

近红外漫反射法测定茯苓中水溶性多糖及碱溶性多糖

康玉姿, 王维皓*

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**建立茯苓中水溶性多糖和碱溶性多糖的基于近红外光谱的含量预测模型。**方法:**建立并优化茯苓中水溶性多糖和碱溶性多糖的分光光度含量测定方法,并用建立的分光光度法对 90 个批次样品中的碱溶性多糖和水溶性多糖进行含量测定。采用积分球漫反射对样品进行红外光谱扫描,参考分光光度法获得的 2 种多糖的含量结果,经光谱预处理方法优选,并以 Matlab R2012a 软件,采用组合区间偏最小二乘法(synergy interval partial least squares regression SIPLS)对特征波长进行了筛选,建立了茯苓中水溶性多糖和碱溶性多糖的近红外含量测定方法。**结果:**建立的近红外预测模型水溶性多糖交叉验证均方根误差(RMSEC)为 0.270,相关系数 $R_c^2 = 0.9059$,预测均方根误差(RMSEP)为 0.119;预测集相关系数 $R_p^2 = 0.9138$ 。碱溶性多糖 RMSEC = 0.242, $R_c^2 = 0.9996$; RMSEP = 0.243, $R_p^2 = 0.9989$ 。**结论:**所建立的近红外漫反射含量测定方法操作简便,快速,准确。适于茯苓中水溶性多糖和碱溶性多糖的质量控制。

[关键词] 茯苓; 近红外; 定量; 水溶性多糖; 碱溶性多糖

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)24-0080-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016240080

Determination of Water-soluble Polysaccharide and Alkali-Soluble Polysaccharide in Poria by Near Infrared Spectroscopy

KANG Yu-zi, WANG Wei-hao*

(Institute of Chinese Material Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quantification method of water-soluble polysaccharide and alkali-soluble polysaccharide in Poria by near infrared spectroscopy (NIR). **Method:** Optimization of the extract method about water-soluble polysaccharide and alkali-soluble polysaccharide was carried out. Meanwhile quantification method with phenol-concentrated sulfuric acid colorimetric reagent was established and the contents of water-soluble polysaccharide and alkali-soluble polysaccharide of ninety batches of samples were obtained. Near-infrared diffused reflected spectroscopy was implemented to obtain the NIR spectra of Poria. The NIR method was established by referring to the obtained contents with partial least squares regression (PLS) to pretreat the NIR spectra and with the program named synergy interval partial least squares regression (SIPLS) over Metlab R2012a platform to select sensitive wavelength number. And parameters was optimized by investigating the root-mean-square error of prediction (RMSEP) the correlation coefficient of calibration (R_c^2), the root-mean-squares error of cross-validation (RMSECV) and the correlation coefficient of prediction (R_p^2). **Result:** The RMSEC value of water-soluble polysaccharide is 0.270, the R_c^2 value is 0.9059, the RMSEP value is 0.119, the value of R_p^2 is 0.9138. Regarding to alkali-soluble polysaccharide, the RMSEC value is 0.242, the R_c^2 value is 0.9996, the RMSEP value is 0.243, and the value of R_p^2 is 0.9989. **Conclusion:** The established NIR method is convenience and accurate and satisfies the requirement of the rapid quality evaluation of Poria.

[Key words] Poria; NIR; quantification; water-soluble polysaccharide; alkali-soluble polysaccharide

[收稿日期] 20160616(010)

[基金项目] 国家重点实验室培育项目(G220140107)

