

基于多重指纹图谱桑黄多糖质量评价研究*

郑含笑¹, 徐凡¹, 蒲婧哲², 胡冲², 张亚中^{1,2**}

(1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012;

2. 安徽省食品药品检验研究院 国家药品监督管理局中药质量研究与评价重点实验室, 合肥 230051)

摘要 目的: 建立桑黄多糖多重指纹图谱法, 为桑黄质量评价提供参考。方法: 采用高效凝胶色谱法 (HPGFC-RID 法), 色谱柱为 TSK-GEL®G3000 PWXL (7.8 mm × 30 cm, 7 μm), 以 20 mmol · L⁻¹ 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 5.7) 为流动相, 流速 0.5 mL · min⁻¹, 进样量 15 μL, 柱温 35 °C, RID 检测器; 采用红外光谱法 (FT-IR 法), 测定范围为 4 000~400 cm⁻¹, 分辨率 4 cm⁻¹, 扫描 16 次; 采用 HPLC-UV 糖谱法, 色谱柱为 Agilent 5 HC-C₁₈(2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.02 mol · L⁻¹ 乙酸铵 (20:80) 为流动相, 流速 1 mL · min⁻¹, 检测波长 250 nm, 进样量 10 μL, 柱温 35 °C, UV 检测器。建立桑黄多糖多重指纹图谱, 对 29 批桑黄多糖的重均分子量、特征吸收官能团、单糖组成进行比较, 并结合化学计量学和主成分分析 (PCA), 分析其种内及种间差异。结果: HPGFC-RID 糖谱分析显示, 桑树桑黄 (SH)、杨树桑黄 (YH)、暴马桑黄 (BH) 和松木层孔菌 (松树桑黄) (SSH) 多糖均有 2 个主要色谱峰 (P1、P2)。对于主要色谱峰 P1, BH 多糖的重均分子量最高, 其次依次为 SSH、SH 和 YH 多糖; 对于主要色谱峰 P2, YH 多糖的重均分子量最高, 其次依次为 SSH、SH 和 BH 多糖。FT-IR 糖谱分析表明, SH、YH、BH 和 SSH 多糖具有相似的红外光谱吸收峰, 种内、种间差异不明显, 但袋料栽培与椴木栽培的桑黄多糖在 1 800~900 cm⁻¹ 范围内主要吸收峰强度不同。HPLC-UV 糖谱结合化学计量学分析显示, 桑黄多糖由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、木糖和岩藻糖组成, 其中 SH、YH (椴木栽培)、BH 和 SSH 多糖中葡萄糖含量最高, YH (袋料栽培) 多糖中木糖含量最高。各单糖组成分布结果表明, 不同品种桑黄单糖含量存在明显差异。此外, PCA 将 YH (袋料栽培) 聚为一类, SH、YH (椴木栽培)、BH 和 SSH 聚为一类, 说明栽培方式的不同也会影响桑黄的质量。结论: 桑黄多糖多重指纹图谱分析方法可对不同品种桑黄质量进行有效评价, 为桑黄质量控制奠定基础。

关键词: 桑黄; 多糖; 重均分子量; 红外光谱; 单糖组成; 甘露糖; 鼠李糖; 葡萄糖; 木糖; 岩藻糖

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2025) 02-0334-16

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0446

Quality evaluation of *Sanghuangporus* polysaccharides based on multiple fingerprints*

ZHENG Han-xiao¹, XU Fan¹, PU Jing-zhe², HU Chong², ZHANG Ya-zhong^{1,2**}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Anhui Institute for Food and Drug Control, State Drug Administration Key Laboratory of Quality Research and Evaluation of Chinese Medicine, Hefei 230051, China)

Abstract Objective: To establish a multiple fingerprint analysis method for polysaccharides from *Sanghuangporus*

* 国家药品监督管理局药品监管科学体系建设重点项目 (RS2024Z006)

** 通信作者 Tel: 15055638554; E-mail: 282483507@qq.com

第一作者 Tel: 18856093728; E-mail: 1332087219@qq.com

sanghuang, providing a reference for quality evaluation. **Methods:** High-performance gel filtration chromatography (HPGFC-RID) was used with a TSK-GEL®G3000 PWXL column (7.8 mm × 30 cm, 7 μm). The mobile phase was 20 mmol · L⁻¹ HAc-NaAc buffer (pH 5.7) at a flow rate of 0.5 mL · min⁻¹. The injection volume was 15 μL, column temperature was 35 °C, and detection was carried out using a RID detector. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy was performed in the range of 4 000 to 400 cm⁻¹ with a resolution of 4 cm⁻¹ and 16 scans. HPLC-UV monosaccharide profiling was done using an Agilent 5 HC-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), with acetonitrile-0.02 mol · L⁻¹ ammonium acetate (20 : 80) as the mobile phase, at a flow rate of 1 mL · min⁻¹, detection wavelength of 250 nm, an injection volume of 10 μL, and column temperature of 35 °C. An UV detector was used for detection. Multiple fingerprints of *Sanghuangporus* polysaccharides were established, and the mass average molar mass, characteristic absorptive functional groups, and monosaccharide compositions of 29 batches of *Sanghuangporus* polysaccharides were compared and analyzed for their intraspecific and interspecific variations by combining with chemometrics and principal component analysis (PCA). **Results:** HPGFC-RID monosaccharide profiling revealed that the polysaccharides from *Sanghuangporus sanghuang* (SH), *Sanghuangporus vaninii* (YH), *Sanghuangporus baumii* (BH), and *Phellinus pini* (SSH) all exhibited two major chromatographic peaks (P1, P2). For P1, BH polysaccharides had the highest molecular weight, followed by SSH, SH, and YH polysaccharides. For P2, YH polysaccharides had the highest molecular weight, followed by SSH, SH, and BH polysaccharides. FT-IR analysis indicated that SH, YH, BH, and SSH polysaccharides shared similar infrared absorption peaks, with no significant differences between species or within species. However, the intensity of the main uptake peaks in the range of 1 800-900 cm⁻¹ was different between bagged and linden cultivated *Sanghuangporus* polysaccharides. HPLC-UV monosaccharide profiling combined with chemometrics revealed that *Sanghuangporus* polysaccharides consist of mannose, rhamnose, glucose, xylose, and fucose. Glucose content was the highest in SH, YH (linden cultivation), BH, and SSH polysaccharides, while xylose was the highest in YH (bagged cultivation). Monosaccharide composition varied significantly among different *Sanghuangporus* varieties. PCA grouped YH (bagged cultivation) as one class, and SH, YH (linden cultivation), BH, and SSH as another, indicating that cultivation methods also influence *Sanghuangporus* quality. **Conclusion:** The multiple fingerprint analysis method for *Sanghuangporus* polysaccharides effectively evaluates the quality of different *Sanghuangporus* varieties, providing a foundation for quality control. **Keywords:** *Sanghuangporus*; polysaccharide; mass average molar mass; infrared spectrum; monosaccharide composition; mannose; rhamnose; glucose; xylose; fucose

桑黄始载于《神农本草经》，名曰“桑耳”，为桑黄孔菌属真菌桑黄 *Sanghuangporus sanghuang* (Sheng H.Wu, T.Hatt & Y.C.Dai) Sheng H.Wu. 的子实体^[1]，具有活血止血、化饮、止泻之功效^[2]。现代研究表明，桑黄中的活性成分有桑黄多糖、黄酮类、萜类、多肽类以及微量元素，在肿瘤、炎症、氧化应激和高血糖等多种疾病的治疗中体现出很好的药用价值^[3-6]。桑黄孔菌属真菌分布广泛，多产于中国的东北、华北、华东等地^[7]。但由于生长环境和生长年限的制约，野生桑黄难以满足市场的需求，如今多通过人工栽培来解决资源短缺的问题^[8]。目前市场流通的桑黄主要有桑树桑黄 (*Sanghuangporus sanghuang*, SH)、

杨树桑黄 (*Sanghuangporus vaninii*, YH)、暴马桑黄 (*Sanghuangporus baumii*, BH) 和松树桑黄 (*Phellinus pini*, SSH) 等。由于桑黄品种繁多，质量存在差异且质控标准缺乏从而导致市场桑黄质量良莠不齐，因此建立桑黄质量控制标准很有必要^[9]。

桑黄多糖作为桑黄的主要活性成分，具有免疫调节、降血糖、调血脂、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、降血压、抗衰老等药理作用^[10-12]。目前，桑黄暂无国家级质控标准^[13]。已颁布并实施的省级质量标准中，均将桑黄多糖列为重要质控指标，且多数相关研究表明桑黄多糖是评价不同来源桑黄质量的重要指标^[14-15]。由于桑黄多糖结构复杂及相对分子质量多分散性，使得桑黄多

糖质量难以控制^[16],因此,亟需建立一种简便快速,准确性好,特异性高的方法对桑黄多糖进行定性定量分析。本研究基于高效凝胶色谱法(HPGFC-RID法)、红外光谱法(FT-IR法)和HPLC-UV糖谱法,建立桑黄多糖多重指纹图谱,对29批桑黄药材中桑黄多糖的重均分子量、特征吸收官能团和单糖组成进行比较,明确不同品种桑黄多糖差异,以期填补桑黄多糖标准化研究的不足,为桑黄质量控制与合理开发提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津LC-20AD高效液相色谱仪(配备RID-10A型检测器,Shimadzu公司);Agilent 1260型高效液相色谱仪(安捷伦公司);NICOLET iN10型傅里叶变换红外光谱仪(赛默飞世尔科技公司);LC-4012型台式低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);FD240型电热恒温干燥箱(Binder公司);LGJ-10S型冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司);ML204型万分之一电子天平、XP26型十万分之一电子天平(托利多仪器上海有限公司);Millipore Simplicity-185型超纯水仪(Millipore公司);XMTD205型水浴锅(常州国宇仪器制造有限公司);116B型摇摆式六两装高速中药粉碎机(永历制药机械有限公司)。

