

西南山茶花化学成分的定量分析*

侯蕾, 唐玲, 史丽颖, 冯宝民, 王永奇[△]

(大连大学药物研究所, 辽宁大连 116622)

[摘要] 目的: 旨在测定西南山茶花醇提取物、花的醇提取物乙酸乙酯萃取物、水层中总皂苷、总多酚、总黄酮的含量。方法: 采用紫外分光光度法。结果: 其总皂苷、总多酚、总黄酮的含量依次为: 西南山茶花醇提取物 12.15%, 32.4%, 3.27%; 花的醇提取物乙酸乙酯萃取物 25.86%, 37.0%, 8.64%; 水层 5.78%, 12.76%, 0.34%。结论: 紫外分光光度法测定以上三种物质简便易行, 准确可靠, 重现性较理想, 回收率较好。

[关键词] 西南山茶花; 总皂苷; 总多酚; 总黄酮; 含量测定

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1000—2723(2010)02—0025—04

西南山茶系山茶科 (*Theaceae*) 山茶属 (*Camellia*) 植物, 为《中华本草》和《滇南本草》所收载。具有活血止血、收敛止泻、解毒敛疮之功能。主治月经不调、月经过多、肠风下血、吐血、急性肠胃炎、痢疾、脱肛、白带、遗精、风湿痹痛、烧伤。在云南各地分布甚广, 同时还自云南西北部分布到贵州的西部, 四川中部、湖南西北部及广西北部, 所以资源非常丰富。我们的前期试验结果发现其叶具有非常强的抗 IgE 介导的 I 型过敏的作用, 为了扩大西南山茶的药用部位, 我们对其花的化学成分进行了定量分析。本文以皂苷、多酚、黄酮类成分为指标, 西南山茶花醇提取物、花乙酸乙酯萃取物、水层中化学成分进行了分析测定, 现报告如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Unico 7200 可见分光光度计 (尤尼柯上海仪器有限公司); Laborata 4000 型旋转蒸发器 (Heidolph 公司); BP210S 十万分之一电子天平 (Sartorius 公司); Jascov - 2560 紫外可见分光光度计 (JASCO 日本分光株式会社)。

1.2 试剂

西南山茶花采集于广西由昆明植物所裴盛基教

授鉴定; 芦丁 (纯度 98%); 齐墩果酸 (中国药品生物制品检定所, 批号: 1107092200304, 纯度 98% 以上); 没食子酸 (中国药品生物制品检定所, 批号: 1205632200412, 纯度 99.1%); 所用试剂均为分析纯; 实验用水为蒸馏水。

2 实验部分

2.1 总皂苷的含量测定^[1]

2.1.1 对照品溶液的制备

精确称取干燥至恒重的齐墩果酸对照品 20 mg, 置 100 mL 容量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得 $0.200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 备用。

2.1.2 供试品溶液的制备

精确称取西南山茶不同提取溶剂提取部位的干浸膏 A g, 置 50 mL 容量瓶中加入甲醇溶解并稀释到刻度, 摇匀, 得浓度为 $B \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 备用。

2.1.3 测定波长的选择

齐墩果酸对照品溶液和供试品溶液香草醛-冰醋酸-高氯酸显色后, 在紫外可见分光光度计上, 波长 400~800nm 区间扫描。均在 551nm 处有最大吸收, 因此选择 551nm 为测定波长, 测得的结果以齐墩果酸为基准计算总皂苷的含量。

2.1.4 线性关系考察

精确吸取齐墩果酸标准溶液 0.1, 0.2, 0.3,

* 基金项目: 国家自然科学基金 (NO: 30772714)

收稿日期: 2009—10—21 修回日期: 2009—11—26

作者简介: 侯蕾 (1985~), 女, 山西榆次人, 硕士研究生, 主要从事天然活性成分的研究。△ 通讯作者: 王永奇。

Tel: (0411) 87403834, E-mail: dalianwyq@163.com

0.4, 0.5 和 0.6 mL 分置于具塞试管中, 挥去甲醇, 精密加入 5% 香草醛 - 冰醋酸溶液 (新鲜配制) 0.2 mL, 高氯酸 0.8 mL, 摇匀, 于 60 °C 水浴中加热 15min 后, 置冰浴中冷却。加冰醋酸 5 mL, 摇匀, 立即在 551nm 波长下测定吸光度 A , 同时以试剂空白做参照。以浓度 C ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为纵坐标, 吸光度 A 为横坐标, 绘制标准曲线。得到回归方程 $C = 0.0284A + 0.00082$ ($r = 0.9991$) 线性范围: $0.014 \sim 0.030 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.1.5 显色反应精密度考察

