

质量分析

基于酶解法和化学计量学的黄精多糖差异性分析*

刁卓¹, 胡冲², 杨青山³, 张亚中^{2,3**}

(1. 安徽医学高等专科学校, 合肥 230031; 2. 安徽省食品药品检验研究院 国家药监局中药质量研究与评价重点实验室, 合肥 230051; 3. 安徽中医药大学, 合肥 230012)

摘要 目的:建立糖苷酶水解下不同品种黄精多糖酶解产物的 HPLC 指纹图谱, 探讨不同品种黄精多糖的差异, 为黄精药材多糖质量评价提供参考。**方法:**黄精多糖经果糖苷酶水解后, 采用 HPLC 建立黄精的指纹图谱; 并结合相似度(SA)分析、聚类分析(HCA)和主成分分析(PCA), 对指纹图谱进行分析, 研究不同品种黄精多糖的差异。**结果:**不同品种黄精的多糖 HPLC 指纹图谱存在差异, 共得到 17 个特异性寡糖片段, 均含有果糖、葡萄糖和蔗糖。分析表明, 3 种基原黄精的种内指纹色谱相似度较高, 差异较小, 种间差异较大, 而黄精混伪品与基原黄精差异明显。**结论:**不同品种黄精及其混伪品多糖酶解产物的指纹图谱结合化学计量学分析可以成功将黄精按照品种进行分类。所建立的 HPLC 方法简便、准确, 重复性好, 可用于黄精药材的多糖的差异研究。

关键词:黄精; 多糖; 酶解法; 指纹图谱; 差异; 化学计量学; 高效液相色谱法

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)02 - 0324 - 09

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024.02.16

Polygonati Rhizoma polysaccharide differential analysis based on enzymolysis and chemometrics*

DIAO Zhuo¹, HU Chong², YANG Qing - shan³, ZHANG Ya - zhong^{2,3**}

(1. Anhui Medical College, Hefei 230031, China; 2. Anhui Provincial Institute for Food and Drug Control, Key Laboratory of Quality Research and Evaluation of Traditional Chinese Medicines of the State Food and Drug Administration, Hefei 230051, China;
3. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

Abstract Objective: To determine the polysaccharide hydrolysates from Polygonati Rhizoma under glycoside enzymatic hydrolysis' HPLC fingerprint. Examine the variations among the polysaccharides produced by the various varieties of Polygonati Rhizoma and provide references for the assessment of the polysaccharide quality. **Methods:** After the polysaccharide from Polygonati Rhizoma was hydrolyzed by fructose enzymes, its fingerprint was established by HPLC - ELSD. The fingerprint was then analyzed using similarity analysis (SA), hierarchical cluster analysis (HCA), and principal component analysis (PCA) to determine the differences between the polysaccharides from various Polygonati Rhizoma varieties. **Results:** Polysaccharides from various strains of Polygonati Rhizoma had different HPLC - ELSD fingerprints, and a total of 17 distinct oligosaccharide fragments were discovered, all of which contained fructose, glucose, and sucrose. Analysis revealed that there are significant intra

* 安徽省药品监督管理局监管科学研究重点项目 - 常用中药材 DNA 分子鉴定研究

** 通信作者 Tel: 13956985695; E - mail: 282483507@qq.com

第一作者 Tel: 18356875022; E - mail: 524081110@qq.com

species differences, minor differences, and high levels of similarity between the three types of Polygonati Rhizoma. The real Polygonati Rhizoma differs significantly from the imitation in several important ways. **Conclusion:** Polygonati Rhizoma can be successfully classified according to varieties, using the fingerprint of polysaccharide hydrolysates of the various varieties of Polygonati Rhizoma and its adulterants. The developed HPLC method can be used for the differential analysis of polysaccharides in Polygonati Rhizoma and is straightforward, precise, and repeatable.

Keywords: Polygonati Rhizoma; polysaccharides; enzymatic hydrolysis; fingerprint; differences; chemometrics; HPLC

黄精为 2020 年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)^[1] 记载品种,其法定基原为百合科植物滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.、黄精 *Polygonatum sibiricum* Red. 或多花黄精 *Polygonatum cyrtoneuma* Hua 的干燥根茎,按形状不同,习称“大黄精”“鸡头黄精”“姜形黄精”,具有补气养阴、健脾、润肺、益肾等功效^[2],常用于抗疲劳、调节免疫等,具有极高的药用保健价值^[3-5]。由于黄精功效确切,市场认可度好,但价格较高,因此市场上常有用黄精属的其他植物,如湖北黄精、四川黄精等,冒充黄精进行销售的现象,严重影响黄精产业发展。因为黄精多糖的药材标准不够明确,采用的苯酚-硫酸法准确性低且无法获取多糖的结构信息,难以对市场上不同品种的黄精多糖质量进行有效评估,故导致这种冒充现象难以杜绝。因此,急需围绕黄精中药材多糖质量控制进行研究,以形成更加明确、更有区分度的标准。

目前对于黄精多糖的研究已经较为深入,但主要集中在采用酸水解以及柱前衍生化等方法对于黄精基原物种单糖组成等方面的研究^[6-8],对黄精及其混伪品的寡糖研究较少且对于黄精品种的研究较为单一。本研究基于酶解法,对于不同品种黄精特异性寡糖片段进行分析,建立了 HPLC 指纹图谱,并结合相似度评价以及化学计量学分析,成功实现对于黄精及其混伪品的鉴别工作,为黄精多糖的质量评价工作提供参考。