1.2 试剂

对照品D-无水葡萄糖(批号110833-201908,纯度以99.8%计),购自中国食品药品检定研究院;对照品D-甘露糖(批号G1072059,纯度>98%)、D-木糖(批号G1152942,纯度>98%),购自Dr.Ehrenstorfer公司;对照品L-鼠李糖(批号FS1607340,纯度以98%计),购自广州硕谱生物科技有限公司;对照品D(+)岩藻糖(批号D06HB201374,纯度≥98%)、葡聚糖(平均分子量分别为2000、20000、40000、100000、200000、500000),购自上海源叶生物科技有限公司。溴化钾为光谱纯,购自上海麦克林生化科技有限公司;95%乙醇、无水乙醇、三氯甲烷、正丁醇、乙酸、乙酸钠、浓盐酸、氢氧化钠、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)、乙酸铵均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 样品

本研究于市场及原产地共收集桑黄样品29批,包括桑树桑黄(SH)8批、杨树桑黄(YH)15批、暴马桑黄(BH)3批、松木层孔菌(松树桑黄)(SSH)3

批,经安徽省食品药品检验研究院张亚中主任中药师鉴定分别为桑树桑黄 *Sanghuangporus sanghuang* (Sheng H. Wu, T. Hatt & Y. C. Dai) Sheng H. Wu、杨树桑黄 (*Sanghuangporus vaninii* Ljub.) L. W. Zhou & Y. C. Dai、暴马桑黄 *Sanghuangporus baumii* (Pilát) L. W. Zhou & Y. C. Dai 及松树桑黄 *Phellinus pini* (Thore: Fr.) A. Ames 的干燥子实体。样品产地信息见表1,性状图见图1。SH外观为耳形或马蹄形,颜色鲜黄,比重轻;YH外观呈球形或椭圆形,颜色棕褐色或灰黄色,比重轻;BH年轮有明显角度,有扎手感,整体饱和度低;SSH呈宽马蹄形,大小中等,有独特的松香味,桑黄的质量可能因其品种不同存在差异。

表1 29批桑黄药材信息

Tab. 1 Information on 29 batches of *Sanghuangporus* herbs

编号 (No.)	来源 (source)
YH1	安徽金寨(椴木栽培)[Jinzhai, Anhui (linden cultivation)]
YH2	安徽金寨(椴木栽培)[Jinzhai, Anhui (linden cultivation)]
YH3	吉林延边(椴木栽培)[Yanbian, Jilin (linden cultivation)]
YH4	吉林延边(椴木栽培)[Yanbian, Jilin (linden cultivation)]
YH5	山东临清(椴木栽培)[Linqing, Shandong (linden cultivation)]
YH6	山东临清(椴木栽培)[Linqing, Shandong (linden cultivation)]
YH7	河南南阳(椴木栽培)[Nanyang, Henan (linden cultivation)]
YH8	河南南阳(椴木栽培)[Nanyang, Henan (linden cultivation)]
YH9	湖北随州(椴木栽培)[Suizhou, Hubei (linden cultivation)]
YH10	湖北随州(椴木栽培)[Suizhou, Hubei (linden cultivation)]
YH11	黑龙江饶河(椴木栽培)[Raohe, Heilongjiang (linden cultivation)]
YH12	黑龙江饶河(椴木栽培)[Raohe, Heilongjiang (linden cultivation)]
YH13	河南南阳(袋料栽培)[Nanyang, Henan (bagged cultivation)]
YH14	河南南阳(袋料栽培)[Nanyang, Henan (bagged cultivation)]
YH15	山东青岛(袋料栽培)[Qingdao, Shandong (bagged cultivation)]
SH1	西藏林芝低海拔(野生)[Linzi, Xizang, low altitude (wild)]
SH2	西藏林芝低海拔(野生)[Linzi, Xizang, low altitude (wild)]
SH3	西藏林芝低海拔(野生)[Linzi, Xizang, low altitude (wild)]
SH4	西藏林芝低海拔(野生)[Linzi, Xizang, low altitude (wild)]
SH5	西藏林芝高海拔(野生)[Linzi, Xizang, high altitude (wild)]
SH6	西藏林芝高海拔(野生)[Linzi, Xizang, high altitude (wild)]
SH7	西藏林芝高海拔(野生)[Linzi, Xizang, high altitude (wild)]
SH8	西藏林芝高海拔(野生)[Linzi, Xizang, high altitude (wild)]
BH1	吉林长白山(野生)[Changbaishan, Jilin (wild)]
BH2	黑龙江伊春(野生)[Yichun, Heilongjiang (wild)]
BH3	吉林吉林(野生)[Jilin, Jilin (wild)]
SSH1	吉林吉林(野生)[Jilin, Jilin (wild)]
SSH2	吉林桦甸(野生)[Huadian, Jilin (wild)]
SSH3	吉林桦甸(野生)[Huadian, Jilin (wild)]

