

完全酸水解-PMP 柱前衍生化法分析甘草蜜炙前后多糖含量变化

孙 捷¹, 段伟萍¹, 王梦岚¹, 陆兔林¹, 陈丽红¹, 郑云枫^{1,2*}, 曹丽娟³, 李存玉^{1,2}, 彭国平^{1,2*}

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023; 2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023; 3. 盛实百草药业有限公司, 天津 300450)

摘要: **目的** 建立完全水解-柱前衍生化 HPLC 法测定甘草多糖含量方法, 比较甘草蜜炙前后多糖含量的变化。**方法** 以甘草多糖为研究对象, 通过平行实验优选多糖提取、完全酸水解条件、衍生化条件、色谱分析条件, 建立完全酸水解-PMP 柱前衍生化分析测定甘草多糖中鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖含量的方法, 并进一步结合含量校正因子计算多糖含量。**结果** 3 批生甘草饮片炮制前多糖平均含量为 (58.6±9.0) mg/g, 蜜炙后饮片平均含量为 (79.3±8.5) mg/g, 其炮制后多糖的平均含量提升了 35.3%。**结论** 该方法准确可行, 是对生、炙甘草质量评价方法的重要补充, 同时也可对其他中药多糖的含量表征提供参考。

关键词: 甘草; 蜜炙; 多糖; 完全酸水解; 柱前衍生化; 含量变化

中图分类号: R282 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)08-2769-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.08.055

甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根和根茎, 又名甜草根、粉草、灵通、国老等^[1], 具有补脾益气、清热散结、调和诸药之功效^[2]。其历代炮制方法众多, 有蜜炙、炒制、酒制、醋制、盐制等, 但大多已被淘汰, 仅有(蜜)炙法被传承下来并广泛应用^[3]。传统中医理论认为, 生甘草味甘偏凉, 长于泻火散结; 炙甘草味甘偏温, 以益气补中为胜^[4]。《本草蒙荃》曰:“蜜炙甘缓难化增益元阳”;《医学校正入门》亦指出:“蜜炙性温, 健脾胃和中, 补三焦元气”。可见, 蜜炙可以改变甘草性味, 增强“补脾益气”的功效。

甘草蜜炙后能进一步提高脾虚动物的免疫功能、改善生化指标、缓解腹泻症状等作用^[5-6], 这可能与炮制前后多糖成分的变化关系密切, 但由于多糖结构复杂、极性较大、相对分子量较高, 使得甘草炮制前后多糖功效物质及其变化尚未有深入研究。目前多糖常用的含量测定方法主要为基于苯酚-硫酸、蒽酮-硫酸等显色反应的紫外分光光度法^[7-8], 但测定时干扰因素较多, 专属性及准确性不高^[9]。

本实验依据多糖结构特征, 采用完全酸水解-1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 衍生化法结合含量校正因子计算, 建立一种检测准确的甘草多糖含量测定方法, 并在此基础上对甘草蜜炙前后多糖的含量变化进行分析, 可为炙甘草炮制工艺、质量控制及甘草多糖的开发应用奠定基础,

也可对其他中药多糖成分含量表征提供参考。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 型高效液相色谱仪, 配有 VWD 紫外检测器、Agilent Chemstation 色谱工作站 (美国 Agilent 公司); Hedra C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) (美国 Waters 公司); MS-105 DU 型电子天平 (十万分之一, 瑞士梅特勒-托利多公司); KH-500 DB 型数控超声仪 (昆山禾创超声仪器有限公司); 数显恒温水浴锅 (郑州豫华仪器制造有限公司); 超纯水机 (南京易普易达科技发展有限公司)。

1.2 试剂与药物 甘草 (盛实百草药业有限公司, 批号 H19007400、H19007500、H19007700); 炙甘草饮片为实验室自制, 上述生甘草饮片按 2020 年版《中国药典》蜜炙法制备所得。葡萄糖 (批号 1122A025)、鼠李糖 (批号 809F025)、半乳糖醛酸 (批号 409B027)、半乳糖 (批号 1228B023)、阿拉伯糖 (批号 1026A021) 对照品购自北京索莱宝科技有限公司; 葡聚糖对照品 (分子量 80 000, 批号 J609009) 购自上海阿拉丁生物试剂有限公司。乙腈 (色谱纯)、三氟乙酸 (分析纯)、氯仿、醋酸铵、氢氧化钠、盐酸、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮购自国药集团化学试剂有限公司; 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 甘草多糖的提取 为了消除单糖及低聚糖对多糖检测

