

5 种当归类药材多糖量的比较

杨博文¹, 王晓晓², 李 曦³, 林廷文¹, 刘永强¹, 马 越¹, 吕光华^{1*}

1. 成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137
2. 德阳市食品药品检验所, 四川 德阳 618000
3. 四川省食品药品检验监测院, 四川 成都 611730

摘要: 目的 比较中国当归 *Angelica sinensis*、日本当归 *A. acutiloba*、韩国当归 *A. gigas*、欧当归 *Levisticum officinale* 和圆当归 *A. archangelica* 药材中多糖的量, 评价这 5 种当归类药材的质量。方法 从不同国家收集了 46 份当归类药材样品, 采用优化的 3,5-二硝基水杨酸法测定多糖量; 比较不同当归药材之间多糖量的差异。结果 这 5 种药材中多糖的量差异很大, 其平均量从高到低的顺序为圆当归 (162.5 mg/g)、欧当归 (142.3 mg/g)、日本当归 (126.8 mg/g)、韩国当归 (81.38 mg/g)、中国当归 (80.75 mg/g)。从日本、中国和韩国收集的日本当归中多糖量也不同, 分别为 131.37、184.29、94.98 mg/g。结论 建立的 3,5-二硝基水杨酸法可准确测定当归类药材中多糖的量; 这 5 种药材中多糖的量不同, 其功效也不同, 不宜混用。

关键词: 中国当归; 日本当归; 韩国当归; 欧当归; 圆当归; 多糖

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)21-3896-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.21.024

Comparison on polysaccharide among five species of *Angelicae Radix*

YANG Bo-wen¹, WANG Xiao-xiao², LI Xi³, LIN Ting-wen¹, LIU Yong-qiang¹, MA Yue¹, LU Guang-hua¹

1. Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
2. Deyang Institute for Food and Drug Control, Deyang 618000, China
3. Sichuan Institute for Food and Drug Control, Chengdu 611730, China

Abstract: Objective Comparing the quality among five species of *Angelicae Radix* (*Danggui*) samples, i.e. Chinese *Danggui* (CDG, the roots of *Angelica sinensis*), Japanese *Danggui* (JDG, the roots of *A. acutiloba*), Korean *Danggui* (KDG, the roots of *A. gigas*), Lovage root (LR, the roots of *Levisticum officinale*), and *Angelica archangelica* root (AAR, the roots of *A. archangelica*) by evaluating the contents of their bioactive components. **Methods** The 3,5-dinitrosalicylic acid colorimetric method (DNS method) was developed to quantify the amount of polysaccharides in a total of 46 species of *Angelicae Radix* collected from different countries based on the optimization of sampling, comparing the differences of polysaccharide among various species of *Angelicae Radix*, etc. **Results** The contents of polysaccharides were found to be significantly different among the five species of *Angelicae Radix*. The order from high to low amount was AAR (162.5 mg/g, $n = 9$), LR (142.3 mg/g, $n = 4$), JDG (126.8 mg/g, $n = 13$), KDG (126.8 mg/g, $n = 13$), and CDG (80.75 mg/g, $n = 12$). For JDG sample, the contents of polysaccharide were significant variety among samples cultivated in Japan (131.37 mg/g, $n = 3$), China (184.29 mg/g, $n = 4$), and Korea (94.98 mg/g, $n = 4$). **Conclusion** The developed DNS method is suitable to accurately quantify the amount of polysaccharide in *Angelicae Radix*. The pharmaceutical efficacy is variety among the five *Angelicae Radix* resulting from the various contents of polysaccharide. These herbs can not be mixed or substituted in clinical use.

Key words: roots of *Angelica sinensis*; roots of *Angelica acutiloba*; roots of *Angelica gigas*; roots of *Levisticum officinale*; roots of *Angelica archangelica*; polysaccharide

收稿日期: 2016-03-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81073044); 国家基础科学人才培养基金课题 (J1310034-02)

作者简介: 杨博文 (1991—), 男, 硕士在读, 主要研究方向为中药品种、质量及资源利用。Tel: 18782903397 E-mail: yangbowenlike@qq.com

*通信作者 吕光华, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药鉴定及资源利用。Tel: (028) 61800232 E-mail: lughcd@aliyun.com