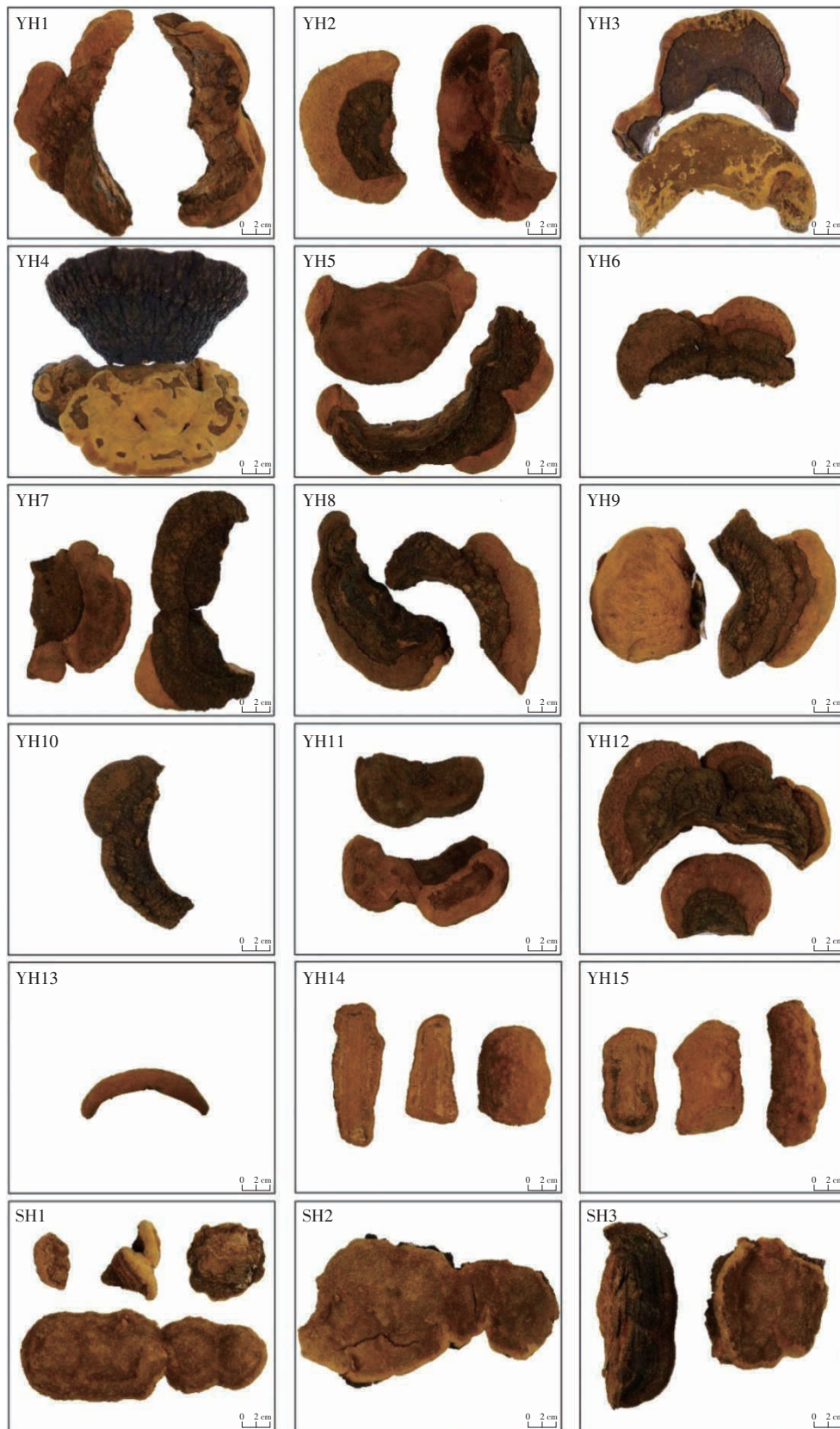


图 1 29 批桑黄药材性状图

Fig. 1 Macroscopic features of 29 batches of *Sanghuangporus* herbs

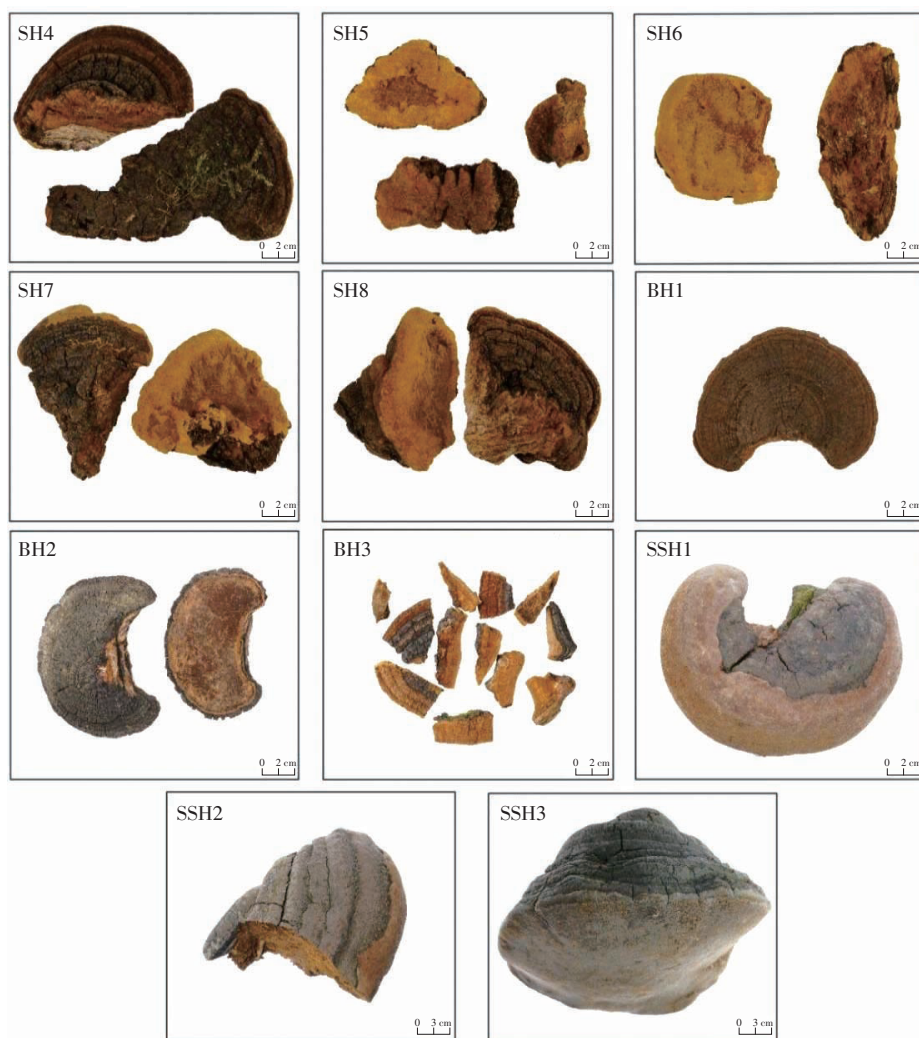


图 1(续)

Fig. 1 (continued)

2 方法

2.1 桑黄多糖提取除杂

取样品适量,粉碎过 4 号筛,烘干,置于烧杯中,加入 4 倍体积 95% 乙醇浸提,过夜,3 500 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min 得滤渣,重复 1 次,滤渣置 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干。取滤渣 5 g,置圆底烧瓶中,加水 100 mL,加热回流提取 2 h,冷却,3 500 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min,取上清液,重复 1 次。合并上清液,加热浓缩至 20 mL,冷却至室温,加无水乙醇至醇浓度为 80%,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下静置 12 h,进行沉淀。3 500 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min,收集沉淀物,复溶到 20 mL 纯水中,得粗多糖溶液,备用。

在粗多糖溶液中,按体积比 5 : 1 加入 Sevage 试剂 [三氯甲烷 - 正丁醇 (5 : 1)],充分振摇。3 500 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min 后收集上层糖液,重复上述步骤,直至出现薄薄的蛋白层。将糖液转移至透析袋中进行透析,

透析后糖液置 50 mL 顶空瓶中,冷冻干燥,得到桑黄粗多糖冻干粉。

2.2 桑黄多糖重均分子量测定

2.2.1 色谱条件 采用 TSK-GEL[®]G3000 PWXL 色谱柱 (7.8 mm \times 30 cm, 7 μm),以 20 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸 - 醋酸钠缓冲液 (pH 5.7) 为流动相,流速 0.5 mL $\cdot \text{min}^{-1}$,进样量 15 μL ,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,检测器为示差检测器 (RID)。

2.2.2 供试品溶液及对照品溶液的制备 取桑黄粗多糖冻干粉适量,用流动相配成质量浓度为 5 mg $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液。取葡萄糖和葡聚糖对照品 (平均分子量分别为 2 000、20 000、40 000、100 000、200 000、500 000) 适量,用流动相配制成 1 mg $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.3 桑黄多糖红外光谱测定

采用傅里叶变换红外光谱仪,使用 OMNIC 5.0

软件进行数据采集。称取冻干粉 2 mg,用溴化钾压片法进行红外光谱分析,光谱测定范围 4 000~400 cm^{-1} ,光谱分辨率为 4 cm^{-1} ,扫描 16 次。

2.4 桑黄多糖完全酸水解糖谱分析

2.4.1 供试品溶液的制备 取桑黄粗多糖冻干粉 5 mg,精密称量,置 10 mL 安瓿瓶中,加入纯水 1 mL 和 3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸(取浓盐酸 24.9 mL,加水稀释至 100 mL,即得)500 μL 。封口后,放置于 110 $^{\circ}\text{C}$ 鼓风干燥箱中水解 1 h,取出,冷却至室温,用 3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液(取氢氧化钠 12 g,加水溶解并稀释至 100 mL,即得)调节 pH 至中性。

2.4.2 混合对照品溶液的制备 取甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、木糖、岩藻糖各对照品适量,精密称量,置量瓶中,加纯水制成每 1 mL 含甘露糖 0.60 mg、鼠李糖 0.05 mg、葡萄糖 2.00 mg、木糖 0.60 mg 和岩藻糖 0.30 mg 的混合对照品溶液。

2.4.3 PMP 衍生化 吸取混合对照品溶液及供试品溶液各 400 μL ,分别置于 4 mL EP 管中,加入 0.3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液(取氢氧化钠 1.2 g,加水溶解成 100 mL,即得)400 μL 和 0.5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PMP 甲醇溶液(取 PMP 8.71 g,加甲醇溶解成 100 mL,即得)400 μL ,混匀,置 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 100 min。反应结束后,放至室温,加入 0.3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸(取浓盐酸 2.5 mL,加水稀释至 100 mL,即得)500 μL ,混匀。EP 管中加入同等体积的三氯甲烷,于漩涡混合仪上混合洗涤,弃去三氯甲烷液,重复 6 次以除去多余的 PMP。最后,将上述衍生化的供试品溶液及对照品溶液过 0.45 μm 微孔滤膜,备用。

2.4.4 色谱条件 采用 Agilent 1260 型高效液相色谱仪,色谱柱为 Agilent 5 HC-C₁₈(2)(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm),以乙腈-0.02 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵(20:80)为流动相,流速 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 250 nm,进样量 10 μL ,检测器为 UV 检测器,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

3 结果与分析

3.1 桑黄多糖 HPGFC-RID 糖谱

取桑黄粗多糖冻干粉,按“2.2”项方法制备供试品溶液并按“2.2.1”项条件进样测定,生成的 HPGFC-RID 叠加图见图 2。29 批桑黄样品重均分子量糖谱总体上相似,均在 9~18 min 产生 2 个主要的色谱峰 P1 和 P2,表明桑黄多糖是由 2 种不同重均分子量的多糖组成的混合物。用 HPGFC-RID 采集不同重均分子量对照品色谱图,用 GPC 软件进行再分析处理,得到分子量校正曲线,相关系数(r)为 0.998,加载校正曲线自动积分得到各样品重均分子量,见表 2。P1 的重均分子量范围为 $4.068 \times 10^5 \sim 6.007 \times 10^5$,P2 的重均分子量范围为 $1.466 \times 10^4 \sim 3.880 \times 10^4$,2 种多糖重均分子量相差 1 个数量级。29 批桑黄多糖重均分子量散点分布图见图 3。结果显示,不同品种桑黄的桑黄多糖重均分子量均值存在差异:对于主要色谱峰 P1,BH 多糖的重均分子量最高,其次依次为 SSH、SH 和 YH 多糖;对于主要色谱峰 P2,YH 多糖的重均分子量最高,其次依次为 SSH、SH 和 BH 多糖。实验结果进一步证明,HPGFC 糖谱可作为多重指纹图谱之一,根据桑黄多糖重均分子量不同,用于区分不同品种桑黄,为桑黄的质量控制提供帮助。

