

分光光度法测定显齿蛇葡萄总黄酮含量

熊皓平^{1,2}, 杨伟丽¹, 何国庆², 张友胜³

(1. 湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128; 2. 浙江大学生物系统工程与食品学院, 浙江 杭州 310029; 3. 广东省农业科学院蚕业研究所, 广东 广州 510640)

摘 要: 用 95% 的乙醇为溶剂连续加热回流浸提显齿蛇葡萄幼嫩茎叶中有效成分, 以二氢杨梅素为标样, 选择波长 294nm, 采用二氯化铝分光光度法, 建立显齿蛇葡萄总黄酮含量测定方法。实验结果表明: 标液浓度在 5~50 $\mu\text{g/ml}$ 范围内, 吸光度与浓度呈良好的线性关系, 回归方程为 $A=3.166 \times 10^{-3}X - 9.0 \times 10^{-3}$, $r=0.9999$ ($n=5$)。加样平均回收率为 98.6%, RSD 为 2.54%。本法操作简便、快速、准确, 可作为该药材质量评价方法。

关键词: 显齿蛇葡萄; 总黄酮; 二氢杨梅素; 分光光度法

Determination on Total Flavanoids of *Ampelopsis grossedentata* by Spectrophotometry

XIONG Hao-ping^{1,2}, YANG Wei-li¹, HE Guo-qing², ZHANG You-sheng³

(1. College of Food Science and Technology, Wuhan Agricultural University, Changsha 410128, China;
2. College of Biosystem Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;
3. Institute of Silkworm, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A method for the determination on total flavanoids of *Ampelopsis grossedentata* was established: using 95% ethanol by continuous thermal reflux to extract its young shoots, taking dihydromyricetin as standard sample, selecting 294nm wavelength and by AlCl_3 spectrometric method. The results showed that the regression equation, within the range of the standard sample concentration in 5-50 $\mu\text{g/ml}$, was $A=3.166 \times 10^{-3}X - 9.0 \times 10^{-3}$, with a good linearity ($r=0.9999$) between the absorbance and concentration. The average recovery rate was 98.6% and RSD was 2.54% ($n=5$). The method is simple, rapid and accurate and suitable for the quality evaluation of *Ampelopsis grossedentata*.

Key words: *Ampelopsis grossedentata*; total flavanoids; dihydromyricetin; spectrometric method

中图分类号: Q949.756.3; R284.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-6630(2004)02-0144-02

显齿蛇葡萄系葡萄科蛇葡萄属植物 *Ampelopsis grossedentata* (Hand-Mazz) W. T. Wang^[1]。全株药用, 具清热、解毒、祛风湿、强筋骨等功效, 民间将其幼嫩茎叶经类似茶叶加工的方法制成“保健茶”, 用于治疗感冒发热、咽喉肿痛、黄疸型肝炎、疱疹等症^[2,3]。经诸多学者的研究表明显齿蛇葡萄中主要的有效成分是以二氢杨梅素为主体的黄酮类化合物^[4~6]。因而总黄酮的测定是该药材质量评价最为重要的依据, 目前关于显齿蛇葡萄总黄酮及其二氢杨梅素的测定已有报道^[7]。笔者在比较、综合前人的研究基础上, 通过自己的反复实验, 建立了一种简便、快速、准确的分光光度法。

1 仪器与材料

索氏提取器, UV-754 型分光光度计, 电子天平(感量为 0.0001g)。

标样二氢杨梅素由张友胜博士经高速逆流色谱制得, 纯度达 99.5% 以上。显齿蛇葡萄春季幼嫩茎叶鲜叶样以及春季幼嫩茎叶加工样(2001 年), 由湖南省张家界市永定区科委提供, 作者依文献^[1]鉴定为葡萄科蛇葡萄属中的显齿蛇葡萄(*Ampelopsis grossedentata*), 鲜叶样经作者区分茎和叶, 并分别及时杀青、干燥固样。所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备

精密称取显齿蛇葡萄固定样品 0.2g(已粉碎并过 0.42mm

收稿时间: 2003-06-03

作者简介: 熊皓平(1970-), 女, 博士, 研究方向为食品微生物与天然产物的发酵生产。

筛),置索氏提取器中,适量石油醚加热回流30min,弃石油醚提取液,并于温水浴中挥干残留石油醚。然后加20ml 95%的乙醇加热煮沸回流提取1h,趁热过滤,并用乙醇定容为25ml。

