

茯苓不同药用部位中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的组成及含量比较研究

杨晨曦, 王伟伟, 冯伟红, 刘晓谦, 张永欣, 毛慧静, 王智民*, 闫利华*
(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 茯苓是我国大宗常用中药材,多个部位可入药,常见的有茯苓皮、赤茯苓、白茯苓、茯神等,多糖是其主要药效物质。明确茯苓不同药用部位中多糖的组成和含量差异,可为茯苓类药材及饮片的产地加工及临床用药提供参考依据。该研究采用高效凝胶渗透色谱(HPGPC)、核磁共振光谱(NMR)等对茯苓菌核不同部位碱溶性多糖的相对分子质量分布、化学组成进行定性比较。结果表明,赤茯苓及茯苓皮中碱溶性多糖的组成与白茯苓中完全一致,均为 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖,相对分子质量分布范围较接近,在 $9.13 \times 10^4 \sim 1.04 \times 10^5$ 。基于 2025 年版《中国药典》茯苓中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的含量测定法,对其供试品溶液的制备方法进行优化。首先,增加了除盐步骤,可使供试品色谱图中仅呈现待测物葡萄糖的色谱峰,降低了分离难度。其次,该试验首次发现,酸性条件下,茯苓 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖水解为葡萄糖的过程中,同时伴随着少量 5-羟甲基糠醛副产物的生成。酸水解反应条件越剧烈,5-羟甲基糠醛的生成量越大,因此,结合单因素试验和响应面试验考察结果,将酸水解时间由 6 h 缩短为 1.5 h,提升了分析效率。经验证,优化后的方法简便、稳定且重复性、准确性良好。采用优化后的含量测定方法评价了茯苓菌核不同部位及茯苓类饮片中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量。结果表明,茯苓不同部位药材中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的含量大小依次为白茯苓、茯神、赤茯苓、茯苓皮。市售茯苓饮片中,色白、质坚的饮片中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量高于色深、质地松泡的饮片。

[关键词] 茯苓; 药用部位; β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖; 含量测定; 响应面法; 5-羟甲基糠醛

Comparative study on composition and content of β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan in different medicinal parts of *Poria cocos*

YANG Chen-xi, WANG Wei-wei, FENG Wei-hong, LIU Xiao-qian, ZHANG Yong-xin, MAO Hui-jing, WANG Zhi-min*, YAN Li-hua*
(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] *Poria cocos* is a commonly used bulk traditional Chinese medicinal material, with multiple parts used medicinally, such as *Poriae Cutis*, *Rubra Poria*, *White Poria*, and *Poria cum Radix Pini*. Polysaccharides are their main active components. Clarifying the composition and content differences of polysaccharides in different medicinal parts of *P. cocos* can provide a reference for processing and clinical application of *P. cocos* medicinal materials and decoction pieces. In this paper, high-performance gel permeation chromatography (HPGPC) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy were employed to qualitatively compare the relative molecular mass distribution and chemical composition of alkali-soluble polysaccharides from different parts of crude *P. cocos*. The results showed that the composition of alkali-soluble polysaccharides in *Rubra Poria* and *Poriae Cutis* was consistent with that in *White Poria*, all of which were β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucans. The relative molecular mass distribution was also relatively close, ranging approximately from 9.13×10^4 to 1.04×10^5 . On the basis of the content determination method of β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan in *P. cocos* according to the 2025 edition of *Chinese Pharmacopoeia*, the preparation method of the test sample solution was optimized. Firstly, a desalination step

[收稿日期] 2025-08-07

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2023YFC3504000);国家药典委员会国家药品标准提高项目(2024Z012,2019Z019);中国中医科学院科技创新工程项目(CI2023E001TS03,CI2021A04406)

[通信作者] *王智民,博士,研究员,主要从事中药化学和质量评价研究,E-mail:zmwang@icmm.ac.cn; *闫利华,博士,研究员,主要从事中药化学和质量评价研究,E-mail:lhyan@icmm.ac.cn

[作者简介] 杨晨曦,硕士研究生,E-mail:yangcx915@163.com

was added, which can enable the test sample chromatogram to present only the chromatographic peak of glucose, thereby reducing the difficulty of separation. Secondly, this experiment discovered for the first time that under acidic conditions, the hydrolysis of β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan to glucose was accompanied by the generation of a small amount of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) as a by-product. A more intense acid hydrolysis reaction condition indicated a greater conversion yield of 5-HMF. Therefore, according to the results of single-factor experiments and response surface methodology experiments, the acid hydrolysis time was shortened from 6 h to 1.5 h, which improved the analysis efficiency. After verification, the optimized method was simple and stable, and had good repeatability and accuracy. Then, the optimized quantitative method was used to evaluate the content of β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan in different parts of crude *P. cocos* and decoction pieces. The results demonstrated that the content of β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan in different medicinal parts of *P. cocos* was in the order of White Poria, Poria cum Radix Pini, Rubra Poria, and Poriae Cutis. Among the commercially available Poria decoction pieces, the content of β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan in the white and hard decoction pieces was higher than that in the dark and loose-textured decoction pieces.

[Key words] *Poria cocos*; medicinal part; β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan; content determination; response surface methodology; 5-hydroxymethylfurfural

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20251113.201

茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核,具有利水渗湿、健脾、宁心等功效。茯苓始载于《神农本草经》,药用历史悠久,在复方中药中应用广泛,也是药食两用的大宗中药材。化学和药理学研究表明,茯苓的主要药效物质是三萜类和多糖类成分^[1]。茯苓三萜类成分具有利尿、抗肿瘤、抗炎、镇静安神等作用^[2],且常作为茯苓质量评价指标,但是其主要成分总含量仅占药材的 0.10%~0.37%。茯苓多糖分为水溶性多糖和碱溶性多糖。水溶性多糖为杂多糖,由不同摩尔比的葡萄糖、半乳糖、甘露糖和岩藻糖等单糖组成^[3],总含量占药材的 0.48%~2.60%^[4]。碱溶性多糖主要由单一葡萄糖组成,基本骨架为 β -1,3-糖苷键连接而成的葡聚糖^[5],并在 C-2、C-4、C-6 位有分支,分支度为 0.02^[6],含量占药材的 70%~90%^[7-9]。茯苓 β -葡聚糖已被证实具有多项健康益处,包括降低血糖和血脂、减少肝脏脂肪变性^[10]、缓解功能性消化不良、增强免疫^[11]、保护 DNA 损伤等作用^[12]。

茯苓传统加工方法为采收后将菌核经反复发汗,趁湿或浸润后切制,亦可趁鲜将菌核按不同部位切制。茯苓切制加工后的饮片形式主要有茯苓皮(深棕色干燥外皮)、赤茯苓(除去茯苓皮后的外层浅棕色部分)、白茯苓(内层白色部分)、茯神(菌核中间带有松根的部分)等。不同药用部位虽源于同一菌核,但功效及临床应用有一定差异,茯苓皮优于利水消肿,赤茯苓优于行水,白茯苓长于健脾渗湿,茯神长于宁心安神^[13-14],这可能与不同药用部位中活性成分含量存在差异有关。已有研究证实,茯苓

菌核不同部位中,三萜类成分含量在茯苓皮中最高,赤茯苓次之,其次为白茯苓和茯神^[15]。但是茯苓多糖在不同药用部位中的分布差异研究较少^[8-9]。

由于多糖类成分结构复杂,相对分子质量高,无紫外吸收,结构鉴定和质量分析较为困难。目前,常用的多糖含量测定方法仍以苯酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法、3,5-二硝基水杨酸法等比色法为主^[16],其专属性和准确性存在一定的局限。建立专属性强、灵敏度高的定量分析方法仍是当前含多糖类中药质量控制的难点。本课题组前期制备了茯苓碱溶性多糖,明确了其组成,在此基础上首次建立了茯苓药材及饮片中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量的 HPLC-ELSD 测定方法^[5]。与紫外-可见分光光度法相比,该方法具有测定指标明确、结果准确、专属性强、重现性好等优点,已收录于 2025 年版《中国药典》茯苓的质量标准项下^[17]。

本研究收集了 15 批不同产地的新鲜茯苓菌核,分别加工制得茯苓皮、赤茯苓和白茯苓药材各 15 批,并采购 33 批市售茯苓类饮片作为实验材料。采用高效凝胶渗透色谱(HPGPC)、核磁共振光谱(NMR)等对茯苓菌核不同部位碱溶性多糖相对分子质量分布、化学组成进行定性比较。在 2025 年版《中国药典》茯苓中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量测定方法的基础上,进一步优化了供试品溶液的制备方法。采用优化后的含量测定方法评价了 45 批茯苓不同部位药材和 33 批市售茯苓类饮片中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的含量差异,明确了其分布规律。该研究为茯苓不同部位药材及饮片产地加工、药效物质揭示及

