

文章编号:1674-7054(2014)02-0166-04

决明子多糖的 IR 指纹图谱甄别技术

李平凡^{1,2}, 顾宗珠^{1,2}

(1. 广东轻工职业技术学院, 广东 广州 510300;

2. 广东高校特色调味品工程技术开发中心, 广东 广州 510300)

摘 要:以决明子为研究对象,对其多糖进行了红外分析,建立了江西决明子多糖的红外指纹图谱标准化共有模式(相似度 0.935~0.998)。基于该模式,分析发现未知决明子多糖的相似度仅为 0.782,进而提取 11 个共有峰,通过对共有峰的主成分分析和聚类分析,表明未知决明子和江西决明子属于不同类别。该方法可作为基于多糖类功效成分的原料的质量控制手段。

关键词:多糖;红外分析;主成分分析;相似度

中图分类号: R 284

文献标志码: A

决明子是豆科植物决明 *Cassia obtusifolia* L. 或小决明 *Cassia tora* L. 的干燥种子。《神农本草经》记载“久服能益精光,轻身”,且列为“为君主养命以应天”的上药。决明子是国家卫生部公布的 69 种药食同源的物质之一,具有清肝火、祛风湿、益肾、明目等功效。决明子的有效化学成分主要为蒽醌类、萘并-吡酮类及多糖等^[1]。此外,决明子多糖具有抗氧化活性,能有效调节人体免疫力,提高机体抵抗力,防止疾病的侵袭,增强并改善体质^[2-4]。《中华人民共和国药典》(2005 年版)以大黄酚、大黄素作为理化指标鉴别决明子。虽然此法简单实用,但无法体现决明子中其他有效成分,如多糖类等有效成分。因此,仅以大黄酚、大黄素作为决明子的鉴别指标难以全面反映决明子的药用成分及质量优劣。红外指纹图谱分析技术是一种快速、可量化的鉴定手段,可用于评价原料及产品质量的真实性、优良性和稳定性^[5]。因此,笔者进行了决明子多糖 IR 指纹图谱甄别技术的研究,旨在为多糖质量控制提供可靠方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 江西决明子 10 批次和未知决明子 1 批次(市售)。

1.1.2 仪器 恒温水浴锅(HH-6,江苏金坛市宏华仪器厂)、循环水式多用真空泵(SHB-III,郑州长城科工贸有限公司)、紫外分光光度计(SHIMADZU UV-2550,日本岛津公司)、万分之一分析天平(日本岛津公司)、傅立叶变换红外光谱仪(美国 PerkinElmer 公司)、压片机(YP-2,上海山岳科学仪器公司)、KBr(光谱纯,国药集团)、其他化学试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 多糖的提取^[2] 称取过 20 目筛的决明子 1.0 g,加水 100 mL,在 80 °C 水浴并磁力搅拌 3 h,过滤。按 $V_{\text{无水乙醇}}:V_{\text{提取液}}=1:3$ 的比例缓慢将提取液滴入无水乙醇,同时置于磁力搅拌器上快速搅拌,室温静置 3 h,4 000 r·min⁻¹ 转速下离心 10 min,取沉淀。将离心后所得残渣用氮气吹干,密封后低温保存。

收稿日期:2014-04-30

基金项目:“广东高校特色调味品工程技术开发中心”开放课题(GCZX-B1103)

作者简介:李平凡(1973-),副教授,主要从事食品生物技术教学与科研。E-mail:lipinf@163.com

通信作者:顾宗珠(1976-),副教授,主要从事食品加工、食品质量与安全控制。E-mail:guzz89@aliyun.com

1.2.2 IR 分析 取 1 mg 决明子多糖样品和 100 mg 溴化钾,充分研磨均匀,压制成均匀透明的样品片,以溴化钾为空白背景,进行红外光谱检测,扫描 3 次,运用 PerkinElmer Spectrum 100 FT-IR Spectrometer 工作站自带软件进行自动基线校正和自动平滑处理。

1.2.3 统计学分析

1.2.3.1 相似度分析 利用相关系数法计算相似度。用 Excel 对导出的红外光谱数据(ASC 格式)进行处理,获得共有模式数据并计算相似度。相似度计算公式如下:

