

周玉波,高晓忠,吴毅斌. 枇杷叶及其炮制品中总黄酮和多糖的含量分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):270-272.

枇杷叶及其炮制品中总黄酮和多糖的含量分析

周玉波,高晓忠,吴毅斌

(绍兴文理学院化学化工学院,浙江绍兴 312000)

摘要:采用 $\text{NaNO}_2 - \text{AlCl}_3 - \text{NaOH}$ 法测定枇杷叶不同炮制品中总黄酮含量,以精制枇杷叶多糖测得枇杷叶多糖对葡萄糖的换算因子,苯酚-硫酸法测定枇杷叶不同炮制品中多糖的含量,比较枇杷叶生品与不同炮制品中总黄酮和多糖的含量差异。结果表明,枇杷叶生品总黄酮含量 3.40%,蜜炙品、姜汁炒制品、姜汤煮制品、清炒制品总黄酮含量分别为 3.77%、4.02%、2.88%、3.98%;枇杷叶生品多糖含量 9.16%,蜜炙品、姜汁炒制品、姜汤煮制品、清炒制品多糖含量分别为 9.51%、7.95%、10.09%、9.19%。枇杷叶经过炮制后多糖和总黄酮的含量均有变化,其中总黄酮含量以姜汁炒枇杷叶中的为最高,多糖含量以姜汤煮枇杷叶中的为最高。

关键词:枇杷叶;炮制品;总黄酮;多糖

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0270-03

枇杷叶为蔷薇科枇杷属植物枇杷 [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.] 的干燥叶,是一种常用中药,收载于历版《中华人民共和国药典》供中医临床使用^[1]。枇杷叶归肺、胃经,具清肺止咳、降逆止呕的作用,用于治疗肺热咳嗽、气逆喘气、胃热呕逆及烦热口渴症状^[2]。枇杷叶的炮制方法较多,临床作用各有所长:枇杷叶清炒后减少滋腻之性,多用于外感咳嗽及呕吐^[3];枇杷叶蜜炙后能增强润肺止咳的作用,多用于肺燥咳嗽^[4];枇杷叶姜炙后,可协同和胃,具有一定的疗效^[5]。目前临床多用枇杷叶的蜜炙炮制品,却很少用《本草纲目》等众本草提及的清炒和姜炙炮制品。本试验以枇杷叶的不同炮制品为研究对象,对其总黄酮和多糖成分的含量进行测定和比较,以期为深入研究枇杷叶提供试验支持。

1 材料与与方法

1.1 仪器

收稿日期:2013-11-07

基金项目:浙江省教育厅科研项目(编号:Y201122331);绍兴文理学院科研项目(编号:08LG1026)。

作者简介:周玉波(1981—),女,浙江奉化人,博士,讲师,主要从事中药与天然药物的研究。Tel:(0575)88342606;E-mail:wszyb9132000@126.com。

的富集能力差异明显,对金属铜的富集能力差异不明显。锰元素虽然是人体必需微量元素,但是过量锰进入人体则会引起中毒,对人体多种脏器和生理功能造成影响。各类标准均未对食用菌中锰含量作限定^[4-9],建议尽快完善食品中锰元素含量的相关标准。

参考文献:

- [1]李月梅. 食用菌的功能成分与保健功效[J]. 食品科学,2005,26(8):517-521.
- [2]陈黎,江勇,王明亮,等. 四川部分地区3种食用菌中7种重金属含量测定[J]. 中国食用菌,2009,28(2):39-42.
- [3]胡桂仙,王小骊,董秀金,等. 3种干食用菌中汞、砷、铅、镉重金属

HP8453型紫外-可见分光光度计(惠普公司);80-2台式低速离心机(上海手术器械厂);METTLER AL204型分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];FZ102粉碎机(北京市永光明医疗仪器厂)。

