

云南不同地区回心草中多糖的含量测定

李金茹, 角星孟, 谢言青, 谭文红, 刘 录*

(云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 测定云南不同地区回心草中多糖的含量。**方法** 通过正交实验确定提取回心草冻干粉的最佳工艺, 采用苯酚-硫酸法进行多糖的含量测定, 并进行方法学考察。**结果** 最佳水提工艺为煎煮 2 次, 一煎 30 min, 加水 24 倍, 二煎 25 min, 加水 22 倍。葡萄糖在 0.01~0.05 mg/mL 范围内与其吸收度呈良好的线性关系, 其线性回归方程为 $y=14.29x+0.2097$ ($R^2=0.9994$), 平均回收率为 98.8%, 15 批回心草水煎液中的多糖含量范围在 15.75%~65.96%。**结论** 该提取方法简便易行, 结果可靠, 精确度高, 可用于回心草中多糖的含量测定。

关键词: 回心草; 多糖; 含量测定

中图分类号: R284

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2023)03-0072-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2023.03.013

Determination of Polysaccharide Content in *Rhodobryum giganteum* in Different Regions of Yunnan

LI Jinru, JIAO Xingmeng, XIE Yanqing, TAN Wenhong, LIU Lu

(Department of Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: **Objective** To determine the content of polysaccharides of *Rhodobryum giganteum* from different regions in Yunnan province, China. **Methods** The optimal process of extraction of freeze-dried powder from *R. giganteum* was determined by orthogonal experiments. The contents of polysaccharides were determined by phenol-sulfuric acid method and investigation of methodological. **Results** The optimal process of extraction with water was determined as follows. The number of times has been decocted as 2 times, the first time with 24 times the amount of water for 30 minutes, and the second time with 22 times the amount of water for 25 minutes. In the range of concentration of 0.01~0.05 mg/mL, glucose had a good linear relationship with its absorption, and the linear regression equation was $y=14.29x+0.2097$ ($R^2=0.9994$). The average recovery of glucose was 98.8%. Moreover, the contents of polysaccharides were between 15.75% and 65.96% in water decoction of *R. giganteum* for 15 batches. **Conclusion** The operation is simple for the extraction method, and its results are characterized by high accuracy and reliability, which can be used to determine the content of polysaccharides for *R. giganteum*.

KEY WORDS: *Rhodobryum giganteum*; polysaccharide; determination of content

回心草为苔藓类真藓科植物暖地大叶藓 *Rhodobryum giganteum* (Hook.) Par. 的干燥全草^[1], 全草入药, 是介于藻类和蕨类之间的高等植物类群^[2]。根据文献^[3-7]记载, 此药味淡, 性平, 具有养心安神、清肝明目的作用, 可用于心悸怔忡、神经衰弱等方面的治疗。《云南中草药选》《云南思茅草药选》《云南中药资源名录》《德宏民族药志》等中均有回心草的记载。

现代临床药理研究证明, 回心草对血液黏度有明显改善作用^[8], 具有降血压、降血脂、抗心肌缺血^[9-10]及抗动脉粥样硬化^[11]等作用。临床上主要用于治疗冠心病、心绞痛和高血压等疾病。研究表明回心草富含果糖^[12]、植物糖蔗糖、果糖 1-酮糖^[13]、短链低聚果糖-益生元^[14]等糖类, 而植物多糖具有抗氧化^[15]、降血脂、降血糖^[16]、抗肿瘤^[17]、抗免疫调节^[18]等药理活性。目前对回心草

基金项目: 中央引导地方科技发展资金项目(202207AB110008); 云南省高校工程研究中心(2020YGG01)

作者简介: 李金茹(1994-), 女, 在读硕士研究生, E-mail: 1448159099@qq.com

* **通信作者:** 刘录(1986-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 中药质量控制研究, E-mail: todayliulu@163.com

的研究主要集中于对其水煎液的化学成分与药理活性研究,对回心草多糖还未进行深入研究,本实验采用紫外可见分光光度法对回心草水煎液中的多糖进行含量测定,为回心草的更深一步研究与开发应用提供有效的参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料 紫外可见分光光度计(批号:2021132902),购于上海元析仪器有限公司;数显恒温水浴锅(批号:HH-S24s),购于郑州长城科工贸有限公司;旋转蒸发仪(批号:EYELAN-1100)东京理化;电子天平(批号:FA2104N),购于上海菁海仪器有限公司;真空冷冻干燥机(批号:FD-1A-50),购于北京博医康实验仪器有限公司;紫砂煎药壶-45U2(潮州市潮安区康雅顺)全自动煎药壶。葡萄糖化学对照品(批号:1122A0223),购于北京索莱宝科技有限公司;浓硫酸(批号:20180410),购于云南杨林工业开发区汕滇药业有限公司;苯酚(批号:20190201),购于天津市大茂化学试剂厂。

