022)。

高效阴离子交换色谱-脉冲安培法将HPLC技术与离子交换技术相结合,以具有大孔或薄壳型或多孔表面层结构的离子交换树脂作为色谱填料,借助物质在离子树脂与淋洗液之间的解离和分配差异达到迅速、连续、高效和灵敏分离检测的效果。该技术的发展为糖类化合物的分析提供了简便有效的途径,并已成为测定多糖含量的首选方法之一(唐静等2016),在相关领域中的应用日益广泛。

3.4 其他检测方法

红外光谱技术能够迅速、简便且无损地对多个成分的结构进行分析。吕悦等(2022)通过近红

外光谱法结合偏最小二乘法(PLS)建立了黄精近红外多指标定量模型,从而可实现对黄精中多糖等成分的快速测定,具有良好的准确性。

高光谱成像技术是一种快速、无损的检测方法,近年来得到了广泛发展。这种技术结合了图像技术和光谱技术,可以获得图像纹理信息和多波段的光谱信息,因此在产品外观品质评价和内部成分含量检测方面应用越来越广泛(李江波等2011; ElMasry和Nakauchi 2016)。其缺点是设备较为昂贵,限制了其推广使用。但目前随着研发的逐步推进,其成本已取得一定程度的降低;未来若各方联合建立高光谱图像数据库,也将进一步促进该项技术的发展。

4 结论与展望

总体而言,对于不同种类和结构的黄精多糖的分析方法已经取得了各种程度的突破(表1),但鉴于多糖的多样性和复杂性,亟待解决的问题还有很多。例如,传统的比色法和逐渐兴起的色谱法等都是通过水解的单糖来反映总糖的含量,而不是多糖含量测定的专属方法;粗多糖经过了一定的纯化过程,仍然包含了少量的蔗糖、淀粉等成分,在使用比色法时显色反应中可能会产生糠醛或其相关衍生物,从而使多糖的含量被过高估计(杨新新等2016);缺乏合适的多糖纯品使得测定精确度降低;样品中中性糖和酸性糖相互干扰等等。

目前主流的解决方法是探索显色剂的用量、显色时间等因素,增加测量的准确性,融合多种技术策略也是如今的热门方向之一。部分色谱法能在粗多糖的基础上制备纯多糖,并计算分子质量,在实验条件允许的情况下,采用此法代替比色法,能解决多糖定量测定方法中的一些瓶颈,但又会产生成本、操作等等问题。

综上所述,由于检测手段限制了对多糖高级结构等研究,进一步优化多糖含量检测方法逐渐成为中药黄精研究中的热点,未来在黄精多糖的检测上建立方便操作、高安全性、高准确性、具有标准化流程的方法将对黄精多糖质量控制和含量检测标准的制定等方面产生积极影响。

表1 黄精多糖含量检测技术简况				
Table 1 A brief introduction of the technology for quantitative determination of <i>Polygonatum</i> polysaccharides				
类别	名称	特点	研究进展	参考文献
比色法	苯酚-硫酸法	操作简单, 稳定性好, 易受色素影响	先预混试剂(在冰浴中混合硫酸和水, 然后向冷酸溶液中加入纯苯酚), 后沸水浴中孵育 用酶标仪替代紫外分光光度计, 提高检测效率, 减少环境压力 以葡萄糖为标准, 结合杂多糖的单糖组成, 通过校正因子的校正来得到更准确的总糖含量	Chen等2023 罗春萍2021 Yue等2022
	蒽酮-硫酸法	试剂不稳定, 易受蛋白质影响	吸光度影响因素: 显色剂用量>显色温度>显色时间 稀硫酸外加热法稳定性佳、经济、易于操作, 是最适合实验应用的方法之一	胡德分等2023 刘桂茹2016
	3,5-二硝基水杨酸法	可联合苯酚-硫酸法或蒽酮-硫酸法根据“多糖=总糖-还原糖”准确测定多糖含量	采用酶联免疫测定仪微盘比色, 在保证检测精确性的前提下有效减少了样品检测损耗量, 提高了检测效率	邵锦挺等2012
色谱法	气相色谱法	能够对多糖的成分和含量进行定性和定量分析	—	—
	凝胶渗透色谱法	可分离样品, 也可检测分子质量和含量	—	—
	离子色谱法	无需衍生前处理, 操作简便	联用微波消解技术, 既能大大缩短样品的水解时间, 又具有较高的灵敏度, 但实验条件较严格, 对仪器及试剂要求高	颀东妹等2022
	高效液相色谱法	稳定性良好, 速度快, 分离高效, 但检测器灵敏度较低	联用微波消解技术前处理样品法与PMP (1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮)柱前衍生-高效液相色谱法, 所得结果准确、可靠、适用性强 联用离子交换技术, 即高效阴离子交换色谱-脉冲安培法达到了迅速、连续、高效和灵敏分离检测的效果	燕梦雨等2022 唐静等2016
其他	红外光谱技术	能够迅速、简便且无损地对多个成分的结构进行分析	结合偏最小二乘法(PLS)建立黄精近红外多指标定量模型, 可实现对黄精中多糖等成分的快速测定, 具有良好的准确性	吕悦等2022 ElMasry和
	高光谱成像技术	快速, 无损, 但设备较为昂贵	在产品外观品质评价和内部成分含量检测方面应用越来越广泛	Nakauchi 2016

