

三七多糖的含量测定方法 及不同部位多糖的含量变化研究

刘岩¹, 范开^{1*}, 李龙军¹, 黄松¹, 刘峰华¹, 韦美滕²

(1. 天津天士力现代中药资源有限公司, 天津 300402;

2. 云南天士力三七种植有限公司, 云南 663000)

[摘要] **目的:**建立三七多糖的检测方法,分析测定三七茎叶、筋条、花和剪口的多糖含量,为三七的质量评价提供依据。**方法:**用 80% 乙醇提取还原性糖,然后用水提取三七多糖,采用蒽酮-硫酸比色法于 528 nm 波长处用分光光度法测定多糖的含量。**结果:**三七不同部位中多糖含量有明显差异,三七筋条中多糖含量最高,三七茎叶中多糖含量最低。**结论:**所用含量检测方法简便、快速、准确,可用于不同部位三七多糖的质量检测和控制,三七筋条、花、茎叶和剪口都有一定的多糖开发价值。

[关键词] 三七; 多糖; 分光光度法; 不同部位

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0118-03

Studies on Content Determination the Polysaccharides in *Panax notoginseng* and Change of Polysaccharides in *Panax notoginseng* Collected at Different Parts

LIU Yan¹, FAN Kai^{1*}, LI Long-jun¹, HUANG Song¹, LIU Feng-hua¹, WEI Mei-tang²

(1. Tianjin Tasly Modern TCM Resources Co. Ltd., Tianjin 300402, China;

2, Yunnan Tasly Planted *Panax notoginseng* Co. Ltd., Kunming 663000, China)

[Abstract] **Objective:** Detection of polysaccharide established on *Panax notoginseng*, determination of polysaccharide content in stem and leaf, ribs, flowers and rhizoma to provide the basis for quality evaluation on *P. notoginseng*. **Method:** The content of polysaccharides was determined by anthrone sulfuric acid method and detected at 528 nm by Shimadzu uv-2450. **Result:** There were significant differences of the content of the extracted polysaccharides among *P. notoginseng* from different parts. **Conclusion:** Used method for the assay is simple, rapid, accurate, and can be used in quality inspection and control in different parts of *P. notoginseng* polysaccharide; Stem and leaf, ribs, flowers and rhizoma have some development value of polysaccharide.

[Key words] *Panax notoginseng*; polysaccharide; UV; different parts

三七为五加科植物人参三七的干燥根和根茎^[1]。主产于云南、广西等地,野生或栽培。其味甘、微苦,性温,主入肝、胃、大肠经,具有滋补、强壮、补血、消肿镇痛、止血散瘀、增强免疫力等功效^[2]。20 世纪末,国内外学者对三七进行了广泛的药理研究和临床实验,取得了大量的新成果,使三七的医学

应用领域得到了拓展。迄今为止,我国学者已对三七中的化学成分进行了较为系统的研究,从三七中分离到皂苷、黄酮、多糖等多种活性成分^[3]。近年来,对于多糖在抗肿瘤、抗衰老、增强机体免疫力、降血糖等方面的作用,国内外学者已作了大量研究工作,三七多糖具有促进与加强网状内皮系统功能、增强免疫力、抗微波辐射、促进恢复创伤和促进骨缺损修复等作用^[4-6],但三七多糖的含量测定报道还较少,不同部位的多糖含量测定尚未见报道。为了更好地开发利用三七,并对其质量进行综合评价,本文对三七多糖的含量进行了检测并对三七不同部位多

[收稿日期] 20120504(006)

[第一作者] 刘岩,硕士研究生,正高级工程师

[通讯作者] * 范开, Tel: 022-86342260, E-mail: fk_7397@sina.com

糖的含量变化进行了考察分析。

1 仪器和试剂

日本岛津 UV-2450 型可见-紫外分光光度计。无水乙醇,浓硫酸,蒽酮, α -萘酚,柠檬酸钠,无水碳酸钠,硫酸铜均为分析纯;葡萄糖对照品(批号 110833-200503,中国药品生物制品检定所),不同部位三七药材(云南文山市售)。

2 方法

2.1 三七多糖溶液的制备

2.1.1 方法 1 取 2 g 三七药材细粉,精密称定,置圆底烧瓶中,加 80% 乙醇 50 mL,置水浴中回流 1.5 h,趁热滤过,残渣用 80% 热乙醇洗涤 3 次,10 mL/次,将残渣及滤纸置烧瓶中,加水 150 mL,置沸水浴中加热回流 2 h,取回流液离心 20 min ($4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),上清液即为三七多糖溶液 1。

2.1.2 方法 2 取 2 g 三七药材细粉,精密称定,置圆底烧瓶中,加水 150 mL 置沸水浴中加热回流 2 h,取回流液离心 20 min ($4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),上清液即为三七多糖溶液 2。