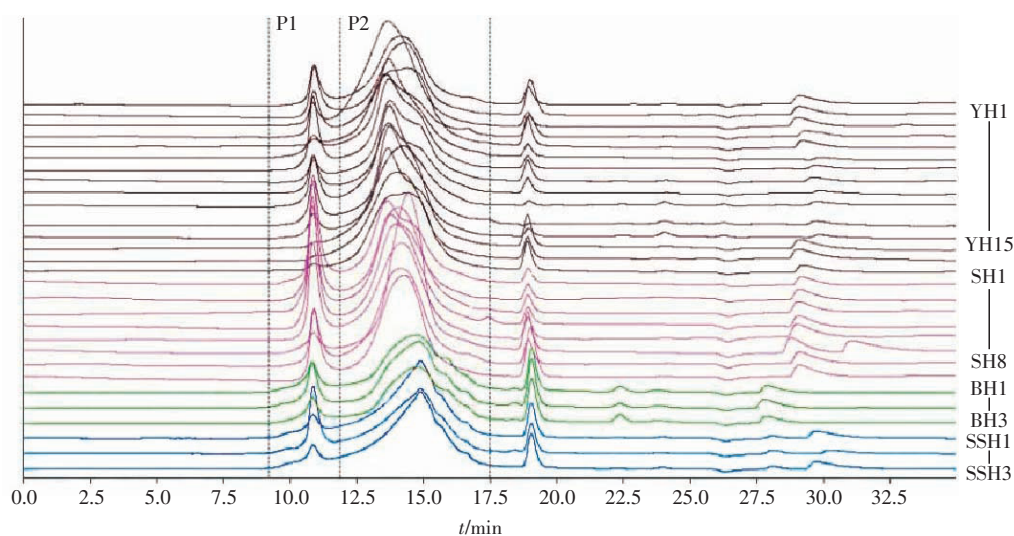


图 2 桑黄多糖 HPGFC 指纹图谱

Fig. 2 HPGFC fingerprint of *Sanghuangporus* polysaccharides

表 2 桑黄多糖重均分子量

Tab. 2 The mass average molar mass (M_w) of *Sanghuangporus* polysaccharides

编号 (No.)	M_w		编号 (No.)	M_w	
	P1($\times 10^5$)	P2($\times 10^4$)		P1($\times 10^5$)	P2($\times 10^4$)
YH1	4.068	1.466	SH1	4.496	2.814
YH2	4.102	1.558	SH2	4.640	2.843
YH3	4.566	1.568	SH3	4.596	2.938
YH4	4.471	1.812	SH4	4.631	2.959
YH5	4.578	2.202	SH5	4.353	3.068
YH6	4.531	2.397	SH6	5.166	3.160
YH7	4.611	2.401	SH7	4.402	3.161
YH8	4.636	2.404	SH8	4.233	3.170
YH9	4.456	2.430	BH1	5.520	3.317
YH10	4.514	2.500	BH2	5.840	3.324
YH11	4.886	2.555	BH3	5.604	3.409
YH12	4.334	2.653	SSH1	6.007	3.532
YH13	4.485	2.657	SSH2	5.005	3.616
YH14	4.227	2.674	SSH3	5.567	3.880
YH15	4.222	2.723			

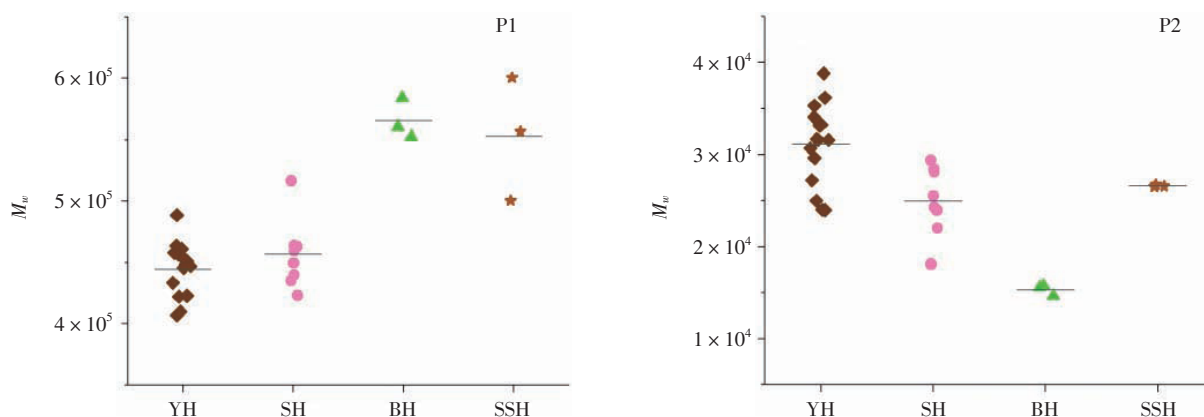


图 3 桑黄多糖重均分子量分布

Fig. 3 Distribution of mass average molar mass of *Sanghuangporus* polysaccharides

3.2 桑黄多糖 FT-IR 糖谱

为表征桑黄多糖化学基团和结构特征,取 29 批桑黄的粗多糖冻干粉,按“2.3”项条件进行 FT-IR 光谱测定。YH、SH、BH 和 SSH 多糖的叠加光谱见图 4。结果显示,不同官能团振动呈现出不同吸收带。除 SH6 和 BH1 多糖外, YH、SH、BH 和 SSH 多糖的种内差异不明显,但 3 批袋料栽培的 YH (YH13、YH14、YH15) 多糖与椴木栽培的 YH 多糖在 1 800~900 cm^{-1} 范围内的主要吸收峰强度不同,表明桑黄栽培方式不同,其质量也会存在差异。29 批桑黄具有相似的红外光谱吸收峰,指纹图谱相似度较高,证明 FT-IR 糖谱也可以作为提高桑黄多糖质量控制的多重指纹图

谱之一。

利用 OMNIC 5.0 软件进行谱图相加,得到 YH、SH、BH 和 SSH 多糖的平均光谱图,见图 5。4 000~400 cm^{-1} 范围内具有多糖类物质的一般特征,其中 3 400 cm^{-1} 附近的强吸收峰是羟基伸缩振动吸收峰,2 930 cm^{-1} 附近的吸收峰是 C-H 伸缩振动峰,1 638 cm^{-1} 附近的峰是糖分子中羟基弯曲振动吸收峰,1 413 cm^{-1} 附近的吸收峰是 C-H 弯曲振动峰,1 152 cm^{-1} 附近为吡喃糖环中醚键(C-O-C) C-O 伸缩振动峰,1 100~1 010 cm^{-1} 的吸收峰是醇羟基变角振动吸收峰,1 730 cm^{-1} 附近没有糖醛酸的特征吸收峰,表明桑黄多糖可能为中性杂多糖^[11-12]。

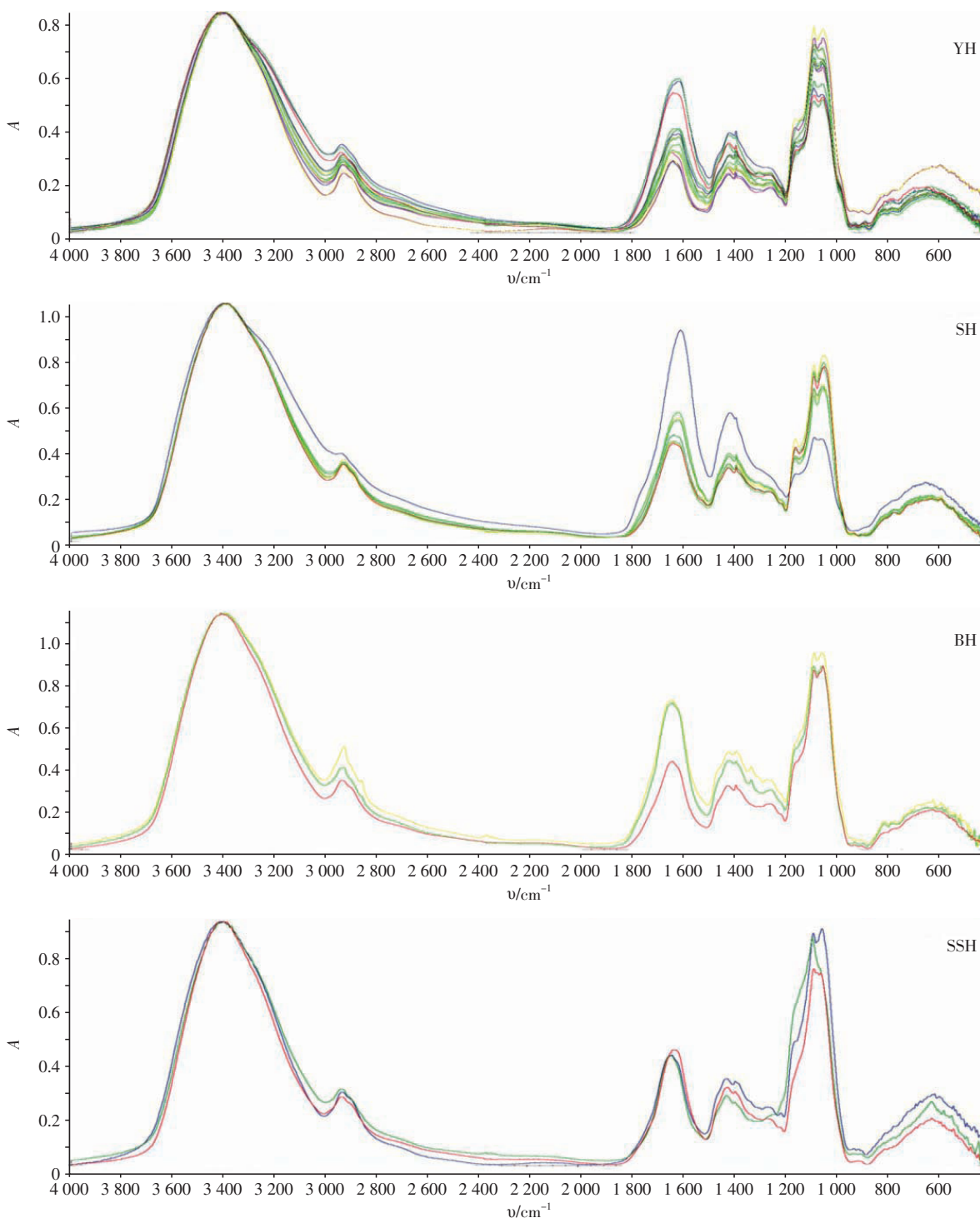


图 4 桑黄多糖叠加光谱图

Fig. 4 Superimposed spectra of *Sanghuangporus* polysaccharides

3.3 桑黄多糖 HPLC-UV 糖谱

3.3.1 HPLC-UV 糖谱的建立 取“2.4.3”项下 PMP 衍生化供试品溶液,按“2.4.4”项条件进样 10 μ L,记录 HPLC 色谱图。采用国家药典委员会中药色谱指

纹图谱相似度评价系统(2012.1 版)进行评价,设定 SH1 样品图谱为参照图谱,将其余样品色谱峰与 SH1 样品色谱峰进行自动匹配,生成对照指纹图谱见图 6,29 批桑黄药材 HPLC 叠加图见图 7。

