

不同加工方法对杜仲总黄酮含量的影响[△]

魏学军*,孙晓惠,刘汇丽,何鑫(黔南民族医学高等专科学校药理学系,贵州都匀 558000)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)28-3967-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.28.24

摘要 目的:比较不同加工方法对杜仲总黄酮含量的影响,为杜仲的合理化产地加工提供科学依据。方法:将新鲜杜仲制成板片和宽丝2种性状,各性状药材按“发汗”和未“发汗”进行阴干、晒干、烘干(60、80、100℃)和微波干燥(5、10、15 min)后晒干等加工方法处理制备样品。以芦丁为对照品,采用紫外分光光度法于510 nm波长测定各样品总黄酮含量。结果:不同加工方法对杜仲总黄酮含量有影响。同一干燥方法下,未“发汗”样品总黄酮含量高于“发汗”样品($P<0.05$ 或 $P<0.01$);同一性状、不同干燥方法下,总黄酮含量微波干燥>烘干>晒干>阴干,以微波干燥10 min后晒干样品中的总黄酮含量最高;宽丝状样品中的总黄酮含量高于板片状样品。结论:若以杜仲总黄酮的药理作用为主进行临床应用时,建议杜仲采用趁鲜切宽丝、不“发汗”、微波辅助干燥后晒干的加工方法。

关键词 杜仲;总黄酮;紫外分光光度法;加工方法;发汗

Effects of Different Processing Methods on the Content of Total Flavonoids in *Eucommia ulmoides*

WEI Xuejun, SUN Xiaohui, LIU Huili, HE Xin (Dept. of Pharmacy, Qiannan Medical College for Nationalities, Guizhou Duyun 558000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare the effects of different processing methods on the content of total flavonoids in *Eucommia ulmoides* so as to provide a scientific basis for reasonable processing of *E. ulmoides* in the production place. METHODS: Fresh *E. ulmoides* was made into flakes and shredded slices. The *E. ulmoides* with the two properties was classified on the basis of “sweating” and “without sweating” and dried in the shade, in the sun or by baking (60℃, 80℃ and 100℃) or dried in the sun after microwave drying (5 min, 10 min and 15 min) for the preparation of samples. With rutin as the reference substance, ultraviolet spectrophotometry was adopted to determine the contents of total flavonoids in all the samples at a wavelength of 510 nm. RESULTS: Different processing methods had effects on the content of total flavonoids in *E. ulmoides*. For the samples processed by the same drying method, the content of total flavonoids in those without “sweating” was higher than that in “sweating” ones ($P<0.05$ or $P<0.01$); for the samples with the same property and processed by different drying methods, the content of total flavonoids arranged from high to low were microwave drying>baking>dried in the sun>dried in the shade, where the content of total flavonoids in those dried in the sun after 10 min microwave drying was the highest; the content of total flavonoids in the shredded slices was higher than that in the flakes. CONCLUSIONS: For clinical application of the pharmacological action of total flavonoids in *E. ulmoides*, it is suggested that fresh *E. ulmoides* cut into shredded slices and without “sweating” should be selected and dried in the sun after microwave drying.

KEYWORDS *Eucommia ulmoides*; Total flavonoids; Ultraviolet spectrophotometry; Processing methods; Sweating

- [6] 张诚翔,赵炜煜,吕万良.多功能靶向性表柔比星脂质体的制备及其对脑胶质瘤细胞的抑制效应[J].中国药理学杂志,2015,50(14):1208.
- [7] 杨平,林珈好,王玉蓉.盐酸小檗碱前体脂质体的制备及理化性质研究[C]//世界中联中药专业委员会学术年会暨中药新药研发与中药资源可持续利用国际研讨会,北京:世界中医药学会联合会,2011:289-292.
- [8] 赵梦玉,张丽男,孙勇军,等.两性霉素B磁性脂质体的制备及磁靶向性研究[J].华西药理学杂志,2014,29(6):618.
- [9] 李文静,杨志强,王杏林.两种硫酸长春新碱脂质体包封率测定方法的比较[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(14):71.
- [10] Zhang Y, Li RJ, Lu WL. Targeting therapy with mitosomes

al daunorubicin plus amidopine has the potential to circumvent intrinsic resistant breast cancer[J]. *Mol Pharm*, 2011,8(1):162.

