

基于内切-1,3- β -葡聚糖酶水解的黄芪糖指纹图谱的建立及不同种质资源黄芪鉴别

王迪^{1,2}, 刘磊^{1,2}, 李科^{1*}, 李爱平¹, 刘月涛¹, 秦雪梅¹, 杜冠华³, 张翔⁴

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

3. 中国医学科学院 北京协和医学院药物研究所, 北京 100050

4. 美国路易斯维尔大学, 美国路易斯维尔 40292

摘要: 目的 以内切-1,3- β -葡聚糖酶的最佳酶解条件对不同种质资源蒙古黄芪(移栽和野生)和膜荚黄芪(移栽和野生)多糖进行酶解, 通过荧光辅助糖电泳(FACE)获得糖指纹图谱, 用于黄芪的种质资源鉴别和评价。方法 利用 SMICA 软件对数据进行主成分分析及 t 检验, 获得区分不同种质资源黄芪的差异性糖组分。结果 内切-1,3- β -葡聚糖酶酶解产物中五糖和六糖可以作为区分野生蒙古黄芪和野生膜荚黄芪的差异性糖片段, 三糖、四糖和五糖可以作为区分移栽蒙古黄芪与移栽膜荚黄芪的差异性糖片段, 五糖和六糖可以作为区分膜荚黄芪(野生和移栽)的差异性糖片段。结论 内切-1,3- β -葡聚糖酶降解的多糖产物能很好地鉴别黄芪种属和生长方式。为黄芪药材的品质评价及活性寡糖的筛选奠定了基础。

关键词: 内切-1,3- β -葡聚糖酶; 黄芪; 多糖; 指纹图谱; 种质资源; 主成分分析

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)10-2320-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.012

Establishment of fingerprint of *Astragali Radix* polysaccharides based on endo-1,3- β -glucanase hydrolysis and identification of different germplasm resources of *Astragali Radix*

WANG Di^{1,2}, LIU Lei^{1,2}, LI Ke¹, LI Ai-ping¹, LIU Yue-tao¹, QIN Xue-mei¹, DU Guan-hua³, ZHANG Xiang⁴

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

4. University of Louisville, Louisville 40292, America

Abstract: **Objective** Enzymatic hydrolysis of *Astragali Radix* polysaccharides from different germplasm resources *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* (MG) (cultured and wild) or *Astragalus membranaceus* (MJ) (cultured and wild) was carried out by the best enzymolysis conditions of endo-1,3- β -glucanase. Saccharide fingerprints were obtained for the identification and evaluation of the germplasm resources of *Astragali Radix* by Fluorophore-assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE). **Methods** The data were analyzed by principal component analysis and t test using SMICA software to distinguish differential sugar segments among different germplasm resources of *Astragali Radix*. **Results** Pentasaccharide and hexasaccharide of endo-1,3- β -glucanase hydrolyzate could be used as differentiated saccharide fragments between natural MG and MJ. Trisaccharide, tetrasaccharide, and pentasaccharide could be used as differentiated saccharide fragments to distinguish the cultured MG and MJ. Pentasaccharide and hexasaccharide can be used as differential fragments to distinguish MJ (cultured and natural). **Conclusion** The polysaccharide products degraded by endo-1,3- β -glucanase can well distinguish *Astragali Radix* species (MG and MJ) and

收稿日期: 2018-04-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31200278); 教育部博士点新教师类基金项目(20131401120006); 山西省优秀人才科技创新项目(201705D211020); 山西省中药产业重点科技攻关项目(201603D311101); 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-JIN-34); 山西省科技攻关项目(2014ZD0401)

作者简介: 王迪, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制。Tel: 15835112475 E-mail: 2512589496@qq.com

***通信作者** 李科, 男, 副教授, 研究方向为中药质量控制及创新药物研发。Tel: 15235180586 E-mail: like@sxu.edu.cn

growth mode (cultured and natural *Astragali Radix*). This study laid the foundation for the quality evaluation of *Astragali Radix* and screening of active oligosaccharides.

Key words: endo-1,3- β -glucanase; *Astragali Radix*; polysaccharide; fingerprint; germplasm resources; principal component analysis

黄芪是我国重要的大宗药材之一,可补益元气而托毒,治一切气衰血虚之症^[1]。《中国药典》2015 年版规定的正品黄芪药材为豆科黄芪属蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的根^[2]。由于黄芪用量很大,加之野生资源的枯竭及再生能力的下降,我国北方多省均有人工引种。蒙古黄芪主要分布在山西、内蒙古、甘肃、陕西等省,其中山西和内蒙古产的 6~8 年生蒙古黄芪为公认道地药材,具有“主根粗长、少分支、绵性大、粉性强、甜味足、豆腥味浓”等特点。膜荚黄芪主产区为黑龙江、吉林,另外在河北、山东等省也有引种^[3-5],但栽培一年即采收上市。这种速生芪外观与道地黄芪有很大差别,呈现“主根短,分枝多,质坚硬,鸡爪形,微甜而淡”等特征^[6]。