收稿日期: 2022-07-27

基金项目: 国家自然科学基金 (81973482); 国家重点研发计划资助项目 (2018YFC1706503)

作者简介: 孙 捷 (1998—), 女, 硕士生, 研究方向为中药化学与分析。E-mail: sunjiexueyong@163.com

* 通信作者: 郑云枫 (1979—), 男, 教授, 研究方向为中药活性成分与质量评价。Tel: (025) 86798186, E-mail: zyunfeng@njucm.edu.cn

彭国平 (1963—), 男, 教授, 研究方向为中药化学与分析。Tel: (025) 86798186, E-mail: guopingpeng@126.com

的影响,参考文献[10]报道,取甘草粉末0.5 g,精密称定,加入80%乙醇75 mL,回流提取1.5 h,过滤,弃去滤液;进一步加水回流提取多糖,以多糖水解后单糖的峰面积之和为评价指标,对料液比(1:50、1:100、1:150、

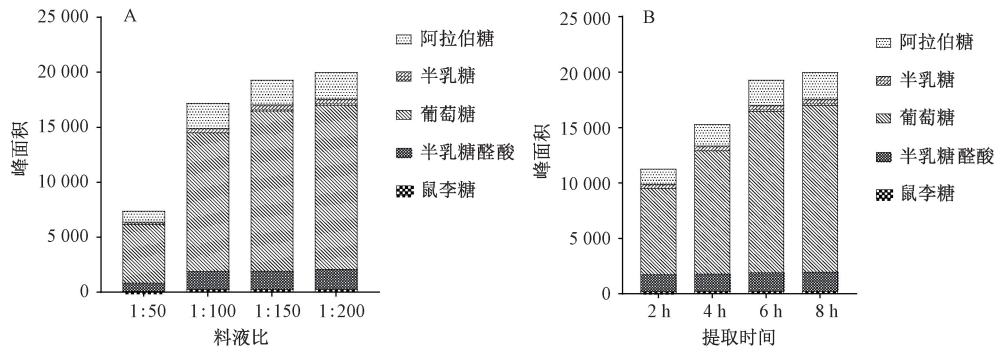


图 1 提取工艺数据图

2.2 完全酸水解条件 参考文献[11-13]报道及甘草多糖的结构特征,本实验中甘草多糖酸水解条件为样品溶液中加入三氟乙酸至浓度为2.0 mol/L,在100℃下水解6 h。

2.3 PMP 衍生化条件考察 PMP 柱前衍生化是基于衍生化试剂在弱酸性条件下与还原性糖发生缩合反应的原理,将多糖水解后的单糖经衍生化反应生成具有紫外(254 nm)吸收的双-PMP 衍生物^[14]。

取甘草粉末0.5 g,精密称定,加入80%乙醇75 mL,

1:200)和提取时间(2、4、6、8 h)进行考察,结果见图1。当料液比为1:150,提取时间为6 h时,甘草多糖已基本提取完全,因此确定甘草多糖提取条件为加150倍量水,回流提取6 h。

回流提取1.5 h,过滤,滤渣加水75 mL,回流提取6 h,过滤,精密量取滤液2 mL于安瓿瓶中,加入三氟乙酸至2.0 mol/L,100℃水解6 h,取水解液,蒸干,加入甲醇,蒸干使溶液呈中性,残渣加水溶解并定容至2.0 mL,备用。取上述溶液100 μL进行PMP衍生化,以各单糖衍生物峰面积为评价指标,对加入25、50、100、150、200、300 μL PMP进行考察。结果表明,当PMP体积为100 μL时水解单糖的衍生化基本完全,结果见表1。为确保水解样品中的单糖能够完全衍生化,选择PMP体积为200 μL。

表 1 PMP 用量考察结果

PMP 用量/μL	峰面积					峰面积和
	鼠李糖	半乳糖醛酸	葡萄糖	半乳糖	阿拉伯糖	
25	6.5	39.1	162.3	8.3	26.1	242.3
50	38.0	306.5	1 585.6	124.7	544.1	2 598.9
100	55.2	369.6	2 790.3	161.5	687.1	4 063.7
150	59.6	373.7	2 826.4	162.9	688.4	4 111.0
200	62.2	369.1	2 859.8	165.6	686.7	4 143.4
300	65.1	373.2	2 832.9	168.6	699.4	4 139.2

