

王伟, 邹金美, 黄冰晴, 等. 比色法测定大血藤中总黄酮含量及其清除 DPPH 自由基研究[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 356–358.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.127

# 比色法测定大血藤中总黄酮含量 及其清除 DPPH 自由基研究

王伟, 邹金美, 黄冰晴, 赵晓丹, 洪雅珍, 张国广

(闽南师范大学生物科学与技术学院, 福建漳州 363000)

**摘要:**以中药材大血藤 [*Sargentodoxa cuneata* (Oliv.) Rehd. et Wils.] 的乙醇提取物为对象, 提出 1 种基于比色法的大血藤总黄酮测定方法, 同时考察了提取物对 DPPH 自由基的清除能力。结果表明, 以芸香苷为标准品的亚硝酸钠-硝酸铝显色法更适合大血藤提取物中总黄酮含量的测定, 测定波长为 510 nm, 芸香苷在 0~0.5 mg/mL 范围内, 质量浓度与吸光度呈良好的线性关系, 平均加样回收率为 99.3%, 精密度、稳定性、重现性均理想; 抗氧化活性试验结果表明大血藤提取物具有很强的清除 DPPH 自由基能力。

**关键词:**大血藤; 总黄酮; 紫外-可见分光光度法; 抗氧化性; 自由基

**中图分类号:** R284.2    **文献标志码:** A    **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0356-03

中药大血藤是木通科植物大血藤 [*Sargentodoxa cuneata* (Oliv.) Rehd. et Wils.] 的干燥藤茎, 具有清热解毒、活血、祛风止痛等功效, 主治肠痈腹痛、热毒疮疡、经闭、跌扑肿痛、风湿痹病等症, 主要产自湖北省、四川省、江西省、浙江省、江苏省、福建省等地。大血藤在不同地区名称不一, 《中药大辞典》记录的别名有: 血藤、过山龙、红藤、千年健、血竭、血通、大活血、活血藤等 10 多种<sup>[1]</sup>。研究表明, 大血藤含有多种化学成分, 包括黄酮类、酚类、有机酸、木脂素、三萜皂苷、萜醌类、糖苷类等物质, 具有抑菌、抗炎、抗病毒、抑制血小板聚集、增加冠脉血流量、抗心肌等功效<sup>[2-6]</sup>。黄酮类化合物具有较强的抗氧化、抗肿瘤、抗炎镇痛、抗病毒、保肝护肝、保护心血管系统、抑菌、抗衰老、提高免疫力等功效。大血藤中黄酮类化合物受到很多研究者的关注<sup>[7-13]</sup>。本研究以中药材大血藤的乙醇提取物为对象, 提出一种基于比色法的大血藤总黄酮测定方法, 同时考察了提取物对 DPPH 自由基的清除能力, 旨在为开发利用大血藤资源提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大血藤药材购于福建省漳州市某中药店。槲皮素与芸香苷标准品均购于中国食品药品检定研究院。DPPH 购于梯希爱(上海)化成公司; 无水乙醇、氯化铝、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、维生素 C 等药品均为分析纯试剂, 购自国药集团化学试剂公司。RE52-99 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); AR124CN 电子分析天平(美国奥豪斯公司); 超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); UV-1750 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); Multiskan GO 全波长酶标仪(美国

Thermo 公司); ZWY-2102C 全温摇床(上海智城分析仪器制造有限公司); 万能粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司)。

### 1.2 样品溶液的制备

用粉碎机将大血藤药材充分粉碎, 准确称取药材粉末 0.5 g, 置于烧杯中, 加入 60% 乙醇 50 mL, 封口后放入全温摇床 120 r/min 60 ℃ 振荡浸提 24 h。浸提结束后超声破碎提取 30 min, 超声破碎程序设定为超声 15 s, 间歇 15 s, 超声频率 40 Hz, 功率 1 000 W。超声结束后抽滤取过滤液, 用 60% 乙醇定容至 50 mL, 得到 10 g/L 样品溶液。

