基于糖谱法的清半夏多糖多元指纹图谱构建及质量评价

刘玉杰[1, 2, 3, 4]，彭　溪[1, 2, 3, 4]，王治焜[1, 2, 3, 4]，岳廉焘[1, 2, 3, 4]，邓巧玲[1, 2, 3, 4]，柳　彤[1, 2, 3, 4]，裴　科[1, 2, 3, 4]，张朔生[1, 2, 3, 4]，胡美变[1, 2, 3, 4*]

1. 山西中医药大学中药与食品工程学院，山西 晋中　030619
2. 山西中药炮制技术传承基地，山西 晋中　030619
3. 中药炮制山西省重点实验室，山西 晋中　030619
4. 中药材加工炮制传承与创新研究室，山西 晋中　030619

摘　要：目的　采用糖谱法，通过完全酸水解、部分酸水解和果胶酶酶解建立不同批次清半夏多糖的单糖组成和寡糖组成指纹图谱，为其质量评价提供新的思路与方法。**方法**　收集 26 批清半夏，提取非淀粉多糖。多糖经完全酸水解后，1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮（1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone，PMP）衍生化-HPLC 法建立指纹图谱，色谱条件：ODS-AQ C_{18} 色谱柱，流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液（pH 6.8）（18∶82）等度洗脱，体积流量为 1.0 mL/min，进样体积为 10 μL，柱温为 30 ℃，检测波长为 245 nm。多糖采用部分酸水解和果胶酶酶解后，HILIC-HPLC-ELSD 法建立指纹图谱，色谱条件：Pei HILIC 色谱柱，流动相为乙腈-水，梯度洗脱：0～25 min，85%～65%乙腈；25～40 min，65%～50%乙腈；体积流量 1.0 mL/min，柱温 35 ℃，进样量 10 μL。ELSD 漂移管温度 115 ℃，载气体积流量 3.2 L/min。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统分析，并结合化学计量学分析样品间的差异。**结果**　单糖组成指纹图谱分析结果表明，样品相似度在 0.781～1.000，化学计量学分析表明样品分类与药材产地有潜在的相关性，筛选出 *L*-鼠李糖、*D*-甘露糖、*D*-半乳糖醛酸、*D*-葡萄糖为潜在差异标记物。寡糖指纹图谱分析结果显示，部分酸水解指纹图谱相似度为 0.888～1.000，层次聚类分析（hierarchical cluster analysis，HCA）和主成分分析（principal component analysis，PCA）结果表明，甘肃与河北样品聚为一类，河南、四川、山西样品聚为另一类，甘肃 S11 号样品独立成类；变量重要性投影（variable importance projection，VIP）筛选出 DP6、DP7、DP1 和 DP5 作为潜在差异标记物。果胶酶酶解样品的指纹图谱相似度 0.991～1.000，比部分酸水解一致性更好，进一步分析结果表明，甘肃和河南样品均呈现跨类分布；VIP 值筛选得到 DP5、DP2 和 DP4 作为潜在差异标记物。**结论**　基于糖谱法建立的多糖的单糖和寡糖指纹图谱分析方法稳定、可靠，可为清半夏的质量评价提供重要依据。

关键词：清半夏；多糖；指纹图谱；单糖组成；寡糖；果胶酶；糖谱法；鼠李糖；甘露糖；半乳糖醛酸；葡萄糖

中图分类号：R283.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2026)21 - 8458 - 13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.21.007

Construction of multivariate fingerprints of polysaccharides from *Pinelliae Rhizoma Praeparatum* cum *Alumine* based on sugar profiling method and quality evaluation

LIU Yujie[1, 2, 3, 4], PENG Xi[1, 2, 3, 4], WANG Zhikun[1, 2, 3, 4], YUE Liantao[1, 2, 3, 4], DENG Qiaoling[1, 2, 3, 4], LIU Tong[1, 2, 3, 4], PEI Ke[1, 2, 3, 4], ZHANG Shuosheng[1, 2, 3, 4], HU Meibian[1, 2, 3, 4]

1. College of Traditional Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China
2. Shanxi Traditional Chinese Medicine Processing Technology Inheritance Base, Jinzhong 030619, China
3. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Processing in Shanxi Province, Jinzhong 030619, China
4. Inheritance and Innovation Research Laboratory of Traditional Chinese Medicine Processing, Jinzhong 030619, China

收稿日期：2026-06-10

基金项目：国家自然科学基金项目（82104547）；山西省科技厅基础研究计划面上项目（202503021211214）；山西省高等学校青年学术带头人项目（2024Q029）；山西省科技厅青年创新人才团队（202304051001044）；山西中医药大学“杏林英才计划”科技创新领域人才项目（2025XK09）；山西中医药大学“杏林英才计划”科技创新领域人才项目（2025XK13）；山西中医药大学科技创新能力培育计划“基础与临床合作研究专项”（2024PY-JL-3-01）；山西中医药大学科技创新能力培育计划“基础与临床合作研究专项”（2024PY-JL-3-02）

作者简介：刘玉杰，副教授，研究方向为中药炮制原理与物质基础。E-mail: liu-1567@163.com

***通信作者：**胡美变，女，副教授，硕士生导师，从事中药炮制原理与物质基础研究。E-mail: hmbcdtcm@163.com

Abstract: Objective To establish monosaccharide and oligosaccharide fingerprints of polysaccharides from different batches of Qingbanxia (*Pinelliae Rhizoma Praeparatum* cum *Alumine*, PRPCA) using sugar profiling method, including complete acid hydrolysis, partial acid hydrolysis, and pectinase digestion, thereby providing a new ideas and methods for the quality evaluation of PRPCA. **Methods** Non-starch polysaccharides were extracted from 26 batches of PRPCA. For monosaccharide fingerprinting, the polysaccharides were subjected to complete acid hydrolysis followed by 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) pre-column derivatization and HPLC analysis. The separation was performed on an ODS-AQ C_{18} column with isocratic elution using acetonitrile-0.05 mol/L phosphate buffer (pH 6.8) (18:82) at a flow rate of 1.0 mL/min. The injection volume was 10 μL, column temperature was 30 ℃, and detection wavelength was 245 nm. For oligosaccharide fingerprinting, polysaccharides were treated by partial acid hydrolysis or pectinase digestion, and then analyzed by HILIC-HPLC-ELSD on a Pei HILIC column with gradient elution (0—25 min, 85%—65% acetonitrile; 25—40 min, 65%—50% acetonitrile) at 1.0 mL/min, column temperature of 35 ℃, and injection volume of 10 μL. The ELSD drift tube temperature was set at 115 ℃ with a gas flow rate of 3.2 L/min. The differences between samples were analyzed by using the similarity evaluation system of chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine, and combined with chemometrics. **Results** The results of monosaccharide fingerprint analysis showed that the sample similarity ranged from 0.781 to 1.000. Chemometric analysis revealed a potential correlation between sample clustering and geographic origin. *L*-Rhamnose, *D*-mannose, *D*-galacturonic acid, and *D*-glucose were identified as potential differential markers. For the partial acid hydrolysis-derived oligosaccharide fingerprints, similarities ranged from 0.888 to 1.000. Hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) showed that samples from Gansu and Hebei clustered together, while those from Henan, Sichuan, and Shanxi formed another cluster, the Gansu S11 sample was distinctly separated. DP6, DP7, DP1, and DP5 were screened as potential differential markers via variable importance projection (VIP) analysis. The similarity of the fingerprint spectra of the samples hydrolyzed by pectinase ranged from 0.991 to 1.000, which was better than the consistency of partial acid hydrolysis. Further analysis indicated cross-cluster distribution of samples from Gansu and Henan. DP5, DP2, and DP4 were identified as potential differential markers based on VIP values. **Conclusion** The established monosaccharide and oligosaccharide fingerprint based on sugar profiling method is stable and reliable, offering a robust basis for the quality evaluation of PRPCA.

Key words: *Pinelliae Rhizoma Praeparatum* cum *Alumine*; polysaccharides; fingerprints; monosaccharide composition; oligosaccharides; pectinase; sugar profiling method; rhamnose; mannose; galacturonic acid; glucose

半夏为天南星科半夏属植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.的干燥块茎，具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结之功效[1]。因其有毒，内服一般经炮制后使用。清半夏是半夏主要的炮制品之一，采用辅料白矾经浸泡或煮制而成，炮制后长于燥湿化痰[2]。据报道，半夏中含有蛋白类、有机酸类、生物碱类、黄酮类、苯丙素类、萜类、甾体、苷类及多糖类等多种成分[3-5]，但其功效相关的物质基础一直未有定论，这也为其质量评价与控制带来了一定的困难。《中国药典》2025 年版对清半夏的质量控制仍以外观性状、水分、灰分及白矾残留量等常规指标为主[6]，缺乏特异性的评价指标，难以全面反映其内在品质及炮制品特点，亟需建立更有效的质量评价方法。现代研究表明，半夏中多糖类成分具有抗炎、免疫调节、抗肿瘤等多种生物活性[7]。本课题组前期也经过研究，优化了清半夏多糖的提取方法，明确了其单糖组成、相对分子质量分布及红外光谱等结构特征，发现清半夏多糖具有抗氧化、抗炎、调节肠道菌群等活性[8-10]，是其功效相关的重要物质基础之一。然而，目前尚无基于多糖类成分的清半夏质量评价方法。

