

显齿蛇葡萄中总黄酮的测定

言 剑*, 王亮亮, 邱 宇, 王 凯, 陈同强, 李凯龙

(湖南省食品质量监督检验研究院, 长沙 410000)

摘要: 目的 研究显齿蛇葡萄总黄酮含量测定的最佳提取条件。**方法** 以显齿蛇葡萄为原料, 用乙醇-水为溶剂, 加热超声浸提, 并通过试验优化出最佳的提取工艺条件, 以芦丁为标准品, 选择波长 415 nm, 采用三氯化铝分光光度法进行总黄酮含量的测定。**结果** 在提取温度 60 °C、提取时间 30 min、乙醇浓度 95%、提取次数 3 次时, 黄酮的提取效率最高; 在此方法下, 标液浓度在 0.5 ~ 56 µg/mL 范围内, 浓度与吸光值呈良好线性关系, 回归方程为 $Y=0.0287X$, $r^2=0.9998$, 方法最低检出限为 2 mg/kg, 样品加标的平均回收率为 98.30%, 标准偏差(relative standard deviation, RSD)分别为 0.94%、1.62%; 通过实验室间结果比对, 检测结果稳定, RSD 均 <2.0%。**结论** 该方法精密性及稳定性好, 可以较好地提取显齿蛇葡萄中的总黄酮。

关键词: 分光光度法; 显齿蛇葡萄; 芦丁

Determination of total flavonoids in ampelopsis grossedentata

YAN Jian*, WANG Liang-Liang, QIU Yu, WANG Kai, CHEN Tong-Qiang, LI Kai-Long

(Hunan Institute of Food Quality Supervision Inspection and Research, Changsha 410000, China)

ABSTRACT: Objective To study on the best extraction conditions of total flavonoids in ampelopsis grossedentata. **Methods** Ampelopsis grossedentata was used as raw material, total flavonoids were extracted by heated ultrasound with ethanol-water as solvent. The best extraction conditions were optimized through experiments. Total flavonoids were determined by AlCl₃ spectrometric method at 415 nm wave-length with Rutin as standard. **Results** The extraction efficiency of flavonoids was the highest when the extraction temperature was 60 °C, the extraction time was 30 min with 95% ethanol concentration under 3 times of extraction. The regression equation was $Y=0.0287X$ with a good linearity ($r^2=0.9998$) between the absorbance and concentration in the range of the standard sample concentration from 0.5 to 56 µg/mL. The detection limit was 2 mg/kg. The average recovery rate was 98.30%, and RSD (relative standard deviation) was 0.94% and 1.62%. There were stable results by comparing interlaboratorys, and the RSD was less than 2%. **Conclusion** The method has good precision and stability, and can better extract the total flavonoids from ampelopsis grossedentata.

KEY WORDS: spectrometric method; ampelopsis grossedentata; rutin

1 引言

显齿蛇葡萄 ampelopsis grossedentata (Hand.-Mazz.)
W. T. Wang 是葡萄科(Vitaceae michx)蛇葡萄属(Ampelopsis)

的一种野生木质落叶藤本植物, 用显齿蛇葡萄幼嫩茎叶制成的类茶饮料具有清热解毒、消炎镇痛、祛风湿强筋骨等功效^[1-3], 其主要分布于湖南、湖北、云南、广东、广西等地, 是中国特有植物^[4]。研究表明, 显齿蛇葡萄的主要活性

*通讯作者: 言剑, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: 827289007@qq.com

*Corresponding author: YAN Jan, Senior Engineer, Hunan Institute of Food Quality Supervision Inspection and Research, Changsha 410000, China. E-mail: 827289007@qq.com