精确吸取 C mL 的供试品溶液, 置于具塞试管中, 挥去甲醇, 照标准曲线项下的方法操作, 平行做 5 次实验, 测定吸光度 A , 代入回归方程, 计算总皂苷的含量。结果见表 2 (注: A 、 B 、 C 的数据见表 1)。

表 1 西南山茶不同提取溶剂提取部位总皂

西南山茶花不同提取溶剂提取部位	A/g	$B/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	C/mL
西南山茶花醇提物	0.1304	2.608	0.15
西南山茶花乙酸乙酯萃取物	0.1103	2.206	0.1
西南山茶花水层	0.1326	2.652	0.2

表 2 总皂苷含量测定结果表

西南山茶不同提取溶剂提取部位	含量平均值/%	RSD/%
西南山茶花醇提物	12.15	0.3
西南山茶花乙酸乙酯萃取物	25.86	0.15
西南山茶花水层	5.78	0.09

2.1.6 重现性实验

取西南山茶的花 0.5 kg, 用 95% 乙醇提取, 得醇提物浸膏, 平行进行 5 组实验。精确称取干燥至恒重的醇提物干浸膏, 置 100 mL 容量瓶中加入甲醇溶解并稀释到刻度, 摇匀, 得不同浓度的溶液, 备用。精确吸取 0.15 mL 的供试品溶液, 置于具塞试管中, 挥去甲醇, 照标准曲线项下的方法操作, 平行做 5 次实验, 测定吸光度 A , 代入回归方程, 计算总皂苷的含量, 结果为 12.56%, RSD 为 1.06%。

2.1.7 加样回收率实验

精确吸取已知总皂苷含量的供试品提取液 0.15mL, 置于具塞试管中, 分别加入 $0.200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的齐墩果酸对照品溶液 0.1mL, 余下部分按

标准曲线项下的方法操作, 平行测定 5 次, 计算加样回收率, 结果见表 3。

表 3 总皂苷测定的加样回收率实验

试品量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
19.0	20	38.3	98.2		
19.0	20	38.7	99.2		
19.0	20	39.4	101.0	99.7	1.10
19.0	20	38.9	99.7		
19.0	20	39.2	100.5		

2.2 多元酚的含量测定^[2-3]

2.2.1 对照品溶液的制备

精确称取干燥至恒重的没食子酸对照品 $50 \mu\text{g}$, 置 100mL 棕色容量瓶中, 加水溶解并稀释到刻度, 摇匀, 得浓度为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 备用。

2.2.2 供试品溶液的制备

精确称取西南山茶花不同提取溶剂提取部位的干浸膏 D g, 置 50mL 容量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀。过滤, 弃去初滤液 50 mL, 得浓度为 $E \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 供试品溶液备用。

2.2.3 测定波长的选择

没食子酸对照品溶液和供试品溶液经磷钼钨酸 - 碳酸钠显色后, 在紫外可见分光光度计上, 波长 400 ~ 1 000 nm 区间扫描。均在 754 nm 处有最大吸收, 因此选择 754 nm 为测定波长, 测得的结果以没食子酸为基准计算总酚的含量。

2.2.4 线性关系考察

精确吸取没食子酸标准溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 分别置 10 mL 棕色容量瓶中, 各加水 2 mL, 再分别加入磷钼钨酸试液 1mL, 再加 29% Na_2CO_3 溶液 2 mL, 用水稀释至刻度, 摇匀, 以相应的试剂为空白, 30 min 后, 在 754 nm 波长下测定吸光度 A 。以浓度 C ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为纵坐标, 吸光度 A 为横坐标, 绘制标准曲线。得到回归方程 $C = 0.0063A - 0.00004$ ($R^2 = 0.9995$) 线性范围: $0.001 \sim 0.005 \text{ mg/mL}$ 。