多糖由于结构复杂、相对分子质量大且极性强，传统的检测难以有效表征其整体结构特征，从而限制了其在质量评价中的应用。赵宁等[11]总结了中药多糖结构表征及质量评价研究进展，发现目前基于多糖类成分的中药质量评价，主要包括定量分析和定性分析 2 个方面。其中，定量分析主要包括多糖含量测定及水解后的单糖的含量测定，定性分析主要依靠中药多糖指纹图谱，基于多糖整体结构特征和单糖组成进行构建。然而，由于多糖在中药中普遍存在，仅依靠含量测定并不能有效评价其质量。基于高效凝胶排阻色谱等技术的多糖整体结构特征指纹图谱，呈现出的多糖谱图过于简单，无法体现多糖之间的细微差别。单糖组成分析虽能提供一定结构信息，但不同来源甚至不同物种的多糖往往具有相似的组成单糖，单糖物质的量比虽然有所差异，却难以成为中药质量评价的刚性质控指标[12]。综上，无论是多糖含量测定、单糖组成分析，还是基于相对分子质量分布或单糖组成的指纹图谱，这些定量、定性方法均明显缺乏专属性，亟需建立新

的专属性更强、适用于多糖类成分的中药质量评价方法。

糖谱法是通过酸水解或特异性糖苷酶酶解结合多种色谱、波谱分析技术实现了对多糖的定性、定量分析的方法，可从整体上分析多糖的结构特征，具有特异性强、选择性高等特点[13]。本课题组前期已通过糖谱法分析了半夏炮制前后多糖结构特征[14]，明确了其所含的糖苷键类型，并发现炮制前后糖谱特征存在显著差异，为半夏及其炮制品的质量评价提供了新的思路。在此基础上，本研究收集了 26 批不同产地的清半夏样品，提取其非淀粉多糖，基于糖谱法的思路，分别采用完全酸水解、部分酸水解及果胶酶酶解处理，结合 HPLC 法建立单糖组成及寡糖组成指纹图谱，并运用相似度评价及化学计量学方法分析批次间差异，筛选差异标志物，旨在建立基于糖谱法的清半夏多糖多元指纹图谱质量控制方法，为其质量评价提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

U3000 型高效液相色谱系统、Hypersil Gold™ Pei HILIC HPLC 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），赛默飞世尔科技有限公司；LC-2050C 3D 型岛津液相色谱仪，日本岛津公司；2000ES 型蒸发光散射检测器，美国奥泰科技有限公司；RE-52AA 型旋转蒸发器，上海亚荣生化仪器厂；SB-5200 DTDN 型超声波清洗机，宁波新芝生物科技股份有限公司；SP ODS-AQ C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），北京慧德易科技有限责任公司；HC-2518 型高速离心机，湖南湘立科学仪器有限公司；FD-I-50 型冷冻干燥机，北京博医康实验仪器有限公司。

1.2 材料

收集和制备了 26 批（S1～S26）不同产地的清半夏饮片，其中 13 批（S1～S13）为白矾浸泡法炮制，13 批（S14～S26）为白矾煮制法炮制。自制样品按照《中国药典》2025 年版中清半夏炮制方法制备。取净半夏，大小分开，用 8%白矾溶液浸泡或煮至内无干心，口尝微有麻舌感，取出，洗净，切厚片，干燥。每 100 千克净半夏，煮法用白矾 12.5 kg，浸泡法用白矾 20 kg。以上样品均经山西中医药大学张朔生教授鉴定为天南星科半夏属植物半夏 *P. ternata* (Thunb.) Breit.的干燥块茎炮制加工成的清半夏饮片。具体信息见表 1。

表 1 清半夏样品信息

Table 1 Information of *Pinelliae Rhizoma Praeparatum* cum *Alumine* (PRPCA) samples

编号	样品名称	产地	炮制方法	来源	生产批号
S1	自制 1-P	甘肃	浸泡	自制	−
S2	自制 2-P	甘肃	浸泡	自制	−
S3	甘肃 1-P	甘肃	浸泡	四川新荷花中药饮片股份有限公司	D2206062
S4	甘肃 2-P	甘肃	浸泡	四川新荷花中药饮片股份有限公司	D2206065
S5	甘肃 3-P	甘肃	浸泡	四川新荷花中药饮片股份有限公司	D2206068
S6	河南 1-P	河南	浸泡	郑州瑞龙制药股份有限公司	22090402
S7	河南 2-P	河南	浸泡	郑州瑞龙制药股份有限公司	21110107
S8	河北 1-P	河北	浸泡	河北仁心药业有限公司	D01822025
S9	河北 2-P	河北	浸泡	河北仁心药业有限公司	D01822027
S10	甘肃 4-P	甘肃	浸泡	山西元和堂中药有限公司	201101
S11	甘肃 5-P	甘肃	浸泡	山西元和堂中药有限公司	210401
S12	市售 1-P	四川	浸泡	市售	−
S13	市售 2-P	四川	浸泡	市售	−
S14	自制 1-Z	甘肃	煮制	自制	−
S15	自制 2-Z	甘肃	煮制	自制	−
S16	甘肃 1-Z	甘肃	煮制	四川新荷花中药饮片股份有限公司	D2110062
S17	甘肃 2-Z	甘肃	煮制	四川新荷花中药饮片股份有限公司	D2110064
S18	甘肃 3-Z	甘肃	煮制	四川新荷花中药饮片股份有限公司	D2110066
S19	山西 1-Z	山西	煮制	河南华夏药材有限公司	230201
S20	山西 2-Z	山西	煮制	河南华夏药材有限公司	220401
S21	河南 1-Z	河南	煮制	郑州瑞龙制药股份有限公司	23010201
S22	河南 2-Z	河南	煮制	郑州瑞龙制药股份有限公司	23010301
S23	甘肃 4-Z	甘肃	煮制	四川麒源药业有限责任公司	220601
S24	甘肃 5-Z	甘肃	煮制	四川麒源药业有限责任公司	230101
S25	市售 1-Z	河北	煮制	市售	−
S26	市售 2-Z	河北	煮制	市售	−

1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮（1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone，PMP，批号 3884-2010）、三氟乙酸（trifluoroacetic acid，TFA，批号 C12188857），上海麦克林生化科技有限公司；果胶酶（40 U/mg）及对照品麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽七糖，批号分别为 115D0212、428E022、0910E022、301G021、34620763、34620774、34620785，北京索莱宝科技有限公司；对照品 *D*-甘露糖、*L*-鼠李糖、*D*-半乳糖醛酸、*D*-葡萄糖、*D*-半乳糖、*L*-阿拉伯糖，批号分别为 V9DJ-AZ9F、UVDY-SNPA、VAA3-B765、FQ3K-U29E、1314-FGZW、1506-200202，中国食品药品检定研究院；α-淀粉酶（100.000 kU/g，批号 M07GS147286）、MD44 透析袋（截留相对分子质量 3 000，批号 JM247213），上海源叶生物科技有限公司；其他试剂均为分析纯；所有对照品质量分数均≥97.0%。

2 方法与结果

2.1 清半夏多糖的制备

采用本课题组前期研究确定的工艺提取清半夏多糖[14]。取清半夏饮片粉末，加 95%乙醇脱去色素和小分子杂质后，滤过。滤渣自然干燥，加 30 倍量水，60 ℃超声提取 45 min。提取液滤过，滤液加低温淀粉酶（20 U/mL），40 ℃孵育 16 h。取适量多糖溶液，加入碘-碘化钾试液，混匀后观察颜色，溶液不显蓝色或蓝紫色，即无淀粉残留。煮沸灭活淀粉酶，抽滤，浓缩，加 4 倍量无水乙醇，4 ℃沉淀过夜。沉淀加水复溶，透析 48 h，取透析袋内的溶液冷冻干燥，得到非淀粉多糖，即为清半夏多糖。按照上述方法，将 26 批清半夏饮片（S1～S26）制备成对应的 26 批清半夏多糖（P1～P26），备用。

2.2 基于 PMP 衍生化-HPLC 单糖指纹图谱研究

2.2.1 单糖混合对照品溶液的制备 取 *D*-甘露糖、*L*-鼠李糖、*D*-半乳糖醛酸、*D*-葡萄糖、*D*-半乳糖和 *L*-阿拉伯糖 6 种单糖对照品分别配制成 5 mg/mL 溶液，取等体积溶液混合并定容，使其单糖混合对照品溶液中各单糖终质量浓度均为 0.5 mg/mL。

2.2.2 供试品溶液的制备 采用本课题组前期研究建立的方法[13]，取 10 mg 多糖，用 8 mL TFA 溶液（2 mol/L）溶解，在 110 ℃水解 5 h 后，取出，放至室温，离心，上清液蒸干。残渣加 5 mL 甲醇洗涤，重复 5 次，以去除残留的 TFA，最后用 2 mL 水进行复溶。对供试品溶液进行 PMP 衍生化后，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，通过 HPLC 进样检测。