作为评价黄芪质量的标准,《中国药典》2015 年版规定黄芪甲苷量不得小于 0.04%^[2]。屠鹏飞等^[7-9]对 59 批不同生长方式、不同年限、不同等级规格的黄芪样品进行评测。研究结果表明随着黄芪生长年限的增长,等级的增高,黄芪甲苷含量呈逐渐下降趋势,而且栽培品含量要高于野生品和半野生品。从上述研究看出,以目前的指标评价黄芪品质,得出的结论是速生栽培芪品质不亚于野生传统芪。然而国际市场并不接受速生芪,国内的一些老中医也仍然使用野生传统芪。这些矛盾说明目前的质量评价指标不能够全面准确地评价黄芪品质。因此建立更加合理的评价指标,对于保护和发展道地黄芪具有重要意义。

传统中医认为,黄芪是“补气”良药,具有补气升阳、益胃固表、托疮生肌、保护肝脏等功效^[10-12]。诸多研究表明,黄芪多糖具有广泛的免疫增强^[13-16]和抗病毒^[17]作用,是黄芪发挥免疫调节活性的主要物质,同时也是黄芪中含量最丰富的化合物。因此多糖应该作为黄芪质量控制与品质评价的指标。现已有研究报道利用紫外分光光度法测定总多糖含量作为药材品质评价的指标,然而,该指标缺乏专属性特征,限制了各版《中国药典》对这一标准的收载^[18-19]。目前,基于酶学方法的糖谱分析技术,为找出具有专属性的黄芪糖类成分提供了技术保证。2010 年首次报道利用该技术比较人参 *Panax ginseng* C. A. Mey.、三七

Panaxnotoginseng (Burk.) F. H. Chen.、西洋参 *Panax quinquefolius* L. 等 9 种不同来源药用植物多糖的特征结构。同时还对比了 8 个不同石斛品种的多糖差异以及对天然冬虫夏草与人工种植冬虫夏草的多糖结构差异分析^[20-21],获取了不同生长方式及物种的多糖酶解产物特征图谱,为筛选种属特异性活性寡糖片段奠定了基础。

已有文献报道^[22]黄芪中的葡聚糖在促进免疫功能等方面具有显著疗效。因此,本研究选用内切-1,3- β -葡聚糖酶的最佳酶解条件水解了不同种质资源蒙古黄芪(移栽芪和野生芪)和膜荚黄芪(移栽芪和野生芪)可溶性多糖,获得指纹图谱,分析其降解片段的相对分子质量分布,并用主成分分析(PCA)找出不同种质资源黄芪差异的糖组分。研究结果为黄芪药材的品质评价及黄芪活性寡糖筛选奠定了基础。

1 材料、仪器与试剂

1.1 材料

蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 和膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 2 个种,共 24 批,购买自河北安国药材市场。将药材保存于阴凉、干燥通风处,经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定,标本保存于山西大学中医药现代研究中心,详细信息见表 1。

1.2 仪器与试剂

DYY-10C 型电泳仪电源, DY-C7 型电泳仪(北京市六一仪器厂); ZD-A1L 真空冷冻干燥仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); 旋转蒸发仪 RE-52C(巩义市予华仪器有限责任公司); TGL-16 型高速冷冻离心机(宁波新芝科技有限公司); SHK-99-II 型台式空气恒温摇床(北京北方同正生物技术发展有限公司)。

亚铁氰化钾(批号 20160108)、乙酸锌(批号 20160518)购自天津市凯通化学试剂有限公司; 8-氨基萘-1,3,6-三磺酸(ANTS, 批号 1657892)购自 Thermo Fisher 公司; NaBH₃CN(批号 YY12652)购自上海源叶生物科技有限公司; *N,N*-亚甲基双丙烯酰胺(批号 20140515)购自天津市登峰化学试剂厂; 丙烯酰胺(批号 20160512)、尿素(批号 20150106)、

表 1 黄芪样本信息

Table1 Samples information of *Astragali Radix*

批次	编号	品种	生长方式	来源	生长年限
1	C1	蒙古黄芪	移栽	甘肃陇西	2
2	C2			甘肃陇西	2
3	C3			甘肃宕昌	2
4	C4			山西代县	2
5	C5			山西应县	2
6	C6			山西应县	2
7	NC1		野生	陕西榆林	5
8	NC2			陕西榆林	5
9	NC3			陕西榆林	5
10	NC4			山西浑源	≥5
11	NC5			山西浑源	5
12	NC6			山西浑源	5
13	CC1	膜荚黄芪	移栽	黑龙江呼兰	1
14	CC2			黑龙江呼兰	1
15	CC3			河北张家口	2
16	CC4			山东文登	1
17	CC5			山东文登	2
18	CC6			山东文登	1
19	AC1		野生	黑龙江加格达奇	5
20	AC2			山西	5
21	AC3			黑龙江呼兰	5
22	AC4			内蒙古	5
23	AC5			黑龙江	5
24	AC6			黑龙江	5

三羟甲基氨基甲烷 (Tris, 批号 1117W072)、硼酸 (批号 20121029)、过硫酸铵 (批号 20150415) 购自天津市大茂化学试剂厂; 无水乙醇购自天津市致远化学试剂有限公司; 标准品葡萄糖 (批号 110833-200904)、麦芽糖 (批号 RS0918B4012J)、棉子糖 (批号 20100801)、麦芽四糖 (批号 E1320044)、麦芽五糖 (批号 2X681-HL)、麦芽六糖 (批号 NOCVI-QE) 购自梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司, 内切-1,3-β-葡聚糖酶 (EC3.2.1.39, endo-1,3-β-D-glucanase) 购自 Sigma 公司。

