

# 鸡血藤药材及其不同部位缩合鞣质的含量测定

林惠贞<sup>1</sup>, 刘浩文<sup>1</sup>, 韦玮<sup>1</sup>, 周盈利<sup>1</sup>, 陈建萍<sup>2\*</sup>, 王冬梅<sup>1\*</sup>

(1. 中山大学药学院, 广州 510006; 2. 香港大学中医药学院, 香港)

**[摘要]** 目的: 建立鸡血藤药材中缩合鞣质的含量测定方法, 并对不同批次鸡血藤药材及其不同部位中缩合鞣质的含量进行测定。方法: 优化并建立了采用香草醛-硫酸显色体系测定鸡血藤药材中缩合鞣质含量的方法, 反应条件为 3 mL 3% 香草醛, 3 mL 40% 浓硫酸, 常温反应 20 min, 测定波长为 500 nm。结果: 5 个批次鸡血藤药材中缩合鞣质含量为 3.99% ~ 8.63%; 其中 3 个批次药材不同部位的缩合鞣质含量测定结果显示, 树脂状分泌物中含量最高, 为 8.14% ~ 11.51%, 木质部 (5.39% ~ 7.92%) 和韧皮部 (3.65% ~ 6.90%) 含量相对较少。结论: 香草醛-硫酸显色法快速、简便、准确、重复性好, 可用于测定鸡血藤药材中缩合鞣质的含量; 缩合鞣质在树脂状分泌物中的含量比其他部位高, 为传统的鸡血藤药材质量的判断方法提供了科学依据。

**[关键词]** 鸡血藤; 密花豆属密花豆; 缩合鞣质; 香草醛-硫酸显色法; 质量控制; 树脂状分泌物

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0070-05

**[doi]** 10.11653/syjf2013240070

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131011.1506.006.html>

**[网络出版时间]** 2013-10-11 15:06

## Determination of Condensed Tannins in *Spatholobi Caulis*

LIN Hui-zhen<sup>1</sup>, LIU Hao-wen<sup>1</sup>, WEI Wei<sup>1</sup>, ZHOU Ying-li<sup>1</sup>, CHEN Jian-ping<sup>2\*</sup>, WANG Dong-mei<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;

**[收稿日期]** 20121025(016)

**[基金项目]** 广东省科技计划国际合作项目(2012B050300014); 香港创新科技基金(ITF)(ITS/073/HFP); 2011 年中山大学实验室开放基金项目(KF201142)

**[第一作者]** 林惠贞, 从事中草药质量标准化与分析研究, Tel: 18998490809, E-mail: dmwang99@foxmail.com

**[通讯作者]** \* 王冬梅, 副教授, 硕士生导师, 从事天然药物化学与中草药质量标准化研究, Tel: 020-39943042, E-mail: lsswdm@mail.sysu.edu.cn; \* 陈建萍, 副教授, 博士生导师, 从事中药药理学(心脑血管药理学、肿瘤药理学)研究, Tel: 00852-95147068, E-mail: jppchen@yahoo.com

本实验采用 HPLC-MS 同时测定芫花中黄酮类成分和二萜原酸酯类成分, 既避免了紫外检测器下不能同时最大程度的测定各个成分问题, 同时检测限也明显低于文献报道的芫花素 0.229 mg·L<sup>-1</sup> 芫花酯甲 36.70 mg·L<sup>-1</sup>, 方法简便、可靠、重复性好, 可用于芫花的质量控制。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 148.
- [2] 张保献, 原思通, 张静修, 等. 芫花的现代研究概况[J]. 中国中医药信息杂志, 1995, 10(2): 21.
- [3] 张保献, 原思通, 夏坤. HPLC 法测定芫花中芫花素的

含量[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(4): 237.

- [4] 朱永安. 高效液相色谱法测定芫花中芫花素含量[J]. 海峡药学, 2006, 18(5): 103.
- [5] 黄兰岚, 李尧尧, 原思通, 等. 不同产地芫花药材中芫花酯甲含量比较[J]. 中成药, 2008, 30(10): 附 10.
- [6] 韩伟, 徐子芳, 宋小妹, 等. 芫花药材物质基础研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 46.
- [7] 张保献, 原思通, 夏坤, 等. HPLC 法测定芫花中芫花酯甲的含量[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(9): 551, 552.
- [8] 宋丽丽, 王丽峰, 郭茂娟. RP-HPLC 法同时测定芫花中芹菜素、羟基芫花素、芫花素的含量[J]. 北京中医药, 2010, 29(6): 461, 475.

