

怀山药及非药用部位总黄酮含量测定

吕鹏, 贾秀梅, 张振凌*, 陈益清
(河南中医学院药学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的:为充分利用怀山药资源,避免资源的浪费,研究怀山药各部位总黄酮的供试品制备方法,探讨怀山药各部位的总黄酮含量的变化。方法:采用乙醇超声提取法,正交设计实验优选怀山药中总黄酮的供试品制备方法,分光光度法测定含量。结果:怀山药总黄酮的供试品制备方法为 95% 乙醇 15 mL 超声提取 3 次,每次提取 45 min。分光光度法其测定怀山药叶中黄酮含量最高,其次是生山药皮粉、藤茎、山药零余子。结论:怀山药各部位总黄酮含量有显著差异。

[关键词] 怀山药; 总黄酮; 含量测定; 分光光度法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)02-0065-04

Content Determination of Total Flavonoids in *Dioscorea opposita*
and Non-medicinal Parts

LV Peng, JIA Xiu-mei, ZHANG Zhen-ling*, CHEN Yi-qing
(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** Studying the best extraction method of flavonoids and its change in various parts of *Dioscorea opposita* Thunb to take full advantage of yam resources and to avoid wastage. **Method:** Using ethanol ultrasonic extraction method and orthogonal experimental design to select the best extraction method of total flavonoids and determing the content by spectrophotometry. **Result:** The extraction method of total flavonoids in *D. opposita* is: ultrasonic extraction with 15 mL of 95% ethyl alcohol 3 times, each time 45 min. The leaf flavonoid content is the highest, followed by skin raw yam flour, cane, yams Bubil. **Conclusion:** Total flavonoid content in *D. opposita* in different parts were significantly different.

[Key words] *Dioscorea opposita* Thunb; total flavonoids; content determination; spectrophotometry

山药为薯蓣科植物薯蓣的干燥根茎,其味甘,性平,归脾、肾、肺经。具有益气养阴、补脾肺肾、固精止带之功效^[1]。用于脾虚证,肺虚证,肾虚证,消渴气阴两虚证。主产于河南省,习惯认为河南(怀庆府)所产者质最佳,故有“怀山药”之称^[2]。山药自古就有重要的临床应用价值,《神农本草经》谓“补中,益气力,长肌肉^[3]”。《本草纲目》中称其有“益

肾气,健脾胃”之效^[4]。现代药理研究表明,山药对实验大鼠脾虚模型有预防和治疗作用,对离体肠管运动有双向调节作用,有助消化作用,对小鼠细胞免疫功能 and 体液免疫有较强的促进作用,并有降血糖、抗氧化等作用^[5]。随着研究的深入,山药的营养及药用价值越来越受到消费者的青睐,有关其非药用部位的研究也倍受关注。有关山药的文献很多,但山药非药用部位的研究却很少。本实验通过超声提取法并经硝酸铝显色后,用紫外分光光度法研究怀山药各部位黄酮的最佳供试品制备方法并对其各部位黄酮含量的进行比较,为怀山药非药用部位如零余子、山药皮、藤茎、叶芽等的综合开发利用提供依据。

1 材料
BS210S 型电子天平(北京塞多利斯天平有限公

[收稿日期] 20110524(002)
[基金项目] 国家“十二五”科技重大专项课题 (2011BAI06B04)
[第一作者] 吕鹏,在读硕士,从事现代食品药品监督管理及新药研究, Tel: 13676980887, E-mail: weiyi5876836@163.com
[通讯作者] * 张振凌,教授,从事中药炮制学教学与研究, Tel:0371-65680970, E-mail: zhangzl6758@163.com

司), TDL-40B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂), KQ-500DV 型数控超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司), HH-S 型恒温水浴锅(巩义市英峪予华仪器厂), BS210S 型 1/万电子天平(北京 SARTORIUS 有限公司, max 210 g, d 0.1 mg), 8002 型温控水浴锅(北京永光明医疗仪器厂), GHG-9076A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司), FW-100 高速万能粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司), FR-高精度电子厨房秤(佛山市顺德区拓普域电子有限公司), METTLER AE240 1/10 万电子分析天平(瑞士), 索氏回流提取器等(均为天津玻璃仪器厂), 冷凝管等; 移液管等(均为天津玻璃仪器厂)。

芦丁对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 760706), 亚硝酸钠(天津市凯通化学试剂有限公司, 分析纯), 硝酸铝(天津市恒兴化学试剂制造有限公司, 分析纯), 氢氧化钠(天津市福晨化学试剂试剂厂, 分析纯), 95% 乙醇(天津市永大化学试剂开发中心, 分析纯), 所用怀山药药材均购于河南省温县称铁棍山药, 经河南中医学院生药教研室董诚明教授鉴定为薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb. 的根茎。