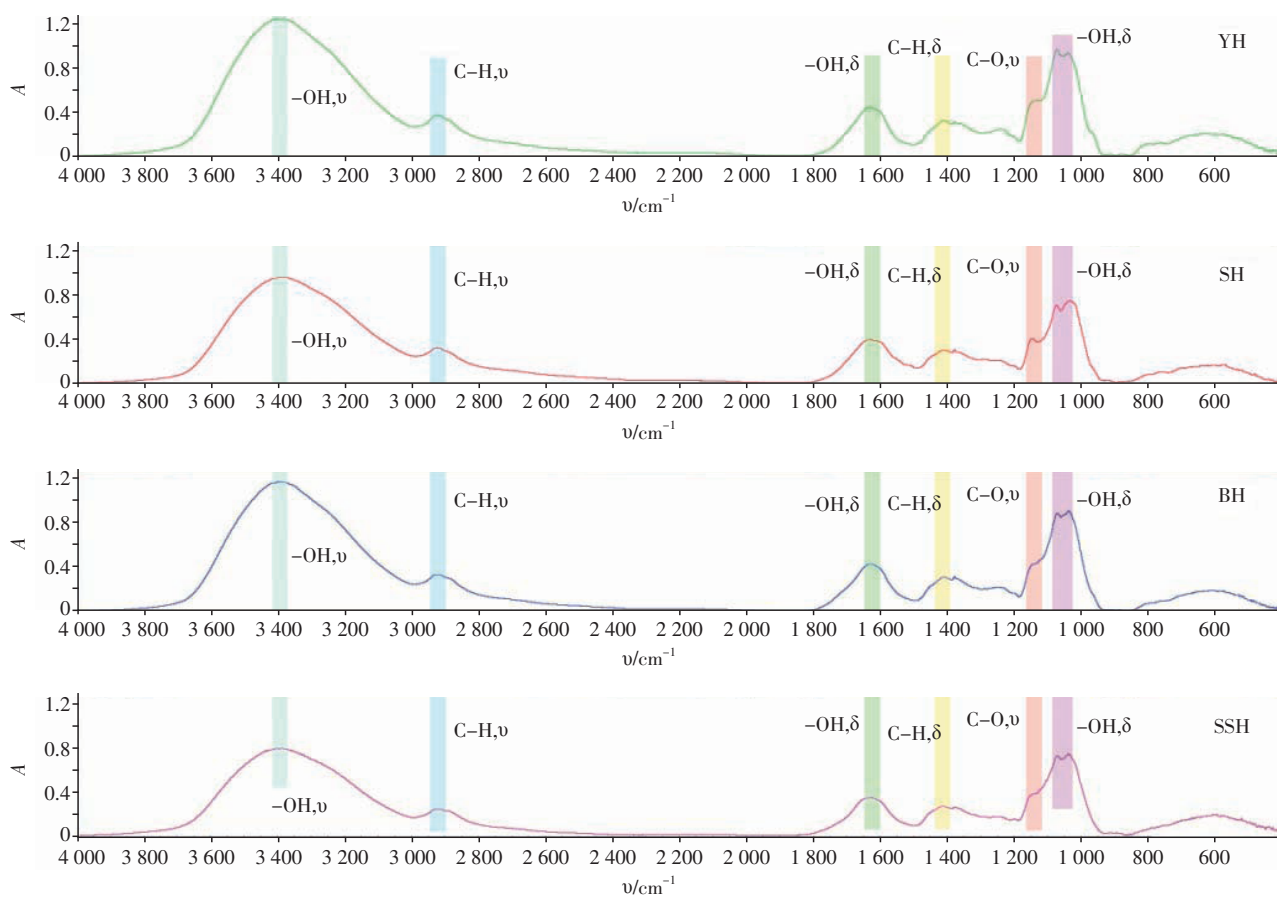
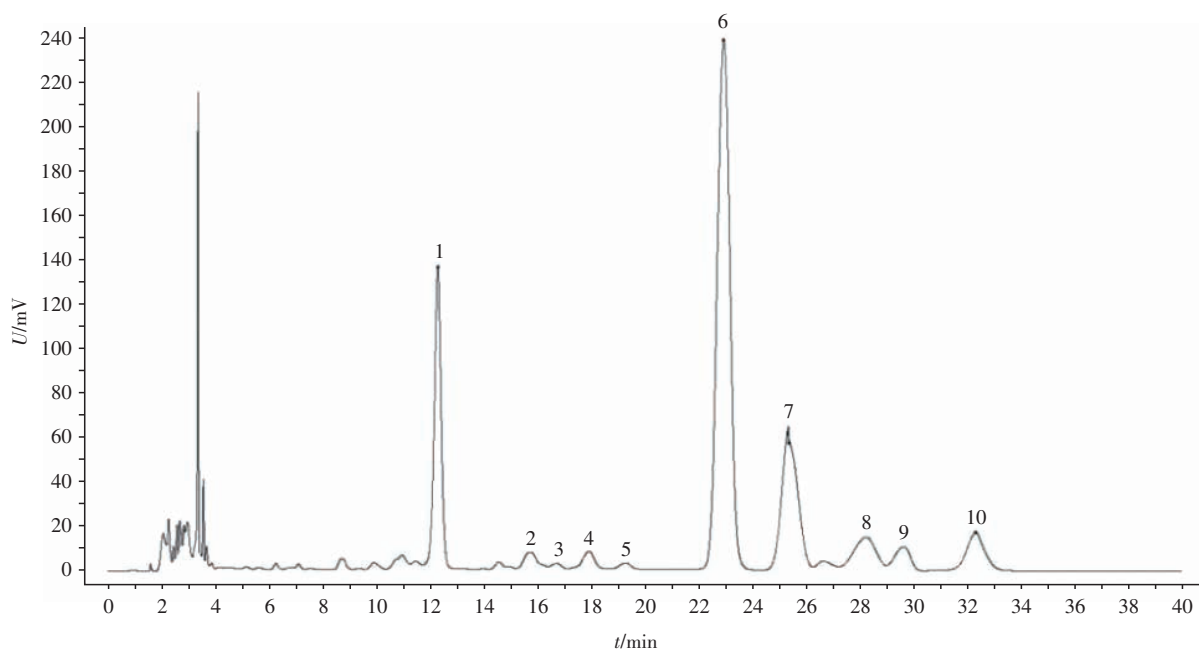


图5 桑黄多糖平均光谱图

Fig. 5 Average spectra of *Sanghuangporus* polysaccharides



1. 甘露糖 (mannose) 3. 鼠李糖 (rhamnose) 6. 葡萄糖 (glucose) 8. 木糖 (xylose) 10. 岩藻糖 (fucose)

图6 桑黄 HPLC 指纹图谱

Fig. 6 HPLC fingerprint of *Sanghuangporus*

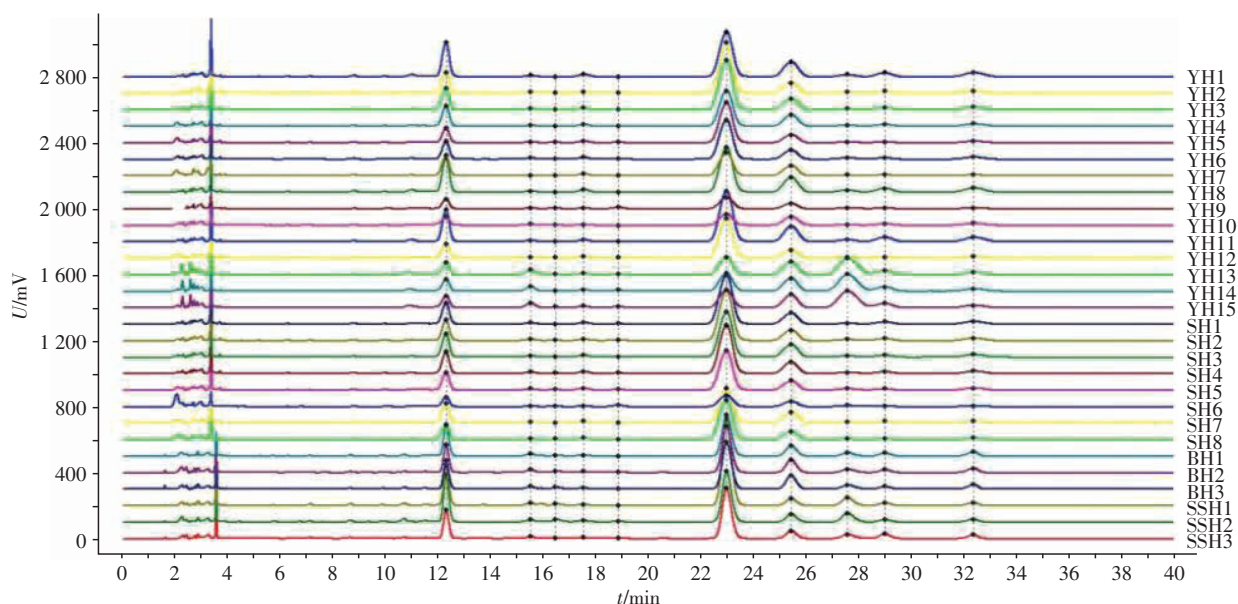


图7 桑黄 HPLC 叠加图

Fig.7 HPLC overlay chart of Sanghuangporus

3.3.2 相似度评价 通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统,对 29 批桑黄的桑黄单糖组成指纹图谱中出峰时间基本一致的 10 个共有峰进行相似度分析,结果见表 3。结果显示,所有样品与对照指纹图谱相似度均在 0.9 以上,且数值越大相似度越高,说明 29 批桑黄样品单糖组成具有较高相似性。

