

栽培藤茶中功能性成分动态变化

玉秋萍,何磊磊,王家胜,张妮,孔琪,余正文*
(贵州师范大学生命科学学院,贵阳 550001)

[摘要] 目的:考察不同采摘时期的两年生栽培藤茶中几种功能性成分多糖、总黄酮、二氢杨梅素和杨梅素的含量动态变化。方法:以蒸馏水为溶剂恒温(90 ℃)回流提取栽培藤茶中的功能性成分;以苯酚-硫酸比色法、三氯化铝比色法分别在紫外-可见分光光度计 490,318 nm 下测定不同采摘时期的两年生栽培藤茶中多糖、总黄酮的含量;采用 Dikma ODS C₁₈ 色谱柱,以甲醇/乙腈(5:11)-0.1% 磷酸水溶液(80:20)为流动相,流速 1 mL·min⁻¹,在 HPLC 色谱仪紫外检测波长为 292,370 nm 处分别对二氢杨梅素和杨梅素进行含量测定,柱温为 40 ℃。结果:不同采摘时期的两年生栽培藤茶中多糖、总黄酮、二氢杨梅素和杨梅素的含量差别比较明显,其中多糖以 8,9 月份含量最高,分别为 2.46% 和 2.41%;总黄酮、二氢杨梅素和杨梅素的含量均是 4 月份达到最高,分别为 8.74%,4.69%,0.18%。结论:本实验所建立的测定不同采摘时期栽培藤茶中 4 种功能性成分含量变化的分析方法可行,结果可靠,能明确栽培藤茶中这 4 种功能性成分含量达到最高的最佳采收时期。

[关键词] 两年生栽培藤茶;不同采摘时期;多糖;总黄酮;二氢杨梅素;杨梅素

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)09-0066-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20140900066

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000067.html>

[网络出版时间] 2014-02-25 13:48

Dynamics Changes of Functional Ingredients from
Cultivated Ampelopsis Grossedentata

YU Qiu-ping, HE Lei-lei, WANG Jia-sheng, ZHANG Ni, KONG Qi, YU Zheng-wen*
(School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

[Abstract] **Objective:** To study the dynamics changes of the content of functional ingredients such as polysaccharide, total flavonoids, dihydromyricetin and myricetin from biennial cultivation of Ampelopsis grossedentata collected in different period. **Method:** The functional ingredients was refluxing extracted by distilled water, the extraction temperature is 90 ℃. The contents of polysaccharide and total flavonoids are measured by UV spectrophotometer using phenol-sulfuric acid method (490 nm) and AlCl₃ method (318 nm) respectively. The contents of dihydromyricetin and myricetin are measured by HPLC, detected by Dikma ODS C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) under 40 ℃, the mobile phase was methanol and acetonitrile (5:11) -0.1% phosphoric acid solution (80:20), the flow rate was 1 mL·min⁻¹, detection wavelengths was 292 nm and 370 nm. **Result:** The content of polysaccharide, total flavonoids, dihydromyricetin and myricetin of biennial cultivation of Ampelopsis grossedentata of different harvest period had significant differences. The highest content of polysaccharide was in August and September, respectively 2.44% and 2.42%; the highest content off total flavonoids, dihydromyricetin and myricetin were in April, respectively 8.74%, 4.69%, 0.18%. **Conclusion:** The determination method

[收稿日期] 20130706(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31060056);贵州省中药现代化专项(黔科合中药字[2011]5046号);贵州省科技基金项目(黔科合J字[2011]2368号);贵州省重点实验室项目(黔科合计Z字[2011]4005号)

[第一作者] 玉秋萍,在读硕士,从事植物化学研究,Tel:18286038095,E-mail:664617543@qq.com

[通讯作者] *余正文,博士,教授,从事植物化学研究,Tel:15285978171,E-mail:yuzhengwen2001@126.com

established of this experiment is feasible, reliable, and can make it clear when the best harvest time was of cultural *Ampelopsis grossedentata*.