相似度(Similarity) =
$$\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 (y_i - \bar{y})^2}}$$

式中 x_i, y_i 为 2 组色谱数据的对应点; $\bar{x}, \bar{y}$ 分别代表 2 组色谱数据的平均值。

1.2.3.2 主成分分析 首先选择降维进行因素分析,得到 2 个大于 1 的特征值,累计贡献率大于 80%。通过主成分载荷矩阵中的数据除以主成分相对应的特征值开平方根,获得主成分中每个指标对应的系数。将该系数与标准化后的数据相乘,即可以获得主成分表达式。

1.2.3.3 聚类分析 对数据进行系统聚类分析,选择组间连接法和欧式距离平方,建立树状图。主成分分析和聚类分析均采用 SPSS. 14 进行。

2 结果与分析

2.1 决明子多糖红外光谱 采用平均值法建立 10 批江西决明子多糖红外光谱指纹图谱共有模式(图 1)。在波数为 3 400 cm^{-1} 处(1 号峰)的强吸收峰为多糖分子中的 O—H 键(可能包含 N—H 键)的伸缩振动吸收峰;2 900 ~3 000 cm^{-1} (2 号峰)的吸收峰为多糖分子中 C—H 的伸缩振动吸收峰;1 640 cm^{-1} (3 号峰)处的吸收峰为—C == O 的伸缩振动吸收峰;1 420 cm^{-1} (4 号峰)处吸收峰为 C—H 键的弯曲振动;1 245 cm^{-1} (5 号峰)处吸收峰为环上 C—C 键的骨架振动;1025 cm^{-1} (6 号峰)处的吸收峰则是醇羟基的 C—O 伸缩振动。以此图谱作为红外光谱指纹图谱的参照图谱,利用相关系数法,分析了未知决明子样品与 10 批江西决明子的多糖红外指纹图谱方面的相似度。从表 1 可知,10 批江西决明子的多糖红外指纹图谱的相似度在 0.935 ~0.998 区间范围,说明所测试的江西决明子多糖官能团差异性小,样品均匀性较好,种源性极其相似;而未知决明子多糖的红外光谱与共有模式的红外光谱相似度为 0.782,说明未知决明子与江西决明子多糖红外数据方面的相似度不高。结果显示,基于多糖的红外光谱,未知样品与江西决明子在种源性等方面差异性较大。

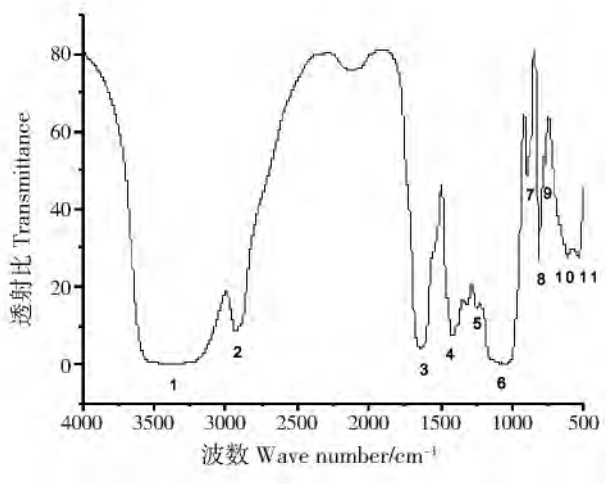


图 1 多糖 IR 指纹图谱标准化模式图
Fig.1 Standardized IR profile of polysaccharides from cassia seeds

表 1 10 批次江西决明子和未知来源决明子的粗多糖红外光谱指纹图谱相似度比较											
Tab.1 Similarity of IR fingerprints of polysaccharides from cassia seeds in Jiangxi and unknown source											
编号	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀	未知样品 Unknown sample
相似度 Similarity	0.935	0.972	0.968	0.983	0.993	0.935	0.979	0.992	0.973	0.998	0.782

2.2 特征峰提取及主成分分析和聚类分析 通过提取共有特征吸收峰,利用主成分分析和聚类分析,进一步研究 10 批决明子粗多糖样品的红外光谱图(见图 1)。提取 11 组共有特征吸收峰的透光率(表 2)进行主成分分析。根据主成分 F_1, F_2 的得分绘制二维散点图(图 2),从图 2 可直观地看出多糖样品之间的