[责任编辑 顾雪竹]

2. School of Chinese Medicine, University of Hong Kong, Hong Kong, China)

**[ Abstract ] Objective:** To establish a method for determination of condensed tannins in *Spatholobi Caulis* (the stem of *Suberect spatholobus*) and investigate the content of condensed tannins in *Spatholobi Caulis* and its different parts. **Method:** The vanillin-sulphuric acid coloration system for the determination of condensed tannins was set up. The optimized condition of coloration was 3 mL 3% vanillin, 3 mL 40% sulphuric acid, at room temperature for 20 min, and the detection wavelength was set at 500 nm. **Result:** The content of condensed tannins was measured as 3.99% -8.63% in five commercial crude drugs of *Spatholobi Caulis*. Among different parts of the crude drugs, condensed tannins was most abundant in the resin-like secretion part (8.14% -11.51%), far higher than those in the xylem part (5.39% -7.92%) and the phloem part (3.65% -6.90%). **Conclusion:** The developed methods are simple, rapid, accurate, stable, and reproducible with high selectivity, and are suitable for the determination of condensed tannins in the quality control of *Spatholobi Caulis*.

**[ Key words ]** *Spatholobi Caulis*; *Spatholobus suberectus*; condensed tannins; vanillin-sulphuric acid coloration; quality control; resin-like secretion

鸡血藤为豆科密花豆属植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn. 的干燥藤茎。其性温,味苦、甘,归肝、肾经,具有补血、活血、通络之传统功效,一般主要用于治疗麻木瘫痪、血虚萎黄、月经不调、风湿痹痛等症<sup>[1]</sup>。《中国药典》2010年版一部中鸡血藤药材的质量标准只有显微鉴别、TLC鉴别和醇浸出物的检测项目,并无含量测定方法。Cheng等<sup>[2]</sup>采用液质联用分析推测出鸡血藤中含有较多的原花青素类成分(也称缩合鞣质),程悦等<sup>[3]</sup>测得鸡血藤醇提取物中缩合鞣质含量为51.09%,远高于其他结构类型化合物的含量<sup>[4-6]</sup>。近年来研究发现,鞣质具有抗氧化、降血糖、降血脂、抗凝血、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗溃疡性结肠炎等多方面的药理作用<sup>[7-9]</sup>,因此缩合鞣质含量的多少直接关系到药材的质量及其药理活性的强弱。鞣质的测定方法有络合滴定法<sup>[10]</sup>、分光光度法<sup>[11]</sup>等。本文采用分光光度法研究建立了鸡血藤药材中缩合鞣质的含量测定方法,并对不同批次鸡血藤药材及其木质部、韧皮部、树脂状分泌物等不同部位中缩合鞣质的含量进行测定,可为完善鸡血藤药材的质量标准提供重要参考。

## 1 材料

TU-1810型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),KQ-250DB型数控超声波清洗器(250 W,40 kHz,昆山超声仪器有限公司);儿茶素对照品(Catechin, Sigma,批号88191-48-4),香草醛、浓硫酸、甲醇等均为国产分析纯试剂;鸡血藤药材,产地广西,购自广州市清平药材市场(批号分别为20110601,20110701,20110702,20110801,20110802),经中山大学药学院生药学与天然药化

实验室杨得坡教授鉴定为豆科密花豆属植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn. 的藤茎。

## 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的制备** 精密称取儿茶素对照品50.03 mg置50 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容,摇匀制得 $1.001 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品储备液。精密量取5 mL对照品储备液置100 mL量瓶中,用甲醇稀释并定容,得 $50.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

**2.2 供试品溶液的制备** 称取约0.1 g鸡血藤药材粉末(过60目筛)于具塞锥形瓶中,精密称定,加入100 mL甲醇,称定质量,超声提取30 min(水浴温度 $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,250 W,40 kHz),放冷,用溶剂补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