- [11] 李学涛,程岚,贾天柱.异长春花碱脂质体的制备及体外释放度考察[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(14):15.
- [12] 作文英,李莎,徐晓娜,等.苦参碱脂质体的稳定性及体外释放度研究[J].中国药房,2013,24(37):3542.
- [13] 牛庆元,张晶晶,纪珍玲,等.小鼠正常肺细胞和肺癌细胞之间的力学特性比较研究[J].中国细胞生物学学报,2014,36(3):308.
- [14] 龙浩.人参皂苷衍生物AD-1对肺癌A549细胞增殖和荷瘤裸小鼠肿瘤生长的抑制作用研究[J].中国药业,2015,24(1):25.
- [15] 汤军,窦霄云,修芸,等.阿霉素脂质体制备工艺优化及节拍式给药细胞探讨[J].西南大学学报:自然科学版,2014,36(9):57.

△基金项目:贵州省民族宗教委员会民族医药传统文化研究项目(No.黔族201364)

*副教授。研究方向:中药与民族药质量控制。电话:0854-8308038。E-mail:qndyxj@163.com

(收稿日期:2016-01-06 修回日期:2016-03-15)
(编辑:邹丽娟)

杜仲为杜仲科植物杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)的干燥树皮,广泛分布于我国西南部和长江中上游地区,是我国的特产药材,具有补肝肾、强筋骨、安胎的功能,临床多用于肾虚腰痛、筋骨无力、妊娠漏血、胎动不安、高血压症等^[1]。贵州杜仲资源丰富、疗效显著,故贵州被业内公认为杜仲的地道产地,并具有极高的药用和经济价值。根据《本草经集注》及相关文献,杜仲有采皮阴干、去粗皮晒干^[1]和去粗皮“发汗”后晒干^[2]等各种加工方法的记载,但加工标准并不统一,而药材的产地加工方法是控制药材品质的关键。在现有的加工方法的研究中,多以降压作用及降压活性成分松脂醇二葡萄糖苷为考察指标^[3-4],而对其他药效作用及活性成分为指标的研究未见文献报道。由于杜仲总黄酮具有降血压、降血脂、抗氧化、抗肿瘤和调节骨代谢等广泛的药理作用^[5-8],是杜仲的重要活性成分之一。故本试验以总黄酮含量作为评价指标,考察不同性状、干燥方法及是否“发汗”对总黄酮含量的影响,探讨杜仲的产地加工方法,为全面建立和评价杜仲加工方法的质量标准体系提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

Cary 100型双光束紫外-可见分光光度计(美国安捷伦科技公司);AS10200A型超声波清洗机(杭州汇尔公司);IKA-RV10型旋转蒸发仪(德国Ika公司);2.0R型低速离心机(德国Heraeus公司);G70F20CN3L-C2型微波炉(广东格兰仕公司);DHG-9240A型真空干燥箱(上海金山公司);AE240型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

1.2 药材、对照品与试剂

杜仲新鲜树皮(购自贵州都匀王司镇药农杜仲种植园,树龄均15年以上,样品编号:150520,经本校中药教研室王传明副教授鉴定为杜仲科植物*Eucommia ulmoides* Oliv.的干燥树皮);芦丁对照品(购自中国食品药品检定研究院,批号:100080-200707,纯度:92.6%);水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 不同加工方法样品的制备

将新鲜树皮刮去粗皮,加工制成板片和宽丝(长约5 cm,宽约1 cm)2种性状药材。各性状药材取“发汗”[按2015年版《中国药典》(一部)杜仲项下“发汗”方法^[9]制备]和未“发汗”品,按表1干燥方法进行处理,得样品A₁~A₁₆。各样品分为“发汗”和未“发汗”2种二级样品,二级样品均制备3批次备用。