2 方法

2.1 黄芪多糖的制备

将干燥的蒙古、膜荚黄芪粉碎成粉末, 过 100 目筛, 取黄芪细粉约 5 g, 精密称定后置于 1000 mL 圆底烧瓶中, 加水 500 mL (1:100), 100 °C 回流提取 1 h, 降至室温后离心取上清液。残渣再加水 400 mL (料液比 1:80), 重复提取 1 次, 取上清, 合并上清。浓缩, 用无水乙醇调节至含醇量为 80%, 静置过夜。3 000 r/min 离心 10 min。合并沉淀, 冷冻干燥得多糖粗粉。将其复溶于水, 加入各 10% 的 10.6% 的亚铁氰化钾溶液和 21.9% 的乙酸锌溶液, 振摇后静置 30 min, 离心除去蛋白, 得到粗多糖, 冻干, 备用。

2.2 黄芪多糖的酶解和衍生化

称取蒙古黄芪和膜荚黄芪多糖约 5 mg, 置于 10 mL 具塞玻璃管中, 分别用内切-1,3-β-葡聚糖酶 2 mL 对 4 种多糖进行酶解, 然后根据最优降解条件, 40 °C 摇床孵育 1 h, 置于 80 °C 水浴上灭活 20 min, 离心 (3 000 r/min, 5 min), 去上清, 氮气吹干。将酶解产物溶于 200 μL 的 NaCNBH₃ 溶液中, 加入 200 μL 的 ANTS 衍生化试剂, 37 °C 摇床孵育 15 h 后, 将产物用氮气吹干, 溶于 1 mL 的 6 mol/L 的尿素溶液, 备用。

2.3 黄芪多糖和糖标准品酶解产物电泳分析

采用垂直板凝胶电泳分离糖标准品及黄芪多糖部分酶解衍生化产物, 分离胶和浓缩胶分别为 0.1 mol/L Tris-H₃BO₃ (pH 8.2) 溶液配制的 0.3 g/mL 和 0.08 g/mL 的聚丙烯酰胺凝胶。电泳缓冲液为 0.1~0.2 mol/L Tris-H₃BO₃ (pH 8.2)。上样量为 1~3 μL, 以溴酚蓝为前沿指示剂, 首先采用 80 V 电压进行电泳分离 60 min, 随后采用 200 V 电压进行电泳分离 120 min。

2.4 数据处理

将电泳图导入 Quantity One 软件, 经过扣除背景、手动校正、基线校准等处理后, 得到色谱图。色谱图转化为 Excel 数据后导入 SMICA-P 13.0 进行分析, 然后运用代谢组学分析技术寻找差异糖片段。

3 结果与分析

3.1 蒙古黄芪和膜荚黄芪多糖内切-1,3-β-葡聚糖酶酶解产物的电泳指纹图谱

从 24 批黄芪样本中分别提取纯化得到多糖组分, 将多糖用内切-1,3-β-葡聚糖酶水解后进行 FACE 电泳, 电泳图导入 Quantity One 软件分析, 所得数据经 OriginPro 8.5 转换, 得到所有的多糖降解后的寡糖指纹图谱, 按照野生与移栽黄芪进行汇总, 结果见图 1。

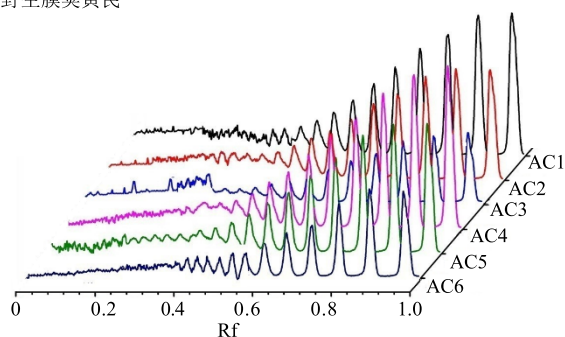
3.2 黄芪多糖降解后黄芪寡糖的相对分子质量分布分析

由黄芪多糖部分酶解衍生化产物电泳的 R_f 值, 根据 FACE 电泳后 6 种糖标准品的 R_f 值 (X) 对相对分子质量 (Y) 作标准曲线, $Y = -1\,268.5X + 1\,411.6$, $R^2 = 0.994\,2$, 测定黄芪多糖降解后黄芪寡糖相应的相对分子质量。

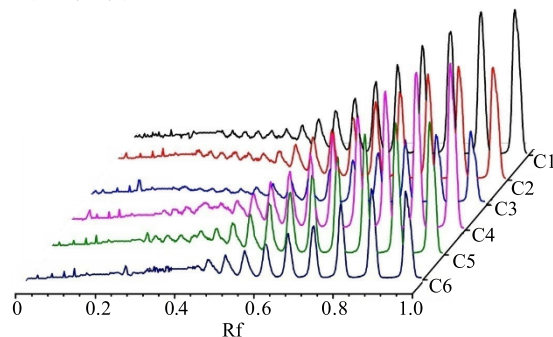
3.3 蒙古黄芪和膜荚黄芪 4 组多糖内切-1,3-β-葡聚糖酶酶解产物电泳指纹图谱的多元统计分析

