

炮制方法对中药狗脊3种成分的影响[△]

赵敏杰^{1,2,3*}, 鞠成国^{1,2,3}, 林桂梅^{1,2,3}, 张凡^{1,2,3}, 贾天柱^{1,2,3#}(1.辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600; 2.国家中医药管理局中药炮制原理解析重点实验室, 辽宁大连 116600; 3.辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁大连 116600)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)19-2692-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.19.31

摘要 目的:比较生狗脊及其不同炮制品水煎液中水溶性总蛋白、总酚酸、总多糖的含量变化,阐明炮制方法对中药狗脊中3种成分的影响。方法:采用紫外-可见分光光度法,分别在590、760、489 nm波长下测定生狗脊及砂烫狗脊、酒狗脊、盐狗脊、蒸狗脊等4种不同炮制品水煎液中水溶性总蛋白、总酚酸、总多糖的含量。结果:5种样品中水溶性总蛋白含量分别为4.03%、3.32%、3.13%、3.33%、3.49%,总酚酸含量分别为0.25%、1.34%、1.38%、2.34%、1.41%,总多糖含量分别为28.56%、36.06%、45.21%、49.60%、49.01%。结论:不同的炮制方法对狗脊中3种成分的含量均有一定的影响,其中水溶性蛋白质的含量在炮制后均呈现一定程度的降低,总酚酸和总多糖的含量在炮制后均呈现一定程度的升高。

关键词 狗脊;炮制品;水溶性总蛋白;总酚酸;总多糖;含量

Effect of Processing Methods on 3 Kinds of Components of *Cibotium barometz*

ZHAO Min-jie^{1,2,3}, JU Cheng-guo^{1,2,3}, LIN Gui-mei^{1,2,3}, ZHANG Fan^{1,2,3}, JIA Tian-zhu^{1,2,3}(1.School of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Liaoning Dalian 116600, China; 2.The Key Laboratory for Principle Analysis of Chinese Medicinal Herbs Processing, State Administration of TCM, Liaoning Dalian 116600, China; 3.Chinese Medicinal Herbs Processing Engineering Technology Research Center of Liaoning Province, Liaoning Dalian 116600, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare the differences in the contents of water-soluble total protein, total phenolic acid and total polysaccharides among the water decoctions of crude *Cibotium barometz* and processed products and to illuminate the effect of processing on 3 kinds of components of *C. barometz*. METHODS: UV-visible spectrophotometry was adopted to determine the contents of water-soluble total protein, total phenolic acid and total polysaccharides in the water decoction of crude *C. barometz* and 4 processed products, namely sand-scorch *C. barometz*, yellow wine *C. barometz*, salt *C. barometz* and steamed *C. barometz*, at wavelengths of 590, 760 and 489 nm respectively. RESULTS: The contents of water-soluble total protein in 5 samples were 4.03%, 3.32%, 3.13%, 3.33% and 3.49%, those of total phenolic acid therein were 0.25%, 1.34%, 1.38%, 2.34% and 1.41%, and those of total polysaccharides therein were 28.56%, 36.06%, 45.21%, 49.60% and 49.01%, respectively. CONCLUSIONS: All above processing methods have an effect to some degree on the contents of the 3 kinds of components of *C. barometz*, where the contents of water-soluble total protein are lower after processing, while those of total phenolic acid and total polysaccharides are higher thereafter.