当归 *Angelicae Radix* 为常用补血药, 来源于伞形科(Umbelliferae)植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根^[1]。随着中医药在世界范围内的广泛传播, 当归在中国、日本、韩国的传统医学中均为补血药, 但其原植物来源不同。日本当归来源于伞形科植物 *A. acutiloba* Kitagava 和 *A. acutiloba* Kitagava var. *sugiyamae* Hikino 的干燥根, 而韩国当归则来源于 *A. gigas* Nakai 的干燥根。此外, 欧洲植物药欧当归 *Levisticum officinale* Koch. 的产量高, 化学成分与中国当归相近; 20 世纪 50 年代曾引种到河北、北京、山东等地, 拟解决当时中国当归紧缺的问题。虽然未作为中国当归的药材来源, 但在我国部分地区仍有种植, 并充当中国当归使用^[2]。欧洲的另一种植物药圆当归 *A. archangelica* L. 与中国当归的拉丁学名和英文名相似, 易与中国当归混淆^[3]。因此, 这 5 种当归类药材在国内及国际市场上均有不同程度的混淆、混用情况。

当归多糖是当归药材中的主要活性成分之一, 具有造血、补血作用, 能够拮抗 X 射线诱导的造血干细胞衰老, 刺激白细胞介素-6 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子等造血因子的分泌, 显著促进溶血性贫血小鼠和急性失血小鼠的外周血红蛋白水平的恢复^[4-5]。其还具有调节免疫、抗癌、抗氧化、抗辐射等多种活性^[6-8]。为此, 本实验从不同国家收集了这 5 种当归类药材 46 份样品, 通过优化, 建立了 3,5-二硝基水杨酸法测定多糖量的方法, 并测定了这些样品中多糖的量, 以期评价这些当归类药材的质量, 为其临床应用提供依据。

1 仪器及材料

1.1 仪器

UV-1100 型紫外可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司); DKZ 型电热恒温振荡水浴槽(成都鑫益仪器有限公司); SF-TDL-5C 型离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司); SA224S 型电子分析天平($d=0.1$ mg), BP211D 电子分析天平($d=0.01$ mg)均为北京赛多利斯科学仪器有限公司生产; 优普超纯水制造系统(四川优普超纯科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

对照品 *D*-无水葡萄糖(批号 110833-201205)购于中国食品药品检定研究院; 3,5-二硝基水杨酸为国药集团化学试剂有限公司生产; 盐酸、无水乙醇、氢氧化钠、酒石酸钾钠、无水亚硫酸钠、苯酚、酚酞均为分析纯, 由成都市科龙化工试剂厂生产;

超纯水由优普超纯水制造系统制备。

3,5-二硝基水杨酸显色剂(DNS)的配制: 称取 182 g 酒石酸钾钠于 1 000 mL 烧杯中, 加水 500 mL, 加热, 使溶解。称取 3,5-二硝基水杨酸 6.3 g, 加入上述酒石酸钾钠热溶液中, 再加入 2 mol/L 的氢氧化钠溶液 262 mL, 混匀; 分别加入苯酚和无水亚硫酸钠各 5 g, 搅拌溶解。待溶液冷却后, 转移至 1 000 mL 量瓶中; 加蒸馏水定容至刻度, 混匀; 再转移至棕色试剂瓶中保存, 放置 7 d 后使用^[10]。

1.3 材料

46 份当归类药材样品分别从中国、日本、韩国、德国、奥地利等地收集(表 1), 由成都中医药大学药学院吕光华教授鉴定。其中, 12 份中国当归为 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根; 12 份日本当归(JDG1~12)为 *A. acutiloba* Kitagava 的干燥根或其加工品, 1 份日本当归(JDG13)为 *A. acutiloba* Kitagava var. *sugiyamae* Hikino 的加工品; 8 份韩国当归样品为 *A. gigas* Nakai 的干燥根及其切制片; 4 份欧当归为 *Levisticum officinale* Koch. 的干燥根的切制品; 9 份圆当归为 *A. archangelica* L. 的干燥根的切制品。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

精密称取葡萄糖对照品 25.52 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加蒸馏水溶解, 定容至刻度, 摇匀, 得到葡萄糖对照品贮备液。分别精密吸取该贮备液 0.6、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、2.8 mL 于 10 mL 量瓶中, 加蒸馏水定容至刻度, 混匀。再分别精密吸取 2.0 mL 不同质量浓度的葡萄糖对照品溶液于具塞试管中, 加 DNS 显色剂 2.0 mL, 混匀; 置于恒温振荡水浴槽中显色反应 30 min (99 °C, 100 r/min), 冷却后加蒸馏水定容至 10 mL, 混匀; 转移至 15 mL 离心管中, 离心 (3 000 r/min) 20 min, 制成不同质量浓度梯度的葡萄糖对照品溶液。