临床用药提供了重要的参考和依据。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)配有 Alltech 3300 型蒸发光散射检测器(美国 Grace 公司);Shimadzu LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司)配有 Alltech 2000ES 型蒸发光散射检测器(美国 Grace 公司);Shimadzu LC-20A 高效液相色谱仪配有示差折光检测器(日本岛津公司);AVIII HD 600 型核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司);GCK3308 全自动空气源(北京中惠普分析技术研究所);YP2002N 电子天平(上海菁海仪器有限公司);BSA124S-CW 型万分之一电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];XSE105DU 型十万分之一电子分析天平、HE53 型快速水分测定仪[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];DK-98-IIA 型数显智能水浴锅(北京世纪予华仪器有限公司);FW100 高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);DF-101T 集热式恒温加热磁力搅拌器(北京世纪予华仪器有限公司);KQ-250DB 型数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);H1850 台式高速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);EYELA N-1100 旋转蒸发器(北京五洲东方科技发展有限公司);MX-S 可调混悬仪(北京大龙兴创实验仪器有限公司);202-00 台式干燥箱(北京中

兴伟业仪器有限公司)。

1.2 药物

氢氧化钠(天津福晨化学试剂有限公司,批号 20210803);浓盐酸(国药集团化学试剂有限公司,批号 20211111);氘代二甲基亚砜[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,批号 101782498,纯度>99.9%];三氟乙酸(批号 C12188859)、磷酸氢二钾三水合物(批号 C17492190)均购自上海麦克林生化科技股份有限公司;D-无水葡萄糖(批号 110833-201908,纯度>99%)和右旋糖酐分子量标准(套)对照品(批号 140637-646-201203,包括 D3 M_p 9 750、D4 M_p 13 050、D5 M_p 36 800、D6 M_p 64 650、D7 M_p 135 350、D8 M_p 300 600、D2000 M_p 2 000 000)购自中国食品药品检定研究院;5-羟甲基糠醛(批号 CHB231111)、5-甲基糠醛(批号 CHB250128)、糠醛(批号 CHB250213)购自成都克洛玛生物科技有限公司,纯度均>98%;乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);水为娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);其他试剂均为分析纯。

1.3 药材及加工处理

茯苓菌核收集于 2024 年 10—12 月、2025 年 3 月,经中国中医科学院中药研究所闫利华研究员鉴定为多孔菌科真菌茯苓 *P. cocos* 的新鲜菌核,信息见表 1。

表 1 茯苓菌核样品信息

Table 1 Sample information of crude *Poria cocos*

编号	来源	收集日期	鲜品质量/kg
F-1	安徽省安庆市岳西县来榜镇马元村	2024-11-20	2.5
F-2	安徽省安庆市岳西县和平乡	2024-10-13	2.0
F-3	湖北省黄冈市英山县石头咀镇程璋河村	2024-11-07	3.2
F-4	湖北省黄冈市罗田县九资河镇九资河村	2024-11-15	2.3
F-5	湖北省黄冈市英山县杨柳湾镇	2024-10-09	1.5
F-6	云南省普洱市景谷傣族彝族自治县益智乡	2024-10-09	1.0
F-7	云南省楚雄彝族自治州楚雄市大地基乡大地基村	2024-11-22	2.5
F-8	云南省普洱市宁洱哈尼族彝族自治县梅子镇民乐村	2024-11-22	2.4
F-9	云南省保山市腾冲市界头镇	2024-11-24	2.8
F-10	云南省楚雄彝族自治州双柏县妥甸镇箐口村	2024-11-24	5.0
F-11	云南省丽江市永胜县永北镇马家坝村	2024-11-24	3.0
F-12	云南省大理白族自治州永平县博南镇	2024-11-26	3.7
F-13	四川省广元市昭化区元坝镇	2024-12-06	5.0
F-14	四川省广元市昭化区王家镇	2024-12-05	4.5
F-15	湖北省黄冈市英山县石头咀镇程璋河村	2025-03-15	3.5

将新鲜菌核表面泥沙冲洗后剥去外皮,作为茯苓皮,剥皮要求尽量大、薄、匀,少带苓肉。剥皮后靠近皮层的带色苓肉被切制出来作为赤茯苓,白色的

苓肉切成边长为 0.5~2 cm 方块作为白茯苓,分别于 60 ℃烘箱干燥 6 h^[18-19],制得茯苓皮、赤茯苓和白茯苓,备用。茯苓菌核不同部位示意图见图 1。

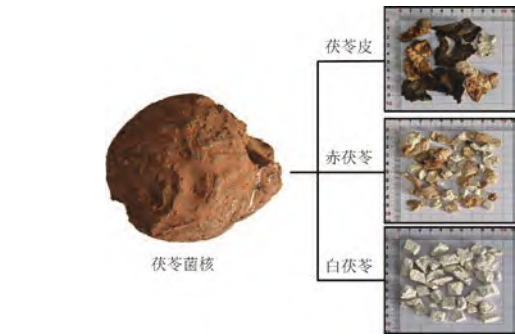


图 1 茯苓菌核不同药用部位
Fig. 1 Different medicinal parts of crude *Poria cocos*

表 2 茯苓类饮片信息

Table 2 Information of *Poria cocos* slices from different medicinal parts

编号	产地	来源	产品批号	饮片类型
T-1	安徽	安徽精诚本草中药饮片有限公司	240401	白茯苓
T-2	安徽	亳州市京皖中药饮片厂	240823	白茯苓
T-3	安徽	河北悦康志德药业有限公司	116250102	白茯苓
T-4	安徽	安徽贵皖药业有限责任公司	250101	白茯苓
T-5	湖北	黄冈金贵中药产业发展有限公司	D24050701	白茯苓
T-6	湖北	湖北弘恩药业有限公司	2408008	白茯苓
T-7	云南	广东合百草制药有限公司	030250101	白茯苓
T-8	云南	洪雅县瓦屋山药业有限公司	241001	白茯苓
T-9	云南	四川新荷花中药饮片股份有限公司	D2409151	白茯苓
T-10	云南	四川国强中药饮片有限公司	2412034	白茯苓
T-11	云南	湖北卫尔康现代中药有限公司	250101	白茯苓
T-12	湖南	广东汇群中药饮片股份有限公司	20241103	白茯苓
T-13	湖南	湖南省弘华中药饮片有限公司	241102	白茯苓
T-14	湖南	湖南省松龄堂中药饮片有限公司	241002	白茯苓
T-15	湖南	江西康庆堂中药饮片有限公司	20250101	白茯苓
T-16	贵州	重庆市国承堂制药有限公司	250203	白茯苓
T-17	安徽	石家庄以岭中药饮片有限公司	Z1706003	白茯苓
T-18	安徽	北京康美制药有限公司	170680331	白茯苓
T-19	湖北	北京东兴堂科技发展有限公司	FL170801	白茯苓
T-20	湖北	绿林赛药铺湖北有限公司	-	白茯苓
T-21	湖南	珠海万宝中药饮片有限公司	180301	白茯苓
T-22	湖南	广州市嘉韩中药饮片有限公司	180301	白茯苓
T-23	云南	云南鸿翔中药科技有限公司	20180401	白茯苓
T-24	云南	云南白药集团中药资源有限公司	YP2421401	白茯苓
C-1	安徽	亳州市京皖中药饮片厂	241101	赤茯苓
C-2	安徽	河北嘉恒冷背药业有限公司	C202407001	赤茯苓
C-3	安徽	河北康益强药业有限公司	24112802	赤茯苓
C-4	云南	云南省普洱市景谷傣族彝族自治县	-	茯苓坨子
P-1	云南	普宁市泽群中药饮片有限公司	241101	茯苓皮
P-2	云南	广东合百草制药有限公司	368240701	茯苓皮
P-3	湖南	洪雅县瓦屋山药业有限公司	240801	茯苓皮
S-1	云南	云南省清平药材市场	-	茯神
S-2	云南	云南省清平药材市场	-	茯神

茯苓皮)粉末各约 2.5 g,精密称定,置 250 mL 锥形瓶中,精密加入 0.5 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液 125 mL,密塞,在 4 ℃下静置提取 4 h,过滤,精密量取续滤液 100 mL,用截留相对分子质量为 3 500 的透析

1.4 饮片
茯苓类饮片购自饮片生产企业及药材市场,包括白茯苓 24 批,赤茯苓 3 批,茯苓坨子 1 批,茯苓皮 3 批,茯神 2 批,信息见表 2,代表性饮片性状见图 2。
2 方法与结果
2.1 茯苓不同部位药材 β -(1→3)-D-葡聚糖的组成比较
2.1.1 提取与纯化
参考文献方法^[5]并进行部分修改。取茯苓菌核(F-15)按不同部位加工的药材(白茯苓、赤茯苓、