药材采集于云南省 4 个地区的 15 个地方(大理凤羽镇、大理上兰乡、大理洱源、大理马登乡、保山蒲缥镇、保山施甸、保山腾冲、临沧鸡飞镇、临沧勐海、临沧三岔河、德宏蒲川乡、德宏中山镇、德宏轩岗乡、德宏河兴乡、德宏象达镇),由三九药业集团有限公司提供,经云南中医药大学杨竹雅教授鉴定为药材暖地大叶藓(*R. giganteum*)的干燥全草。

1.2 冻干粉的制作

1.2.1 正交试验设计 按照卫生部、国家中医药管理局发布的《医疗机构中药煎药室管理规范》国中医药发[2009]3 号文,花草全草类饮片一般煎煮 2 次。加水量一般浸过药面 2~5 cm 左右。因此本实验通过正交试验设计,以出膏率为指标,考察提取过程中 3 个主要因素:煎煮时间、煎煮次数和加水倍数。见表 1。

表 1 因素水平表

水平	因素				
	A 煎煮次数	B 煎煮时间(min)		C 加水倍数	
		一煎	二煎	第一次	第二次
1	1	30	25	20	18
2	2	40	35	22	20
3	3	50	45	24	22

回心草出膏率测定:精密吸取混合煎煮液 20 g,置于恒重蒸发皿,在 105 ℃的干燥箱干燥 3 h,置干燥器中冷却 1 h,迅速称重,质量为 W_2 ,按下式公式计算出膏率。出膏率= $W_2 \times V / 20 \times W_1 \times 100\%$ 。式中: W_1 -回心草的质量(g), W_2 -浓缩液的干浸膏质量(g); V -提取液总质量(g)。

1.2.2 正交试验方案与结果 从河头乡(批号:S14)中分别称取 9 份回心草饮片,每份 100 g,先用纯净水浸泡 30 min,按照 $L_9(3^4)$ 表进行正交试验,滤液合并,按出膏率测定项进行称量计算。D 列为空白列。结果见表 2 和表 3。

表 2 正交试验设计表

试验号	因素				出膏率 /%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	15.03
2	1	2	2	2	16.35
3	1	3	3	3	17.18
4	2	1	2	3	23.32
5	2	2	3	1	22.78
6	2	3	1	2	18.51
7	3	1	3	2	23.19
8	3	2	1	3	16.78
9	3	3	2	1	21.35
K_1	16.18	20.51	16.77	19.72	
K_2	21.53	18.64	20.33	19.35	
K_3	20.44	19.01	21.05	19.09	
R	5.35	1.87	4.28	0.63	

表 3 方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著水平
A	47.87	2	23.93	80.07	0.011	$P<0.05$
B	5.90	2	2.95	9.86	0.09	$P>0.05$
C	31.46	2	15.73	52.63	0.02	$P<0.05$
误差	0.60	2	0.30			

结论:3 个因素对回心草出膏量影响程度为:煎煮次数>加水倍数>煎煮时间;因素 A、因素 C 主具有显著意义,因此影响因子大小顺序为 $C>A>B$, $A_2>A_3>A_1$, $B_1>B_3>B_2$, $C_3>C_2>C_1$,最终方案: $A_2B_1C_2$,

煎煮两次,一煎 30 min,二煎 25 min,第一次加水 24 倍,第二次 22 倍。

1.2.3 回心草冻干粉制备 称取回心草饮片加入饮片量 24 倍的水,浸泡 30 min,煎煮 30 min,用 200 目药典筛趁热过滤,滤渣中加饮片量 22 倍的水,再煎煮 25 min,用 200 目药典筛趁热过滤,合并提取滤液,使用 200 目筛进行趁热过滤,在旋转蒸发仪上浓缩(温度 50 ℃,压力 0.08 MPa)至 100 mL,经真空冷冻干燥即得,备用。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备 对照品溶液:精密称取葡萄糖标准品 10 mg,置于具塞的 200 mL 容量瓶中,加纯水至刻度,制成每 1 mL 含有 0.05 mg 对照品溶液,摇匀,即得。