成分为黄酮类化合物,其含量高达 45.5%^[5]。显齿蛇葡萄中黄酮类化合物主要分为黄酮类、黄酮醇类、异黄酮类、黄烷酮类、查耳酮类以及花色素类等,主要代表化合物为二氢杨梅素、芦丁、杨梅素、槲皮素、木犀草素等,在植物界实属罕见,号称黄酮王^[6]。显齿蛇葡萄总黄酮具有显著的降血糖作用,是一种很强的抗氧化剂,可有效清除体内的氧自由基^[7,8];药理学研究表明,显齿蛇葡萄具有清热解毒、抗氧化^[9]、抑菌消炎^[10,11]、降血糖、降血脂^[12]、抗肿瘤等活性^[13],是一种极具开发价值的典型药食两用植物。近年来对显齿蛇葡萄叶中活性成分及药理分析已有较多研究,且目前对显齿蛇葡萄的质量监控大多以检测二氢杨梅素的含量为主^[14-16],但是以芦丁为参照品测定显齿蛇葡萄总黄酮类化合物的相关报道较少。因此本实验研究了不同条件对显齿蛇葡萄黄酮提取效率的影响,优化出显齿蛇葡萄中总黄酮含量测定的最佳条件,并测定不同产地的显齿蛇葡萄中总黄酮的含量,以期对显齿蛇葡萄的进一步的开发利用及质量标准的建立及质量评价提供科学依据。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

2.1.1 实验材料

显齿蛇葡萄:采自湖南省各个不同产地。

2.1.2 试剂

芦丁标准品(纯度 97.5%,中国药品生物制品检定所);乙醇(分析纯,上海安谱有限公司);三氯化铝(分析纯,上海国药有限公司);醋酸钾(分析纯,上海国药有限公司);实验用水为超纯水。

2.1.3 仪器设备

BK-900C 超声波清洗器(济宁丰鑫超声设备有限公司);BSA224s 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);T9CS 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 样品前处理

称取粉碎均匀的试样 1~2 g,精确至 0.01 g,置于 150 mL 具塞三角瓶中,加入一定浓度乙醇溶液,将三角瓶置于 60 °C 的水浴中超声波提取,趁热过滤,收集滤液至于 100 mL 容量瓶中。重复提取 3 次,用一定浓度乙醇清洗滤纸和残渣,合并提取液,冷却定容至刻度,备用。

2.2.2 总黄酮的测定方法

吸取上述试液 1.0 mL 于 50 mL 带塞比色管中,另吸取 0.0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 芦丁标准使用液(相当于 0.0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg 芦丁),分别置于 50 mL 带塞比色管中。于标准管于试样管中分别加入 2.0 mL 三氯化铝溶液(2.5 g/100 mL)混匀,各加入 2.0 mL 醋酸钾溶液(9.82 g/100 mL),混匀,加 30%乙醇至刻度,混

匀,静置,在 30 min 内用 1 cm 比色杯,以零管调节零点,于特定波长 415 nm 处测吸光度,绘制标准曲线。同时做试剂空白。

2.2.3 最大吸收波长的确定

取样品液适量,显色后,以试剂为空白参比液在 385~490 nm 波长范围测定络合物的吸光度,确定最大的吸收波长为 415 nm。

2.2.4 线性范围的考察

精密量取混合标准品储备液适量,逐级稀释,配制不同浓度的混合标准品溶液。于特定波长处测吸光度,绘制标准曲线,计算得回归方程。

2.2.5 最低检出限的确定

参考 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》^[17],方法的最低检出限按式(1)计算

$$C_L = 3S_b/b \quad (1)$$

式中: C_L —方法的检出限, mg/kg;

S_b —空白值标准偏差;

b —方法标注曲线斜率。

2.2.6 不同条件下对黄酮提取效率的研究

研究不同条件下对黄酮提取效率的影响,其研究方面主要是:液料比、提取时间、提取的乙醇浓度,得到最佳的提取工艺。

2.2.7 精密度实验

精密称取样品 6 份,按照优化后的方法“2.2.6”进行总黄酮含量的测定。

2.2.8 加样回收率实验

取已知含量的样品粉末 5 份,约 1 g,精密称定。精密加入黄酮类化合物对照品,按“2.2.2”项下条件测定,计算黄酮的加样回收率及平均回收率。

2.2.9 稳定性实验

精密吸取供试品溶液,按“2.2.2”项下条件,供试品溶液于制样后不同时间进样测定,计算相对标准偏差。

2.2.10 样品含量测定

采取十组样品分别按照优化后的检测方法“2.2.6”制备供试品溶液,每批平行操作 3 份,计算黄酮的含量。

2.2.11 标准测定方法对比

选择 4 组样品进行了标准测定方法对比实验室之间对比,其中实验室 A 为本实验室,实验室 B 为长沙市食品安全质量监督检测中心,实验室 C 为湖南省疾病预防控制中心。