1.2 试剂与试药

枇杷叶(购于浙江震元医药连锁有限公司,产地为浙江),经鉴定为蔷薇科枇杷属植物枇杷的干燥叶。 D -无水葡萄糖(购自中国食品药品检定研究院,批号:110833-200904),芸香苷(购自中国食品药品检定研究院,批号:100080-200707),重蒸苯酚,浓硫酸、乙醇、亚硝酸钠、氯化铝、氢氧化钠等试剂为分析纯。

1.3 样品的制备

1.3.1 枇杷叶及其炮制品的制备 生枇杷叶:取枇杷叶20g,用纯净水洗后烘干。

蜜炙枇杷叶:取炼蜜冷开水4:1稀释后加入枇杷叶丝拌匀,闷润,置锅内文火加热(炒干),炒至微黄色、不黏手时,取出晾凉。每100kg枇杷叶,用炼蜜20kg。

姜汁炒枇杷叶:枇杷叶丝加姜汁拌匀,润透后置锅内文火加热,炒干,取出晾凉。每100kg枇杷叶用干姜3kg。

姜汤煮枇杷叶:取干姜片,加水与枇杷叶同煮至水尽,取出枇杷叶,炒干,放凉。每100kg枇杷叶用干姜3kg。

- 的污染的检测与评估[J]. 浙江农业学报,2011,23(2):349-352.
- [4]寇冬梅,陈玉成,张进忠. 食用菌富集重金属特征及污染评价[J]. 江苏农业科学,2007(5):229-232.
- [5]叶雪珠,赵首萍,张永志,等. 浙江省食用菌铅镉重金属污染风险研究[J]. 中国食用菌,2013,32(3):50-53.
- [6]沈霞,余胜光. 广东省6种常见食用菌的重金属含量调查与评价[J]. 西北农业学报,2008,17(6):294-297.
- [7]赵玉卉,王秉峰,路等学,等. 几种市售鲜食用菌重金属含量及评价[J]. 中国食用菌,2010,29(4):32-34.
- [8]黎勇,杨素珍,阮尚全,等. 内江地区主要食用菌中铅镉含量的调查与分析[J]. 内江师范学院学报,2008,23(10):60-63.
- [9]段冷曼. 吉林省5种主要食用菌中4种重金属的含量及其富集规律的研究[D]. 长春:吉林大学,2006.

清炒枇杷叶:取净枇杷叶,置锅内,用文火加热,炒至微焦,有香气,取出放凉。

1.3.2 枇杷叶总黄酮样品溶液及对照品的制备 精确称取枇杷叶生品及各种炮制品粉末各1.0 g,用75%乙醇50 mL加热回流提取3次,每次2 h,趁热过滤,滤液在60℃下减压浓缩蒸去乙醇后,于分液漏斗中用相同体积的乙醚萃取2~3次,除去叶绿素及蜡质等,最后用75%乙醇定容至50 mL,即得总黄酮样品溶液。

精确称取芸香苷0.019 9 g,60%乙醇定容至50 mL量瓶中,摇匀即得对照品。

1.3.3 枇杷叶精制多糖的制备及其溶液的配制 称取枇杷叶粉末30 g,加10倍量80%乙醇于90℃水浴中回流3次,每次2 h,抽滤。药渣挥尽乙醇后,加入10倍量水,加热回流3次,每次2 h,抽滤,合并滤液,减压浓缩至60 mL,取出,加乙醇使醇含量达到80%,于4℃冰箱中过夜,过滤,干燥,即得枇杷叶粗多糖。

将粗多糖以水复溶,用Servage法^[6]除蛋白(氯仿-正丁醇,体积比4:1),反复操作,用考马斯亮蓝法^[7]测定至无蛋白为止。用95%乙醇调至醇浓度达到80%,4℃静置过夜,离心,沉淀用热蒸馏水溶解后抽滤,滤液浓缩至60 mL,再加95%乙醇使含醇量达到80%,4℃静置过夜,将离心后的沉淀分别用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,于60℃烘干至恒重,得精制的枇杷叶多糖。

