

木芙蓉叶多糖的提取纯化工艺及组分分析



谢 瑞, 施 静, 许诗怡, 杨贺翔, 林若芸, 徐钧浩, 游元元

成都医学院药学院 (成都 610500)

【摘要】目的 研究木芙蓉叶多糖的提取工艺, 并对其单糖组成进行分析及分离纯化。**方法** 采用星点响应面法对木芙蓉叶多糖的酶法提取工艺进行优化研究, 用 Sevag 法和三氯乙酸法对木芙蓉叶多糖脱蛋白, 筛选最优脱蛋白方法; 对脱蛋白后的木芙蓉叶多糖进行 DEAE-52 纤维素柱和 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱层析分离纯化; 采用 1- 苯基 -3- 甲基 -5- 吡唑啉酮 (PMP) 柱前衍生 - 高效液相色谱法对木芙蓉叶多糖以及纯化产物的单糖组分进行分析。**结果** 木芙蓉叶多糖的最佳提取工艺为: 提取时间 3 h, 液料比 70 : 1, 温度 40 °C, 酶用量 1.3%, 产率为 56.42%; 木芙蓉叶多糖脱蛋白最佳方法为三氯乙酸法; 木芙蓉叶多糖主要由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖和岩藻糖 6 种单糖组成, 其含量排序为葡萄糖 > 半乳糖 > 木糖 > 甘露糖 ≈ 岩藻糖 > 鼠李糖, 且在 9 月份时总多糖含量达到最高; 分离纯化得到的木芙蓉叶多糖 I 含有葡萄糖和半乳糖, 摩尔比为 9.06 : 1, 木芙蓉叶多糖 II α 含有甘露糖、鼠李糖、半乳糖、木糖和岩藻糖, 摩尔比为 0.23 : 0.15 : 1 : 0.45 : 0.21, 木芙蓉叶多糖 II β 仅含少量岩藻糖。**结论** 木芙蓉叶多糖的最佳提取工艺稳定可行, 可为其生产提供理论依据; 使用 PMP 柱前衍生 - 高效液相色谱法测定木芙蓉叶多糖单糖组成稳定性、准确度及重复性好, 可作为木芙蓉叶多糖的质量控制方法; 木芙蓉叶多糖的纯化工艺稳定可行, 可成功纯化出均一多糖。

【关键词】 木芙蓉叶; 多糖; 提取工艺; 响应面设计; 分离纯化; 脱蛋白法; 单糖组成; 柱前衍生化

【中图分类号】 R284.2 **【文献标识码】** A

Extraction purification and composition analysis of Folium hibisci mutabilis polysaccharides

XIE Rui, SHI Jing, XU Shiyi, YANG Hexiang, LIN Ruoyun, XU Junhao, YOU Yuanyuan

School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

Corresponding author: YOU Yuanyuan, Email: yyy@cmc.edu.cn

【Abstract】Objective To investigate the extraction process of Folium hibisci mutabilis polysaccharides, and to analyze, isolate and purify the monosaccharide composition. **Methods** The enzymatic extraction process of Folium hibisci mutabilis polysaccharides was optimized by star point response surface method, and Folium hibisci mutabilis polysaccharides deproteinization was deproteinized by Sevag method and trichloroacetic acid method to screen the optimal deproteinization method. The deproteinized Folium hibisci mutabilis polysaccharides was

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202404057

基金项目: 国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室建设项目 (国中医药人教函 [2019]41 号); 四川省大学生创新训练项目 (202113705036)

通信作者: 游元元, 博士, 教授, 硕士研究生导师, Email: yyy@cmc.edu.cn

separated and purified by DEAE-52 cellulose column and Sephadex G-100 glucan gel column. The monosaccharide components of Folium hibisci mutabilis polysaccharides and the purified product were analyzed by 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) precolumn derivatization-high performance liquid chromatography. **Results** The optimal extraction process of Folium hibisci mutabilis polysaccharides was as follows: 3 hours of extraction, the liquid to material ratio of 70 : 1, the temperature of 40 °C, the enzyme dosage of 1.3%, and the yield was 56.42%. The best method for Folium hibisci mutabilis polysaccharides deproteinization was trichloroacetic acid. Folium hibisci mutabilis polysaccharides was mainly composed of six monosaccharides: mannose, rhamnose, glucose, galactose, xylose and fucose, the order of its content was glucose> galactose> xylose>mannose>fucose≈rhamnose, and the total polysaccharide content reached the highest in September. The isolated and purified Folium hibisci mutabilis polysaccharides I contained glucose and galactose with a molar ratio of 9.06 : 1, Folium hibisci mutabilis polysaccharides IIa contained mannose, rhamnose, galactose, xylose and fucose with a molar ratio of 0.23 : 0.15 : 1 : 0.45 : 0.21, and Folium hibisci mutabilis polysaccharides IIb contained only a small amount of fucose. **Conclusion** The optimal extraction process of Folium hibisci mutabilis polysaccharides is stable and feasible, which can provide a theoretical basis for its production. The PMP precolumn derivatization-high performance liquid chromatography method is used to determine the composition of Folium hibisci mutabilis polysaccharides monosaccharides with good stability, accuracy and repeatability, which can be used as a quality control method for Folium hibisci mutabilis polysaccharides. The purification process of Folium hibisci mutabilis polysaccharides is stable and feasible, and can successfully purify homogeneous polysaccharides.

【Keywords】 Folium hibisci mutabilis; Polysaccharide; Extraction process; Responsive surface design; Isolation and purification; Deproteinization; Monosaccharide composition; Precolumn derivatization

木芙蓉叶为锦葵科木槿属植物木芙蓉 *Hibiscus mutabilis* Linn. 的干燥叶^[1]。李时珍在《本草纲目》中指出芙蓉叶“治一切大小痈疽肿毒恶疮，消肿排脓止痛”^[2]，张璐在《本经逢原》称赞“芙蓉叶散痈疽殊有神效”^[3]，《本草从新》也描述其“散热止痛，消肿排脓，治一切痈疽肿毒有殊功”^[4]。尽管历代医家对木芙蓉叶外敷后解毒、消肿、止痛的功效很推崇，但《中国药典》至 2015 年版才将其作为新增品种收入，且目前对其药效物质基础研究尚少。

木芙蓉叶性滑涎黏，前期试验证实其所含有大量黏液为多糖类物质。多糖在皮肤病领域已有较多研究，目前已报道白及、灵芝、魔芋、麦冬等所含多糖具有促进创面愈合、减轻痤疮症状、改善皮炎等药理作用^[5-10]，木芙蓉叶消肿生肌、治疗疮疡肿毒的功效与上述植物多糖的作用有类同之处，由此推测木芙蓉叶多糖 (Folium hibisci mutabilis polysaccharides, FHMP) 为其有效成分

