

沈 莉, 石秋霞, 高晓忠, 等. 不同炮制方法对牡丹皮多糖和总黄酮含量的影响[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 324–326.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.115

不同炮制方法对牡丹皮多糖和总黄酮含量的影响

沈 莉¹, 石秋霞², 高晓忠², 吴春雷², 周玉波²

(1. 宁夏众欣联合方泽医药有限公司, 宁夏银川 750004; 2. 绍兴文理学院化学化工学院, 浙江绍兴 312000)

摘要: 为了比较不同炮制方法对牡丹皮多糖和总黄酮含量的影响, 本研究以牡丹皮生品、酒制品、炒黄制品、炒焦制品和炒炭制品为材料, 分别测定了它们多糖和总黄酮的含量。结果发现, 牡丹皮生品多糖含量为 9.31%, 酒制品为 10.86%, 炒黄制品为 10.62%, 炒焦制品为 9.96%, 炒炭制品为 8.78%; 牡丹皮生品总黄酮含量为 1.86%, 酒制品为 2.07%, 炒黄制品为 1.98%, 炒焦制品为 1.93%, 炒炭制品为 1.77%。牡丹皮经过炮制后多糖和总黄酮的含量均发生变化, 以酒制品中的含量为最高。

关键词: 牡丹皮; 炮制; 多糖; 总黄酮

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0324-03

牡丹皮为毛茛科芍药属植物牡丹(*Paeonia suffruticosa*)的干燥根皮, 性微寒, 味苦、辛, 归肝、心、肾经, 是我国的传统中药之一。其功效为清热凉血、活血化瘀等, 主要用于热入营血、温毒发斑、吐血衄血、夜热早凉、无汗骨蒸、经闭痛经、肿痛疮毒等^[1-2]。历史上牡丹皮的炮制方法很多, 主要有酒制、炒制、煮制、制炭等。生品长于清热凉血、活血化瘀, 丹皮制炭后凝血作用增强, 有凉血止血的作用^[3], 用于吐血、衄血。目前临床中最常用的是牡丹皮生品, “清炒”“酒炒”“炒炭”仅有少部分地区沿用, 研究也多集中于生品, 而对其炮制品的研究较少^[4-5]。本试验通过比较牡丹皮及其不同炮制品中多糖和总黄酮的含量, 为深入研究牡丹皮成分提供数据支持。

1 材料

收稿日期: 2014-01-07

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 21176156); 浙江省教育厅科研项目(编号: Y201122331)。

作者简介: 沈 莉(1969—), 女, 宁夏银川人, 工程师, 主要从事药品质量研究。

通信作者: 周玉波, 博士, 讲师, 主要从事中药与天然药物的研究。

E-mail: wszyb9132000@126.com。

[8] Ruiz E, Cara C, Manzanera P, et al. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2008, 42(2): 160–166.

[9] Li J B, Gellerstedt G, Toven K. Steam explosion lignins; their extraction, structure and potential as feedstock for biodiesel and chemicals[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(9): 2556–2561.

[10] Han G P, Deng J, Zhang S Y, et al. Effect of steam explosion treatment on characteristics of wheat straw[J]. Industrial Crops and Products, 2010, 31(1): 28–33.

[11] 任天宝, 马孝琴, 徐桂转, 等. 响应面法优化玉米秸秆蒸汽爆破预处理条件[J]. 农业工程学报, 2011, 27(9): 282–286.

[12] 张红漫, 郑荣平, 陈敬文, 等. NREL 法测定木质纤维素原料组分的含量[J]. 分析试验室, 2010, 29(11): 15–18.

[13] 李 彬, 高 翔, 孙 倩, 等. 基于 3,5-二硝基水杨酸法的水稻

1.1 仪器

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

1.2 试剂与试药

牡丹皮产地为安徽, 购自浙江震元医药连锁有限公司, 经鉴定为毛茛科芍药属植物牡丹 *P. suffruticosa* 的干燥根皮。芸香苷(中国食品药品检定研究院, 批号: 100080-200707), D-无水葡萄糖(中国食品药品检定研究院, 批号: 110833-200904), 浓硫酸、乙醇、重蒸苯酚、氢氧化钠、氯化铝、亚硝酸钠等试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

牡丹皮生品: 取牡丹皮 20 g, 纯净水洗 3 次后, 晾干备用。牡丹皮酒制: 取牡丹皮, 照生品清洗法处理后晾干, 每 500 g 牡丹皮加黄酒 60 g, 拌匀后闷透, 放锅内用文火加热炒干, 取出放凉。牡丹皮炒黄: 取牡丹皮, 照生品清洗法处理后晾干, 用文火微炒, 取出放凉备用。牡丹皮炒焦: 取牡丹皮, 照生品

秸秆酶解工艺[J]. 农业机械学报, 2013, 44(1): 106–112.