表 3 相似度评价结果

Tab.3 The result of the similarity evaluation

编号 (No.)	相似度 (similarity)	编号 (No.)	相似度 (similarity)
YH1	0.996	SH1	0.996
YH2	1.000	SH2	0.994
YH3	0.996	SH3	1.000
YH4	0.999	SH4	0.997
YH5	0.991	SH5	0.997
YH6	0.997	SH6	0.992
YH7	0.982	SH7	0.999
YH8	0.996	SH8	0.991
YH9	0.982	BH1	0.999
YH10	0.927	BH2	0.999
YH11	1.000	BH3	0.999
YH12	0.991	SSH1	0.992
YH13	0.936	SSH2	0.975
YH14	0.954	SSH3	0.979
YH15	0.967		

3.3.3 共有峰的指认 通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件对 29 批桑黄药材单糖组成色谱图进

行共有峰标识,根据各峰的峰面积、峰形和分离度,选择 10 个共有峰,并与对照品色谱图进行比对,最终确定 1 号峰为甘露糖,3 号峰为鼠李糖,6 号峰为葡萄糖,8 号峰为木糖,10 号峰为岩藻糖。

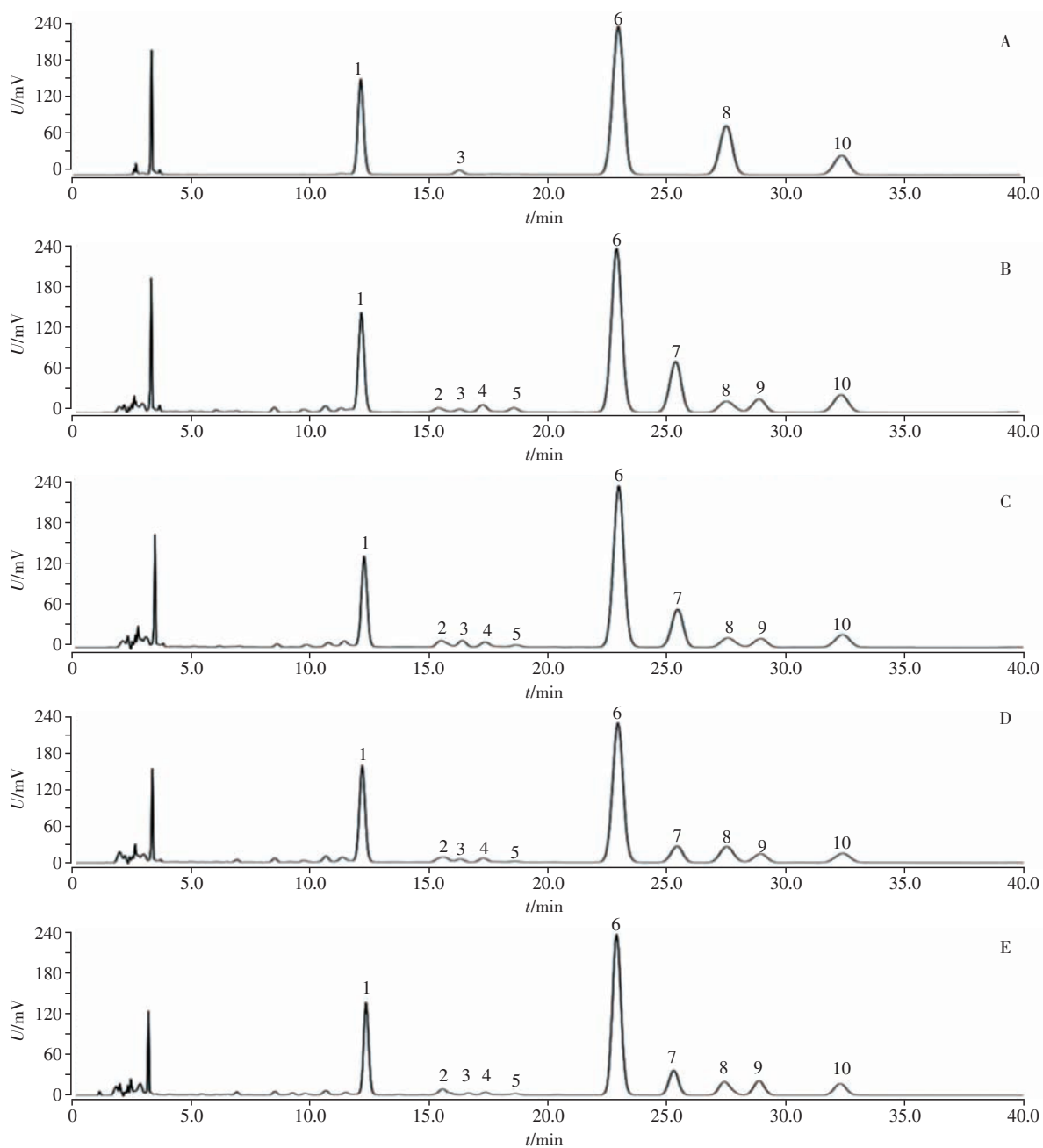
3.4 桑黄多糖完全酸水解含量测定

3.4.1 专属性试验 精密吸取“2.4”项下混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液,在“2.4.4”项条件下,测定并记录色谱图,见图 8。结果显示,阴性对照溶液无干扰,专属性强。

3.4.2 线性关系考察 精密吸取“2.4.3”项 PMP 衍生化后混合对照品溶液适量,梯度稀释 2、4、16、64 倍,按“2.4.4”项色谱条件进行测定。以待测成分的浓度 X 为横坐标,待测成分峰面积 Y 为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程及相关系数,结果见表 4。

3.4.3 精密度试验 按“2.4.4”项色谱条件,取用混合对照品溶液连续进行 6 次进样,记录待测成分峰面积并计算 RSD。结果甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、木糖和岩藻糖峰面积的 RSD ($n=6$) 均 $< 1.6\%$,表明使用的仪器精密度良好。

3.4.4 稳定性试验 取同一份 PMP 衍生化后供试品溶液 (YH1),分别于制样后 0、2、4、6、8、10、12、24、36、48 h,按“2.4.4”项色谱条件进行测定,记录峰面积,计算甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、木糖和岩藻糖含量和 RSD。结果 5 个成分含量的 RSD 均 $< 2.0\%$,表明供试品溶液在 48 h 内基本稳定。



1. 甘露糖 (mannose) 3. 鼠李糖 (rhamnose) 6. 葡萄糖 (glucose) 8. 木糖 (xylose) 10. 岩藻糖 (fucose)

A. 混合对照品 (mixed reference) B. YH C. SH D. BH E. SSH F. 阴性对照 (negative control)

图 8 混合对照品溶液和供试品溶液的对比图

Fig. 8 Comparison of mixed reference and sample solutions

表 4 5 个成分的回归方程、线性范围

Tab. 4 Regression equation and linear range of 5 components

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	线性范围 (linear range) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	<i>r</i>
甘露糖 (mannose)	$Y=264.4 X-1.799 8$	9.375~600	0.999 8
鼠李糖 (rhamnose)	$Y=183.38 X-0.097 4$	0.781~50	0.999 5
葡萄糖 (glucose)	$Y=219.93 X-4.768 5$	31.250~2 000	0.999 7
木糖 (xylose)	$Y=241.13 X-0.909 8$	9.375~600	0.999 8
岩藻糖 (fucose)	$Y=155.62 X-0.424 7$	4.688~300	0.999 8

3.4.5 重复性试验 精密称取适量桑黄粗多糖冻干粉(YH1),平行6份,按“2.4.1”项方法制备供试品溶液,衍生化后,按“2.4.4”项色谱条件进行测定,记录峰面积,计算甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、木糖和岩藻糖的含量和RSD。结果甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、木糖和岩藻糖的平均含量($n=6$)分别为7.99%、0.49%、37.44%、0.88%、5.68%,RSD($n=6$)均小于2.4%,表明本方法的重复性良好。

3.4.6 加样回收率试验 精密称定已知含量的桑黄多糖粗粉(YH1)2.5 mg,平行6份,分别加入对照品溶液甘露糖300 μ L、鼠李糖400 μ L、葡萄糖450 μ L、木糖33 μ L、岩藻糖500 μ L,按“2.4.1”项方法制备供试溶液,衍生化后,按“2.4.4”项色谱条件进行测定,计算各个待测成分的平均回收率和RSD,结果见表5。根据统计,5个待测成分的平均加样回收率在98.1%~101.9%,RSD均小于2.0%,表明本方法可以获得较为准确的结果。

表5 5个成分加样回收率试验($n=6$)

