

文章编号:1673-1689(2005)05-0072-05

西洋参多糖的定量测定

陈军辉, 谢明勇*, 聂少平, 王远兴, 彭日煌

(南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘要: 建立一种蒽酮-硫酸法测定西洋参多糖质量分数的方法, 并对不同西洋参中多糖的质量分数进行测定比较. 西洋参用水提取, 经多级处理除去脂类、单糖、双糖、低聚糖、氨基酸、蛋白质等杂质制得西洋参精制多糖, 精制多糖溶解与蒽酮-硫酸试剂显色, 通过扫描确定最大吸收波长. 然后用精制多糖测得西洋参多糖对葡萄糖的换算因子, 采用蒽酮-硫酸法比色测定. 结果表明, 此测定方法简便可行, 供试液在 4 h 内显色稳定, 重现性较好, 平均回收率为 96.9%, RSD=1.33% ($n=4$). 来源于不同产地的西洋参多糖质量分数有一定的差异, 其范围为 6.32%~10.8%.

关键词: 西洋参多糖; 蒽酮-硫酸法; 测定

中图分类号: S 567.53

文献标识码: A

Determination of Polysaccharides in *Panax quinquefolium* L.

CHEN Jun-hui, XIE Ming-yong*, NIE Shao-ping, WANG Yuan-xing, PENG Ri-huang
(Key Laboratory of Food Science, Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: An anthrone- H_2SO_4 colorimetry method was developed for the determination of polysaccharides in *Panax quinquefolium* L. samples from different origins. Polysaccharides in *Panax quinquefolium* L. samples were extracted with water, and the interference components such as lipid, monosaccharide, disaccharide, oligosaccharide, amino acids and protein were removed during the pretreatment process. The contents of the polysaccharides were determined by anthrone- H_2SO_4 colorimetry method, and a corrected factor was used in order to minimize the error of determination. The results showed that the method used was simple and practical, and the color of the treated samples could be stabilized within 4h. The average recovery rate for the polysaccharides was 96.6% with 1.33% of RSD ($n=4$). The contents of polysaccharides in *Panax quinquefolium* L. from different origins ranged from 6.32% to 10.8%.

Key words: polysaccharides in *Panax quinquefolium* L.; anthrone-sulfuric acid method; determination

西洋参(*Panax quinquefolium* L.)又名西洋人参、洋参、花旗参、广东人参,为五加科植物.西洋参主产于美国、加拿大等国,近年我国亦有栽培.近年来,关于西洋参提取物及与其它中药配伍应用对机体免疫调节作用的研究已取得很大进展.有文

献^[1]报道西洋参多糖对机体具有免疫增强作用.还有报道^[2]显示,西洋参多糖对异常增高的血糖有降低作用,而且可以减少放射性物质对机体的损害,促进机体核酸和蛋白质的合成.西洋参多糖对肿瘤细胞也有一定的抑制作用,可以抑制肿瘤细胞的过

收稿日期:2004-10-26; 修回日期:2004-11-30.

作者简介:陈军辉(1978-),男,河北石家庄人,营养与食品卫生硕士研究生; * 通讯作者.

度增殖。马秀俐^[3]等报道,西洋参多糖由不同比例的阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和糖醛酸组成。西洋参多糖质量分数的测定对于其提取工艺优化评价和原料选择都具有重要的意义。迄今为止,西洋参多糖测定方法的报道较少,朱晓琳^[4]等报道采用高效毛细管电泳测定西洋参多糖,该方法对设备有较高要求。作者采用改进的蒽酮-硫酸比色法测定西洋参多糖,简便可行,结果可靠。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

UV-2000 紫外分光光度计:尤尼柯公司产品;FA1104 电子天平:上海精天电子仪器厂产品;电子恒温不锈钢水浴锅:上海宏兴机械仪器实业制造公司产品;旋转蒸发器:上海荣生有限公司产品;TDL-5 型离心沉淀机:上海飞鸽系列离心机厂产品;烘箱:南京实验仪器厂产品。

蒽酮:上海化学试剂公司产品;浓硫酸、无水乙醇、丙酮、乙醚,以上试剂均为分析纯;蛋白酶:丹麦诺维信(中国)有限公司产品。

西洋参共 12 个样品,其中 8 个为东北吉林样品(8 号样品为长枝参、7 号样品为短枝参)、2 个为新加坡样品(1 号样品为长枝参、2 号样品为短枝参)、1 个为加拿大样品(西洋参切片生产剩下的西洋参碎片)、1 个为广州样品。