KEYWORDS *Cibotium barometz*; Processed products; Water-soluble total protein; Total phenolic acid; Total polysaccharides; Content

狗脊为蚌壳蕨科植物金毛狗脊 *Cibotium barometz* 的干燥根茎,味苦、甘、性温,归肝、肾经,具有祛风湿、补肝肾、强腰膝的功效^[1]。生狗脊以祛风湿、利关节为主;砂烫狗脊质地疏松,便于粉碎和煎出有效成分,且易于除去残存绒毛;蒸狗脊和酒狗脊、盐狗脊具有增强“补肝肾、强腰膝”的作用^[2]。本课题组前

期对狗脊不同炮制品的药效学作了大量的研究^[3-7],但尚未涉及这5种样品水煎液中化学成分含量的变化情况。因此,本试验同时对狗脊生品及其4种不同炮制品水煎液中水溶性总蛋白、总酚酸、总多糖的含量进行比较研究,以期阐明炮制对狗脊化学成分的影响,为临床合理用药提供依据。

1 材料

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30973938)

*硕士研究生。研究方向:中药炮制原理。E-mail:13478479869@163.com

#通信作者:教授,博士生导师。研究方向:中药炮制原理。电话:0411-89850135。E-mail:jiatzh@126.com

本栏目协办

南京伊登生物医学科技有限公司

地址:江苏省南京市玄武区龙蟠中路29号珠江路都市经济园312室
邮编:210018

1.1 仪器

U-3010型紫外-可见分光光度计(日本日立公司);电热恒温水浴锅、101型电热鼓风干燥箱(北京市永光明医疗器械有限公司);AE240型十万分之一分析天平(瑞士梅特勒公司);FA1004B型电子天平(上海精密科学仪器有限公司);HH-4型恒温水浴锅(国华电器有限公司);RE-52A型旋蒸蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHZ-DⅢ型循环水式真空泵(上海予华仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

D-无水葡萄糖(以下简称葡萄糖)对照品、原儿茶醛对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110833-200904、118010-201007,纯度:>98%);牛血清白蛋白(北京索莱宝科技有限公司,批号:711J053,纯度:>98%);考马斯亮蓝G250(以下简称考马斯亮蓝,天津市大茂化学试剂厂);苯酚、浓硫酸、乙醇、丙酮、乙醚均为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

狗脊于2013年11月采自广西河池,经辽宁中医药大学王冰教授鉴定为蚌壳蕨科植物金毛狗脊 *Cibotium barometz* 的根茎。

2 方法与结果

2.1 4种炮制品的制备

2.1.1 砂烫狗脊的制备 取净河砂400 g,置于炒制容器内,用武火加热至180~190℃呈滑利状态时,加入净狗脊片50 g,不断翻炒,6 min后取出^[8]。

2.1.2 盐狗脊的制备 取净狗脊片50 g,加入含盐量为1 g的盐水40 ml,用保鲜膜密封,浸润2 h,武火蒸制3 h,停火闷润4 h,取出干燥^[9]。

2.1.3 酒狗脊的制备 取7.5 g黄酒,用清水稀释至40 ml,加入50 g净狗脊片中拌匀,用保鲜膜密封,浸润2 h,放入锅内武火蒸制4 h,停火后闷润4 h,取出干燥^[10]。

2.1.4 蒸狗脊的制备 取净狗脊片50 g,加入清水40 ml并用保鲜膜密封,浸润1 h,放入锅内武火蒸制4 h,停火闷润4 h,取出干燥^[11]。

将生品及以上4种炮制品粉碎,过三号筛,备用。

2.2 水溶性总蛋白的含量测定^[12]

2.2.1 考马斯亮蓝溶液的制备 精密称取考马斯亮蓝100 mg,加入95%乙醇50 ml,溶液变为蓝色,再加入85%(W/V)磷酸溶液100 ml,此时溶液变成血红色,最后用蒸馏水定容至1 000 ml,混匀。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取牛血清白蛋白0.010 05 g,用少量蒸馏水溶解,定容至100 ml,即得100.5 μg/ml的蛋白标准贮备液(4℃冰箱中保存)。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取狗脊生品及不同炮制品粉末各1 g,置于圆底烧瓶中,精密加入蒸馏水100 ml,称质量,加热回流2 h,放凉后补足质量。