1 材料

U3000 型高效液相色谱仪(配备 Allech-ELSD6000 蒸发光散射检测器),Dionex 公司;XP26 百万分之一分析天平,Mettler Toledo 公司;Elmasonic S 型超声仪(功率 1 kW,频率 37 kHz),德祥科技有限公司;FD240 电热恒温干燥箱,Binder 公司;XMTD205 水浴锅,常州国宇仪器制造有限公司;JW-3021 HR

高速冷冻离心机,安徽省嘉文仪器装备有限公司;LGJ-10S 真空冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司;Millipore Simplicity-185 型超纯水仪,Millipore 公司。

对照品果糖(批号 111504-201703,纯度 99.8%)、蔗糖(批号 111507-202105,纯度 99.8%)、葡萄糖(批号 110833-201908,纯度 99.8%),中国食品药品检定研究院; α -淀粉酶(EC:3.2.1.1,批号 S11GS160659)、果糖苷酶(EC:3.2.1.26,批号 J21M11K10978),上海源叶生物科技有限公司。三氯甲烷(批号 10006818)、正丁醇(批号 20211026)、乙醇(批号 20211026)均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;乙腈(批号 F22M7D201)色谱级,Fisher Scientific 公司;黄精药材由安徽省食品药品检验研究院提供,经安徽省食品药品检验研究院张亚中教授鉴定,分别为百合科植物滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.、黄精 *Polygonatum sibiricum* Red. 或多花黄精 *Polygonatum cyrtoneuma* Hua 的干燥根茎。此外,文中所提到的四川黄精、湖北黄精、小叶黄精以及进口黄精为调研过程中所收集当地的习用品。34 批样品详情见表 1。

2 方法

2.1 黄精多糖的提取

将黄精的新鲜根茎于烘箱中烘干至恒重,并粉碎。取粉末 5 g,置于 15 倍 85% 乙醇中浸泡 24 h。过滤并离心($3\ 000\ \text{r}\ \text{min}^{-1}$, 5 min),收集沉淀并烘干,加入 15 倍的蒸馏水,在 80 °C 条件下超声提取 2 次,每次 2 h,离心,上清液合并,浓缩成浓度为 $400\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 黄精多糖溶液。在浓缩液中加入浓度为 $20\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 α -淀粉酶,在 60 °C 水浴下酶解 4 h,反应完成后,沸水浴灭酶 10 min。取上清液,加相当于其体积 1/4 的 Seville 试剂,剧烈震荡,离心,重复以上操作直到无白色絮状物产生为止。所得上清液

表 1 试验材料详表

Tab. 1 Detailed list of test materials

编号 (number)	产地 (habitat)	编号 (number)	产地 (habitat)
S1	江西瑞昌 (Ruichang, Jiangxi)	D3	贵州毕节 (Bijie, Guizhou)
S2	安徽六安 (Lu'an, Anhui)	D4	云南昆明 (Kunming, Yunnan)
S3	安徽池州 (Chizhou, Anhui)	D5	四川达州 (Dazhou, Sichuan)
S4	安徽池州 (Chizhou, Anhui)	C1	四川成都 (Chengdu, Sichuan)
S5	安徽池州 (Chizhou, Anhui)	C2	湖北武汉 (Wuhan, Hubei)
S6	浙江杭州 (Hangzhou, Zhejiang)	C3	河南洛阳 (Luoyang, Henan)
S7	浙江杭州 (Hangzhou, Zhejiang)	C4	河南洛阳 (Luoyang, Henan)
S8	浙江杭州 (Hangzhou, Zhejiang)	C5	河南洛阳 (Luoyang, Henan)
S9	浙江杭州 (Hangzhou, Zhejiang)	H1	湖南岳阳 (Yueyang, Hunan)
S10	浙江衢州 (Quzhou, Zhejiang)	H2	湖南岳阳 (Yueyang, Hunan)
J1	贵州毕节 (Bijie, Guizhou)	H3	安徽池州 (Chizhou, Anhui)
J2	安徽池州 (Chizhou, Anhui)	H4	安徽池州 (Chizhou, Anhui)
J3	山东泰安 (Tai'an, Shandong)	H5	安徽池州 (Chizhou, Anhui)
J4	辽宁抚顺 (Fushun, Liaoning)	Z1	国外 (abroad)
J5	河南洛阳 (Luoyang, Henan)	Z2	国外 (abroad)
D1	四川成都 (Chengdu, Sichuan)	X1	四川成都 (Chengdu, Sichuan)
D2	湖北武汉 (Wuhan, Hubei)	X2	四川成都 (Chengdu, Sichuan)

注 (note): S1 ~ S10. 多花黄精 (*Polygonatum cyrtoneura* Hua) J1 ~ J5. 黄精 (*Polygonatum sibiricum* Red) D1 ~ D5. 滇黄精 (*Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.) C1 ~ C5. 四川黄精 (*Sichuan Polygonati Rhizoma*) H1 ~ H5. 湖北黄精 (*Polygonatum zanlanscianense* Pamp.) Z1 ~ Z2. 进口黄精 (imported *Polygonati Rhizoma*) X1 ~ X2. 小叶黄精 (*Polygonati Rhizoma microphylla*)