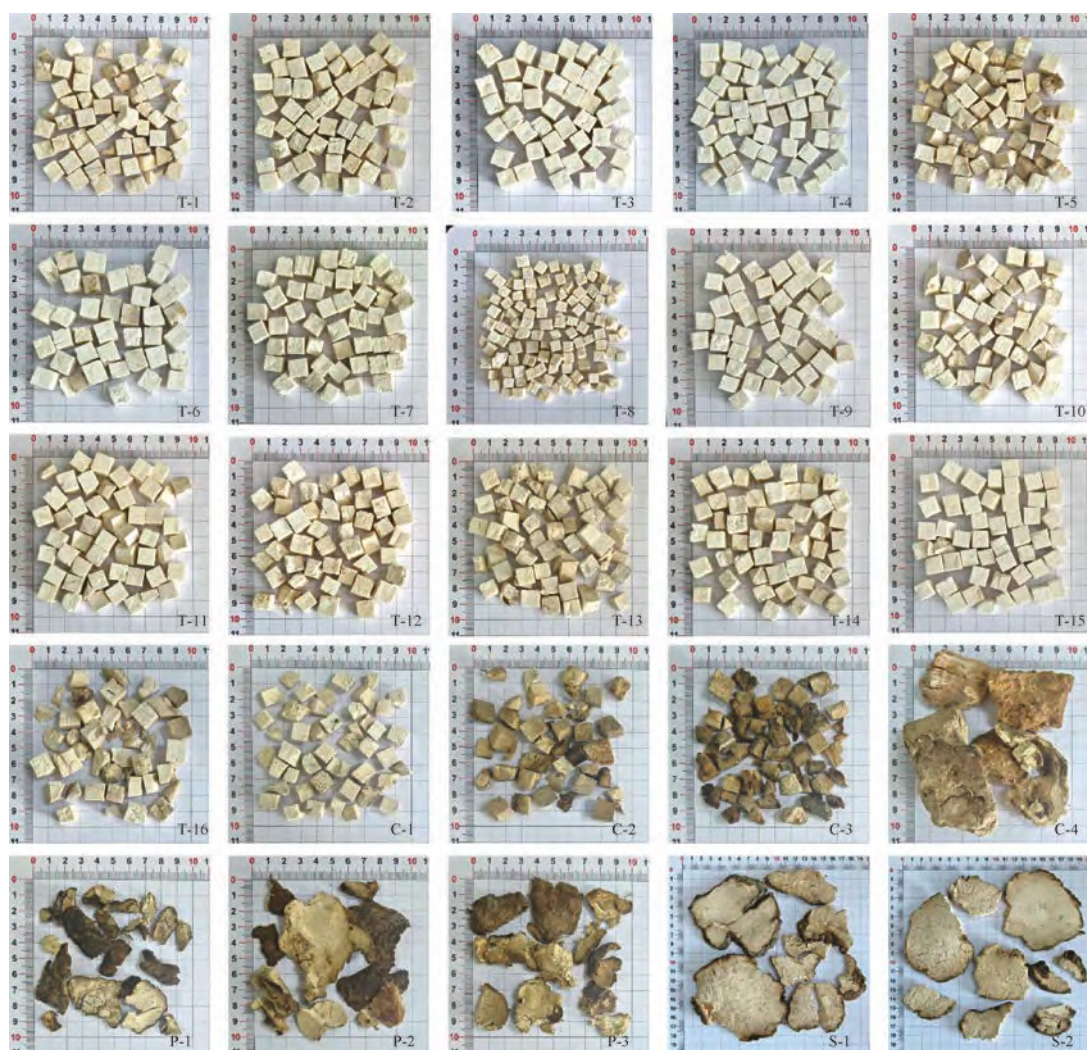


图 2 代表性茯苓类饮片性状

Fig. 2 Representative pictures of *Poria cocos* slices from different medicinal parts

袋加水透析 48 h, 除去盐类和水溶性杂质, 截留液冷冻干燥, 得白茯苓、赤茯苓和茯苓皮 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖各 1.60、1.61、0.83 g, 得率分别为 80.0%、80.5%、41.5%。其性状分别为白色、浅棕色和深褐色的不规则片状固体, 见图 3A。

2.1.2 相对分子质量测定

参考文献方法^[11]并进行部分修改, 采用高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 对茯苓不同部位药材 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的相对分子质量分布进行测定。

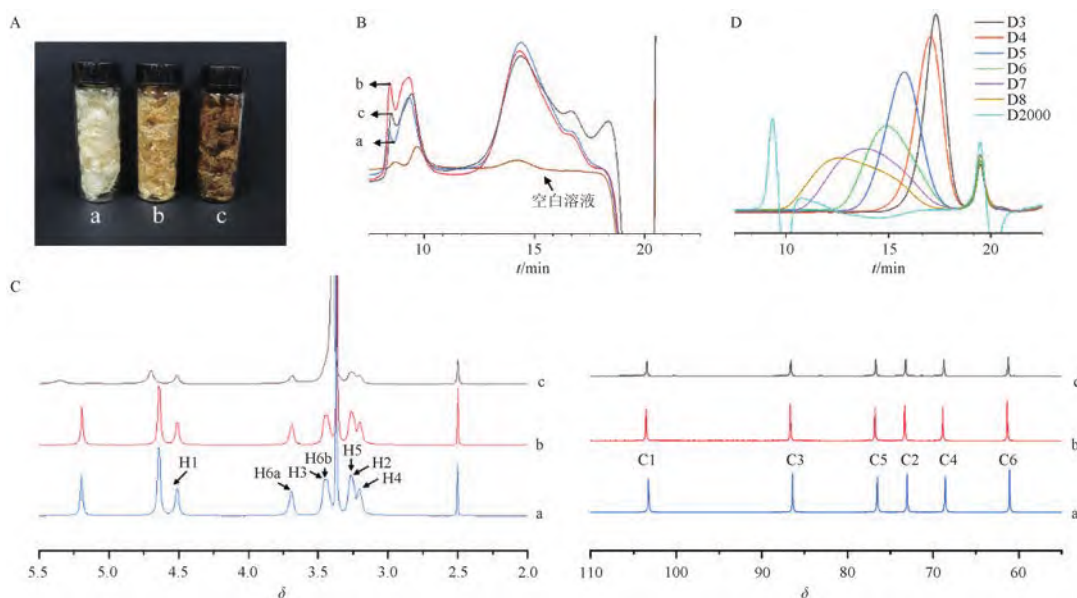
2.1.2.1 色谱条件 Shodex OH pak SB-804 HQ 色谱柱 (8.0 mm $\times$ 300 mm, 10 μ m), 流动相 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹磷酸氢二钾溶液, 流速 0.5 mL $\cdot$ min⁻¹, 柱温 35 $^{\circ}$ C, 进样体积 50 μ L, 示差折光检测器, 检测池温度 35 $^{\circ}$ C。

2.1.2.2 对照品溶液的制备 取已知相对分子质量的右旋糖酐分子量标准 (套) D3~D8 和 D2000 系列对照品适量, 精密称定, 加 2.1.2.1 项流动相溶解并稀释制成 1 mg $\cdot$ mL⁻¹的溶液, 即得。

2.1.2.3 供试品溶液的制备 取 2.1.1 项制得的茯苓不同部位药材 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖各约 10 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加 0.5 mol $\cdot$ L⁻¹的氢氧化钠溶液 1 mL 溶解, 用 2.1.2.1 项流动相稀释至刻度, 制成 1 mg $\cdot$ mL⁻¹的溶液, 即得。

2.1.2.4 空白溶液的制备 除不加 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖外, 其余同 2.1.2.3 项供试品溶液制备方法, 用于检测溶剂峰的影响。

2.1.2.5 标准曲线绘制 精密吸取上述系列对照品溶液各 50 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 见图 3D,



a. 白茯苓; b. 赤茯苓; c. 茯苓皮。

图3 茯苓不同药用部位 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的性状图(A)、HPGPC图(B)、 ^1H -NMR和 ^{13}C -NMR图(C)及右旋糖酐对照品溶液的HPGPC图(D)

Fig. 3 The characteristics diagrams (A), HPGPC chromatograms (B), ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectrum (C) of β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan in different parts of crude *Poria cocos* and HPGPC chromatogram of the dextran reference standard solution (D)

采用 GPC 软件对结果进行分析,以对照品重均相对分子质量(weight-average molecular weight, M_w)的对数值为纵坐标,保留时间(t)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $\lg M_w = -0.000\ 953\ 801\ 4t^3 - 0.000\ 953\ 801\ 4t^2 - 0.561\ 798\ 1t + 9.717\ 225$ ($r = 0.999\ 8$)。

2.1.2.6 相对分子质量测定 根据回归方程计算茯苓不同部位药材中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的相对分子质量,见表3,HPGPC图见图3B。结果表明,白茯苓、赤茯苓和茯苓皮中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的 M_w 分别为 9.79×10^4 、 1.04×10^5 、 9.13×10^4 。聚合物分散指数(polydispersity index, PDI)分别为1.266、1.273、1.563,表明白茯苓和赤茯苓 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的相对分子质量分布窄,具有较好的均一性^[3];茯苓皮 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖因纯度略低,相对分子质量分布略宽。

2.1.3 核磁共振光谱分析

称取2.1.1项制得的茯苓不同部位药材 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖样品约20 mg,加入0.6 mL 氘代二甲基亚砜($\text{DMSO}-d_6$)充分溶解后转移至5 mm 核磁管中,在600 MHz 核磁共振光谱仪的磁场中进行检测。

茯苓不同部位药材 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的 ^1H -

表3 茯苓不同部位药材 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖相对分子质量Table 3 Relative molecular mass of β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan from different medicinal parts of crude *Poria cocos*

样品	数均相对分子质量(M_n)	重均相对分子质量(M_w)	Z均相对分子质量(M_z)	聚合物分散指数(M_w/M_n)
白茯苓	77 344	97 949	119 298	1.266
赤茯苓	81 490	103 756	127 206	1.273
茯苓皮	58 398	91 285	122 325	1.563

NMR和 ^{13}C -NMR图谱见图3C。经比较,赤茯苓及茯苓皮中的 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖呈现出与白茯苓中的 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖基本一致的碳、氢化学位移信号^[5,20-21],其中,茯苓皮 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖因纯度较低,化学位移响应值较低,也呈现出少量杂质峰信号。