1.2 实验方法

1.2.1 西洋参多糖的提取与精制 称取 10 g 已干燥的西洋参粉末(10 目),置索氏提取器中,加入石油醚(沸程 60~90 °C)100 mL,90 °C 回流提取至无色,滤渣挥干,加体积分数为 80% 的乙醇 200 mL 于 90 °C 水浴回流 1 h,抽滤,滤渣再次回流 1 h,抽滤,挥干乙醇,滤渣加 150 mL 蒸馏水 100 °C 水浴回流提取 1 h,过滤,滤渣重复提取两次。合并滤液冷却至室温后加入相当于西洋参质量 0.2% 的蛋白酶,55 °C 酶解,约 2 h,加热至 95 °C 恒温 30 s 灭酶,冷却至室温,离心,取上清液浓缩至 100 mL,然后用流动的自来水透析 48 h,蒸馏水透析 24 h,将透析液离心,除去沉淀,加无水乙醇使乙醇体积分数达到 70%,冰箱中静置过夜,离心(4 800 r/min,10 min),回收上清液,沉淀用无水乙醇,丙酮,乙醚各洗涤两次,于 50 °C 烘箱中烘干即得西洋参精制多糖。称重,计算得率,备用^[5~7]。

1.2.2 最大吸收波长的确定 精确称取 50 °C 干燥至恒重的西洋参精制多糖 20 mg,置于 100 mL 容量瓶中,加蒸馏水溶解并定容至刻度,按照 1.2.4

中所述方法与蒽酮-硫酸试剂显色,以等量的蒸馏水作空白,手动调节不同波长,测定西洋参精制多糖的最大吸收波长。按此方法,测定 4 种不同西洋参精制多糖的最大吸收波长。

1.2.3 西洋参多糖最佳醇沉体积分数的确定 精确称取西洋参粉末(10 目)15 g,按照 1.2.6 所述方法,制得西洋参多糖提取液,西洋参多糖提取液真空浓缩至 150 mL,将浓缩液分成 5 等份,加入无水乙醇至乙醇的体积分数分别为 40%、50%、60%、70%、80%,置于冰箱中静置过夜,离心(4 800 r/min,10 min),回收上清液,收集沉淀,将沉淀置于 50 °C 烘箱中烘干至恒重,称量。

1.2.4 标准曲线的绘制

1) 标准溶液的配制

精确称取 105 °C 干燥至恒重的葡萄糖标准品 0.2684 g,置于 250 mL 容量瓶中,加蒸馏水并稀释至刻度,配成 1.073 6 mg/mL 的标准溶液,然后分别精确移取 2.5、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 mL 标准溶液,置于 100 mL 容量瓶中稀释至刻度,摇匀,配成系列葡萄糖标准溶液。

2) 蒽酮-硫酸试液的配制

准确称取 0.33 g 蒽酮,加 100 mL 浓硫酸,置于棕色瓶中,混合摇匀置于冰箱中(现配现用)。

3) 标准曲线的制备

分别准确移取 1 mL 系列标准溶液于具塞试管中,以 1 mL 蒸馏水作空白,每管再加入 4 mL 蒽酮-硫酸试液,立即摇匀,置于冰水浴中,然后一起置于沸水浴中加热 10 min,之后用流动自来水迅速冷至室温,放置 10 min 后,于 480 nm 处测定吸光度,以吸光度(A)对葡萄糖质量浓度(C)作回归处理,得回归方程: $C=0.1734A+0.003$, $r=0.9997$ 。

1.2.5 换算因子的测定 精确称取 50 °C 干燥至恒重的西洋参精制多糖 20 mg,置于 100 mL 容量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀,制得西洋参多糖贮备液,蒽酮-硫酸比色法测定其吸光度,由回归方程求出此精制西洋参多糖贮备液中葡萄糖质量浓度,测得其葡萄糖质量浓度,按下式计算换算因子:

$$\text{换算因子 } f = W / (C \times D) \quad (1)$$

式中:W 为称取多糖的质量(mg),C 为精制西洋参多糖贮备液中葡萄糖质量浓度(mg/mL),D 为多糖的稀释因素(mL)。

1.2.6 样品中西洋参多糖质量分数为测定

1) 样品溶液的制备

精确称取西洋参粉末(10 目)5 g,加体积分数

为80%乙醇200 mL,90℃水浴回流1 h,重复一次,趁热抽滤,滤渣用体积分数80%热乙醇洗涤(10 mL×2)。挥干溶剂后,滤渣连同滤纸置于烧瓶中,加75 mL蒸馏水,100℃水浴浸提1 h,趁热过滤,滤渣重复提取2次,合并滤液,离心分离(4 800 r/min,10 min),上清液置于250 mL容量瓶中,加蒸馏水定容至刻度,摇匀。精确移取2 mL置于50 mL容量瓶中,以蒸馏水定容至刻度,摇匀备用。