2 方法与结果

2.1 供试药材粉末制备

2.1.1 鲜山药 将怀山药用清水洗净, 削去皮, 干燥; 另将鲜山药切厚片, 于烘箱中 60 ℃ 烘干, 打粉过 40 目筛, 备用。

2.1.2 烫山药 置沸水中烫 3 min 左右, 取出, 剥去皮, 干燥; 另将烫山药切厚片, 于烘箱中 60 ℃ 烘干, 打粉过 40 目筛, 备用。

2.1.3 蒸山药 置锅内蒸 10 min 左右, 取出, 剥去皮, 干燥; 另将蒸山药切厚片, 于烘箱中 60 ℃ 烘干, 打粉过 40 目筛, 备用。

2.2 怀山药总黄酮的供试品制备方法

2.2.1 最大吸收波长的选择 精密吸取样品溶液 2 mL 置于 10 mL 具塞试管中, 加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL, 摇匀, 静置 6 min, 再加入 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL, 摇匀, 静置 6 min, 然后加入 4% 氢氧化钠溶液 4 mL, 摇匀, 用蒸馏水稀释至刻度, 静置 15 min。另设试剂空白对照。在 190 ~ 900 nm 扫描。确定最大吸收波长为 $\lambda_{\max}$ 510.6 nm。

2.2.2 怀山药总黄酮的提取方法的筛选

2.2.2.1 回流提取方法 称取山药皮粉末 1.0 g, 置 50 mL 圆底烧瓶中, 水浴 85 ℃ 用 15 mL 95% 乙醇

提取 1 h, 过滤, 用适量提取溶剂洗涤药渣, 将洗涤液与前 2 次滤液合并, 置 50 mL 量瓶中, 95% 乙醇定容至刻度, 摇匀, 备用。

2.2.2.2 超声提取方法 称取山药皮药材粉末 1.0 g, 精密称定置 50 mL 具塞锥形瓶中, 用 15 mL 95% 乙醇提取, 超声提取 2 次, 每次 30 min。提取液过滤, 第 2 次提取液过滤后, 用适量提取溶剂洗涤药渣, 洗涤液合并前 2 次滤液, 置 50 mL 量瓶中, 加 95% 的乙醇定容至刻度, 摇匀, 备用。

按上述提取方法分别制备样品液, 经显色处理后, 进行紫外检测。超声提取效果较好, 且超声提取总黄酮的含量均较回流提取高。

表 1 怀山药黄酮提取方法筛选数据

提取方法	样品质量/g	总黄酮含量/%	平均含量/%
回流提取 1	1.001 0	0.30	0.31
回流提取 2	1.002 5	0.31	
超声提取 1	1.003 0	0.35	0.35
超声提取 2	1.002 9	0.34	

2.2.3 提取溶剂的选择 依据参考文献^[5]在超声提取条件下, 选用 100% 甲醇、95% 乙醇进行提取, 以确定最佳提取溶剂; 并进行脱脂与不脱脂样品处理的比较。95% 乙醇提取效果较好, 采用甲醇提取的效果差, 并且甲醇有毒性, 因此选择乙醇作为最佳的提取溶剂。见表 2。

表 2 怀山药总黄酮提取溶剂的考察

提取溶剂	样品质量/g	总黄酮含量/%	平均含量/%
95% 乙醇 1	1.002 3	0.35	0.36
95% 乙醇 2	1.003 3	0.36	
甲醇 1	1.002 5	0.28	0.29
甲醇 2	1.003 1	0.29	

2.3 怀山药各部位总黄酮供试品制备方法正交设计试验

2.3.1 正交设计试验 根据生产实际及文献, 本实验以总黄酮成分提取的提取溶剂体积、水浴提取温度、提取时间为 3 个考察因素(表 3)。每个因素各取 3 个水平, 选用 $L_9(3^4)$ 正交试验表进行实验设计(表 4, 5)。据正交设计结果准备 9 个样品, 每次实验药材用量为 1.0 g, 以 50 mL 量瓶定容, 溶液中总黄酮浓度为指标。