图 2-A 为蒙古黄芪和膜荚黄芪多糖内切-1,3-

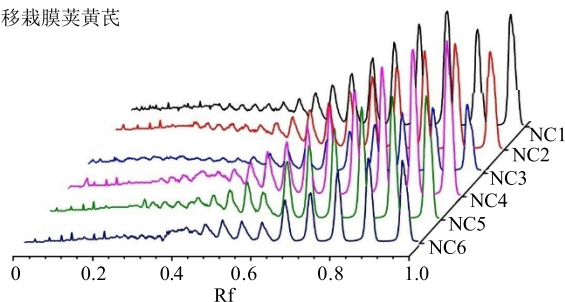
野生膜荚黄芪



移栽蒙古黄芪



移栽膜荚黄芪



野生蒙古黄芪

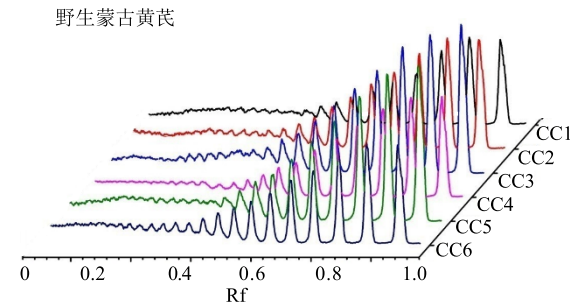
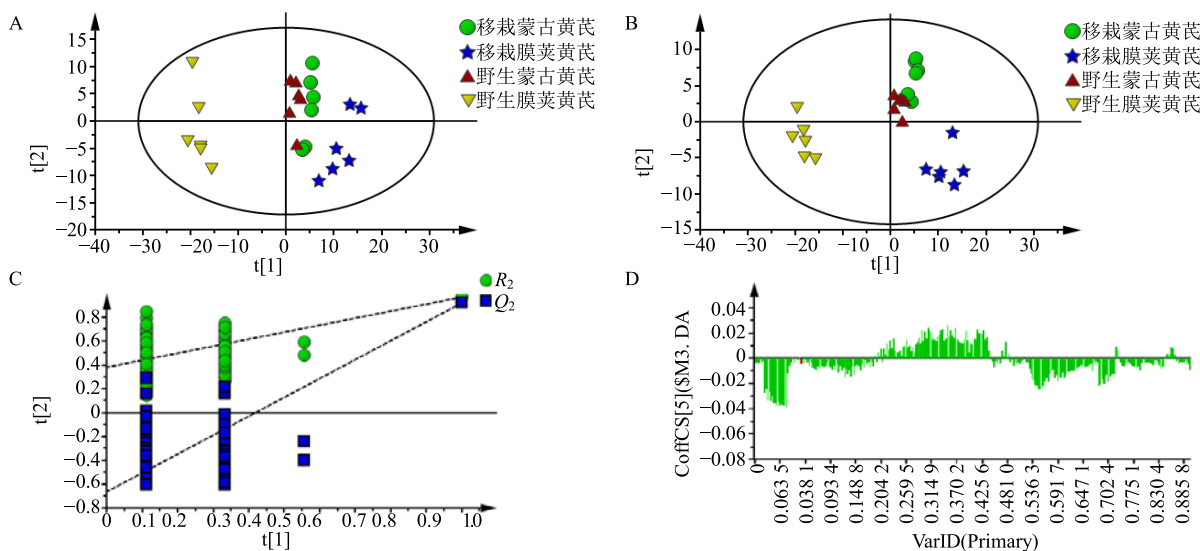


图 1 黄芪多糖内切-1,3-β-葡聚糖酶酶解产物的 FACE 指纹图谱分析

Fig.1 Analysis of FACE fingerprint of *Astragali Radix* polysaccharide based on endo-1,3-β-glucanase hydrolyzate



A-PCA 得分图 B-PLS-DA 得分图 C-模型验证图 D-Loading 图
A-PCA score plots B-PLS-DA score plots C-permutations D-loading

图 2 蒙古黄芪和膜荚黄芪多糖内切-1,3-β-葡聚糖酶酶解产物电泳指纹图谱的多元统计分析

Fig. 2 Multivariate statistical analysis of electrophoresis fingerprints of MG and MJ polysaccharides based on endo-1,3-β-glucanase hydrolysates

β-葡聚糖酶酶解产物电泳指纹图谱 PCA 得分散点图, 可见, 蒙古芪与膜荚芪可得到较好分离, 膜荚移栽芪和野生芪分离明显, 蒙古移栽芪和野生芪分离不明显。进行有监督的偏最小二乘判别分

析 (PLS-DA) 分析 (图 2-B) 发现与主成分分析 (PCA) 图基本一致。用外部模型验证方法排列实验来证明模型成立 (图 2-C), 载荷图分析 (图 2-D) 可以继续后面部分差异成分的筛选。

从图 2-A 分析, 蒙古黄芪和膜荚黄芪种属之间的差异要大于移栽和野生生长方式间差异, 野生蒙古黄芪与野生膜荚黄芪分离现象明显, 移栽蒙古黄芪与移栽膜荚黄芪分离现象明显, 可以对同一生长方式不同种属黄芪进行差异性片段寻找; 膜荚黄芪中移栽芪和野生芪能得到很好地分离, 而蒙古黄芪中移栽芪和野生芪分离现象不明显, 因此只对区分移栽和野生膜荚黄芪的差异性片段进行筛选。