2.4 色谱条件优化 甘草多糖中单糖组成主要为鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖^[15-16],依据文献报道,选择了乙腈-醋酸铵缓冲溶液为流动相系统^[11-14],并对流动相pH值进行考察。以乙腈为流动相A,醋酸铵缓冲溶液(pH分别调节至5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)为流动相B,梯度洗脱(0~65 min,15%~25% A),进行考察,结果见图2。当醋酸铵缓冲溶液pH值为6.5时,各色谱峰的分离效果及出峰时间较好。

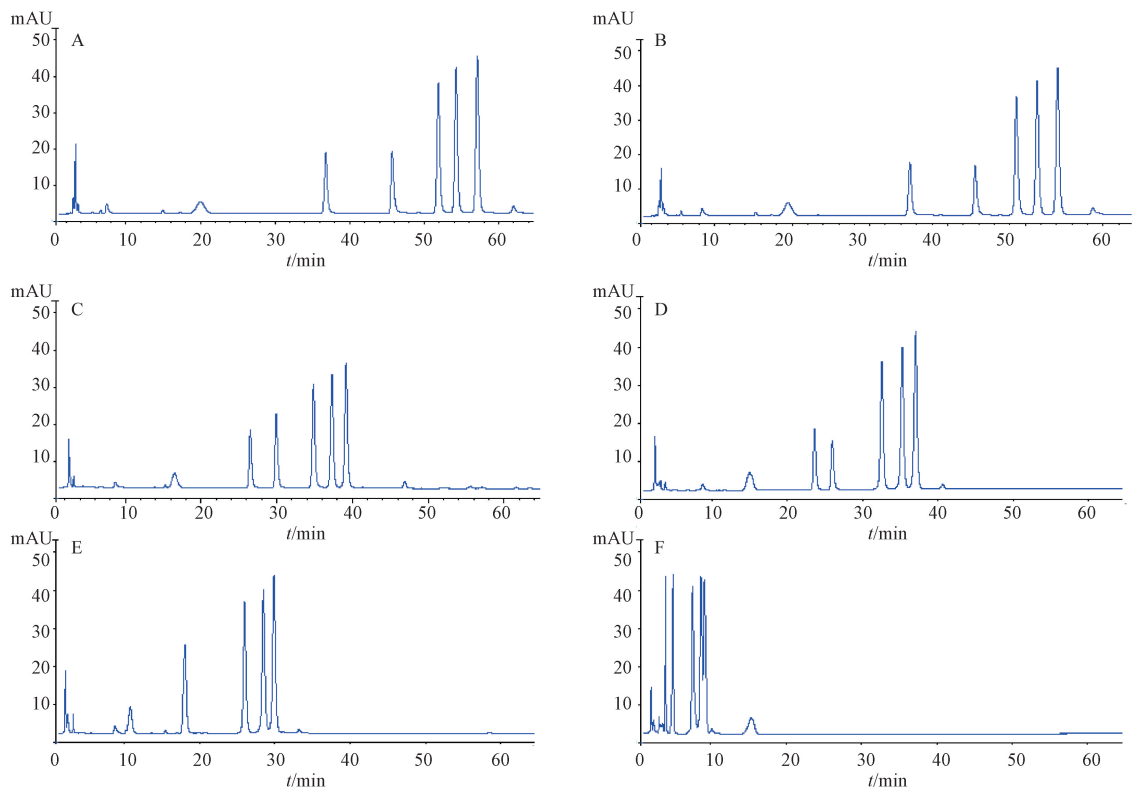
2.5 供试品溶液制备 分别取生、炙甘草粉末(过3号筛)0.5 g,精密称定,加入80%乙醇75 mL,回流提取1.5 h,过滤,弃去滤液,加水75 mL回流提取6 h,过滤,滤液置100 mL量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,精密量取2.0 mL于安瓿瓶中,加入三氟乙酸至2.0 mol/L,100℃水解6 h,蒸干,反复加甲醇蒸干至中性,残渣加水溶解并定容至2.0 mL,即得。

