

[14] 赵艳敏, 刘素香, 张晨曦, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的甘草化学成分分析[J]. 中草药, 2016, 47(12): 2061-2068.

[15] 韩 丽, 田 莉. 维药芹菜根研究概况[J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(4): 124-126.

[16] Ying S, Chen D M, Wang J M, et al. A sensitive LC-MS/MS-based bioanalytical method for quantification of salviaflaside and rosmarinic acid in rat plasma and its application in a pharmacokinetic study[J]. *Biomed Chromatogr*, 2018, 32(8): e4259.

[17] 张 伟, 晁利平, 陈 秋, 等. 维药蜀葵花黄酮类成分的分离与结构鉴定[J]. 天津中医药大学学报, 2016, 35(1): 36-39.

[18] 丁文政, 俞桂新, 程雪梅, 等. 香青兰子化学成分的初步研究[J]. 西北药学杂志, 2016, 31(2): 122-124.

[19] 韦 悦, 程雪梅, 俞桂新, 等. 黑种草子定性定量方法改进研究[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(5): 867-876.

[20] Feng N, Wei Y T, Feng J, et al. Preparative isolation of ganoderic acid S, ganoderic acid T and ganoderol B from *Ganoderma lucidum* mycelia by high-speed counter-current chromatography[J]. *Biomed Chromatogr*, 2018, 32(10): e4283.

[21] 胡春梅, 吴久鸿. 番荔枝科植物之黄酮类化合物及其生物活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(9): 765-770.

[22] 丁林芬, 王 扣, 王海垠, 等. 旋覆花化学成分研究[J]. 中药材, 2016, 39(6): 1296-1299.

[23] 张根荣, 胡 静, 丁 斐, 等. 肉豆蔻挥发性成分的气相色谱/质谱分析[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(11): 2596-2598.

[24] He W J, Cao D M, Chen Y B, et al. Explore of the beneficial effects of Huang-Lian-Jie-Du decoction on diabetic encephalopathy in db/db mice by UPLC-Q-Orbitrap HRMS/MS based untargeted metabolomics analysis[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 192: 113652.

[25] Mohrbacher R J, Ho W, Tutwiler G F. Alkenylglycidic acid derivatives: US, US19780897972[P]. 1979-01-02.

[26] 韦 悦, 程娟娟, 程雪梅, 等. 维吾尔药复方木尼孜其颗粒剂的质量控制方法研究[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(10): 1799-1809.

雪莲果低聚果糖化学成分及其生物活性

郝 婷, 李洪波, 赵红玲, 李松涛
(河北省中药研究与开发重点实验室, 承德医学院中药研究所, 河北 承德 067000)

摘要: **目的** 研究雪莲果低聚果糖的化学成分及其生物活性。**方法** 雪莲果低聚果糖水溶液的分析采用华谱 XAmide 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水, 梯度洗脱; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 ℃。检测器 ELSD, 漂移管温度 70 ℃; 氮气体积流量 3.5 L/min。Flash HILIC 柱色谱分离技术分离雪莲果低聚果糖; UV 法测定双歧杆菌发酵液的 OD 值。**结果** 雪莲果低聚果糖中含有蔗果三糖 (10.29%)、蔗果四糖 (16.28%)、蔗果五糖 (13.27%)、蔗果六糖 (10.78%)、蔗果七糖 (6.47%)、蔗果八糖 (4.95%) 等, 通过 OD 值的测定可得出雪莲果低聚果糖对双歧杆菌的增殖效果最好, 是低聚果糖和菊粉的 1.5~2 倍, 且雪莲果低聚果糖不同部位对双歧杆菌不同时间段的增值效果不同。**结论** 该方法所得的雪莲果低聚果糖对双歧杆菌的增殖效果较好, 其各单体对双歧杆菌的增值效果不同时间起的作用不同, 且相互之间有协调作用。

关键词: 雪莲果; 低聚果糖; 化学成分; HPLC-ELSD; 双歧杆菌

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)05-1375-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.05.052

雪莲果 *Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob. 为菊科多年生草本, 原产于南美洲安第斯山, 是印第安人传统的块茎食物^[1-2]。雪莲果块根含有大量的水分及糖类, 其中低聚果糖是主要的糖类物质, 占果实干物质的 45%~65%, 有低聚果糖之王的美称。低聚果糖具有改善体内菌群, 排毒清肠、改善脂质代谢, 降低血脂、调节机体免疫系统,