2.2 标准曲线的制备

2.2.1 无水葡萄糖对照溶液的配制 精密称取 105 °C 干燥至恒重的葡萄糖对照品 24.61 mg,置 25 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 $0.984\ 4\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的无水葡萄糖对照溶液,4 °C 保存备用。

2.2.2 显色剂(蒽酮-浓硫酸)的配制 取 98% 的浓硫酸 76 mL,稀释成 100 mL 溶液;称取蒽酮 0.20 g,放入 100 mL 量瓶中,逐渐加入上述配制的硫酸溶液至刻度并摇匀,冷却至室温,备用(需临用前现配)。

2.2.3 标准使用液的配制 精密吸取无水葡萄糖对照溶液各 0.10,0.20,0.30,0.40,0.50,0.60 mL 置于 10 mL 具塞比色试管中且都用蒸馏水补至 2.0 mL。

2.2.4 标准曲线的绘制^[7] 在冰水浴中分别于 2.2.3 标准使用液中缓缓滴加 0.2% 蒽酮-硫酸溶液至刻度,摇匀,放冷后置沸水浴中保温 15 min,取出,立即置冰水浴中冷却 15 min,取出,以相应试剂为空白,于 528 nm 测吸光度,以吸光度为纵坐标,葡萄糖质量为横坐标,绘制标准曲线,得标准曲线及回归方程,回归方程为 $Y = 2.277\ 7X - 0.050\ 5 (r = 0.999\ 1)$ 。结果表明葡萄糖在 $0.1 \sim 0.6\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 与吸光度呈良好的线性关系。

2.3 稳定性试验 精密吸取无水葡萄糖对照溶液 0.3 mL 置于 10 mL 具塞比色试管中且用蒸馏水补

至 2.0 mL,按 2.2.4 中的测定方法,分别于配制后 0, 10, 20, 30, 45, 60 min 测定吸光度,结果表明,供试品溶液在 60 min 内稳定性良好,RSD 1.98%。

2.4 精密度试验 精密吸取无水葡萄糖对照溶液 0.3 mL 置于 10 mL 具塞比色试管中且用蒸馏水补至 2.0 mL,按 2.2.4 中的测定方法测定吸光度,连续测定 5 次,RSD 0.34%,表明精密度良好。

2.5 重复性试验 精密吸取无水葡萄糖对照溶液 0.3 mL 置于 10 mL 具塞比色试管中且用蒸馏水补至 2.0 mL,共 6 份,按 2.2.4 中的测定方法分别测定吸光度,RSD 1.78%,表明重复性良好。

2.6 加样回收 取已知多糖含量的三七毛根细粉 1.2 g,置圆底烧瓶中,加 80% 乙醇 50 mL,置水浴中回流 1.5 h,趁热滤过,残渣用 80% 热乙醇洗涤 3 次,10 mL/次,将残渣及滤纸置烧瓶中,再精密加入 105 °C 干燥至恒重的葡萄糖对照品适量,加水 100 mL 置沸水浴中加热回流 2 h,取回流液离心 20 min ($4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),精密量取上清液,取 0.2 mL 置于 10 mL 具塞比色试管中用蒸馏水补至 2.0 mL,共 6 份,按 2.2.4 的方法测吸光度,由回归方程计算回收率,测定结果见表 1。

表 1 葡萄糖加样回收试验的试验

No.	取样量 /g	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	1.205 5	110.1	114.4	220.5	96.5		
2	1.196 7	109.3	110.2	225.0	105.1		
3	1.201 2	109.7	109.8	213.8	94.8		
4	1.184 9	108.2	105.7	215.2	101.3	99.2	3.80
5	1.213 3	110.8	111.3	222.5	100.4		
6	1.221 4	111.5	108.5	216.8	97.0		

2.7 三七药材中多糖含量的测定 精密吸取 2.1 的样品溶液,且做一定倍数的稀释,取 0.3 mL 于 10 mL 具塞比色试管中且都用蒸馏水补至 2.0 mL,按 2.2.4 的方法测吸光度,由回归方程计算样品多糖含量,测定结果见表 2。

表 2 三七不同部位经两种方法处理后多糖含量的测定($n = 5$)

部位	多糖含量/%	
	方法 1 含量	方法 2 含量
三七主根	16.6	45.0
三七毛根	9.1	18.9
三七筋条	12.2	38.1
三七花	6.5	26.0
三七茎叶	4.2	20.0
三七剪口	6.1	33.5

2.8 三七多糖溶液的理化性质^[8]