**2.3 检测波长的选择** 分别吸取5 mL儿茶素对照品溶液( $50.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )和5 mL鸡血藤药材供试品溶液,加入包有锡箔的试管中,分别加入3 mL 3%香草醛甲醇溶液和3 mL 30%浓硫酸甲醇溶液,摇匀,避光显色20 min后,对以上2份溶液进行UV扫描,结果显示鸡血藤药材供试品溶液与儿茶素对照品溶液的紫外-可见吸收光谱的峰形相似,均在500 nm处有最大吸收,因此选用500 nm作为测定波长。

## 2.4 反应条件的优化

**2.4.1 香草醛浓度的考察** 精密吸取5 mL儿茶素对照品溶液( $50.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )于6支试管中,分别加入3 mL 1%,2%,3%,4%,5%,6%的香草醛-甲醇溶液,再加入3 mL 30%硫酸甲醇溶液,避光显色20 min后,测定吸光度 $A_{500}$ ,分析结果见图2。 $A_{500}$ 随着香草醛浓度的增大,先上升,后下降,当香草醛-甲醇溶液的浓度为3%的时候, $A_{500}$ 出现最大值,因此

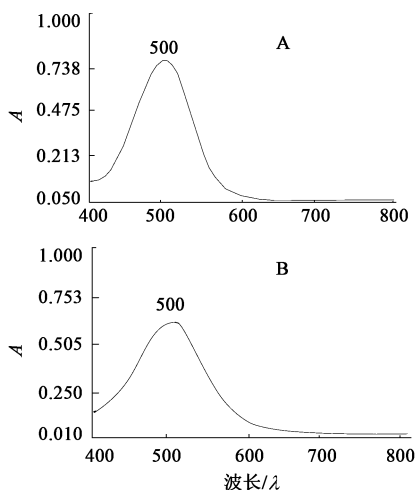


图 1 儿茶素对照品(A)和药材供试品溶液(B)经香草醛硫酸显色后的紫外-可见吸收光谱

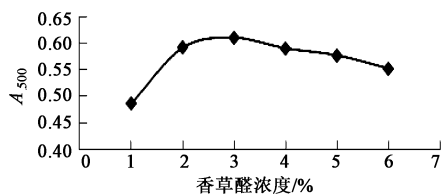


图 2 香草醛浓度对缩合鞣质含量测定的影响

选择 3% 香草醛-甲醇溶液作为优化后的反应条件。

**2.4.2 硫酸体积分数的考察** 精密吸取 5 mL 儿茶素对照品溶液 ( $50.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 于 6 支试管中,先加入 3 mL 3% 的香草醛-甲醇溶液,再分别加入 3 mL 10%,20%,30%,40%,50% 硫酸甲醇溶液,避光显色 20 min 后,测定吸光度  $A_{500}$ ,见图 3。 $A_{500}$  随着硫酸体积分数的增大而增大,当硫酸体积分数为 40% 的时候, $A_{500}$  的增加趋向平缓。由上述实验结果可知硫酸甲醇溶液的体积分数对反应结果有很大影响,硫酸甲醇溶液的体积分数越大,吸光度越大,反应越灵敏,但硫酸甲醇溶液的体积分数过高易使香草醛发生自缩合反应而使体系变绿色。因此,考察硫酸体积分数对香草醛的影响,以空白基线不发生漂移为宜<sup>[12-13]</sup>。

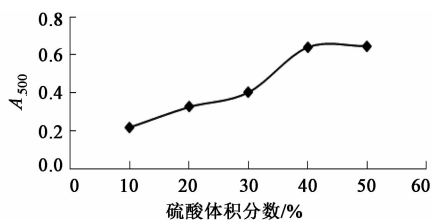


图 3 硫酸体积分数对缩合鞣质含量测定的影响

由于硫酸香草醛发生自缩合反应而使体系变绿色后在 570 nm 处有最大吸收,所以选取 570 nm 为

检测空白基线的测定波长。以 5 mL 甲醇、3 mL 3% 香草醛-甲醇溶液、3 mL 不同体积分数的硫酸甲醇溶液反应,以甲醇溶液作为空白对照,测定  $A_{570}$  随着时间的变化情况,结果见图 4。