以上结果证实,赤茯苓及茯苓皮中的碱溶性多糖,其组成与白茯苓中完全一致,均为 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖,相对分子质量分布范围也比较接近,在 $9.13 \times 10^4 \sim 1.04 \times 10^5$ 。

2.2 茯苓 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖 HPLC-ELSD 含量测定方法

2.2.1 色谱条件

Nacalai Tesque COSMOSIL Sugar-D 色谱柱

(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(80:20), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 对照品溶液进样体积 10、20 μL, 供试品溶液进样体积 10 μL(白茯苓、赤茯苓、茯神)或 20 μL(茯苓皮)。采用蒸发光散射检测器检测:漂移管温度 70 ℃, 载气流速 2 L·min⁻¹, 增益值为 4。理论板数按葡萄糖峰计算应不低于 1 500。空白溶液(水)、对照品溶液和茯苓不同部位药材供试品溶液色谱图见图 4。

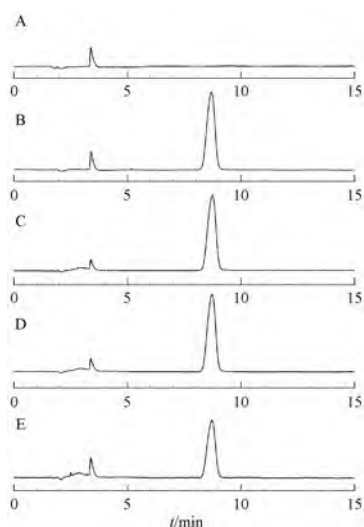


图 4 空白溶液(A)、D-无水葡萄糖对照品溶液(B)、白茯苓(C)、赤茯苓(D)、茯苓皮(E)供试品溶液的 HPLC-ELSD 图

Fig. 4 HPLC-ELSD chromatograms of blank solvent(A), D-glucose reference standard solution(B) and test sample solution from White Poria(C), Rubra Poria(D) and Poriae Cutis(E)

2.2.2 对照品溶液的制备

称取 D-无水葡萄糖对照品 10.07 mg, 置于 20 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为 0.503 5 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备

取茯苓类药材或饮片粉末(过 3 号筛), 约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 0.5 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液 25 mL, 密塞, 冰水浴超声处理(功率 250 W、频率 40 kHz, 温度控制在 10~20 ℃) 45 min, 滤过。精密量取续滤液 1 mL, 置 15 mL 聚丙烯离心管中, 精密加入 1.0 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 0.5 mL, 涡旋 30 s 至充分混匀。加水 5 mL, 涡旋 10 s, 8 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃去上清液。重复上述离心洗涤 1 次。沉淀中加入 7.0 mol·L⁻¹ 三氟乙酸溶

液 6.0 mL, 涡旋 10 s 混匀, 于 110 ℃ 水解 1.5 h, 冷却至室温, 减压回收溶剂至干。残渣加水溶解, 转移至 20 mL 量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 含量计算方法

以进样量(μg)的对数(lg M)为横坐标, 峰面积的对数(lg A)为纵坐标绘制标准曲线, 以外标法计算葡萄糖含量, 通过换算系数折算出样品中 β-(1→3)-D-葡聚糖含量。样品中 β-(1→3)-D-葡聚糖含量按以下公式计算。

$$\beta-(1\rightarrow3)\text{-D-葡聚糖含量} = \frac{25 \times V_1 \times M}{1\,000 \times V_2 \times m} \times 0.9 \times 100\%$$

25 为稀释倍数, M 为外标法计算的葡萄糖质量(μg), V₁ 为供试品溶液体积(mL), V₂ 为供试品溶液进样体积(μL), 1 000 为单位换算系数, m 为样品粉末质量(g), 0.9 为葡萄糖含量换算为 β-(1→3)-D-葡聚糖含量的换算系数^[22-23]。

2.3 供试品溶液制备方法的优化

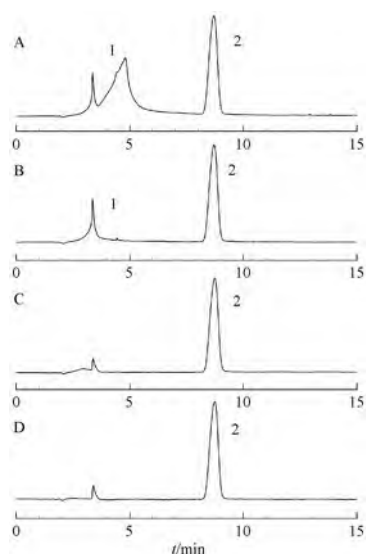
2.2.3 项供试品溶液的制备方法, 是在 2025 年版《中国药典》茯苓中 β-(1→3)-D-葡聚糖含量测定方法的基础上优化确定。

2.3.1 除盐方法考察

供试品溶液制备过程中, 使用到氢氧化钠和盐酸, 因此存在氯化钠残留。不除盐的情况下, 供试品色谱图中有氯化钠响应信号^[5]。因此, 根据茯苓 β-(1→3)-D-葡聚糖不溶于水的性质, 在样品前处理过程中增加除盐步骤。

按 2.2.3 项方法制备供试品溶液, 自“涡旋 30 s 至充分混匀”起, 加水 5 mL, 涡旋 10 s, 8 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃去上清液。分别重复上述离心洗涤 1、2、3 次, 考察除盐次数。后续按 2.2.3 项方法制样, 按 2.2.1 项色谱条件依次进样测定, 色谱图见图 5。

结果表明, 未除盐(水洗 0 次)时, 保留时间 4.5 min 处是氯化钠的色谱峰, 测得 β-(1→3)-D-葡聚糖质量分数为 73.13%。经 1 次水洗后, 氯化钠的峰面积约降低 86.77%, β-(1→3)-D-葡聚糖质量分数降为 69.83%, 损失率为 3.30%。进一步进行 2 次水洗后, 氯化钠峰基本消失, 而 β-(1→3)-D-葡聚糖质量分数仍保持在 69.83%。因此, 综合考虑除盐效果, 操作效率和 β-(1→3)-D-葡聚糖的损失率, 确定 2 次水洗为最佳除盐方法。在经过 2 次水洗除盐处理



1. 氯化钠; 2. 葡萄糖。

图 5 不除盐(A)、除盐 1 次(B)、除盐 2 次(C)、除盐 3 次(D)供试品溶液的 HPLC-ELSD 图

Fig. 5 HPLC-ELSD chromatograms of test sample solution without desalting (A), with one-time desalting (B), with two-time desalting (C) and with three-time desalting (D)

后, 色谱图中仅显示出葡萄糖的单一色谱峰, 有效去除氯化钠杂质的同时最大程度地保留了 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖, 避免因过度水洗导致的成分损失。

2.3.2 酸水解条件单因素考察试验

在固定其他条件不变的基础上, 分别考察水解时间、三氟乙酸浓度、水解温度、三氟乙酸用量对样品中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量的影响。按 2.2.3 项方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项色谱条件进样测定。所有实验平行进行 2 次。

2.3.2.1 水解时间考察 固定三氟乙酸浓度 7 mol·L⁻¹, 水解温度 110 °C, 三氟乙酸用量 6 mL, 设置水解时间分别为 0.5、1、2、3、4、5、6 h。不同水解时间下测得 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的含量结果见图 6A。结果表明, 水解时间为 1 h 时测得 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量最高, 但在水解 2 h 及 3 h 时含量降低, 当水解时间达 3 h 后含量趋于稳定, 因此采用 3 h 水解时间进行后续的单因素试验。

2.3.2.2 三氟乙酸浓度考察 固定水解时间 3 h, 三氟乙酸用量 6 mL, 水解温度 110 °C, 设置三氟乙酸浓度分别为 1、2、3、4、5、6、7、8 mol·L⁻¹。不同三氟乙酸浓度下, 测得 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的含量结果见图 6B。结果表明, 在三氟乙酸浓度为 1~4 mol·

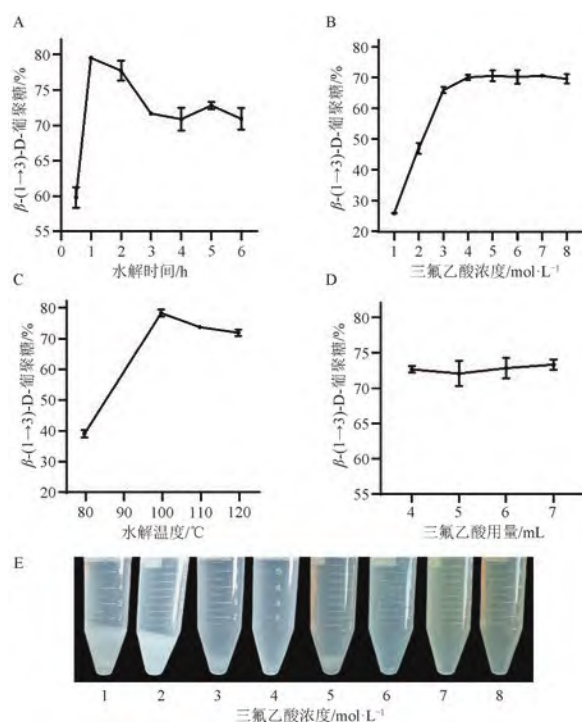


图 6 水解时间(A)、三氟乙酸浓度(B)、水解温度(C)和三氟乙酸用量(D)对茯苓 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量测定结果的影响及不同浓度三氟乙酸水解茯苓 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的实验现象(E)