供试品溶液:精密称取“1.2.3”项制备的回心草冻干粉 10 mg,置于具塞的 200 mL 容量瓶中,加纯水至刻度,定容,摇匀,即得供试品溶液。

2.2 方法学验证

2.2.1 线性关系的考察 精密量取“2.1”项对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、1 mL, 分别置于 10 mL 试管中,加纯水补至 1 mL,摇匀,即得浓度为 0、0.01、0.02、0.03、0.05 mg/mL 的对照品溶液, 分别精密加入 6 % 苯酚 0.5 mL,浓硫酸 2.5 mL,混匀,在 490 nm 波长处测定上述溶液的吸光度,以吸光度为纵坐标,葡萄糖浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 标准方程为 $y=14.29x+0.2097(R^2=0.9994)$ 。结果表明葡萄糖浓度在 0~0.05 mg/mL 范围内与其吸收呈良好的线性关系。结果见表 4 和图 1。

表 4 线性关系考察结果	
浓度(mg/mL)	吸光度(A)
0.010	0.352
0.020	0.498
0.030	0.632
0.040	0.789
0.050	0.921

2.2.2 精密度 取对照品溶液适量,按“2.2.1”项下的方法,连续测定溶液 6 次吸光度值,结果其 RSD 为 0.300 %(n=6),表明仪器精密度良好,测定结果可信。结果见表 5。

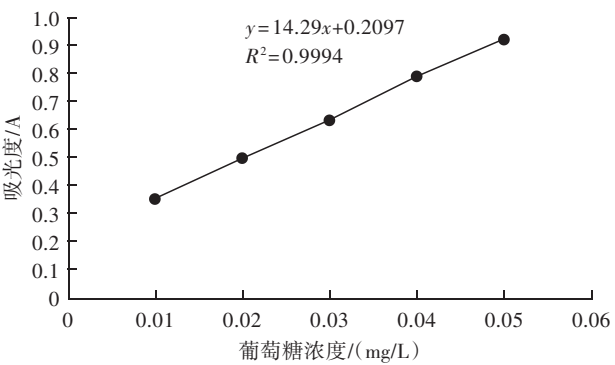


图 1 葡萄糖对照品标准曲线

表 5 回心草水煎液多糖含量测定精密度实验结果						
编号	1	2	3	4	5	6
吸光度	0.860	0.858	0.858	0.862	0.863	0.864
RSD/%	0.300					

2.2.3 稳定性 精密称取同一供试品溶液,在隔 0、2、4、8、12、24 h 分别测定溶液吸光度值,结果其 RSD 值为 0.438 %(n=6),表明供试品在 24 h 内稳定性较好。结果见表 6。

表 6 回心草水煎液多糖含量测定精密度实验结果						
编号	1	2	3	4	5	6
吸光度	0.603	0.604	0.603	0.605	0.600	0.598
RSD/%	0.438					

2.2.4 重复性 精密称取同一供试品 6 份,按“2.2.1”项下分别测吸光度,以考察本法的重现性。结果 RSD =0.502 %(n=6),说明重现性较好。结果见表 7。

表 7 回心草水煎液多糖含量测定重复性实验结果						
编号	1	2	3	4	5	6
吸光度	0.604	0.608	0.601	0.600	0.605	0.606
RSD/%	0.502					

2.2.5 加样回收率 精密称取等量的供试品溶液 6 份, 分别加入一定量葡萄糖对照品溶液,按上述“2.2.1”项下方法进行测定,结果平均回收率为 98.8%,RSD 值为 0.706 %(n=6)。结果见表 8。

2.3 样品含量测定 精密称取 15 批供试品,按“2.1”项方法制备成供试品溶液,并按“2.2.1”项方法测定吸光度值,并计算 15 批供试品中多糖的含量。结果见表 9。

表 8 回心草水煎液多糖含量测定加样回收实验结果

编号	1	2	3	4	5	6
吸光度	0.786	0.778	0.776	0.788	0.789	0.78
回收率/%	103	96.8	95.2	104.8	105.6	98.4
平均值/%	98.8					
RSD/%	0.706					