Tab. 5 The recoveries of 5 components

成分 (component)	样品含量 (content)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (detected)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/%
甘露糖(mannose)	0.19	0.18	0.38	100.6	101.9	1.1
	0.20	0.18	0.38	101.3		
	0.19	0.18	0.38	101.4		
	0.20	0.18	0.38	102.8		
	0.20	0.18	0.38	101.7		
	0.20	0.18	0.38	103.5		
鼠李糖(rhamnose)	0.01	0.02	0.03	95.3	98.1	1.6
	0.01	0.02	0.03	99.3		
	0.01	0.02	0.03	98.7		
	0.01	0.02	0.03	97.3		
	0.01	0.02	0.03	99.3		
	0.01	0.02	0.03	98.7		
葡萄糖(glucose)	0.91	0.90	1.85	103.9	101.4	1.4
	0.92	0.90	1.83	101.1		
	0.91	0.90	1.81	100.1		
	0.92	0.90	1.83	101.2		
	0.92	0.90	1.82	100		
	0.92	0.90	1.84	102.2		
木糖(xylose)	0.02	0.02	0.04	98.9	99.7	1.5
	0.02	0.02	0.04	100.1		
	0.02	0.02	0.04	97.7		
	0.02	0.02	0.04	102.2		
	0.02	0.02	0.04	99.4		
	0.02	0.02	0.04	99.7		
岩藻糖(fucose)	0.14	0.15	0.29	100.2	100.1	0.95
	0.14	0.15	0.29	101.3		
	0.14	0.15	0.29	100.1		
	0.14	0.15	0.29	98.7		
	0.14	0.15	0.29	100.7		
	0.14	0.15	0.29	99.3		

3.4.7 样品含量测定 取29批样品,按“2.4.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.4.4”项色谱条件进行测定,用外标法计算样品含量,结果见表6。29批样品中甘露糖含量范围为3.38%~10.25%,鼠李糖含量范围为0.59%~1.13%,葡萄糖含量范围为

8.99%~23.45%,木糖含量范围为1.17%~4.89%,岩藻糖含量范围为1.55%~2.67%。

建立桑黄多糖中5个单糖成分含量柱状图,以相对丰度为纵坐标,直观地显示桑黄样品种内种间的差异,见图9。结果显示,29批桑黄多糖中5个单

表 6 桑黄多糖中 5 个单糖成分的含量

Tab. 6 Content of five monosaccharide components in *Sanghuangporus polysaccharide*

编号 (No.)	含量 (content) /%				
	甘露糖 (mannose)	鼠李糖 (rhamnose)	葡萄糖 (glucose)	木糖 (xylose)	岩藻糖 (fucose)
YH1	7.99	0.49	37.44	0.88	5.68
YH2	7.12	0.28	31.81	0.65	4.27
YH3	8.24	0.21	31.85	0.77	2.60
YH4	8.00	0.74	16.37	1.81	4.19
YH5	9.33	0.37	22.46	1.03	2.23
YH6	9.20	0.69	16.25	2.18	5.43
YH7	7.01	0.22	10.08	1.62	2.91
YH8	9.70	0.35	23.24	1.73	6.28
YH9	6.51	0.21	11.41	0.91	1.46
YH10	6.72	0.22	11.39	0.94	1.49
YH11	8.85	0.26	18.50	1.04	1.88
YH12	9.86	0.74	18.87	2.39	5.64
YH13	3.45	1.59	4.87	13.34	3.31
YH14	3.75	1.42	4.75	11.42	4.15
YH15	3.86	1.44	4.54	10.84	3.95
SH1	7.25	0.20	36.04	0.85	3.84
SH2	6.97	0.28	36.53	1.29	3.63
SH3	7.86	0.43	32.98	1.25	4.02
SH4	7.27	0.40	34.77	1.37	3.54
SH5	6.03	0.53	28.52	1.51	3.05
SH6	3.38	0.59	8.99	1.17	1.55
SH7	6.63	0.30	25.05	1.09	3.49
SH8	4.89	0.41	28.75	0.91	2.37
BH1	7.11	0.49	22.71	3.05	2.89
BH2	6.33	0.85	21.79	2.52	4.14
BH3	6.19	0.71	21.59	2.10	4.15
SSH1	6.53	0.30	23.70	2.57	3.51
SSH2	10.25	1.13	23.45	4.89	2.67
SSH3	8.83	0.76	39.03	4.23	3.01

糖组成比例不同, YH(椴木栽培)、SH、BH 和 SSH 多糖中葡萄糖含量最高,甘露糖和岩藻糖次之,木糖和鼠李糖最低,分布趋势近似平行。YH(袋料栽培)

中木糖含量最高,岩藻糖、甘露糖、葡萄糖含量次之,鼠李糖含量最低,与其他样品相比具有明显差异。

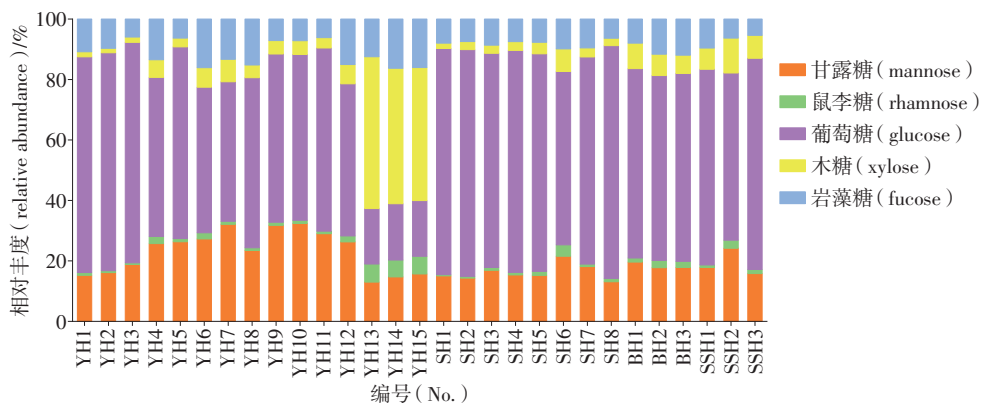
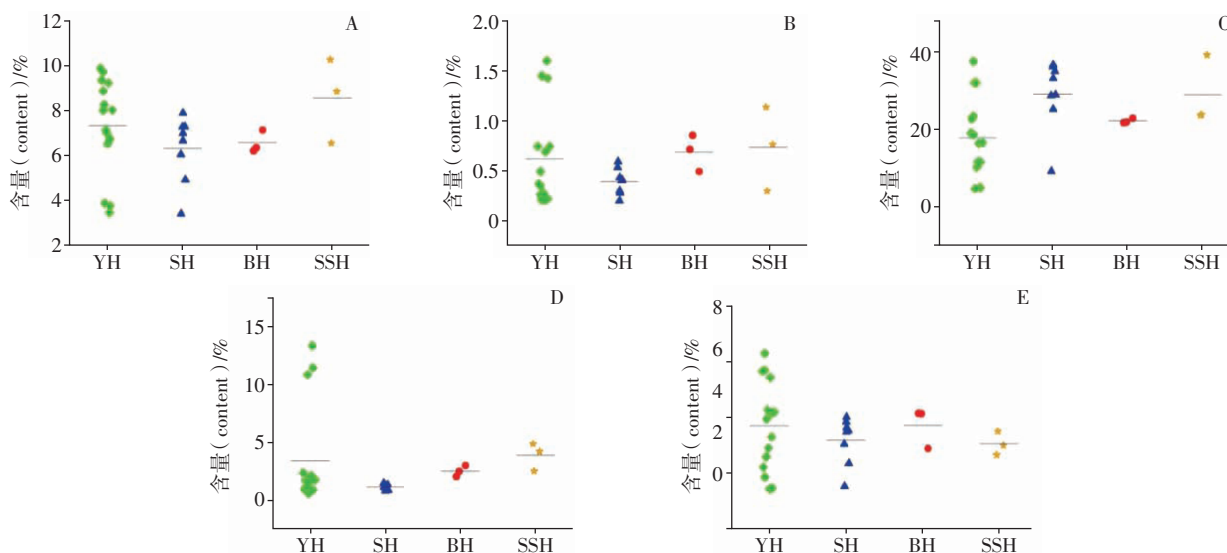


图 9 5 个单糖成分的含量柱状图

Fig. 9 Histogram of the contents of 5 monosaccharide components

对5个单糖在29批桑黄样品中的分布进行分析,见图10。4个品种桑黄多糖的5个单糖含量相差不大。但相对而言,甘露糖、鼠李糖和木糖的含量均值在SSH样品中较高,在SH样品中较低;葡萄糖的