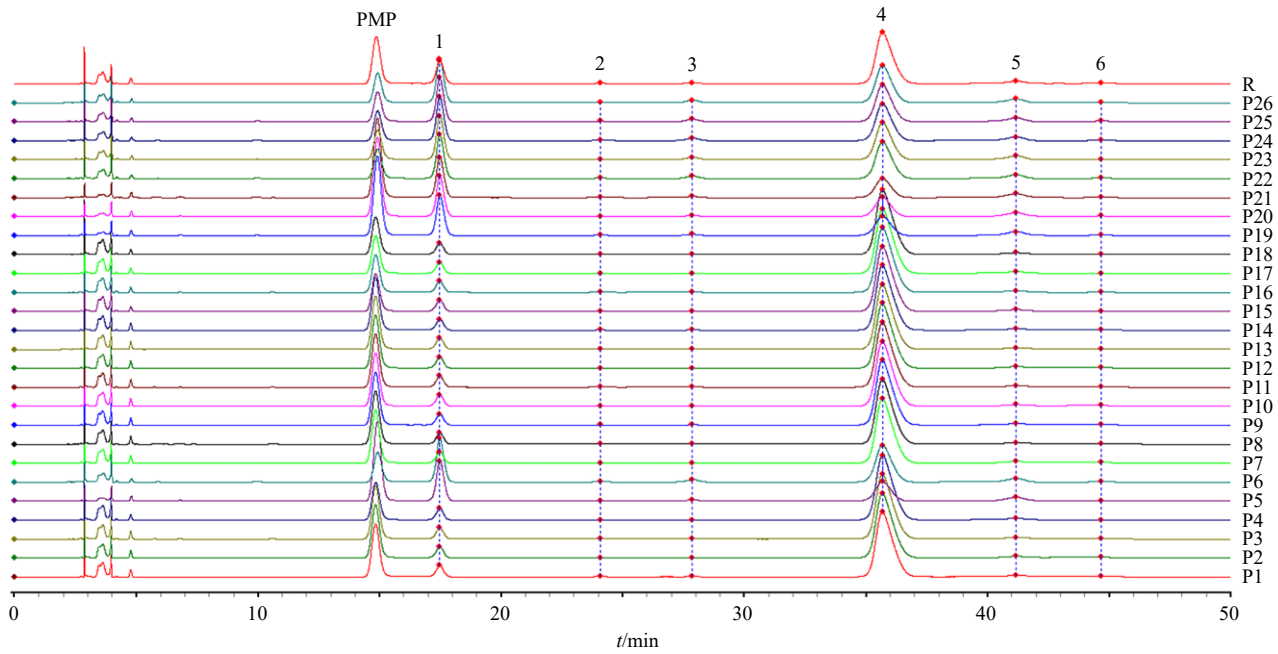
2.2.3 色谱条件 采用 U-3000 高效液相色谱仪和 SP ODS-AQ C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液（PBS，pH 6.8），按照 18∶82 的体积比等度洗脱，体积流量为 1.0 mL/min，进样体积为 10 μL，柱温为 30 ℃，检测波长为 245 nm。

2.2.4 精密度试验 取多糖样品（P18），按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2.3”项色谱条件下连续进样检测 6 次，记录各种单糖的峰面积和保留时间，并计算其 RSD 值。结果 *D*-甘露糖、*L*-鼠李糖、*D*-半乳糖醛酸、*D*-葡萄糖、*D*-半乳糖、*L*-阿拉伯糖峰面积的 RSD 值分别为 0.99%、2.10%、2.63%、0.14%、0.21%、0.59%，均＜3%；相对保留时间的 RSD 值分别为 0.49%、0.25%、0.26%、0.11%、0.16%、0.09%，均＜3%；结果表明，该仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 取多糖样品（P18），按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2.3”项色谱条件下分别在制备后 0、4、8、12、16、24 h 进行检测，记录各种单糖的峰面积和保留时间，并计算其 RSD 值。结果 *D*-甘露糖、*L*-鼠李糖、*D*-半乳糖醛酸、*D*-葡萄糖、*D*-半乳糖、*L*-阿拉伯糖峰面积的 RSD 值分别为 0.43%、2.47%、0.21%、0.34%、0.49%、1.90%，均＜3%；相对保留时间 RSD 值分别为 0.86%、0.35%、0.13%、0.48%、0.29%、0.15%，均＜3%；结果表明，该供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.6 重复性试验 取多糖样品（P18）6 份，精密称定，分别按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2.3”项色谱条件下进行检测，记录各种单糖的峰面积和保留时间，并计算其 RSD 值。结果 *D*-甘露糖、*L*-鼠李糖、*D*-半乳糖醛酸、*D*-葡萄糖、*D*-半乳糖、*L*-阿拉伯糖峰面积的 RSD 值分别为 0.69%、2.71%、2.85%、0.44%、0.83%、0.66%，均＜3%；相对保留时间 RSD 值分别为 0.36%、0.41%、0.24%、0.54%、0.12%、0.18%，均＜3%；结果表明，该实验方法重复性良好。

2.2.7 清半夏多糖单糖组成 HPLC 指纹图谱的建立与分析 按照“2.2.2”项下方法制备 26 批次清半夏多糖（P1～P26）样品溶液，在“2.2.3”项色谱条件下进样检测，获得不同批次清半夏多糖样品的色谱图，并利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）进行分析。选取 P1 样品的色谱图作为参照图谱，采用中位数多点校正法进行峰匹配分析，设定时间窗宽度为 0.1 min，生成对照指纹图谱（R），26 批清半夏多糖（P1～P26）单糖组成及其对照指纹图谱如图 1 所示，P1～P26 单糖组成指纹图谱与其 R 的相似度评价结果分别为 0.999、0.999、0.781、0.927、1.000、0.996、0.996、0.994、1.000、0.997、0.784、0.997、0.998、0.996、0.992、0.953、0.979、0.996、0.996、0.993、0.995、0.999、0.998、0.989、0.994、1.000。不同批次清半夏多糖的单糖组成相似度在 0.781～1.000，除 P3、P11 号样品外，其他样品的相似度较高（均＞0.9）。P3、P11 号样品与其余样品相比，*D*-甘露糖和 *D*-半乳糖的比例相对较高，*D*-葡萄糖的比例相对较低，因此相似度偏低（仅为 0.781 和 0.784）。清半夏多糖的单糖组成指纹图谱含 6 个共有峰，通过与单糖对照品图谱（图 2）比对，分别为 *D*-甘露糖、*L*-鼠李糖、*D*-半乳糖醛酸、



1-*D*-甘露糖；2-*L*-鼠李糖；3-*D*-半乳糖醛酸；4-*D*-葡萄糖；5-*D*-半乳糖；6-*L*-阿拉伯糖；图 2 同。

1-*D*-mannose; 2-*L*-rhamnose; 3-*D*-galacturonic acid; 4-*D*-glucose; 5-*D*-galactose; 6-*L*-arabinose; Same as figure 2.

图 1　26 批清半夏多糖的单糖组成 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱（R）

Fig. 1　HPLC fingerprint of monosaccharide composition of polysaccharides from 26 batches of PRPCA and their control fingerprint (R)

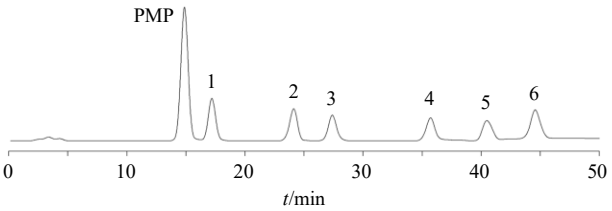


图 2　单糖混合对照品 HPLC 图

Fig. 2　HPLC of monosaccharide mixed reference substances

D-葡萄糖、*D*-半乳糖和 *L*-阿拉伯糖。

2.2.8　基于清半夏多糖单糖组成色谱图的化学计量学分析　采用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件进行层次聚类分析（hierarchical cluster analysis，HCA），提取 26 批清半夏多糖的单糖组成色谱图中的共有峰峰面积数据，获得 6 个共有峰的峰面积，并进行标准化处理构成 26×6 原始峰面积矩阵，采用平方欧氏距离计算样本间距，选择组间联接系统聚类法进行分析。样本同一类别表明它们在单糖组成上具有高度相似性，结果如图 3 所示。当平方欧式距离为 6 时，26 批样品被分为 3 大类：P5、P11、P17、P18 号样品聚为第 1 类，产地为甘肃；P8、P9、P16、P25、P26 号样品聚为第 2 类，产地分别是甘肃、河北；P1～P4、P6、P7、P10、P12～P15、P19～P24 号样品聚为第 3 类，产地分别是甘肃、河南、山西、四川。结果表明，各样品按单糖组成的相似性聚为

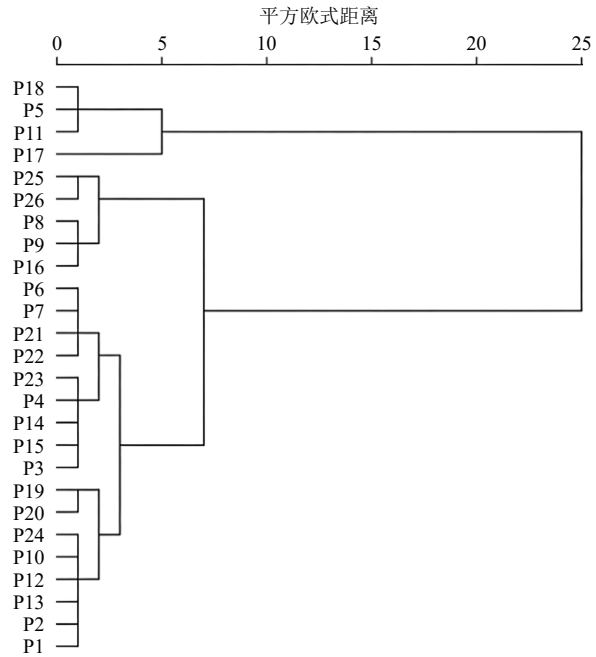


图 3　26 批清半夏多糖单糖组成指纹图谱 HCA

Fig. 3　HCA of monosaccharide composition fingerprints of polysaccharides from 26 batches of PRPCA

3 类，与产地呈现一定的相关性，但未完全对应。不同产地的样品聚为一类，可能与炮制过程的影响有关，尽管产地不同，但炮制后多糖的单糖组成趋于一致；来源于甘肃的样品存在跨类分布，表明同