[**Key words**] biennial cultivation of *ampelopsis grossedentata*; different harvest period; polysaccharide; total flavonoids; dihydromyricetin; myricetin

藤茶又名茅岩莓茶、端午茶、山甜茶、龙须茶,学名显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand.-Mazz.) W. T. Wang^[1]。显齿蛇葡萄是一种非常古老的中草药资源、类茶植物资源和药食两用植物资源^[1-3],该植物在贵州、湖南、湖北、广西、广东、江西、福建、安徽等地均有分布^[4]。相传显齿蛇葡萄为瑶族同胞最先利用^[3-6],至今已有数百年的药用历史^[1]。近年来对藤茶的化学成分研究表明,藤茶富含黄酮类化合物以及多糖,其中黄酮类化合物的主要成分为二氢杨梅素,还含少量杨梅素等^[7]。藤茶多糖具有抗肿瘤及免疫调节、抗氧化、降血脂等多种生物活性^[8-11]。藤茶黄酮也具有抗菌、消炎、护肝、降血压、降血脂的功效,而二氢杨梅素是较为特殊的一种黄酮类化合物,除具有黄酮类化合物的一般特性外,还具有解除醇中毒、预防酒精肝、脂肪肝、抑制肝细胞恶化、降低肝癌的发病率等作用^[12-13]。本实验以蒸馏水为溶剂回流提取多糖、黄酮,分别采用苯酚-硫酸比色法、三氯化铝比色法、高效液相色谱法对从3月份到9月份中旬采收的两年生栽培藤茶叶中多糖、总黄酮、二氢杨梅素和杨梅素的含量进行测定和分析。明确了两年生栽培藤茶的最佳采收时期,旨在为该显齿蛇葡萄植物的人工栽培提供理论支撑,为藤茶资源的合理开发利用提供相应的依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂 LX-02 型多功能粉碎机(上海江信科技有限公司),AB135-S 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),XP205 型 1/10 万分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),752E 型紫外-可见分光光度计(天津普瑞斯仪器有限公司),DK-98-11A 型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司),LC-20AT 型高效液相色谱仪(岛津 LCsolution 色谱工作站、SPD-20A 紫外检测器、SIL-20A 自动进样器),Dikma ODS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 中国迪马公司)。甲醇和乙腈为色谱纯(天津市科密欧化学试剂有限公司生产),其余试剂为分析纯。

1.2 药材 两年生栽培藤茶叶(于2012年3月中旬至9月中旬采摘,产于贵州省江口县),葡萄糖

(汕头市西陇化工厂),二氢杨梅素及杨梅素对照品(实验室自制,经测定纯度>98%)。

2 方法与结果

2.1 HPLC 色谱条件 Dikma 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相[甲醇-乙腈(5:11)]-0.1% 磷酸水溶液(80:20),流速 1 mL·min⁻¹,柱温 40 ℃,进样量 10 μL,紫外检测波长 292,370 nm。

2.2 标准曲线的制作

2.2.1 多糖标准曲线的制作 精密称取葡萄糖 0.100 g,用蒸馏水溶解并定容至 100 mL,吸取 5.0 mL 定容至于 50 mL 量瓶中,分别吸取 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 mL 加水定容至 50 mL 量瓶中,配制成 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0 mg·L⁻¹ 的葡萄糖对照品溶液。精密吸取上述不同浓度的葡萄糖对照品溶液各 2.0 mL 于试管中,依次加入 5% 苯酚 1.0 mL 和浓硫酸 5.0 mL,振摇,静置 5 min 后沸水浴加热 15 min,冷却至室温,在 490 nm 处测定吸光度。以溶液质量浓度为横坐标(*X*),吸光度为纵坐标(*Y*),绘制葡萄糖标准曲线。

2.2.2 总黄酮标准曲线的制作 精密称取 10.0 mg 二氢杨梅素,用甲醇溶解并定容至 100 mL 量瓶中,得 0.1 g·L⁻¹ 的对照品溶液,分别从中吸取对照品溶液 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 mL 于 10 mL 试管中,各加 3.0 mL 5% AlCl₃ 溶液,然后再分别加甲醇至总体积为 10 mL,摇匀。用 752E 型紫外-可见分光光度计,在波长为 318 nm 处分别测定其吸光度。以溶液浓度为横坐标(*X*),吸光度为纵坐标(*Y*),绘制总黄酮标准曲线。

2.2.3 二氢杨梅素和杨梅素标准曲线的制作 精密称取二氢杨梅素 50.0 mg 和杨梅素 25.0 mg,分别置于 50 mL 量瓶中,以甲醇溶解并定容到刻度,摇匀,得 1.0, 0.5 g·L⁻¹ 的二氢杨梅素、杨梅素对照品溶液。将 1.0 g·L⁻¹ 二氢杨梅素和 0.5 g·L⁻¹ 杨梅素对照品溶液混合,精密吸取 0.1, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 20.0 mL 的混合溶液加甲醇定容至 50 mL,得系列的对照品溶液。分别精密吸取对照品溶液 10.0 μL 注入液相色谱仪,测定峰面积,每个样品进样 3 次,取平均值。以进样质量浓度为横坐标(*X*)、峰面积为纵坐标(*Y*),绘制二氢杨梅素及杨梅