2.6 对照品溶液制备 取鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、

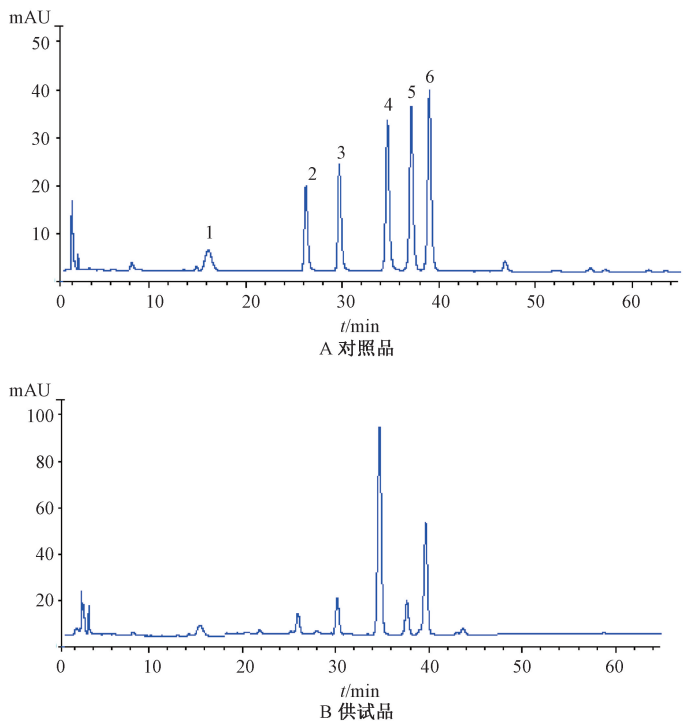
半乳糖、阿拉伯糖对照品适量,精密称定,加水配置成每1 mL含鼠李糖0.382 mg、半乳糖醛酸0.326 mg、葡萄糖1.204 mg、半乳糖0.436 mg、阿拉伯糖0.314 mg的对照品溶液,即得。

2.7 PMP 衍生化样品溶液制备 分别精密量取“2.5”项下供试品溶液、“2.6”项下对照品溶液100 μL,加入0.3 mol/L氢氧化钠溶液100 μL、0.5 mol/L PMP 甲醇溶液200 μL,混匀,70℃水浴45 min,冷却至室温,依次加入0.3 mol/L盐酸溶液100 μL、水500 μL,混匀。加入氯仿1 mL萃取,充分振荡后除去有机相,重复萃取3次,水相经0.22 μm微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.8 色谱条件 Hedra C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相乙腈(A)-醋酸铵(pH 6.5)缓冲溶液(B),梯度洗脱(0~65 min,15%~25% A);体积流量1.0 mL/min;柱温30℃;检测波长254 nm;进样量10 μL,色谱图见图3。



注：A~F 酸铵缓冲溶液 pH 值分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0。
图 2 流动相 pH 值对单糖 PMP 衍生化色谱分离影响 HPLC 色谱图



1. PMP 2. 鼠李糖 3. 半乳糖醛酸 4. 葡萄糖 5. 半乳糖 6. 阿拉伯糖
图 3 各单糖 HPLC 色谱图

2.9 校正因子及多糖含量计算 基于多糖水解反应原理，多糖每水解结构中 1 个糖苷键就需要引入一分子水，因此甘草多糖完全酸水解后生成的单糖总质量比实际甘草多糖质量要高；为了准确分析甘草多糖的含量，需要引入含量校正因子 f_x 进行计算，公式为 $f_x = (M_x - 18)/M_x$ ， $m_{pol} = \sum f_x \cdot m_x$ ，其中 f_x 为单糖的校正因子， M_x 为单糖的摩尔质量， m_{pol} 为甘

草多糖质量， m_x 为甘草多糖水解后单糖的质量。

2.10 方法学考察

2.10.1 线性关系考察 取“2.6”项下对照品溶液，稀释至 1、2、4、8、16、32、64、128、256 倍，按“2.7”项下

方法进行 PMP 衍生化，在“2.8”项色谱条件下进样测定，以对照品质量浓度为横坐标（ X ），峰面积为纵坐标（ Y ）进行回归，结果见表 2。可知各单糖在各自范围内线性关系良好。

表 2 各单糖线性关系

单糖	线性关系	r	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
鼠李糖	$Y=3.437X-28.417$	0.998 2	1.492~47.75
半乳糖醛酸	$Y=3.881X-32.189$	0.999 5	2.547~40.75
葡萄糖	$Y=2.132X-51.286$	0.999 6	37.625~1 204
半乳糖	$Y=6.146X-29.526$	0.999 5	3.406~54.5
阿拉伯糖	$Y=9.597X-33.104$	0.999 7	4.906~157

2.10.2 精密密度试验 取同一份对照品溶液，按“2.7”项下方法进行 PMP 衍生化，在“2.8”项色谱条件下进样测定 6 次，测得鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖峰面积 RSD 为 1.28%、1.40%、1.57%、1.40%、0.87%，表明仪器精密密度良好。

