

黄芪多糖的糖含量与饮片截面积的关系及对小鼠免疫器官指数的影响

彭勤, 刘晓曦* (广东海洋大学滨海农业学院动物医学系, 广东湛江 524000)

摘要 [目的]以多糖含量来评价黄芪质量,并研究黄芪多糖对小鼠免疫器官指数的影响。[方法]根据黄芪饮片大小编号为1号、2号和3号,先测量其面积,粉碎机粉碎后过20目筛,经过水提醇沉的方法提取多糖,用酶标仪测定黄芪多糖中的糖含量,选用糖含量最高的提取物制作黄芪多糖药液(10 mg/mL);将小鼠随机分成2组,即对照组和黄芪多糖组(0.01 mL/g)给小鼠灌胃7 d,称量小鼠体重,眼球采血,测量其外周血白细胞数及采集其胸腺、脾脏并称量,比较其内脏系数和外周血白细胞数的变化。[结果]1~3号黄芪多糖的提取率分别为5.75%、5.95%和7.76%,糖含量分别为208.75、209.45和212.35 mg/g,黄芪饮片的内圈大小和多糖提取量呈正相关,3号饮片质量最佳;小鼠灌胃黄芪多糖后胸腺、脾脏系数显著增高。[结论]黄芪多糖改善了小鼠的免疫功能。

关键词 黄芪;多糖;含量;饮片截面积;小鼠;免疫器官指数

中图分类号 R 285 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2022)11-0159-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.11.041



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Relationship between Sugar Content of Astragalus Polysaccharide and Cross-sectional Area of Decoction Pieces and Its Effect on Immune Organ Index in Mice

PENG Qin, LIU Xiao-xi (Department of Veterinary Medicine, Binhai Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524000)

Abstract [Objective] The astragalus quality was evaluated by the polysaccharide content, and the effect of astragalus polysaccharide on the immune organ index of mice was studied. [Method] According to the size of astragalus decoction pieces numbered as No. 1, No. 2 and No. 3, the area of astragalus decoction pieces was measured first. After being crushed by a pulverizer and sieved through 20 meshes, the polysaccharide was extracted by water extraction and alcohol precipitation. The sugar content in astragalus polysaccharide was determined by an enzyme labeling instrument. The extract with the highest sugar content was selected to make astragalus polysaccharide solution (10 mg/mL); The mice were randomly divided into two groups: control group and astragalus polysaccharide group (0.01 mL/g). The mice were gavaged for 7 days. The weight of the mice was weighed, the blood was collected from the eyeball, the number of leukocytes in peripheral blood was measured, and the thymus and spleen were collected and weighed. The changes of visceral coefficient and the number of leukocytes in peripheral blood were compared. [Result] The extraction rates of 1-3 astragalus polysaccharides were 5.75%, 5.95% and 7.76% respectively, and the sugar contents were 208.75, 209.45 and 212.35 mg/g respectively. There was a positive correlation between the inner ring size of astragalus decoction slices and the extraction amount of polysaccharides, and the quality of No. 3 slices was the best. After intragastric administration of astragalus polysaccharides, the coefficients of thymus and spleen increased significantly. [Conclusion] Astragalus polysaccharides improved the immune function of mice.

Key words Astragalus; Polysaccharide; Content; Cross-sectional area of decoction pieces; Mouse; Immuno-organ index

在饲料中添加安全可靠、高效的天然植物(提取物、超微粉碎物等)以增加畜禽的免疫力用来抵御疾病,是预防疾病的一项重要营养措施^[1]。黄芪味甘,性微温,具有补气升阳、止汗固表、消肿利尿、托毒排脓、敛疮生肌等效果。临床上主要是用于治疗气虚乏力、中气下陷、气虚水肿等^[2]。近代药理学研究发现,黄芪具有调节机体免疫、抗应激、抗病毒、抗感染等作用。