2.2 标准溶液的制备

精密称取二氢杨梅素10mg,用95%的乙醇溶解,定容为100ml,即配成浓度为100 μ g/ml的标液。

2.3 最大吸收波长的选择

精密吸取标液1ml,样品溶液0.1ml,分别置于10ml的容量瓶中,精密加入5%的 $AlCl_3$ 溶液3ml,95%的乙醇定容(总黄酮浓度在5-50 μ g/ml范围内)。分别于200~400nm处随同空白扫描。结果样品和标液均在294nm处有最大吸收,故选择294nm为测试波长。

2.4 标准曲线制作

准确吸取标液0、0.5、1、1.5、2.0、2.5ml分别置于10ml容量瓶中,加入5%的 $AlCl_3$ 溶液3ml,用95%的乙醇定容,于294nm处测定吸光度。以标样的质量(g)为横坐标,吸光度为纵坐标,建立回归方程为:

$$A=3.166 \times 10^{-3}X - 9.0 \times 10^{-3}, r=0.9999 (n=5).$$

2.5 样品含量测定

精密吸取样品溶液0.1ml,置于10ml容量瓶中,加入5%的 $AlCl_3$ 溶液3ml,95%的乙醇定容,于294nm处测定吸光度。根据回归方程计算总黄酮含量,结果见表1。

表1 样品含量测定结果(n=4) (%)

样品	总黄酮含量	RSD
幼叶	36.52	0.58
幼茎	9.65	0.54
加工样	36.18	0.62

2.6 样品稳定性考察

将同一样品溶液按2.5项平行配制多份,在室温条件下避免阳光直射,每隔30min测定一次。结果表明,在4h内,吸光值基本保持不变。

2.7 加样回收率实验

精密称取幼叶样品0.2g,加10mg二氢杨梅素,依次按2.1、2.5项操作,计算加样回收率,共重复5次。结果平均回收率为98.6%,RSD为2.54%。

3 讨论

3.1 显齿蛇葡萄黄酮类成分含量丰富(占原料干物率的30%以上),尤以其中的一个单体—二氢杨梅素(占原料

干物率的20%以上)为其特征性成分^[1]。这在植物界中实属罕见,因此引起了众多学者极大的关注并展开了相关研究。笔者对该植物抗菌作用的研究表明,其具有广谱、高效的抗菌性能的有效成分正是以二氢杨梅素为主体的黄酮类化合物^[9]。随着对显齿蛇葡萄化学成分、药理功能研究的深入,开发与利用显齿蛇葡萄指日可待。鉴于该植物有不同的产地、不同的品种、采摘有不同的季节,而不同来源的材料其有效成分的含量与组成不一。为建立一个统一的评价标准,以其中黄酮类化合物的含量作为一个衡量指标无疑是最合理、最简便的。

3.2 黄酮类化合物水溶性较差,醇溶性较好,故提取时需乙醇作溶剂。乙醇作溶剂时,不可避免地将脂溶性色素一起提取出来,这将干扰比色测定,故样品先以石油醚回流脱脂,以剔除其干扰。同理,标液与试液的配制都需用乙醇作溶剂定容,从经济的角度考虑,必须有效地控制溶剂的用量。因而提取时采用索氏提取器连续加热提取,使有效成分在有限的溶剂中多次提取,既保证了提取效果,又节省了溶剂用量。溶液配制时,均需精密量取,以小体积定容。

参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所.中国高等植物图鉴(补编)第二册[M].北京:科学出版社,1983.349-356.
- [2] 全国中草药汇编编写组.全国中草药汇编下册[M].北京:人民出版社,1978.789.
- [3] 广西药物研究所.广西药用植物名录[M].南京:广西民族出版社,1974.202-206.
- [4] 钟正贤,覃洁萍,周桂芬.广西瑶族藤茶中双氢杨梅树皮素的药理研究[J].中国民族医药杂志,1998,4(3):42-44.
- [5] 周天达,周雪仙.藤茶中双氢黄酮醇的分离、结构鉴定及药理活性[J].中国药理学杂志,1996,31(8):458-461.
- [6] 覃洁萍,钟正贤,周桂芬,等.双氢杨梅树皮素降血糖的实验研究[J].中国现代应用药学,2001,18(5):351-352.
- [7] 何桂霞,裴刚,周天达,等.显齿蛇葡萄中总黄酮和二氢杨梅素的含量测定[J].中国中药杂志,2000,25(7):423-425.
- [8] 张友胜,杨伟丽,熊皓平.显齿蛇葡萄部分营养及功能成分研究[J].食品科学,2001,22(9):75-77.
- [9] 熊皓平,何国庆,杨伟丽,等.显齿蛇葡萄提取物抗菌作用的研究[J].中国食品学报,2003.