之一。本文采用响应面法对 FHMP 的酶法提取工艺进行优化，然后考察最佳脱蛋白方法，对脱蛋白后的多糖进行分离纯化，最后对 FHMP 的单糖组分以及纯化产物进行分析，为 FHMP 的进一步研究与开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

LC-2030C 3D Plus 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司); SP-Scientific 型冷冻干燥机 (德祥科技有限公司); IKA RV 10 型旋转蒸发仪 (成都世纪方舟科技有限公司); SHZ-D (II) 型循环水式真空泵 (巩义市予华仪器有限公司); IKA HB 10 型水浴锅 (成都世纪方舟科技有限公司); UPL-IV-30EZ 型超纯水机 (四川优普超纯科技有限公司); MH-2000 型电热套 (北京科伟永兴仪器有限公司); JY10002 型电子天平 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司); JW-1042 型低速离

心机(安徽嘉文仪器装备有限公司); TopPette 100~1 000 μL 型手动单道可调式移液器[大龙兴创实验仪器(北京)股份公司]; UV-5880 型紫外可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司]。

1.2 主要药品与试剂

对照品: D-(+) 无水葡萄糖(批号: MUST-21030214, 纯度 99.61%)、鼠李糖(批号: MUST-21040104, 纯度 99.99%)、D-(+)-木糖(批号: MUST-22091701, 纯度 99.59%)、L-岩藻糖(批号: MUST-2111804, 纯度 98.36%)、D-(+)-甘露糖(批号: AF20151053, 纯度 98%)、D-半乳糖(批号: AF20171204, 纯度 98%) 均购自成都埃法生物科技有限公司; 木瓜蛋白酶(批号: 20150307)、果胶酶(批号: 20150307)、纤维素酶(批号: 20150307) 均购自上海源叶生物科技有限公司; 考马斯亮蓝 G250(批号: 221123) 和牛血清蛋白(批号: 230210) 购自合肥千盛生物科技有限公司; 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为纯化水。

收集 9 批木芙蓉叶样品(S1~S9 号), 来源于四川省成都市新都区固定的 5 个采摘点, 经成都医学院药学院中药教研室游元元教授鉴定为锦葵科植物木芙蓉 *Hibiscus mutabilis* Linn. 的干燥叶。采摘洗净去除杂质, 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干, 粉碎过 50 目筛网, 在室温下密封备用。

2 方法与结果

2.1 木芙蓉叶粗多糖的提取工艺研究

2.1.1 葡萄糖标准曲线的建立

取无水葡萄糖对照品, 精确称定, 定容至 100 mL, 得质量浓度为 0.079 mg/mL 的对照品溶液。精密吸取 0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mL 的对照品溶液于比色管中, 用超纯水补至 1 mL。采用苯酚-硫酸法显色, 于 490 nm 处测定吸光度。以浓度为横坐标(X , mg/mL)、吸光度为纵坐标(Y) 绘制葡萄糖标准曲线, 得线性回归方程: $Y=12.422X+0.0873$, $r=0.9999$, 结果表明葡萄糖在 0.0158~0.0790 mg/mL 浓度范围内线性关系良好。

2.1.2 多糖提取率的测定

将粗多糖提取液稀释一定倍数后, 用显色反应测定吸光度, 将吸光度值代入葡萄糖标准曲线

中计算得到多糖浓度, 再代入下式, 即得多糖的提取率。

$$Y(\%) = \frac{V \times C \times D}{m \times 10^3} \times 0.9\% \times 100\%$$

式中 Y 为多糖提取率(%), V 为样品总体积(mL), C 为多糖浓度(mg/mL), D 为稀释倍数, m 为称取的样品质量(g), 0.9 为转换系数。

2.1.3 酶种类的筛选

称取适量木芙蓉叶粉末, 95% 乙醇索氏提取 2 h, 除去叶绿素。取 6 份脱脂粉末各 1 g, 精密称定, 分别加入 50 mL 提前在 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下活化的果胶酶水溶液、纤维素酶水溶液、木瓜蛋白酶水溶液, 50 $^{\circ}\text{C}$ 提取 2 h 后, 90 $^{\circ}\text{C}$ 放置 4 min 终止酶解反应, 加水补足重量。6 743 \times g 离心 10 min 后取上清液, 得到不同酶提取法提取的粗多糖液。将其在 75 $^{\circ}\text{C}$ 下减压浓缩, 加入无水乙醇使最终醇浓度达到 80%, 24 h 后 6 743 \times g 离心 10 min 取沉淀, 冷冻干燥, 得粗多糖样品。在果胶酶、纤维素酶和木瓜蛋白酶作用下得到的多糖平均提取率分别为 3.05%、3.39%、3.46% ($n=3$)。其中, 果胶酶作用下提取率最小, 纤维素酶和木瓜蛋白酶作用下结果相差不大, 考虑到木瓜蛋白酶可用于后续粗多糖的纯化, 故本试验选择木瓜蛋白酶提取法。

2.1.4 提取工艺优化

①单因素试验。考察单个因素对多糖提取率的影响规律, 工艺参数及范围为: 提取时间 1、2、3、4 h; 液料比 30:1、40:1、50:1、60:1、70:1 mL/g; 提取温度 30、40、50、60、70、80 $^{\circ}\text{C}$; 酶浓度 0.8%、0.9%、1.0%、1.1%、1.2%、1.3%。

由图 1A 可知, FHMP 的提取率随着酶解温度的升高, 总体呈现先升高后下降的趋势, 并在 50 $^{\circ}\text{C}$ 时达到最高。因此, 本试验选择酶解温度为 40、50、60 $^{\circ}\text{C}$ 作为响应面的 3 个水平。

由图 1B 可知, FHMP 的提取率随着酶解时间的延长, 总体呈现先增加后减少的趋势, 并在 2 h 时达到最高。因此, 本试验选择酶解时间为 1、2、3 h 作为响应面的 3 个水平。

由图 1C 可知, FHMP 的提取率随着酶浓度的增大, 总体呈现不断上升的趋势。在研究过程中发现, 当酶浓度为 1.3% 时, 酶水呈现轻微混悬液状态, 推测已为饱和状态, 故继续增加酶浓度可能造成数据不稳定。从减少生产成本兼顾提

