

不同采收期杜仲叶和果实中总黄酮和多糖含量比较

周程艳*, 马红翠, 王美, 王旭, 张海岚, 艾凌艳
(河北联合大学药学院, 河北 唐山 063000)

[摘要] 目的:明确杜仲叶和果实中的总黄酮和总多糖的含量,为杜仲叶和果实的最佳采收期的确定以及开发提供科学的依据。方法:不同采收期杜仲叶和果实,分别用 70% 乙醇加热回流提取 3 次,紫外分光光度法(506 nm)对其总黄酮的含量进行测定,进行系统的分析统计,得出总黄酮含量最高的月份。不同采收期杜仲叶和果实,分别用水加热回流提取 3 次,用苯酚-硫酸显色,用紫外分光光度法(481 nm)对其总多糖的含量进行测定,进行系统的分析统计,得出总多糖含量最高的月份。结果:紫外分光光度法测得不同季节的杜仲叶和果实中总黄酮和总多糖的含量有显著差异,叶和果实中总黄酮含量以 4 月份为最高。叶和果实中总多糖含量均以 3 月份为最高,但是果实中总多糖的含量在 6 月份会达到最低,7 月份又有显著回升;而叶的这个过程不明显,5 月份后总多糖含量一直缓慢下降。结论:杜仲叶和果实中的总黄酮和总多糖的含量均比较高,其最佳采收期均为 4 月份。

[关键词] 杜仲叶;杜仲果实;总黄酮;总多糖;最佳采收期

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0111-04

Determination and Comparison of Content of Total Flavonoids and Total Polysaccharides in Leaves and Fruit of *Eucommia ulmoides* during Different Harvest Periods

ZHOU Cheng-yan*, MA Hong-cui, WANG Mei, WANG Xu, ZHANG Hai-lan, AI Ling-yan
(Hebei United University, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To make clear the peak content of total flavonoids and total polysaccharide in the leaf and fruit of *Eucommia ulmoides*, so as to provide evidence for the optimal harvest of the fruit of *E. ulmoides*. **Method:** Total flavonoids extracted with 70% ethanol by reflux from leaves and fruits of *E. ulmoides* in different harvest periods were determined by UV spectroscopy at 506 nm. Total polysaccharide from leaves and fruits of *E. ulmoides* in different harvest periods were determined by phenol-sulfuric acid method and measured by ultraviolet spectrophotometer at 481 nm with glucose as a reference substance. **Result:** The flavonoids content in leaves and fruits of *E. ulmoides* during different harvest periods were significant different by UV spectroscopy. The highest flavonoids content of leaves and fruits during different harvest periods of *E. ulmoides* was found in April, and then declined until July and a little rise again. The content of flavonoids stabilized after September. There were significant differences about total polysaccharide in leaves and fruit of *E. ulmoides* in different seasons. The total polysaccharide content of the leaves and fruits of *Eucommia* in different harvests were highest in March. The content of polysaccharide of the *Eucommia* leaf gradually decreased after May. And then, total polysaccharide content of *Eucommia* fruits would stabilize from August to November. **Conclusion:** It can be obtained from this experiment that the best harvest period of the leaves and fruits of *Eucommia* is in April.

[收稿日期] 20100823(009)

[基金项目] 河北省唐山市科技局科研项目(09130223b)

[通讯作者] * 周程艳, 硕士, 讲师, 从事中药药效和有效成分筛选的研究, E-mail: xuefanone@sohu.com

[Key words] *Eucommia ulmoides* leaf; *Eucommia ulmoides* fruit; total flavonoids; total polysaccharide; different harvest periods

杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliver 古称“曼榆”，又名“木棉”，为杜仲科杜仲属的落叶乔木，传统上用皮入药，为我国特有的单科目、单属科、单种属植物，已经有 2 000 多年的栽培历史^[1]。现代研究表明，杜仲含有多种药效成分和营养成分，主要为黄酮和多糖类等化学成分，如杜仲多糖、槲皮素、山柰酚、芦丁、杜仲醇、杜仲胶、杜仲苷、松脂醇二葡萄糖苷和维生素等^[2]，有良好的降压、利尿、保肝、抗肿瘤、抗菌、抗衰老和中枢镇静等多种药理作用，因此近年来在临床上的应用越来越广泛，临床需求量显著增加^[3-4]。由于杜仲传统药用部位的特殊，使得杜仲的发展及利用受到限制。为了更好的开发、利用我国的这一宝贵药用植物资源，研究用杜仲的其他部位入药势在必行。因此，本实验首次对杜仲叶与杜仲果实中总黄酮和总多糖含量的进行全面系统的研究，从而初步确定杜仲叶和果实最佳采集时期，为杜仲的深入开发和利用提供科学的依据。

1 材料

1.1 试剂 95% 乙醇、硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠、苯酚、碳酸氢钠、铝片、芦丁对照品(98%，深圳美荷生物有限公司)、葡萄糖、浓硫酸。

1.2 仪器 TU-180 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。BT.125D 型 1/10 万电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司)。FA2104N 型 1/万电子天平(上海民桥精密仪器厂)。FA2104N 型普通电子天平(上海民桥精密仪器厂)。PTHW 型电热套(巩义市英峪予华仪器厂)。电热恒温水浴锅(上海医疗器械五厂)。予华 SHZ-D(III) 循环水式真空泵(河南省巩义市英峪予华仪器厂)。RE-52AA 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

1.3 药材 杜仲叶与果实均于 3~11 月份每月中旬采集于华北煤炭医学院校园内 20 年左右树龄的杜仲树上，晾干之后收集备用。所采集的叶片大小均匀，厚度相同，光泽较好；所采集的果实大小亦均匀，种粒饱满。经华北煤炭医学院中医系中医学教研室包巨太教授鉴定为其正品。

2 方法

2.1 杜仲叶和果实中总黄酮的含量测定

2.1.1 标准溶液的制备及标准曲线的绘制 以

P_2O_5 为干燥剂，减压干燥(60 °C, 0.09 mPa)至恒重的芦丁对照品 0.081 25 g，用 70% 的乙醇溶解，定容至 250 mL，摇匀得 $0.000\ 325\ g \cdot L^{-1}$ 的标准液，放入低温暗箱内及时检测。精密量取对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL 分别置 25 mL 量瓶中，各加 70% 的乙醇至 10 mL，摇匀，加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL，使混匀，放置 6 min，加 10% 硝酸铝溶液 1 mL，摇匀，放置 6 min，加 4% 氢氧化钠试液 10 mL，混匀，再加 70% 的乙醇定容至刻度，摇匀，放置 15 min，用 70% 乙醇作空白对照。采用紫外分光光度法在 506 nm 的波长处测定吸收度，以标准溶液浓度(C)为横坐标，A 为纵坐标，绘制标准曲线，得回归方程 $Y = 12.097X - 0.006\ 4$ ($r = 0.999\ 6$)，线性范围 0.013 ~ 0.078 $g \cdot L^{-1}$ 。

2.1.2 杜仲叶和果实中总黄酮的含量测定 精密称取干燥至恒重的不同生长期(3~11 月份)杜仲叶和果实各 5 g，分别用 100 mL 70% 乙醇浸泡 12 h，然后加热回流提取 3 次，首次用时 2 h，以后 2 次均是 1.5 h，合并滤液，使用旋转蒸发器浓缩液体，浓缩液放入冰箱，待测。将经过上述操作处理的杜仲叶和果实醇提物的浓缩液用 70% 乙醇稀释至 250 mL，再精密量取 20.00 mL 稀释至 100 mL，精密量取 2 mL 至 25 mL 量瓶中，然后按照 2.1.1 标准曲线项目下的检测方法，在 506 nm 处测量吸光度，根据回归方程和稀释倍数计算出杜仲叶和果实中总黄酮的含量。