2.2 样品中总黄酮含量的测定

2.2.1 供试品溶液的制备^[9] 称取杜仲药材约5 g,剪成碎片后揉成絮状,精密称取1 g置于具塞锥形瓶中,加入40倍量95%乙醇,在超声功率50 W条件下提取30 min。提取液过滤、离心后挥去乙醇,加入60%乙醇溶解并定容至50 ml量瓶中,摇匀,冷藏备用。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品11.06 mg,加入60%乙醇溶解并定容至50 ml量瓶中,摇匀后即得芦丁对照品溶液。

2.2.3 标准曲线的制备 精密移取芦丁对照品溶液0(第1管)、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml分别置于10 ml量瓶中,加60%乙醇至7 ml,加5%亚硝酸钠溶液0.3 ml,摇匀放置6 min;再加10%硝酸铝溶液0.3 ml,摇匀放置10 min;加4%氢

表1 不同加工方法杜仲总黄酮含量比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Comparison of the contents of total flavonoids in *E. ulmoides* processed by different methods($\bar{x} \pm s, n=3$)

编号	外观性状	干燥方法	总黄酮, mg/g	
			未“发汗”品	“发汗”品
A ₁	板片	阴干(阴凉处晾15 d)	0.394 ± 0.007*	0.351 ± 0.003
A ₂	板片	晒干(阳光下晒7 d)	0.544 ± 0.012**	0.396 ± 0.010
A ₃	板片	60 °C烘箱干燥(48 h)	0.647 ± 0.021*** ^Δ	0.429 ± 0.007
A ₄	板片	80 °C烘箱干燥(24 h)	0.718 ± 0.009*** ^Δ	0.513 ± 0.005
A ₅	板片	100 °C烘箱干燥(12 h)	0.736 ± 0.007*** ^Δ	0.534 ± 0.005
A ₆	板片	微波(700 W)干燥5 min后晒干(24 h)	0.740 ± 0.010*** ^Δ	0.601 ± 0.007
A ₇	板片	微波(700 W)干燥10 min后晒干(12 h)	0.754 ± 0.012*** ^Δ	0.611 ± 0.007
A ₈	板片	微波(700 W)干燥15 min后晒干(12 h)	0.507 ± 0.008*	0.476 ± 0.005
A ₉	宽丝	阴干(阴凉处晾15 d)	0.550 ± 0.018**	0.373 ± 0.006
A ₁₀	宽丝	晒干(阳光下晒7 d)	0.661 ± 0.019**	0.448 ± 0.006
A ₁₁	宽丝	60 °C烘箱干燥(48 h)	0.685 ± 0.008*** ^Δ	0.482 ± 0.003
A ₁₂	宽丝	80 °C烘箱干燥(24 h)	0.725 ± 0.012*** ^Δ	0.568 ± 0.010
A ₁₃	宽丝	100 °C烘箱干燥(12 h)	0.709 ± 0.007*** ^Δ	0.505 ± 0.011
A ₁₄	宽丝	微波(700 W)干燥5 min后晒干(24 h)	0.780 ± 0.012*** ^Δ *	0.575 ± 0.006
A ₁₅	宽丝	微波(700 W)干燥10 min后晒干(12 h)	0.866 ± 0.008*** ^Δ **	0.615 ± 0.005
A ₁₆	宽丝	微波(700 W)干燥15 min后晒干(12 h)	0.660 ± 0.009**	0.469 ± 0.005

注:与“发汗”样品比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与阴干和晒干样品比较,^Δ $P < 0.05$,^{ΔΔ} $P < 0.01$;与宽丝烘干样品(100 °C)比较,* $P < 0.01$;与板片微波干燥10 min后晒干样品比较,[#] $P < 0.01$

Note: vs. “sweating” samples, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. samples dried in the shade and in the sun, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$; vs. shredded slices dried (100 °C) by baking, * $P < 0.01$; vs. flakes dried in the sun after 10 min microwave drying, [#] $P < 0.01$