3.4 筛选野生蒙古黄芪与野生膜荚黄芪多糖内切-1,3- β -葡聚糖酶酶解产物的差异性生物标志物

野生蒙古黄芪与野生膜荚黄芪多糖酶解产物电泳指纹图谱正交偏最小方差判别分析 (OPLS-DA) 散点图, 见图 3-A, 可见, 野生蒙古黄芪与野生膜荚黄芪可得到较好分离。用外部模型验证方法排列实验来证明模型成立 (图 3-B), 载荷图分析 (图 3-C) 可以进行差异成分的筛选。

由图 4 可知, 五糖和六糖可以作为区分野生蒙古黄芪和野生膜荚黄芪的主要差异性片段。对该片段分析发现, 野生蒙古黄芪中五糖和六糖片段的含

量高于野生膜荚黄芪的含量。

3.5 筛选移栽蒙古黄芪与移栽膜荚黄芪多糖内切-1,3- β -葡聚糖酶酶解产物差异性生物标志物

移栽蒙古黄芪与移栽膜荚黄芪多糖内切-1,3- β -葡聚糖酶酶解产物电泳指纹图谱 OPLS-DA 散点图, 见图 5-A, 可见, 移栽蒙古黄芪与移栽膜荚黄芪可得到较好分离。用外部模型验证方法排列实验来证明模型成立 (图 5-B), 载荷图分析 (图 5-C) 可以进行差异成分的筛选。

由图 6 分析可知, 三糖、四糖和五糖可以作为区分移栽蒙古黄芪与移栽膜荚黄芪的主要差异性片段。对该片段分析发现, 移栽膜荚黄芪中三糖、四糖和五糖的含量均高于移栽蒙古黄芪的含量。

3.6 筛选膜荚黄芪多糖内切-1,3- β -葡聚糖酶酶解产物电泳指纹图谱的生物标志物

为了明确膜荚黄芪多糖内切-1,3- β -葡聚糖酶酶解产物间的化学差异成分, 分组对酶解产物的电泳指纹图谱进行 OPLS-DA、模型验证及载荷图分析 (图 7), 筛选生物标志物。

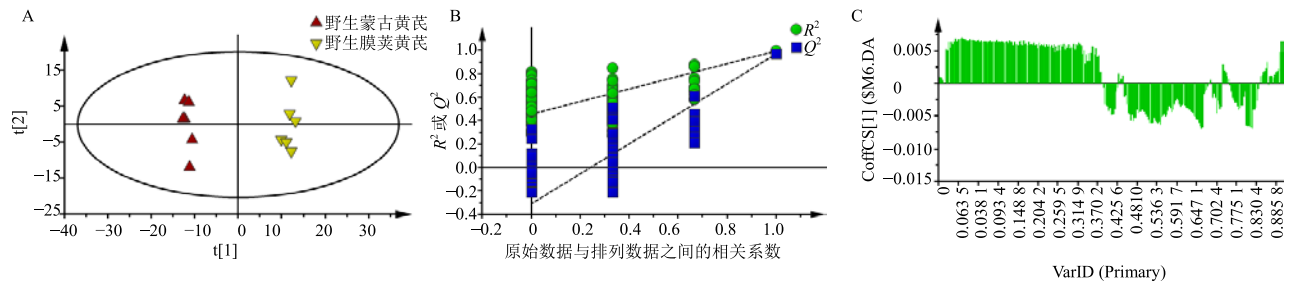
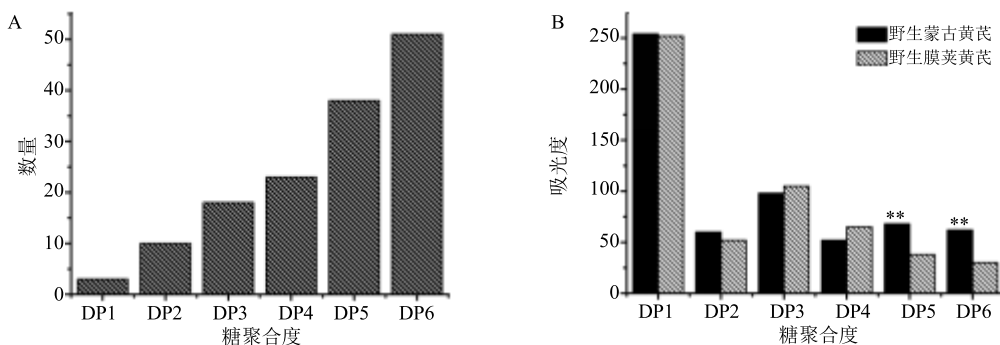


图 3 野生蒙古黄芪与野生膜荚黄芪多糖内切-1,3- β -葡聚糖酶酶解产物电泳指纹图谱的 OPLS-DA 散点图 (A)、模型交叉验证 (B) 及 Loading 图 (C)

Fig. 3 Multivariate statistical analysis of electrophoresis fingerprints of wild MG and wild MJ polysaccharides based on endo-1,3- β -glucanase hydrolysates (A-OPLS-DA score plots, B-permutations, C-Loading)