加入无水乙醇 (慢加快搅) 至乙醇浓度为 80%, 置 4 °C 冰箱中放置 24 h, 离心, 倒去上清液。沉淀加 95% 乙醇洗涤 2 次, 每次 10 mL, 离心, 得沉淀物, 加热水使沉淀溶解, 冷冻干燥, 得黄精粗多糖冻干粉。

2.2 供试品溶液制备

取黄精多糖 10 mg, 加水 20 mL, 制成质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的黄精多糖溶液; 另取果糖苷酶 10 mg ($100 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$), 转移至 10 mL 量瓶中, 用水溶解并定容至刻度, 制成 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的果糖苷酶溶液。取黄精多糖溶液 5 mL 与果糖苷酶溶液 ($100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 5 mL 混合。混合物在振荡器中水解 ($55 \text{ }^\circ\text{C}$, $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 3 h), 并在 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 下加热 20 min 使酶变性。离心 ($4500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min) 后, 取上清液, 干燥, 溶解在 2 mL 乙腈 - 水 (1:1) 溶液中, 以进行 HPLC 分析。

2.3 对照品溶液制备

取果糖、蔗糖、葡萄糖的对照品各约 10 mg, 精密称定, 分别转移至 10 mL 量瓶中, 用水溶解并定容至刻度, 即得。

2.4 色谱条件

U3000 型高效液相色谱仪 (配备 Allech-ELSD6000 蒸发光散射检测器), 色谱柱为 Hypersil GOLD™ PEI HILIC HPLC (250 mm × 4.6 mm, $5 \mu\text{m}$), 流动相为乙腈 (A) - 水 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 25 min, 85% A → 65% A; 25 ~ 35 min, 65% A → 50% A), 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$, 进样量 $10 \mu\text{L}$ 。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取 S2 号样品一份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次测定并记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 (以果糖的出峰时间和峰面积为参考, 其他各峰出峰时间和峰面积与其的比值, 下同), 测得其共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 $< 3.0\%$, 表明仪器精密度良好, 符合指纹图谱要求。

2.5.2 重复性试验 取 S2 号样品 6 份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.4”项下色谱条件进行测定, 测得各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 $< 3.0\%$, 同一样品每次提取之间的结果比

较一致,表明该提取方法重现性良好,符合指纹图谱要求。

2.5.3 稳定性试验 取同一份 S2 号样品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样,测得其共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明供试品溶液在 24 h 内较稳定,化学成分及含量不会发生改变,符合指纹图谱要求。

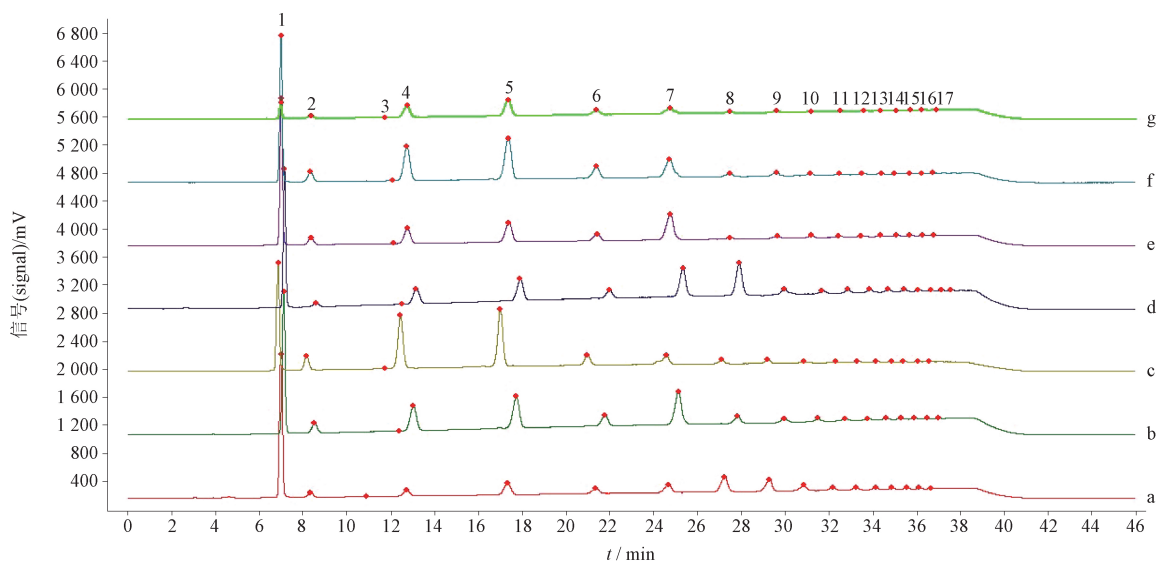
3 结果

3.1 指纹图谱相似度评价

对上述 34 批样品进行 HPLC 分析研究,找出 2020 年版《中国药典》中 3 种不同基原黄精存在的差

异及其与市场中易混品的异同,以此进行鉴别。

如图 1 所示,HPLC 检测到 17 个峰,得到了较为理想的特异性寡糖片段。比较相同条件下果糖、葡萄糖与蔗糖的保留时间,发现峰 1、峰 2、峰 4 分别为果糖、葡萄糖和蔗糖。此外,将 5 批黄精、5 批滇黄精、10 批多花黄精、5 批四川黄精、5 批湖北黄精、2 批小叶黄精、2 批进口黄精药材色谱图,分别导入中药指纹图谱相似度评价系统(2012 版)软件,生成 3 种基原黄精的对照图谱。34 批样品分别与黄精、滇黄精和多花黄精的对照图谱比较,计算相似度,以多花黄精对照图谱为例,如图 2、3 所示,结果见表 2。