氧化钠溶液2 ml,分别用60%乙醇定容,摇匀放置10 min。以第1管溶液为空白对照,在510 nm波长处分别测定吸光度。以芦丁进样量(c)为横坐标、吸光度(A)为纵坐标绘制标准曲线,得线性方程为 $A = 0.010 1c + 0.003 0$ ($r = 0.999 9$)。结果表明芦丁进样量线性范围为11~110 μg。

2.2.4 精密度试验 取供试品溶液2.0 ml置于10 ml量瓶中,按“2.2.3”项下方法操作后连续测定5次吸光度,RSD=0.57% ($n=5$)。

2.2.5 稳定性试验 取供试品溶液2.0 ml置于10 ml量瓶中,按“2.2.3”项下方法操作后分别在放置0、10、20、30、60、120 min时测定吸光度,RSD=2.23% ($n=6$)。

2.2.6 重复性试验 取A₁未“发汗”第1批次样品5份,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液。取供试品溶液2 ml置于10 ml量瓶中,按“2.2.3”项下方法操作测定,含量的RSD=2.67% ($n=5$)。

2.2.7 加样回收率试验 取已知含芦丁量的A₁未“发汗”第1批次样品5份,加入适量芦丁对照品,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液。取各供试品溶液2 ml置于10 ml量瓶中,按“2.2.3”项下方法操作测定并计算回收率。结果,芦丁平均回收率为97.87% (RSD=2.43%, $n=5$)。

2.2.8 各样品含量测定 精密移取各样品不同批次提取所得供试品溶液2.0 ml置于10 ml量瓶中,按“2.2.3”项下方法操作并计算总黄酮含量。测定值为3批次的均值,结果见表1。

2.3 结果分析

2.3.1 杜仲“发汗”与未“发汗”对总黄酮含量的影响 表1结果表明,2种性状药材采用同一干燥方法处理,“发汗”杜仲与未“发汗”杜仲的总黄酮含量差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或

$P < 0.01$), 未“发汗”杜仲高于“发汗”杜仲。究其原因, 可能与水分的散失对总黄酮的溶解度有影响有关。同一干燥方法, 未“发汗”药材在初期均较“发汗”药材水分的气化速率快, 随着水分的快速散失, 减少了总黄酮的溶解, 故含量较高; “发汗”药材在覆盖物下保持数日, 温度升高虽有利于内部水分向外部的溢出, 但水分蒸发缓慢或未蒸发, 对总黄酮的溶解影响较小, 因而含量较低。

2.3.2 干燥方法对未“发汗”杜仲总黄酮含量的影响 由表 1 可知, 2 种性状药材均以阴干品的总黄酮含量最低, 微波干燥 10 min 后晒干品含量最高。综合考虑总黄酮含量水平依次为: 微波干燥后晒干(除微波干燥 15 min 后晒干) > 烘干 > 晒干 > 阴干。同一性状药材采用不同干燥方法处理, 烘箱干燥和微波干燥与阴干、晒干比较总黄酮含量差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 微波干燥 5、10 min 后晒干与微波干燥 15 min 后晒干总黄酮含量差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 原因与温度对水分的蒸发和对黄酮类成分的影响有关。当微波干燥温度高时, 在一定时间范围内可使水分迅速蒸发而对总黄酮类成分影响较小, 因而含量较高; 微波干燥 15 min 后晒干的样品总黄酮量下降明显, 可能与长时间高温对黄酮类成分的破坏有关^[10-11]。

2.3.3 药材性状对杜仲总黄酮含量的影响 2 种性状药材均以烘干和微波干燥后晒干品的总黄酮含量整体水平高。同一性状微波干燥后晒干与烘干后样品中的总黄酮量差异存在不同情况: 板片状微波干燥 10 min 后晒干样品与 100 °C 烘干后样品总黄酮含量差异无统计学意义; 宽丝微波干燥 10 min 后晒干总黄酮量与烘干差异均有统计学意义。不同性状药材烘干后总黄酮含量差异无统计学意义, 而 2 种性状样品经微波干燥 10 min 后晒干的总黄酮含量差异具有统计学意义, 宽丝状高于板片状样品。原因可能与宽丝比板片比表面积增大, 水分快速蒸发, 致植物细胞和某些物质失活, 新陈代谢减少有关。