取效率的综合考虑下,本试验选择酶浓度为 1.1%、1.2%、1.3% 作为响应面的 3 个水平。

由图 1D 可知, FHMP 的提取率随着液料比的

增加, 总体呈现先增加后下降的趋势, 并在 60 : 1 (mL/g) 时达到最高。因此, 本试验选择液料比为 50 : 1、60 : 1、70 : 1 作为响应面的 3 个水平。

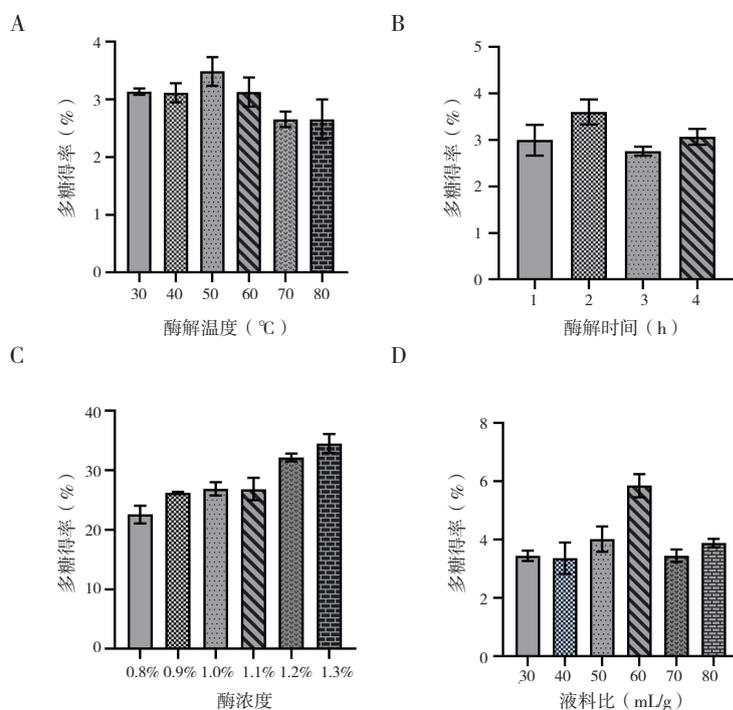


图1 单因素试验结果 ($n=3$)

Figure 1. The results of single-factor experiment ($n=3$)

注: A. 酶解温度; B. 酶解时间; C. 酶浓度; D. 液料比。

②根据单因素试验结果, 采用 Design Expert 10.0.1 软件进行响应面试验设计, 对 FHMP 提取工艺进行优化。采用 Design Expert 10.0.1 软件对试验数据进行分析拟合, 得出了如下的回归方程:

$$Y=37.39+3.05A-2.88B+0.62C+6.33D-1.74AB-0.34AC+0.013AD-0.59BC-2.12BD+1.68CD-0.33A^2-0.11B^2+0.42C^2+0.38D^2$$

(其中 Y 为多糖提取率, A 为酶用量, B 为温度, C 为时间, D 为液料比)。结果显示, 该模型的 $P < 0.01$, 说明模型极其显著; 失拟项的 $P > 0.05$, 说明未知因素对试验结果的干扰很小^[11], 可用该回归方程来分析试验结果^[12]。回归方程中的 A、B、D、AB、BD、CD 的 P 均 < 0.05 , 表明这些因素均对总多糖提取率产生了显著影响。该模型的相关系数 $R^2=0.9181$, 表明模型拟合优度比较高。调整决定系数 $R^2_{Adj}=0.8417$, 表明忽略自变量个数的影响后, 84.17% 多糖提取率的变化能用此方程进行解释^[13]。各因素对总多糖提取率有影响程度依次是 $D > B > A$, C 对多糖提取率无显著影响 ($P > 0.05$)。

三维响应面和等高线图是将其中 1 个或多个

因素固定于中心值不变, 直观反应另外两个因素的交互作用对多糖含量的影响。若等高线呈椭圆形, 响应面曲线陡峭, 说明两因素之间的交互作用对多糖含量的影响较大^[14-15]。由响应面 3D 图 (图 2) 可知, 4 个因素之间的交互作用对总多糖提取率有影响的程度依次是 $BD > AB > CD$, 其余因素之间的交互作用对总多糖提取率不产生显著影响 ($P > 0.05$)。

2.1.5 验证试验

软件预测的最佳提取工艺条件为提取时间 3 h、液料比 70 : 1 (mL/g)、提取温度 40 °C, 酶浓度 1.3%。此条件可操作性强, 不需作任何调整。按照最优条件进行 3 次验证试验, 测得 FHMP 的提取率平均值为 53.40%, 与预测值相差不大。

2.2 木芙蓉叶粗多糖纯化工艺研究

2.2.1 葡萄糖标准曲线的建立

同“2.1.1”项下方法。

2.2.2 蛋白标准曲线的建立

精密称取考马斯亮蓝 G250 0.100 0 g, 置 1 000 mL 量瓶中, 用 50 mL 90% 乙醇溶解, 摇匀,

再加入 100 mL 85% 磷酸，用超纯水稀释至刻度，减压抽滤，4℃冰箱保存。取 BSA，精密称定，定容至 100 mL，得质量浓度为 0.1 mg/mL 的蛋白质对照品溶液。精密吸取 0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mL 于比色管中，用超纯水定容至 1 mL，摇匀。加入考马斯亮蓝染液 5 mL，

涡旋 30 s，放置 3 min^[16]。在 595 nm 处测吸光度，以浓度为横坐标 (X , mg/mL)、吸光度为纵坐标 (Y) 绘制蛋白质标准曲线，得线性回归方程： $Y=6.203X+0.044 22$ ， $r=0.999 4$ ，结果表明蛋白质在 0.02~0.10 mg/mL 浓度范围内线性关系良好。