表 9 不同地区回心草多糖含量

编号	产地	称量质量 /mg	吸光度 /A	多糖含量 /%	平均值 /%
S1	大理凤羽镇	10	0.63	59.10	43.91
S2	大理上兰乡	10	0.62	57.28	
S3	大理洱源	10	0.60	55.19	
S4	大理马登乡	10	0.50	41.19	
S5	保山蒲缥镇	10	0.42	28.87	
S6	保山施甸	10	0.54	46.51	
S7	保山腾冲	10	0.44	32.23	
S8	临沧鸡飞镇	10	0.68	65.96	
S9	临沧勐海	10	0.46	34.75	
S10	临沧三岔河	10	0.51	41.47	
S11	德宏蒲川乡	10	0.54	46.37	
S12	德宏中山镇	10	0.59	52.53	
S13	德宏轩岗乡	10	0.32	15.72	
S14	德宏河头乡	10	0.60	55.05	
S15	德宏象达镇	10	0.40	26.49	

3 结论

本实验制备多糖的方式为水煎煮法,通过紫外分光光度计法对 15 批回心草样品中多糖进行含量测定,多糖含量分别范围在 15.75%~65.96%之间。结果表明该多糖含量测定方法具有良好的准确度,精密度和稳定性,实验方法简单易行。实验为今后进一步研究回心草多糖结构及药理试验奠定实验基础。

4 讨论

云南省 4 个地区所产回心草多糖含量存在显著差异,其中以临沧鸡飞镇的回心草多糖含量最高,德宏象达镇的回心草多糖含量最低。因采收时间、生长年限、产地环境及处理方式等因素,回心草的多糖含量可能存在一定影响。多糖的含量测定有比色法、滴

定法、高效液相色谱法、气相色谱法等多种方法。目前使用的比色法中的苯酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法这两种方法操作简单,测定速度快^[19],苯酚-硫酸法主要用于多聚糖、甲基化的糖和戊糖等糖类的测定,而蒽酮-硫酸法对所有的碳水化合物几乎都可以测定^[20],回心草中含有果糖、戊糖及多糖,因此苯酚-硫酸法是回心草多糖含量测定的理想方法。回心草传统应用上多为回心草水煎液,具有降血糖、降血脂、抗凝血活性、抗炎等药理作用,民间主要用于治疗心脏病、预防心血管等方面的疾病,而回心草水煎液中主要含有多糖成分,因此推测其功效作用与其多糖有着密切关系。

参考文献:

[1] 朱丽萍,蒋晖,房秀艳,等. 云南习用药材回心草的质量标准研究[J]. 云南中医学院学报,2006,29(6):13-16.

[2] 严启新,何广新,张荣平,等. 回心草的生药学研究[J]. 云南中医学院学报,1998,21(3):6-8.

[3] 余月明,马援,夏天,等. 回心草降低心肌缺血区红细胞聚集性及全血屈服应力的实验研究[J]. 中国中药杂志,1995,20(7):429-432.

[4] 雷秀玲,张荣平,董雪峰,等. 民族药滇产回心草及回心康对麻醉大鼠血流动力学的影响[J]. 中国民族民间医药杂志,2001,53(6):351-353,369.

[5] 雷秀玲,张荣平,董雪峰,等. 民族药滇产回心草对大鼠实验性心肌缺血的保护作用[J]. 中草药,2001,32(12):1103-1106.

[6] 余月明,马援,魏辉,等. 回心草防治兔动脉粥样硬化的实验研究[J]. 陕西中医,1994,15(12):562-563.

[7] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:上海科技出版社,1986:886.

[8] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编(下册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1975:249-250.

[9] 吴征镒. 新华本草纲要(第 3 册)[M]. 上海:上海科技出版社,1990:769.

[10] 国家中医药管理局. 中华本草(第 4 卷)[M]. 上海:上海科技出版社,1998:15.

[11] 云南省卫生局革命委员会. 云南中草药[M]. 昆明:云南人民出版社,1971:554.

[12] 王波,刘屏,林辉. 回心草化学成分研究Ⅲ[J]. 解放军药学学报,2008,24(4):296-298.

[13] BORIS P,CARMINE I,GIUSEPPINA T,et al. Sugar composition of the moss *Rhodobryum* (下转第 112 页)