精确称取枇杷叶精制多糖0.012 0 g,置于50 mL容量瓶中,加水溶解,摇匀定容,得浓度为0.24 mg/mL的枇杷叶精制多糖溶液。

1.3.4 枇杷叶多糖样品溶液及对照品溶液的制备 精确称取枇杷叶生品及各种炮制品粉末各1.0 g,用80%乙醇50 mL加热回流2次,每次2 h,过滤后取滤渣挥尽乙醇后,用50 mL水回流提取3次,每次2 h,趁热抽滤,合并滤液,浓缩后移入50 mL量瓶中,稀释至刻度,摇匀,即得样品溶液。

精确称取干燥至恒重的无水葡萄糖0.049 9 g,置于50 mL容量瓶中,加水溶解,稀释至刻度,得浓度为0.998 mg/mL的葡萄糖对照品溶液。

2 结果与分析

2.1 枇杷叶总黄酮含量测定

2.1.1 标准曲线的绘制 取芸香苷对照品溶液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,分别置于10 mL量瓶中,依次加入5%亚硝酸钠溶液0.3 mL,摇匀后放置6 min,加10%氯化铝溶液0.3 mL,摇匀后放置6 min,再加4%氢氧化钠溶液4 mL,加60%乙醇定容至刻度,摇匀,放置15 min后,以随行试剂作空白参比在510 nm波长处测定吸光度 D 。以 D 为纵坐标,以芸香苷浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线,回归方程为 $y = 10.571x - 0.031$ ($r = 0.999 8$),说明芸香苷在0.019 9~0.099 5 mg/mL范围内,线性关系良好。

2.1.2 稳定性试验 取供试品溶液1.0 mL,置于10 mL量瓶中,按照“2.1.1”节方法测定吸光度,间隔10 min测定1次,连续测定1 h,结果吸光度值的 RSD 为1.85%,表明供试品溶液在室温下放置60 min内稳定。

2.1.3 精密度试验 精确吸取芸香苷对照品溶液2.0 mL,

置于10 mL量瓶中,按“2.1.1”节方法测定吸光度,平行测定6份, RSD 为1.39%,表明仪器精密度良好。

2.1.4 重复性试验 精确称取同一批次粉碎后的枇杷叶生品6份,按“1.3.2”节操作制备供试品溶液,取1.0 mL置于10 mL量瓶中,按照“2.1.1”节方法测定吸光度, RSD 为2.27%,表明重复性良好。

2.1.5 加样回收率试验 精确称取枇杷叶生品1.0 g 6份,分别加入芸香苷对照品35 mg,按照“1.3.2”节方法制备供试品溶液,取1.0 mL置于10 mL量瓶中,按照“2.1.1”节方法测定吸光度,计算芸香苷平均回收率为100.71%, RSD 为2.03% ($n=6$) (表1)。

表1 枇杷叶总黄酮加样回收率试验结果

取样量 (g)	样品中含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	RSD (%)
1.000 9	33.98	35.15	69.75	98.92	
1.001 2	33.99	35.07	68.58	98.63	
1.000 8	33.98	35.09	69.89	102.34	
1.001 0	33.98	35.11	69.53	101.25	
1.001 0	33.98	35.13	70.41	103.70	
1.001 2	33.99	35.10	68.89	99.43	
平均				100.71	2.03

2.1.6 样品含量测定 精确移取枇杷叶及其炮制品供试品溶液各1.0 mL,置于10 mL量瓶中,按照“2.1.1”节方法测定吸光度,从回归方程中求出供试品中总黄酮的浓度。由表2可知,枇杷叶生品总黄酮含量3.40%,蜜炙品、姜汁炒制品、姜汤煮制品、清炒制品总黄酮含量分别为3.77%、4.02%、2.88%、3.98%。

表2 枇杷叶生品及其炮制品中总黄酮含量测定结果 ($n=3$)

样品	含量 (%)	RSD (%)
生枇杷叶	3.40	2.31
蜜炙枇杷叶	3.77	1.85
姜汁炒枇杷叶	4.02	1.98
姜汤煮枇杷叶	2.88	2.12
清炒枇杷叶	3.98	2.43