1. 果糖(fructose) 2. 葡萄糖(glucose) 4. 蔗糖(sucrose)

a. 多花黄精(*Polygonatum cyrtoneura* Hua) b. 滇黄精(*Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl) c. 黄精(*Polygonatum sibiricum* Red) d. 四川黄精(*Sichuan Polygonati Rhizoma*) e. 湖北黄精(*Polygonatum zanlanscianense* Pamp) f. 进口黄精(imported *Polygonati Rhizoma*) g. 小叶黄精(*Polygonati Rhizoma microphylla*)

图 1 不同品种黄精多糖对照图谱叠加图

Fig. 1 Overlay map of control map of *Polygonati Rhizoma* polysaccharide from different varieties

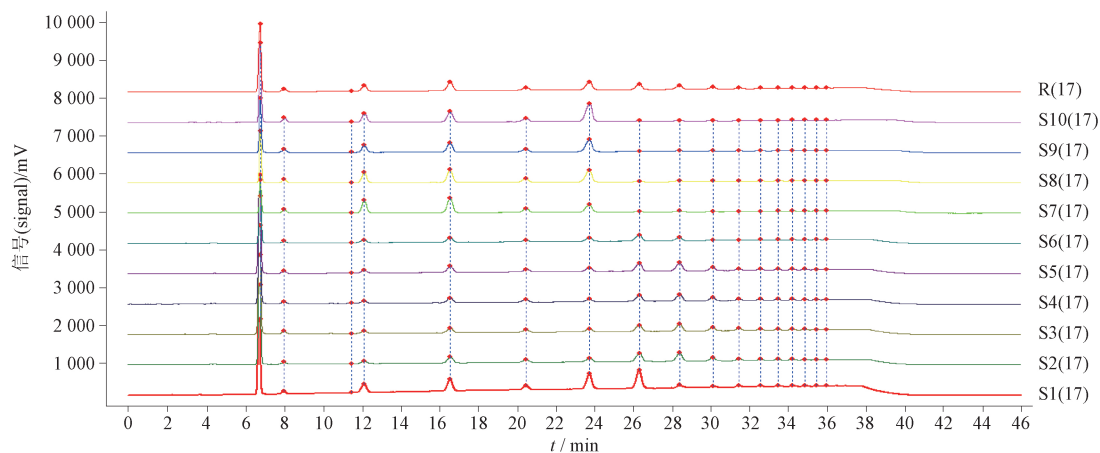
从表中可看出:与多花黄精对照图谱相比,3 种基原黄精的相似度中 10 批多花黄精相似度 > 0.93 (图 2);滇黄精和黄精与其相比(图 3-A),除 1 批滇黄精(D1)样品外,相似度 < 0.85;而市场上的易混品相较于多花黄精对照图谱而言(图 3-B),分布较为离散,其中湖北黄精相似度在 0.44 ~ 0.95;四川黄精除 1 批(C4)之外,相似度均 < 0.86;进口黄精相似度均 < 0.82;小叶黄精相似度均 < 0.5。