参考文献(References)

Bizzi CA, Pedrotti MF, Silva JS, et al (2017). Microwave-assisted digestion methods: towards greener approaches for plasma-based analytical techniques. *J Anal At Spectrom*, 32: 1448–1466

Cao HL (2009). Research progress and application of gas chromatography technology. *Guangdong Chem Ind*, 36 (8): 100–101, 120 (in Chinese with English abstract) [曹环礼(2009). 气相色谱技术的研究进展及其应用. *广东化工*, 36 (8): 100–101, 120]

Chen W, Gao L, Song L, et al (2023). An improved phe-

- nol-sulfuric acid method for the quantitative measurement of total carbohydrates in algal biomass. *Algal Res*, 70: 102986
- Chen YY, Wang W, Ding Y, et al (2005). Determination of polysaccharide in Thizishenyue capsule by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Chin Pharm J*, 40 (7): 540–542 (in Chinese with English abstract) [陈芸芸, 王伟, 丁怡等(2005). SE-HPLC测定太子神悦胶囊中多糖相对分子质量分布及含量. *中国药学杂志*, 40 (7): 540–542]
- Chen Z, Liu J, Kong X, et al (2020). Characterization and immunological activities of polysaccharides from *Polygonatum sibiricum*. *Biol Pharm Bull*, 43 (6): 959–967
- Cui X, Wang S, Cao H, et al (2018). A review: the bioactivities and pharmacological applications of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides. *Molecules*, 23: 1170
- ElMasry M, Nakauchi GS (2016). Image analysis operations applied to hyperspectral images for non-invasive sensing of food quality – a comprehensive review. *Biosyst Eng*, 142: 53–82
- Gao Q, Liu FH, Shi YR, et al (2019). Determination method of polysaccharide content in natural plant polysaccharide compound based on microplate reader. *Chin J Anim Nutr*, 31: 922–929 (in Chinese with English abstract) [高倩, 刘凤华, 史雅然等(2019). 一种基于酶标仪检测天然植物复方多糖中多糖含量的方法. *动物营养学报*, 31: 922–929]
- Gong H, Gan X, Li Y, et al (2023). Review on the genus *Polygonatum* polysaccharides: extraction, purification, structural characteristics and bioactivities. *Int J Biol Macromol*, 229 (28): 909–930
- Guo R, Chen M, Ding Y, et al (2022). Polysaccharides as potential anti-tumor biomacromolecules – a review. *Front Nutr*, 9: 838179
- He LJ, Gan YP, Lü WD, et al (2017). Monosaccharide composition analysis on polysaccharides in *Polygonatum cyrtoneura* by high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 48: 1671–1676 (in Chinese with English abstract) [何连军, 干雅平, 吕伟德等(2017). 高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法测定多花黄精多糖的单糖组成. *中草药*, 48: 1671–1676]
- Hou C, Chen L, Yang L, et al (2020). An insight into anti-inflammatory effects of natural polysaccharides. *Int J Biol Macromol*, 153: 248–255