分散距离:相对于未知样品而言,10批江西决明子粗多糖样品能够比较集中在一个小区域范围内,而未知样品与该区域的距离相差甚远。因此,可以对10批江西决明子和未知决明子样品进行分类:第1类为10批次江西决明子,第2类为未知决明子。

同时,对该11组共有特征吸收峰的透光率(表2)进行系统聚类分析,对以上结果进行验证。从图3可以直观地看出样品之间的差异性大小,并对这10批江西决明子($S_1 \sim S_{10}$)和未知决明子样品进行分类:第1大类为10批次江西决明子,第2大类为未知决明子样品。在树状图里,根据第1大类江西决明子粗多糖的差异性,可以进一步细分为2小类:第1小类为江西决明子粗多糖样品 $S_4 \sim S_{10}$,第2小类为江西决明子粗多糖样品 $S_1 \sim S_3$ 。实验结果说明,10批次江西决明子不仅与未知决明子样品差异性很大,而且不同批次的江西决明子样品内部也存在细小的差异性。

表2 决明子多糖红外光谱的11组特征吸收峰透光率

Tab. 2 Transmittance of 11 characteristic peaks of IR fingerprints of cassia seed polysaccharides

批次 Sample	特征峰的透光率 T/% Transmittance of characteristic peaks										
	3 400	2 900	1 640	1 420	1 245	1 025	890	815	767	610	530
	cm ⁻¹	cm ⁻¹	cm ⁻¹	cm ⁻¹	cm ⁻¹	cm ⁻¹	cm ⁻¹	cm ⁻¹	cm ⁻¹	cm ⁻¹	cm ⁻¹
S_1	0.12	12.31	8.35	11.42	20.13	0.15	65.21	35.39	64.86	32.46	35.09
S_2	0.02	8.52	3.55	8.35	17.24	0.02	62.1	34.67	67.41	31.37	26.73
S_3	0.02	8.56	2.38	6.97	15.36	0.03	55.51	29.26	56.33	29.51	29.21
S_4	0.02	6.48	2.22	5.48	12.52	0.03	49.06	24.16	52.25	24.73	23.32
S_5	0.00	3.85	0.99	2.92	8.24	0.01	45.11	22.72	52.42	21.87	21.76
S_6	0.01	5.14	1.25	3.95	9.74	0.02	37.03	17.84	37.29	18.11	18.09
S_7	0.01	9.05	2.66	7.59	18.62	0.02	63.55	35.95	52.00	31.62	30.21
S_8	0.01	5.43	1.33	3.52	7.98	0.01	34.31	15.45	36.14	17.61	17.26
S_9	0.04	7.45	2.12	7.68	15.91	0.13	48.39	30.85	39.29	21.50	20.39
S_{10}	0.03	5.47	1.85	4.70	9.75	0.05	32.58	18.79	27.25	15.04	15.15
未知样 unknown sample	2.36	17.88	17.51	15.93	25.31	2.26	45.36	29.76	62.31	58.36	59.66

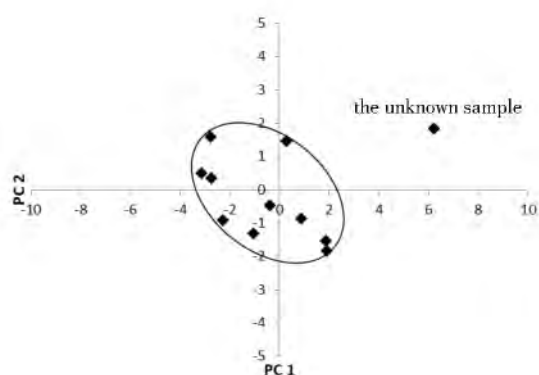


图2 决明子粗多糖红外光谱数据的主成分分析
Fig. 2 Principle component analysis of IR fingerprints of cassia seed polysaccharides