- [52] HAMILTON J L, NAGAO M, LEVINE B R, et al. Targeting VEGF and its receptors for the treatment of osteoarthritis and associated pain[J]. J Bone Miner Res, 2016, 31(5):911-924.
- [53] MIFUNE Y, MATSUMOTO T, TAKAYAMA K, et al. The effect of platelet-rich plasma on the regenerative therapy of muscle derived stem cells for articular cartilage repair [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2013, 21(1):175-185.
- [54] 卢键森. 软骨细胞 mTORC1 活性刺激关节血管形成和加速骨关节炎发展[D]. 广州:南方医科大学,2017.
- [55] HUANG B, WANG W H, LI Q C, et al. Osteoblasts secrete Cxcl9 to regulate angiogenesis in bone [J]. Nat Commun, 2016, 7:13885-13898.
- [56] DODD K M, YANG J, SHEN M H, et al. mTORC1 drives HIF-1 α and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3 [J]. Oncogene, 2015, 34(17):2239-2250.
- [57] 陈果,王宏,汪学良,等. 基于步态分析的膝关节炎病理步态机理及诊疗评估探讨[J]. 云南中医学院学报, 2022,45(4):96-98,102.
- [58] KRAAN P M, BERG W B. Osteophytes:relevance and biology[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2007, 15 (3):237-244.
- [59] KANEKO H, ISHIJIMA M, FUTAMI I, et al. Synovial perlecan is required for osteophyte formation in knee osteoarthritis[J]. Matrix Biol, 2013, 32(3-4):178-187.
- [60] XU Z W, CHEN T M, LUO J, et al. Cartilaginous metabolomic study reveals potential mechanisms of osteophyte formation in osteoarthritis [J]. J Proteome Res, 2017, 16(4):1425-1435.
- [61] AIGNER T, DIETZ U, STÖSS H, et al. Differential expression of collagen types I, II, III, and X in human osteophytes[J]. Lab Invest, 1995, 73(2):236-243.
- [62] 郭雄飞,王挺,汤立新. 膝骨关节炎患者血浆骨硬化蛋白及关节液 YKL-40 水平变化及其临床意义[J]. 新乡医学院学报,2020,37(2):185-188.
- [63] CHANG J C, CHRISTIANSEN B A, MURUGESH D K, et al. SOST/Sclerostin improves posttraumatic osteoarthritis and inhibits MMP2/3 expression after injury [J]. J Bone Miner Res, 2018, 33(6):1105-1113.
- [64] BOUAZIZ W, FUNCK-BRENTANO T, LIN H. Loss of sclerostin promotes osteoarthritis in mice via β -catenin-dependent and -independent Wnt pathways[J]. Arthritis Res Ther, 2015, 17(1):24-34.
- [65] BLANEY DAVIDSON E N, VITTERS E L, BENNINK M B, et al. Inducible chondrocyte-specific overexpression of BMP2 in young mice results in severe aggravation of osteophyte formation in experimental OA without altering cartilage damage [J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74 (6):1257-1264.
- [66] SCHELBERGEN R F P, MUNTER W, BOSCH M H, et al. Alarmins S100A8/S100A9 aggravate osteophyte formation in experimental osteoarthritis and predict osteophyte progression in early human symptomatic osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2016, 75(1):218-225.
- [67] 李军伟. TGF- β 1、IGF-1 和 BMP-2 在骨关节炎骨赘发生过程中的基因表达[D]. 北京:中国协和医科大学,2005.
- [68] ZHOU C H, ZHANG X, XU L L, et al. Taurine promotes human mesenchymal stem cells to differentiate into osteoblast through the ERK pathway[J]. Amino Acids, 2014, 46(7):1673-1680.

(收稿日期:2022-10-10)

(上接第 75 页)

- ontariense* (Kindb.) Kindb.[J]. Nat Prod Res, 2012, 26 (3):209-215.
- [14] BORIS P, MARKO S, VELE T, et al. Further study on fructooligosaccharides of *Rhodobryum ontariense* [J]. Cryptogamie Bryol,2012,33(2):191-196.
- [15] 张亚楠,董旭然. 秋葵多糖提取及抗氧化性的研究进展[J]. 现代农村科技,2019,578(10):66-67.
- [16] 藏传刚,任珊,刘宇超,等. 玉米须多糖与普洱茶多糖降血糖、降血脂作用研究[J]. 中国医学创新,2021,18(16):29-34.

- [17] 胡盼盼. 乳酸菌胞外多糖发酵条件优化及抗肿瘤活性的研究[J]. 中国酿造,2020,39(8):187-192.
- [18] 李荣乔,贾东升,温春秀,等. 槐花多糖对免疫抑制小鼠免疫功能的影响研究[J]. 食品研究与开发,2016,37 (24):155-159.
- [19] 梁存权. 比色法测定植物多糖含量方法概述[J]. 北方药学,2011,8(12):4,86.
- [20] 马趣环,石晓峰,新娣,等. 苯酚硫酸法与蒽酮硫酸法测定糙叶败酱多糖含量的比较研究[J]. 西部中医药, 2015,28(12):30-33.

(收稿日期:2022-10-09)