2.2 线性范围考察

精密吸取 2.0 mL 蒸馏水于具塞试管中, 自“加 DNS 显色剂 2.0 mL”起操作, 依法制得空白溶液。以空白溶液为背景, 在 520 nm 波长下分别测定不同质量浓度葡萄糖对照品溶液的吸光度(A)值。以 A 值对质量浓度(C)进行线性回归, 得回归方程为 $A=4.0214C-0.1615$, $r=0.9992$ 。表明葡萄糖在 0.061~0.286 g/L 与其 A 值呈良好的线性关系。

表 1 5 种当归类药材样品的来源及多糖量

Table 1 Sources and contents of polysaccharides in five species of *Angelicae Radix*

样品编号	名称	药材性状	来源	样品编号	名称	药材性状	来源
CDG1	中国当归	全根	甘肃岷县	JDG12	日本当归	根切片	韩国首尔
CDG2	中国当归	全根	甘肃岷县	JDG13	日本当归	粗颗粒	日本大阪
CDG3	中国当归	全根	甘肃漳县	KDG1	韩国当归	根切片	韩国江源道平昌郡
CDG4	中国当归	全根	甘肃漳县	KDG2	韩国当归	根切片	韩国江源道平昌郡
CDG5	中国当归	全根	甘肃漳县	KDG3	韩国当归	根切片	韩国 FDA
CDG6	中国当归	全根	甘肃漳县	KDG4	韩国当归	根切片	韩国首尔
CDG7	中国当归	全根	甘肃渭源县	KDG5	韩国当归	根切片	韩国首尔
CDG8	中国当归	全根	甘肃渭源县	KDG6	韩国当归	根切片	韩国首尔
CDG9	中国当归	全根	四川茂县	KDG7	韩国当归	根切片	韩国首尔
CDG10	中国当归	全根	四川北川县	KDG8	韩国当归	全根	吉林珲春市
CDG11	中国当归	全根	云南鹤庆县	EDG1	欧当归	粗颗粒	奥地利格拉茨
CDG12	中国当归	全根	成都荷花池中药材市场	EDG2	欧当归	粗颗粒	奥地利格拉茨
JDG1	日本当归	全根	日本奈良	EDG3	欧当归	粗颗粒	奥地利格拉茨
JDG2	日本当归	全根	日本奈良	EDG4	欧当归	粗颗粒	德国柏林
JDG3	日本当归	粗颗粒	日本东京	AAR1	圆当归	粗颗粒	奥地利格拉茨
JDG4	日本当归	全根	中国四川中江县	AAR2	圆当归	粗颗粒	奥地利维也纳
JDG5	日本当归	全根	中国四川北川县	AAR3	圆当归	粗颗粒	奥地利维也纳
JDG6	日本当归	全根	中国四川北川县	AAR4	圆当归	粗颗粒	奥地利维也纳
JDG7	日本当归	全根	中国四川汉源县	AAR5	圆当归	粗颗粒	奥地利维也纳
JDG8	日本当归	全根	深圳津村药业有限公司	AAR6	圆当归	粗颗粒	波兰
JDG9	日本当归	粗粉	深圳津村药业有限公司	AAR7	圆当归	粗颗粒	波兰
JDG10	日本当归	全根	韩国首尔	AAR8	圆当归	粗颗粒	波兰
JDG11	日本当归	全根	韩国首尔	AAR9	圆当归	粗颗粒	德国柏林

2.3 供试液的制备

精密称取药材粉末（过 2 号筛）1.0 g，加入 50 mL 蒸馏水，密封，称定质量；置于恒温振荡水浴槽中提取 5 h（99 ℃，100 r/min），冷却后补足减失的质量，摇匀；取 10 mL 提取液，离心（3 000 r/min）20 min，精密移取上清液 4.0 mL，注入装有 20 mL 无水乙醇的 50 mL 离心管中，静置 10 h 以上，离心（3 000 r/min）20 min，弃去上清液；加入 2 mL 无水乙醇洗涤离心管管壁和沉淀，离心（3 000 r/min）20 min，弃上清液；将沉淀物置于 50 ℃ 烘箱干燥，得到粗多糖；再精密加入 12 mL 蒸馏水于粗多糖干燥物中，溶解多糖，即得当归类药材多糖水溶液。

精密吸取当归类药材多糖水溶液 1.0 mL，加入 6 mol/L 盐酸 2.0 mL，置恒温振荡水浴槽中水解 30 min（99 ℃、100 r/min）；冷却后各加 1 滴 1% 酚酞试液，再分别滴加 10 mol/L 和 2 mol/L 的氢氧化钠