- Hu DF, Liu JM, Li FJ, et al (2023). Determination and optimization of the polysaccharide content of *Gastrodia Elata* Bl. f. *glauca* by anthrone-sulfuric acid methods. *J Yunnan Natl Univ*, 6: 687–694 (in Chinese with English abstract) [胡德分, 刘金美, 李凤娇等(2023). 蒽酮-硫酸法测定乌天麻多糖含量的条件优化. *云南民族大学学报*, 6: 687–694]
- Hu J, Cheng H, Xu J, et al (2021). Determination and analysis of monosaccharides in *Polygonatum cyrtoneura* Hua polysaccharides from different areas by ultra-high-performance liquid chromatography quadrupole trap tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*, 44 (18): 3506–3515
- Huang S, Yuan H, Li W, et al. (2021). *Polygonatum sibiricum* polysaccharides protect against MPP-induced neurotoxicity via the Akt/mTOR and Nrf2 pathways. *Oxid Med Cell Longev*, 2021: 8843899
- Jiang H, Xu Y, Sun C, et al (2018). Physicochemical properties and antidiabetic effects of a polysaccharide obtained from *Polygonatum odoratum*. *Int J Food Sci Technol*, 53 (12): 2810–2822
- Jie DM, Wang NL, Liu XX, et al (2022). Determination of the content and composition of *Lycium barbarum* polysaccharides by microwave digestion-ion chromatography. *J Food Saf Qual*, 13: 1065–1072 (in Chinese with English abstract) [颀东妹, 王宁丽, 刘笑笑等(2022). 微波消解-离子色谱法测定枸杞多糖的含量及组成. *食品安全质量检测学报*, 13: 1065–1072]
- Kocarnik JM, Compton K, Dean FE, et al (2022). Cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life years for 29 cancer groups from 2010 to 2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019. *JAMA Oncol*, 8 (3): 420–444
- Lei SP, Long ZJ, Shi H, et al (2017). Protection of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides on H9c2 myocardial cells injury induced by hypoxia-reoxygenation. *Pharm Clin Chin Mater Med*, 33: 102–106 (in Chinese with English abstract) [雷升萍, 龙子江, 施慧等(2017). 黄精多糖对缺氧复氧诱导H9c2心肌细胞损伤的保护作用. *中药药理与临床*, 33: 102–106]
- Li J, Li RY, Liang RN (2012). Determination of Monosaccharide Constituents in *Lycium Barbarum* polysaccharide using capillary ion chromatography with pulsed amperometric detection. *Anal Chem*, 40: 1415–1420 (in Chinese with English abstract) [李静, 李仁勇, 梁立娜(2012). 毛细管型离子色谱-脉冲安培法检测枸杞多糖的单糖组成. *分析化学*, 40: 1415–1420]
- Li JB, Rao XQ, Ying YB (2011). Advance on application of hyperspectral imaging to nondestructive detection of agricultural products external quality. *Spectrosc Spectral Anal*, 31: 2021–2026 (in Chinese with English abstract) [李江波, 饶秀勤, 应义斌(2011). 农产品外部品质无损检测中高光谱成像技术的应用研究进展. *光谱学与光谱分析*, 31: 2021–2026]
- Li JP (2014). Discussion on polysaccharide determination