[第一作者] 康玉姿,在读硕士,从事药物分析研究, Tel:15206437520, E-mail:2695665072@qq.com

[通讯作者] * 王维皓,博士,助理研究员,从事中药质量研究, Tel:010-6401-4411-2848, E-mail:olive_wh@126.com

茯苓为中医临床常用药,具有健脾和胃、利湿、宁心的功效^[1],用于提高免疫力、消除水肿、改善睡眠。现代研究认为,茯苓中的多糖及三萜为主要活性成分,其中多糖类成分在含量上占绝对优势。但是,文献对于多糖提取方法及含量的报道不尽相同^[2-4]。原因主要是茯苓中的多糖分为碱溶性多糖(又称粗多糖)和水溶性多糖,而已有的很多报道对茯苓中这 2 类多糖的区分不明确。另外,这 2 种多糖在药理活性方面也存在差异。茯苓中的水溶性多糖具有免疫调节、抗肿瘤、抗炎等多方面药理活性^[5-6];碱溶性多糖具有抗氧化和微弱的抗肿瘤活性^[7]。另有研究表明,碱溶性多糖经结构修饰产生具有抗肿瘤活性的成分^[8]。在 2015 年版《中国药典》中,茯苓项下缺少相应的质量指标性成分含量控制内容。由此,明确水溶性多糖、碱溶性多糖的含量对茯苓评价以及其综合利用具有指导意义。

分光光度法是多糖含量测定的传统方法^[9]。但是,该方法操作繁琐、耗时,难以适应中药质量快速检测的需要^[10-13]。截止目前近红外技术用于茯苓质量评价的研究未见报道。本研究优化并建立了茯苓中水溶性多糖及碱溶性多糖的分光光度含量测定方法,为茯苓的质量控制提供借鉴及有益的补充。

1 材料

T6 型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),KQ322DE 型超声波清洗仪(江苏省昆山市超声仪器有限公司),XS105 型双量程分析天平(瑞士梅特勒托利多公司),Thermo Antaris 近红外扫描仪(美国赛默飞世尔科技有限公司)。

D-无水葡萄糖(成都普菲德生物技术有限公司,批号 150130,纯度 >98%),氢氧化钠、苯酚均为分析纯。药材收集于安徽、湖北、云南 3 个省份共 90 批,经中国中医科学院资源中心袁媛研究员鉴定为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* 的干燥菌核。

2 方法与结果

2.1 水溶性多糖的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取 D-无水葡萄糖对照品 8 mg,置 50 mL 量瓶中,加入纯净水,溶解并定容,制备质量浓度为 0.16 g·L⁻¹ 的葡萄糖对照品溶液。

2.1.2 样品提取方法考察 分别考察了提取方法(回流、超声),样品-溶剂比例,提取时间对水溶性多糖的提取效果。实验设计见表 1。结果表明,0.5 g 茯苓粉末(过 80 目筛)加水 10 mL,于 50 °C 水浴中超声提取 2 h,对茯苓中水溶性多糖提取效果最佳。

2.1.3 供试品溶液的制备 取粉碎后过 80 目筛的茯苓药材粉末 0.5 g,精密称定,精密加入纯净水 10 mL,于 50 °C 水浴中超声提取 2 h,取出,冷却至室温,1 万 r·min⁻¹ 离心,取上清液 0.1 mL,准确加入 5% 的苯酚 1 mL,再准确加入浓硫酸 5 mL,涡旋 30 s,室温静置 20 min,于 490 nm 波长下测定吸光度。

表 1 水溶性多糖提取方法设计及测定

Table 1 Extracting method and results of water-soluble polysaccharide of *Poria*

No.	处理方法	料液比	提取时间/min	水溶性多糖/%
1	回流	1:20	60	1.33
2			90	1.46
3			120	1.60
4	超声	1:20	30	1.49
5			60	2.39
6			90	3.11
7			120	3.72
8			150	2.94
9			180	2.94
10	超声	1:30	30	1.23
11			60	1.84
12			90	2.11
13			120	2.73
14	超声	1:40	30	1.22
15			60	1.79
16			90	1.88
17			120	2.37

2.1.4 线性范围考察 分别精密吸取对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 加水至 2 mL,精密加入 5% 的苯酚溶液 1 mL,涡旋 30 s,准确加入浓硫酸 5 mL,涡旋 30 s,室温条件下静置 20 min,在 490 nm 波长下测定吸光度。以吸光度对浓度进行线性回归,得线性方程 $Y = 7.12 \times 10^{-3} X - 1.18 \times 10^{-2}$ ($r = 0.9996$)。D-无水葡萄糖在 2.0 ~ 20.0 mg·L⁻¹ 线性关系良好,。