溶液，中和盐酸至溶液变为粉红色。冷却后，用蒸馏水定容至 10 mL，混匀；转移至 15 mL 离心管中，离心（3 000 r/min）20 min；取上清液，得当归类药材多糖水解液。

精密吸取 2.0 mL 当归类药材多糖水解液于具塞玻璃试管中，加入 2.0 mL DNS 显色剂，混匀，于恒温振荡水浴槽中显色 30 min（99 ℃、100 r/min）；冷却后用蒸馏水定容至 10 mL，混匀；转移至 15 mL 离心管中，离心（3 000 r/min）20 min，取上清液，即得样品供试液。

2.4 空白对照溶液的制备

当归类药材多糖水溶液 1.0 mL 于具塞玻璃试管中，加入 2.0 mL 蒸馏水，置恒温振荡水浴槽中 30 min（99 ℃、100 r/min）。冷却后分别加 1% 酚酞试液和 2 mol/L 氢氧化钠溶液各 1 滴。按照上述“2.1”项下方法，自“用蒸馏水定容至 10 mL”起操作，依法制得空白溶液。

2.5 多糖量的计算

以空白对照溶液为背景,在 520 nm 处测定供试液的 A 值。重复测定 3 次。取平均值,根据回归方程计算供试液中多糖的质量浓度。再根据稀释倍数和样品质量,计算药材粉末样品中多糖的量。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 取同一份当归多糖供试液,水解、显色后连续 6 次测定 A 值,其 A 值的 RSD 为 0.43%。表明仪器的精密度良好。

2.6.2 稳定性试验 取同一当归多糖供试液,分别于水解显色后 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 h 测定 A 值。其 A 值的 RSD 为 3.49%。表明供试液显色后,在 4.0 h 内稳定。

2.6.3 重复性试验 取同一当归样品粉末 6 份,分别制备各供试品溶液,测定多糖量。其 RSD 为 4.62%,表明所用方法重复性良好。

2.7 样品的测定

药材样品粉碎(过 2 号筛)后,每份粉末称取 2 份,按“2.3”项方法制备成供试品溶液,测定多糖的量,再计算 2 份平行样品中多糖量的平均值。46 份当归类药材样品中多糖的量见表 2。

5 种当归类药材 46 份样品中均含有多糖。中国当归、日本当归、韩国当归、欧当归和圆当归中多糖的量分别为 46.83~119.1 mg/g、74.60~186.6 mg/g、61.69~96.19 mg/g、112.2~173.5 mg/g、126.5~205.7 mg/g。这 5 种药材中多糖的量差异很大($P<0.05$),其平均值由高到低分别为圆当归(162.5 mg/g)>欧当归(142.3 mg/g)>日本当归(126.8 mg/g)>韩国当归(81.38 mg/g)>中国当归(80.75 mg/g)。当归多糖具有补血作用^[4-5],还具有调节免疫、抗癌、抗氧化、抗辐射等多种活性^[6-9]。这 5 种当归类药材中多糖量不同,说明他们的生物活性和功效不同。

从日本、中国和韩国收集的日本当归中多糖量分别为 89.67~157.8 mg/g、155.1~186.6 mg/g、74.60~128.1 mg/g。产于日本(131.37 mg/g)、中国(184.29 mg/g)和韩国(94.98 mg/g)的日本当归药材中多糖量之间有显著性差异($P<0.05$)。表明产地对日本当归药材中多糖量影响较大。日本当归在汉方中以补血功效入药^[10],则不同产地的日本当归的补血功效可能不同。

3 讨论

3.1 当归类药材多糖测定方法的选择

测定多糖量的方法主要有 3,5-二硝基水杨酸法

表 2 测定结果($n=2$)

Table 2 Results of determination ($n=2$)

样品编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)	样品编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)
CDG1	88.28	JDG12	74.60
CDG2	46.83	JDG13	157.80
CDG3	68.50	KDG1	78.49
CDG4	76.18	KDG2	61.69
CDG5	72.23	KDG3	96.19
CDG6	71.93	KDG4	80.37
CDG7	99.56	KDG5	83.02
CDG8	83.11	KDG6	79.47
CDG9	97.79	KDG7	88.43
CDG10	119.10	KDG8	83.36
CDG11	80.34	EDG1	112.20
CDG12	65.15	EDG2	134.60
JDG1	89.67	EDG3	173.50
JDG2	116.30	EDG4	148.80
JDG3	119.40	AAR1	163.60
JDG4	169.40	AAR2	171.10
JDG5	186.60	AAR3	177.20
JDG6	176.50	AAR4	162.00
JDG7	155.10	AAR5	166.20
JDG8	85.81	AAR6	142.60
JDG9	101.40	AAR7	205.70
JDG10	128.10	AAR8	126.50
JDG11	87.54	AAR9	147.60