黄芪能提高机体免疫功能^[3],增加动物体内外周白细胞数^[4],添加在饲料中能提高小鼠的免疫力、加快动物机体快速恢复^[5]、改善肠道菌群^[6]等。黄芪主要含有黄芪多糖、黄芪皂苷、黄芪黄酮等类化合物,其中黄芪多糖含量最多、免疫活性最强、应用最为广泛^[7]。提取黄芪多糖的方式有水煎煮法(水提醇沉)^[8]、碱醇提取法、碱水提取法^[9]、微波提取法^[10]、超声提取法^[11]、超高压提取法^[12]、酶提取法^[13]和基于响应面分析的提取方法等,其中水提醇沉法最常见也最简便。市场上的黄芪质量参差不齐,甚至存在伪品黄芪冒充正品或以次充好的现象^[14]。但是黄芪多糖结构较为复杂,不具备成为质控的指标条件,所以国内大多数试验都是通过提

取黄芪多糖,以总多糖来作为研究对象。但针对多糖对黄芪质量的研究较少,故质量评估方法一直是个热门的研究方向。为建立一种更科学的品质评价指标,笔者通过水提醇沉法去提取黄芪多糖,并测定黄芪多糖中糖含量以评价饮片质量,以期在市场上评价黄芪饮片质量提供理论依据,对中草药资源保护和发展都具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试验样品及其来源 根据黄芪饮片大小,将饮片从大到小进行编号。黄芪1号(化州市某有限公司中药饮片厂生产,饮片),采购于湛江市霞山区康悦大药房;黄芪2号(北京某有限公司生产,饮片),采购于湛江市霞山区湛川大道北京同仁堂江霞分店;黄芪3号(岐山某中药材有限公司生产,饮片),采购于湛江市大参林。6周昆明系小白鼠10只。

1.2 主要试剂 无水乙醇(分析纯);苯酚;硫酸;超纯水;肝素。

1.3 测量黄芪饮片内圈大小 将购买的各样品黄芪饮片随机挑选5枚黄芪饮片测量其内圈的长度和宽度,记录并求得其平均值,计算其内圈面积。黄芪饮片内圈近似椭圆形,其内圈面积的计算公式为 $S = \pi \times A \times B$,式中, A 为内圈的半长轴, B 为内圈的半短轴。

1.4 黄芪多糖提取 将3种黄芪饮片(黄芪1号、黄芪2

作者简介 彭勤(1997—),男,广东梅州人,从事动物病毒方面的研究。

* 通信作者,讲师,博士,从事中兽医的教学与研究工作。

收稿日期 2021-08-31

号、黄芪3号)分别用万能高速粉碎机粉碎,并过20目筛网,获得20目的黄芪粉。用电子天平称取100g的黄芪粉,并加入20倍的超纯水(2L),煎煮2次(先使用1L水煎煮1次,再用1L水煎煮第2次),混合2次煎煮出的黄芪液。将煎煮出的黄芪液离心(10 min, 2 000 r/min),取上清液蒸发浓缩至500 mL,加入无水乙醇使醇浓度达到60%,离心(10 min, 2 000 r/min),弃上清液,沉淀溶于水,再加入无水乙醇使醇浓度达到40%,离心(10 min, 2 000 r/min),获得沉淀物,将沉淀物放入鼓风干燥机中干燥,获得黄芪多糖1号、黄芪多糖2号、黄芪多糖3号,称重并记录数据。

1.5 酶标仪测定多糖中的糖含量

1.5.1 葡萄糖标准溶液的配制。称取葡萄糖标准样品20 mg,放入100 mL锥形瓶,定容,加入适量超纯水溶解,稀释至刻度,摇匀,备用。

1.5.2 苯酚溶液的制备。称取苯酚5 g,置于100 mL棕色容量瓶中,定容,加入适量水溶解,稀释至刻度线,摇匀,得5%的苯酚溶液,置于4℃冰箱备用。

1.5.3 不同梯度葡萄糖标准溶液的制备。量取配制好的葡萄糖标准溶液0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8和1.0 mL,置于具塞试管中,并依次编号为1~7,并且分别补水至2 mL。将5%苯酚溶液1.0 mL加入各试管,搅拌混匀后迅速将5.0 mL硫酸加入,搅拌混匀,静置10 min后,于水浴加热(40℃)15 min,取出冷却至室温。不加葡萄糖的试剂为空白组。

1.5.4 全波长酶标仪标准曲线的绘制。以空白作参比,精密吸取编号为1~7的葡萄糖标准溶液各100 μL,分别置于96孔单条可拆酶标板中,采用全波长酶标仪在450 nm波长下测定其OD值,以葡萄糖含量为X轴、OD值为Y轴,绘制标准曲线。