一产地的样品之间多糖的结构存在多样性。

将原始峰面积矩阵导入 SIMCA 14.1 软件，以自动规格化方式对数据进行处理，处理后的数据作为 *X* 变量。建立主成分分析（principal component analysis，PCA）模型，观察样品分类情况，由软件拟合后自动提取了 2 个主成分，其累积方差贡献率为 64.10%，模型预测指数 Q^2 为 0.213，低于 0.5，表明模型预测能力较弱，这可能是主成分累积方差贡献率偏低，数据波动性较大或样本量不足等原因导致的。绘制得到 PCA 得分图，结果如图 4 所示，结果表明尽管模型整体效能一般，但样品仍可依据产地实现初步聚类划分，其分类趋势与 HCA 结果相一致。因此，为了进一步分析不同批次清半夏多糖的差异性，选择有监督的模型对其进行识别。

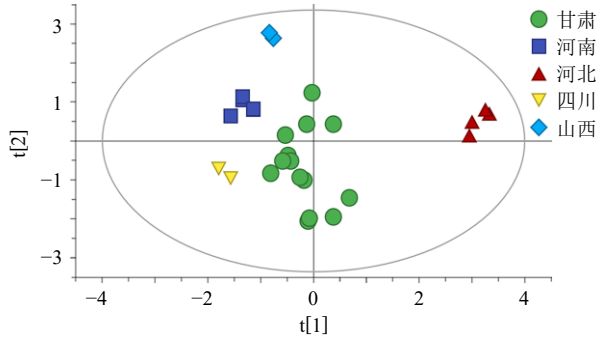


图 4　26 批清半夏多糖单糖组成指纹图谱 PCA

Fig. 4　PCA of monosaccharide composition fingerprints of polysaccharides from 26 batches of PRPCA

使用 SIMCA 14.1 软件，以 6 个共有峰峰面积为 *X* 变量，以不同产地为分组变量（*Y* 变量），建立正交偏最小二乘-判别分析（orthogonal partial least-squares-discrimination analysis，OPLS-DA）模型，并通过 7 折交叉验证评估模型预测能力，模型参数为 R_X^2=0.775，R_Y^2=0.682，Q^2=0.525，R^2 和 Q^2 均大于 0.5，表示模型拟合结果可接受，结果见图 5-A。样品全部分布于 95%置信区间以内，OPLS-DA 模型展现出了明显的分类能力，能够将 26 批次样品区分开。这表明尽管无监督的 PCA 模型在预测能力方面存在局限，但使用有监督学习策略的模型，便可借助类别信息，有效识别并突出样本之间的差异。

设置分类矩阵变量随机排列 200 次置换检验，结果显示，R^2 和 Q^2 拟合线于 *Y* 轴截距分别为 0.104、−0.375，且左侧置换检验所得 Q^2 值均低于右侧原始点，结合交叉验证方差分析（cross-validated analysis of variance，CV-ANOVA）检验结果（F=2.85，P<0.001），表明模型无过拟合现象，且整体具有较高

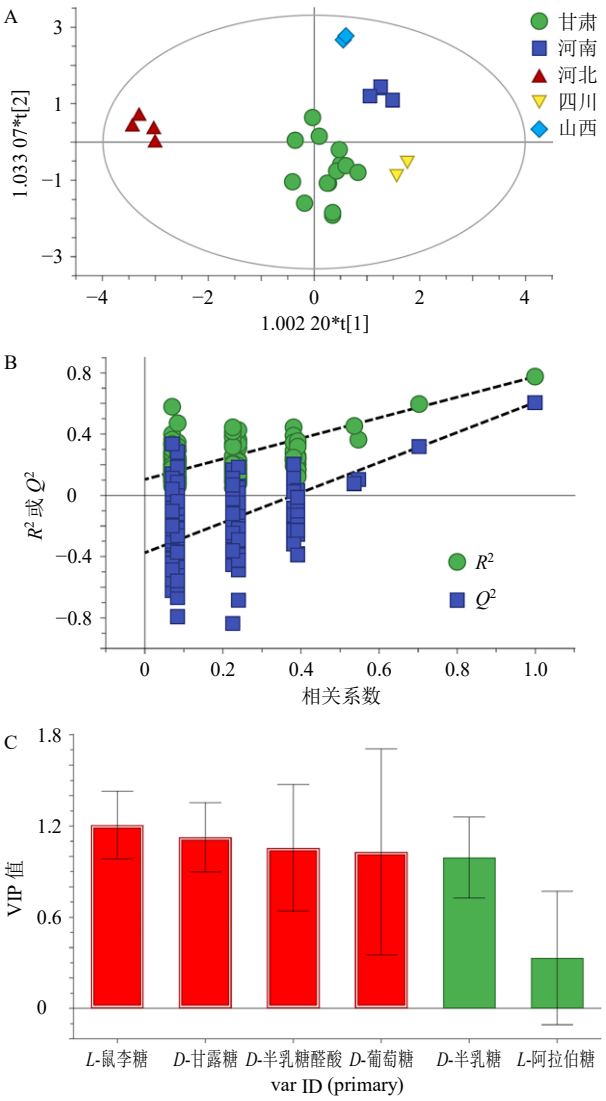


图 5　26 批清半夏多糖单糖组成指纹图谱 OPLS-DA (A) 及其置换检验 (B) 和模型 VIP 分析 (C)

Fig. 5　OPLS-DA (A) and its permutation test (B), model VIP analysis (C) of monosaccharide composition fingerprints of polysaccharides from 26 batches of PRPCA

的统计学显著性，结果见图 5-B。

采用 OPLS-DA 模型中变量重要性投影（variable importance projection，VIP）值＞1 为筛选特征差异变量的判定阈值，发现清半夏多糖的单糖组成有 4 个差异标记物，其影响程度依次为 *L*-鼠李糖＞*D*-甘露糖＞*D*-半乳糖醛酸＞*D*-葡萄糖，这些变量可初步反映批次间差异及潜在产地相关性，结果见图 5-C。

2.3　基于 HILIC-HPLC-ELSD 糖谱指纹图谱研究

2.3.1　清半夏多糖部分酸水解　根据本课题组前期建立的多糖部分酸水解方法[13]，将 26 批次清半夏多糖（P1～P26）用超纯水分别配制成 5 mg/mL 溶

液，按照 1∶1 比例加入 1 mol/L 的 TFA 溶液，80 ℃水浴加热 5 h。蒸干溶剂，用甲醇多次洗涤去除残余的 TFA。残渣加水复溶，冷冻干燥（冷阱温度−45 ℃，真空度＜20 Pa）24 h，即得不同样品多糖的部分酸水解产物（P1a～P26a）。

2.3.2 清半夏多糖果胶酶酶解 根据本课题组前期建立的多糖果胶酶酶解方法[14]，将 26 批次清半夏多糖用超纯水分别配制成 5 mg/mL 溶液，加入果胶酶（终浓度 20 U/mL），37 ℃酶解 16 h，待多糖酶解结束后，煮沸灭活 10 min，4 500×*g* 离心 10 min，取上清液，冷冻干燥，即得不同样品多糖的酶解产物（P1p～P26p）。

2.3.3 寡糖混合对照品溶液的制备 分别称取 *D*-葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖和麦芽七糖对照品，用 50%乙腈溶液配制成 1 mg/mL 的混合对照品溶液，备用。

2.3.4 供试品溶液的制备 称取“2.3.1”和“2.3.2”项中多糖部分酸水解或酶解产物，精密称定，加入 50%乙腈溶液配制成 2 mg/mL 的供试品溶液，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，通过 HILIC-HPLC-ELSD 法进行检测。

2.3.5 HILIC-HPLC-ELSD 分析条件 采用配备有 ELSD 检测器的 LC-2050C 3D 岛津液相色谱仪和 Hypersil Gold™ Pei HILIC HPLC 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-水，梯度洗脱：0～25 min，85%～65%乙腈；25～40 min，65%～50%乙腈；体积流量 1.0 mL/min，柱温 35 ℃，进样量 10 μL。ELSD 漂移管温度 115 ℃，载气体积流量 3.2 L/min。

2.3.6 精密度试验 取部分酸水解的清半夏多糖样品（P2a），根据“2.3.4”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.5”项分析条件下连续检测 6 次，记录各个共有峰的相对保留时间和相对峰面积，并计算其 RSD 值。结果各个共有峰（命名为 DP1～DP7）相对保留时间的 RSD 值分别为 0.97%、0.58%、0.36%、0.26%、0.32%、0.40%、0.18%，均＜3%；相对峰面积的 RSD 值分别为 2.77%、2.30%、2.80%、2.17%、2.74%、2.71%、2.72%，均＜3%；结果表明，该仪器精密度良好。

2.3.7 稳定性试验 取部分酸水解的清半夏多糖样品（P2a），根据“2.3.4”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.5”分析条件下分别在制备后 0、4、8、12、16、24 h 进行检测，记录各个共有峰的相对保留时间和相对峰面积，并计算其 RSD 值。结果各个共有峰（DP1～DP7）相对保留时间的 RSD 值分别为 2.37%、2.13%、1.33%、1.00%、0.66%、0.64%、0.46%，均＜3%；相对峰面积的 RSD 值分别为 2.89%、2.45%、2.48%、2.76%、2.46%、2.92%、2.68%，均＜3%；结果表明该供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.8 重复性试验 取部分酸水解的清半夏多糖样品（P2a）6 份，分别根据“2.3.4”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.5”项分析条件下进行检测，记录各个共有峰的相对保留时间和相对峰面积，并计算其 RSD 值。结果各个共有峰（DP1～DP7）相对保留时间的 RSD 值分别为 0.84%、0.47%、0.31%、0.27%、0.24%、0.30%、0.18%，均＜3%；相对峰面积的 RSD 值分别为 2.63%、1.78%、2.87%、2.16%、2.63%、2.76%、2.23%，均＜3%；结果表明，该实验方法重复性良好。