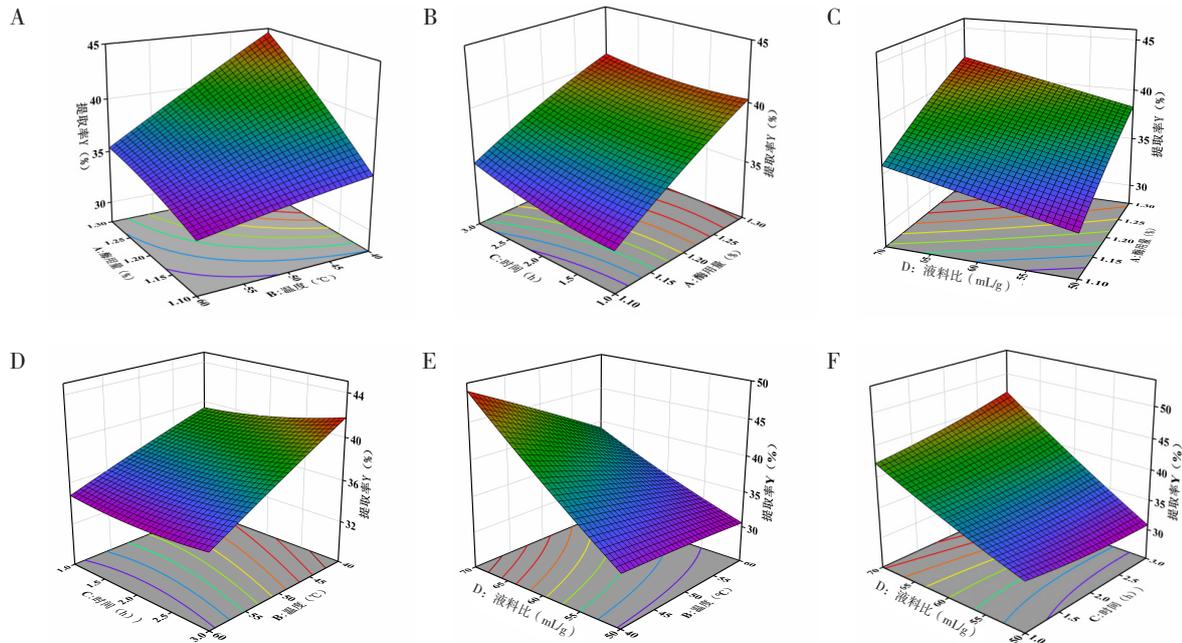


图2 响应面分析的3D图

Figure 2. 3D plot of response surface analysis

注：A. 酶用量与温度；B. 酶用量与时间；C. 酶用量与液料比；D. 温度与时间；E. 温度与液料比；F. 时间与液料比。

2.2.3 Sevag法脱蛋白

将 Sevag 试剂（正丁醇：氯仿 = 1 : 4）和粗多糖溶液按 5 : 2 的体积比混合，充分振荡摇匀后静置，弃去下层二元有机体系和中间层蛋白乳浊液，重复操作 5 次。用考马斯亮蓝法和苯酚 - 硫酸法分别测定蛋白去除率和多糖损失率。由图 3 可知，蛋白去除率和多糖损失率随脱蛋白次数的增加而增大，随后趋于平稳。当脱蛋白次数大于 2 次时，无法兼顾高蛋白去除率和低多糖损失率。综合考虑，最佳脱蛋白次数为 2 次。

2.2.4 三氯乙酸法脱蛋白

取适量多糖提取液，加入等体积的 2%、5%、7.5%、10% 三氯乙酸（trichloroacetic acid, TCA），并立即调节 pH 至中性，于 60℃水浴加热 30 min，冷却至室温，在 4℃冰箱中冷藏过夜，6 743 × g 离心 5 min，取上清液。用考马斯亮蓝法和苯酚 - 硫酸法分别测定蛋白去除率和多糖损失率。由图 4 可知，蛋白去除率和多糖损失率随

TCA 浓度的增加而增大，当 TCA 的质量超过 5% 时，多糖损失率剧增，蛋白去除率趋于平缓。因此，TCA 的质量浓度应该控制在 5% 左右。将该结果与“2.2.3”项结果对比，本试验将采用质量浓度为 5% 的 TCA 进行脱蛋白处理。

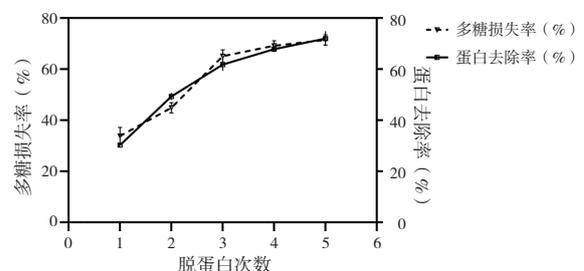


图3 脱蛋白次数对多糖损失率和蛋白去除率的影响 ($n=3$)

Figure 3. Effect of the number of deproteinization on the rate of polysaccharide loss and protein removal ($n=3$)

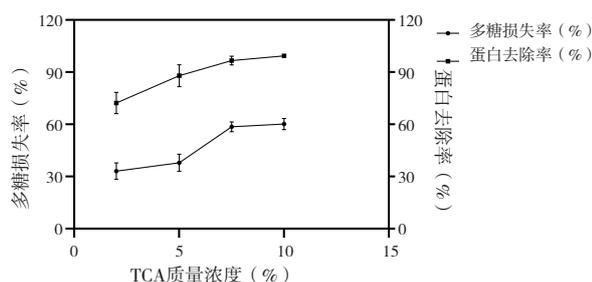


图4 不同TCA浓度对多糖和蛋白质的影响 (n=3)

Figure 4. Effect of TCA on polysaccharide and protein content (n=3)

2.2.5 DEAE-52纤维素柱层析

取适量脱蛋白后的多糖粉末用少量反渗透水进行溶解并上柱,按照蒸馏水、0.2、0.5、0.7、1.0 mol/L NaCl 溶液进行梯度洗脱,每次洗脱液体积 200 mL,10 mL/管,收集完成后于 490 nm 下测定吸光度,以管数为横坐标 (X)、吸光度为纵坐标 (Y) 绘制洗脱曲线^[17]。由图 5 可知,第 1 个峰为蒸馏水洗脱部分,命名为 FHMP-I;第 2 个峰为 0.2 mol/L NaCl 溶液洗脱部分,命名为 FHMP-II。分别收集各吸收峰洗脱液,旋蒸浓缩,计算得率分别为 41.6% 和 12.7%。

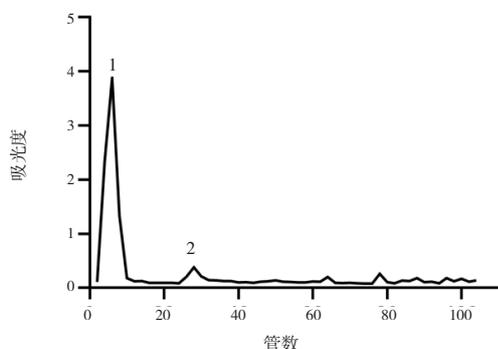


图5 木芙蓉叶多糖DEAE-52纤维素柱层析洗脱曲线

Figure 5. Cellulose column chromatography elution curve of Folium hibisci mutabilis polysaccharide DEAE-52

注: 1.FHMP-I; FHMP-II。

2.2.6 Sephadex G-100葡聚糖凝胶柱层析

将“2.2.5”项下得到的洗脱部分过 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱,以蒸馏水为洗脱液,5 mL/管,收集完成后于 490 nm 下测定吸光度,管数为横坐标 (X)、吸光度为纵坐标 (Y) 绘制洗脱曲线^[18]。FHMP-I 和 FHMP-II 的 Sephadex G-100