[14] 黄崇杏, 王双飞, 杨崎峰, 等. 低压蒸汽爆破处理对蔗渣浆化学组分的影响[J]. 造纸科学与技术, 2005, 24(2): 16–18.

[15] Tanahashi M, Keiko T, Toshiyuki G, et al. Characterization of steam-exploded wood. II: Chemical changes of wood components by steam explosion[J]. Wood Research, 1988, 75: 1–12.

[16] Zhao H B, Kwak J H, Conrad Z Z, et al. Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 68(2): 235–241.

[17] Xu W L, Ke G Z, Wu J H, et al. Modification of wool fiber using steam explosion[J]. European Polymer Journal, 2006, 42(9): 2168–2173.

[18] 王许涛. 生物纤维原料汽爆预处理技术与应用研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2008: 1–104.

清洗法处理,晾干,用文火炒至微焦,取出放凉备用。牡丹皮炒炭:取牡丹皮,照生品清洗法处理后晾干,用中火加热炒至焦炭色,取出放凉。

2.2 牡丹皮多糖含量测定

2.2.1 牡丹皮精制多糖的制备 称取牡丹皮生品粉末 30 g,加入 80% 乙醇(10 倍量)后在 90 ℃ 水浴中回流 3 次(2 h/次),抽滤后取药渣挥尽乙醇,再加水(10 倍量)回流提取 3 次(2 h/次),趁热抽滤,合并滤液,减压浓缩后,加 95% 乙醇至醇含量达 80%,置 4 ℃ 冰箱中静置 12 h,充分沉淀后过滤,干燥后得到粗多糖。

粗多糖水复溶后,用 Servage(三氯甲烷-正丁醇,4:1)法进行除蛋白操作^[6],反复多次后用考马斯亮蓝法检验至无蛋白^[7]。取上清液,加入乙醇,使溶液中醇浓度达到 80%,4 ℃ 静置过夜后离心,沉淀用热水复溶后抽滤,滤液再重复 1 次醇沉淀操作,离心后的沉淀分别用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,烘干至恒重,得到精制的牡丹皮多糖。

2.2.2 供试品溶液的制备 取牡丹皮生品及其炮制品粉末各 1.0 g,加入 80% 乙醇 50 mL 于 90 ℃ 水浴中回流 2 次,每次 2 h,过滤后取滤渣挥尽乙醇,再加 50 mL 水回流提取 3 次,每次 2 h,抽滤后合并滤液,浓缩后转移至 50 mL 容量瓶中,定容即得。

2.2.3 对照品溶液的制备 取无水葡萄糖(干燥至恒重)0.049 9 g 于 50 mL 容量瓶中,加水溶解后定容,得浓度为 0.998 mg/mL 的葡萄糖对照品溶液。

2.2.4 标准曲线的绘制 分别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,加水至刻度。量取上述各标准液 1.0 mL 于 20 mL 具塞试管中,加入 1.0 mL 的 5% 苯酚溶液,摇匀后再加入 5.0 mL 浓硫酸,盖上试管塞,摇匀后置沸水浴中加热反应 30 min,取出后放置冰水浴中冷却至室温。以相应试剂作空白参比,在 488 nm 波长处测定吸光度 D 。以标准溶液浓度(x)为横坐标,吸光度 y 为纵坐标,进行线性回归,得到回归方程 $y = 8.079x - 0.0514 (r = 0.9995)$,表明葡萄糖浓度在 0.019 96 ~ 0.099 80 mg/mL 范围内与吸光度呈良好线性关系。

2.2.5 换算因子的测定 取牡丹皮精制多糖 0.015 5 g 于 50 mL 量瓶中,加水溶解后定容,得浓度为 0.31 mg/mL 的牡丹皮精制多糖溶液。精确量取上述多糖溶液 1.0 mL 于 20 mL 具塞试管中,按“2.2.4”节操作测定吸光度,通过回归方程求出精制多糖溶液中的葡萄糖浓度,并计算其中含量。按下式计算换算因子: $f = W / (C \times D)$,式中 W 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 $f = 3.58 (n = 6)$ 。

2.2.6 稳定性试验 取供试液 1.0 mL,置 10 mL 量瓶中加水定容,摇匀后取 1.0 mL 于 20 mL 具塞试管中,按“2.2.4”节操作,测定吸光度,之后每隔 15 min 测定 1 次,连续测定 2 h,结果吸光度值的 RSD 为 1.71%,表明供试液室温下 2 h 内稳定性良好。