2.10.3 重复性试验 精密量取同一份甘草多糖溶液 6 份，每份 2.0 mL，按“2.5”项下方法制备供试品溶液，按“2.7”项下方法进行 PMP 衍生化，在“2.8”项色谱条件下进样测定，测得甘草多糖含量 RSD 为 1.51%，表明该方法重复性良好。

2.10.4 稳定性试验 精密量取同一份甘草多糖溶液 6 份，每份 2.0 mL，按“2.5”项下方法制备供试品溶液，按“2.7”项下方法进行 PMP 衍生化，于 0、2、4、6、10、24 h 在“2.8”项色谱条件下进样测定，测得甘草多糖含量 RSD 为 1.30%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.10.5 加样回收率试验 取各成分含量已知的甘草粉末 0.25 g，精密称定，平行 6 份，加入一定量的葡聚糖对照品，按“2.5”项下方法制备供试品溶液，按“2.7”项下方法进行 PMP 衍生化，在“2.8”项色谱条件下进样测定，计算回收率，结果见表 3。

表 3 加样回收率试验结果

取样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
0.254 5	14.91	14.18	28.69	97.32	98.61	2.90
0.251 7	14.75	14.03	28.54	98.37		
0.250 8	14.70	13.61	28.01	97.96		
0.249 3	14.61	13.66	28.13	99.04		
0.247 7	14.52	13.89	29.05	103.79		
0.248 9	14.59	13.98	27.87	95.20		

2.11 含量测定 分别取生、炙甘草样品，共 6 批，按“2.5”项下方法制备供试品溶液，按“2.7”项下方法进行 PMP 衍生化，在“2.8”项色谱条件下进样测定，计算各单糖及多糖的含量，结果见表 4，结合校正因子计算，生甘草中多糖平均含量为（58.6±9.0）mg/g，炙甘草中多糖平均含量为（79.3±8.5）mg/g，甘草经蜜炙后多糖平均含量提高了 35.3%。

表 4 甘草炮制前后多糖及其完全酸水解后单糖含量（mg/g）

组别	批号	鼠李糖	半乳糖醛酸	葡萄糖	半乳糖	阿拉伯糖	多糖总含量
生甘草	H19007400	0.83	2.33	47.12	1.54	3.80	55.62
	H19007500	1.12	3.02	59.51	2.14	6.46	72.24
	H19007700	1.34	3.56	32.03	2.68	8.35	47.95
炙甘草	H19007400	1.24	4.07	63.64	2.15	7.68	78.79
	H19007500	1.35	4.51	74.96	2.37	8.78	91.97
	H19007700	1.26	4.40	51.53	2.31	7.62	67.12

注：多糖含量=单糖质量之和/甘草粉末称样量。

3 讨论

本实验优化甘草多糖最佳提取条件为 150 倍量水回流提取 6 h；完全酸水解条件为样品液中三氟乙酸浓度为 2 mol/L、水解温度 100 ℃、水解时间 6 h；衍生化试剂 PMP 加入量为 200 μL ；色谱条件为 Hedra C₁₈ 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm ），流动相乙腈-醋酸铵缓冲液（pH 6.5），梯度洗脱。

中药多糖是一类结构复杂的天然产物，具有免疫调节、

抗肝损伤、抗病毒、抗肿瘤等活性，已引起国内外学者的广泛关注。甘草作为临床常用的补脾益气类中药，含有丰富的多糖类成分，药理研究表明，甘草多糖具有较强的免疫调节活性，被认为是甘草补脾益气的主要药效物质^[17]。但由于多糖结构复杂、相对分子量高，且常与蛋白质、脂质等结合成多糖复合物，给结构鉴定及质量分析带来了困难。迄今为止，常用的多糖含量测定方法仍以苯酚-硫酸法或蒽酮-硫酸法等比色法为主，其专属性及准确性存在一定

的局限^[9]。

完全酸水解-PMP 柱前衍生化法目前常用于多糖中单糖组成分析^[18-19]，由于在多糖酸水解过程中，每 1 个糖苷键的水解便会引入一分子水，因此单糖的总量与多糖含量并不吻合，不宜将此法直接用于多糖的含量测定。为了解决这一系统误差，本实验引入了含量校正因子，使多糖含量测定的结果准确可靠。