Fig. 6 Effects of hydrolysis time (A), trifluoroacetic acid (TFA) concentration (B), hydrolysis temperature (C) and TFA volume (D) on the contents of β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan of *Poria cocos*, and experimental phenomena of hydrolysis of β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan of *P. cocos* by TFA at different concentrations (E)

L⁻¹时, 随着酸浓度增加, β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量增加; 在三氟乙酸浓度为 4~8 mol·L⁻¹, 随着酸浓度增加, β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量趋于稳定。同时, 实验中观察到在三氟乙酸浓度为 1~6 mol·L⁻¹时, 水解 3 h 后离心管中均有白色不溶物(沉淀或悬浮), 溶液几乎呈无色, 提示上述条件下 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖未完全水解。在三氟乙酸浓度为 7、8 mol·L⁻¹时, 水解 3 h 后离心管内无不溶物, 溶液呈淡黄色, 见图 6E, 提示上述条件下 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖已完全水解。因此选择三氟乙酸浓度 7 mol·L⁻¹ 进行后续单因素试验。

值得注意的是, 三氟乙酸浓度为 7、8 mol·L⁻¹ 时, 测得 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的含量并没有比 4~6 mol·L⁻¹ 时升高, 结合不同三氟乙酸浓度下水解液颜色变化, 推测该水解过程可能同时存在 β -(1 $\rightarrow$ 3)-

D-葡聚糖的水解和产物葡萄糖的转化。此转化规律将在 2.3.4 项进一步探究。

2.3.2.3 水解温度考察 固定水解时间 3 h, 三氟乙酸浓度 $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 三氟乙酸用量 6 mL, 设置水解温度分别为 80、100、110、120 $^{\circ}\text{C}$ 。其中 80、100 $^{\circ}\text{C}$ 采用水浴加热, 110、120 $^{\circ}\text{C}$ 采用油浴加热。不同水解温度下, 测得 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的含量结果见图 6C。结果表明, 水解温度为 100 $^{\circ}\text{C}$ 时, 测得 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的含量明显高于 80 $^{\circ}\text{C}$, 略高于 110、120 $^{\circ}\text{C}$ 。考虑到采用 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热, 水蒸气蒸发速度快, 需给水浴锅频繁补水, 因此选择 110 $^{\circ}\text{C}$ 油浴加热, 进行后续单因素试验。

2.3.2.4 三氟乙酸用量考察 固定水解时间 3 h, 三氟乙酸浓度 $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 水解温度 110 $^{\circ}\text{C}$, 设置三氟乙酸用量分别为 4、5、6、7 mL。不同三氟乙酸用量下, 测得 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的含量结果见图 6D。结果表明, 三氟乙酸在用量为 4~7 mL, 对 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的含量测定结果几乎没有影响。

2.3.3 酸水解条件响应面法优化试验

在单因素试验基础上, 采用响应面法构建多项式回归模型, 以精准揭示各因素及其交互作用对响应值的影响, 进一步优化酸水解条件。

2.3.3.1 试验设计及结果 基于单因素试验发现三氟乙酸用量对茯苓 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的含量测定结果几乎没有影响, 故以 6 mL 作为三氟乙酸用量固定值。以水解温度(A)、水解时间(B)和三氟乙酸浓度(C)为响应因素, 设定各因素最佳水平选取范围, 以 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量(Y)为响应值, 采用 Box-Behnken 原理设计 3 因素 3 水平的响应面分析试验, 对影响酸水解条件的不同因素进行综合评估。各因素和水平设计见表 4, 响应面设计方案及对应的实验结果见表 5。所有实验平行进行 2 次。

表 4 响应面试验因素水平

Table 4 Factors and levels of response surface experiment

水平	A 水解温度/ $^{\circ}\text{C}$	B 水解时间/h	C 三氟乙酸浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
-1	100	1	3
0	110	2	5
1	120	3	7

2.3.3.2 模型方程的建立与方差分析 用 Design-Expert 13 软件对实验结果进行统计分析, 得到水解

表 5 响应面试验设计方案及结果

Table 5 Design and results of response surface experiment

No.	水解 温度/ $^{\circ}\text{C}$	水解 时间/h	三氟乙酸浓度 / $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	β -(1 $\rightarrow$ 3)- D-葡聚糖/%
1	110	1	3	54.98
2	120	2	7	70.28
3	120	3	5	71.66
4	110	3	7	74.17
5	100	2	3	54.86
6	110	2	5	74.69
7	110	2	5	75.03
8	110	3	3	68.11
9	110	2	5	75.38
10	110	2	5	76.78
11	120	2	3	66.26
12	120	1	5	72.74
13	100	3	5	73.32
14	100	1	5	71.99
15	110	1	7	78.75
16	110	2	5	76.60
17	100	2	7	78.75

时间(A)、水解温度(B)、酸浓度(C)与 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量(Y)的二次多项回归方程为 $Y = 75.70 + 0.2525A + 1.10B + 7.22C - 0.6025AB - 4.97AC - 4.43BC - 2.37A^2 - 0.9018B^2 - 5.79C^2$ 。对该模型进行方差分析, 结果见表 6。由表 6 可知, 回归模型极显著 ($P < 0.0001$), 失拟项不显著, 表明该模型可用于酸水解条件的优化; 多元相关系数 $R^2 = 0.9819$, 表明预测值与实际值之间的相关性较好; 修正后的多元相关系数 $R^2_{\text{adj}} = 0.9586$, 表明该模型拟合度较高, 实验误差小, 可以利用该回归方程确定最佳实验条件^[24]。F 表示各因素对响应值的影响程度, 水解条件的 3 个因素对 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量显著性影响的顺序为三氟乙酸浓度(C) > 水解时间(B) > 水解温度(A)。

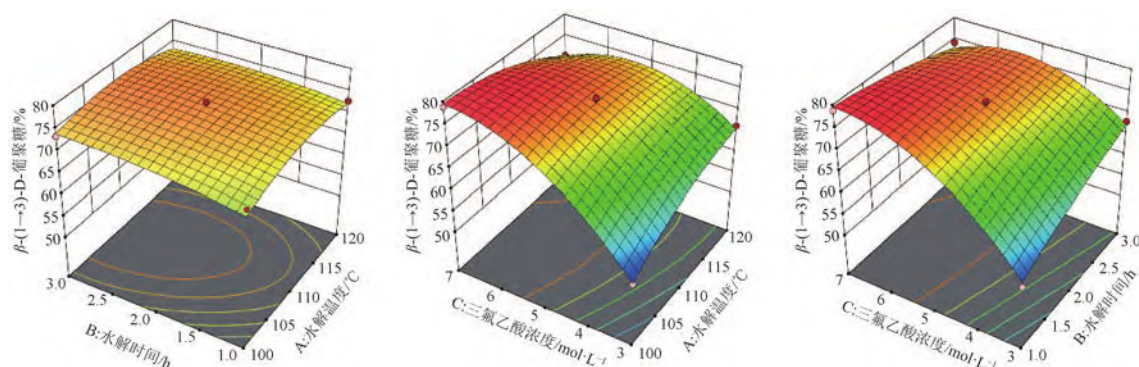
2.3.3.3 因素相互作用分析 各因素对响应值影响并不是简单的线性关系, 两两因素交互作用的响应曲面图见图 7。响应面越陡峭表明 2 个变量之间的交互作用较强。水解温度、水解时间与三氟乙酸浓度的交互作用曲面幅度大, 说明其相互作用对 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量影响极显著。

2.3.3.4 最佳水解条件预测与验证 经响应面分析预测得到最佳水解条件: 水解温度 105.754 $^{\circ}\text{C}$, 水解时间 1.397 h, 三氟乙酸浓度 6.798 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在此条件下 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖质量分数预测值为 80.12%。为方便实际操作, 将验证条件调整为水解

表 6 回归模型的方差分析

Table 6 Analysis of variance for response surface quadratic regression

来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>P</i>	显著性
模型	784.65	9	87.18	42.2	<0.000 1	极显著
<i>A</i> (水解温度)	0.51	1	0.51	0.246 9	0.634 5	
<i>B</i> (水解时间)	9.68	1	9.68	4.69	0.067 2	
<i>C</i> (三氟乙酸浓度)	416.74	1	416.74	201.7	<0.000 1	极显著
<i>AB</i>	1.45	1	1.45	0.702 8	0.429 5	
<i>AC</i>	98.70	1	98.70	47.77	0.000 2	极显著
<i>BC</i>	78.41	1	78.41	37.95	0.000 5	极显著
<i>A</i> ²	23.59	1	23.59	11.42	0.011 8	显著
<i>B</i> ²	3.42	1	3.42	1.66	0.238 9	
<i>C</i> ²	141.24	1	141.24	68.36	<0.000 1	极显著
残差	14.46	7	2.07			
失拟项	10.92	3	3.64	4.10	0.103 1	
纯误差	3.55	4	0.886 9			
总和	799.11	16				

注:差异显著. $P<0.05$;差异极显著. $P<0.01$ 。图 7 水解温度、水解时间和三氟乙酸浓度交互作用下 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量的响应曲面图Fig. 7 Response surface plots of the contents of β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan under the interaction of hydrolysis temperature, hydrolysis time and TFA concentration