2.2.7 精密度试验 精确吸取浓度为 0.039 92 mg/mL 的葡萄糖标准品溶液 1.0 mL,按“2.2.4”节操作测定,平行测定 6 份, RSD 为 2.61%,表明仪器具有良好的精密度。

2.2.8 重复性试验 取同一批次的牡丹皮生品 6 份,按

“2.2.2”节方法制备供试品溶液,精确量取 1.0 mL,置 10 mL 量瓶中加水定容,摇匀后取 1.0 mL 于 20 mL 具塞试管中,按“2.2.4”节操作测定吸光度, RSD 为 2.17%,表明本试验具有良好的重复性。

2.2.9 加样回收率试验 取牡丹皮生品 6 份各 0.5 g,分别加入葡萄糖对照品 10 mg,按“2.2.2”节方法制备供试品溶液,精确量取 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中,用蒸馏水定容,摇匀后取 1.0 mL 于 20 mL 具塞试管中,按“2.2.4”节方法测定,计算后得葡萄糖平均回收率为 100.73%, RSD 为 2.80% ($n = 6$),见表 1。

表 1 牡丹皮多糖加样回收率试验结果

试验号	取样量 (g)	样品中含 量(mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	RSD (%)
1	0.500 5	13.02	10.04	23.41	103.49	
2	0.500 4	13.01	10.03	23.46	104.19	
3	0.500 5	13.02	10.05	22.92	98.51	
4	0.500 3	13.01	10.03	22.97	99.30	
5	0.500 2	13.01	10.03	22.76	97.21	
6	0.500 5	13.02	10.05	23.24	101.69	
平均					100.73	2.80

2.2.10 样品含量测定 精确量取“2.2.2”节下牡丹皮及其炮制品供试液各 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中,用蒸馏水定容,摇匀后取 1.0 mL 于 20 mL 具塞试管中,按“2.2.4”节方法测定吸光度,通过上述回归方程计算出供试液中葡萄糖浓度,再按下列公式计算供试品中多糖的含量:含量 = $(C \times D \times f / W) \times 100\%$,其中 C 为供试液中葡萄糖的浓度, D 为稀释倍数, f 为换算因子, W 为供试品干品质量。得到的结果见表 2。

表 2 牡丹皮生品及其炮制品中多糖的含量测定结果($n = 3$)

样品	含量 (%)	RSD (%)
牡丹皮生品	9.31	1.93
牡丹皮酒制	10.86	2.34
牡丹皮炒黄	10.62	2.12
牡丹皮炒焦	9.96	1.75
牡丹皮炒炭	8.78	1.95

2.3 牡丹皮总黄酮含量测定

2.3.1 供试品溶液的制备 取牡丹皮生品及其炮制品粉末各 1.0 g,加入 50 mL 的 75% 乙醇加热回流提取 3 次(2 h/次),过滤,将滤液减压浓缩至无乙醇,用同体积乙醚萃取除去叶绿素及蜡质等,最后用 75% 乙醇定容至 50 mL,得到总黄酮样品溶液。

2.3.2 对照品溶液的制备 取芸香苷对照品 0.025 2 g,用 60% 乙醇溶解,再定容至 50 mL 即得。

2.3.3 标准曲线的绘制 精确量取对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,分别置 10 mL 容量瓶中,依次加入 0.3 mL 的 5% 亚硝酸钠溶液,摇匀后放置 6 min;然后加 0.3 mL 的 10% 氯化铝溶液摇匀后放置 6 min,再加 4 mL 的 4% 氢氧化钠溶液,用 60% 乙醇定容,摇匀,放置 15 min 后,以相应试剂作空白参比,于 510 nm 波长处测定吸光度。以芸香苷浓度(x)为横

坐标,吸光度(y)为纵坐标,进行线性回归,得到回归方程: $y = 9.846x - 0.010$ ($r = 0.999\ 7$),表明芸香苷浓度在 $0.025\ 2 \sim 0.126\ 0\ \text{mg/mL}$ 范围内与吸光度呈良好线性关系。

2.3.4 稳定性试验 精确量取供试液 $1.0\ \text{mL}$ 于 $10\ \text{mL}$ 容量瓶中,按照“2.3.3”节操作,测定吸光度,之后每隔 $10\ \text{min}$ 测定 1 次,连续测定 $1\ \text{h}$,结果 RSD 为 2.56% ,表明供试液室温下 $1\ \text{h}$ 内稳定性良好。

2.3.5 精密度试验 取芸香苷对照品溶液 $2.0\ \text{mL}$ 于 $10\ \text{mL}$ 容量瓶中,按“2.3.3”节操作平行测定 6 份, RSD 为 1.97% ,表明仪器具有良好的精密度。