2.2 杜仲叶和果实中总多糖的含量测定

2.2.1 标准溶液的制备及标准曲线的绘制 称取苯酚 100 g 置于 250 mL 圆底烧瓶中，再加入铝片 0.1 g 和碳酸氢钠 0.05 g，常压蒸馏，收集(180 ± 2) °C 的馏分，精密此馏分 5 mL 置于 100 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，即得 5% 的苯酚溶液，将其置于棕色试剂瓶中，放入冰箱备用。

精密称取 105 °C 下干燥至恒重的葡萄糖 100 mg 置于 100 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，即得葡萄糖标准溶液。精密吸取葡萄糖标准溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0 mL 分别置于 25 mL 量瓶中，加去离子水稀释至刻度，摇匀。精密吸取上述各种溶液 2.0 mL 分别加入

5%的苯酚溶液 1.0 mL 摇匀,迅速加入 5.0 mL 浓硫酸,振摇 5 min,置于沸水浴中加热 15 min,然后置于冷水浴中冷却 30 min,以去离子水 2 mL 按上述条件处理的溶液作为空白,在 481 nm 波长处测量吸光度 (A),以标准溶液浓度 (C) 为横坐标, A 为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 11.759X - 0.016$ ($r = 0.9985$),结果表明葡萄糖在 $0.007 \sim 0.078 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.2.2 杜仲叶和果实中总多糖的含量测定 精密称取干燥至恒重的不同生长期(3~11月份)杜仲的叶和果实各 10 g,分别用 200 mL 去离子水浸泡 12 h,然后加热回流提取 3 次,首次用时 2 h,以后 2 次均是 1.5 h,合并滤液,浓缩至 1:2(即 1 g 药材相当于 2 mL 溶液),加 95% 的乙醇使溶液醇浓度达到 80% 以上,静置 12 h 使多糖沉淀,抽滤,得多糖粗品。将上述所得的多糖连同滤纸一起放入烧杯中加水溶解,待溶解完全后将液体转移到 1 000 mL 量瓶中,加水稀释至刻度。根据该溶液浓度,精密吸取 10 mL 置于 25 mL 量瓶中定容,摇匀,得供试品溶液。精密吸取 2 mL 上述供试品溶液置于试管中,然后按照 2.2.1 标准曲线项目下的检测方法,在 481 nm 处测量 A ,根据回归方程和稀释倍数计算出杜仲叶和果实中总多糖的含量。

2.3 精密度试验 精密量取 2.1.1 中所配制的标准品溶液 2 mL,按照 2.1.1 中的方法,重复测定 6 次,结果总黄酮的 RSD 0.50% ($n = 6$)。精密量取 2.2.1 中所配制的对照品溶液 2 mL,按照 2.2.1 中的方法,重复测定 6 次。结果表明总多糖的 RSD 0.50% ($n = 6$),仪器精密度良好。

2.4 稳定性试验 精密量取 2.1.1 中所配制的对照品溶液 2.0 mL 和 2.0 mL 供试品溶液各 3 份,按照 2.1.1 中的方法进行测量,芦丁对照品溶液和同一供试样品溶液在反应体系形成黄酮-铝盐络合物后 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120 min,按 2.2.1 项下方法测定其 A 。结果表明在 30 min 内稳定性良好, RSD 0.12%, 30 min 后 A 逐渐下降且变化明显,提示测定宜在反应显色后 30 min 内进行,本实验选择测定时间为反应显色后 15 min。同时吸取同一供试品溶液 1.0 mL 分别在制备后 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 h,按 2.2.1 方法测定总黄酮含量。结果 RSD 0.95%,表明供试品溶液在 8 h 内基本稳定。

精密量取 2.2.1 中所配制的对照品溶液 2 mL,

测定方法同 2.2.1,每隔 30 min 测定 1 次 A ,共测定 8 次,结果表明, RSD 0.02% ($n = 6$) 供试品溶液在显色操作完成后 2.5 h 内基本稳定,提示测定宜在反应显色后 2.5 h 内进行,故选择测定时间为反应显色后 30 min。

2.5 重复性试验 精密量取 2.1.1 中所配制的对照品溶液,分别平行制备 6 份供试品溶液进样测定,按照 2.1.1 中的方法进行测量,结果表明, RSD 1.23% ($n = 6$)。取 2.2.1 中所配制的同一供试品,分别平行制备 6 份供试品溶液进样测定,按照 2.2.1 中的方法进行测量。结果 RSD 1.18% ($n = 6$)。