2) 样品中西洋参多糖质量分数的测定

精确吸取按照1.2.6方法制得的样品溶液1 mL,置于具塞试管中,按照1.2.4所述方法测定吸光度(A),由回归方程计算供试液中葡萄糖质量浓度(C),按下式计算样品中西洋参多糖质量分数。

$$\text{多糖质量分数}(\%) = C \cdot D \cdot f / W \times 100\% \quad (2)$$

式中:C为供试液中葡萄糖浓度(mg/mL),D为多糖的稀释因素(mL),f为换算因子,W为供试西洋参样品的质量(mg)。

1.2.7 重现性实验 精确称取5份西洋参粉末(10目)各5 g,按照1.2.6中方法同时制取5份样品溶液。精确移取各样品溶液各1 mL,分别置于具塞试管中,按照1.2.4下的方法测定吸光度(A),计算西洋参多糖含量。

1.2.8 稳定性试验 精确吸取按1.2.6中方法制取的提取液1 mL于具塞试管中,按照1.2.4下的方法测定吸光度(A),每隔1 h测定1次,连续4 h考察其稳定性。

1.2.9 加样回收率测定 精确称取4份西洋参粉末(10目)各2 g,加入精制西洋参多糖约200 mg,按1.2.6样品溶液的制备和1.2.4的测定方法操作,得西洋参多糖的平均质量分数为9.96%,计算回收率。

1.2.10 不同西洋参中多糖质量分数的比较 精确称取所采集的各种西洋参样品,各3份,按1.2.6样品溶液的制备和1.2.4的测定方法操作,测定吸光度(A),从回归方程中计算供试液中葡萄糖质量浓度(C),据式(1)和式(2)计算出样品中西洋参多糖的质量分数。

2 结果与讨论

2.1 实验结果

2.1.1 精制西洋参多糖的得率 称取4种不同西洋参样品(吉林洋参4号、吉林洋参2号、加拿大洋参、新加坡洋参1号)粉末各10 g,制备西洋参精制多糖,结果见表1。

万方数据

表1 西洋参精制多糖得率结果

Tab.1 Result of preparation for refined polysaccharide

样品	多糖得率/%
吉林4号	4.21
吉林2号	4.56
加拿大	3.71
新加坡1号	3.84
均值	4.08
RSD	9.40

2.1.2 最大吸收波长 分别将吉林洋参4号、吉林洋参2号、加拿大洋参、新加坡洋参1号精制多糖溶解定容,测得最大吸收波长分别为480,478,479,480 nm,最终确定最佳吸收波长为480 nm,结果见图1。