层析柱洗脱曲线见图 6,结果表明 FHMP-I 为均一多糖, FHMP-II 洗脱后得两种均一多糖,分别命名为 FHMP-II α 和 FHMP-II β 。

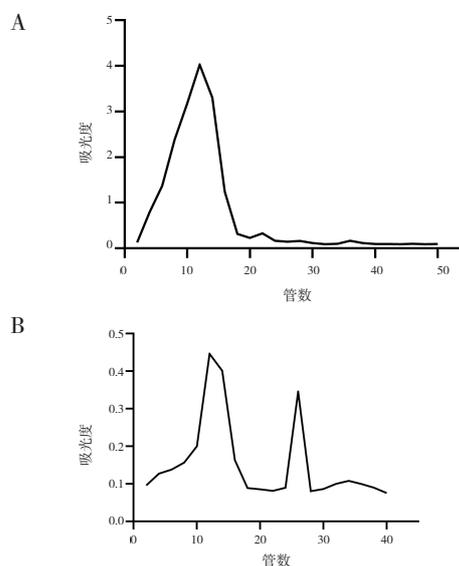


图6 Sephadex G-100葡聚糖凝胶柱层析洗脱曲线

Figure 6. Sephadex G-100 dextran gel column chromatography elution curve

注: A. FHMP-I; B. FHMP-II。

2.3 FHMP的单糖组分分析

2.3.1 HPLC色谱条件

采用 RD-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱;以乙腈 (A) - 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液 (B) (pH 6.8) 为流动相,梯度洗脱 (0~10 min, 17%A; 10~20 min 17%~20%A; 20~35 min, 20%~24.5%A; 35~40 min, 24.5%~30%A);检测波长为 254 nm;流速为 1.0 mL/min;柱温为 30 $^{\circ}$ C;进样体积为 10 μ L^[19]。

2.3.2 粗多糖水解衍生液及纯化产物衍生液的制备

精密称取木芙蓉叶粗多糖、纯化后多糖各 0.1 g 分别置于西林瓶中,加入 4 mL 2 mol/L 三氟乙酸溶解,密封后于 100 $^{\circ}$ C 热水中煮沸水解 3 h;水解完成后,取出倒于蒸发皿上,置于 90 $^{\circ}$ C 水浴锅上,反复多次滴加少量甲醇,直至三氟乙酸完全挥干后,加入 4 mL 反渗透水复溶得水解液。取 1 mL 水解液于 10 mL 离心管中,加入 1 mL 0.5 mol/L 1-苯基-3-甲基-5-吡唑酮 (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP) 甲醇溶液及 1 mL 0.3 mol/L NaOH 溶液,密封后涡

旋混匀, 70 °C下反应 30 min, 完成后冷却至室温, 再加入 1 mL 0.3 mol/L HCl 溶液中和, 最后加入 4 mL 氯仿涡旋萃取多余的 PMP, 每次 5 min, 重复操作 2 次, 弃去氯仿层, 经 0.45 μm 滤膜后进行 HPLC 分析。

2.3.3 混合对照品衍生液的制备

精密称定甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、岩藻糖对照品适量, 混合定容至 10 mL, 加水配制成质量浓度分别为 0.14、0.27、5.60、0.51、0.40、0.15 mg/mL 的混合单糖对照品溶液。

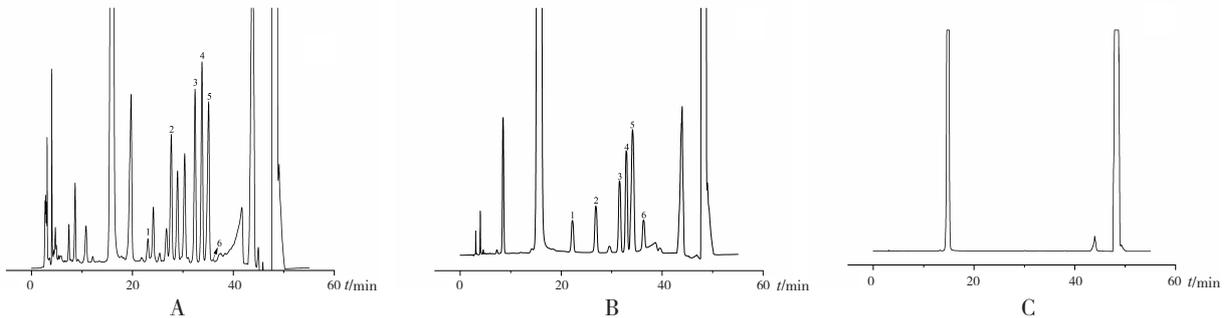


图7 各溶液的衍生化-HPLC色谱图

Figure 7. Derivatization of each solution-HPLC chromatogram

注: A. 木芙蓉叶粗多糖水解液; B. 单糖混合对照品溶液; C. 空白对照溶液; 1. 甘露糖; 2. 鼠李糖; 3. 葡萄糖; 4. 半乳糖; 5. 木糖; 6. 岩藻糖。

表1 FHMP中6个单糖测定标准曲线

Table 1. Standard curves for the determination of six monosaccharides in FHMP

单糖	回归方程	r	线性范围 (μg/mL)
甘露糖	$Y=45\ 986X-10\ 001$	1.000 0	8.75~140.00
鼠李糖	$Y=36\ 759X+12\ 268$	0.999 9	16.88~270.00
葡萄糖	$Y=15\ 863X-293\ 133$	0.999 3	350.00~5 600.00
半乳糖	$Y=38\ 954X-21\ 976$	1.000 0	31.88~510.00
木糖	$Y=31\ 665X+228\ 854$	0.999 8	25.00~400.00
岩藻糖	$Y=41\ 620X+477\ 119$	0.999 7	9.38~150.00

2.3.6 各单糖标准曲线的建立

将“2.3.3”项下的混合单糖对照品溶液逐级稀释成不同浓度的混合对照品溶液, 分别经 PMP 衍生化后, 进样分析, 记录峰面积。以每种单糖的质量浓度为横坐标 (X , μg/mL)、色谱峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 计算回归方程, 结果见表 1。

2.3.7 精密度试验

取“2.3.6”项下中间浓度的混合对照品溶液, 经 PMP 衍生化后, 重复进样 6 次。计算得甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、岩藻糖峰面积的 RSD 分别为 0.55%、0.72%、0.32%、0.23%、0.22%、1.62%, 保留时间的 RSD 分别为 1.68%、1.36%、1.20%、1.16%、1.33%、1.17% ($n=6$), 结果表明仪器精密度良好。