2.2 枇杷叶多糖含量测定

2.2.1 标准曲线的绘制 精确量取葡萄糖对照品溶液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL于50 mL容量瓶中,加水定容,得到一系列不同浓度的葡萄糖标准溶液。分别量取各标准液1.0 mL于20 mL具塞刻度试管中,加入5%苯酚溶液1.0 mL,摇匀后迅速加入5.0 mL浓硫酸,盖上试管塞,摇匀,置于沸水浴中加热反应30 min,取出后冰水浴冷却至室温。以随行试剂作空白参比,在488 nm波长处测定吸光度 D 。以葡萄糖标准溶液浓度 C (mg/mL)为横坐标,吸光度 D 为纵坐标,绘制标准曲线。回归方程 $y = 8.681x - 0.014 3$ ($r = 0.999 6$),说明葡萄糖在0.019 96~0.099 80 mg/mL浓度范围内呈良好线性关系。

2.2.2 换算因子的测定 取枇杷叶精制多糖溶液1.0 mL于20 mL具塞刻度试管中,按“2.2.1”节操作依法测定吸光度,由回归方程求出枇杷叶精制多糖溶液中葡萄糖浓度,并计算其中葡萄糖含量。按公式 $f = m / (C \times D)$ 计算换算因子,其中

m 为多糖质量(mg), C 为多糖中葡萄糖浓度(mg/mL), D 为稀释倍数。测得换算因子 $f=3.73(n=6)$ 。

2.2.3 稳定性试验 取供试品溶液 1.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加水定容, 摇匀后取 1.0 mL 于 20 mL 具塞刻度试管中, 按“2.2.1”节操作依法测定吸光度, 间隔 15 min 测定 1 次, 连续测定 2 h, 结果吸光度的 RSD 为 1.37%, 表明供试品溶液在室温下放置 2 h 内稳定。

2.2.4 精密度试验 精确吸取浓度为 0.059 88 mg/mL 的葡萄糖标准品溶液 1.0 mL, 平行 6 份, 按“2.2.1”节操作测定吸光度, RSD 为 2.16%, 表明仪器精密度良好。

2.2.5 重复性试验 精确称取同一批次粉碎后的枇杷叶生品 6 份, 按“1.3.4”节操作制备供试品溶液, 取 1.0 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加水定容, 摇匀后取 1.0 mL 于 20 mL 具塞刻度试管中, 按“2.2.1”节操作依法测定吸光度, RSD 为 1.98%, 表明重复性良好。

2.2.6 加样回收率试验 精确称取枇杷叶生品 0.5 g 6 份, 分别加入葡萄糖对照品 10 mg, 按“1.3.4”节操作制备供试品溶液, 取 1.0 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加水定容, 摇匀后取 1.0 mL 于 20 mL 具塞刻度试管中, 按“2.2.1”操作依法测定吸光度, 计算葡萄糖平均回收率为 100.38%, RSD 为 2.42% ($n=6$) (表 3)。

表 3 枇杷叶多糖加样回收率试验结果

取样量 (g)	样品中含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	RSD (%)
0.500 6	12.31	10.05	22.29	99.30	
0.500 3	12.31	10.07	22.53	101.49	
0.500 4	12.31	10.06	22.09	97.22	
0.500 5	12.31	10.05	22.20	98.41	
0.500 4	12.31	10.08	22.66	102.68	
0.500 5	12.31	10.07	22.70	103.18	
平均				100.38	2.42

2.2.7 样品含量测定 精确移取“1.3.4”节枇杷叶及其炮制品供试品溶液各 1.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加水定容, 摇匀后取 1.0 mL 于 20 mL 具塞刻度试管中, 按“2.2.1”项操作依法测定吸光度, 由回归方程计算供试品溶液中葡萄糖浓度, 按含量 = $(C \times D \times f/m) \times 100\%$ 计算供试品中多糖的含量。式中, C 为供试品溶液中葡萄糖的浓度, D 为稀释倍数, f 为换算因子, m 为供试品干物质量。由表 4 可知, 枇杷叶生品多糖含量 9.16%, 蜜炙品、姜汁炒制品、姜汤煮制品、清炒制品多糖含量分别为 9.51%、7.95%、10.09%、9.19%。