温度 110 $^{\circ}\text{C}$, 水解时间 1.5 h, 三氟乙酸浓度 7 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在此条件下进行试验验证, 3 次试验得到 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的平均质量分数为 $78.51\% \pm 1.09\%$, 与理论预测值接近, 表明通过响应面法预测得到的水解条件准确可靠。

2.3.4 酸水解过程中糠醛类副产物的生成规律

2.3.2.2 项下, 在对三氟乙酸浓度进行水解条件单因素考察时发现, 酸浓度为 4~8 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 随着酸浓度增加, 离心管内不溶物明显减少, 即 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的降解量在增大, 溶液逐渐呈现出淡黄色, 见图 6E, 但测得水解后的葡萄糖的含量并未升高。由此推测在三氟乙酸浓度为 4~8 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖在水解为葡萄糖过程中,

可能同时存在葡萄糖向其他物质的转化, 且随着酸浓度的增加, β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖水解量和葡萄糖转化量接近持平, 导致测得葡萄糖的含量未升高。文献研究表明, 在酸性条件下热处理还原糖会产生 5-羟甲基糠醛、糠醛、5-甲基糠醛等化合物^[25-26]。糠醛类化合物是评估美拉德反应程度的工具, 因此, 本试验对不同水解条件下水解液中糠醛类化合物的含量进行测定, 以明确茯苓 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖酸水解过程中是否生成糠醛类副产物及其转化规律。

2.3.4.1 色谱条件 Hydrosphere C_{18} 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 150 mm, 3 μm), 流动相为乙腈-水 (10:90), 流速 0.6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积 10 μL , 检测波长 283 nm。

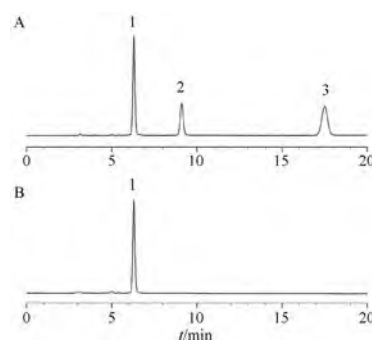
2.3.4.2 对照品溶液的制备 分别称取 5-羟甲基糠醛、糠醛、5-甲基糠醛对照品 15.79、6.88、11.49 mg, 分别置 10 mL 或 25 mL 量瓶中, 加水制成质量浓度分别为 0.631 6、0.688 0、1.149 mg·mL⁻¹ 的单一对照品溶液, 将单一对照品溶液分别稀释 25、100、50 倍, 取稀释后的单一对照品溶液各 1 mL, 置同一 5 mL 量瓶中, 得到质量浓度分别为 5.053、1.376、4.596 mg·L⁻¹ 混合对照品溶液。

2.3.4.3 供试品溶液的制备 取 2.3.2 项酸水解条件单因素考察试验的水解液样品作为供试品溶液。

2.3.4.4 线性范围 称取 5-羟甲基糠醛对照品 10.81 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加水制成质量浓度为 0.432 4 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液。将对照品储备液加水逐级稀释, 得到 43.24、21.62、10.81、5.405、0.540 5 mg·L⁻¹ 的对照品溶液, 按 2.3.4.1 项色谱条件进样。以质量浓度 (mg·L⁻¹) 为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归分析, 得到回归方程 $Y = 123\,602X - 4\,092.88$ ($r = 0.999\,9$), 表明 5-羟甲基糠醛在 0.540 5~43.24 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.3.4.5 不同水解条件的水解液中糠醛类化合物含量测定 取 2.3.2 项酸水解条件单因素考察试验

的水解液样品按 2.3.4.1 项色谱条件进行测定。水解液样品 (水解条件为水解温度 110 ℃, 水解时间 3 h, 三氟乙酸浓度 7 mol·L⁻¹、三氟乙酸用量 6 mL) 和混合对照品溶液色谱图见图 8。结果显示, 水解液样品中仅检出 5-羟甲基糠醛, 未检出 5-甲基糠醛和糠醛, 因此仅对 5-羟甲基糠醛的含量进行测定, 结果见图 9 [β -(1→3)-D-葡聚糖和 5-羟甲基糠醛的含量均按 0.5 g 药材粉末中的量计]。



1. 5-羟甲基糠醛; 2. 糠醛; 3. 5-甲基糠醛。

图 8 糠醛类对照品溶液 (A) 与水解液样品供试品溶液 (B) 的 HPLC 图

Fig. 8 HPLC chromatograms of furanic reference substances solution (A) and hydrolysate test sample solution (B)

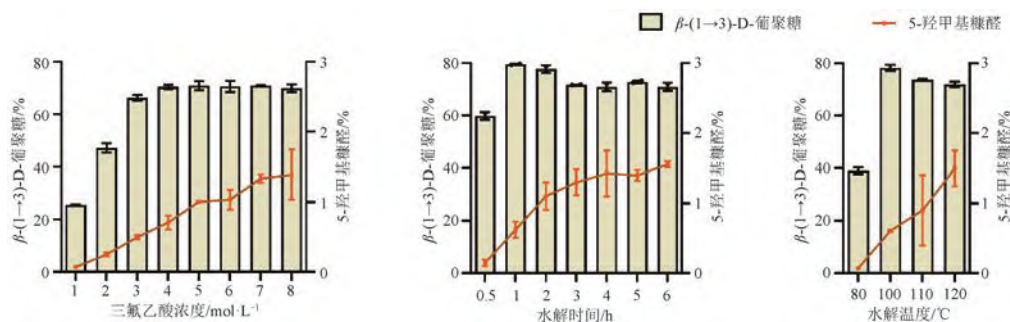


图 9 不同酸水解条件下 β -(1→3)-D-葡聚糖与 5-羟甲基糠醛含量变化规律 ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

Fig. 9 Variation patterns of β -(1→3)-D-glucan and 5-HMF contents under different acid hydrolysis conditions ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

如图 9 所示, 随着三氟乙酸浓度、水解时间和水解温度的增大, 水解液中 5-羟甲基糠醛的含量均升高, 即在水解条件较温和时, 5-羟甲基糠醛含量较低, 水解条件越剧烈, 含量越高。在水解时间和水解温度考察时, β -(1→3)-D-葡聚糖含量达到峰值后开始下降, 而 5-羟甲基糠醛含量持续增加, 推测葡萄糖转化为 5-羟甲基糠醛; 同时 β -(1→3)-D-葡聚糖减少量高于 5-羟甲基糠醛生成量, 推测葡萄糖还可能发生了其他转化。

有文献分析不同酸水解条件下葡聚糖生成糠醛类化合物规律时, 检测到 5-羟甲基糠醛和糠醛的生成, 并推测糠醛是通过 5-羟甲基糠醛经多步异构化再脱水生成^[27]。本研究仅检测到 5-羟甲基糠醛可能是因为底物与水解条件与文献有一定差异。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系

称取 D-无水葡萄糖 40.26 mg, 置 20 mL 量瓶

中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度为 $2.013 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,分别精密量取 1.0、1.5、2.5、3.0、4.0、5.0 mL 于 5 mL 量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,得到质量浓度分别为 0.402 6、0.603 9、1.007、1.208、1.610、2.013 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液,按 2.2.1 项色谱条件进样,进样体积为 20 μL 。以进样量(μg)的对数($\lg M$)为横坐标,峰面积的对数($\lg A$)为纵坐标进行线性回归,得到回归方程 $Y=1.083 6X+3.175 6(r=0.999 5)$ 。结果表明葡萄糖在 8.052~40.26 μg 线性关系良好。

2.4.2 精密度

取白茯苓样品(F-2),按 2.2.3 项方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项色谱条件进样分析,1 日内连续进样 6 次,计算 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量的 RSD 为 0.76%,表明仪器日内精密度良好。精密吸取该供试品溶液,每天进样 3 次,连续进样 3 日,计算 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量的 RSD 为 1.1%,表明仪器日间精密度良好。

2.4.3 稳定性

取白茯苓样品(F-2),按 2.2.3 项方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项色谱条件分别于制备后 0、2、4、8、16、24、36、48 h 进样分析,测定并计算 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量的 RSD 为 0.88%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性

取白茯苓样品(F-2)6 份,按 2.2.3 项方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项色谱条件进样分析。

测定并计算 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖质量分数平均值为 78.45%,RSD 为 1.1%,表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率

2.4.5.1 茯苓 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖对照品的纯度检查 取 2.1.1 项方法制备的白茯苓 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖对照品约 17 mg,精密称定,平行 2 份,置 15 mL 聚丙烯离心管中,加入 $7.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸溶液 6.0 mL,涡旋 10 s 混匀,于 110 $^{\circ}\text{C}$ 水解 1.5 h,冷却至室温,减压回收溶剂至干。残渣加水溶解,转移至 20 mL 量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,过滤,按 2.2.1 项色谱条件测定,测得水解后葡萄糖的质量分数为 86.90%,通过换算系数 0.9 折算成 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的质量分数为 78.21%。按照《中国药典》2025 年版四部通则 2302 灰分测定法,测得白茯苓 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖中总灰分为 0.168%,表明其几乎不含无机盐类杂质。采用 HE53 型快速水分测定仪,测得白茯苓 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的含水量为 5.95%,即以干燥品计,自制 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖对照品的纯度为 83.16%。