2.1.5 重复性试验 按 2.1.3 项下方法处理,平行制备 6 份供试品溶液样品,测定吸光度,代入线性方程计算,结果 6 份样品质量分数平均值为 4.36%,RSD 2.3%。表明测定方法的重复性良好。

2.1.6 回收率试验 准确称取茯苓粉末 0.25 g,至 50 mL 锥形瓶中,准确吸取质量浓度为 2.177 6 g·L⁻¹ 的 D-无水葡萄糖对照品溶液 5 mL,再准确加入纯净水 5 mL。自“于 50 °C 水浴中”始,按 2.1.3 供试品溶液处理方法,平行处理 6 份样品。测定吸光度。并计算回收率及 RSD,6 份样品的平均回收率为 101.7%,回收率的 RSD 1.7%。

2.1.7 样品的含量测定 按 2.1.3 项下方法处理,

3 个省份的 90 个的茯苓样品,每个样品平行制备 2 份。测定吸光度,并计算各样品中水溶性多糖的含量。水溶性多糖的质量分数在 0.63% ~ 4.49%,含量主要分布于 1.0% ~ 2.5%,平均值为 1.73%。

2.2 碱溶性多糖的含量测定

2.2.1 对照品溶液的配制 采用 D-无水葡萄糖作为对照品,按 2.1.1 项下方法制备。

2.2.2 供试品溶液的制备 取茯苓粉末 0.05 g,精密称定。准确加入 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液 50 mL,冷浸过夜。过滤,精密吸取续滤液 0.1 mL,加水至 2 mL,自“准确加入 5% 的苯酚 1 mL”始,按 2.1.3 项下方法显色,并于 490 nm 波长下测定吸光度。

2.2.3 重复性考察 按 2.2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,测定 6 份样品的吸光度并计算。6 份样品的碱溶性多糖平均质量分数为 93.89%,RSD 4.4%。

2.2.4 回收率试验 精密称取茯苓粉末 0.025 g,准确加入质量浓度为 $0.9389 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 D-无水葡萄糖对照品溶液 25 mL,自“于 50 °C 水浴中”始,按 2.2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,测定吸光度,并计算回收率及回 RSD。6 份样品的平均回收率为 100.8%,RSD 3.3%。

2.2.5 含量测定 按确定的供试品处理方法及显色方法测定茯苓样品中碱溶性多糖的含量。碱溶性多糖的质量分数在 51.26% ~ 93.45%,平均值为 78.26%,主要集中于 80.0% ~ 90.0%。

2.3 近红外(NIR)含量测定方法的建立

2.3.1 NIR 光谱的采集 将收集的茯苓样品 90 份,粉碎过 80 目筛。取约 10 g,混合均匀后装入石英样品杯中,摊平。以空气做参比,扣除背景,采集光谱图。采样方式:积分球漫反射法,采集区域 $4000 \sim 12000 \text{ cm}^{-1}$,分辨率 32.0 cm^{-1} ,扫描次数 64 次,增益 2X,温度 25 °C。每份样品扫描 1 次作为样品 NIR 光谱。扫描结果见图 1。

2.3.2 校正集及验证集的筛选 采用 TQ Analyst 软件进行数据处理。以偏最小二乘法(partial least squares,PLS)对数据进行划分,随机选择校正集和验证集样品。

2.3.3 光谱预处理 采用多元信号修正(multiplicative signal correction,MSC)或标准归一化变换(standard normal variate,SNV)来消除样品粒度、均匀性等影响。光谱预处理方法有^[13-14]:一阶导数(first derivative,FD),二阶导数(second

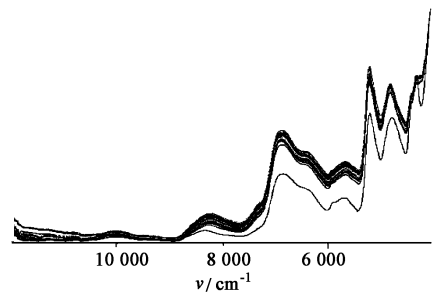


图 1 90 批茯苓样品的近红外扫描

Fig.1 Near-infrared spectra of ninety batches of samples

derivative,SD),标准正态变量变换(standard normal variate transform,SNV),平滑滤波(savitzky-Golay filter,SG)。以交叉验证均方根误差(RMSEC),预测均方根误差(RMSEP),校正集相关系数(R_c^2)及验证集相关系数(R_p^2)数值作为筛选光谱预处理参数的标准。