2.6 加样回收率 取 2.1.2 中所配制的已知总黄酮含量的供试液中已知含量的供试液 5 份,分别置 25 mL 量瓶中,加入定量的芦丁对照品,进行测定,并计算回收率。结果平均回收率为 99.89%, RSD 1.93% ($n = 5$)。取 2.2.2 中所配制的已知总多糖含量的供试液中已知含量的供试液 5 份,分别置试管中,加入定量的葡萄糖对照品,进行测定,并计算回收率。结果平均回收率 101.3%, RSD 0.61% ($n = 5$)。

3 结果

3.1 杜仲叶和果实中总黄酮的含量 见图 1。可得出杜仲不同采收期的叶和果实中黄酮含量均以 4 月份为最高,但是叶中总黄酮的含量总体上要高于果实中的含量。

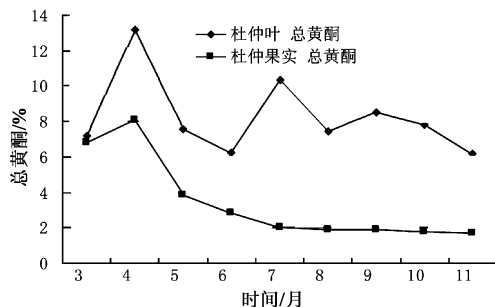


图 1 杜仲不同采收期叶子和果实中总黄酮含量变化趋势

3.2 杜仲叶和果实中总多糖的含量测定 见图 2。可得出杜仲不同采收期的叶和果实中黄酮含量均以 3 月份为最高,但是叶中总多糖的含量在 3 月份低于果实的含量,而在 3 月份之后叶中总多糖的含量均高于果实的含量。

4 讨论

杜仲叶与杜仲皮的化学成分存在差异,但大部分组成还是相同的,可以以叶代皮入药^[5]。近年研究也表明杜仲叶与皮有相似的药理作用,可以代皮供药

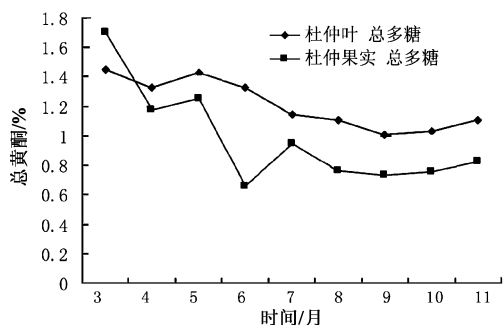


图 2 杜仲不同采收期叶子和果实中总多糖含量变化趋势

用。杜仲叶中含有的天然产物对动物的心血管有着明显的药理作用,蛙后肢血管灌注证明杜仲煎剂有扩张血管作用,浓度越高作用越明显,对兔耳灌注作用亦相同^[6]。朱丽青等也证实杜仲叶水煎剂可明显增加豚鼠离体心脏冠状脉流量,杜仲皮则无此作用^[7]。