### 1.3 黄酮标准品溶液的配制

称取芸香苷、槲皮素标准品各 5 mg, 分别置于 50 mL 容量瓶中, 加适量无水乙醇将其完全溶解, 纯水定容, 得到 0.1 mg/mL 芸香苷标准液、槲皮素标准液。

### 1.4 黄酮 3 种定量测定方法

**1.4.1 直接测定法** 分别取大血藤提取物溶液、芸香苷标准液、槲皮素标准液, 用紫外分光光计在 300~800 nm 波长范围内进行光谱扫描, 60% 乙醇作基线处理, 记录吸光度。

**1.4.2 三氯化铝法** 分别取 1 mL 大血藤提取物溶液、芸香苷标准液、槲皮素标准液, 加入 3 支 10 mL 具刻度试管中, 依次加入 1 mL 0.1 mol/L  $AlCl_3$  溶液及 1 mL pH 值为 5.5 的醋酸钠-醋酸缓冲液, 用 60% 乙醇定容至刻度, 在 300~800 nm 波长范围内进行光谱扫描, 60% 乙醇同样显色后作扫描基线, 记录吸光度。

**1.4.3 亚硝酸钠-硝酸铝法** 分别取 1 mL 大血藤提取物溶液、芸香苷标准液、槲皮素标准液, 加入 3 支 10 mL 具刻度试管中, 加 60% 乙醇定容至 5 mL, 加 5%  $NaNO_2$  溶液 300  $\mu$ L, 静置 6 min 后加入 10%  $Al(NO_3)_3$  溶液 300  $\mu$ L, 静置 6 min 后再加入 4 mL 1.0 mol/L NaOH 溶液, 最后用 60% 乙醇定容至 10 mL, 30 ℃ 水浴静置 20 min, 在 300~800 nm 波长范围内进行光谱扫描, 60% 乙醇加显色剂管作扫描基线, 记录吸光度。

### 1.5 亚硝酸钠-硝酸铝显色法考察

根据以上 3 种方法的光谱扫描结果, 筛选出合适的标准

收稿日期: 2014-04-24

基金项目: 闽南师范大学创新团队项目。

作者简介: 王伟(1964—), 男, 辽宁朝阳人, 硕士, 副教授, 主要从事天然产物提取及活性研究。E-mail: 746113647@qq.com。

品为芸香苷,采用亚硝酸钠-硝酸铝法显色进行试验。

1.5.1 标准曲线绘制 分别取芸香苷标准液 0、1、2、3、4、5 mL 至 6 支 10 mL 具刻度试管中,加 60% 乙醇稀释至 5 mL,按照“1.4.3”节的方法显色,在 510 nm 波长处测定吸光度,以标准品质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

1.5.2 精密度试验 精确移取标准品液 1 mL,样品液 1 mL (5 个平行样),按亚硝酸钠-硝酸铝显色法进行操作,测定 510 nm 波长处吸光度,计算样品相对标准偏差 (*RSD*)。

1.5.3 稳定性试验 将芸香苷标准品及样品按亚硝酸钠-硝酸铝法操作,每隔 10 min 于 510 nm 波长处测定 1 次吸光度,共测 60 min,计算样品测定值相对标准偏差 (*RSD*)。

1.5.4 重现性考察 精确称取大血藤粉末 4 份,每份 0.5 g,按照“1.2”节方法制成大血藤提取液,按亚硝酸钠-硝酸铝法进行操作,于 510 nm 波长处测定吸光度,计算 4 份大血藤提取物的总黄酮浓度,计算 4 份样品相对标准偏差 (*RSD*)。

1.5.5 加标回收率试验 用移液管精确移取 5 mL 样品液置于烧杯中,加入 60% 乙醇溶液稀释至 20 mL,精确吸取 1 mL 稀释后的样品液置于 3 支 10 mL 具刻度试管中,按照亚硝酸钠-硝酸铝法于 510 nm 波长处测定吸光度,将吸光度代入标准曲线,求得 1 mL 提取液中黄酮浓度,取平均值。另取 4 支干净试管,精密吸取 1 mL 上述已测定黄酮浓度的样品液,分别加入 1、2、3、4 mL 芸香苷标准液,按亚硝酸钠-硝酸铝法操作,于 510 nm 波长处测定吸光度,计算加标回收率。