2.3.4 异常样品的剔除 以 TQ Analyst 软件进行含量计算,将样品的真实值和计算值的偏差作为判定异常样品的标准。对于水溶性多糖,以偏差 $> \pm 1\%$ 作为异常样品剔除的标准,碱溶性多糖以偏差 $> 10\%$ 作为异常样品剔除的标准。

2.3.5 波数的选择 检测波长的选择采用 Matlab R2012a 软件,以 SIPLS 程序进行筛选。确定了水溶性多糖的波数范围为 $6600 \sim 6800, 9100 \sim 11998 \text{ cm}^{-1}$ 。对于碱溶性多糖,经筛选出的波数范围与全波长扫描建模结果比较,在 $3999 \sim 11998 \text{ cm}^{-1}$ 所建立的模型更优,因此确定碱溶性多糖的检测波数为 $3999 \sim 11998 \text{ cm}^{-1}$ 。

2.3.6 碱溶性多糖及水溶性多糖 NIR 含量测定模型参数 采用 PLS 数据划分,水溶性多糖从 90 个样品中剔除 6 个极端值后将剩余样品中的 67 个选为校正集,17 个选为验证集进行建模。碱溶性多糖选择了 90 个样品进行实验,剔除 9 个极端值后将剩余样品中的 61 个选为校正集,20 个作为验证集进行建模。经参数筛选与优化确定了水溶性多糖、碱溶性多糖含量测定参数。水溶性多糖的模型参数为:选用 PLS 模型,SNV + 一阶导数,不平滑处理,光谱区间为 $6600 \sim 6800, 9100 \sim 11998 \text{ cm}^{-1}$,因子数为 6,见图 2。碱溶性多糖的近红外模型参数为:选用 PLS 模型,MSC + 一阶导数,不平滑处理,光谱区间为 $3999 \sim 11998 \text{ cm}^{-1}$,因子数为 8,见图 3。建模后水溶性多糖 RMSEC = 0.270, $R_c^2 = 0.9059$, RMSEP = 0.119,预测集相关系数 $R_p^2 = 0.9138$,见图 4;碱溶性多糖 RMSEC = 0.242, $R_c^2 = 0.9996$,

RMSEP = 0.243, 预测集相关系数 $R_p^2 = 0.9989$, 见图 5。

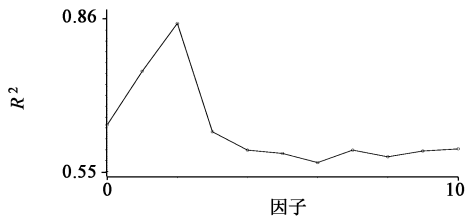


图 2 水溶性多糖的因子

Fig. 2 Factor diagram for water-soluble polysaccharide

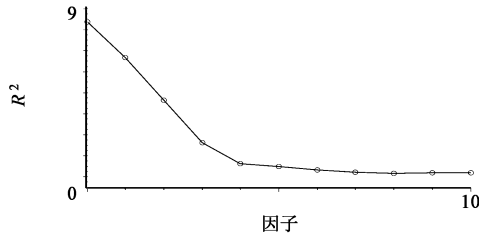


图 3 碱溶性多糖的因子

Fig. 3 Factor diagram for alkali-soluble polysaccharide

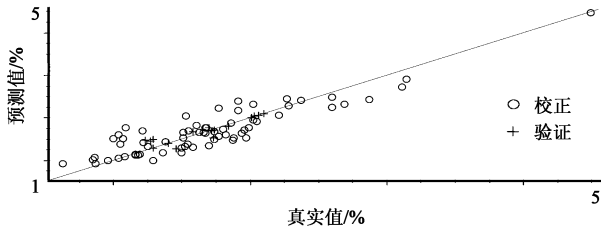


图 4 茯苓碱溶性多糖含量预测值与参考值之间的相关

Fig. 4 Correlogram between predicted values and reference value of water-soluble polysaccharide contents