素标准曲线。

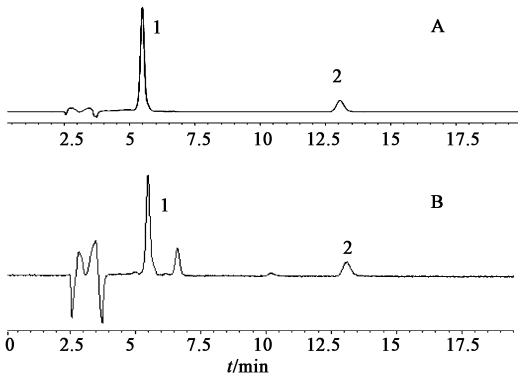
2.3 供试品溶液的制备 将 3 月份到 9 月份采摘的藤茶叶自然干燥后粉碎,过 40 目筛。分别精密称取藤茶样品粉末 0.100 g,加入适量石油醚于电热恒温水浴锅(70 ℃)中回流脱脂 2 次,每次 1 h,过滤,挥干滤渣中的石油醚。滤渣分别加入 25.0 mL 蒸馏水于电热恒温水浴锅(90 ℃)中回流 2 次,每次 1 h,趁热过滤,合并滤液于 50 mL 量瓶中并以蒸馏水定容至刻度,待用于测定多糖含量。分别从上述 50 mL 水溶液中吸取 20.0 mL 溶液蒸干蒸馏水,用甲醇溶解并定容至 10 mL,待用于测定总黄酮、二氢杨梅素和杨梅素含量。

2.4 样品含量测定

2.4.1 多糖的含量测定 多糖的含量测定采用苯酚-硫酸比色法,在 490 nm 处测定吸光度。在 2.3 项的多糖供试品溶液中,3,4,6,7 月份各取 1.0 mL,5,8,9 月份各取 0.5 mL,均加蒸馏水至 2.0 mL,按 2.2.1 项中的处理方法对藤茶多糖进行测定,记录其吸光度,通过多糖标准曲线回归方程计算其含量。

2.4.2 总黄酮的含量测定 藤茶总黄酮的含量测定采用 AlCl₃ 比色法,在 318 nm 测吸光度。在 2.3 项中的黄酮供试品溶液中,3,4,8 月份各取 0.3 mL,5,6 月份各取 0.5 mL,7,9 月份各取 1.0 mL,按 2.2.2 项中的处理方法对藤茶总黄酮进行测定,记录其吸光度,通过总黄酮标准曲线回归方程计算其含量。

2.4.3 二氢杨梅素和杨梅素的含量测定 取 10 μL 2.3 项中的供试品溶液,注入高效液相色谱仪进行分析,获得样品的色谱图(图 1)。通过其标准曲线回归方程计算二氢杨梅素和杨梅素的含量。



A. 对照品;B. 样品;1. 二氢杨梅素;2. 杨梅素

图 1 藤茶样品 HPLC

2.5 方法学考察 取同一多糖、总黄酮、二氢杨梅素和杨梅素供试品溶液,按 2.4.1,2.4.2,2.4.3 项的方法分别对供试品溶液重复平行测定 5 次,进行

精密度试验;取同一样品 5 份,分别制备多糖、总黄酮、二氢杨梅素和杨梅素供试品溶液并测定,进行重复性试验;取已知多糖、总黄酮、二氢杨梅素和杨梅素质量分数的藤茶样品(4 月份)9 份,按照样品中多糖、总黄酮、二氢杨梅素和杨梅素质量含量的 0.8,1.0,1.2 倍加入对照品,各 3 份,按制备供试品溶液方法制备供试品溶液,按样品含量测定方法对供试品溶液进行测定,计算回收率。

2.6 结果与分析

2.6.1 线性关系 葡萄糖线性回归方程 $Y = 53.628X + 0.0502$ ($R^2 = 0.9990$),线性范围 2.5 ~ 12.5 mg·L⁻¹;总黄酮线性回归方程 $Y = 57.68X - 0.1841$ ($R^2 = 0.9998$),线性范围 5.0 ~ 17.5 mg·L⁻¹;二氢杨梅素回归方程 $Y = 10^7X - 28745$ ($R^2 = 0.9999$),线性范围为 0.01 ~ 2.0 μg;杨梅素回归方程 $Y = 3 \times 10^7X - 17322$ ($R^2 = 0.9997$),线性范围 0.005 ~ 1.0 μg。