2.3.6 重复性试验 取同一批次牡丹皮生品 6 份,按“2.3.1”节方法制备供试液,精确量取 $1.0\ \text{mL}$ 于 $10\ \text{mL}$ 容量瓶中,按照“2.3.3”节操作测定, RSD 为 2.38% ,表明本试验重复性良好。

2.3.7 加样回收率试验 取 6 份牡丹皮生品,每份 $1.0\ \text{g}$,分别加入芸香苷对照品 $20\ \text{mg}$,按照“2.3.1”节操作制备供试液,量取 $1.0\ \text{mL}$ 于 $10\ \text{mL}$ 容量瓶中,按照“2.3.3”节操作测定,计算芸香苷平均回收率为 99.61% , RSD 为 2.70% ($n = 6$),见表 3。

表 3 牡丹皮总黄酮加样回收率试验结果

试验号	取样量 (g)	样品中含 量(mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	RSD (%)
1	1.001 1	18.62	20.08	39.48	103.88	
2	1.000 9	18.62	20.09	38.27	97.81	
3	1.001 0	18.62	20.11	39.08	101.74	
4	1.001 2	18.62	20.10	38.39	98.35	
5	1.000 8	18.61	20.10	38.05	96.72	
6	1.000 6	18.61	20.05	38.49	99.15	
平均					99.61	2.70

2.3.8 样品含量测定 精确量取“2.3.1”节中牡丹皮及其炮制品供试液各 $1.0\ \text{mL}$ 于 $10\ \text{mL}$ 容量瓶中,按照“2.3.3”节操作测定,再依据回归方程求出供试品中总黄酮的浓度,结果见表 4。

表 4 牡丹皮生品及其炮制品中总黄酮的含量测定结果 ($n = 3$)

样品	含量(%)	RSD(%)
牡丹皮生品	1.86	2.52
牡丹皮酒制	2.07	2.65
牡丹皮炒黄	1.98	1.67
牡丹皮炒焦	1.93	1.79
牡丹皮炒炭	1.77	2.23

3 讨论

长期以来,对牡丹皮的研究较多集中于酚及酚苷类、单萜及苷类等活性物质,而对于丹皮多糖的研究很少。然而丹皮多糖有明显的降血糖、保护肾脏及提高免疫等功效,是颇具发展前景的一种天然活性物质^[8-9]。本研究通过计算葡萄糖和牡丹皮精制多糖之间的换算因子,并以此校正多糖含量的方法,测定了牡丹皮及其炮制品中多糖的含量,多糖含量按酒制品、炒黄制品、炒焦制品、生品、炒炭制品次序依次降低。

近年来研究人员从牡丹皮中分离得到黄酮类化合物^[10],其中儿茶素、槲皮素、山柰素是清除 $1,1 - 二苯基 - 2 - 三硝基苯肼、O_2 \cdot$ 自由基,抑制酪氨酸酶、高级糖化物终产物 (AGES) 产生的主要活性物质^[11]。试验表明,牡丹皮及其不同炮制品中黄酮的含量差异较大,从高到底依次为:酒制品 > 生品 > 炒炭制品 > 炒焦制品 > 炒黄制品。由此可见,牡丹皮除酒制品外,其他方法炮制后的总黄酮含量均有降低。通过本试验研究可为牡丹皮的炮制研究提供参考,同时也为牡丹皮的综合应用提供科学依据。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:160.

[2] 张虹,丁安伟,张丽. 中药牡丹皮的研究进展[J]. 江苏中医药,2007,39(9):75-77.

[3] 赫炎,王祝举,唐力英. 牡丹皮炮制历史沿革研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(11):67-68.

[4] 丘志春,孙冬梅,张诚光. 不同炮制方法对牡丹皮中丹皮酚及芍药苷含量的影响[J]. 医学研究杂志,2009,38(4):131-133.

[5] 赵学龙,丁安伟,张丽,等. 牡丹皮炮制历史沿革的研究[J]. 中华中医药学刊,2008,26(9):1907-1910.

[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] 彭代银,韩岚,张丛芬,等. 丹皮多糖一般药理学研究[J]. 安徽中医学院学报,2005,24(2):30-32.

[9] 刘吉成,牛英才. 多糖药物学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008.

[10] 丁安伟,张丽,赵学龙,等. 不同炮制工艺丹皮炭中黄酮类成分的动态变化[J]. 中国中药杂志,2009,34(8):965-968.

[11] Ding H Y, Lin H C, Chang T S. Tyrosinase inhibitors isolated from the roots of *Paeonia suffruticosa* [J]. Journal of Cosmetic Science, 2009,60(3):347-352.