本实验构建的完全酸水解-PMP 柱前衍生化结合含量校正因子法定量分析甘草中多糖含量，经过验证，该方法稳定且重复性良好。在此基础上，分析了 3 批甘草饮片在蜜炙前后多糖的含量，结果显示，生、炙甘草中多糖含量存在明显差异，炮制后甘草多糖的含量增加显著。甘草中多糖分子量在 80 000~100 000 Da 之间，分子量相对较大，水溶性并不理想，水煎煮提取时从药材细胞壁中迁出相对困难^[20]。而蜜炙后，一方面可能破坏了甘草饮片细胞壁的完整性，使得多糖这一类大分子物质更容易从细胞内迁移出；另一方面炮制加热过程可能导致了大分子多糖的降解，形成了水溶性更好、分子量相对较小的多糖，从而提高了炙甘草水溶性多糖的提取率。

已有学者研究发现，甘草经蜜炙后免疫调节作用大大提升^[5-6]。本实验从功效物质变化的角度，发现甘草蜜炙后水溶性多糖含量明显提升，这为甘草炮制增效机制的探索提供了一定的依据，并可为炙甘草的临床应用、炮制机理研究及其多糖开发奠定基础。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：88.

[2] 贾天柱. 中药炮制传统理论概述[C] //中药药效提高与中药饮片质量控制交流研讨会论文集. 上海：中华中医药学会，2009：4-8.

[3] 孙立立，张 泰，周 倩，等. 甘草历代炮制方法概述[J]. 中成药，2010，32(7)：1188-1190.

[4] 孙立立，吕 佳，戴衍朋，等. 甘草及其炮制品补脾作用的初步药理研究[C] //中华中医药学会中药炮制分会 2009 年学术研讨会论文集. 武汉：中华中医药学会，2009：531-536.

[5] 张玉龙，王梦月，杨静玉，等. 炙甘草化学成分及药理作用研究进展[J]. 上海中医药大学学报，2015，29(3)：

99-102.

[6] 张恒斌，贾亦兵. 蜜炙对甘草饮片免疫活性影响的实验研究[J]. 药学研究，2018，37(8)：446-448；459.

[7] 白瑞斌，马玉玲，张 培，等. 苯酚-硫酸法结合校正因子法测定含半乳糖醛酸的多糖中的糖含量[J]. 中国药房，2017，28(21)：2974-2978.

[8] 黄再强，张燕飞，陈 玲，等. 川产葛根、粉葛总黄酮和多糖含量的对比分析[J]. 中药与临床，2017，8(3)：11-14.

[9] 张 婷，孙红梅，李 振，等. 响应面法优化水提醇沉玄参多糖工艺及其含量分析[J]. 中国现代中药，2021，23(4)：679-684；697.

[10] 宣 丽，刘长江. 不同提取方法对软枣猕猴桃多糖单糖组成及抗氧化活性的影响[J]. 天然产物研究与开发，2013，25(9)：1260-1265.

[11] Wang Q H, Shu Z P, Xing N, *et al.* A pure polysaccharide from *Ephedra sinica* treating on arthritis and inhibiting cytokines expression[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 86：177-188.

[12] 邝婷婷，王 宇，王 张，等. 柱前衍生 HPLC 法分析蔓菁多糖中单糖的组成[J]. 中成药，2014，36(10)：2121-2125.

[13] 张丽芝，沈 荣. 单糖组成分析方法的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展，2013，41(1)：77-81.

[14] 符梦凡，赵一帆，阎卫东. 柱前衍生化 HPLC 法分析枸杞多糖中单糖组成[J]. 食品科学，2018，39(18)：186-191.

[15] 陈 橙，帕丽达·阿不力孜，米仁沙·牙库甫，等. 胀果甘草酸性多糖的分离纯化、结构分析及免疫活性测定[J]. 食品安全质量检测学报，2017，8(12)：4651-4658.

[16] 丛媛媛. 新疆胀果甘草多糖的分离纯化、结构分析和生物活性研究[D]. 乌鲁木齐：新疆医科大学，2008.

[17] 邓桃妹，彭 灿，彭代银，等. 甘草化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的探讨[J]. 中国中药杂志，2021，46(11)：2660-2676.

[18] 王小燕，郭常润，常军民，等. 怀牛膝多糖的柱前衍生化-HPLC 指纹图谱建立及单糖成分含量测定[J]. 中国药房，2021，32(3)：294-300.

[19] 付兴情，黄 绿，吴 增，等. 柱前衍生化-高效液相色谱法分析缅甸刺梧桐胶多糖的单糖组成[J]. 分析科学学报，2021，37(1)：75-80.

[20] 赵 颖，宋新波，张丽娟，等. 高效凝胶色谱法测定甘草多糖分子量及其分子量分布[J]. 天津中医药，2015，32(1)：46-48.