提高免疫力、促进矿物质吸收等生物活性^[3-7]。人体肠道内含有大量的有益菌, 其数量可作为衡量人体健康的标准。然而, 随着年龄的增长、抗生素的广泛应用等, 会直接造成人体肠道内微生态环境时期平衡, 从而使益生菌数量明显减少。因此, 研究增殖肠道内有益菌的数量对人类健康有着非常重要的意义。益生菌产品的摄入是简单可靠的,

收稿日期: 2020-01-22

基金项目: 河北省中医药管理局项目 (2017190); 承德医学院项目 (201921); 河北省科技厅“技术创新引导专项——科技工作会商”(2020); 河北省中药研究与开发重点实验室开放性课题 (ZYKF202010)

作者简介: 郝 婷 (1984—), 女, 硕士, 助理研究员, 从事中草药中有效成分提取分离研究。Tel: 15133874538, E-mail: haowenting1314@163.com

但这些产品受到许多生产条件的限制，经给人体摄入功能性低聚糖来实现促进肠道中双歧杆菌自然繁殖具有一定的研究意义^[8]。因此本实验以雪莲果低聚果糖为研究对象，用 HPLC-ELSD 法测定其化学组成和含量，并用 Flash HILIC 柱色谱分离技术分离雪莲果低聚果糖，然后通过 *OD* 值的测定研究雪莲果低聚果糖及其不同部位对长双歧杆菌的增值效果，以期为后续从雪莲果中提取低聚果糖并分离单体成分研究其代谢机理提供参考。

1 材料

1.1 仪器 Agilent1200 高效液相色谱仪（自动进样器，四元泵，柱温箱，ELSD 检测器，美国 Agilent 公司）；AG-245 型电子分析天平（瑞士梅特勒公司）；CHRIST 实验室型冷冻干燥机（德国 Martin Christ 公司）；KQ-100E 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；753 紫外分光光度计（上海光谱仪器有限公司）；SPH-100B 恒温振荡培养箱（上海世平实验设备有限公司）；HC-JH-131 超净工作台（北京鑫宏程洁净工程技术有限公司）。

1.2 试剂与药物 对照品蔗糖、蔗糖四糖、蔗糖五糖（批号 AWG0714，上海惠城生物科技有限公司）；蔗糖六糖、蔗糖七糖、蔗糖八糖（实验室自制）；乙腈（色谱纯，天津星马克科技发展有限公司）；雪莲果低聚果糖（SFOS、实验室自制）；双歧杆菌 TPY 培养基（广东环凯生物科技有限公司）；双歧杆菌（批号 ZLSW180319-1，正常健康人肠道菌，西安泽朗生物科技有限公司）；水（娃哈哈集团有限公司），其余试剂为分析纯。本实验所用雪莲果经河北省承德医学院赵春颖教授鉴定为菊科植物雪莲果 *Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Robinson，购自四川省内江市隆昌县。

2 组成与含量

2.1 色谱条件 参考文献 [9-11]，华谱 XAmide 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-水（B），梯度洗脱（0~25 min，70%~60%A；25~30 min，60%~50%A）；体积流量 1 mL/min；进样量 10 μL；柱温 30 ℃。检测器 ELSD，漂移管温度 70 ℃；氮气体积流量 3.5 L/min。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称定对照品蔗糖、蔗糖四糖、蔗糖五糖、蔗糖六糖、蔗糖七糖、蔗糖八糖以流动相溶解，制备成分别含有蔗糖三糖、蔗糖四糖、蔗糖五糖、蔗糖六糖、蔗糖七糖、蔗糖八糖 2.20、2.10、1.90、2.30、2.30、2.50 mg/mL 的对照品溶液，滤膜过滤，备用。

2.2.2 供试品溶液 精密称取雪莲果低聚果糖（实验室自制）3.09 mg，用 1 mL 蒸馏水溶解，滤膜过滤，备用。

2.3 线性关系考察 精密量取对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL 分别置于 1 mL 量瓶中，加流动相溶液稀释至刻度，滤膜过滤。在“2.1”项条件下，分别进样 10 μL，每个质量浓度平行测定 3 次，记录峰面积，以质量浓度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标（*Y*）进行回归，结果见表 1。

含量结果见表 2。表 2 显示，雪莲果低聚果糖中主要含有蔗糖三糖、蔗糖四糖、蔗糖五糖、蔗糖六糖、蔗糖七糖、蔗糖八糖，其中蔗糖三糖、蔗糖四糖、蔗糖五糖、蔗糖六糖含量较多，占雪莲果低聚果糖的 50.62%。