2.3.9 清半夏多糖部分酸水解样品指纹图谱的建立与分析 将 26 批清半夏多糖部分酸水解所得寡糖样品（P1a～P26a）色谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）。以 P1a 样品为参照，采用中位数多点校正法进行峰匹配，时间窗宽度设为 0.1 min，生成对照指纹图谱（R），26 批清半夏多糖部分酸水解样品（P1a～P26a）色谱指纹图谱和对照指纹图谱（Ra）如图 6 所示，P1a～P26a 样品指纹图谱与其 Ra 的相似度评价结果分别为 1.000、0.997、0.888、0.996、0.963、1.000、0.999、0.998、1.000、1.000、0.969、1.000、1.000、1.000、0.999、1.000、0.993、0.998、1.000、0.999、1.000、0.999、0.999、1.000、0.999、1.000。不同批次的清半夏的多糖部分酸水解样品指纹图谱相似度为 0.888～1.000，结果初步表明，除 P3a（相似度 0.888）外，其他样品的相似度均较高（均＞0.95）。26 批清半夏多糖部分酸水解样品指纹图谱含 7 个共有峰（DP1～DP7），通过与混合对照品（图 7）比对，其分别与 *D*-葡萄糖、麦芽二糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖和麦芽七糖相对应。

2.3.10 基于清半夏多糖部分酸水解样品指纹图谱的化学计量学分析 采用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件进行 HCA，提取 26 批清半夏多糖部分酸水解样品色谱图中共有峰的峰面积，获得 7 个共有峰的峰面积，并进行标准化处理构成 26×7 原始峰面积矩阵，采用平方欧氏距离计算样本间距，选择组间

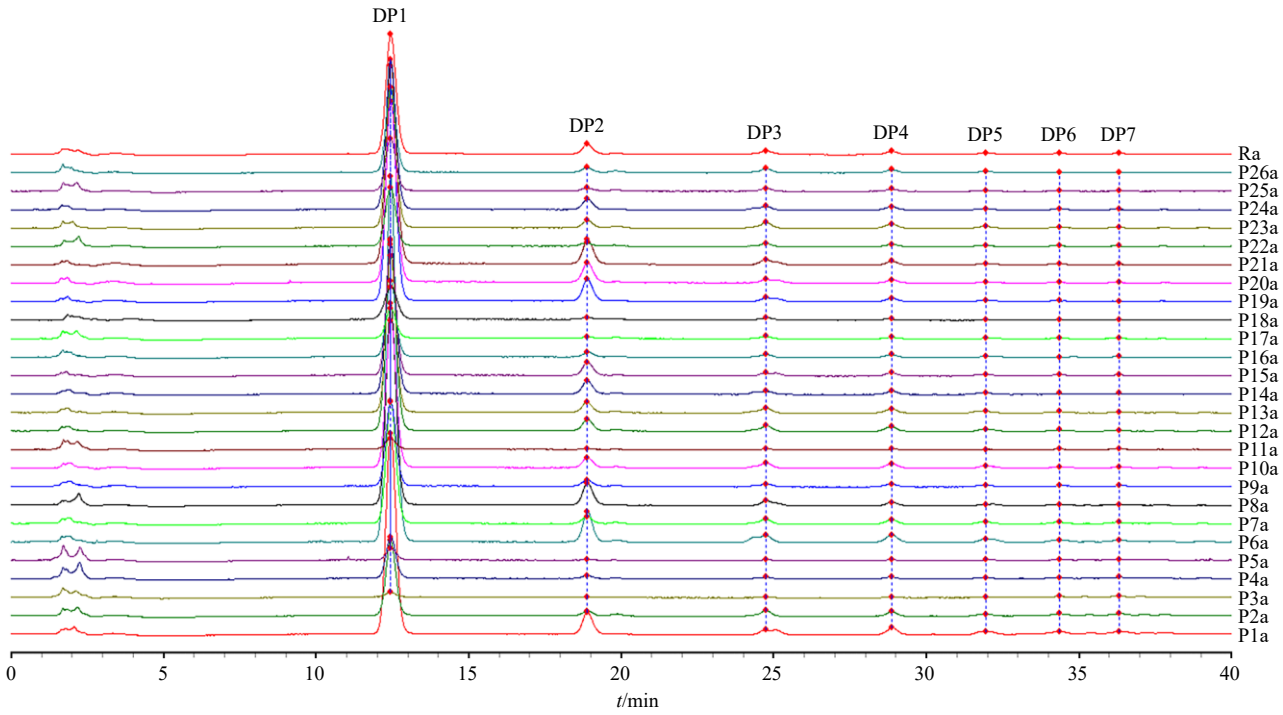
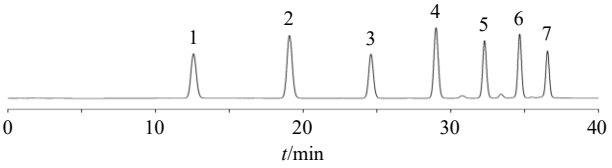


图 6　26 批清半夏多糖部分酸水解样品的 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱（Ra）

Fig. 6　HPLC fingerprints of partially acid-hydrolyzed samples of polysaccharides from 26 batches of PRPCA and their control fingerprint (Ra)



1-葡萄糖；2-麦芽二糖；3-麦芽三糖；4-麦芽四糖；5-麦芽五糖；6-麦芽六糖；7-麦芽七糖。

1-glucose; 2-maltose; 3-maltotriose; 4-maltotetraose; 5-maltopentaose; 6-maltohexaose; 7-maltoheptaose.

图 7　寡糖混合对照品 HPLC 图

Fig. 7　HPLC of oligosaccharide mixed reference substances

联接系统聚类法进行分析，结果见图 8。当平方欧式距离为 10 时，26 批样品被分为 3 大类：P1a～P5a、P8a～P10a、P14a～P18a、P23a、P24a 号样品聚为第 1 类，产地为甘肃、河北；P6a、P7a、P12a、P13a、P19a～P22a 号样品聚为第 2 类，产地分别是河南、四川、山西，表明这些产地的清半夏多糖在部分酸水解寡糖组成上具有一定的相似性；P11a 号样品聚为第 3 类，产地为甘肃，表明与同产地的其他样品在组成上存在一定差异。总之，26 批次清半夏多糖部分酸水解寡糖组成指纹图谱从 HCA 上与产地呈现一定的相关性。

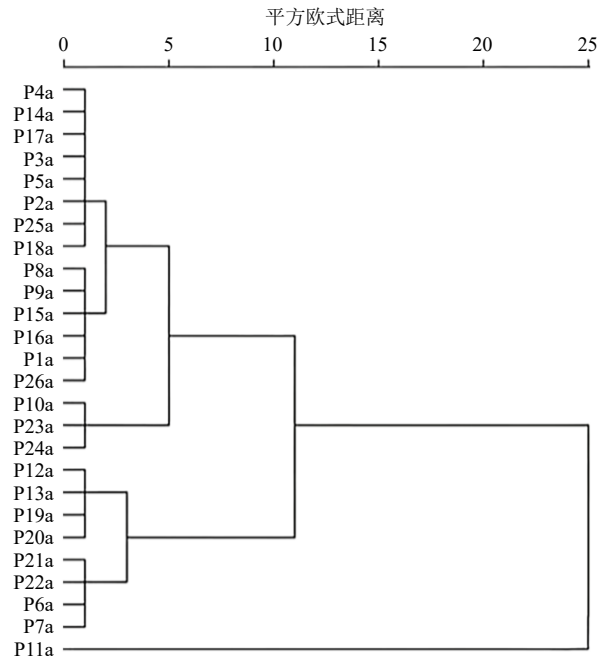


图 8　26 批清半夏多糖部分酸水解样品指纹图谱 HCA

Fig. 8　HCA of fingerprints of partially acid-hydrolyzed samples of polysaccharides from 26 batches of PRPCA

将原始峰面积矩阵导入 SIMCA 14.1 软件，以自动规格化方式对数据进行处理，处理后的数据作为 *X* 变量。建立 PCA 模型，观察样品分类情况，由软件拟合后自动提取了 2 个主成分，其累积方差贡献率为 72.50%，表明该模型对样本整体变异解释能力较强；模型预测指数 Q^2（0.348）低于 0.5，表明模型预测能力较弱。绘制得到 PCA 得分图，结果如图

9 所示，大部分样本落在 95%置信区间内。另外，PCA 把样品大致分为了 3 类，这与 HCA 分类结果一致。为了进一步分析不同批次样品的差异性，将选择有监督的模型对其进行识别。

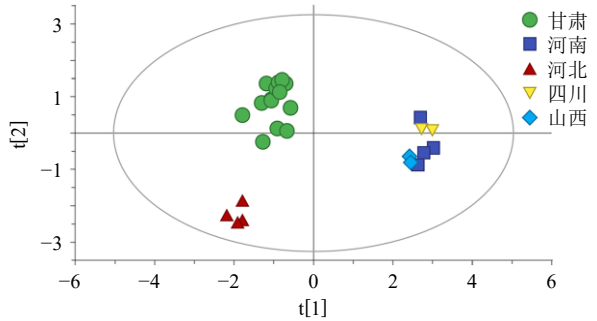


图 9　26 批清半夏多糖部分酸水解样品指纹图谱 PCA

Fig. 9　PCA of fingerprints of partially acid-hydrolyzed samples of polysaccharides from 26 batches of PRPCA