按“2.3.2”项下方法制备混合对照品衍生液。

2.3.4 空白对照衍生液的制备

按“2.3.3”项下方法制备空白对照溶液衍生液。

2.3.5 专属性试验

空白对照溶液、单糖混合对照品溶液、木芙蓉叶粗多糖水解液的衍生化-HPLC 色谱图见图 7。测定结果显示空白对照溶液对样品峰的测定不产生干扰, 且 6 种单糖衍生物的色谱峰均都能实现基线分离 (各组分分离度 > 1.5), 理论塔板数以甘露糖计都在 8 000 以上。

2.3.8 稳定性试验

取 0.1 g 木芙蓉叶粗多糖 (编号: S5), 经水解并衍生化后, 于 0、2、6、10、16、20、24 h 后进样分析, 记录峰面积。计算得甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、岩藻糖峰面积的 RSD 分别为 1.23%、1.78%、2.77%、1.95%、2.21%、3.82% ($n=7$), 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。

2.3.9 重复性试验

取 0.1 g 木芙蓉叶粗多糖 6 份 (编号: S5), 经水解并衍生化后, 进样分析, 记录峰面积, 代入标准曲线计算 6 种单糖的含量。计算得甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、岩藻糖的平均含量为 0.06%、0.11%、22.58%、0.45%、0.33%、0.04%, RSD 分别为 3.88%、3.40%、2.50%、2.36%、2.93%、2.88% ($n=6$), 结果表明该方法的重复性良好。

2.3.10 加样回收率试验

取约 0.05 g 木芙蓉叶粗多糖 6 份 (编号: S6), 加入与之含量相近的混合对照品溶液, 经水解和衍生化, 进样分析, 记录峰面积, 代入标准曲线计算 6 种单糖的含量, 并计算其加样回收率。结果见表 2, 结果表明该方法准确度良好。

2.3.11 样品含量测定

取 9 批不同月份的 FHMP 各约 0.1 g, 精密

称定, 经水解和衍生化, 进样分析, 记录峰面积, 根据标准曲线计算 6 种单糖的含量。不同月份 FHMP 的单糖组分的含量测定结果见表 3。木芙蓉叶单糖含量及总多糖含量均为葡萄糖 > 半乳糖 > 木糖 > 甘露糖 ≈ 岩藻糖 > 鼠李糖, 且在 9 月份时总多糖含量达到最高。

2.4 纯化产物组分测定结果

FHMP-I、FHMP-II α 及 FHMP-II β 部位的单糖组成及其摩尔比结果, 见表 4。

表2 6种单糖成分的加样回收率试验结果 (n=6)

Table 2. Results of recovery rate of 6 kinds of monosaccharides (n=6)

单糖	样品中含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	加样回收率 (%)	平均加样回收率 (%)	RSD (%)
D-甘露糖	0.034 8	0.14	0.175 6	100.58	100.86	2.10
	0.034 9	0.14	0.177 4	101.73		
	0.035 3	0.14	0.170 3	96.44		
	0.035 2	0.14	0.178 4	102.29		
	0.035 1	0.14	0.176 7	101.14		
	0.035 2	0.14	0.179 4	102.97		
鼠李糖	0.039 8	0.15	0.173 6	89.25	94.03	3.08
	0.039 9	0.15	0.185 4	96.98		
	0.040 3	0.15	0.176 8	91.01		
	0.040 2	0.15	0.184 7	96.33		
	0.040 2	0.15	0.181 9	94.52		
	0.040 2	0.15	0.184 4	96.09		
D-葡萄糖	15.091 2	8.64	23.395 1	97.76	96.11	2.51
	15.688 6	8.64	23.704 1	102.09		
	15.091 2	8.64	23.540 2	98.78		
	15.814 3	8.64	24.448 4	103.56		
	15.782 9	8.64	24.115 2	102.36		
半乳糖	0.258 4	0.19	0.449 8	101.66	96.56	2.89
	0.259 5	0.19	0.435 5	93.56		
	0.262 1	0.19	0.444 0	96.69		
	0.261 6	0.19	0.442 3	96.06		
	0.261 0	0.19	0.450 5	100.65		
	0.261 6	0.19	0.442 8	96.34		
D-木糖	0.174 0	0.29	0.460 1	101.80	94.08	3.33
	0.174 7	0.29	0.445 7	96.62		
	0.176 4	0.29	0.444 0	95.54		
	0.176 1	0.29	0.455 9	99.75		
	0.175 7	0.29	0.450 5	97.98		
	0.176 1	0.29	0.433 6	92.02		
L-岩藻糖	0.019 9	0.17	0.195 8	102.65	99.68	2.86
	0.020 0	0.17	0.188 3	96.97		
	0.020 2	0.17	0.191 9	99.43		
	0.020 1	0.17	0.190 2	98.21		
	0.020 1	0.17	0.180 0	90.53		
	0.020 1	0.17	0.190 8	98.66		

表3 不同采收期木芙蓉叶的单糖组成及总多糖测定结果 (n=3)

Table 3. Determination of monosaccharide composition and total polysaccharides of *Folium hibisci mutabilis* at different harvesting stages (n=3)

编号	采收期	质量分数 (%)						总
		D-甘露糖	鼠李糖	D-葡萄糖	半乳糖	D-木糖	L-岩藻糖	
S1	2021.04	0.10	0.12	26.55	0.46	0.37	0.07	27.68
S2	2021.05	0.06	0.11	26.33	0.43	0.35	0.04	27.32
S3	2021.06	0.07	0.16	30.51	0.52	0.50	0.03	31.79
S4	2021.07	0.06	0.10	28.73	0.55	0.43	0.02	29.89
S5	2021.08	0.06	0.09	24.66	0.50	0.37	0.03	25.71
S6	2021.09	0.07	0.08	31.44	0.52	0.35	0.04	32.50
S7	2021.10	0.07	0.12	28.91	0.48	0.34	0.07	30.00
S8	2021.11	0.08	0.09	24.75	0.44	0.28	0.07	25.70
S9	2021.12	0.13	0.14	26.99	0.60	0.48	0.04	28.37

表4 单糖组成分析结果 (n=3)

Table 4. The analysis results of monosaccharide composition (n=3)

部位	摩尔比					
	D-甘露糖	鼠李糖	D-葡萄糖	半乳糖	D-木糖	L-岩藻糖
FHMP-I	—	—	9.06	1	—	—
FHMP-II α	0.23	0.15	—	1	0.45	0.21
FHMP-II β	—	—	—	—	—	少量