3 结果与分析

3.1 最大吸收波长的确定

取样品液适量,显色后,以试剂为空白参比液在 385~490 nm 波长范围测定络合物的吸光度,络合物于 415 nm 波长处有最大吸收,吸收谱图见图 1。故测定时选用 415 nm 作为测定波长。

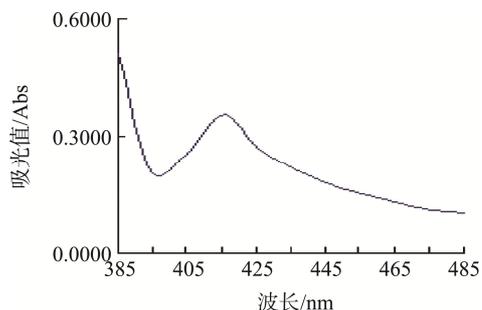


图 1 最大吸收波长光谱图

Fig.1 Spectrum of maximum absorption

3.2 芦丁线性范围的确定

在 0.5~56 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 配制一系列芦丁标准溶液, 在波长 415 nm 下进行分析, 浓度与吸光值呈良好线性关系, 回归方程为 $Y=0.0287X$, $r^2=0.9998$, 如图 2。

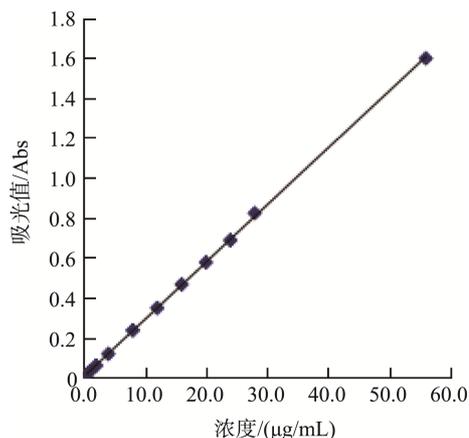


图 2 芦丁标准曲线

Fig.2 Standard curve rutin

3.3 最低检出限的确定

根据 2.2.5 确定本方法的最低检出限, 结果见表 1。若固体样品称样量为 1 g, 试样处理液总体积为 100.0 mL, 测定用样液体积 1.00 mL, 则检出限为 2 mg/kg。液体样品为 2 mg/L。

3.4 不同条件下对黄酮提取效率的研究

3.4.1 料液比对黄酮提取率的影响

图 3 为固定提取时间(30 min)及乙醇溶剂浓度(95%)比较不同的料液比(1:5、1:10、1:20、1:30、1:40、1:50)对样品总黄酮提取率的影响。从图 3 可以看出: 料液比在(1:10)~(1:30)时, 黄酮提取率随料液比增大而增加较大, 当料液比大于 1:30 后, 黄酮得率趋于稳定, 变化不大。从提取效率和节约试剂等方面综合考虑, 将料液比选在 1:30 左右比较合适。

表 1 空白值测定

Table 1 Blank value determination

编号	空白值	标准偏差/%	最低检出限/mg
1	0.0018		
2	0.0021		
3	0.0025		
4	0.0016		
5	0.0018	0.000397	0.002
6	0.0020		
7	0.0012		
8	0.0014		
9	0.0015		

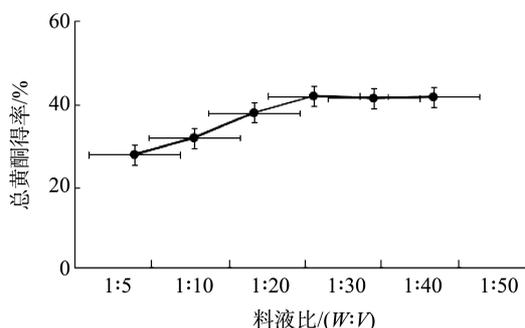


图 3 液料比对黄酮提取率的影响(n=3)

Fig.3 Effect of liquid to material ratio on the extraction rate of flavonoids(n=3)