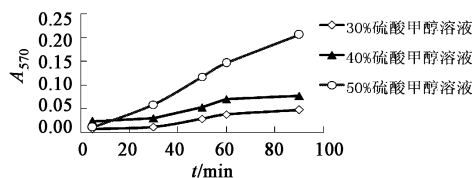


图 4 不同硫酸甲醇溶液体积分数对空白基线的影响

结果表明,30% 硫酸甲醇溶液的空白基线相对最平稳,40% 次之,50% 最不稳定。硫酸体积分数为 40% 和 50% 的反应体系的吸光度较高,且 40% 硫酸甲醇溶液反应体系的空白基线相对比较平稳,综合考虑,选择 40% 硫酸甲醇溶液作为优化后的反应条件。

**2.4.3 反应时间的考察** 精密吸取 5 mL 儿茶素对照品溶液 ( $50.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 于 6 支试管中,加入 3 mL 3% 香草醛甲醇溶液和 3 mL 40% 硫酸甲醇溶液,摇匀,分别显色 5,10,15,20,40,60 min 后,测定吸光度  $A_{500}$ ,结果见图 5。 $A_{500}$  随着反应时间的增加,先上升,后下降,当反应时间为 20 min 的时候, $A_{500}$  出现最大值,因此选择反应时间为 20 min 作为优化后的反应条件。

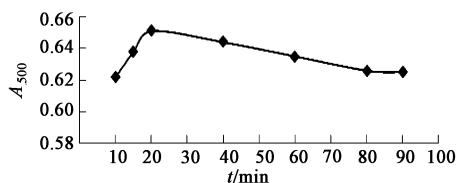


图 5 反应时间对缩合鞣质含量测定的影响

**2.4.4 反应温度的考察** 精密吸取 5 mL 儿茶素对照品溶液 ( $50.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 于 7 支试管中,加入 3 mL 3% 香草醛甲醇溶液和 3 mL 40% 浓硫酸甲醇溶液,摇匀,分别在 25,40,50,60,70,80,95 °C 水浴中避光显色 20 min,冰水浴中冷却 5 min,测定吸光度  $A_{500}$ ,结果见图 6。随着反应温度的升高, $A_{500}$  先升高后下降。当反应温度在 40 °C 时, $A_{500}$  达到最高,而当反应温度分别为 25 °C 和 40 °C 时, $A_{500}$  的差异并不大,故选择 25 °C 即常温作为优化后的反应条件。

综上所述,经单因素考察各显色反应条件,确定鸡血藤药材中缩合鞣质含量测定的优选反应条件为:测定波长为 500 nm,香草醛浓度为 3%,用量为 3 mL,浓硫酸体积分数为 40%,用量为 3 mL,常温反

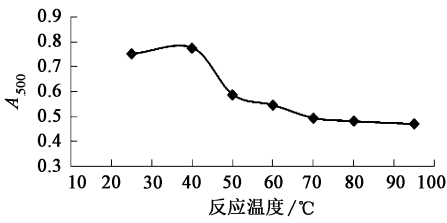


图6 反应温度时间对缩合鞣质含量测定的影响

应 20 min。

## 2.5 方法学考察

**2.5.1 线性关系考察** 精密量取儿茶素对照品储备液 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 1.0 mL 分别置于 10 mL 量瓶中, 分别加入甲醇稀释并定容至刻度, 摇匀, 备用。分别取上述各质量浓度对照品溶液 5 mL, 按 2.4 项下优化后的反应条件测定, 以对照品溶液的质量浓度 ( $X$ ,  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 为横坐标, 显色反应后溶液的  $A_{500}$  ( $Y$ ) 为纵坐标, 进行回归分析。结果显示, 儿茶素对照品浓度在 10.01 ~ 100.06  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  与吸光度的线性关系良好, 回归方程为  $Y = 0.019\ 57X - 0.027\ 26$  ( $R^2 = 0.999\ 5$ )。

**2.5.2 精密度试验** 取对照品溶液 (50.03  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 5 mL, 按 2.4 项下优化后的反应条件测定, 重复测定 6 次, 结果  $A_{500}$  的 RSD 0.08%, 表明仪器精密度良好。