3 讨论

对药材进行合理的产地加工可以保证药材品质、增强药物疗效。2015 年版《中国药典》记载杜仲的加工方法是去粗皮, “发汗”后晒干。有研究表明, 就降压作用而言, 杜仲采用“发汗”的加工方法是可行的^[3]; 另有研究发现, 杜仲“发汗”后对不同活性成分的含量有影响, 可提高醇溶性、水溶性成分含量, 而松脂醇二葡萄糖苷含量降低^[4]。由于中药活性成分较多, 各活性成分的药理作用差异较大, 临床治疗证候不同, 如单一采用药典方法进行加工, 可能会影响不同活性成分含量, 难以发挥各活性成分应有的疗效, 因而有必要针对不同活性成分开展相应加工方法的研究。

本试验结果表明, 不同性状、干燥方法及是否“发汗”对杜

仲总黄酮含量有影响。未“发汗”杜仲与“发汗”杜仲总黄酮含量差异显著, 未“发汗”样品高于“发汗”样品。这一结果表明, 如采用药典方法进行“发汗”加工处理, 则杜仲总黄酮含量较低。不同干燥方法, 微波干燥后晒干品(除微波干燥 15 min 后晒干)含量整体水平高, 烘干、晒干品渐次, 阴干品最低, 故不宜采用《本草经集注》中“采皮阴干”的加工方法。2 种性状样品, 如采用微波干燥后晒干, 宽丝状与板片状总黄酮含量存在显著差异, 宽丝状高于板片状。

综上所述, 杜仲临床应用时, 如以总黄酮类活性成分的药理作用为主, 建议采用趁鲜切宽丝, 不“发汗”, 微波辅助干燥后晒干的加工方法, 而不宜采用《中国药典》记载的“发汗”后晒干和“采皮阴干”的加工方法。实际生产中, 考虑到设备成本、操作技术等原因, 在不“发汗”、趁鲜切宽丝的前提下, 采用操作简单、低成本的烘干或晒干等干燥方法是否可行, 尚有待研究人员结合药效学研究进一步确定。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 第 5 卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 458-462.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 165.
- [3] 王丽娜, 杨美华. 传统发汗方法对杜仲降压作用的影响[C]//2010 年中国药学会暨第十届中国药师周论文集, 天津: 中国药学会, 2010.
- [4] 刘金圣, 吴德康, 狄留庆, 等. 杜仲不同加工方法对其质量的影响[J]. 中医药信息, 2007, 14(12): 39.
- [5] 吴丽芳, 吴卫华, 欧阳冬生, 等. 杜仲的降压成分及降压机制[J]. 中草药, 2006, 37(1): 150.
- [6] 刘静, 濮智颖, 李爱玲, 等. 杜仲叶黄酮降血脂及抗氧化作用的研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(11): 5 631.
- [7] 袁带秀, 舒丽霞, 黄蓉. 杜仲总黄酮对荷瘤小鼠的抗肿瘤作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(12): 1 332.
- [8] 张贤, 蔡建平, 张艳红, 等. 杜仲诱导大鼠间充质干细胞成骨分化中成骨与成脂相关转录因子的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(19): 3 523.
- [9] 徐丽萍, 喻方圆, 陈浩, 等. 超声波提取杜仲皮总黄酮工艺[J]. 林业科技开发, 2010, 24(4): 82.
- [10] 陶益, 盛辰, 李伟东, 等. 杜仲不同炮制品化学成分研究[J]. 中成药, 2014, 39(22): 4 352.
- [11] 李晓斌, 陈振斌, 杨旸, 等. 响应面分析法优化槐叶中黄酮类化合物的提取工艺[J]. 中国药房, 2015, 26(7): 960.

(收稿日期: 2016-02-01 修回日期: 2016-05-11)

(编辑: 刘 萍)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊, 欢迎投稿、订阅