2.8.1 Molish 试剂反应^[9] 取三七多糖溶液 1 mL 加入试管中,滴加 α -萘酚试剂两滴,混匀,然后沿试管壁慢慢加入浓硫酸 2 mL,观察有无紫色环出现。

2.8.2 Benedict 试剂反应^[9] 取试管,加入 Benedict 试剂(将 170 g 柠檬酸钠和 100 g 无水碳酸钠溶于 800 mL 水中;另将 17 g 硫酸铜溶 100 mL 热水中。将硫酸铜溶液缓缓倾入柠檬酸钠-碳酸钠溶液中,边加边搅,最后定容至 1 000 mL)2 mL 和 1 mL 多糖溶液,沸水浴中加热 5 min,取出后冷却,观察试管中是否有红棕色沉淀出现。

方法 1 得到的三七多糖溶液的 Molish 反应为阳性,Benedict 试剂反应为阴性;方法 2 得到的三七多糖溶液 Molish 反应和 Benedict 试剂反应均为阳性,表明用方法 1 处理的三七多糖溶液中无还原性单糖。

3 讨论

采用蒽酮-硫酸法测定粗多糖的含量,与苯酚硫酸法相比较,该法无需进行苯酚蒸馏等显试剂预处理,操作简单,稳定性好,在线性关系、稳定性、精密度及回收率方面结果令人满意,可用于三七多糖含量的测定。

在多糖含量测定中,得到相应多糖对照品较困难,多采用单糖如葡萄糖代替为对照品,测定样品多糖的相对含量。本实验中先用 80% 乙醇提取除去大部分还原性糖,然后用水提取三七多糖,并对多糖溶液用 Molish 反应和 Benedict 试剂反应进行鉴别,张慧芳等^[10]在测定百合多糖时提及先用 80% 乙醇提取除去所含单糖、低聚糖及苷类等干扰性成分后再用水提醇沉法得到多糖,本实验主要考察三七不同部位的多糖含量,未对 80% 乙醇提取液的成分作考察,结果表明:方法 2 得到的三七多糖水溶液中含有还原性单糖,整体含量数据偏高,无法真实反应出不同部位的多糖含量;而方法 1 得到的三七多糖溶液较为纯净,可以降低三七药材中还原性糖对多糖含量的影响,使结果更加准确可靠。

比色反应中,蒽酮硫酸溶液加入后一定要摇匀,特别要注意控制比色反应的时间和温度,要保证沸水浴 15 min 后立用冰水冷却 15 min,这样会得到重复性较好的结果。

加样回收率中,由于对照品葡萄糖能溶解于 80% 乙醇,所以在提取样品的时候,是用 80% 的乙醇提取之后,再将葡萄糖加至处理后的样品中,然后进行回收率试验。

目前有关三七多糖质量分数测定的文献相对较少,崔秀明等^[11]测定的三七多糖质量分数为 0.011% ~ 0.18%,而我们测得的三七多糖质量分数为 4.2% ~ 16.8%,分析这种差异的原因,可能是由于三七多糖不同提取处理方法、不同的测定方法等造成的。

本实验对三七不同部位多糖含量分别进行了测定,从结果中可以看出,三七主根中多糖含量最高,三七筋条、毛根、花、茎叶和剪口中均含有多糖,虽然和主根中多糖含量相比较低,但可以利用茎、叶部位提取多糖,从而更加科学合理的利用药材资源。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010.
- [2] Li Xiao-yu. Immunomodulating Chinese herbal medicines[J]. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, 1991, 86 (Supp II): 159.
- [3] 郑光植,杨崇仁.三七生物学及其应用[M].北京:科学出版社,1994.
- [4] 黄芳,蒙义文.活性多糖的研究进展[J].天然产物研究与开发,1998,5(1):92.
- [5] 陈新霞,顾呈华.三七多糖对小鼠免疫功能调节的研究[J].江苏预防医学,2007,18(3):10.
- [6] 姜文茹,毕良佳.三七多糖复合自固化磷酸钙人工骨修复骨缺损的实验研究[J].中国中医药科技,2008,15(5):355.
- [7] 周琴妹,邵家德.冠心平片鉴别及含量测定方法研究[J].时珍国医国药,2007,18(5):1189.
- [8] 周存山,马海乐.条斑紫菜多糖的含量测定及其部分理化性质研究[J].食品科学,2006,27(2):38.
- [9] James F. NORRJS. Experimental organic chemistry[M]. New York: McGRAW-HILL BOOK COMPANY, INC. 1971.
- [10] 张慧芳,蔡宝昌.百合不同炮制品中多糖的测定[J].中草药,2006,37(11):1675.
- [11] 崔秀明,徐璐珊.三七糖类成分的含量及其变化[J].现代中药研究与实践,2003,增刊:21.

[责任编辑 顾雪竹]