2.4.5.2 加样回收率试验 取已知含量的白茯苓样品粉末(F-2)6 份,各约 0.25 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别加入自制茯苓 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖对照品粉末适量,按 2.2.3 项供试品溶液制备方法操作,按 2.2.1 项色谱条件依次进样测定,结果见表 7。 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的平均回收率为 96.86%,RSD 为 2.7%,表明该方法的准确度良好。

表 7 茯苓 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的加样回收率试验($n=6$)

Table 7 Recoveries of β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan of *Poria cocos* ($n=6$)

称样量/g	样品中量/g	加入量/ $\text{g}^{(1)}$	测得量/g	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.250 1	0.196 2	0.196 3	0.352 5	101.8	96.86	2.7
0.250 0	0.196 1	0.197 2	0.346 1	97.24		
0.250 1	0.196 2	0.196 7	0.345 3	96.92		
0.250 2	0.196 3	0.196 2	0.342 1	95.03		
0.249 8	0.196 0	0.196 4	0.342 1	95.14		
0.250 0	0.196 1	0.195 5	0.341 4	95.01		

注:⁽¹⁾加入的茯苓 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖对照品纯度为 78.21%(含水量为 5.95%),因此, β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖纯品的实际加入量需按此纯度折算,实际加入量分别为 0.153 5、0.154 2、0.153 8、0.153 4、0.153 6、0.152 9 g。

2.5 茯苓不同部位药材和饮片的 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的含量测定

取 1.3 项和 1.4 项各批次样品,按 2.2.3 项方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项色谱条件进行测定,

按 2.2.4 项方法计算含量。样品含水量按照《中国药典》2025 年版四部通则 0832 水分测定法第二法进行测定。样品中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量以干燥品计,结果见表 8、9。

表 8 茯苓不同部位药材中β-(1→3)-D-葡聚糖的含量(以干燥品计)(n=2)

Table 8 Contents of β-(1→3)-D-glucan in different medicinal parts of crude <i>Poria cocos</i> (measured by dry products) (n=2) %						
编号	白茯苓		赤茯苓		茯苓皮	
	含水量	β-(1→3)-D-葡聚糖	含水量	β-(1→3)-D-葡聚糖	含水量	β-(1→3)-D-葡聚糖
F-1	6.78	81.13	6.25	79.96	6.39	34.41
F-2	7.82	85.13	6.77	81.63	6.66	31.00
F-3	5.28	77.68	6.28	79.86	5.91	38.68
F-4	5.61	76.05	5.86	76.95	6.04	35.27
F-5	5.95	80.50	6.67	80.69	6.70	47.81
F-6	6.58	79.95	9.12	80.38	6.44	44.53
F-7	5.58	81.19	5.17	79.77	5.40	43.59
F-8	6.54	84.13	5.26	79.13	5.15	42.16
F-9	5.09	79.30	3.65	74.78	5.51	56.31
F-10	5.28	83.31	4.51	81.36	4.37	45.86
F-11	6.08	81.81	4.92	82.61	4.32	61.20
F-12	5.70	85.72	5.23	81.99	4.19	32.23
F-13	6.14	82.43	5.99	83.69	5.40	15.36
F-14	6.26	78.33	6.11	77.23	5.86	43.70
F-15	11.80	79.22	6.40	76.36	4.75	33.04

表 9 茯苓类饮片中β-(1→3)-D-葡聚糖的含量(以干燥品计)(n=2)

Table 9 Contents of β-(1→3)-D-glucan in <i>Poria cocos</i> slices from different medicinal parts (measured by dry products) (n=2) %					
编号	含水量	β-(1→3)-D-葡聚糖	编号	含水量	β-(1→3)-D-葡聚糖
T-1	14.70	85.06	T-18	10.67	77.21
T-2	14.62	84.32	T-19	10.74	78.64
T-3	14.57	71.70	T-20	11.07	78.15
T-4	13.85	73.31	T-21	10.65	79.81
T-5	11.82	78.87	T-22	11.14	80.07
T-6	16.09	74.09	T-23	11.59	77.01
T-7	14.10	72.98	T-24	10.66	78.15
T-8	11.56	73.04	C-1	13.92	63.73
T-9	11.13	73.87	C-2	13.11	60.27
T-10	14.56	71.79	C-3	12.42	59.79
T-11	12.30	80.90	C-4	10.61	52.64
T-12	14.03	79.17	P-1	10.36	35.55
T-13	14.65	81.58	P-2	12.92	44.94
T-14	15.43	69.86	P-3	11.23	42.63
T-15	13.09	83.04	S-1	12.27	61.80
T-16	15.98	58.06	S-2	11.59	68.88
T-17	10.95	75.10			

15 批自制茯苓菌核不同部位药材中,白茯苓、赤茯苓和茯苓皮的β-(1→3)-D-葡聚糖质量分数分别为 76.05%~85.72%、74.78%~83.69%、15.36%~61.20%,均值分别为 81.19%、80.00%、40.87%;33 批市售茯苓类饮片中,白茯苓、赤茯苓、茯苓皮和茯神的β-(1→3)-D-葡聚糖质量分数分别为 58.06%~85.06%、52.64%~63.73%、35.55%~44.94%、61.80%~68.88%,均值分别为 76.49%、59.11%、41.04%、65.34%。

自制白茯苓和赤茯苓药材中β-(1→3)-D-葡聚

糖含量相差甚少,均在 70%以上,茯苓皮中β-(1→3)-D-葡聚糖含量明显低于前两者。不同产地含量波动较小,茯苓皮的波动主要由于各批次间茯苓皮内侧附着的苓肉分布不均,这与剥皮过程中菌核水分含量差异导致茯苓皮产生的不同皱缩程度,以及剥皮时的操作方式密切相关。市售的 24 批白茯苓饮片中β-(1→3)-D-葡聚糖质量分数均高于 50%,符合《中国药典》2025 年版规定。赤茯苓和茯神中β-(1→3)-D-葡聚糖质量分数高于 50%,普遍低于白茯苓,并且表现出较大的波动性。茯苓不同部位

β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量顺序为白茯苓>茯神>赤茯苓>茯苓皮。

3 讨论

3.1 耐用性考察

本试验考察了 Nacalai Tesque COSMOSIL Sugar-D (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m)、Megassil Sugar-D (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m)、Ultimate Diol (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m)、Ultimate XB-NH₂ (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m)、NUCLEODUR 100-5NH₂ (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m)、Waters X Bridge HILIC (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m)、Prevail Carbohydrate ES (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m) 7 种色谱柱对样品的测定结果。不同色谱柱对待测物的保留时间和载样量有一定影响,对色谱峰的分离度和含量测定结果(RSD<4.0%)无明显影响。通过适当调整流速和进样体积,可使供试品溶液与对照品溶液在各色谱柱相应保留时间处有对应色谱峰。考虑色谱柱的填充剂类型、色谱柱的载样量、待测物的分离效果及保留时间等,最终选择 COSMOSIL Sugar-D 色谱柱进行试验。

分别使用 Agilent 1200 型(配有 Alltech 3300 型 ELSD 检测器)和 Shimadzu LC-20AT 型(配有 Alltech 2000ES 型 ELSD 检测器)高效液相色谱仪对同一样品进行含量测定, β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量 RSD 为 0.32%,表明本方法耐用性良好。

3.2 用于糖类化合物分析的色谱填料

亲水作用色谱(HILIC)适用于糖类化合物的分离和分析,填料种类丰富,包括二氧化硅胶微粒,通过化学键合方式在硅胶表面引入氨基、仲胺/叔胺基、二醇基、酰胺基、糖基等极性官能团的改性填料,苯乙烯-二乙烯基苯离子交换树脂,聚合物等^[28-29]。文献研究表明,氨基柱易导致糖和键合相生成 Schiff 碱并影响柱寿命^[30],且还存在柱流失等缺点,因此在选择使用氨基柱时需要关注目标峰的色谱行为。酰胺基键合硅胶色谱柱是常用的 HILIC 色谱柱,但有报道^[30-33]表明葡萄糖主要异构体 α -吡喃葡萄糖和 β -吡喃葡萄糖会在酰胺色谱柱上分离,出现分裂峰。鉴于 HILIC 色谱柱固定相种类繁多,分离机制复杂,若应用于茯苓中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量测定,仍需进行充分的方法学验证。

3.3 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量与水解后葡萄糖含量的换算系数

酸水解是多糖研究中的常用方法,采用 HPLC

对中药多糖含量进行分析时,通常先将多糖水解为单糖,再测定水解液中单糖的含量,以单糖含量总和记为多糖的含量。在水溶液中用酸作催化剂进行水解,通过引入水分子来裂解糖苷键是最常用方法。需要注意的是多糖中的单糖单元是以“脱水”形式存在,水解过程中 1 个糖苷键的断裂会引入 1 分子水,因此完全酸水解后生成的单糖总质量比实际多糖质量要高^[23]。茯苓中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖,经水解后生成葡萄糖,假设测得葡萄糖含量为 x ,则药材中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖实际含量应为 $0.9x$ ^[34-36]。