3 讨论

目前对于木芙蓉叶的研究主要集中于黄酮、有机酸、挥发性等成分及其生物活性^[20-25]。尚未见木芙蓉叶多糖研究的报道。酶解法被认为是提高多糖得率的常用方法^[26]，本文探究了不同酶解法提取 FHMP 的最优工艺，以多糖提取率作为评价指标确定酶种类，根据结果可以看出木瓜蛋白酶的提取率最大。对成都市 9 批同一产地不同采摘时间的木芙蓉叶样品检测分析，确定了单糖成分及其质量分数，经方法学验证，所建立的柱前衍生 HPLC 方法可靠、适用性强，可用于 FHMP 中 6 种单糖的定性和定量分析。由结果可以看出，9 批样品的各单糖质量分数差异不大，波动无明显规律，但 9 月份总含量最大。通过酶解法提取得到的粗多糖成分较为复杂，通常伴随着一些色素、脂肪、无机盐和蛋白质等物质^[27]，这些物质不利于多糖的活性分析及结构鉴定，因此需要进一步分离纯化，即除杂和组分分离。本文经过试验，最终选择质量浓度为 5% 的 TCA 进行脱蛋白处理，利用 DEAE-52 纤维素柱层析和 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶柱层析分离纯化，成功分离出均一多糖。

综上，本试验对 FHMP 的提取、纯化工艺及

组分分析进行了探索，为其进一步开发利用奠定了基础。但本研究仅为基础性研究，仍有需要深入探讨的地方。酶具有专一性，不同的酶作用于多糖的连接位点不同^[28]，会影响提取出来的木芙蓉叶多糖的相对分子质量和黏度，从而导致不同酶解法提取出来的多糖活性产生差异。因此，今后还应深入研究不同酶解法得到的 FHMP 活性差异，及其对多糖结构的改变、单糖组成的变化以及连接方式的影响。在对木芙蓉叶开发应用中可以根据实际需要选择不同的提取方法。

参考文献

- 1 中国药典 2015 年版. 一部 [S]. 2015: 64
- 2 明·李时珍, 著. 朱斐, 王杰, 何国浓, 等, 校注. 本草纲目 [M]. 南昌: 二十一世纪出版社, 2014: 249.
- 3 清·张璐, 著. 本经逢原 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2017: 205.
- 4 清·吴仪洛, 撰. 本草从新 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2013: 153.
- 5 Hu F, Yan Y, Wang CW, et al. Article effect and mechanism of ganoderma lucidum polysaccharides on human fibroblasts and skin wound healing in mice[J]. Chin J Integr Med, 2019, 25(3): 203-209. DOI: 10.1007/s11655-018-3060-9.

- 6 Zhang C, He Y, Chen Z, et al. Effect of polysaccharides from *Bletilla striata* on the healing of dermal wounds in mice[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 9212314. DOI: [10.1155/2019/9212314](https://doi.org/10.1155/2019/9212314).
- 7 Al-Ghazzewi FH, Tester RF. Effect of konjac glucomannan hydrolysates and probiotics on the growth of the skin bacterium *Propionibacterium acnes* *in vitro*[J]. *Int J Cosmet Sci*, 2010, 32(2): 139–142. DOI: [10.1111/j.1468-2494.2009.00555.x](https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00555.x).
- 8 李笑眉. 白芨多糖水凝胶促进糖尿病创面愈合的应用研究[D]. 辽宁大连: 大连医科大学, 2021. DOI: [10.26994/d.cnki.gdlyu.2021.000316](https://doi.org/10.26994/d.cnki.gdlyu.2021.000316).
- 9 徐燕婷, 李哲明, 范丽娜. 黄芪多糖介导 Nrf2-HO-1/NQO1 信号通路促进大鼠难愈创面的愈合[J]. *中国现代医生*, 2023, 61(21): 39–43, 49. [Xu YT, Li ZM, Fan LN. Huangqi polysaccharide mediates Nrf2-HO-1/NQO1 signaling pathway to promote healing of difficult to heal wounds in rats[J]. *Chinese Modern Doctor*, 2023, 61(21): 39–43, 49.] DOI: [10.3969/j.issn.1673-9701.2023.21.009](https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-9701.2023.21.009).
- 10 韩凤玉, 闫风华, 张俊飞, 等. 枸杞多糖促进压疮大鼠皮肤创面愈合的作用机制研究[J]. *宁夏医学杂志*, 2023, 45(1): 5. [Han FY, Yan FH, Zhang JF, et al. Mechanism of *Lycium barbarum* polysaccharides promoting skin wound healing in pressure ulcer rats[J]. *Ningxia Medical Journal*, 2023, 45(1): 5.] DOI: [10.13621/j.1001-5949.2023.01.0005](https://doi.org/10.13621/j.1001-5949.2023.01.0005).
- 11 韩鹏飞, 马明昊, 迟乃玉, 等. 戴氏虫草多糖的提取工艺优化和抗氧化活性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2023, 34(4): 150–157. [Han PF, Ma MH, Chi NY, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity of polysaccharides from *Cordyceps militaris*[J]. *China Food Additives*, 2023, 34(4): 150–157.] DOI: [10.19804/j.issn1006-2513.2023.04.018](https://doi.org/10.19804/j.issn1006-2513.2023.04.018).
- 12 张妍, 高敏, 戴映迪, 等. 响应面优化乙二胺四乙酸二钠提取荷叶离褶伞子实体多糖工艺条件[J/OL]. *吉林农业大学学报*, 2023–05–12. [Zhang Y, Gao M, Dai YD, et al. Response surface optimization of the extraction process conditions of polysaccharides from the fruiting body of lotus leaves using ethylenediaminetetraacetic acid disodium[J/OL]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2023–05–12.] DOI: [10.13327/j.jjlau.2021.1994](https://doi.org/10.13327/j.jjlau.2021.1994).
- 13 王杨, 唐明明, 孙梦莹, 等. 响应面法优化油茶籽多糖提取及其体外抗氧化活性研究[J]. *现代园艺*, 2023, 46(13): 56–59. DOI: [10.3969/j.issn.1006-4958.2023.13.019](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-4958.2023.13.019).
- 14 姜振浩, 朱建星, 张万忠. 响应面法优化结球菊苣多糖的磷酸化修饰工艺[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(24): 200–206. [Jiang ZH, Zhu JX, Zhang WZ. Optimization of phosphorylation of polysaccharides from Chicory (*Cichorium intybus* var. *foliosum* Hegi) by response surface method[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(24): 200–206.] DOI: [10.13386/j.issn1002-0306.2023020262](https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023020262).
- 15 高山雪, 王琦, 郭艳芳, 等. 响应面法优化纤维素酶提取草菇中甾醇类化合物的工艺[J]. *菌物研究*, 2021, 19(3): 163–169. [Gao SX, Wang Q, Guo YF, et al. Optimization of cellulase extraction process for sterols from shiitake mushrooms using response surface methodology[J]. *Microbial Research*, 2021, 19(3): 163–169.] DOI: [10.13341/j.jfr.2020.1307](https://doi.org/10.13341/j.jfr.2020.1307).
- 16 李根. 荷叶多糖的提取、分离纯化、理化性质及生物活性研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2023. DOI: [10.27462/d.cnki.ghzhc.2023.001027](https://doi.org/10.27462/d.cnki.ghzhc.2023.001027).
- 17 野津, 张文森, 王知斌, 等. DEAE-52 在中药多糖分离纯化中的应用[J]. *化学工程师*, 2019, 33(11): 43–45, 22. [Ye J, Zhang WS, Wang ZB, et al. Application of DEAE-52 in the separation and purification of polysaccharides from traditional Chinese medicine[J]. *Chemical Engineer*, 2019, 33(11): 43–45, 22] DOI: [10.16247/j.cnki.23-1171/tq.20191143](https://doi.org/10.16247/j.cnki.23-1171/tq.20191143).
- 18 扈瑞平, 杜玲, 敖长金, 等. 沙葱多糖的 SephadexG-100 凝胶柱纯化和分子量的测定[J]. *科学技术与工程*, 2011, 11(12): 2780–2783. [Hu RP, Du L, Ao CJ, et al. Sephadex G-100 gel column purification and molecular weight determination of *Allium mongolicum* polysaccharide[J]. *Science, Technology and Engineering*, 2011, 11(12): 2780–2783.] DOI: [10.3969/j.issn.1671-1815.2011.12.033](https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-1815.2011.12.033).
- 19 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. [Wang XY, Guo CR, Chang JM, et al. Establishment of pre-column derivatization-HPLC fingerprint and content determination of monosaccharide composition from *Achyranthes bidentata* polysaccharides[J]. *Chinese Pharmacy*, 2021, 32(3): 294–300.] DOI: [10.6039/j.issn.1001-0408.2021.03.08](https://doi.org/10.6039/j.issn.1001-0408.2021.03.08).
- 20 王艺, 叶磊, 胡攀, 等. 芙蓉黄酮类化学成分、药理