2.6.2 方法学考察 多糖、总黄酮、二氢杨梅素和杨梅素精密度、重复性试验结果的 RSD 见表 1,加样回收率试验结果见表 2。结果表明本试验精密度和稳定性良好,分析方法可靠。

表 1 多糖、总黄酮、二氢杨梅素和杨梅素
精密度、重复性试验(n=5)

功能性成分	精密度 RSD	重复性 RSD
多糖	0.09	1.49
总黄酮	0.17	0.93
二氢杨梅素	4.50	4.50
杨梅素	2.40	1.20

2.6.3 样品含量测定结果 不同采摘时期的两年生栽培藤茶叶中 4 种功能性成分含量测定结果的质量百分数见表 3。

3 讨论

从表中可以清楚地看到,两年生栽培藤茶叶中多糖、总黄酮、二氢杨梅素和杨梅素的含量随着采摘时间的不同差别明显,多糖以 8,9 月份含量最高,总黄酮、二氢杨梅素及杨梅素均是 4 月份含量达到最高。与多年生野生藤茶对比,本研究中的栽培藤茶多糖含量达最大的月份与野生藤茶一致^[14];野生藤茶中杨梅素含量达到最高的时期目前尚未见文献报道;据文献报道,野生藤茶总黄酮和二氢杨梅素含量达到最大值时的月份都在 5 月份^[15-16],而本研究的两年生栽培藤茶叶中总黄酮和二氢杨梅素含量达到最大均是 4 月份,到 5 月份其含量明显下降,与 4 月

表 2 多糖、总黄酮、二氢杨梅素和杨梅素加样回收率试验

成分	No.	称样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
多糖	1	0.500	6.250 0	5.000	11.167 5	98.35	99.37	1.04
	2	0.501	6.262 5	5.008	11.244 0	99.47		
	3	0.501	6.262 5	5.010	11.280 5	100.16		
	4	0.502	6.275 0	6.275	12.514 9	99.44		
	5	0.500	6.250 0	6.251	12.416 0	98.64		
	6	0.500	6.250 0	6.251	12.583 5	101.32		
	7	0.501	6.262 5	7.513	13.695 1	98.93		
	8	0.502	6.275 0	7.530	13.654 4	98.00		
	9	0.501	6.262 5	7.514	13.778 0	100.02		
总黄酮	1	0.202	17.654 8	14.124	31.458 2	97.73	98.79	0.77
	2	0.200	17.480 0	13.984	31.262 6	98.56		
	3	0.201	17.567 4	14.054	31.327 7	97.91		
	4	0.201	17.567 4	17.567	35.155 5	100.12		
	5	0.201	17.567 4	17.567	34.939 4	98.89		
	6	0.200	17.480 0	17.481	34.791 4	99.03		
	7	0.202	17.654 8	21.186	38.692 5	99.30		
	8	0.201	17.567 4	21.081	38.277 4	98.24		
	9	0.201	17.567 4	21.080	38.506 2	99.33		
二氢杨梅素	1	0.503	23.590 7	18.872	42.124 9	98.21	98.00	0.70
	2	0.500	23.450 0	18.761	41.809 5	97.86		
	3	0.501	23.496 9	18.800	42.206 7	99.52		
	4	0.501	23.496 9	23.497	46.622 7	98.42		
	5	0.500	23.450 0	23.452	46.264 1	97.28		
	6	0.502	23.543 8	23.544	46.539 2	97.67		
	7	0.501	23.496 9	28.201	51.023 9	97.61		
	8	0.502	23.543 8	28.253	51.254 3	98.08		
	9	0.502	23.543 8	28.252	51.047 1	97.35		
杨梅素	1	0.503	0.905 4	0.724	1.620 5	98.77	100.00	1.20
	2	0.500	0.900 0	0.721	1.632 0	101.52		
	3	0.501	0.901 8	0.721	1.622 3	99.93		
	4	0.501	0.901 8	0.902	1.800 6	99.64		
	5	0.500	0.900 0	0.901	1.786 0	98.33		
	6	0.502	0.903 6	0.904	1.805 6	99.78		
	7	0.501	0.901 8	1.082	2.007 3	102.17		
	8	0.502	0.903 6	1.085	1.988 7	100.01		
	9	0.502	0.903 6	1.084	1.986 0	99.85		