表 1 各成分线性关系

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ (mg·mL ⁻¹)
蔗糖三糖	<i>Y</i> =0.651 603 <i>X</i> -3.906 74	0.999 8	0.44~2.20
蔗糖四糖	<i>Y</i> =0.649 002 <i>X</i> -3.881 60	0.999 6	0.42~2.10
蔗糖五糖	<i>Y</i> =0.640 961 <i>X</i> -3.801 61	0.999 5	0.38~1.90
蔗糖六糖	<i>Y</i> =0.651 374 <i>X</i> -3.861 97	0.999 8	0.46~2.30
蔗糖七糖	<i>Y</i> =0.640 761 <i>X</i> -3.809 51	0.998 3	0.46~2.30
蔗糖八糖	<i>Y</i> =0.646 989 <i>X</i> -3.841 88	0.999 8	0.50~2.50

表 2 雪莲果低聚果糖中各单体质量浓度和含量

成分	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	含量/%
蔗糖	0.10	3.07
蔗糖三糖	0.32	10.29
蔗糖四糖	0.50	16.28
蔗糖五糖	0.41	13.27
蔗糖六糖	0.33	10.78
蔗糖七糖	0.20	6.47
蔗糖八糖	0.15	4.95

3 雪莲果低聚果糖提取工艺优化

3.1 工艺流程 参考文献 [1-2]，雪莲果粉末→0.3% 柠檬酸水溶液→超声提取→0.08% 聚丙烯酰胺水溶液絮凝→抽滤→用氯仿和正丁醇萃取（除蛋白）→水层减压浓缩（旋蒸）→95% 乙醇醇沉（去除多糖）→抽滤、上清液减压浓缩（旋蒸）→无水乙醇醇沉→抽滤得雪莲果低聚果糖。

3.2 正交试验 参考文献 [12]，采用超声提取法，在预实验基础上考察提取时间（*A*）、料液比（*B*）、柠檬酸含量（*C*）3 个因素，以雪莲果低聚果糖收率（按药材计算）为评价指标。选用 L₉(3⁴) 正交试验表安排试验，见表 3。

表 3 因素水平

水平	因素		
	<i>A</i> 提取时间/h	<i>B</i> 料液比	<i>C</i> 柠檬酸含量/%
1	1	10	0.1
2	1.5	15	0.3
3	2	20	0.5

3.3 工艺优化 以雪莲果低聚果糖提取率（按药材计算）为评价指标。雪莲果低聚果糖提取率 = $M_{\text{SFOS}}(\text{g}) / M_{\text{雪莲果粉末}}(\text{g}) \times 100\%$ ，选用 L₉(3⁴) 正交试验表安排试验，结果见表 4~5。

由表 4~5 可知，各因素的影响顺序为 *A* > *B* > *C*，即影响雪莲果低聚果糖提取率最显著因素为提取时间（*P* < 0.05），其次为料液比，柠檬酸含量的影响较小；最优组合为 A₁B₂C₃，即超声提取 1 h、料液比为 15 倍、提取液为

0.5% 柠檬酸水溶液。由于得出的最佳参数未在正交试验中表现出来，所以需要再进行验证试验，3 次验证试验提取率分别是 51.42%、50.28%、52.37%，得雪莲果低聚果糖的提取率平均为 51.36%，比正交试验中的提取率都高，表明正交试验得到的最优组合最佳。

表 4 试验设计与结果

试验号	A	B	C	雪莲果低聚果糖收率/% (按药材计算)
1	1	1	1	43.87
2	1	2	2	42.91
3	1	3	3	43.73
4	2	1	2	30.21
5	2	2	3	35.13
6	2	3	1	29.63
7	3	1	3	40.59
8	3	2	1	42.55
9	3	3	2	42.09
K ₁	43.50	38.22	38.868	
K ₂	31.66	40.20	38.840	
K ₃	41.74	38.48	39.82	
R	11.85	1.97	1.41	

表 6 不同洗脱部位中各成分含量测定结果 (%)

部位	蔗果三糖	蔗果四糖	蔗果五糖	蔗果六糖	蔗果七糖	蔗果八糖	蔗果九糖等
80% 乙腈	26.04	36.32	13.56	3.36	—	—	—
70% 乙腈	6.93	17.76	29.02	27.85	12.94	5.89	—
60% 乙腈	—	—	—	5.17	13.16	24.11	57.00