与膜荚黄芪比较: ** $P < 0.01$ DP1~6-一至六聚糖, 下同
** $P < 0.01$ vs MJ DP1~6-one to six sugars, same as below

图 4 野生蒙古黄芪和野生膜荚黄芪多糖内切-1,3- β -葡聚糖酶酶解产物差异性糖片段贡献数 (A) 和糖片段吸光度 (B)

Fig. 4 Differential sugar segments contribution number (A) and sugar segment optical density values histogram (B) of (wild MG and MJ) polysaccharides based on endo-1,3- β -glucanase hydrolysates

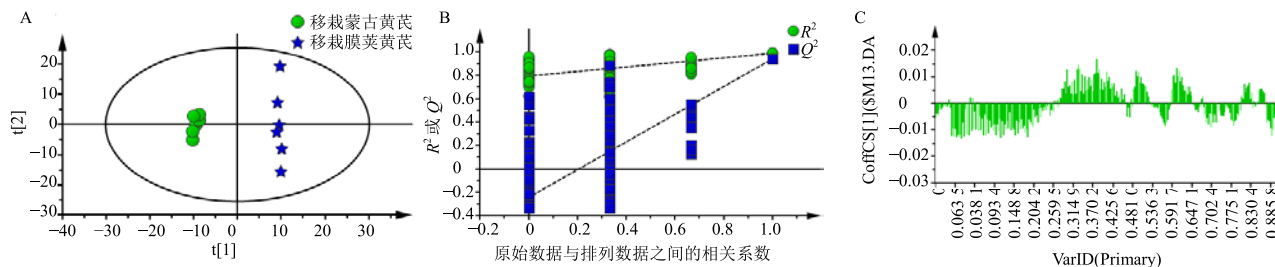


图 5 移栽蒙古黄芪与移栽膜荚黄芪多糖内切-1,3- β -葡聚糖酶酶解产物电泳指纹图谱的 OPLS-DA 散点图 (A) 和模型交叉验证图 (B) 及 Loading 图 (C)

Fig. 5 Multivariate statistical analysis of electrophoresis fingerprints of cultured MG and cultured MJ polysaccharides based on endo-1,3- β -glucanase hydrolysates (A-OPLS-DA score plots, B-permutations, C-Loading)

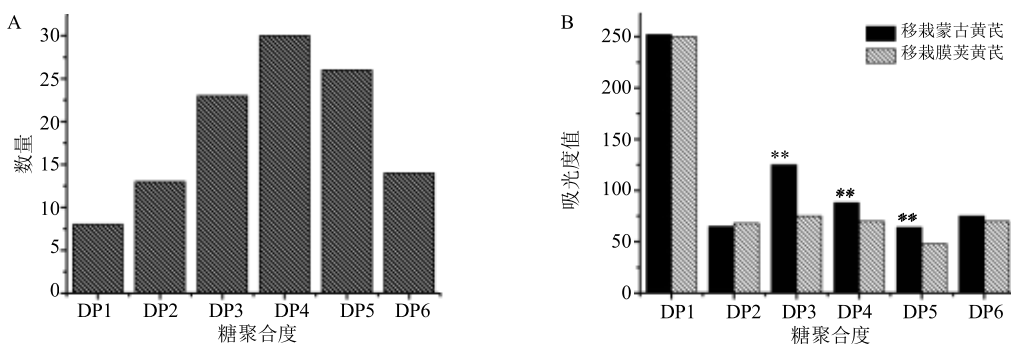


图 6 移栽蒙古黄芪与移栽膜荚黄芪多糖内切-1,3- β -葡聚糖酶酶解产物差异性糖片段贡献数 (A) 和糖片段吸光度值 (B)

Fig. 6 Differential sugar segments contribution number (A) and sugar segment optical density values (B) of cultured MG and cultured MJ polysaccharides based on endo-1,3- β -glucanase hydrolysates

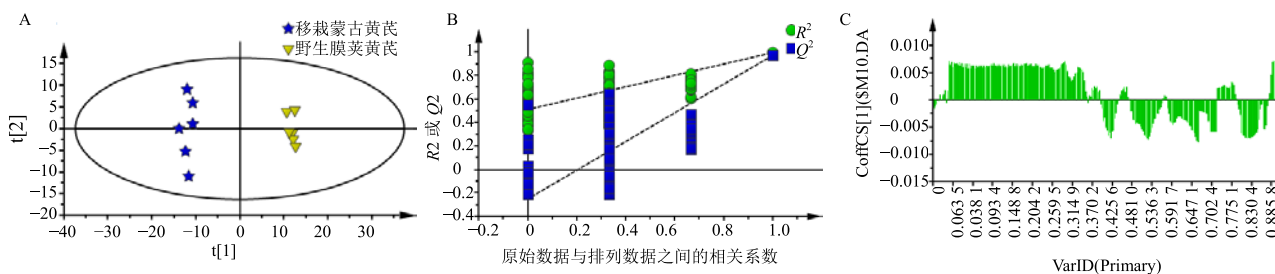


图 7 膜荚黄芪多糖内切-1,3- β -葡聚糖酶酶解产物电泳指纹图谱的 OPLS-DA 散点图 (A)、模型交叉验证 (B) 及 Loading 图 (C)