1.5.5 样品溶液的制备。精密称取1号、2号、3号黄芪饮片提取的多糖样品1 g,加水溶解至100 mL,摇匀,即得1号、2号、3号样品溶液。

1.5.6 糖含量的测定。精密量取制备的1号、2号、3号样品溶液1.0 mL,置于具塞试管中,精密加水1.0 mL,搅拌混匀,进行显色操作[加入1.0 mL的5%苯酚溶液,搅拌混匀,加入5.0 mL硫酸,搅拌混匀,静置10 min后,水浴保温(40℃)15 min,取出,迅速冷却至室温]。在450 nm波长下,吸取编号1~3的多糖样品溶液各100 μL,分别注入96孔单条可拆酶标板中,采用全波长酶标仪进行OD值测定,重复测定6次,根据标准曲线计算样品糖含量。

1.6 动物试验

1.6.1 10 mg/mL 黄芪多糖药液的配制。称取3号黄芪多糖1 g,加入100 mL超纯水,加热搅拌溶解,获得10 mg/mL的药液。

1.6.2 试验动物分组。选用10只(20±2)g的小鼠,编号并记录初始体重,随机分成两组,分别为对照组和黄芪多糖组。将配制完成的黄芪多糖(浓度10 mg/mL)按0.01 mL/g给药进行灌胃,黄芪多糖组每天灌胃0.2 mL,对照组则灌0.2 mL生理盐水作空白对照,每组每次饲养需固定饲养量,每天2

次,饲养7 d。

1.6.3 小鼠脾脏、胸腺的摘除及保存并计算脾脏、胸腺脏器系数。观察并饲养7 d后,饲养结束。提前禁食1 d,称重,眼球采血,收集全血,做好标记。小鼠眼球采血,收集到的全血置于装有抗凝剂(EDTA)的立式离心管内,上下颠倒摇匀,充分混合。将采集的血液在URIT-5810五类全自动血细胞分析仪测量外周血白细胞数,测定白细胞数并记录。剖开小鼠腹腔,采集小鼠的脾脏和胸腺。取4个洁净的50 mL立式离心管,分别标记黄芪多糖组和对照组。离心管内分别倒入适量4%甲醛溶液(溶液的量需完全浸没组织),用以保存摘取的脾脏和胸腺。在密封、室温条件下,固定72 h保存以备。称量并记录各组的脾脏和体重,根据以下公式计算:胸腺、脾脏脏器系数=胸腺、脾脏的湿重/小鼠胴体重量×100%。

1.7 数据统计分析 使用Excel软件处理测量的数据及画图,应用统计软件SPSS 20.0进行2个独立样本的t检验。

2 结果与分析

2.1 黄芪饮片截面积与黄芪多糖提取量的相关性 从表1可以看出,3号黄芪饮片截面积最大,其次为2号,最小的是1号;3号黄芪饮片中多糖提取率提高,其次为2号,最低的为1号,1号、2号和3号黄芪饮片的多糖提取率分别为5.75%、5.95%和7.76%。由表1和图1可知,黄芪多糖提取量与黄芪内圈大小有关,黄芪多糖提取量与黄芪饮片截面积呈正相关性,线性方程是 $y=2.6563x+4.096$ ($R^2=0.9997$),结果表明黄芪饮片截面积在0~1.40 cm²线性关系良好。内圈越大提取的多糖量越多,反之则越少。

表1 黄芪饮片截面积和多糖提取率

Table 1 Cross-sectional area and polysaccharide extraction rate of astragalus decoction pieces

黄芪饮片 Astragalus decoction piece	内圈长 Inner ring length//cm	内圈宽 Inner ring width//cm	截面积 Cross-sectional area//cm ²	多糖提取率 Polysaccharide extraction rate//%
1号 No.1	1.32±0.13	0.60±0.07	0.63±0.13	5.75
2号 No.2	1.46±0.09	0.60±0.10	0.69±0.16	5.95
3号 No.3	2.22±0.36	0.80±0.10	1.38±0.31	7.76