上述结果表明,药典收录的 3 种不同来源黄精药材的种内指纹色谱相似度较高,差异较小;3 种基原黄精种间差异较大。因此,不同黄精多糖的结构

特征不同,便于区分。

3.2 聚类分析

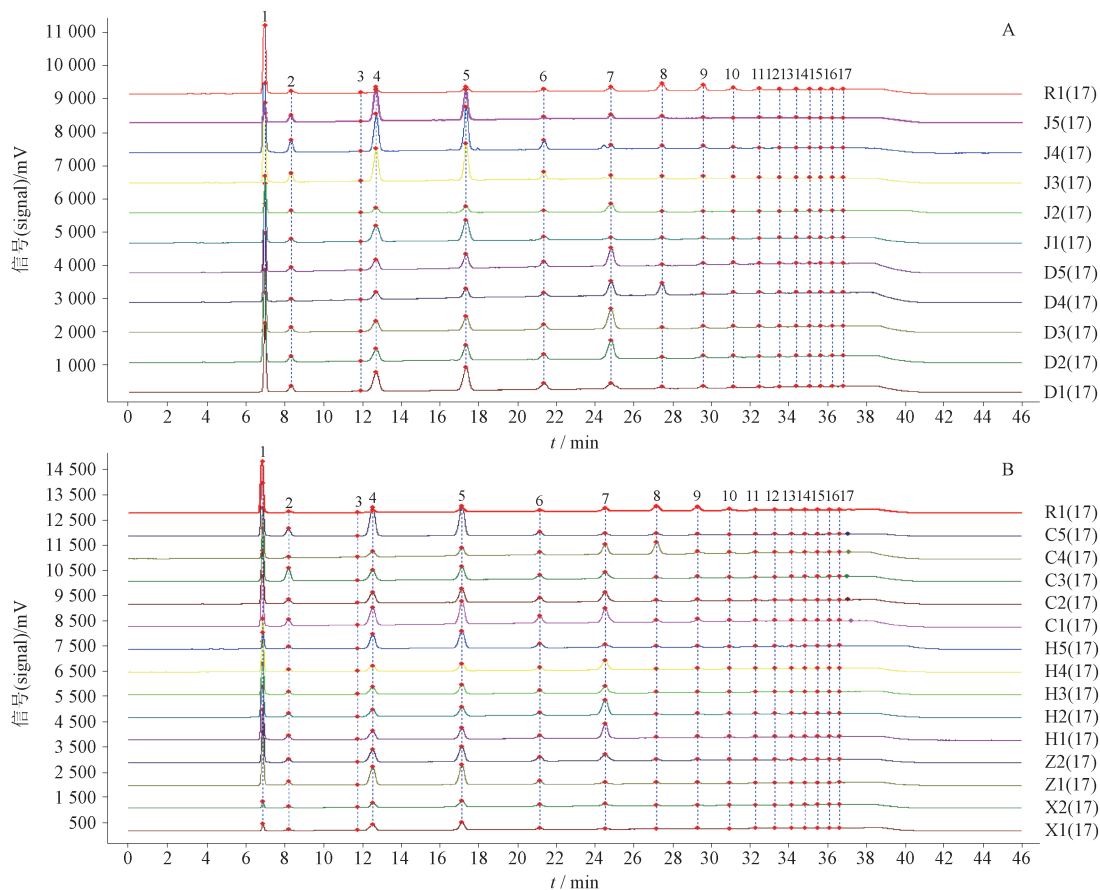
由于相似度分析中存在部分基原黄精品种区分度不明显的情况,故进一步采用聚类分析(HCA)对黄精、滇黄精和多花黄精进行分类。取 20 批黄精基原物种(含滇黄精、黄精、多花黄精)中多糖的 HPLC-ELSD 指纹图谱的共同峰面积整合形成 20×17 的数据矩阵。将数据矩阵进行低级融合并导入 IBM SPSS Statistic 23 版软件,采用组间联接作为聚类方法,根据个体差异对样本进行分类。



R. 多花黄精对照图谱 (the control chromatogram of *Polygonatum cyrtoneuma* Hua) S1 - S10. 多花黄精 (*Polygonatum cyrtoneuma* Hua)

图 2 10 批多花黄精多糖指纹图谱

Fig. 2 Polysaccharide fingerprint of 10 batches of *Polygonatum cyrtoneuma* Hua



R1. 多花黄精对照图谱 (the control chromatogram of *Polygonatum cyrtoneuma* Hua) D1 - D5. 滇黄精 (*Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.) J1 - J5. 黄精 (*Polygonatum sibiricum* Red) H1 - H5. 湖北黄精 (*Polygonatum zanlanscianense* Pamp) C1 - C5. 四川黄精 (Sichuan *Polygonati* Rhizoma) Z1 - Z2. 进口黄精 (imported *Polygonati* Rhizoma) X1 - X2. 小叶黄精 (*Polygonati* Rhizoma *microphylla*)

A. 滇黄精、黄精鉴别 (identification of *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl. and *Polygonatum sibiricum* Red) B. 其他黄精鉴别 (identification of other *Polygonati* Rhizoma)

图 3 以多花黄精多糖为参考不同品种黄精的指纹图谱

Fig. 3 Fingerprint of *Polygonatum cyrtoneuma* Hua polysaccharides as reference

表 2 基于多花黄精多糖对照图谱的不同品种黄精相似度

Tab. 2 Similarity of different varieties of *Polygonati Rhizoma* based on the comparison map of *Polygonatum cyrtoneuma* Hua polysaccharide

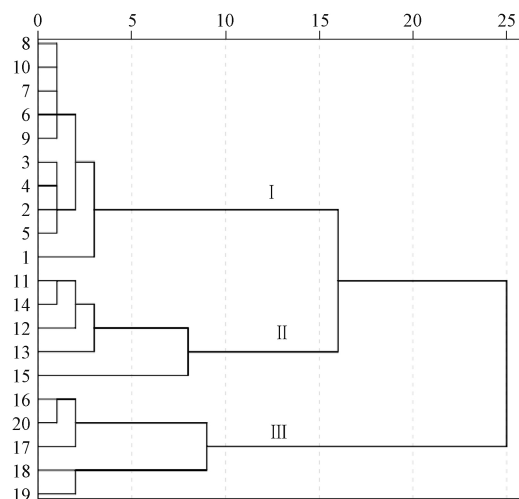
样品 (sample)	相似度 (similarity)	样品 (sample)	相似度 (similarity)
S1	0.937	D3	0.827
S2	0.998	D4	0.779
S3	0.997	D5	0.723
S4	0.997	C1	0.762
S5	0.998	C2	0.858
S6	0.997	C3	0.824
S7	0.998	C4	0.901
S8	0.998	C5	0.694
S9	0.997	H1	0.896
S10	0.997	H2	0.877
J1	0.755	H3	0.932
J2	0.838	H4	0.913
J3	0.770	H5	0.445
J4	0.751	Z1	0.765
J5	0.343	Z2	0.818
D1	0.933	X1	0.445
D2	0.773	X2	0.474

注(note):以多花黄精对照图谱(R1)色谱图作为参照图谱,利用中位数法进行多点校正生成对照图谱。各批次的相似度是与R1比较(用the R1 chromatogram of *Polygonatum cyrtoneuma* Hua as the reference spectrum, and use the median method for multi-point correction to generate the reference spectrum. The similarity of each batch is compared to R1)