- methods in new Chinese drug research. *China J Chin Mater Me*, 39: 3392–3394 (in Chinese with English abstract) [李计萍(2014). 中药新药研究中多糖含量测定方法探讨. *中国中药杂志*, 39: 3392–3394]
- Li WB, Yang WH, Huang SY, et al (2008). Study on the testing method of the content of total sugar, reducing sugar and polysaccharide in radix *Angelicae sinensis*. *Stud Trace Elem Health*, 3: 46–47 (in Chinese with English abstract) [李卫彬, 阳文辉, 黄锁义等(2008). 当归总糖还还原糖和多糖的含量测定方法探讨. *微量元素与健康研究*, 3: 46–47]
- Li X, Chen Q, Liu G, et al (2021). Chemical elucidation of an arabinogalactan from rhizome of *Polygonatum sibiricum* with antioxidant activities. *Int J Biol Macromol*, 190: 730–738
- Li Y, Zhao SZ, Zhou SF, et al (2006). Determination of total polyose content in Tiannian mixture and identification by TLC. *China Pharm*, 15 (1): 35–36 (in Chinese with English abstract) [李毅, 赵淑芝, 周淑芳等(2006). 天年合剂总多糖的含量测定及薄层色谱鉴别. *中国药业*, 15 (1): 35–36]
- Liang YK, Wu SQ (2012). Bleaching and removal protein of *Polygonatum* polysaccharide. *Food Sci Technol*, 12: 166–169 (in Chinese with English abstract) [梁引库, 吴三桥(2012). 黄精多糖脱色和脱蛋白工艺研究. *食品科技*, 12: 166–169]
- Liu D (2008). An analysis of amylose determining method. *Sichuan Univ Arts Sci J*, 2: 49–51 (in Chinese with English abstract) [刘丹(2008). 对多糖测定方法的探讨. *四川文理学院学报*, 2: 49–51]
- Liu GR (2016). Difference of sulfuric acid anthrone colorimetric methods of sugar. *Tianjin Agric Sci*, 22: 5–7 (in Chinese with English abstract) [刘桂茹(2016). 不同硫酸蒽酮比色定糖法的比较. *天津农业科学*, 22: 5–7]
- Liu HY, Wang HH, Cui CH, et al (2013). Experiment improvement of the soluble sugar content determination by enthrone colorimetric method. *Lab Sci*, 16: 19–20 (in Chinese with English abstract) [刘海英, 王华华, 崔长海等(2013). 可溶性糖含量测定(蒽酮法)实验的改进. *实验室科学*, 16: 19–20]
- Liu S, Hu ST, Jia QJ, et al (2021). Advances in chemical constituents and pharmacological effects of polygonati rhizoma. *Nat Prod Res Dev*, 33: 1783–1796 (in Chinese with English abstract) [刘爽, 胡舒婷, 贾巧君等(2021). 黄精的化学组成及药理作用的研究进展. *天然产物研究与开发*, 33: 1783–1796]
- Liu XP, Tian QJ, Tian CL (2016). Deproteinization of *Polygonatum* polysaccharide. *J Northwest For Univ*, 31: 238–242 (in Chinese with English abstract) [刘小攀, 田启建, 田春(2016). 黄精多糖酶法脱蛋白的工艺研究. *西北林学院学报*, 31: 238–242]
- López-Barajas M, López-Tamames E, Buxaderas S (1998). Improved size-exclusion high-performance liquid chromatographic method for the simple analysis of grape juice and wine polysaccharides. *J Chromatogr A*, 823: 339–347
- Lü Y, Wu HS, Wei FY, et al (2022). Model establishment for quantitative analysis of multiple bioactive constituents of polygonati rhizoma by near-infrared spectrometry. *Chin Tradit Pat Med*, 44: 2878–2884 (in Chinese with English abstract) [吕悦, 吴杭莎, 韦飞扬等(2022). 黄精多指标成分近红外光谱快速定量分析模型建立. *中成药*, 44: 2878–2884]
- Luo CP, Lu YL, Wang XX (2021). Optimization of rapid determination of polysaccharides by phenol-sulfuric acid method. *Chem Enterp Manag*, 3: 90–94 (in Chinese) [罗春萍, 陆友利, 王星星(2021). 苯酚-硫酸法快速测定多糖方法的优化. *化工管理*, 3: 90–94]
- Mametov R, Ratiu IA, Monedeiro F, et al (2021). Evolution and evaluation of GC columns. *Crit Rev Anal Chem*, 51 (2): 150–173
- Shao JT, Ying GQ, Wang Q, et al (2012). Miniaturization for determination of reducing sugar mass concentration using 3,5-dinitrosalicylic acid method. *J Zhejiang Univ Technol*, 40: 250–252 (in Chinese with English abstract) [邵锦挺, 应国清, 王琦等(2012). 微型化DNS法测定多糖水解液中还原糖的质量浓度. *浙江工业大学学报*, 40: 250–252]
- Shi J, Yang H, Yang SW, et al (2017). Deproteinization of *Polygonatum* polysaccharide by trichloroacetic acid. *Anhui Agric Sci Bull*, 6: 29–31 (in Chinese with English abstract) [施伽, 杨浩, 杨思文等(2017). 三氯乙酸法脱除黄精多糖中蛋白的工艺优化. *安徽农学通报*, 6: 29–31]
- Sun H, Zhang Y, Li Y, et al (2020). Physicochemical properties and immunological activities of polysaccharides from both crude and wine-processed *Polygonatum sibiricum*. *Int J Biol Macromol*, 143: 255–264
- Tang J, Zhao D, Li H, et al (2016). Determination of polysaccharide and free polysaccharide contents of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine by high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Chin J Pharm Anal*, 36: 1804–1809 (in Chinese with English abstract) [唐静, 赵丹, 李红等(2016). 高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法测定b型流感嗜血杆菌结合疫苗多糖及游离多糖的含量. *药物分析杂志*, 36: 1804–1809]
- Tao AE (2019). Study on physicochemical properties, activity screening and quality evaluation of polysaccharides from *Polygonatum kingianum* (dissertation). Dali, Yunnan: Dali University (in Chinese with English abstract) [陶爱