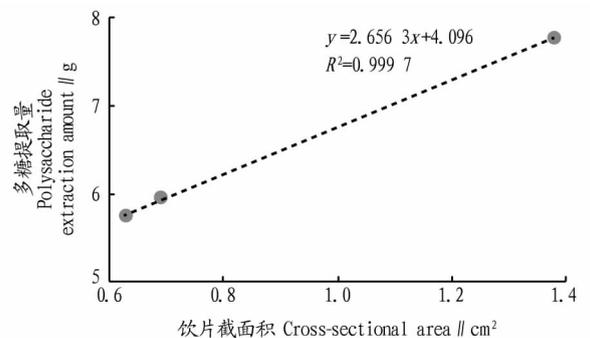


图1 黄芪饮片截面积与多糖提取量的相关关系

Fig. 1 Correlation between the cross-sectional area of astragalus pieces and the extraction amount of polysaccharides

2.2 黄芪多糖中糖含量测定 根据酶标仪在450 nm波长

下的结果,绘制 OD 值与葡萄糖含量的标准曲线,结果见图 2。从图 2 可以看出,在 450 nm 波长下,全波长酶标仪测定结果的线性方程是 $y = 1.045 2x + 0.090 1$ ($R^2 = 0.986$),表明葡萄糖含量在 0~0.20 mg/mL 线性关系良好。

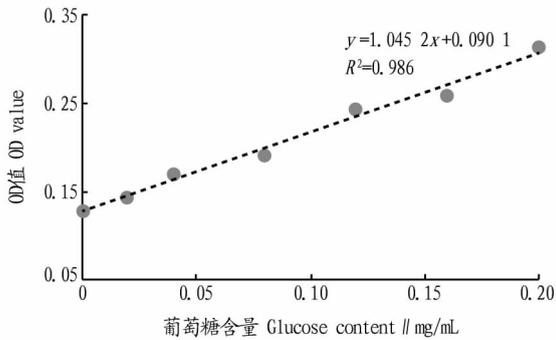


图 2 多糖标准曲线

Fig. 2 Polysaccharide standard curve

经计算,1号、2号和3号黄芪多糖中糖含量分别为 208.75、209.45、212.35 mg/g,可见3号黄芪多糖中含糖量最多,故判断3号黄芪质量最好。因此,选取3号黄芪多糖开展动物试验。

2.3 黄芪多糖对小鼠脏器指数的影响 按 0.01 mL/g 给小鼠灌胃给药 7 d 后,发现相比于对照组,黄芪多糖组的外周血白细胞数有升高趋势 ($P > 0.05$)。从表 2 可以看出,黄芪多糖组的脾脏、胸腺的脏器指数均高于对照组,且差异显著 ($P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠脏器指数

Table 2 Organ index of mice in each group %

处理 Treatment	脾脏指数 Spleen index	胸腺指数 Thymus index
对照组 Control group	0.20±0.04	0.59±0.14
黄芪多糖组 Astragalus polysaccharide group	0.53±0.18*	0.94±0.12*

注: * 表示与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)

Note: * indicates significant difference compared with the control group ($P < 0.05$)

3 结论与讨论

该试验通过水煮醇沉的方法提取黄芪多糖,1号、2号和3号黄芪饮片的多糖提取率分别为 5.75%、5.95%和 7.76%,通过酶标仪对多糖标准品绘制的标准曲线^[15]计算出 1号、2号和3号黄芪饮片提取的多糖中糖含量分别为 208.75、209.45 和 212.35 mg/g。黄芪多糖提取量与黄芪饮片截面积呈正相关,黄芪饮片截面积越大,黄芪多糖含量越多;反之则越少。黄芪饮片的截面积可作为质控指标之一。黄芪质量主要以传统性状分为特等、一等、二等、三等、四等^[16]。水煎煮法是黄芪多糖的传统提取方法,又被称为水提醇沉,主要根据大部分多糖在热水中溶解度较大而在高浓度乙醇中溶度小的原理进行提取;该方法主要的优点在于操作简单方便、对多糖的破坏较小,是目前运用最广泛的黄芪多糖提取方法,但其也存在一些缺点,如多糖的提取率及其糖含量普遍的偏低;试验中由于多糖被乙醇萃取后容易黏附在玻璃