2.2.5 显色反应精密度考察

精确吸取 F mL 的供试品溶液, 分别置于 10 mL 的棕色容量瓶中, 照标准曲线项下的方法操

作, 同法测定吸收值, 各平行测定5次, 在754 nm处测定吸光度 A , 代入回归方程, 计算总酚的含量。结果见表5 (注: D、E、F的数据见表4)

表4 西南山茶不同提取溶剂提取部位测总酚的实验数据

西南山茶不同提取溶剂提取部位	D/g	E/mg · mL ⁻¹	F/mL
西南山茶花醇提物	0.1195	2.390	2.0
西南山茶花乙酸乙酯萃取物	0.1278	2.556	1.0
西南山茶花水层	0.1558	3.116	4.0

表5 总酚含量测定结果表

西南山茶不同提取溶剂提取部位	含量平均值/%	RSD/%
西南山茶花醇提物	32.40	0.13
西南山茶花乙酸乙酯萃取物	37.00	0.10
西南山茶花水层	12.76	0.06

2.2.6 重现性实验

取西南山茶的花0.5kg, 用95%乙醇提取, 回收溶剂得醇提物浸膏, 平行进行5组实验。精确称取0.200g干燥至恒重的醇提物干浸膏, 置100 mL容量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀。过滤, 弃去初滤液50 mL, 精密量取20 mL, 置100 mL棕色容量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 得供试品溶液; 精确吸取1 mL的供试品溶液, 分别置于10 mL的棕色容量瓶中, 照标准曲线项下的方法操作, 同法测定吸收值, 各平行测定5次, 在754 nm处测定吸光度 A , 代入回归方程, 计算总酚的含量为32.64%, RSD为0.76%。

2.2.7 加样回收率实验

精确吸取已知总酚供试品试液1.0 mL置于10 mL棕色容量瓶中, 分别加入50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的没食子酸标准溶液1.0 mL余下部分按标准曲线项下的方法操作, 平行测定5次, 计算加样回收率, 结果见表6。

表6 总酚测定的加样回收率

试品量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
8.80	10.00	18.80	100.00		
8.80	10.00	18.82	100.20		
8.80	10.00	18.77	99.70	100.04	0.21
8.80	10.00	18.81	100.10		
8.80	10.00	18.82	100.20		

2.3 总黄酮的含量测定^[4-5]

2.3.1 对照品溶液的制备

精确称取干燥至恒重的对照品10 μg , 置50 mL容量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释到刻度, 摇匀, 得浓度为0.20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 备用。

2.3.2 供试品溶液的制备

精确称取西南山茶花不同提取溶剂提取物的干浸膏G g, 置50 mL容量瓶中加入甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得H $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 备用。

2.3.3 测定波长的选择

对照品溶液和供试品溶液 AlCl_3 显色后, 在紫外可见分光光度上, 波长200~600nm区间扫描。均在420nm处有最大吸收, 因此选择420nm为测定波长。测得的结果以对照品为基准计算总黄酮的含量。

2.3.4 线性关系考察

精密吸取对照品溶液0.0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL, 再加10% AlCl_3 溶液2.0 mL, 再分别加入pH=4 NaAc-HAc缓冲溶液3.0 mL, 各加60%甲醇-水至10.0 mL摇匀, 室温放置10 min, 在420 nm波长下测定吸光度 A , 同时以试剂空白做参比。以浓度 C ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为纵坐标, 吸光度 A 为横坐标, 绘制标准曲线。得到回归方程 $C = 0.0608A - 0.0001$ ($r = 0.9998$) 线性范围: 0.012~0.048 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3.5 显色反应精密度考察

精确吸取I mL的供试品溶液, 置于试管中, 按照标准曲线项下的方法操作, 测定吸光度, 平行做5次实验, 代入回归方程, 计算总黄酮的含量。结果见表8 (注: G、H、I的数据见表7)

表7 西南山茶不同提取溶剂提取部位测总黄酮的实验数据

西南山茶不同提取溶剂提取部位	G/g	H/mg · mL ⁻¹	I/mL
西南山茶花醇提物	0.2589	5.178	2.0
西南山茶花乙酸乙酯萃取物	0.1203	2.406	1.0
西南山茶花水层	0.8062	16.124	2.0