份中的含量差别显著,说明不同采摘时期的栽培藤茶和野生藤茶中总黄酮和二氢杨梅素含量的动态变化有一定差异性,这种差异性可能是由于生长年限与生长地区的不同而产生,本课题组拟在未来研究中跟踪测定分析不同地区同一生长年限、不同产区

不同生长年限、同一地区同一生长年限以及同一地区不同生长年限的栽培藤茶和野生藤茶中这 4 种功能性成分含量的动态变化,为藤茶资源的人工培育及开发利用提供有利依据。

根据实验测定结果可见,本试验建立的提取和

表 3 不同采摘时期的两年生栽培藤茶叶中多糖、总黄酮、二氢杨梅素和杨梅素的含量 %

月份	多糖	总黄酮	二氢杨梅素	杨梅素
3	1. 01	5. 69	2. 31	0. 08
4	1. 25	8. 74	4. 69	0. 18
5	2. 31	2. 85	1. 19	0. 04
6	1. 15	3. 78	0. 93	0. 03
7	1. 33	1. 66	1. 00	0. 03
8	2. 46	6. 49	1. 34	0. 04
9	2. 41	1. 94	0. 96	0. 03

分析方法可行,实验结果能够清楚准确地反映出不同采收时期的两年生栽培藤茶叶中多糖、总黄酮、二氢杨梅素和杨梅素的含量动态变化,明确了栽培藤茶中这 4 种成分含量达到最高的最佳采收时期,为藤茶资源的合理开发利用提供理论支撑。

[参考文献]

[1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编:下册 [M]. 北京:人民卫生出版社,1997:788.

[2] 广西植物研究所. 广西药用植物名录 [M]. 南宁:广西民族出版社,1974:202.

[3] 张友胜,宁正祥,杨伟丽. 藤茶学 [M]. 广州:广东科技出版社,2003:3.

[4] 中国科学院研究所. 中国高等植物图鉴 [M]. 补编 (第二册). 北京:科学出版社,1979:353.

[5] 陈杖洲. 天然植物代用茶——野藤茶 [J]. 贵州茶叶, 2001, (3):11.

[6] 张友胜,杨伟丽,熊浩平. 类茶植物显齿蛇葡萄的研究利用现状 [J]. 茶叶通讯,2001(1):19.

[7] 张友性,杨伟丽,熊皓平. 显齿蛇葡萄基本成分研究 [J]. 天然产物研究与开发,2001,13(5):46.

[8] 李玉山,李田,戴清堂,等. 藤茶茶多糖对实验性糖尿病大鼠血糖的影响 [J]. 营养学报,2006,28(4):356.

[9] 罗祖友,严奉伟,薛照辉,等. 藤茶多糖的抗氧化作用研究 [J]. 食品科学,2004,25(11):291.

[10] 刘翠娥,王海玉,王亚东,等. 藤茶辅助降血脂作用的研究 [J]. 食品科学,2005,26(11):237.

[11] 陈玉琼,向班贵,倪德江,等. 恩施富硒藤茶降血脂作用研究 [J]. 营养学报,2006,28(5):448.

[12] 高倩倩,杨秀芬,欧敏. 藤茶总黄酮和二氢杨梅素含药血清对肝癌 HepG2 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 中国中药杂志,2011,36(4):500.

[13] 曾春晖,杨柯,徐明光,等. 广西藤茶总黄酮对金黄色葡萄球菌抗菌机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013,19(10):249.

[14] 向东山,郑小江,翟琨. 不同采收时期及不同部位绿风藤茶中多糖含量比较与分析 [J]. 安徽农业科学, 2008,36(29):12751.

[15] 何桂,杨伟丽,裴刚,等. 藤茶不同采收时期及不同部位的总黄酮考察 [J]. 湖南中医学院学报,2004,1(24):13.

[16] 何桂霞,裴刚,杨伟丽,等. HPLC 测定藤茶不同采收时期及不同部位的二氢杨梅素含量 [J]. 中成药, 2004,3(26):210.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国中药杂志》2014 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1955 年 7 月,是创刊最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平,主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、研究院所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊,128 页,2014 年定价每期 30 元,全年 24 期定价为 720 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公,如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 [www. ejcm. com. cn](http://www.ejcm.com.cn) 或 www. 中国中药杂志. com。

联系电话:稿件查询 010-64045830 转 602;主任电话 010-64058556;资源与栽培栏编辑:010-64048925;制剂栏编辑:010-64040392;化学栏编辑:010-64040113;药理栏编辑:010-84022522;临床栏编辑:010-64059766;电子杂志制作发行及网上维护:010-64030625。