HCA 结果如图 4 所示,20 批黄精样品被分为 3 大类:第 1 类包括 10 批多花黄精,产地分别是安徽六安、安徽池州(3 个),浙江杭州(4 个)、浙江衢州、江西瑞昌;第 2 类包括 5 批滇黄精,产地分别是四川达州、四川成都(2 个)、湖北武汉、云南昆明和贵州毕节;第 3 类包括 5 批黄精,产地分别是贵州毕节、安徽池州、山东泰安、辽宁抚顺。结果表明,黄精多糖酶水解产物经数据分析后依次被划分为 3 类与基原有一定的相关性,HCA 的样本中同一类别表明它们在结构特性上确实具有高度相似性。分成 3 类的原因可能是不同来源的黄精多糖结构具有一定的差异,这一发现给黄精的鉴别工作提供了另一种方法。

3.3 主成分分析

体现了降维思想的主成分分析(PCA),选取



1 - 10. 多花黄精(*Polygonatum cyrtoneuma* Hua) 11 - 15. 滇黄精(*Polygonatum kingianum* Coll. et) 16 - 20. 黄精(*Polygonatum sibiricum* Red)

图 4 20 批黄精多糖 HCA 树状关系

Fig. 4 HCA dendrogram relationship of 20 batches of *Polygonati Rhizoma* polysaccharide

贡献率较大的成分进行分析,既简化了分析过程,又尽可能多地展现了原始信息^[9]。将 20 批次样品的 17 个共有峰峰面积导入 SPSS 23. 软件,进行 PCA,特征值和方差贡献率如表 3 所示,碎石图见图 5。以特征值 > 1 为提取标准^[10],提取了 4 个主成分,前 3 个分别占总方差的 50.1%、26.5% 和 9.1%,故选取 3 个主成分进行评价,它代表黄精多糖中 17 个成分量的 85.8% 的信息量,足以评价黄精多糖的品质。将数据矩阵导入 SIMCA 统计软件中,提取了 3 个主成分,该模型中, $R^2 X(\text{cum}) = 0.844$, $Q^2(\text{cum}) = 0.612$,均 > 0.5,说明该 PCA 模型的预测能力越好。黄精多糖的三维 PCA 得分图(图 6)表明,20 批黄精多糖被分为 3 类,与 HCA 结果一致。多花黄精 S1 ~ S10 被聚集为一组,滇黄精 D1 ~ D5 被聚集到另一组,而鸡头黄精 J1 ~ J5 被分到第 3 组。PCA 模型也为 3 种不同基原的黄精提供了令人满意的分类,表明采取酶水解的方法对于黄精多糖进行分析,可以对不同来源的黄精进行很好的鉴别。

3.4 偏最小二乘判别分析

将 20×17 的数据矩阵导入 SIMCA 13 统计软件进行偏最小二乘判别分析(PLS-DA),每个色谱峰对鉴别结果的影响由 VIP(投影中的变量重要性)值确定。该模型中, $R^2 X(\text{cum}) = 0.909$, $R^2 Y(\text{cum}) = 0.863$, $Q^2(\text{cum}) = 0.775$, $R^2 Y$ 和 Q^2 的值

表 3 特征值和方差贡献率

Tab. 3 Characteristic value and variance contribution rate

成分 (principal component)	初始特征值(initial eigenvalue)			提取载荷平方和(extraction sums of squared loadings)		
	总计 (total)	方差百分比 (variance percentage)	累积 (accumulate)	总计 (total)	方差百分比 (variance percentage)	累积 (accumulate)
1	8.522	50.129	50.129	8.522	50.129	50.129
2	4.519	26.580	76.709	4.519	26.580	76.709
3	1.553	9.135	85.844	1.553	9.135	85.844
4	1.129	6.638	92.482	1.129	6.638	92.482
5	0.543	3.193	95.675			
6	0.317	1.867	97.542			
7	0.144	0.849	98.391			
8	0.102	0.599	98.990			
9	0.078	0.457	99.447			
10	0.042	0.248	99.695			
11	0.020	0.116	99.811			
12	0.017	0.100	99.911			
13	0.007	0.038	99.949			
14	0.004	0.025	99.974			
15	0.003	0.018	99.992			
16	0.001	0.007	99.999			
17	9.277×10^{-5}	0.001	100.000			