使用 SIMCA 14.1 软件，以 7 个共有峰峰面积为 *X* 变量，以不同产地为分组变量（*Y* 变量），建立 OPLS-DA 模型，用 SIMCA 14.1 软件进行分析，并通过 7 折交叉验证评估模型预测能力。经分析得到模型参数为 R_X^2=0.865，R_Y^2=0.660，Q^2=0.511，R^2 和 Q^2 均大于 0.5 表明模型拟合结果可接受，结果见图 10-A，样品全部分布于 95%置信区间内，OPLS-DA 模型具有明显的分类能力，能够将 26 批次样品分开。设置分类矩阵变量随机排列 200 次置换检验，R^2 和 Q^2 拟合线于 *Y* 轴截距分别为 0.082、−0.440，且左侧置换检验所得 Q^2 值均低于右侧原始点，结合 CV-ANOVA 检验结果（F=3.42，P<0.001），表明模型无过拟合现象且整体具有高度统计学显著性，结果见图 10-B。采用 OPLS-DA 模型中 VIP 值＞1 为筛选特征差异变量的判定阈值，发现清半夏多糖部分酸水解寡糖组成有 4 个差异标记物，其影响程度依次为 DP6＞DP7＞DP1＞DP5，结果见图 10-C，因此这些变量可进一步反映清半夏批次间差异及潜在产地相关性。

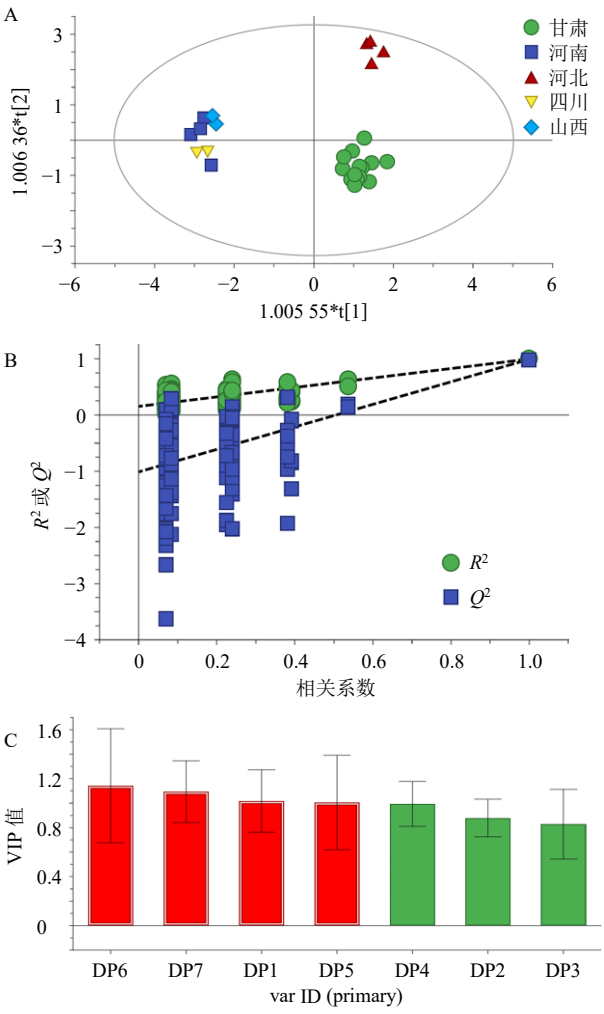


图 10　26 批清半夏多糖部分酸水解样品指纹图谱 OPLS-DA (A) 及其置换检验 (B) 和模型 VIP 分析 (C)

Fig. 10　OPLS-DA (A) and its permutation test (B), model VIP analysis (C) of fingerprints of partially acid-hydrolyzed samples of polysaccharides from 26 batches of PRPCA

2.3.11　清半夏多糖果胶酶酶解样品指纹图谱的建立分析　将 26 批清半夏多糖果胶酶酶解样品（P1p～P26p）的色谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）。选定 P1p 样品作为参照图谱，以中位数多点校正法执行峰匹配，时间窗宽度设定为 0.1 min，生成对照指纹图谱（Rp），26 批清半夏多糖果胶酶酶解样品（P1p～P26p）的色谱图和对照指纹谱图如图 11 所示，P1p～P26p 样品指纹图谱与其 Rp 的相似度评价结果分别为 1.000、1.000、0.999、1.000、0.991、1.000。不同批次清半夏多糖果胶酶酶解样品相似度均在 0.991～1.000，相似度均大于 0.9，结果表明不同批次来源的清半夏多糖样品经果胶酶酶解后的寡糖指纹图谱相似度较高。26 批清半夏多糖果胶酶酶解样品指纹图谱含 7 个共有峰（DP1～DP7），通过与混合对照品（图 7）比对，其分别与 *D*-葡萄糖、麦芽二糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖和麦芽七糖相对应。

2.3.12　基于清半夏多糖果胶酶酶解样品指纹图谱的化学计量学分析　采用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件进行 HCA，提取 26 批清半夏多糖果胶酶酶解

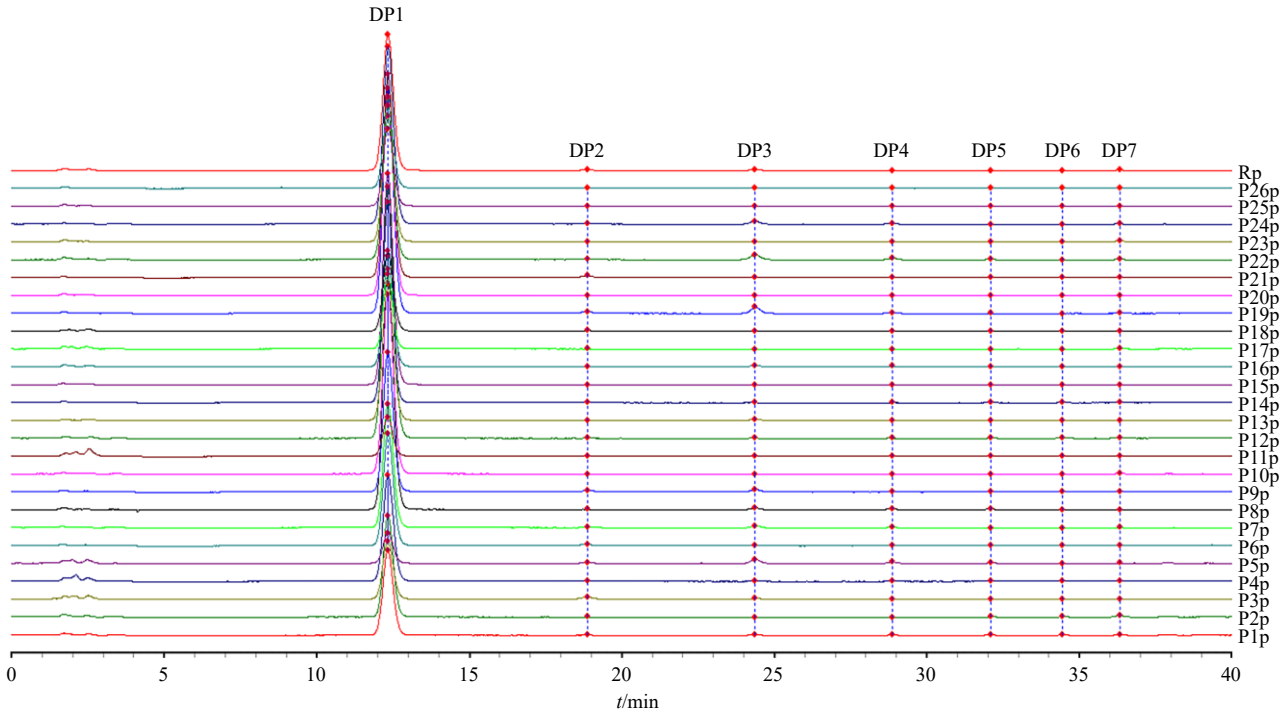


图 11　26 批清半夏多糖部分果胶酶酶解样品的 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱（Rp）

Fig. 11　HPLC fingerprints of pectinase-hydrolyzed samples of polysaccharides from 26 batches of PRPCA and their control fingerprint (Rp)

样品色谱图中的共有峰峰面积，获得 7 个共有峰的峰面积，并进行标准化处理构成 26×7 原始峰面积矩阵，通过平方欧氏距离计算样本间距，选择组间联接系统聚类法进行分析，结果见图 12。当平方欧式距离为 10 时，26 批样品被分为 3 大类：P1p～P6p、P11p、P14p～P18p、P21p、P23p、P24p 号样品聚为第 1 类，产地为甘肃、河南，表明这 2 个产地的样品果胶酶酶解寡糖组成较为接近；P8p～P10p、P25p、P26p 号样品聚为第 2 类，产地分别是甘肃、河北，表明有部分甘肃的清半夏多糖果胶酶酶解后寡糖组成与河北的具有一定的相似性；P7p、P12p、P13p、P19p、P20p、P22p 号样品聚为第 3 类，产地为河南、四川、山西，表明这些产地的样品在果胶酶酶解后寡糖组成上具有一定的相似性。

将原始峰面积矩阵导入 SIMCA 14.1 软件，以自动规格化方式对数据进行处理，处理后的数据作为 X 变量，建立 PCA 模型，观察样品分类情况，由软件拟合后自动提取了 2 个主成分，其累积方差贡献率为 68.50%，模型预测指数 Q^2（0.243）低于 0.5，整体解释度与预测能力均偏弱。绘制得到 PCA 得分图，结果如图 13 所示，大部分样本落在 95%置信区间内。另外，PCA 把样品大致分为了 3 类，这与 HCA 分类结果一致。为了进一步分析不同批次样品的差异性，将选择有监督的模型对其进行识别。