2.3.2 结论 由正交实验方差分析结果可知, 因素 A, B, C 即提取时间, 提取次数和料液比, 其中提取时间有显著影响。结合直观分析表, 确定怀山药总

表 3 怀山药总黄酮正交试验因素水平

水平	A	B	C
	提取时间/min	提取次数	料液比/mL
1	15	1	8
2	30	2	10
3	45	3	15

表 4 直观分析表

因素	提取时间/A	提取次数/B	料液比/C	结果
1	1	1	1	0.077 372
2	1	2	2	0.080 758
3	1	3	3	0.095 996
4	2	1	2	0.086 684
5	2	2	3	0.098 536
6	2	3	1	0.097 689
7	3	1	3	0.095 996
8	3	2	1	0.102 768
9	3	3	2	0.111 233
K ₁	0.085	0.087	0.093	0.096
K ₂	0.094	0.094	0.093	0.091
K ₃	0.103	0.102	0.097	0.095
R	0.018	0.015	0.004	0.005

表 5 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P
提取时间	0.001	2	4.000	3.110	<0.05
提取次数	0.000	2	0.000	3.110	
料液比	0.000	2	0.000	3.110	
误差	0.000	8			

黄酮的最佳供试品制备方法是 A₃B₃C₃,即超声提取,95%乙醇 15 mL,提取 3 次,每次 45 min。

2.4 验证实验 称取药材粉末 3 份,平行操作,制备样品溶液,进行紫外检测。数据处理见表 6。

表 6 优选总黄酮提取工艺验证试验

No.	样品量/g	总黄酮含量/%
样品 1	1.004 5	0.31
样品 2	1.002 6	0.31
样品 3	1.003 0	0.31

表 6 数据处理结果说明了怀山药总黄酮优选供试品制备方法的可行性与准确性。

3 方法学考察

3.1 供试品溶液的制备 精密称取怀山药皮粉末 1.0 g,药材粉末置 50 mL 锥形瓶中,95%乙醇超声提取 3 次,每次加 95%乙醇 15 mL,每次 45 min。取超声提取液过滤,药渣 3 次超声提取后,3 mL 95%乙醇洗涤药渣,洗涤液过滤,合并前 3 次过滤液,取过滤液定容至 50 mL 量瓶中,备用。

3.2 对照品溶液的制备 精密称取芦丁(105 ℃干燥至恒重)10.25 mg 于 100 mL 量瓶中,用 95%乙醇溶液溶解定容至刻度,配成质量浓度为 0.102 5 g·L⁻¹ 的标准溶液。

3.3 标准曲线绘制 准确吸取标准溶液 0.50, 1.00,1.50,2.00,2.50,3.00 mL 分别置于 10 mL 具塞试管中。加入 0.30 mL 5% 的亚硝酸钠溶液摇匀,放置 6 min 后加入 0.30 mL 10% 的硝酸铝溶液,6 min 后再加入 4 mL 4% 的氢氧化钠溶液,混匀,用蒸馏水稀释至刻度,静置 15 min 后以试剂空白为参比,于 510.6 nm 处测定吸光度值,得芦丁含量(X)(mg)与吸光度(Y)的回归方程为 Y = 11.813X + 0.029 6(*r*² = 0.999 6)。

3.4 重复性试验 对同一批药材样品,按供试品制备方法平行制备 5 份,依法测定,重复性试验结果,表明正交设计实验优选提取方法重复性良好,RSD 0.99%。

3.5 精密度试验 精密移取芦丁标准品溶液 2.0 mL 于 10 mL 具塞试管中,操作步骤同标准曲线绘制项下,在可见-紫外分光光度计上 510.6 nm 处测定吸收度 6 次,RSD 0.14%,表明仪器精密度良好。

3.6 稳定性试验 精密吸取样品溶液 2 mL,按照最大吸收波长向下操作,每隔 10 min 测定其吸收度,结果表明,表明样品溶液在 0~1 h 内稳定性良好,RSD 0.68%。

3.7 加样回收率试验 精密称取标准品 0.032 11 g 至 50 mL 量瓶中,95%乙醇定容至刻度,分别精密移取怀山药叶片 0.4,0.5,0.6 g 各 3 份于 50 mL 锥形瓶中,并分别加入芦丁对照品溶液 6,5,4 mL 于锥形瓶中各 3 份,按供试品制备项下操作,测定吸收度,得平均回收率为 99.95%,RSD 1.78%。结果见表 7。

表 7 怀山药中总黄酮加样回收率试验

No.	样品 称重 /g	样品量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	0.400 5	0.007 7	0.011 6	0.019 1	98.27	99.95	1.78
2	0.400 6	0.007 7	0.011 6	0.019 4	100.95		
3	0.400 2	0.007 7	0.011 6	0.019 5	101.82		
4	0.500 4	0.009 6	0.009 6	0.019 1	97.82		
5	0.500 1	0.009 6	0.009 6	0.019 1	98.55		
6	0.500 7	0.009 6	0.009 6	0.019 4	101.35		
7	0.600 2	0.011 6	0.007 7	0.019 2	98.83		
8	0.600 7	0.011 6	0.007 7	0.019 5	102.72		
9	0.600 4	0.011 6	0.007 7	0.019 2	99.22		