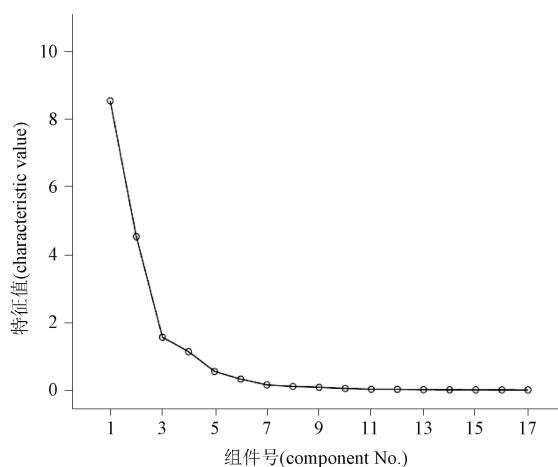


图 5 20 批黄精多糖碎石图

Fig. 5 Scree plot of 20 batches of Polygonati Rhizoma polysaccharide

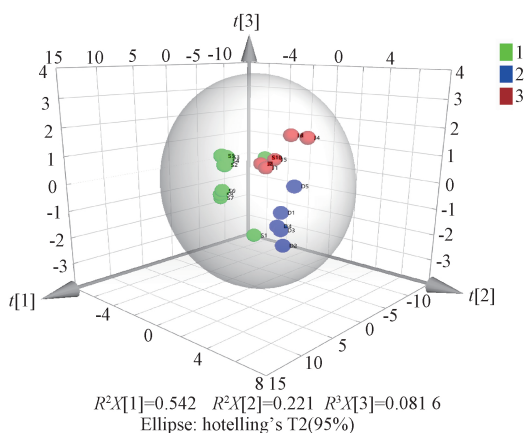
以 >0.5 为宜,且 R^2Y 和 Q^2 的值越趋近于 1,说明该 PLS-DA 模型的预测能力越好^[11]。分析结果如图 7 所示,分类结果与 HCA 和 PCA 相一致。图 8 反映了该模型的 VIP 值, VIP 值的大小表示的是每个

自变量贡献的大小,以 $VIP > 1$ 为筛选标准,得出导致品种间差异的标志性成分。从 VIP 值可知,色谱峰 1、4、5、7 和 8 的 VIP 值都 > 1 ,说明上述 5 个色谱峰对 PLS-DA 模型的判别分析具有较大的贡献。

4 讨论

根据文献调研发现,部分酸水解已广泛应用于中药多糖的降解^[12-13],但基于酶解的方式对中药多糖进行研究更具方向性、目的性和可控性^[14],在分析多糖的糖苷键类型、构建糖谱以及构效关系研究等方面具有显著优势。虽也存在反应条件要求较高,反应时间长,合适的酶不易获取等问题,但是现已完成适用于黄精多糖的特异性糖苷酶筛选以及酶解条件的优化,且还没有基于酶解法对于不同品种黄精多糖研究的报道。黄精基原混乱的主要原因是目前市售黄精多出自于人工栽培,性状往往与基原物种极其相似。

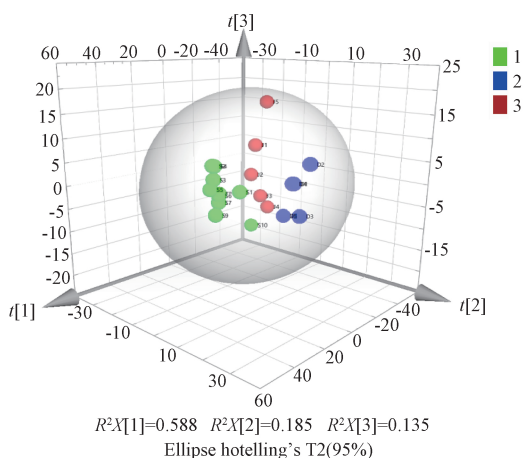
本实验采用果糖苷酶对于黄精多糖展开研究,



1. 多花黄精 (*Polygonatum cyrtoneuma* Hua) 2. 滇黄精 (*Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.) 3. 黄精 (*Polygonatum sibiricum* Red)

图 6 20 批黄精多糖 PCA 三维投影

Fig. 6 PCA 3D projection of 20 batches of *Polygonati Rhizoma polysaccharide*

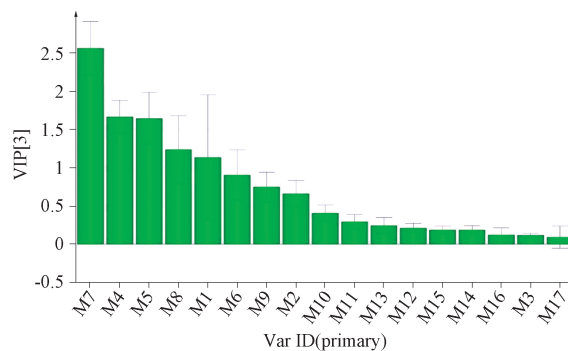


1. 多花黄精 (*Polygonatum cyrtoneuma* Hua) 2. 滇黄精 (*Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.) 3. 鸡头黄精 (*Polygonatum sibiricum* Red)

图 7 20 批黄精多糖偏最小二乘判别分析图

Fig. 7 Partial least squares discriminant analysis of 20 batches of *Polygonati Rhizoma polysaccharide*

通过相似度评价鉴别不同品种黄精之间的差异,结果表明果糖苷酶水解下 3 种基原黄精的种内指纹色谱相似度较高,差异较小,而种间差异较大。特别是以多花黄精为对照图谱时结果较为明显,滇黄精和黄精与其相比,除 1 批滇黄精(D1)样品外,相似度均 < 0.85。而市场上的易混品相较于多花黄精对照图谱而言,分布较为离散,其中湖北黄精相似度在 0.44 ~ 0.95,这可能是由于市场上存在多花黄精掺伪湖北黄精的情况。四川黄精除 1 批(C4)外,相似度均 < 0.86,提示四川黄精与多花黄精依旧存在



M1 - M17. 峰 1 ~ 17 (peak 1 - 17)

图 8 20 批黄精多糖的 VIP 图

Fig. 8 VIP diagram of 20 batches of *Polygonati Rhizoma polysaccharide*

差异,故而市场上将其与多花黄精混为一谈的说法有待进一步验证。此外,进口黄精相似度均 < 0.82,小叶黄精相似度均 < 0.5,表明不同黄精多糖的结构特征不同。此方法一定程度上解决了目前市场上对于四川黄精、湖北黄精等黄精易混品鉴别困难等问题。