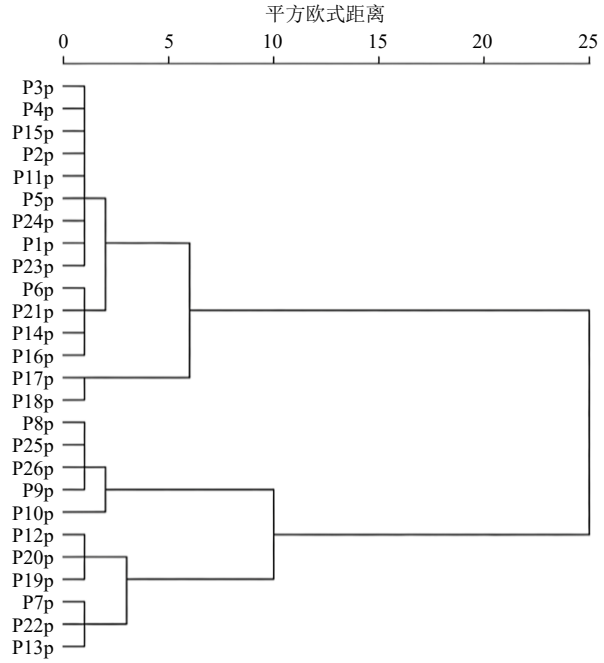


图 12　26 批清半夏多糖果胶酶酶解样品指纹图谱 HCA

Fig. 12　HCA of fingerprints of pectinase-hydrolyzed samples of polysaccharides from 26 batches of PRPCA

使用 SIMCA 14.1 软件进行分析，以 7 个共有峰峰面积为 X 变量，以不同产地为分组变量（Y 变量），建立 OPLS-DA 模型，用 SIMCA 14.1 软件进

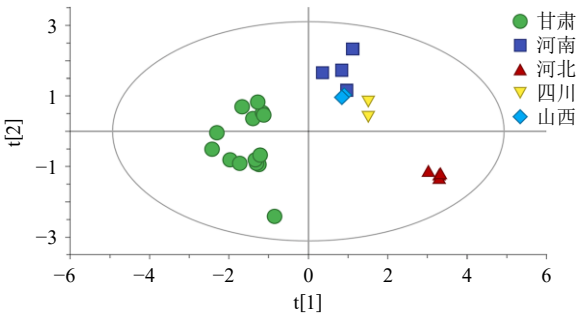


图 13　26 批清半夏多糖果胶酶酶解样品指纹图谱 PCA

Fig. 13　PCA of fingerprints of pectinase-hydrolyzed samples of polysaccharides from 26 batches of PRPCA

行 OPLS-DA，并通过 7 折交叉验证评估模型预测能力。经分析得到模型参数为 R_X^2＝1.000，R_Y^2＝0.880，Q^2＝0.575。其中 R_X^2 达到完美拟合，可能与变量数和相对样本量偏少有关，模型存在一定的过拟合风险。但 Q^2＝0.575（＞0.5），提示该模型具一定预测能力，但该结果后续需扩大样本量以进一步验证。结果如图 14-A 所示，OPLS-DA 模型仍展现出明显的分类能力，能够将 26 批次的样品分开。设置分类矩阵变量随机排列 200 次置换检验，R^2 和 Q^2 拟合线于 Y 轴截距分别为 0.155、−1.010，且左侧置换检验所得 Q^2 值均低于右侧原始点，结合 CV-ANOVA 检验结果（F＝1.74，P＜0.05），表明模型无过拟合现象且整体具有统计学显著性，结果见图 14-B。采用 OPLS-DA 模型中 VIP 值＞1 为筛选特征差异变量的判定阈值，发现清半夏多糖果胶酶酶解寡糖组成有 3 个差异标记物，其影响程度依次为 DP5＞DP2＞DP4，这些变量可一定程度上反映清半夏批次间差异及潜在产地相关性，结果见图 14-C。

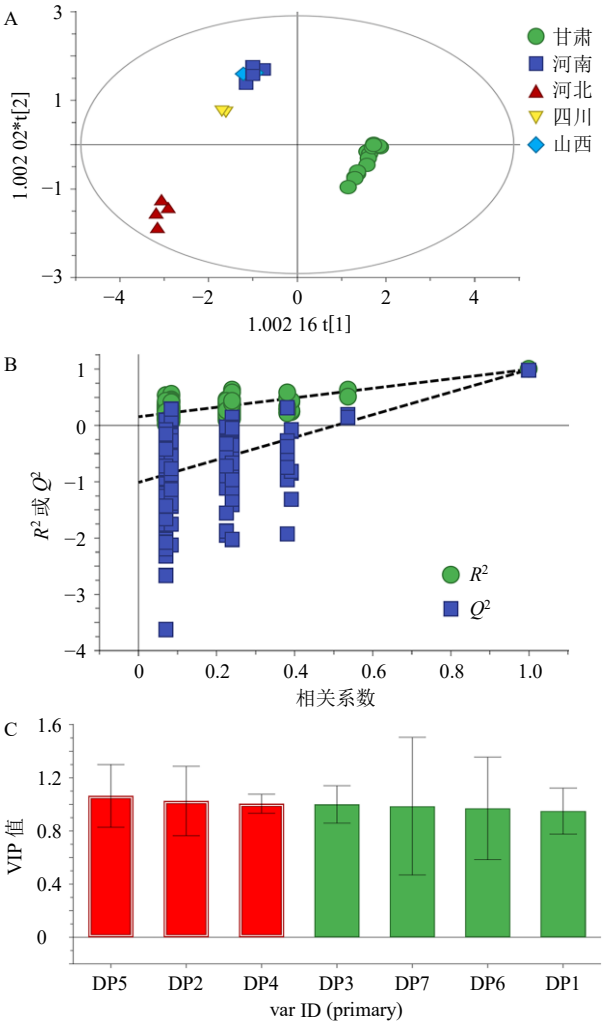


图 14　26 批清半夏多糖果胶酶酶解样品指纹图谱 OPLS-DA (A) 及其置换检验 (B) 和模型 VIP 分析 (C)

Fig. 14　OPLS-DA (A) and its permutation test (B), model VIP analysis (C) of fingerprints of pectinase-hydrolyzed samples of polysaccharides from 26 batches of PRPCA

3　讨论

本研究基于糖谱法思路，采用完全酸水解、部分酸水解及果胶酶酶解 3 种方式，分别建立了清半夏多糖的单糖组成和寡糖组成 HPLC 指纹图谱评价其质量一致性，并结合化学计量学对不同批次样品间的差异进行了分析，为其质量控制提供了多元化的技术手段。完全酸水解结合 PMP 衍生化分析单糖组成，是多糖质量评价的常用方法之一。该法操作简便、重复性好，能够在一次分析中同时测定多种单糖的相对含量，因而在中药多糖的组成分析中被广泛采用。以单糖组成建立的指纹图谱已应用于桑黄、淫羊藿和蓬莪术等中药质量评价[15-17]。单糖作为多糖的重要结构元素，直接影响多糖的生物活性，也可以影响多糖的官能团、链长、空间构象等结构特征，从而影响多糖的溶解度、流变性、稳定性等[11]。本研究建立了 26 批不同产地清半夏多糖的单糖组成 HPLC 指纹图谱，结果显示，除 P3 和 P11（*D*-甘露糖和 *D*-半乳糖的比例相对较高，*D*-葡萄糖的比例相对较低）外，其余样品相似度较高。部分样品相似度偏低，可能是因为半夏本身的遗传多样性和不同地区生态环境影响了植物体内多糖的合成代谢，进而导致结构的差异[18]；采收时节的不同会导致多糖的累积程度及结构成熟度的差异；产地加工方式（是否及时清洗、干燥方式等）[19]以及炮制工艺参数（蒸制温度、浸润时间等）的批次间不统一，会进一步影响多糖的结构，进而导致了多糖单糖组成的批次间波动，即使同一产地内部也有所不同。通过 VIP 值筛选出 *L*-鼠李糖、*D*-甘露

糖、*D*-半乳糖醛酸和 *D*-葡萄糖 4 个 VIP 值大于 1 的差异标记物，可初步反映清半夏批次间差异及潜在产地相关性。然而，完全酸水解将所有糖苷键彻底断裂，多糖的连接方式、分支程度及聚合度等结构信息在此过程中完全丢失。虽然能定性定量分析单糖组成，但从中提取的结构信息有限，难以对多糖的整体质量进行精确评价[20]。

近年来，采用糖谱法思路对多糖进行部分酸水解及酶解后建立指纹图谱的分析方法日益受到关注，已成为一种方便、准确的多糖质量控制新手段[21-23]。本研究首先采用部分酸水解对清半夏多糖进行指纹图谱分析。部分酸水解通过控制酸浓度、温度和时间，随机断裂部分糖苷键，生成保留有特定连接方式特征的寡糖片段。目前，该法在中药多糖结构表征和质量评价中已有较多应用。如席璟睿等[24]利用 TFA 对 16 批枸杞多糖进行部分酸水解建立指纹图谱，相似度达 0.911～0.997，HCA、PCA 和 PLS-DA 可有效区分不同产地样品，筛选出 *D*-葡萄糖、*L*-阿拉伯糖和 *D*-半乳糖为差异标志物。又如周忠瑜等[25]对 13 批多花黄精多糖采用相同方法进行分析，相似度为 0.781～0.945，但 61.5%的样品相似度低于 0.90。本研究中，26 批样品部分酸水解寡糖组成的相似度在 0.888～1.000，仅有 2 批样品相似度低于 0.90。HCA 与 PCA 将 26 批样品大致分为 3 类，且分类结果相互印证，体现了一定的产地相关性。通过 VIP 值筛选出 DP6、DP7、DP1 和 DP5 作为关键差异成分，可初步反映批间差异及潜在产地相关性。与枸杞与多花黄精的研究相比，本研究筛选出的差异标记物除单糖外还包括聚合度为 5～7 的寡糖（DP5～DP7），其可能来源于多糖的支链区域或特定重复单元，为深入解析半夏多糖的结构特征及产地判别提供了重要依据。