表8 总黄酮含量测定结果表

西南山茶不同提取溶剂提取部位	含量平均值/%	RSD/%
西南山茶花醇提物	3.27	0.08
西南山茶花乙酸乙酯萃取物	8.6	0.09
西南山茶花水层	0.22	0.06

2.3.6 重现性实验

取西南山茶的种子 0.5 kg, 用 95% 乙醇提取, 回收溶剂得醇提物浸膏, 醇提物平行进行 5 组实验。精确称取干燥至恒重的醇提物干浸膏, 置 100 mL 容量瓶中加入甲醇溶解并稀释到刻度, 摇匀, 得不同浓度的溶液, 备用。精确吸取 3.0 mL 的供试品溶液, 置于试管中, 按照标准曲线项下的方法操作, 测定吸光度, 平行做 5 次实验, 代入回归方程, 计算总黄酮的含量为 4.05%, RSD 为 1.10%。

2.3.7 加样回收率实验

精确吸取已知总黄酮含量的供试品提取液 1.0 mL 置于试管中, 分别加入 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芦丁标准溶液 0.5 mL, 余下部分按标准曲线项下的方法操作, 平行测定 5 次, 计算加样回收率, 结果见表 9。

表 9 总黄酮加样回收率实验

试品量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
72.8	100.0	173.00	100.20		
72.8	100.0	173.10	100.30		
72.8	100.0	172.90	100.10	100.13	0.12
72.8	100.0	172.88	100.08		
72.8	100.0	172.78	99.98		

3 讨论

3.1 皂苷含量测定方法的选择

皂苷的分析测定有多种方法, 如沉淀法、溶血指数法、层析法等, 沉淀法测定往往易带进杂质或

导致皂苷变质; 层析法一般可以分离出总皂苷, 但对总含量测定不适, 误差大, 成本高, 而分光光度法操作简便、灵敏, 属于经典、成熟的方法^[6], 我们选择了与西南山茶皂苷类成分基本母核结构接近的齐墩果酸为对照品, 采用分光光度法测定其总皂苷的含量。

3.2 总黄酮含量测定方法的选择

经大量的文献调研表明, 采用可见分光光度法测定总黄酮的含量是比较成熟的方法, 此方法稳定性好, 准确度高, 且简便快捷, 易于操作, 结果可靠。故我们选择了采用分光光度法测定西南山茶提取物中总黄酮的含量。

[参考文献]

- [1] 高声传, 郭涛, 夏维杰, 等. 比色法测定酸枣仁提取物中总皂苷的含量 [J]. 实用药物与临床, 2005, 8 (1): 15-16.
- [2] 国家药典委员会. 中国药典 2005 年版 (一部) [S]. 2005: 附录 57.
- [3] 王坤, 鲁静. 中药材中鞣质含量测定方法的研究 [J]. 中国药事, 2004, 18 (6): 361-364.
- [4] 欧敏锐, 许小平, 邓焱杰, 等. 福建产白花蛇舌草活性成分提取与含量测定 [J]. 海峡药学, 2004, 16 (2): 44.
- [5] 毕和平, 韩日长, 廖家旺, 等. 穿心莲总黄酮含量的测定 [J]. 光谱实验室, 2006, 23 (3): 356-359.
- [6] 国家药典委员会. 中国药典 2005 年版 (一部) [S]. 2005: 附录 63.

(编辑: 迟 越)

Determination of Chemical Constituents in *Camellia Pitardii*

HOU Lei, TANG Ling, SHI Li-ying, FENG Bao-min, WANG Yong-qi

(Institute of Materia Medica of Dalian University, Dalian Liaoning 116622)

[ABSTRACT] OBJECTIVE: To determine the chemical constituents of total saponin, total polyphenol (tannin) and total flavonoids in section *Camellia pitardii*. METHOD: Their contents were determined by spectrophotometry. RESULTS: The contents of total saponin, total polyphenol (tannin) and total flavonoids were respectively determined as: alcohol extract of *Camellia pitardii* 12.15%, 3.27%, 32.4%; ethyl acetate extracts of *Camellia pitardii* 25.86%, 37.0%, 8.64%; water layer 5.78%, 12.76%, 0.34%. CONCLUSIONS: The method is convenient and reliable to determinate the three substance, the reproducibility and the recovery were fairly well.

[KEY WORDS] *Camellia pitardii*; total saponin; total polyphenol; total flavonoids; determination