- 恩(2019). 滇黄精多糖的理化性质、活性筛选与质量评价研究(学位论文). 云南大理: 大理大学
- Vojvodić Cebin A, Komes D, Ralet MC (2022). Development and validation of HPLC-DAD method with pre-column PMP derivatization for monomeric profile analysis of polysaccharides from agro-industrial wastes. *Polymers*, 14: 544
- Wang J, Wang Q, Xiang WS (2001). Application of chromatography to the analysis of carbohydrates. *Anal Chem*, 29: 222–227 (in Chinese with English abstract) [王静, 王晴, 向文胜(2001). 色谱法在糖类化合物分析中的应用. *分析化学*, 29: 222–227]
- Wang S, Li G, Zhang X, et al (2022). Structural characterization and antioxidant activity of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides. *Carbohydr Polym*, 291: 119524
- Wang Y, Li FT, Huang GZ, et al (2021). Optimizing the extraction technology and determining the antioxidant activity of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides. *Anim Husb Veter Med*, 12: 53–59 (in Chinese with English abstract) [王莹, 李锋涛, 黄美子等(2021). 黄精多糖提取工艺优化及其抗氧化活性研究. *畜牧与兽医*, 12: 53–59]
- Wang Y, Liu N, Xue X, et al (2020). Purification, structural characterization and *in vivo* immunoregulatory activity of a novel polysaccharide from *Polygonatum sibiricum*. *Int J Biol Macromol*, 160: 688–694
- Xiaowei C, Wei W, Hong G, et al (2019). Review of *Polygonatum sibiricum*: a new natural cosmetic ingredient. *Die Pharmazie*, 74: 513–519
- Xie JH, Shen MY, Nie SP, et al (2013). Analysis of monosaccharide composition of *Cyclocarya paliurus* polysaccharide with anion exchange chromatography. *Carbohydr Polym*, 98: 976–981
- Xie Y, Jiang Z, Yang R, et al (2021). Polysaccharide-rich extract from *Polygonatum sibiricum* protects hematopoiesis in bone marrow suppressed by triple negative breast cancer. *Biomed Pharmacother*, 137: 111338
- Yan MY, Jie DM, Liu ZH, et al (2022). Determination of content and composition of *Lycium barbarum* polysaccharides by microwave digestion-1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolonepre-column derivatization-high performance liquid chromatography. *J Food Saf Qual*, 22: 7297–7304 (in Chinese with English abstract) [燕梦雨, 颜东妹, 刘志虎等(2022). 微波消解-1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮柱前衍生-高效液相色谱法测定枸杞多糖含量及组成. *食品安全质量检测学报*, 22: 7297–7304]
- Yang H (2012). Study on the dns method determination and preparation process by membrane separation technology of herbal polysaccharide (dissertation). Qingdao, Shandong: Qingdao University of Science & Technology (in Chinese with English abstract) [杨浩(2012). 中药多糖的DNS法测定及膜分离制备工艺研究(学位论文). 山东青岛: 青岛科技大学]