Fig. 7 Multivariate statistical analysis of electrophoresis fingerprints of MJ (cultured and wild *Astragali Radix*) polysaccharides based on endo-1,3- β -glucanase hydrolysates (A-OPLS-DA score plots, B-permutations, C-Loading)

膜荚黄芪多糖内切-1,3- β -葡聚糖酶酶解产物电泳指纹图谱的 OPLS-DA 分析结果见图 7-A, 显示野生和移栽黄芪多糖水解产物得到很明显的分离, 其中野生芪位于散点图的右部, 而移栽芪位于散点图的左部, 表明它们之间存在较大的差异。模型验证 (图 7-B) 采用总解释变量 (R^2 值) 和模型可预测性 (Q^2 值) 进行评估。回归线纵轴相交并处于零点以下, 左端任何一次随机排列产生的 R^2 、 Q^2 均小于右端,

且最右端的 2 个值差距较小。表明模型具有良好的可预测性和拟合度。模型验证结果成立, 模型可靠。通过相应的载荷图中距原点较远的点筛选具有潜在贡献的生物标志物 ($VIP > 1$, 图 7-C)。

由图 8 可知, 五糖和六糖可以作为区分移栽膜荚黄芪和野生膜荚黄芪的主要差异性片段。对该片段分析发现, 移栽膜荚黄芪中五糖和六糖的含量均高于野生膜荚黄芪的含量。

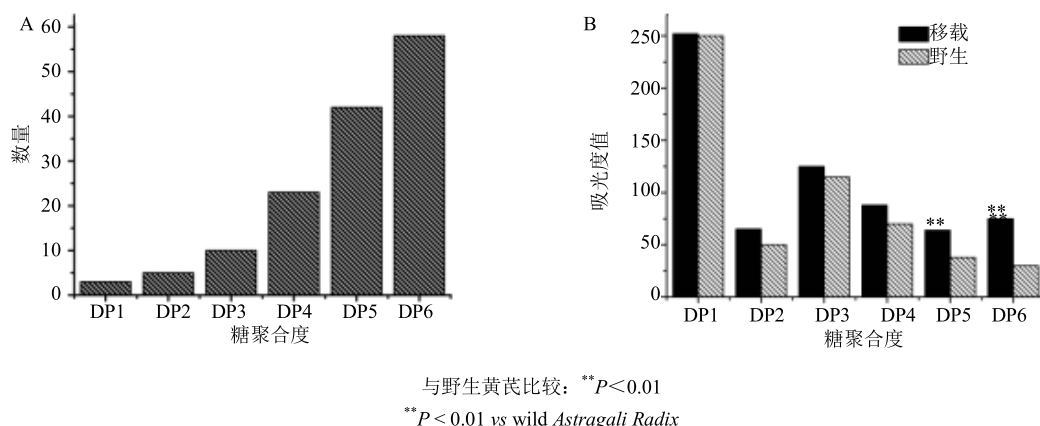


图 8 膜荚黄芪多糖内切-1,3- β -葡聚糖酶酶解产物差异性糖片段贡献数 (A) 和糖片段吸光度值 (B)

Fig. 8 Differential sugarsegments contribution number (A) and sugar segment optical density values (B) of MJ (cultured and wild *Astragali Radix*) polysaccharides based on endo-1,3- β -glucanase hydrolysates

4 讨论

在本研究中,野生黄芪选自道地产区山西浑源等地,这些地方多是土质疏松的半坡环境,夏季日照充足,干旱少雨,昼夜温差大,冬季寒冷,野生黄芪在此环境中生长多达 5 年以上。移栽黄芪则是农户选择肥沃土地,经移栽施肥生长 2 年后采收。相比之下,野生黄芪受到了更多干旱、低温、营养缺乏等环境胁迫,而移栽黄芪较少受到逆境的影响。大量研究表明,植物通常以细胞和整个生物有机体抵抗胁迫。逆境下,植物会在形态结构、生理生化、渗透调节、植物激素水平、膜保护物质及活性氧平衡、逆境蛋白等诸多环节发生变化,涉及到植物水分、光合、呼吸、物质代谢等多项生理过程^[23-27]。已有研究报道^[23],细胞质中游离糖及糖醇成分是植物受到生长胁迫而诱导产生的小分子物质,这些物质在细胞中大量积累,调节细胞渗透压,有利于植物保持水分,抵抗盐碱、低温等多种逆境,对维持植物的正常生理功能具有重要作用。因此,在环境影响下,野生黄芪比移栽黄芪经受更多的胁迫因素,野生黄芪中的多糖含量远远高于移栽黄芪。虽然本研究找出了哪些糖片段可以作为区分蒙古黄芪和膜荚黄芪生长方式的主要差异性片段,然而多糖经酶水解后的糖片段含量差异,活性如何,是否可以作为评价黄芪种质资源的指标还有待进一步研究。

本实验通过测定内切-1,3- β -葡聚糖酶对蒙古黄芪和膜荚黄芪中可溶性多糖的酶解产物,发现酶能很好地区分不同生长方式和不同种属的黄芪。根据 FACE 电泳后 6 种糖标准品的 Rf-相对分子质量标准曲线(图 2),测定黄芪多糖降解后黄芪寡糖相应的