研究显示,杜仲叶和果实中总多糖含量在 3 月份都达到了最高点,因为此时唐山地区气温刚刚开始升高,温度比较底,降水量较少 9.0 ~ 16.8 mm,这样的气候环境不适宜杜仲的快速生长,因此叶和果实都较小,而经过一个冬天的蓄积,内部有效成分的含量都较高,占有比例较大,因此含量比较高。杜仲叶和果实中的总黄酮和总多糖含量在 4 月份都有一个高峰期,可能是因为此时唐山地区气温正在逐渐升高,且气温回升快,蒸发大,平均气温 9.6 ~ 15.7 °C,降水量 24.1 ~ 77.3 mm,占全年降水量的 11.8%,因此此时叶片和果实都较小,而经过 1 个冬天的蓄积,内部有效成分的含量都较高,占有比例较大;但是总多糖积累的整体比例在同期不如总黄酮增加的快,因此在 4 月份没有形成杜仲叶子和果实总多糖含量的最高点,而在 5 月份有不太显著的回升。最终在 4,5 月份杜仲叶子和果实总多糖的含量稍微低于 3 月份,但是依然显著高于其他月份。虽然 4,5 月份,随着季节的升温,杜仲树木的生长,杜仲的叶子和果实都进入了快速生长时期,此时是杜仲的生长旺盛期;尤其是到了 5 月份,唐山地区气温显著升高,降水量明显增加,使得叶子的生长更加旺盛,随着树木的生长,叶片和果实内的有效成分虽然也有所增加,但整体比例不及树木的生长程度,由于总黄酮和总多糖的积累途径不同,因此在 5 月份叶和果实中的总黄酮的含量有显著降低,而总多糖有所回升。6 月份唐山地区在此时以晴到多云天气为主,气温明显偏高,平均气温为 13 ~ 23 °C,全省平均降水量为 100 mm,降水量明显多于前月份,但是杜

仲具有两次生长高峰,在第 1 次生长高峰后会有 1 个短暂的生长低谷期,而第 1 次生长高峰在 4,5 月份,因此 6 月份是杜仲第 1 次高、径生长高峰期之后的低谷期,此时植物的新陈代谢比较缓慢,因此有效成分的集聚能力降低,因此 6 月份是杜仲叶子和果实总黄酮含量最低点。7 月中旬至 8 月中旬为“三伏”期,平均气温为 27 °C 为降水集中期,平均降水量在 600 ~ 783 mm,比较适宜杜仲旺盛生长,达到了杜仲的另 1 个生长茂盛期限,叶片和果实中总黄酮和总多糖的含量有一定幅度的回升,虽含量不及 4 月份,但其叶片产量高,叶重且厚,总黄酮和总多糖的总含量比较高^[8]。但 7,8 月份采收对杜仲的生长影响比较大,因此不适宜采收;而 4 月份总黄酮的含量达到最高点,总多糖的含量虽不及 3 月份,但是依然显著高于其他月份,同时叶和果实产量也比较高,因此从总黄酮含量的角度考虑,将 4 月份作为杜仲叶和果实的最佳采收时间比较适宜,但与陈立群等^[9]的研究有不同之处。秋季以后,唐山地区昼夜温差大,气温缓慢波状下降,雨水逐渐减少,季降水量平均为 72.1 mm,占全年总降水量的 11%,平均气温 12.0 °C,杜仲进入了生长不活跃期,植物代谢能力降低,因此总黄酮和总多糖的缓慢降低,呈不断下降趋势。

【参考文献】

- [1] 王景祥. 杜仲叶和杜仲皮的成分比较[J]. 中草药, 1987, 18(3): 11.
- [2] 宁康健, 曾艳, 吕锦芳, 等. 不同采摘时期杜仲叶中枢镇静作用的比较[J]. 中国中医药科技, 2009, 16(6): 459.
- [3] 高锦明, 刘丽, 张鞆灵. 杜仲叶生物活性成分的提纯研究[J]. 西北林学院报, 1998, 13(1): 83.
- [4] 杜红岩. 杜仲活性成分与药理研究的新进展[J]. 经济林研究, 2003, 21(2): 58.
- [5] 叶文峰. 杜仲叶中化学成分、药理活性及应用研究进展[J]. 林产化工通讯, 2004, 38(5): 40.
- [6] 于学玲, 朱荣誉, 刘晓明. 杜仲皮、叶营养成分的分析[J]. 中草药, 1992, 23(3): 161.
- [7] 朱丽青, 张黎明. 杜仲叶和杜仲皮的药理实验[J]. 中草药, 1986, 17(12): 15.
- [8] 马梅, 马希汉, 张檀, 等. 杜仲叶采收时间与采叶量的研究[J]. 西北林学院学报, 1999, 14(3): 56.
- [9] 陈立群, 杨中林. 不同采收期杜仲叶中 3 种黄酮成分动态变化研究[J]. 海峡药学, 2007, 19(4): 29.

[责任编辑 邹晓翠]