本实验在仪器的使用方面,选择了灵敏的蒸发光检测器,更适用于对于多糖中寡糖片段的分离^[15]。通过进一步与 HILIC 色谱柱相结合,最终黄精多糖指纹图谱可达到 17 个色谱峰,对于大分子糖的研究有了新的突破,通过定位酶切技术成功得到特异性寡糖片段。后续对于药典收录的黄精品种,采用化学计量学分析,通过 PCA 发现,采用果糖苷酶可以很好地按照黄精种类的不同将其进行分类,而 VIP 值结果表明,峰 1、4、5、7 和 8 可以作为区分不同品种黄精的标志物,这也再次验证了采用酶解方法结合 HPLC 分析黄精多糖的可行性,进一步推动黄精多糖的研究应用与快速发展。

参考文献

[1] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 319
ChP 2020. Vol I [S]. 2020: 319

[2] 王慧,袁德培,曾楚华,等. 黄精的药理作用及临床应用研究进展[J]. 湖北民族学院学报(医学版), 2017, 34(2): 58
WANG H, YUAN DP, ZENG CH, et al. Pharmacological action and clinical application of *Polygonatum sibiricum* [J]. J Hubei Univ Nat (Med Ed), 2017,34 (2): 58

[3] 黄瑶,石林. 黄精的药理研究及其开发利用[J]. 华西药学期刊, 2002,17 (4): 278
HUANG Y, SHI L. Pharmacological research and utilization of *Polygonatum sibiricum* [J]. West Chin J Pharm J, 2002,17 (4): 278

[4] 陈辉,冯珊珊,孙彦君,等. 3 种药用黄精的化学成分及药理

- 活性研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(15): 2329
CHEN H, FENG SS, SUN YJ, *et al.* Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Polygonatum sibiricum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2015, 46(15): 2329
- [5] 姜程曦, 张铁军, 陈常青, 等. 黄精的研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中草药, 2017, 48(1): 1
JIANG CX, ZHANG TJ, CHEN CQ, *et al.* Research progress of *Polygonatum* and prediction analysis of its quality markers [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2017, 48(1): 1
- [6] 杜泽飞, 陶爱恩, 夏从龙, 等. 基于 PMP-HPLC 和化学计量学的黄精基原物种多糖差异分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15): 25
DU ZF, TAO AE, XIA CL, *et al.* Approach based on PMP-HPLC fingerprint and chemometrics to compare difference of polysaccharide in *Polygonati Rhizoma* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2019, 25(15): 25
- [7] 秦垂新, 曹子丰, 黄绮敏, 等. 黄精多糖水解物柱前衍生 HPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(11): 65
QIN CX, CAO ZF, HUANG QM, *et al.* Pre-column derivatives HPLC fingerprint of *Polygonati Rhizoma* polysaccharide hydrolysate [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2015, 21(11): 65
- [8] 王海洋, 高阳, 高其品, 等. 黄精多糖的柱前衍生化 HPLC 指纹图谱研究[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(13): 3462
WANG HY, GAO Y, GAO QP, *et al.* Study on pre-column derivatives HPLC fingerprint of *Polygonati polysaccharide* [J]. *Hubei Agric Sci*, 2016, 55(13): 3462
- [9] KANDASAMY S, YOO J, YUN J, *et al.* ¹H HRMAS-NMR based metabolic fingerprints for discrimination of cheeses based on sensory qualities[J]. *Biol Sci*, 2020, 27(6): 1446
- [10] LI YQ, KONG DX, WU H. Comprehensive chemical analysis of the flower buds of five *Lonicera species* by ATR-FTIR, HPLC-DAD, and chemometric methods [J]. *Rev Bras Farmacogn*, 2018, 28(5): 533
- [11] ZHAO H, LAI CJ, YU Y, *et al.* Acidic hydrolysate fingerprints based on HILIC-ELSD/MS combined with multivariate analysis for investigating the quality of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 163(6): 476
- [12] 席璟睿, 张懿琳, 吴梦琪, 等. 基于化学计量学的枸杞多糖部分酸水解产物 PMP-HPLC 指纹图谱[J]. 食品工业科技, 2021, 42(18): 268
XI JR, ZHANG YL, WU MQ, *et al.* PMP-HPLC fingerprint of partial acid hydrolysate of *Lycium barbarum* polysaccharides based on the chemometric methods [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021, 42(18): 268
- [13] XIA YG, YU SM, LIANG J, *et al.* Chemical fingerprinting techniques for the differentiation of polysaccharides from genus *Astragalus* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 178(9): 112898
- [14] 高艳艳, 祝琳琳, 李想, 等. 酸水解和酶水解在多糖研究中的应用进展[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(5): 142
GAO YY, ZHU LL, LI X, *et al.* Application progress of acid hydrolysis and enzyme hydrolysis in the study of polysaccharides. [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2022, 40(5): 142
- [15] LEIJDEKKERS AG, SANDERS MG, SCHOLS HA, *et al.* Characterizing plant cell wall derived oligosaccharides using hydrophilic interaction chromatography with mass spectrometry detection [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(51): 922

(本文于 2023 年 6 月 19 日收到)