相对分子质量及其分布。分析结果显示,内切-1,3- β -葡聚糖酶酶解产物中五糖和六糖可以作为区分野生蒙古黄芪和野生膜荚黄芪的差异性糖片段,对该片段分析发现,野生蒙古黄芪中五糖和六糖片段的含量高于野生膜荚黄芪的含量;三糖、四糖和五糖可以作为区分移栽蒙古黄芪与移栽膜荚黄芪的差异性糖片段,且移栽膜荚黄芪中三糖、四糖和五糖的含量均高于移栽蒙古黄芪的含量;五糖和六糖可以作为区分膜荚黄芪的差异性糖片段,且移栽膜荚黄芪中五糖和六糖的含量均高于野生膜荚黄芪的含量。这一指标为蒙古黄芪和膜荚黄芪的鉴别提供了依据,同时也为黄芪药材的品质评价及活性寡糖的筛选奠定了基础。

参考文献

- [1] 刘迎,史万玉,钟秀会.黄芪药理研究进展 [A] // 中国畜牧兽医学论文集 [C]. 兰州: 中国畜牧兽医学中兽医分会 2005 年学术年会, 2005.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 余坤子,刘靖,洪浩,等.黄芪种植产地与生态环境及饮片规格的调查研究 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(9): 641-645.
- [4] 谢小龙,王溪森,赵利,等.黄芪种质资源研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2005, 33(1): 121-123.
- [5] 赵一之.黄芪植物来源及其产地分布研究 [J]. 中草药, 2004, 35(10): 1189-1190.
- [6] 高凤兰,孙雪筠,哈永年.野生与栽培黄芪主要成分的分析测定 [J]. 黑龙江中医药, 1991(3): 47-49.
- [7] 姜勇,金芳,鲍忠,等.不同来源黄芪药材中黄芪甲苷的定量分析 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(11): 930-933.

- [8] 石子仪, 鲍忠, 姜勇, 等. 不同来源黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的定量分析 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(9): 779-783.
- [9] 胡芳弟, 封士兰, 赵健雄, 等. HPLC 法测定黄芪中黄酮类成分和黄芪甲苷的含量 [J]. 分析测试技术与仪器, 2003, 9(3): 173-177.
- [10] 杨凤华. 黄芪及其有效成分的研究概况 [J]. 现代中西医结合杂志, 2003, 12(10): 1112-1114.
- [11] 冷祥康, 陈蓉. 黄芪的药物研究及临床应用 [J]. 中华实用医学, 2003, 5(7): 108-109.
- [12] 尤丽芬. 黄芪的免疫及抗病毒作用 [J]. 中草药, 1993, 24(4): 211-214.
- [13] 李鹏飞, 杜海燕, 赵孟春. 黄芪多糖的化学和免疫学研究 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2005(5): 4-6.
- [14] 李树鹏. 黄芪多糖益生菌合生元对雏鸡生长和免疫作用的研究 [D]. 西安: 西北农林科技大学, 2005.
- [15] 孔祥峰, 胡元亮, 宋大鲁. 黄芪多糖的免疫药理学研究进展 [J]. 中兽医学杂志, 2003(3): 34-37.
- [16] 贺生中, 王涛, 周建强, 等. 黄芪多糖的免疫作用及其兽医I临床应用 [J]. 动物科学与动物医学, 2004, 21(7): 39-41.
- [17] 张伟, 朱连勤, 王吉才, 等. 黄芪多糖在增强家禽免疫功能 and 抗病毒方面的心用 [J]. 家禽科学, 2007(1): 41-43.
- [18] Guan J, Yang F Q, Li S P. Evaluation of carbohydrates in natural and cultured cordyceps by pressurized liquid extraction and gas chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2010, 15(6): 4227-4241.
- [19] 黄东兰, 徐永群, 陈小康, 等. 红外三级鉴定法快速鉴别栽培与半野生黄芪 [J]. 光谱实验室, 2010, 27(3): 833-837.
- [20] Xu J, Guan J, Chen X J, *et al.* Comparison of polysaccharides from different dendrobium using saccharide mapping [J]. *J Pharm Biomed Analy*, 2011, 55(5): 977-983.
- [21] Guan J, Zhao J, Feng K, *et al.* Comparison and characterization of polysaccharides from natural and cultured *Cordyceps* using saccharide mapping [J]. *Analyt Bioanalyt Chem*, 2011, 399(10): 3465-3474.
- [22] 王莹, 赵毅民, 张起凤, 等. 黄芪中一种新葡聚糖的分离纯化与化学结构研究 [J]. 中草药, 2001, 32(11): 962-964.
- [23] 蔡孟深, 李中军. 糖化学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [24] Morcuende R, Krappe A, Hhrry V, *et al.* Sucrose feeding leads to increased rates of nitrate assimilation, increased rates of α -oxoglutarate synthesis, and increased synthesis of a wide spectrum of amino acids in tobacco leaves [J]. *Plants*, 1998, 206(3): 394-409.
- [25] Koch K E, Ying Z, Wu Y, *et al.* Multiple paths of sugar-sensing and a sugar/oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism [J]. *J Exp Bot*, 2000, 51(343): 417-427.
- [26] 布坎南, 格鲁依森姆, 琼斯. 植物生物化学与分子生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [27] 苏文华, 张光飞, 李秀华, 等. 植物药材次生代谢产物的积累与环境的关系 [J]. 中草药, 2005, 36(9): 1415-1418.