## 1.6 DPPH 自由基清除能力测定

将大血藤样品母液分别配制成药材干质量浓度为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.1 g/L 的 6 个浓度梯度。取 96 孔酶标板,每 6 个测定孔为 1 组,依次加入不同浓度的大血藤提取物 100  $\mu$ L,然后选其中 1 组分别加入 100  $\mu$ L 0.06 mmol/L DPPH 溶液,另外 1 组分别加入 100  $\mu$ L 无水乙醇作为对照组,混匀,室温下放置 30 min 后,在全波长酶标仪中 517 nm 波长下测定各孔的吸光度,加入 DPPH 组测定值为  $A_s$ ,加入无水乙醇组测定值为  $A_l$ ,同时设置 100  $\mu$ L 60% 乙醇加 100  $\mu$ L DPPH 反应组,其吸光度作为空白对照  $D_0$ ,DPPH 自由基清除率 (*I*) 计算公式如下。维生素 C 作为阳性对照。

$$I = [1 - (A_s - A_l) / D_0] \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 光谱扫描结果

由图 1 可知,芸香苷在 368 nm 波长处、槲皮素在 336 nm 波长处有最大吸收峰,样品在 434 nm 波长处有较大吸收峰,在近 300 nm 波长处吸光度达到最大,该区间与标准品没有很好地重叠,且大血藤提取物肉眼观察呈现红色,因此在紫外区-近紫外区吸光度较大,且紫外区测定易受蒽醌、酚类物质的干扰,该方法不适合大血藤黄酮的定量测定。由图 2 可知,AlCl<sub>3</sub> 显色体系中,槲皮素在 430 nm 波长处、芸香苷在 414 nm 波长处吸光度最大,大血藤样品在 420 nm 波长附近并没有明

显吸收峰,该方法不能用于大血藤黄酮的定量测定。由图 3 可知,在亚硝酸钠-硝酸铝显色体系中,芸香苷在 510 nm 波长处吸光度最大,样品在 502 nm 波长处吸光度最大,二者吻合度较高,槲皮素可见光区未观察到明显的吸收峰,所以本研究确定芸香苷为测定标准品,采用亚硝酸钠-硝酸铝显色方法,测定波长为 510 nm 进行下一步试验。在该显色方法下,加入 NaOH 后,溶液中出现肉眼几乎难以察觉的细小悬浮物,长时间静置后变成沉淀析出,用滤纸将溶液过滤后进行测定,后续试验均需将测定溶液静置 20 min 后用滤纸过滤后测定。