**2.5.3 重复性试验** 精密称取 0.1 g 鸡血藤药材粉末 6 份, 按 2.2 项下方法制备供试液, 按 2.4 项下优化后的反应条件测定, 结果测得缩合鞣质的含量均值为 40.24  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 2.06%, 表明该方法具有良好的重复性。

**2.5.4 稳定性试验** 精密称取 0.1 g 鸡血藤药材粉末, 按 2.2 项下方法制备供试液, 同一供试品溶液分别于第 0, 1, 2, 4, 8, 16 h 进行测定, RSD 1.29%, 表明样品溶液在 16 h 内稳定性良好。

**2.5.5 加样回收率试验** 称取约 0.1 g 已知缩合鞣质含量的鸡血藤药材粉末 9 份, 精密称定, 分别加入不同含量的儿茶素对照品溶液, 制备 3 个不同浓度的样品, 每个浓度平行 3 份, 按 2.2 项下方法平行操作, 按 2.4 项下优化后的反应条件测定, 结果见表 1。

**2.6 不同批次鸡血藤药材中的缩合鞣质含量测定** 精密称取 5 批鸡血藤药材粉末各 0.1 g, 按 2.2 项下方法制备供试液, 按 2.4 项下优化后的反应条件测定, 每份样品平行测定 3 次, 代入标准曲线计算缩合鞣质的含量, 结果见表 2。5 批药材的缩合鞣质含量为 39.86 ~ 86.31  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 不同批次的鸡血藤药材

表1 鸡血藤药材中儿茶素加样回收率试验

浓度等级	取样量 /g	样品 中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	均值 /%	RSD /%
高浓度 /120%	0.100 4	4.040	4.843	8.762	97.50		
	0.100 2	4.032	4.843	8.907	100.66		
	0.100 3	4.036	4.843	9.018	102.87		
中浓度 /100%	0.100 5	4.044	4.061	8.076	99.29		
	0.101 1	4.068	4.061	8.226	102.39	100.58	1.66
	0.101 0	4.064	4.061	8.147	100.54		
低浓度 /80%	0.100 2	4.032	3.228	7.320	101.86		
	0.100 6	4.048	3.228	7.293	100.53		
	0.100 6	4.048	3.228	7.263	99.60		

中缩合鞣质含量有较大差异。

表2 多批鸡血藤药材缩合鞣质的含量测定 ( $\bar{x} \pm s$ )  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 

药材批次	缩合鞣质	药材批次	缩合鞣质
20110601	57.85 ± 1.55	20110801	39.86 ± 1.16
20110701	86.31 ± 1.30	20110802	43.17 ± 0.89
20110702	82.85 ± 1.57		

**2.7 鸡血藤药材不同部位缩合鞣质的含量测定** 根据鸡血藤药材的性状将其分为不同部分 (韧皮部、木质部以及树脂状分泌物), 称取其不同部位的药材粉末约 0.1 g, 按 2.2 项下方法制备供试液, 按 2.4 项下优化后的反应条件测定, 每份样品平行测定 3 次, 代入标准曲线计算其中缩合鞣质的含量, 结果见表 3。树脂状分泌物中缩合鞣质的含量为 81.42 ~ 115.05  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 远高于木质部和韧皮部。

表3 鸡血藤药材不同部位缩合鞣质的含量测定 ( $\bar{x} \pm s$ )

药材批次	缩合鞣质		
	韧皮部	木质部	树脂状分泌物
20110601	48.23 ± 0.95	53.92 ± 1.52	81.42 ± 0.76
20110701	69.02 ± 1.22	79.24 ± 0.84	92.84 ± 1.29
20110702	36.49 ± 1.05	69.38 ± 1.37	115.05 ± 1.60

## 3 讨论

对 5 批广西产不同批次的鸡血藤药材中的缩合鞣质含量进行测定, 缩合鞣质含量在 3.99% ~ 8.63% 之间, 即使是同一地区, 不同批次的鸡血藤药材中缩合鞣质含量亦有较大差异, 这可能与鸡血藤的生长环境、生长年限、干燥过程、贮藏条件等一系列因素有关。