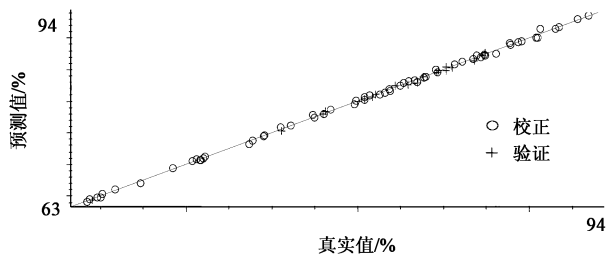


图 5 茯苓碱溶性多糖含量预测值与参考值之间的相关

Fig. 5 Correlogram between predicted values and the reference value of alkali-soluble polysaccharide contents

3 讨论

近红外建模的过程,是参数不断优化的过程,参数 RMSEC, RMSEP, R_c^2 及 R_p^2 的数值对于判断模型的优劣有重要参考意义。

已有的报道^[3],对水溶性多糖,常采用回流多次的提取方式进行。本研究通过比较回流提取和超声提取,考察对水溶性多糖的提取效果。试验结果

表明,超声的提取效率明显优于回流,因此本研究采用超声提取水溶性多糖。

曾有报道^[15],茯苓中的多糖含量 > 90%,通过本实验对 90 个批次茯苓样品中碱溶性多糖的分析,茯苓中碱溶性多糖的含量主要集中在 80% ~ 90%。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015: 240.
- [2] 段启,庄义修. 茯苓中茯苓多糖的含量测定方法及提取工艺优选[J]. 海峡药学,2010,22(11): 66-68.
- [3] 张璐,刘强. 茯苓多糖制备工艺及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(4):61-64.
- [4] 张凯,李茂凡,胡国元,等. 茯苓菌核多糖的分离技术研究[J]. 武汉工程大学学报, 2011,33(1):25, 31.
- [5] 吴波,梁谋. 茯苓多糖抗肿瘤作用与机理的实验研究[J]. 中国药理学通报, 1994,10(4):300-304.
- [6] 侯安继,彭施萍,项荣. 茯苓多糖抗炎作用研究[J]. 中药药理与临床,2003,19(3):15-16.
- [7] 张婉晴. 茯苓粗多糖萃取物对 Balb/c 鼠免疫调节和对转殖 CT26 肿瘤的作用[D]. 台北:国立台湾大学,2005.
- [8] 刘林,霍志斐,史树堂,等. 茯苓多糖的药理作用概述[J]. 河北中医, 2010, 32(9):1427-1428.
- [9] 段启,庄义修. 茯苓中茯苓多糖的含量测定方法及提取工艺优选[J]. 海峡药学,2011,22(11):66-68.
- [10] Sinelli N, Cerretani L, Di Egidio V. Application of near infrared and mid infrared spectroscopy as a rapid tool to classify extra virgin olive oil on the basis of fruity attribute intensity [J]. Food Res Int, 2010, 43 (1): 369-375.
- [11] 熊智新,武中臣,陈朝霞,等. 利用多元散射校正提高油菜籽脂肪酸近红外分析精度[J]. 光谱实验室, 2007, 24(5): 953-958.
- [12] 李彦周,闵顺耕,刘霞. 近红外光谱技术在中草药分析中的应用[J]. 光谱学与光谱分析, 2008,28(7): 1549-1553.
- [13] 姜爽,杨海龙,臧恒昌. 近红外光谱分析技术在中药生产过程质量控制领域的应用[J]. 食品与药品, 2013,15(2):135-138.
- [14] 徐庆贤,沈恒胜,林斌,等. 利用近红外漫反射光谱(NIRS)技术建立甘薯茎叶重金属预测模型[J]. 福建农业学报,2011, 26(3):440-445.
- [15] 周海霞,唐明林,殷辉安,等. 茯苓中多糖的提取及含量测定[J]. 天然产物研究与开发,2003, 15(4): 330-333.

[责任编辑 顾雪竹]