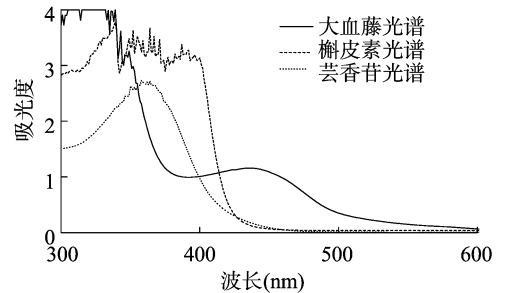


图1 样品、芸香苷和槲皮素直接扫描光谱图

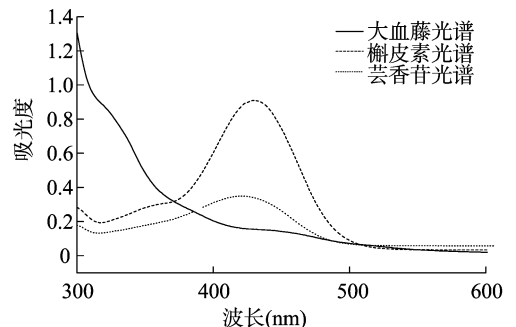


图2 样品、芸香苷和槲皮素AlCl<sub>3</sub>显色后光谱图

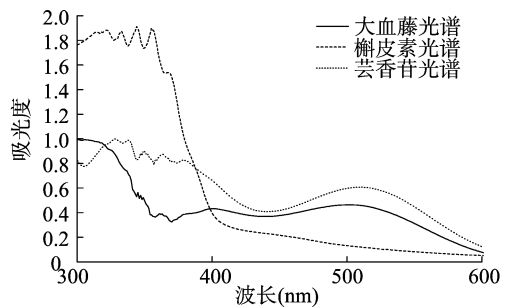


图3 样品、芸香苷和槲皮素Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>显色后紫外可见光谱图

### 2.2 标准曲线绘制

芸香苷标准品溶液的线性回归方程为  $y = 1.2354x + 0.0015$ ,  $r = 0.9998$ ,线性范围为 0~0.5 g/L。

### 2.3 精密度试验结果

由表 1 可知,芸香苷标准品溶液吸光度 *RSD* 为 2.51%,样品溶液吸光度 *RSD* 为 1.58%,精密度良好。

表 1 精密度试验结果

试样	吸光度						<i>RSD</i> (%)
	平行 1	平行 2	平行 3	平行 4	平行 5	平均值	
芸香苷标准品	0.104 5	0.105 4	0.102 4	0.109 6	0.104 6	0.105 3	2.51
样品	0.761	0.770	0.765	0.755	0.739	0.758	1.58

2.4 稳定性试验结果

由表 2 可知,芸香苷标准品溶液吸光度 *RSD* 为 0.26%,

样品溶液吸光度 *RSD* 为 2.28%,说明在 60 min 内吸光度稳定性好。

表 2 稳定性试验结果

试样	吸光度							<i>RSD</i> (%)
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	平均值	
芸香苷标准品	0.130 3	0.130 8	0.130 8	0.131 0	0.131 2	0.131 2	0.130 9	0.26
样品	0.778 0	0.769 0	0.760 6	0.751 4	0.740 3	0.732 7	0.755 3	2.28

2.5 重现性试验结果

重现性考察结果表明,4 次平行提取大血藤提取物中黄酮含量分别为 0.580、0.570、0.602、0.562 g/L,平均值为 0.578 5 g/L,*RSD* 为 2.99%,重现性好。

2.6 加标回收率试验结果

稀释后大血藤样品黄酮平均含量为 0.150 mg/mL,加标回收率在 97.7%~101.0%,平均回收率为 99.3%(表 3),说明该法准确度高。

表 3 加标回收率试验结果

序号	样品量 (mg/mL)	加标量 (mg/mL)	测得量 (mg/mL)	回收率 (%)
1	0.150	0.1	0.248	98.0
2	0.150	0.2	0.351	100.5
3	0.150	0.3	0.423	97.7
4	0.150	0.4	0.554	101.0
平均				99.3

2.7 大血藤 DPPH 自由基清除能力

由图 4 可知,随着大血藤提取物浓度和维生素 C 浓度的增大,DPPH 自由基清除率均逐渐升高。

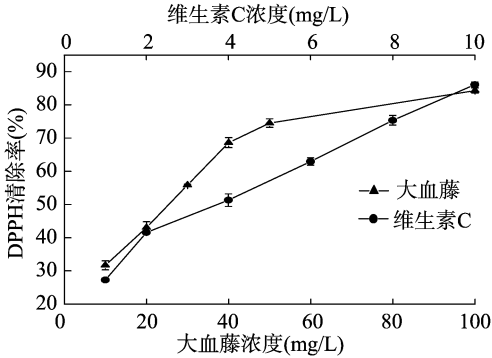


图 4 DPPH 自由基清除率

3 结论与讨论

大血藤药材中黄酮种类较为复杂,有数十种<sup>[10]</sup>。目前,不同学者采用不同的方法对大血藤药材中总黄酮含量进行测定,有采用 HPLC 方法测定的<sup>[8]</sup>,有采用紫外法即低浓度氯化铝显色后在 275 nm 处测定的<sup>[7]</sup>,有采用氯化铝显色后在 420 nm 处测定的<sup>[9]</sup>,有采用亚硝酸钠-硝酸铝显色后在 510 nm 处<sup>[13]</sup>测定的。本研究结果表明,大血藤乙醇提取物 AlCl<sub>3</sub> 显色后在 420 nm 附近并没有明显的光吸收峰,直接在紫外光范围内测定易受大血藤中蒽醌类、酚类化合物干扰,且对样品制备条件及机器性能要求比较高,二者不适合用于大血藤黄酮的比色法定量,因此笔者选择了亚硝酸钠-硝酸铝显色法进行下一步试验。笔者在试验过程中发现,加入 NaOH 溶液后,会形成一些肉眼难以观察到的细小悬浮物,将溶液放置 8 h 以上,在试管中能看到明显的沉淀物(同时进行