3.8 怀山药黄酮含量测定以及怀山药不同部位黄酮含量比较 按照 **3.1** 下方法操作提取黄酮,精密吸取供试液各 2 mL,按 **3.3** 下方法操作。于 510.6 nm 下测定吸光度,结果见表 8 ~ 10。

表 8 铁棍山药各部位总黄酮含量

批次	样品量/g	总黄酮/mg	含量/%
生山药(带皮)	1.000 5	3.80	0.38
蒸山药(带皮)	1.000 6	2.29	0.23
烫山药(带皮)	1.000 9	2.95	0.29
生山药(去皮)	1.000 9	1.26	0.12
蒸山药(去皮)	1.002 0	1.72	0.17
烫山药(去皮)	1.000 4	0.71	0.07
生山药皮	1.003 0	13.69	1.36
蒸山药皮	1.001 5	7.13	0.71
烫山药皮	1.001 1	9.03	0.90
山药叶片	1.003 2	19.33	1.93
山药藤茎	1.001 0	5.96	0.59
山药零余子	1.002 5	2.46	0.25

表 9 怀山药单独植株各部位总黄酮含量比较

批次	样品量 /g	总黄酮 /mg	含量 /%
1 号株山药	1.000 8	1.55	0.16
1 号株山药皮	0.501 3	4.76	0.95
1 号株山药零余子	1.002 0	3.32	0.33
1 号株山药藤茎	0.500 0	2.94	0.59
1 号株山药叶片	0.500 4	11.15	2.23
2 号株山药	1.000 5	0.69	0.07
2 号株山药皮	0.200 2	3.74	1.87
2 号株山药零余子	1.002 2	3.53	0.35
2 号株山药藤茎	1.002 6	2.90	0.29
2 号株山药叶片	1.000 2	34.06	3.41

4 讨论

本研究采用超声提取法提取效率较回流提取法高,提取溶剂为 95% 乙醇,毒性小,无污染。通过正交设计试验筛选出怀山药非药用部位黄酮类成分的最佳供试品制备方法,为提取时间 45 min,料液比 1:15,提取 3 次。样品粉末经超声提取黄酮类成分

表 10 太古山药各部位总黄酮含量比较

批次	样品质量 /g	总黄酮 /g	含量 /%
烫太古山药(去皮)	1.000 5	0.96	0.096
烫太古山药(带皮)	1.000 7	1.57	0.157
生太古山药(去皮)	1.000 3	1.09	0.109
生太古山药(带皮)	1.001 7	2.12	0.212
蒸太古山药(去皮)	1.003 8	0.73	0.073
蒸太古山药(带皮)	1.001 2	1.13	0.113
烫太古山药皮	1.000 9	6.40	0.640
蒸太古山药皮	1.000 4	7.84	0.784
生太古山药皮	1.000 6	9.66	0.966

后,残留药渣挥至无醇味即可进行多糖提取,工艺耗时短,缩短了生产周期,提高了生产效率,有效节约了加热能量,可作为怀山药非药用部位黄酮类成分的有效提取途径。采用紫外分光光度法测定总黄酮含量,方法简单易行,测定结果准确稳定。

有研究表明,怀山药中的黄酮类化合物具有较高的抗氧化活性,其总黄酮提取液对由 Fenton 体系产生的·OH 有一定的清除作用^[6],是怀山药非药用部位的重要活性成分之一。本实验研究结果表明黄酮类成分主要存在于怀山药的叶片和根茎的皮中,在叶片中含量最高,为充分开发利用怀山药非药用部位,避免资源浪费提供重要参考。

[参考文献]

[1] 苏敬. 新修本草[M]. 合肥:安徽科学技术出版社, 1981:150.

[2] 陈嘉谟. 本草蒙筌. 第一卷[M]. 明原刻本,11.

[3] 杨武德,李白玲,冯靖. 怀山药及不同炮制品多糖含量分析[J]. 贵阳中医学院学报,2004,26(3):61.

[4] 赵彦青,王爱凤. 怀山药的药理研究进展[J]. 中医研究,2000,13(5):49.

[5] 范喜梅,赵小全. 四大怀药及其开发前景[J]. 黑龙江农业科学,2007(1):93.

[6] 张婧萱,廖保宁,黄锁义. 淮山药中总黄酮的提取及对羟自由基的清除作用[J]. 微量元素与健康研究, 2007,24(1):44.

[责任编辑 蔡仲德]