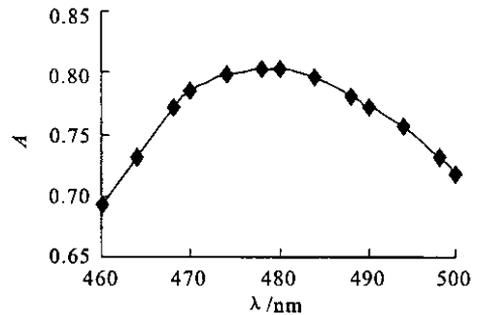


图1 西洋参多糖最大吸收波长

Fig.1 Chromatogram of absorbance wavelength

2.1.3 最佳醇沉体积分数 以吉林洋参4号为样品测定西洋参多糖最佳醇沉体积分数,结果见表2。

表2 西洋参多糖最佳醇沉体积分数试验结果

Tab.2 Result of the best alcohol concentration for polysaccharide sedimentation

醇沉体积分数/%	多糖质量/g
40	0.116 8
50	0.128 0
60	0.203 4
70	0.269 5
80	0.244 1

2.1.4 换算因子 分别将吉林洋参4号、吉林洋参2号、加拿大洋参、新加坡洋参1号中的西洋参精制多糖溶解定容,测定其换算因子,结果见表3。

2.1.5 重现性 以吉林洋参4号为样品测定西洋参多糖含量,检验此测定方法的重现性,结果见表4,相对标准偏差RSD=1.51%。

2.1.6 稳定性 以吉林洋参4号为样品测定稳定性,结果见表5。

表 3 不同西洋参样品的换算因子 f

Tab. 3 Corrected factor of different samples

样品	换算因子 f
吉林 4	1.51
吉林 2	1.46
加拿大	1.48
新加坡 1	1.53
均值	1.50
RSD	2.07%

表 4 西洋参多糖质量分数测定重现性试验结果

Tab. 4 Result of repetition experiment of polysaccharide determination

样品号	多糖质量分数/%
1	10.06
2	10.12
3	9.93
4	9.73
5	9.99
均值	9.96
RSD	1.51

表 5 西洋参多糖质量分数测定稳定性试验结果

Tab. 5 Result of stability experiment of polysaccharide determination

时间/h	A
0	0.281
1	0.290
2	0.286
3	0.287
4	0.292
均值	0.287
RSD	1.49%

2.1.7 加样回收率 以吉林洋参 4 号为样品测定加样回收率,结果见表 6。

表 6 西洋参多糖加样回收率测定结果

Tab. 6 Result of recovery experiments of polysaccharide determination

取样量/g	原质量/mg	加样量/mg	测定量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
2.002 8	0.198 8	0.205 4	0.388 0	96.0		
2.007 6	0.199 3	0.203 7	0.394 1	97.8	96.9	1.33
2.004 1	0.198 9	0.200 8	0.392 5	98.2		
2.003 5	0.198 9	0.206 0	0.399 2	95.6		

2.1.8 不同西洋参中多糖质量分数的比较 测定 12 种不同西洋参样品中多糖的质量分数,结果见

表 7。

表 7 不同西洋参中多糖质量分数的测定结果 ($n=3$)

Tab. 7 The detection results of polysaccharide in different samples

样品	A	质量分数/%	RSD/%
吉林洋参 2 号	0.315	10.80	2.19
吉林洋参 1 号	0.310	10.64	1.91
新加坡洋参 2 号	0.294	10.12	2.82
吉林洋参 4 号	0.291	10.02	2.40
广州洋参	0.276	9.53	1.52
吉林洋参 3 号	0.263	9.11	1.86
吉林洋参 7 号	0.236	8.23	1.34
吉林洋参 8 号	0.233	8.14	1.48
吉林洋参 6 号	0.228	7.97	1.43
吉林洋参 5 号	0.224	7.85	2.36
加拿大洋参	0.207	7.29	2.19
新加坡洋参 1 号	0.177	6.32	1.97

2.2 测定方法评价

目前糖类的定量测定方法主要有:苯酚-硫酸法、地衣酚-硫酸法、Somogyi-Nelson 法、蒽酮-硫酸法等多种方法^[8]。蒽酮-硫酸法的基本原理是利用糖类在浓硫酸作用下,水解生成糠醛或其衍生物,可与蒽酮试剂缩合产生颜色物质,反应后溶液呈蓝绿色,于 620 nm 处有特征吸收,其颜色深浅与糖的浓度成正比^[8]。多糖是由 10 个分子以上的一种或多种单糖连接而成的大分子化合物^[9]。而具有生物活性的多糖主要是指相对分子质量较大,易溶于水的非淀粉质糖类。来源不同的多糖其相对分子质量以及单糖组成有很大的差异,因为组成多糖链的单糖种类不同,它们在浓硫酸作用下脱水的难易程度、脱水产物的结构和稳定性以及与蒽酮互变异构体的显色情况均存在差异,所以完全照搬经典的糖类测定方法测定西洋参多糖会导致测定结果与实际值之间有一定的差异。

作者采用蒽酮-硫酸法测定西洋参多糖,试验表明,此方法操作简单,供试液在 4 h 内显色稳定,重现性好,平均回收率高,检测下限与经典的蒽酮-硫酸法相差不大,且试剂消耗少,价格便宜,一般实验室都能满足测定要求。

2.3 讨论

从西洋参精制多糖提取率结果与西洋参多糖测定结果对比可以看出,西洋参精制多糖的提取率

大约只占西洋参多糖测定值的40%~50%,说明西洋参精制多糖的提取率偏低,这可能是因为西洋参精制多糖的制备过程复杂,每一步除杂质过程都会损失一部分多糖,值得注意的是,西洋参多糖水提液浓缩后冷却至室温就会有沉淀析出,将此沉淀离心分离,用蒸馏水溶解,与蒽酮-硫酸试剂反应,显蓝绿色,可见此沉淀含有大量的糖类物质。本试验所制备的西洋参精制多糖呈淡黄色粉末状,溶解性良好,与文献[9]报道一致。