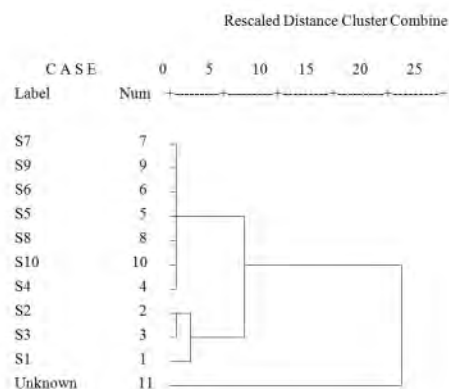


图3 决明子粗多糖红外光谱数据的聚类分析
Fig. 3 Hierarchical cluster analysis of IR fingerprints of cassia seed polysaccharides

3 讨论

多糖的结构与营养功效密切相关。决明子多糖的功效作用已逐渐被现代医学和营养学所证实,但是

决明子存在质量良莠不齐、产地混淆等问题。鉴于多糖组成和结构的复杂性,目前,仍缺乏能够科学有效、快速地鉴别决明子多糖成分的质量控制方法和标准。笔者利用红外快速检测方法和3种统计学手段,基于多糖对江西决明子进行了相似度评价和判定。首先,利用相关系数法建立一种多糖的红外指纹图谱标准化共有模式。利用该模式,通过计算未知决明子多糖的相似度来判定未知样品是否属于原建模样品类别;其次,提取共有峰,通过对共有峰的主成分分析,探明未知样品和建模样品在二维平面上的相对距离,从而判断是否属于同一类样品。该统计学分析方法是原来特征峰透光率数据进行标准化处理,计算样品相关系数矩阵及特征值,形成主成分表达式 F_1 和 F_2 。根据标准化的原始数据,按照各个样品分别代入主成分表达式,就可以得到各主成分下的各个样品的新数据,即为主成分得分,从而绘图直观观察判定;最后,采用聚类分析进行验证,采用 Euclidean 距离来反映不同数据间的相异性,该统计学分析方法则是对样品数据按相似或相异程度将样品分类到不同的类或簇的过程,减少了人为观测的误差。笔者提供的方法具有快速、简单、准确的特点,可作为决明子等基于多糖类的原料质量控制手段。

参考文献:

- [1] 吕翠婷,黎海彬,李续娥,等. 中药决明子的研究进展[J]. 食品科技, 2006(8):295-297.
- [2] 郭晓强,颜军,郭晓勇,等. 决明子水溶性多糖的纯化及抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2007, 28(8):205-208.
- [3] 章晋武. 决明子多糖的结构及其对仔猪生长、免疫和肠道微生态的影响研究[D]. 南昌:南昌大学, 2005.
- [4] 赵国华,王赞,李志孝,等. 山药多糖的免疫调节作用[J]. 营养学报, 2002, 24(2):187-188.
- [5] 罗国安,梁琼麟,王义明. 中药指纹图谱—质量评价、质量控制与新药研发[M]. 北京:化学工业出版社, 2009.

Discrimination of Cassia Seed Polysaccharides by Fingerprint Infrared Spectroscopy

LI Pingfan^{1,2}, GU Zongzhu^{1,2}

(1. Guangdong Industry Technical College, Guangzhou 510300, China; 2. Center of Guangdong Higher Education for Engineering and Technological Development of Specialty Condiments, Guangzhou 510300, China)

Abstract: The polysaccharides from cassia seeds (seeds of *Cassia obtusifolia* or *C. tora*) were analyzed by using fingerprint infrared spectrometry. A model for infrared fingerprint spectra of polysaccharides from 10 batches of cassia seeds collected in Jiangxi was established and standardized with a similarity ranging from 0.935 to 0.998. With this model the cassia seeds polysaccharide from unknown source was evaluated, and the similarity was merely 0.782. Furthermore, 11 co-existing peaks were chosen from the IR fingerprints of the polysaccharides from 10 batches of cassia seeds collected in Jiangxi and resorted to principal component analysis and hierarchical cluster analysis. The results showed that the cassia seeds from the unknown source was different from those collected in Jiangxi and was in a different category. The fingerprinting method and principle component analysis could be applied to supervise the quality of the products or raw materials that have bioactive components of polysaccharides.

Key words: polysaccharide; infrared analysis; principle component analysis; similarity