- 作用及提取工艺研究进展 [J]. 山东化工, 2022, 51(12): 80–86. [Wang Y, Ye L, Hu P, et al. Research progress on the chemical composition, pharmacological effects, and extraction process of flavonoids in *Hibiscus syriacus* [J]. Shandong Chemical Industry, 2022, 51(12): 80–86.] DOI: [10.3969/j.issn.1008-021X.2022.12.022](https://doi.org/10.3969/j.issn.1008-021X.2022.12.022).
- 21 万静, 陈晓兰, 董娜娜, 等. 芙蓉叶研究进展 [J]. 湖北民族大学学报 (医学版), 2021, 38(4): 79–82. [Wan J, Chen XL, Dong NN, et al. Research progress on hibiscus leaves [J]. Journal of Hubei University for Nationalities (Medical Edition), 2021, 38(4): 79–82.] DOI: [10.13501/j.cnki.42-1590/r.2021.04.019](https://doi.org/10.13501/j.cnki.42-1590/r.2021.04.019).
- 22 张小芳. 芙蓉叶中化学成分的研究 [D]. 西安: 西北大学, 2021. DOI: [10.27405/d.cnki.gxbdu.2021.000408](https://doi.org/10.27405/d.cnki.gxbdu.2021.000408).
- 23 王艺, 黄李璐, 冯丽萍, 等. 芙蓉花的化学成分研究 [J]. 中药材, 2022, 45(5): 1106–1109. [Wang Y, Huang LL, Feng LP, et al. Study on chemical components of *Hibiscus mutabilis* [J]. Chinese Herbal Medicine, 2022, 45(5): 1106–1109.] DOI: [10.13863/j.issn1001-4454.2022.05.016](https://doi.org/10.13863/j.issn1001-4454.2022.05.016).
- 24 王艺, 冯丽萍, 黄李璐, 等. UPLC–Q–Orbitrap HRMS 技术快速鉴定木芙蓉花化学成分 [J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(12): 2042–2052. [Wang Y, Feng LP, Huang LL, et al. UPLC–Q–Orbitrap HRMS technology for rapid identification of chemical components in hibiscus flowers [J]. Research and Development of Natural Products, 2021, 33(12): 2042–2052.] DOI: [10.16333/j.1001-6880.2021.12.008](https://doi.org/10.16333/j.1001-6880.2021.12.008).
- 25 Song Y, Zeng R, Hu L, et al. In vivo wound healing and in vitro antioxidant activities of *Bletilla striata* phenolic extracts [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 93: 451–461. DOI: [10.1016/j.biopha.2017.06.079](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.079).
- 26 喻明军, 向敏, 夏勇, 等. 铁皮石斛多糖的提取工艺及对生物活性影响研究进展 [J]. 农产品加工, 2021(9): 79–82, 88. [Yu MJ, Xiang M, Xia Y, et al. Advances in extraction technology polysaccharide from *Dendrobium officinale* and its effect on biological activity [J]. Farm Products Processing, 2021(9): 79–82, 88.] DOI: [10.16693/j.cnki.1671-9646\(X\).2021.05.020](https://doi.org/10.16693/j.cnki.1671-9646(X).2021.05.020).
- 27 林彦. 黄芩茎叶多糖的提取分离纯化、体外抗氧化与醒酒代谢指标测定及其结构鉴定 [D]. 河北承德: 承德医学院, 2024. DOI: [10.27691/d.cnki.gcdyx.2024.000245](https://doi.org/10.27691/d.cnki.gcdyx.2024.000245).
- 28 魏夏森, 余赛男, 张哲一, 等. β -1,3-葡聚糖酶的结构、功能及应用研究进展 [J]. 食品科学, 2023, 44(15): 269–277. [Wei XS, Yu SN, Zhang ZY, et al. Research progress on structure, function and application of β -1,3-glucanases [J]. Food Science, 2023, 44(15): 269–277.] DOI: [10.7506/spkx1002-6630-20220820-235](https://doi.org/10.7506/spkx1002-6630-20220820-235).

收稿日期: 2024 年 04 月 09 日 修回日期: 2024 年 10 月 10 日
本文编辑: 钟巧妮 李 阳