- Yang JY, Xiao YS, Jiang JL, et al (2020). Effect of Huangjingwan on antioxidant functions and $A\beta_{1-42}$ and APP protein expressions in brain of Alzheimer's disease rats. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 26 (6): 32–38 (in Chinese with English abstract) [杨晶莹, 肖移生, 姜劼琳等(2020). 黄精丸对阿尔茨海默病大鼠大脑的抗氧化作用及 $A\beta_{1-42}$, App蛋白表达的影响. *中国实验方剂学杂志*, 26 (6): 32–38]
- Yang XX, Pan XJ, Yan HJ, et al (2016). Extraction process of crude polysaccharide from manyflower rhizome and content determination of polysaccharide in the crude polysaccharide by the method of anthrone-sulfuric acid spectrophotometric. *J Sichuan Tradit Chin Med*, 34: 103–106 (in Chinese with English abstract) [杨新新, 潘晓鹃, 严寒静等(2016). 黄精粗多糖提取及蒽酮-硫酸分光光度法含量测定. *四川中医*, 34: 103–106]
- Yang Y, Hou TT, Wang W, et al (2022). Research progress on pharmacological effects of polysaccharides from polygonati rhizoma. *Drugs Clin*, 37 (3): 659–665 (in Chinese with English abstract) [杨迎, 侯婷婷, 王威等(2022). 黄精多糖的药理作用研究进展. *现代药物与临床*, 37 (3): 659–665]
- Yelithao K, Surayot U, Lee JH, et al (2016). RAW264.7 cell activating glucomannans extracted from rhizome of *Polygonatum sibiricum*. *Prev Nutr Food Sci*, 21 (3): 245–254
- Yuan Q, Lin S, Fu Y, et al (2019). Effects of extraction methods on the physicochemical characteristics and biological activities of polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus*). *Int J Biol Macromol*, 127: 178–186
- Yue F, Zhang J, Xu J, et al (2022). Effects of monosaccharide composition on quantitative analysis of total sugar content by phenol-sulfuric acid method. *Front Nutr*, 9: 963318
- Zhang GW, Du ZF, Sun JF (2023). Research progress on chemical constituents and antitumor effects of *Polygonatum sibiricum*. *China Mod Med*, 30 (28): 31–34, 39 (in Chinese with English abstract) [张国文, 杜泽飞, 孙健玮(2023). 黄精化学成分与抗肿瘤作用的研究进展. *中国当代医药*, 30 (28): 31–34, 39]
- Zhang ZJ, Sun W, Li YL, et al (2012). Determination of polysaccharide in rhizoma polygonatii by phenol-sulfuric acid and DNS methods. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 18: 106–109 (in Chinese with English abstract) [张志君, 孙伟, 李永亮等(2012). 3,5-二硝基水杨酸法联合苯酚-浓硫酸法测定不同产地黄精中多糖含量. *中国实验方剂学杂志*, 18: 106–109]
- Zhao Z, Lin Q, Feng Y, et al (2020). Determination of monosaccharides hydrolyzed from polysaccharides in activated

sludge by ion chromatography–mass spectrometry with online pretreatment of column switching technique. Anal Bioanal Chem, 412: 8061–8071

Zhu JX, Zhang YP, Zheng GB, et al (2016). Rapid batch determination of the inulinin *Taraxacum kok-saghyz* Rodin by

enzyme mark instrument. Sci Technol Food Ind, 37 (19): 294–297, 301 (in Chinese with English abstract) [朱金霞, 张源沛, 郑国保等(2016). 利用酶标仪快速批量测定橡胶草中菊糖的含量. 食品工业科技, 37 (19): 294–297, 301]