2.2.4 标准曲线的制备 取牛血清白蛋白标准贮备液100、200、300、400、500、600、800 μl,分别补加蒸馏水至1 ml,再分别加入5 ml考马斯亮蓝溶液,显色5 min。以1 ml蒸馏水作空白,在400~800 nm波长处扫描,结果牛血清白蛋白在590 nm波长处有最大吸收。测定上述溶液在590 nm波长处的吸光度。以牛血清白蛋白质量浓度(x , μg/ml)为横坐标,以吸光度(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=0.007 6x+0.081 5$ ($r=0.999 9$)。结果表明,牛血清白蛋白检测质量浓度线性范围为10.05~80.40 μg/ml。

2.2.5 精密度试验 取牛血清白蛋白标准贮备溶液1 ml,按“2.2.4”项下操作,连续测定6次。结果,吸光度的RSD=0.56%($n=6$),表明方法精密度良好。

2.2.6 显色稳定性试验 取生狗脊供试品溶液,按“2.2.4”项下相关方法操作,每隔5 min测定1次吸光度,连续测定30 min。结果,吸光度的RSD=3.23%($n=7$),表明供试品溶液中总蛋白在30 min内显色基本稳定。

2.2.7 重复性试验 取生狗脊粉末6份,按“2.2.3”项下方法制备,按“2.2.4”项下方法测定其含量。结果,含量的RSD=1.65%($n=6$),表明方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 称取已知含量的生狗脊粉末0.5 g,共6份,精密称定,按“2.2.3”项下制备供试品溶液,分别加入牛血清白蛋白20.15 mg,然后按“2.2.4”项下方法测定含量,计算得总蛋白的平均回收率为101.1%(RSD=3.52%, $n=6$)。

2.3 总酚酸的含量测定^[13]

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取原儿茶醛对照品5.31 mg,置于50 ml量瓶中,加水使充分溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为0.106 2 mg/ml的对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取狗脊生品及不同炮制品粉末各0.1 g,置于圆底烧瓶中,精密加入蒸馏水100 ml,称质量,加热回流2 h,放凉后补足质量。

2.3.3 标准曲线的制备 精密吸取原儿茶醛对照品溶液50、100、200、300、400、500、600 μl,分别置于10 ml量瓶中,加甲醇至2 ml,加0.3%十二烷基硫酸钠0.8 ml、0.6%FeCl₃-0.9%K₃[Fe(CN)₆](1:1)混合溶液0.4 ml,混匀,暗处放置5 min,加0.1 mol/L盐酸溶液至25 ml,摇匀,暗处放置20 min。蒸馏水平行做空白试验。以原儿茶醛对照品溶液质量浓度(x , mg/ml)为横坐标,以760 nm波长处测定的吸光度(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=35 366x+0.175 7$ ($r=0.999 5$)。结果表明,原儿茶醛检测质量浓度线性范围为5.31~63.72 μg/ml。

2.3.4 精密度试验 取原儿茶醛对照品溶液0.5 ml,按“2.3.3”项下方法操作,连续测定6次。结果,吸光度的RSD=0.45%($n=6$),表明方法精密度良好。

2.3.5 显色稳定性试验 取生狗脊供试品溶液,按“2.3.3”项下操作,每隔5 min测定1次吸光度,连续测定30 min。结果,吸光度的RSD=4.36%($n=7$),表明狗脊供试品溶液中总酚酸类化合物在30 min内显色基本稳定。

2.3.6 重复性试验 取生狗脊粉末6份,按“2.3.2”项下方法制备,按“2.3.3”项下方法测定其含量。结果,含量的RSD=2.26%($n=6$),表明方法重复性良好。

2.3.7 加样回收率试验 称取已知含量的生狗脊粉末0.1 g,共6份,精密称定,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,分别加入原儿茶醛对照品0.25 mg,按“2.3.3”项下方法测定含量,计算得总酚酸的平均回收率为99.6%(RSD=2.97%, $n=6$)。

2.4 总多糖的含量测定^[14]