器械上,导致结果有所偏差;对提取的物质的选择性较差,提取物成分的种类较多,不利于后期的分离纯化,而且提取的物质容易变质。

小鼠灌胃 7 d 后,解剖采样后发现黄芪多糖组小鼠的胸腺、脾脏系数与对照组的胸腺、脾脏系数相比增加明显,通过数据可以发现提取出的黄芪多糖对小鼠的免疫系统有强化提升的作用,使小鼠的免疫力增强。黄芪多糖是一种药食两用的天然中草药提取物,蕴含较丰富的营养物质,如多糖、维生素、微量元素、氨基酸及一些未知的生长因子等,可以促进动物的免疫器官发育、增强动物机体对疾病的抵抗力、提高动力的机体的免疫力、加快动物机体快速恢复、改善肠道菌群等。多糖也具有提升动物机体免疫力的作用,如茯苓多糖对肉鸡有改善机体免疫的作用^[17]、赤松茸多糖对小鼠脾脏细胞和巨噬细胞的增殖作用^[18]以及枸杞多糖对肉雏鸡免疫器官指数有增加作用^[19],这些多糖在畜禽养殖业各个领域中都具有很好的应用效果。

综上所述,黄芪饮片的内圈大小与多糖提取量呈正相关,3号饮片质量最佳;小鼠灌胃黄芪多糖后胸腺、脾脏系数显著增高,表明黄芪多糖改善了小鼠的免疫功能。

参考文献

- [1] 张吉鹏. 非洲猪瘟背景下,药食同源中草药黄芪多糖提升猪只抗病力的营养活性作用[J]. 猪业科学, 2020, 37(12): 81-85.
- [2] 武宁,何珍,徐贺朋,等.《医学衷中参西录》对黄芪应用之探讨[J]. 中国药物经济学, 2021, 16(5): 125-128.
- [3] 柳序,田科雄,彭灿阳,等. 黄芪多糖的免疫调节作用及其在动物生产中的应用[J]. 中国饲料, 2016(22): 12-15, 24.
- [4] 冯会利,王海棚,刘守铨,等. 日粮中添加黄芪多糖对断奶羔羊生长性能、血液生化指标及免疫力的影响[J]. 饲料研究, 2021, 44(2): 23-26.
- [5] 宋雷,展辉. 黄芪对大运动量小鼠身体功能恢复的促进作用[J]. 中国饲料, 2020(4): 64-67.
- [6] 孙波,陈静,刘江,等. 饲料中添加黄芪多糖对肉鸡肠道菌群及免疫器官指数的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(13): 86-88.
- [7] 曹宇欣. 基于多糖分子量分布和免疫活性比较的黄芪质量研究[D]. 太原:山西大学, 2020.
- [8] 权彦,何建军,刘靖丽,等. 水提醇沉法提取黄芪中黄芪多糖的工艺优化及含量测定[J]. 当代化工, 2018, 47(7): 1374-1376.
- [9] 龚旭昊,张璐,董玲玲,等. 黄芪多糖提取方法研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(1): 88-92.
- [10] 李龙,赵璐,李学良. 水煎醇沉法和微波结合法提取黄芪、淫羊藿多糖[J]. 农家参谋, 2020(8): 144.
- [11] 王丹,王娟. 星点设计-响应面法优化黄芪多糖超声提取工艺[J]. 安徽化工, 2019, 45(4): 29-32.
- [12] 陈瑞战,孟繁磊,张守勤,等. 超高压提取黄芪甲苷工艺研究[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(7): 519-523.
- [13] 魏凤玉,康家胜,张宇. 纤维素酶法提取黄芪多糖的动力学[J]. 过程工程学报, 2012, 12(5): 839-843.
- [14] 裴文茵,何凡,程春松,等. 中药黄芪质量评价方法的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(5): 620-628.
- [15] 高倩,刘凤华,史雅然,等. 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[J]. 动物营养学报, 2019, 31(2): 922-929.
- [16] YIN M Z, YANG M, CHU S S, et al. Quality analysis of different specification grades of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* (Huangqi) from Hunyuan, Shanxi [J]. *Journal of AOAC international*, 2019, 102(3): 734-740.
- [17] 刘海防. 茯苓多糖对肉鸡免疫力的影响[J]. 畜牧兽医学报(电子版), 2020(15): 9-10.
- [18] 伍玉兰,冯婉滢,张玲雨,等. 赤松茸多糖的提取及对小鼠免疫力的影响[J]. 中国食物与营养, 2020, 26(10): 50-53.
- [19] 王建东,高慧兰,马吉锋,等. 含不同浓度枸杞多糖的免疫增效剂对肉雏鸡机体免疫力的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(6): 150-152.