基于酶解的方法因其具有明确的作用方向、特异的酶切位点及可控的反应过程，在多糖结构解析研究中更具应用价值[26]。如炙黄芪多糖经 β-*D*-半乳糖苷酶水解后，指纹图谱相似度达 0.939～0.995，且能有效区分生黄芪与炙黄芪，差异标志物为葡萄糖、DP2 和 DP3[21]。本课题组前期采用果胶酶等多种特异性糖苷酶酶解半夏及其炮制品多糖，发现半夏多糖能被果胶酶有效水解，提示其含有 α-1,4-半乳糖醛酸苷键等特征性连接方式[14]。与此一致，本研究对 26 批清半夏多糖进行果胶酶酶解，所得样品的指纹图谱相似度在 0.991～1.000，为 3 种水解方法中相似度最高，这可能归因于果胶酶特异的酶切位点，其酶解产物更能反映果胶多糖的结构特征。HCA 和 PCA 仍然将 26 批样品分为 3 大类，并通过 VIP 值筛选出 DP5、DP2 和 DP4 作为差异标志物。同时，前期研究中发现半夏多糖经酸水解和果胶酶酶解后清除 ABTS 自由基能力减弱，但清除 DPPH 自由基能力均明显增强[14]。这些发现提示，果胶酶酶解筛选出的差异寡糖片段不仅可作为清半夏质量评价的化学标志物，还可能进一步与抗氧化等药理活性相关联。

本研究发现，无论是单糖组成，还是部分酸水解及果胶酶酶解的寡糖指纹图谱分析，尽管聚类分析结果表明其分类与产地呈现一定的相关性，但普遍存在跨产地聚类现象（如甘肃与河南、甘肃与河北、多省样品混合聚类等）。其原因主要有以下几个方面：首先，清半夏为生半夏经白矾溶液浸泡或煮制炮制而成，炮制过程中的白矾及加热作用可能对多糖产生相似的降解和修饰效应，使得不同产地原料经相同炮制方法处理后，其多糖特征趋于一致，从而削弱了产地原始差异；其次，部分产地地理位置接近（如河南与山西、甘肃陇南与河南西部等），其气候、土壤等生态条件具有相似性，导致生半夏中多糖的基础组成和含量等本身差异较小，经炮制后结构特征呈现一定的相似性；此外，样品批次间炮制工艺细节（如浸泡或煮制时间、干燥方式等）的波动也可能导致多糖结构特征差异的变化，当不同产地样品的加工条件相近时，两者可能聚为一类。

综上，本研究基于糖谱法通过不同水解方式建立了清半夏多糖多元指纹图谱，不同水解方式因水解原理差异显著，完全酸水解彻底降解多糖为单糖，反映整体的单糖组成；部分酸水解随机断裂对酸敏感的糖苷键，产生结构相对复杂的寡糖片段；而果胶酶酶解具有底物特异性，专一裂解特定糖苷键，生成特征性寡糖。该方法稳定、可靠，能为评价清半夏质量一致性提供一定的依据，筛选出的单糖及寡糖差异标记物为清半夏批间差异评价提供了一定的参考。

采用 3 种水解方式建立指纹图谱，与单一方法相比，从不同层次更全面地评价清半夏质量。相较于传统的完全酸水解结合 PMP 衍生化单糖组成分析，HILIC-HPLC-ELSD 法直接分析寡糖，避免了衍生化步骤，减少了衍生化效率差异带来的误差，且分析时间更短。然而，目前寡糖标准品缺乏，虽已

通过对照品进行比对，但仅能确定寡糖的聚合度（单糖个数），无法确认其具体结构。此外，本研究仍存在一定局限性：样品批次和产地覆盖范围有限，后续需扩大样本量以建立更具代表性的指纹图谱库；市售商用果胶酶可能含有微量杂酶或辅料成分，从而对指纹图谱结果产生一定影响；差异标记物的结构尚未确证，后续可结合 LC-MS 或核磁共振等鉴定特征寡糖的具体结构及进行定量分析等；此外，未将多糖指纹图谱与药效活性相关联，后续应开展谱效关系研究，明确与化痰、抗炎和免疫调节等药效相关的关键多糖或寡糖片段，为清半夏多糖质量控制提供更完善的科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 王丽, 黄林, 黎智, 等. 微波炮制与传统炮制对半夏成分、刺激性及镇咳化痰药效影响的比较研究 [J]. 中草药, 2026, 57(7): 2512-2522.

[2] 许艳青, 王欣之, 崔小兵, 等. 清半夏及其效应成分对急性肺损伤炎症反应的改善作用研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2025(8): 1055-1065.

[3] 周亚丽, 杨萍, 李喜香, 等. 半夏化学成分与药理作用研究进展及其质量标志物 (Q-Marker) 预测 [J]. 中草药, 2024, 55(14): 4939-4952.

[4] 宋敏, 刁婷婷, 王一超, 等. 半夏及其有效成分在心血管疾病中的研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2025, 30(2): 251-264.

[5] 王婉怡, 朱志军, 李航飞, 等. 半夏化学成分、药理作用研究进展及其质量标志物预测分析 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26(3): 203-215.

[6] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 128-129.

[7] 高奎旭, 王瑶, 胡美变, 等. 半夏多糖的提取纯化、结构分析及药理作用研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(7): 147-153.

[8] Liu Y J, Mo X L, Tang X Z, *et al*. Extraction optimization, characterization, and bioactivities of polysaccharides from *Pinelliae Rhizoma Praeparatum* cum *Alumine* employing ultrasound-assisted extraction [J]. *Molecules*, 2017, 22(6): 965.

[9] Hu M B, Liu Y J, Wang L, *et al*. Purification, characterization of two polysaccharides from *Pinelliae Rhizoma Praeparatum* cum *Alumine* and their anti-inflammatory effects on mucus secretion of airway epithelium [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(14): 3553.

[10] Gao K X, Peng X, Wang J Y, *et al*. *In vivo* absorption, *in vitro* simulated digestion and fecal fermentation properties of polysaccharides from *Pinelliae Rhizoma Praeparatum* cum *Alumine* and their effects on human gut microbiota [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 266(Pt 2): 131391.

[11] 赵宁, 韩著, 简颖琳, 等. 中药多糖结构表征及质量评价研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(21): 7491-7506.

[12] 刘睿敏. 铁皮石斛与枸杞子寡糖谱效关系研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2022.

[13] 胡美变, 王瑶, 高奎旭, 等. 基于糖谱法的制远志炮制前后多糖结构特征分析及抗氧化活性评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2025, 45(16): 1832-1839.

[14] 胡美变, 高奎旭, 王瑶, 等. 基于糖谱法的半夏及其炮制品多糖结构特征分析及水/酶解前后抗氧化活性评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(11): 192-201.

[15] 郑含笑, 徐凡, 蒲婧哲, 等. 基于多重指纹图谱桑黄多糖质量评价研究 [J]. 药物分析杂志, 2025, 45(2): 334-349.

[16] 黄春跃, 杨子璇, 孙宜春, 等. 基于 PMP 柱前衍生化-HPLC 法的淫羊藿多糖的单糖指纹图谱研究 [J]. 中国医药工业杂志, 2024, 55(1): 81-88.

[17] 康荣, 胡玉莹, 李明华, 等. 蓬莪术多糖 PMP-HPLC 指纹图谱与抗氧化活性的相关分析 [J]. 中国药学杂志, 2023, 58(18): 1650-1656.

[18] 夏天睿, 周欣, 范皎皎, 等. 柱前衍生化-HPLC 法结合多元统计分析揭示不同产地半夏多糖的单糖特征[J]. 中药材, 2026, (1): 155-160.

[19] 李薛唐, 黄艳龙, 周爱仪, 等. 中药材产地初加工环节对其质量稳定性的作用 [J]. 农业产业化, 2025(10): 145-147.

[20] 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): 3505-3513.

[21] Shang A L, Li Y D, Zhao Y, *et al*. Comparison and characterization of polysaccharides from various sources and before and after honey processing of *Astragali Radix* utilizing saccharide mapping [J]. *Biomed Chromatogr*: *BMC*, 2025, 39(7): e70121.

[22] 刘进宝. 基于特征降解糖谱和标记寡糖的黄精多糖质量控制研究 [D]. 保定: 河北大学, 2024.

[23] 万晓莹, 刘振丽, 宋志前, 等. 中药多糖定性鉴别与糖谱的研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(5): 876-881.

[24] 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): 268-275.

[25] 周忠瑜, 杜泽飞, 蒲婷婷, 等. 基于化学计量学的多花黄精多糖部分酸水解产物 PMP-HPLC 指纹图谱构建 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(13): 284-290.

[26] 刁卓, 胡冲, 杨青山, 等. 基于酶解法和化学计量学的黄精多糖差异性分析 [J]. 药物分析杂志, 2024, 44(2): 324-332.

[责任编辑 郑礼胜]