2.4.1 对照品溶液的制备 取105℃干燥至恒质量的葡萄糖约100 mg,精密称定,置于100 ml量瓶中,加入适量水溶解,并稀释至刻度,摇匀,即得1.021 0 g/L的葡萄糖对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备 取狗脊生品及不同炮制品粉末各0.5 g,精密称定,置于圆底烧瓶中,加入100 ml 80%乙醇,加热回流,每次1 h,至无色,抽滤。滤渣在常温下挥干,将滤渣连同滤纸置于圆底烧瓶中,加蒸馏水100 ml,加热回流1 h,2次,趁热滤过,用少量水洗涤滤器,合并滤液和洗液,放冷,移入250 ml量瓶中,稀释至刻度,即得。

2.4.3 苯酚试液的制备 取苯酚100 g,加铝片0.1 g、碳酸氢钠0.05 g,蒸馏,182 ℃收集馏分。称取该馏分5 g,置于100 ml量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度,摇匀,滤过并置于棕色瓶中,即得5%苯酚试液,备用。

2.4.4 标准曲线的制备 精密吸取葡萄糖对照品溶液0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 ml,分别置于具塞刻度试管中,加水至1 ml,再分别加入5%苯酚溶液1 ml,混匀,加入浓硫酸5 ml,充分混匀。另取1.0 ml的蒸馏水同上操作,作为空白对照。将上述溶液置于沸水浴中反应5 min,迅速放冷至室温,在489 nm波长处测定吸光度。以葡萄糖对照品溶液质量浓度(x)为横坐标,以吸光度(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=7.642.088x+0.154(r=0.9993)$ 。结果表明,葡萄糖检测质量浓度线性范围为0.051~0.613 mg/ml。

2.4.5 精密度试验 取同一供试品溶液1.0 ml,按“2.4.4”项下方法,连续测定6次。结果,吸光度的RSD=1.03%(n=6),表明方法精密度良好。

2.4.6 显色稳定性试验 取生狗脊供试品溶液,按“2.4.4”项下方法操作,每隔5 min测定1次吸光度,连续测定30 min。结果,吸光度的RSD=2.67%(n=7),表明供试品溶液中总多糖在30 min内显色基本稳定。

2.4.7 重复性试验 取生狗脊粉末6份,按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.4.4”项下方法测定,结果总多糖的平均含量为28.56%(RSD=1.41%,n=6),表明方法重复性良好。

2.4.8 加样回收率试验 称取已知含量的生狗脊粉末0.25 g,共6份,精密称定,按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,分别加入葡萄糖对照品71.4 mg,然后按“2.4.4”项下方法测定含量,计算得总多糖的平均回收率为99.3%(RSD=3.56%,n=6)。

2.5 含量测定结果

取狗脊生品及不同炮制品分别按照“2.2.3”“2.3.2”“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,再分别按“2.2.4”“2.3.3”“2.4.4”项下方法测定吸光度,计算供试品中水溶性总蛋白、总酚酸和总多糖的含量,结果见表1。

表1 狗脊生品及其不同炮制品中水溶性总蛋白、总酚酸、总多糖含量测定结果(n=6,%)

Tab 1 Determination results of water-soluble total protein, total phenolic acid and total polysaccharides in crude *C. barometz* and different processed products (n=6,%)

样品	水溶性总蛋白	总酚酸	总多糖
生狗脊	4.03	0.25	28.56
砂烫狗脊	3.32	1.34	36.06
酒狗脊	3.13	1.38	45.21
盐狗脊	3.33	2.34	49.60
蒸狗脊	3.49	1.41	49.01

由表1结果可知,不同的炮制方法对狗脊中水溶性总蛋白、总酚酸、总多糖含量均有一定的影响,水溶性总蛋白的含量在炮制后均呈现一定程度的降低,总酚酸和总多糖的含量在炮制后均呈现一定程度的升高。