鸡血藤不同于其他豆科植物之处在于, 其茎被

切断以后,其木质部就立即出现淡红棕色,不久慢慢变成鲜红色汁液流出来,很像鸡血,因此,人们称它为鸡血藤。鸡血藤切面由木质部与韧皮部相间排列呈数个同心性椭圆形环或偏心性半圆形环,髓部偏向一侧,韧皮部有树脂状分泌物呈红棕色至黑棕色<sup>[1]</sup>。民间曾认为树脂状分泌物多的药材质量较好。本文对鸡血藤药材不同部位的缩合鞣质含量测定结果显示,缩合鞣质在树脂状分泌物中含量最高,达 8.14% ~ 11.51%,其次为木质部(5.39% ~ 7.92%),韧皮部中含量相对较少(3.65% ~ 6.90%),该结果为上述传统的通过对药材的性状观察来鉴别鸡血藤药材质量提供了科学依据。

### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:180.

[2] CHENG Xiao-Lan, WAN Jin-Yi, LI Ping, et al. Ultrasonic/microwave assisted extraction and diagnostic ion filtering strategy by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for rapid characterization of flavonoids in *Spatholobus suberectus* [J]. J Chromatogr A, 2011(1218):5774.

[3] 程悦,符影,王志宇,等. 鸡血藤提取物中缩合鞣质的含量测定及其抗肿瘤活性初步研究[J]. 中山大学学报, 2011, 50(2):75.

[4] 李莹,陈晓辉,张天虹,等. RP-HPLC 法测定鸡血藤

中芒柄花素的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(12):975.

[5] 郑岩,王京丽,赵玉英,等. 高相液相测定不同产地鸡血藤药材中黄酮类化合物的含量[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(15):1920.

[6] 仰铁锤,林振坤,丁平,等. 鸡血藤药材质量评价研究[J]. 中国药学杂志, 2009, 44(23):1765.

[7] 王瑞斌,薛成虎. 国内鞣质生理活性研究进展[J]. 榆林学院学报, 2010, 20(2):47.

[8] 明东升,王峰,徐宏喜,等. 水杨梅属植物化学成分及其生物活性的研究进展[J]. 药学学报, 2000, 35(7):552.

[9] 邹艳,李洪嫚,郭建鹏. 老鹳草鞣质结肠定位制剂的体外释放度[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):4.

[10] 杨辉,王治宝. 桃叶鸦葱鞣质的提取及体外抗氧化作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18):244.

[11] 程明,杨连菊,冯学锋,等. 养殖五灵脂和野生五灵脂等鞣质含量比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7):90.

[12] 孙芸,谷文英. 硫酸-香草醛法测定葡萄籽原花青素含量[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(9):43.

[13] 樊金玲,陶冠军,朱文学. 香草醛/硫酸比色法测定两种原花色素含量的比较[J]. 食品科学, 2007(9):467.

[责任编辑 顾雪竹]

## 欢迎订阅 2014 年《中国中医药信息杂志》

《中国中医药信息杂志》是由国家中医药管理局主管、中国中医科学院中医药信息研究所主办的中医药学术期刊。1994 年创刊,2002 年,被中国科学技术信息研究所的"中国科技论文统计源期刊"收录,成为中国科技核心期刊。随着期刊影响力的不断提升,已相继被《中国科学引文数据库》、波兰《哥白尼索引》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、《世界卫生组织西太平洋地区医学索引》及英国《农业与生物科学研究中心文摘》、英国《全球健康》等知名检索系统收录。

本刊是中医药行业一本独具特色的学术期刊,其内容较全面地反映了我国中医药发展水平。主要栏目有:中医动态、专题论坛、改革与管理、中医药信息学、流行病学调查、临床论著、实验研究、中药研究与开发、临床报道、专家经验、临证心得、思路与方法、中医教育、医院药学、综述等。

本刊为月刊,大 16 开国际开本,136 页,国内外公开发售,每册定价 10 元,全年 120 元。国内邮发代号:82-670;国外代号:M4564。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。地址:北京市东直门内南小街 16 号《中国中医药信息杂志》编辑部,邮编:100700,电话:010-64014411-3278, E-mail:Lxx@mail.cintcm.ac.cn。