(DNS 法)、苯酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法及直接滴定法。因用苯酚-硫酸法和蒽酮-硫酸法测定多糖量时,无法排除还原性糖的干扰而致使结果偏高,且所用试剂(蒽酮和苯酚)稳定性较差,易被氧化。并且在操作过程中,硫酸在反应时会被稀释而放热,使得反应条件不易控制。而 DNS 法在测定多糖量时,可排除还原性糖的干扰;DNS 试剂稳定性较好,从而避免了多次配制试剂所带入的误差。故本研究采用 DNS 法,测定 5 种当归类药材中多糖量。

3.2 DNS 法测定当归类药材多糖方法的优化

3.2.1 最佳检测波长的选择 为了选择最佳的检测波长,分别对葡萄糖用 DNS 显色剂显色后的溶液和 DNS 显色剂在 400~600 nm 波长下扫描。结果表明,葡萄糖-DNS 显色剂的最大吸收波长为 484 nm,蒸馏水-DNS 显色剂的最大吸收波长为 468 nm;DNS 显色剂在 400~510 nm 内有较大吸收。若选择葡萄糖-DNS 显色剂的最大吸收波长 484 nm 为检测

波长, DNS 显色剂对测定结果干扰严重。可见, 最大吸收波长并非最佳检测波长。依据“吸收最大, 干扰最小”原则, 本研究选择 520 nm 作为检测波长, 测定多糖的量。

3.2.2 DNS 显色剂用量考察 为了减小 DNS 显色剂的干扰, 比较了加入不同用量 DNS 显色剂的供试液的 A 值。结果表明, 当 DNS 显色剂用量小于 2.0 mL 时, 溶液的 A 值随显色剂用量的增加而增大; 达到 2.0 mL 后, A 值趋于稳定。表明 DNS 显色剂用量为 2.0 mL 时, 样品溶液中的还原糖已完全反应、显色。因此, DNS 显色剂以 2.0 mL 为宜。

3.2.3 显色时间考察 对葡萄糖对照品溶液和当归多糖供试液的显色时间进行了考察。结果表明, 30 min 均可显色完全, 故选择为显色时间。

当归多糖具有补血等多种生物活性。这 5 种当归类药材多用作补血药。但是, 它们之间的多糖量差异很大, 说明它们的功效不同, 不宜混用。同时, 本研究建立的 DNS 法测定多糖的方法稳定可靠、操作简便, 适合于测定当归类药材多糖的量。

志谢: 奥地利格拉茨大学 Rudolf Bauer 教授, 香港浸会大学赵中振教授, 西悉尼大学陈金泉教授提供部分药材样品。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
[2] 方洪钜, 吕瑞绵, 刘国声, 等. 挥发油成分的研究 II,

中国当归与欧当归主要成分的比较 [J]. 药学报, 1979, 14(10): 617-623.

- [3] *European Pharmacopoeia* (Volume 2) [S]. 8th edition. 2012.
[4] 张晓君, 祝晨陈, 胡 黎, 等. 当归多糖的免疫活性和对造血功能影响 [J]. 中药药理与临床, 2002, 18(5): 24-25.
[5] Liu P J, Hseih W T, Hao S, *et al.* Hematopoietic effect of water-soluble polysaccharides from *Angelica sinensis* on mice with acute blood loss [J]. *Exp Hematol*, 2010, 38: 437-445.
[6] Zhao L, Wang Y, Shen H L, *et al.* Structural characterization and radioprotection of bone marrow hematopoiesis of two novel polysaccharides from the root of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83: 1712-1720.
[7] 杜小丽, 王改琴, 吴 宏. 当归多糖对小鼠造血细胞表面粘附分子表达的影响 [J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(3): 274-276.
[8] Jin M L, Zhao K, Huang Q S, *et al.* Isolation, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels: A review [J]. *Carbohydr Polym*, 2012(89): 713-722.
[9] 吴瑾瑾, 朱雨晴, 章德军, 等. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定猕猴桃根提取物中多糖 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1649-1650.
[10] Tanaka S, Kano Y, Tabata M, *et al.* Studies on anti-nociceptive activities of aqueous extracts from different varieties of Tōki (author's transl) [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1977, 97(1): 14-17.