作者确定的测定波长480 nm与经典的蒽酮-硫酸法最大吸收波长620 nm有较大不同。本试验所取的4种西洋参精制多糖与蒽酮-硫酸试剂反应,颜色均为蓝绿色,与葡萄糖显示的颜色一致,可初步确定所制备的精制多糖为糖类物质,接着又采用苯酚-硫酸试剂与西洋参精制多糖显色并测定最大吸收波长,试验结果表明,西洋参精制多糖显示的颜色与葡萄糖显示的颜色一致,最大吸收波长为484 nm。有文献[8]报道苯酚-硫酸试剂与糖类物质显色,己糖的最大吸收波长为490 nm,而戊糖及糖醛酸的最大吸收波长为480 nm。所以可以进一步确定本试验所制备的精制多糖应为西洋参多糖,且是一种杂多糖,由己糖及戊糖或糖醛酸按一定比例组成,这与马秀俐^[10]等报道的西洋参多糖主要由阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、糖醛酸组成的结果一致。

作者采用实验确定的最大吸收波长测定西洋参多糖与经典的620 nm相比较,其测定结果更准确。笔者采用双波长(480 nm和620 nm)对同一样品进行测定,并且用葡萄糖标准溶液制备两条标准曲线,经过对比计算发现,采用620 nm为吸收波长测得的结果比采用480 nm测得的结果高出50%左右。

不同植物中所含的多糖其相对分子质量、单糖

组成以及一些物理性质差异都很大。所以不同植物中的多糖醇沉条件亦有一定的差异,试验结果表明西洋参多糖的最佳醇沉体积分数为70%。

董群^[11]等用杂多糖或寡糖的组成单糖相对于葡萄糖的校正系数及组成单糖的质量分数计算杂多糖或寡糖的校正系数,从而以葡萄糖为标准测定组成已知的杂多糖或寡糖的含量,但此方法要求知道杂多糖的准确组成。作者采用精制西洋参多糖测得西洋参多糖对葡萄糖的换算因子以减小测定误差,一方面避免了用葡萄糖做标准引起的系统误差,另一方面较之据杂多糖组成计算校正系数或与杂多糖组成相同的混合单糖制作标准曲线简便,而且由于组成上与待测样最接近,结果较真实。研究还表明,西洋参样品不同,换算因子也随之各异。

据文献[2]报道,西洋参中总糖质量分数约为50%~65%,其中多糖质量分数为5%~10%。可见除去西洋参中的单糖、双糖、低聚糖、淀粉质等糖类物质是准确测定西洋参多糖含量的关键之一,如果西洋参单糖、双糖、低聚糖、淀粉质清除不彻底则会导致西洋参多糖含量测定结果偏高。

多糖测定结果表明,吉林洋参1号、吉林洋参2号、吉林洋参4号、新加坡洋参2号等多糖质量分数在10%~11%之间,吉林洋参3号、广州洋参等多糖质量分数在9%~10%之间,吉林洋参7号、吉林洋参8号等多糖质量分数在8%~9%之间,吉林洋参5号、吉林洋参6号、加拿大洋参等多糖质量分数在7%~8%之间,新加坡洋参1号多糖质量分数为6.32%,可见不同的样品多糖含量差异明显,但其产地的经纬度、光照时间、无霜期、降水量、土壤特性以及西洋参的采收季节、采集年限、干燥方法、保存方法等与西洋参多糖含量之间的关系还有待进一步研究确定。

参考文献:

- [1] 郑明权,刘彦臣.西洋参茎叶总皂苷和根多糖的药理学研究进展[J].中医药信息,2000,(2):12-13.
- [2] 孟凡征,李柏.西洋参[M].北京:北京科学技术出版社,2003.
- [3] 马秀俐,赵德超.西洋参多糖PPQI-1~4的分离和表征[J].中草药,2000,31(3):165-167.
- [4] 朱晓琳,马永建.高效毛细管电泳测定西洋参多糖的方法研究[J].中国生化药物杂志,2001,22(6):298-300.
- [5] 傅博强,谢明勇.茶叶中多糖含量的测定[J].食品科学,2001,22(11):69-73.
- [6] 徐建祥,晏志云.酶法脱蛋白技术用于螺旋藻多糖提取工艺的研究[J].食品与发酵工业,1998,24(3):24-27.
- [7] 张仁权,吕洁平.西洋参须废渣中多糖的提取及含量测定[J].中药新药与临床药理,2001,12(2):109-110.
- [8] 张惟杰.复合多糖生化研究技术[M].上海:上海科学技术出版社,1987.
- [9] 中国科学院上海药物研究所.中草药有效成分提取与分离[M].上海:上海科学技术出版社,1983.
- [10] 马秀俐,郝春艳.西洋参多糖PPQI-1~4理化性质的研究[J].药学学报,1999,34(12):946-948.
- [11] 董群,郑丽伊.改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J].中国药学杂志,1996,31(9):550-553.