3.4 对供试品溶液制备方法的优化及对茯苓质量标准的建议

本试验在 2025 年版《中国药典》茯苓中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量测定方法的基础上,进一步优化了供试品溶液的制备方法。在供试品溶液制备方法中增加了水洗除盐步骤,使得供试品溶液色谱图仅呈现待测成分葡萄糖的峰,降低了色谱分离难度,拓宽了色谱柱的选择性。另外,该步骤在去除盐的同时,亦可消除原料中掺入水溶性糖的干扰。基于单因素试验和 Box-Behnken 响应面试验,将水解时间由 6 h 优化为 1.5 h,缩短了样品制备时间。此外,试验中还发现,酸性条件下,茯苓 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖水解为葡萄糖的过程中,同时伴随着少量 5-羟甲基糠醛副产物的生成。酸水解反应条件越剧烈,5-羟甲基糠醛转化量越大。综合以上考察,本试验确定了新的供试品溶液制备方法。经过验证,优化后的方法简便、稳定且重复性、准确性良好。

2025 年版《中国药典》茯苓含量测定项下规定“按干燥品计算,含茯苓 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖以无水葡萄糖(C₆H₁₂O₆)计,不得少于 50.0%”。按照此标准,本试验测定的 15 批白茯苓药材和 24 批白茯苓饮片全部合格。含量限度不作改变。饮片同药材。

3.5 茯苓不同药用部位中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的分布规律及药效差异

本研究结果表明,色白、质坚的茯苓饮片中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖质量分数约在 70% 以上,色深、质地松泡的茯苓饮片中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖质量分数较低,约在 60% 以下,茯苓皮中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖质量分数低于 50%。可见, β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖的含量在一定程度上能够反映茯苓类药材及饮片的质量优劣。

β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖在不同药用部位中的含量

大小依次为白茯苓、茯神、赤茯苓、茯苓皮,三萜类化合物^[37]含量大小依次为茯苓皮、赤茯苓、茯神、白茯苓。白茯苓 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量高、三萜含量低,主补脾气;赤茯苓 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖略低,三萜含量稍高,偏利湿热;茯神中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖和三萜含量居中,擅安神;茯苓皮 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量低而三萜含量高,专利水消肿。这种含量差异在白茯苓和茯苓皮中尤其显著,有可能进一步揭示其药效物质,提示临床处方需按部位精准用药。

4 结论

高效凝胶渗透色谱和核磁共振光谱分析结果表明,茯苓菌核不同药用部位中的碱溶性多糖均为 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖,且相对分子质量分布范围接近,在 $9.13\times 10^4\sim 1.04\times 10^5$ 。依据单因素试验和响应面法优化了2025年版《中国药典》茯苓中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量测定的供试品制备方法,改进后的供试品溶液制备方法不仅缩短了水解时间,而且在色谱分析中仅有单一葡萄糖峰,从而提升效率并降低色谱分离难度。采用优化的含量测定方法系统评价了茯苓菌核不同部位及茯苓类饮片中 β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡聚糖含量,明确了其含量大小依次为白茯苓、茯神、赤茯苓、茯苓皮。

[参考文献]

- [1] NG C Y J, LAI N P Y, NG W M, et al. Chemical structures, extraction and analysis technologies, and bioactivities of edible fungal polysaccharides from *Poria cocos*: an updated review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 261: 129555.
- [2] 路平,史汶龙,杨思雨,等. 茯苓化学成分及药理作用研究进展[J]. *中成药*, 2024, 46(4): 1246.
- [3] CHENG Y, XIE Y, GE J, et al. Structural characterization and hepatoprotective activity of a galactoglucan from *Poria cocos* [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 263: 117979.
- [4] 杨宇. 茯苓质量评价及其醇提物调节脂代谢紊乱的质量标志物研究[D]. 昆明: 云南中医药大学, 2024.
- [5] 王悦,刘晓谦,张永欣,等. 基于碱提多糖收率及含量的茯苓质量评价方法研究[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(2): 443.
- [6] LUO X Y, YU M, LI H J, et al. Structural characteristics and potential antidepressant mechanism of a water-insoluble β -1, 3-glucan from an edible fungus *Wolfiporia cocos* [J]. *Carbohydr Polym*, 2025, 348: 122779.
- [7] 黄佳静,房悦,王妍妍,等. 不同等级茯苓块、茯苓片的外观性状与内在成分的相关性研究[J]. *中南药学*, 2025, 23(1): 78.
- [8] 宋潇,谢昭明,黄丹,等. 茯苓不同产地、不同药用部位多糖含量比较[J]. *山东中医药大学学报*, 2015, 39(2): 186.
- [9] 许甜甜,金传山,吴德玲,等. 茯苓不同药用部位化学成分分析[J]. *安徽中医学院学报*, 2013, 32(1): 77.

- [10] SUN S S, WANG K, MA K, et al. An insoluble polysaccharide from the sclerotium of *Poria cocos* improves hyperglycemia, hyperlipidemia and hepatic steatosis in ob/ob mice via modulation of gut microbiota [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(1): 3.
- [11] TU Y, LUO X, LIU D, et al. Extracts of *Poria cocos* improve functional dyspepsia via regulating brain-gut peptides, immunity and repairing of gastrointestinal mucosa [J]. *Phytomedicine*, 2022, 95: 153875.
- [12] TANG J, NIE J, LI D, et al. Characterization and antioxidant activities of degraded polysaccharides from *Poria cocos* sclerotium [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 105: 121.
- [13] 赵佳琛,王艺涵,金艳,等. 经典名方中茯苓的本草考证[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(10): 327.
- [14] 占慧慧,邓丹,刘媛,等. 基于指纹图谱和网络药理学的茯苓4个药用部位饮片质量标志物预测分析[J]. *中国药理学杂志*, 2023, 58(10): 891.
- [15] 占慧慧,黄丹,邓丹,等. 基于一测多评策略的茯苓不同部位三萜酸分析研究[J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(6): 1061.
- [16] 张文晋,王升,黄璐琦,等. 中药多糖质量评控方法探析[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(14): 3489.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2025: 259.
- [18] 湖北省质量技术监督局. 中药材 茯苓生产技术规程: DB42/T 1006-2014[S]. 2014-10-28.
- [19] 中国菌物学会. 茯苓栽培技术: TMS002-2022[S]. 2023.
- [20] MENG Y, HU C, CHENG J, et al. The extraction, structure characterization and hydrogel construction of a water-insoluble β -glucan from *Poria cocos* [J]. *Carbohydr Res*, 2023, 534: 108960.
- [21] SILVEIRA M L L, SMIDERLE F R, MORAES C P, et al. Structural characterization and anti-inflammatory activity of a linear β -D-glucan isolated from *Pleurotus sajor-caju* [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 113: 588.
- [22] BIERMANN C J. Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry: hydrolysis and other cleavages of glycosidic linkages in polysaccharides [M]. Oregon: Academic Press, 1988.
- [23] 孙捷,段伟萍,王梦岚,等. 完全酸水解-PMP柱前衍生化法分析甘草蜜炙前后多糖含量变化[J]. *中成药*, 2023, 45(8): 2769.
- [24] WANG S Y, YU S X, YANG X, et al. Evaluation of quality attributes of different parts of *Poria cocos* during stress sweating process based on AHP-EWM and RSM [J]. *Ind Crop Prod*, 2024, 210: 118047.
- [25] FUSARO M B, CHAGNAULT V, POSTEL D. Reactivity of D-fructose and D-xylose in acidic media in homogeneous phases [J]. *Carbohydr Res*, 2015, 409: 9.
- [26] XING Q, FU X, LIU Z, et al. Contents and evolution of potential furfural compounds in milk-based formula, ultra-high temperature milk and pasteurised yoghurt [J]. *Int Dairy J*,

- 2021, 120: 105086.
- [27] 王紫萱,宗鑫妍,宋萧萧,等. 不同酸水解条件下葡聚糖生成糠醛类化合物的规律性[J]. 食品科学,2023,44(10):1.
- [28] JANDERA P. Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts [J]. J Sep Sci, 2008, 31(9): 1421.
- [29] 张丹丹,矫芮文,米春孝,等. 用于分离单糖与寡糖的亲水色谱材料制备及应用进展[J]. 食品科学,2024,45(9):261.
- [30] 詹胜群,钟娉婷,葛城,等. 基于酰胺基柱的 HPLC-RID 同时测定异麦芽酮糖中 5 种糖的含量及其影响因素[J]. 中国食品添加剂,2024,35(2):252.
- [31] HAO Z, XIAO B, WENG N. Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC) [J]. J Sep Sci, 2008, 31(9): 1449.
- [32] FU Q, LIANG T, LI Z, et al. Separation of carbohydrates using hydrophilic interaction liquid chromatography [J]. Carbohydr Res, 2013, 379: 13.
- [33] 孙亚灵,赵恂,张玫,等. 蔗糖及其有关物质含量的 HPLC-CAD 分析研究[J]. 药物分析杂志,2019,39(4):588.
- [34] SOLEYMANPOUR Z, NIKZAD M, TALEBNIA F, et al. Xanthan gum production from acid hydrolyzed broomcorn stem as a sole carbon source by *Xanthomonas campestris* [J]. 3 Biotech, 2018, 8(7): 296.
- [35] CHEN M, ZHAO J, XIA L. Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility[J]. Biomass Bioenerg, 2009, 33(10): 1381.
- [36] 食品安全国家标准 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定:GB 5009.8-2023[S]. 2023-09-06.
- [37] 王宏侠. 茯苓不同药用部位化学成分分析及赤茯苓质量标准研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2017.

[责任编辑 张宁宁]