含量均值在SH和SSH样品中较高,在YH样品中最低;岩藻糖的含量均值在SH和SSH样品中较低,5个单糖的含量分布结果可为区分不同品种的桑黄提供参考。



A. 甘露糖 (mannose) B. 鼠李糖 (rhamnose) C. 葡萄糖 (glucose) D. 木糖 (xylose) E. 岩藻糖 (fucose)

图10 样品分布图

Fig. 10 Map of the distribution of samples

将29批桑黄多糖样品中5个单糖成分的含量测定结果导入SIMCA-P 14.0软件进行主成分分析(PCA),以5个单糖成分的含量为变量,建立PCA模型,见

图11。结果显示,3批袋料栽培的YH聚为一类,其他桑黄样品没有明显区分,与含量柱状图结果相同。进一步表明,桑黄质量可能因栽培方式不同而存在差异。

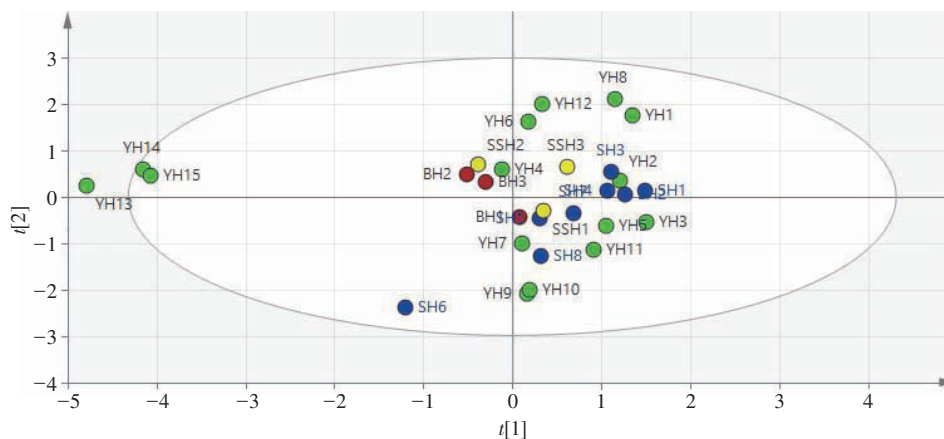


图11 29批样品PCA图

Fig. 11 PCA diagram of 29 samples

4 讨论

4.1 重均分子量测定

本研究采用 HPGFC-RID 方法测定桑黄多糖重均分子量,预先考察不同色谱柱 (OHpak SB-804 HQ

色谱柱、TSK GEL®G3000 PWXL 色谱柱)、不同流动相 [水、9 mg·mL⁻¹ 氯化钠溶液、0.71% 硫酸钠溶液、20 mmol·L⁻¹ 乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH 5.7)]、不同流速 (0.4、0.5、0.6 mL·min⁻¹) 及不同柱温 (30、35、40 °C)

对色谱峰分离效果和峰形的影响,最终确定最优色谱条件。

4.2 红外光谱测定

在进行样品多糖红外光谱测定时,为获得高质量的透射光谱,样品与溴化钾的压片比例至关重要。样品比例高时,片子不易透明,强吸收峰易超过表尺刻度,出现齐头峰,无法确定其真实峰位;样品比例低时,某些峰会消失,无法得到完整的光谱图,且易产生干涉现象。本研究通过预实验,确定最佳比例为2 mg 样品多糖加300 mg KBr 研磨压片。通过比较1 000~700 cm^{-1} 范围内的特征吸收峰,可以识别不同的吡喃糖和呋喃糖,有助于糖苷键及糖构型的确定^[15]。

4.3 单糖含量测定

若单糖衍生化后PMP萃取不彻底,HPLC图谱中PMP峰明显,影响图谱效果;若PMP萃取过度,可能会造成单糖衍生产物的损失^[17]。实验预先考察了单糖衍生化后残留的PMP萃取次数,结果显示萃取6次后PMP峰已不影响图谱效果。同时,对Welch Ultimate Plus C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱和Agilent 5 HC-C₁₈(2)(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱进行考察,结合分离度、峰形等因素,选择Agilent 5 HC-C₁₈(2)(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱用于单糖组成研究。

5 小结

本研究所建立的HPGFC-RID糖谱、FT-IR糖谱和HPLC-UV糖谱可对不同品种桑黄质量进行有效评价。HPGFC-RID糖谱分析表明,应有2个主要色谱峰,其重均分子量可作为桑黄多糖质量控制的参数之一,用于区分不同品种的桑黄;FT-IR糖谱分析表明,桑黄多糖具有相似的红外光谱吸收峰,种内、种间差异不明显,但袋料栽培与椴木栽培的桑黄多糖在1 800~900 cm^{-1} 范围内主要吸收峰强度不同;HPLC-UV糖谱分析表明,葡萄糖为桑黄多糖的主要单糖组分,可根据桑黄多糖的单糖含量区分不同品种的桑黄。

不同的栽培方式对桑黄的质量也存在影响,其中,袋料栽培的桑黄、椴木栽培的桑黄和野生桑黄有明显区分。已有研究表明,不同栽培基质会导致袋料栽培桑黄子实体成分的差异,包括多糖含量及粗多糖单糖组成,从而影响其有效成分活性^[18]。此结果提示,尽管野生桑黄资源日渐匮乏,各地开始推广栽培桑黄,但仍需要对栽培技术、栽培桑黄的有效成分和

药用功效进行更深入的研究。

吴声华等^[1]通过研究确定了真正的桑黄种类为桑树桑黄,实验结果证实,目前普遍市售的另外3个桑黄品种,其多糖类成分的理化性质及单糖组成与桑树桑黄具有很高的相似性。从有效成分多糖的角度分析,收集的4种桑黄均可作为中药桑黄使用,本研究同时填补了桑黄多糖标准化研究的不足,为桑黄质量标准的建立奠定了基础。

参考文献

- [1] 吴声华,戴玉成.药用真菌桑黄的种类解析[J].菌物学报,2020,39(5):781
WU SH, DAI YC. Species clarification of the medicinal fungus *Sanghuang*[J]. *Mycosystema*, 2020, 39(5): 781
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1999:546
Editorial Committee of the Chinese Materia Medica of the State Administration of Traditional Chinese Medicine. *Chinese Materia Medica*[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1999: 546
- [3] 石河,梅景晨,李荣雪,等.桑黄多糖的提取分离及药理作用研究进展[J].药物评价研究,2023,46(6):1360
SHI H, MEI JC, LI RX, et al. Research progress in extraction, separation and pharmacological action of *Phellinus* polysaccharides[J]. *Drug Eval Res*, 2023, 46(6): 1360
- [4] YANG Y, HE PY, LI N. The antitumor potential of extract of the oak bracket medicinal mushroom *Inonotus baumii* in SMMC-7721 tumor cells[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, doi: 10.1155/2019/1242784
- [5] LEE S, LEE D, JANG ST, et al. Anti-inflammatory phenolic metabolites from the edible fungus *Phellinus baumii* in LPS-stimulated RAW264.7 cells[J]. *Molecules*, 2017, 22(10): 1583
- [6] ZHANG JJ, CHEN BS, DAI HQ, et al. Sesquiterpenes and polyphenols with glucose-uptake stimulatory and antioxidant activities from the medicinal mushroom *Sanghuangporus sanghuang*[J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(9): 693
- [7] 范祺,吴茂玉,张博华,等.桑黄的主要活性成分及国内外研究进展[J].中国果菜,2022,42(11):50
FAN Q, WU MY, ZHANG BH, et al. Main active components of *Phellinus linteus* and its domestic and international research progress[J]. *Chin Fruit Veg*, 2022, 42(11): 50
- [8] 周荣,李有贵,汪泰初.我国桑黄研究进展[J].蚕桑通报,2023,54(4):12
ZHOU R, LI YG, WANG TC. Research progress of *Sanghuangporus* in China[J]. *Bull Seric*, 2023, 54(4): 12
- [9] 朱奕豪,付春,高晓东,等.桑黄的人工栽培技术研究现状[J].现代化农业,2023(8):47
ZHU YH, FU C, GAO XD, et al. Current status of research on artificial

- cultivation technology of *Morus alba* [J]. *Mod Agric*, 2023 (8): 47
- [10] 于艳杰,王芳芳,马红红,等. 桑黄生物活性成分及药理作用研究进展 [J]. *特种经济动植物*, 2022, 25 (10): 94
YU YJ, WANG FF, MA HH, *et al*. Progress in the study of bioactive components and pharmacological effects of *Sanghuangporus* [J]. *Spec Econ Anim Plants*, 2022, 25 (10): 94
- [11] KIM D, YANG B, JEONG S, *et al*. Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus* [J]. *Biotechnol Lett*, 2001, 23 (7): 513
- [12] KIM G, PARK S, LEE M, *et al*. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* activates murine B lymphocytes via protein kinase C and protein tyrosine kinase [J]. *Int Immunopharmacol*, 2003, 3 (9): 1281
- [13] 长城,赵俊华,于文杰,等. 杨树桑黄多糖提取工艺与测定 [J]. *化学试剂*, 2021, 43 (7): 973
CHANG C, ZHAO JH, YU WJ, *et al*. Extraction technology and determination of polysaccharide from *Sanghuangporus vaninii* [J]. *Chemotherapy*, 2021, 43 (7): 973
- [14] 高雯雯,张娜,俞淑文. 桑黄抗肿瘤及其作用机制的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39 (21): 4165
GAO WW, ZHANG N, YU SW. Progress in the study of anti-tumor and its mechanism of action of *Sanghuangporus* [J]. *China J Chin Mater Med*, 2014, 39 (21): 4165
- [15] MA XK, XU S, PETERSON EC, *et al*. A newly characterized exopolysaccharide from *Sanghuangporus sanghuang* [J]. *J Microbiol*, 2019, 9 (57): 812
- [16] 李绍平,吴定涛,赵静. 糖谱及其在中药多糖质量控制中的应用 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40 (17): 3505
LI SP, WU DT, ZHAO J. Saccharide mapping and its application in quality control of polysaccharides from Chinese medicines [J]. *China J Chin Mater Med*, 2015, 40 (17): 3505
- [17] 田妍,陈振兴,张宁,等. 中药水提液中还原糖衍生化测定方法研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31 (9): 3803
TIAN Y, CHEN ZX, ZHANG N, *et al*. Study on the method of reducing sugar derivatization in water-extract of Chinese materia medica [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2016, 31 (9): 3803
- [18] 王南南,王付彬,冯雯杰,等. 山东地区桑黄绿色高效袋料栽培关键技术 [J]. *食用菌*, 2023, 45 (6): 53
WANG NN, WANG FB, FENG WJ, *et al*. Key technology of green and efficient bag cultivation of *Sanghuangporus* in Shandong area [J]. *Edib Fungi*, 2023, 45 (6): 53

(本文于 2024 年 7 月 4 日收到)