表 4 枇杷叶生品及其炮制品中多糖含量测定结果 ($n=3$)

样品	含量(%)	RSD (%)
生枇杷叶	9.16	2.39
蜜炙枇杷叶	9.51	1.97
姜汁炒枇杷叶	7.95	2.44
姜汤煮枇杷叶	10.09	2.56
清炒枇杷叶	9.19	1.89

3 结论与讨论

黄酮类化合物在自然界中分布广泛, 主要存在于植物的叶片、果实和根部, 是一类引人注目的广谱生物活性物质, 在治疗肿瘤、心血管疾病、糖尿病、炎症、细菌、病毒感染(抗 HIV 病毒等)等多方面具有药理作用^[8-10]。枇杷叶富含黄酮, 本试验结果表明, 不同炮制品中黄酮含量有较大差异, 由高到低的顺序依次为姜汁炒制品 > 清炒制品 > 蜜炙品 > 生品 > 姜汤煮制品。由此可见, 除姜汤煮制品以外, 枇杷叶经过炮制后总黄酮含量均有所增高。

多糖具有抗炎症、免疫增强、抗肿瘤、降血糖等活性^[9,11-12], 是天然药物的研究热点之一。枇杷叶多糖能明显提高小鼠抗疲劳能力^[13]。在多糖的含量测定中, 多采用葡萄糖代替对照品, 从而测得样品中多糖的相对含量, 但其准确含量必须通过单糖和多糖之间的换算因子计算来获得。因此本研究以枇杷叶精制多糖测得粗多糖对葡萄糖的换算因子, 以此校正多糖含量测定方法, 从而对其不同炮制品的含量进行更为准确的测定。不同炮制方法对枇杷叶多糖的含量有影响, 多糖含量按姜汤煮制品、蜜炙品、清炒制品、生品、姜汁炒制品次序依次降低。

本试验研究可为枇杷叶的炮制研究提供参考, 同时也为其临床合理用药提供理论依据。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 142.
- [2] 陈 剑, 李维林, 吴菊兰, 等. 枇杷叶的化学成分 [J]. 植物资源与环境学报, 2006, 15(4): 67-68.
- [3] 上海市卫生局. 上海市中药炮制规范 [M]. 上海: 上海科学普及出版社, 1994: 263.
- [4] 叶广亿, 李书渊, 陈艳芬, 等. 枇杷叶不同提取物的止咳化痰平喘作用比较研究 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(2): 100-102.
- [5] 张炳鑫. 中药炮制品古今演变评述 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 322-324.
- [6] 屠婕红, 黄 佳. 瓜蒌皮中水溶性多糖的提取及含量测定 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(2): 281-282.
- [7] 王文平, 郭祀远, 李 琳, 等. 考马斯亮蓝法测定野木瓜多糖中蛋白质的含量 [J]. 食品研究与开发, 2008, 29(1): 115-117.
- [8] 陈永钧, 龙晓英, 潘素静, 等. 黄酮类化合物的药效机制及构效关系研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 337-344.
- [9] 江 珊, 刘 焰, 赵 斌, 等. 猪苓中多酚、黄酮、多糖和蛋白质提取工艺的优化 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 243-246.
- [10] 李 光, 余 霜, 邓 银, 等. 金荞麦叶黄酮提取技术研究 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(7): 264-266.
- [11] 周纪东. 糖类研究的几个问题 [J]. 生物学通报, 2001, 36(10): 11-12.
- [12] 杨 兵, 夏先林, 施晓丽, 等. 熟地黄多糖对断奶仔猪抗氧化性能和免疫性能的影响 [J]. 江苏农业学报, 2012, 28(4): 787-791.
- [13] 黄爱萍, 高慧颖, 陈秀萍, 等. 枇杷叶多糖对小鼠抗疲劳能力的影响 [J]. 福建果树, 2006(2): 13-14.