3 讨论

本试验首次考察了狗脊不同炮制品水煎液中水溶性总蛋白、总酚酸、总多糖的含量变化。炮制后水溶性总蛋白的含量均较生品有所下降,可能是由于加热破坏了狗脊中的部分蛋白质结构,从而使其含量有所下降,但是含量降低后所致生物活性的变化尚不明确,有待进一步研究。酚酸类化合物是狗

脊中重要的活性成分,《中国药典》以原儿茶酸作为含量测定的指标来评价药材的质量。狗脊中总酚酸的含量炮制后均有所增加,是由于炮制加热致使糖苷键断裂生成酚酸所致,故炮制后“补肝肾、强腰膝”作用的增强可能与总酚酸的含量增加有关^[15]。多糖是中药中普遍存在的一类化学成分,具有延缓衰老、提高免疫功能等多方面的补益药理作用^[16-18],狗脊经炮制后多糖含量的增加也符合制狗脊“补肝肾作用增强”的传统炮制理论。但是狗脊发挥药效的活性成分尚不能明确,故还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 95.
- [2] 贾天柱. 中药炮制学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008: 114.
- [3] 鞠成国, 曹翠香, 史琳, 等. 狗脊及其炮制品和狗脊毛的镇痛、止血作用研究[J]. 中成药, 2005, 27(11): 1 279.
- [4] 李军, 王振海, 王春田, 等. 狗脊及其炮制品对佐剂性关节炎大鼠血液流变学的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(17): 2 170.
- [5] 徐钢, 裴启洋, 鞠成国, 等. CCK-8法检测狗脊不同炮制品对成骨细胞的影响[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(24): 4 319.
- [6] 徐钢, 孙娜, 赵敏杰, 等. 狗脊不同炮制品水煎液抗维甲酸致雄性大鼠骨质疏松症研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(6): 1 011.
- [7] 索天娇, 韩蕾, 贾天柱. 狗脊生、制品正丁醇提取物药效学实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(10): 35.
- [8] 解世全, 鞠成国, 贾天柱. 正交实验优选狗脊炮制工艺[C]//中华中医药学会第六届中药炮制学术会议论文集. 淄博: 中华中医药学会中药炮制分会, 山东鼎立中药材科技有限公司, 2006: 3.
- [9] 药政管理局. 全国中药炮制规范[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 71.
- [10] 徐钢, 鞠成国, 周远征, 等. 正交试验优选酒制狗脊的炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 15.
- [11] 赵敏杰, 徐钢, 鞠成国, 等. 狗脊蒸后切与切后蒸工艺的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 8.
- [12] 董洁, 郭立玮, 文红梅, 等. 中药水提液中蛋白质含量测定方法研究[J]. 现代中药研究与实践, 2009, 23(6): 40.
- [13] 鞠成国, 章琦, 于海涛, 等. 不同产地生制狗脊中多糖的比较分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 46.
- [14] 甄攀, 肖金鱼. 吴茱萸及其炮制品中总酚酸含量测定[J]. 河北北方学院学报: 医学版, 2009, 26(5): 13.
- [15] 刘国欣, 邢建国, 李明春, 等. 香菇多糖对小鼠T淋巴细胞膜上离子通道基因表达的影响[J]. 中国药房, 2014, 25(15): 1 361.
- [16] 许枏, 贾天柱. 烫狗脊炮制过程的化学反应及产物研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(15): 2 066.
- [17] 曾祥海. 山药多糖对正常小鼠与实邪证模型小鼠免疫功能的影响[J]. 中国药房, 2014, 25(23): 2 125.
- [18] 吴贤波, 杜全宇, 梁亚丽, 等. 黄芪多糖对肺气虚模型小鼠免疫功能的影响[J]. 中国药房, 2012, 23(47): 4 417.

(收稿日期: 2014-09-17 修回日期: 2014-12-17)

(编辑: 刘 萍)