锥形瓶中，高压灭菌锅 120 ℃ 灭菌 15 min 后接种双歧杆菌菌种 1.5 mL，37 ℃ 摇床上培养 12、24、48 h 分别取 1 mL 菌种培养液，用无菌水稀释 5 倍，用紫外分光光度计 600 nm 下测定培养液的 A 值。以 TPY 培养液中双歧杆菌的吸光度值做对照组，比较不同低聚果糖、菊粉及雪莲果低聚果糖不同洗脱部位对双歧杆菌的增殖作用。

由图 1、表 7~8 可看雪莲果低聚果糖对双歧杆菌的增殖效果是低聚果糖、菊粉的 1.5~2 倍，而雪莲果低聚果糖 3 个洗脱部位对双歧杆菌的增殖效果均不如雪莲果低聚果

表 7 雪莲果低聚果糖对双歧杆菌增殖试验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

样品	12 h	24 h	48 h	72 h
对照组(未添加)	0.322±0.072	0.391±0.068	0.383±0.068	0.367±0.053
雪莲果低聚果糖	0.346±0.074	0.522±0.080	0.623±0.019	0.603±0.060
低聚果糖(山东保龄宝)	0.287±0.035	0.342±0.038	0.379±0.050	0.387±0.071
菊粉(丰宁高科)	0.275±0.033	0.325±0.051	0.378±0.057	0.388±0.075
80% 乙腈部位	0.278±0.005	0.344±0.004	0.447±0.003	0.463±0.007
70% 乙腈部位	0.305±0.002	0.363±0.008	0.414±0.004	0.422±0.003
60% 乙腈部位	0.455±0.002	0.450±0.008	0.433±0.013	0.415±0.006

糖，但比低聚果糖、菊粉的增殖效果好，且 $P<0.05$ ，具有统计学意义。雪莲果低聚果糖 60% 乙腈部位在 12、24 h 时增殖效果明显高于雪莲果低聚果糖 70%、80% 乙腈部位，雪莲果低聚果糖 80% 乙腈部位 48、72 h 时增殖效果明显高

表 5 方差分析

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	245.18	2	122.59	23.03	<0.05
B	6.9	2	3.45	0.65	
C	3.36	2	1.68	0.32	
误差	10.65	2	5.32		

4 雪莲果低聚果糖的分离

根据上述试验结果提取雪莲果低聚果糖，采用 Flash Hilic 柱色谱技术得到不同洗脱部位样品 3 个（80% 乙腈部位、70% 乙腈部位、60% 乙腈部位），HPLC-ELSD 法检测含量和组成。

由表 6 可知，从雪莲果低聚果糖中分离得到的 3 个部位中的低聚果糖的含量和组成成分均不同，主要成分也不同。其中 80% 乙腈部位主要有蔗果三糖、蔗果四糖；70% 乙腈部位主要有蔗果五糖、蔗果六糖；60% 乙腈部位主要有蔗果七糖、蔗果八糖、蔗果九糖等。

5 雪莲果低聚果糖对双歧杆菌的增殖作用

TPY 培养基中添加 2% 的雪莲果低聚果糖、低聚果糖、菊粉以及雪莲果低聚果糖的不同洗脱部位为样品组，TPY 培养基无添加为对照组，各培养液分别 50 mL 装入 100 mL

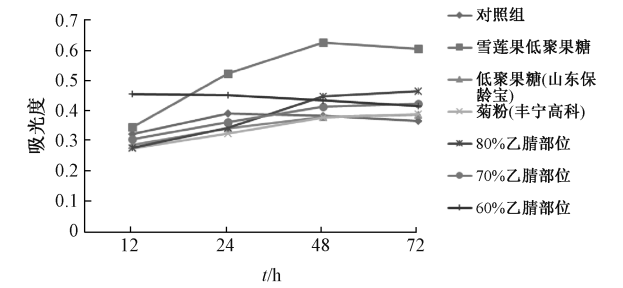


图 1 双歧杆菌生长曲线图

于雪莲果低聚果糖 60%、70% 乙腈部位，表明各单体对双歧杆菌的增殖效果不同时间起的作用不同，且相互之间有协调作用。

表 8 雪莲果低聚果糖对双歧杆菌增殖试验结果方差分析						
来源		平方和	自由度	均方	F 值	P 值
12 h	组间	0.072	6	0.120	6.416	<0.05
	组内	0.026	14	0.002		
	总数	0.098	20			
24 h	组间	0.117	6	0.190	8.997	<0.05
	组内	0.030	14	0.002		
	总数	0.147	20			
48 h	组间	0.138	6	0.023	14.625	<0.05
	组内	0.022	14	0.002		
	总数	0.161	20			
72 h	组间	0.116	6	0.019	7.902	<0.05
	组内	0.034	14	0.002		
	总数	0.150	20			