的芸香苷标准液显色中未出现沉淀现象)。曾凡骏等用同样的方法测定银杏叶总黄酮时也观察到这种沉淀<sup>[14]</sup>。本试验将静置时间延长至 20 min,让原花色类物质在碱性条件下充分沉淀,取滤纸过滤溶液用于测定,60 min 内吸光度稳定性很好。大血藤黄酮类化合物组成比较复杂,药材来源、提取工艺、测定方法、标准品选择等诸多因素对测定结果均有较大影响。本研究中基于分光光度计的亚硝酸钠-硝酸铝显色法的精密性、稳定性、重现性、线性关系、加标回收率均较高。DPPH 在有机溶剂中是 1 种较稳定的自由基,在 517 nm 波长处有强吸收,其结构中 1 个氮原子上有 1 个孤对电子,当自由基清除剂存在时,该孤对单电子被配对而导致其颜色变浅,而且这种颜色变浅的程度与配对电子数呈化学计量关系,因此 DPPH 被广泛用于检测自由基的清除情况以及评价样品的抗氧化能力。大血藤乙醇提取物具有很强的 DPPH 自由基清除能力。

参考文献:

[1] 苗抗立,张建中,王飞音,等. 红藤化学成分的研究[J]. 中草药, 1995,26(4):171-173,223.

[2] 倪士峰,傅承新,吴平. 大血藤化学成分及药学研究进展[J]. 中国野生植物资源,2004,23(4):8-10.

[3] 毛水春,顾谦群,崔承彬,等. 中药大血藤中酚类化学成分及其抗肿瘤活性[J]. 中国药物化学杂志,2004,14(6):326-330.

[4] 马瑞丽,于小凤,徐秀泉,等. 大血藤的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源,2012,31(6):1-5.

[5] Chang J, Case R. Phenolic glycosides and ionone glycoside from the stem of *Sargentodoxa cuneata* [J]. Phytochemistry, 2005, 66(23): 2752-2758.

[6] 李钧敏,陈永辉,金则新,等. 大血藤黄酮类化合物的提取与分析[J]. 武汉植物学研究,2002,20(2):157-161.

[7] 葛明菊,李钧敏,张利龙,等. 大血藤叶片黄酮类化合物的 HPLC 分析[J]. 浙江中医学院学报,2002,26(6):71-72.

[8] 李钧敏,金则新,钟章成,等. 大血藤不同器官黄酮类化合物含量的季节变化[J]. 植物资源与环境学报,2002,11(1):57-58.

[9] 葛明菊,金则新,李钧敏,等. 大血藤黄酮类化合物组成的初步研究[J]. 浙江林学院学报,2002,19(4):382-386.

[10] 邵红,李钧敏,金则新. 不同产地大血藤次生代谢产物含量比较[J]. 植物研究,2006,26(3):342-348.

[11] 李钧敏,金则新. 大血藤叶片提取物抑菌活性与次生代谢产物含量的通径分析[J]. 中国药学杂志,2006,41(1):13-18.

[12] 韩磊,邓翀,张萌,等. 正交试验设计优化大血藤总黄酮提取工艺[J]. 陕西中医学院学报,2012,35(5):90-91.

[13] 韩伟,叶亚婧,葛珊珊,等. 吐温 60 与纤维素酶协同超声波法提取红藤中总黄酮的工艺[J]. 南京工业大学学报:自然科学版,2012,34(6):63-68.

[14] 曾凡骏,陈松波,曾里,等. 一种改进的银杏黄酮紫外分光光度检测方法的研究[J]. 食品科学,2003,24(11):102-104.