6 讨论

由表 2 数据可以看出雪莲果低聚果糖含有蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖、蔗果六糖、蔗果七糖、蔗果八糖，其中蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖、蔗果六糖含量较多，占雪莲果低聚果糖的 50.62%，以期为今后雪莲果低聚果糖的质量控制提供科学依据。

本研究通过正交优化试验，考察提取时间、料液比、提取液中柠檬酸含量 3 个因素对雪莲果低聚果糖提取率的影响，优选出最佳的提取工艺， $P<0.05$ 具有统计学意义，故本实验雪莲果低聚果糖的最佳提取工艺为 $A_1B_2C_3$ ，即超声提取 1 h、料液比为 15 倍、提取液为 0.5% 柠檬酸水溶液，在此条件下雪莲果低聚果糖提取率为 51.36%，比目前文献的提取率都高很多。

通过雪莲果低聚果糖、低聚果糖、菊粉增值双歧杆菌的实验结果，可以看出雪莲果低聚果糖的增值效果最好，是低聚果糖、菊粉的 1.5~2 倍。通过雪莲果低聚果糖 60%、70%、80% 乙腈部位增值双歧杆菌的实验结果可以看出雪莲果低聚果糖各单体对双歧杆菌的增值效果不同时间起的作用不同，且相互之间有协调作用，以期为今后继续研究雪莲果低聚果糖各单体的活性提供参考。

雪莲果低聚果糖混合物的生物活性虽然已被证实，但对其单体及各单体相互之间协同作用对肠道菌群影响的研究在国内外仍属罕见。因此本实验对雪莲果低聚果糖的提取方法进行优化，并用 HPLC-ELSD 确定其组成和含量，以

期为后续制备单体打下基础，同时对雪莲果低聚果糖各部位增值双歧杆菌的活性进行研究，确定了各单体对肠道菌群具有协同作用。对于制备分离雪莲果低聚果糖单体，探讨雪莲果低聚果糖对肠道菌群的代谢机理，开发高活性的产品具有重要意义。

参考文献：

[1] 游 懿. 雪莲果低聚果糖提取分离及分析研究[D]. 长沙: 长沙理工大学, 2011.

[2] 武 莹. 雪莲果中糖类成分分析及低聚果糖制备工艺路线初探[D]. 北京: 北京中医药大学, 2008.

[3] 李新海, 梁兆辉, 蔡锦源, 等. 微波辅助提取雪莲果低聚糖的工艺研究[J]. 中国药物警戒, 2011, 8(3): 145-147.

[4] 陈学玲, 关 健, 何建军, 等. 雪莲果的功能特性及应用[J]. 农产品加工 (学刊), 2010(10): 18-19.

[5] 韩 笑, 杨 明, 崔承彬, 等. 高效液相色谱法定量测定巴戟天中菊淀粉型寡糖的含量[J]. 军事医学, 2011, 35(4): 296-298.

[6] Hond E D, Geypens B, Ghos Y. Effect of high performance chicory inulin on constipation[J]. *Nutr Res*, 2000, 20(5): 731-736.

[7] Alexandre R L, Célia C, Eliana P A, *et al.* Effects of fructans-containing yacon (*smallanthus sonchifolius* poepp & endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance, and bone calcium retention in growing rats [J]. *Brit J Nutr*, 2007, 97(4): 776-785.

[8] 巫晓燕, 蔡为荣. 果胶低聚糖对双歧杆菌体外增殖作用和应用研究[D]. 芜湖: 安徽工程大学, 2018.

[9] 魏军香, 张跃进, 梁宗锁, 等. HPLC 法测定不同储藏条件及时期雪莲果块根中绿原酸含量[J]. 西北农业学报, 2012, 21(7): 118-122.

[10] 郑名敏, 李静威, 荣廷昭, 等. HPLC 法测定雪莲果在不同储藏条件下糖分组成的变化[J]. 食品科学, 2009, 30(8): 190-193.

[11] 郝 婷, 尹志峰, 王小青, 等. HPLC-ELSD 法测定不同炮制方法雪莲果中低聚果糖的含量[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(5): 842-844.

[12] 张会香, 杨世军, 郑伟婵. 雪莲果中 SDF 的提取工艺及特性研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(10): 13-16.