3.4.2 提取时间对黄酮提取率的影响

图 4 为固定乙醇溶剂浓度(95%)及料液比(1:30)比较不同的超声辅助提取时间(5、10、20、30、40、60 min)对总黄酮提取率的影响。从图 4 可以看出: 黄酮提取率开始随着提取时间增大而增大, 然后有下降趋势。当作用时间为 10~30 min 时, 黄酮提取率比增加较快, 当提取时间为 30 min 时, 黄酮得率最大。30 min 后, 黄酮提取率不但没有增加反而下降。这可能是超声波具有较强的热效应和机械效应, 长时间作用使黄酮发生了氧化。从提取效率和成本等方面综合考虑, 将提取时间控制在在 25~30 min 左右为宜。

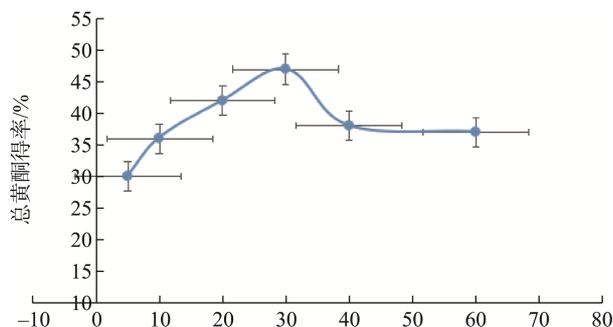


图 4 提取时间对黄酮提取率的影响(n=3)

Fig.4 Effect of extraction time on the extraction rate of flavonoids (n=3)

3.4.3 乙醇浓度对黄酮提取率的影响

图 5 为固定提取时间(30min)及料液比(1:30)比较不同的乙醇提取液浓度(50%、60%、70%、80%、95%、100%)对样品中总黄酮提取率的影响。由图 5 可知随着乙醇的浓度提高,黄酮的提取率增加,这是由于常见的黄酮主要是醇溶性的,因此本法将乙醇浓度定在 95%。

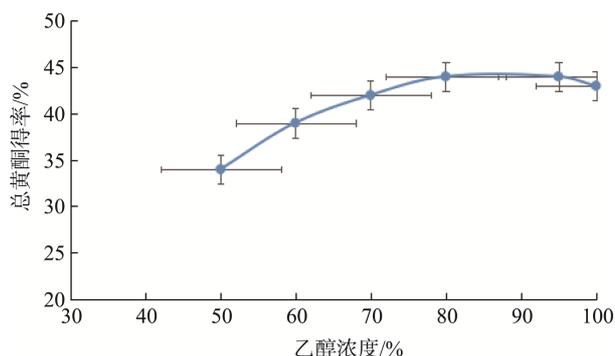


图 5 乙醇浓度对黄酮提取率的影响($n=3$)

Fig.5 Effect of ethanol concentration on the extraction rate of flavonoids ($n=3$)

3.4.4 最佳提取方式的确定

综上,对不同条件下黄酮提取效率的影响研究发现,料液比为 1:30($m:V$),乙醇提取浓度为 95%,提取时间 30 min,黄酮的提取效率最佳。即试样前处理方式:称取粉碎均匀的试样 1~2 g,精确至 0.01 g,置于 150 mL 具塞三角瓶中,加入 95%乙醇溶液,将三角瓶置于 60 °C 的水浴中超声波提取,趁热过滤,收集滤液至于 100 mL 容量瓶中。重复提取 3 次,用 95%乙醇清洗滤纸和残渣,合并提取液,冷却定容至刻度,备用。

3.5 测定方法的精密度

精密称取样品 6 份,按照 3.4.4 方法进行测定。结果如表 2 所示,平均值为 4.05%,标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.94%,结果表明精密度良好。

3.6 加标回收实验

为了考察整个方法的可靠性,对 5 份样品用标准品加标法测定回收率,结果如表 3 所示。平均回收率为 98.30%,回收率高,表明结果准确可靠。

表 2 样品精密度测定
Table 2 Sample precision determination

样品号	样品质量/g	吸光值	黄酮含量/%
1	1.0025	0.4629	4.01
2	1.0002	0.4705	4.08
3	1.0211	0.4745	4.03
4	1.0125	0.4762	4.08
5	1.0065	0.4659	4.02
6	1.0185	0.4805	4.10

表 3 样品回收率测定

Table 3 Sample recovery determination

样品号	标准加入量 /mg	样品中含量 /mg	测定值 /mg	回收率 /%
1	0.1	0.2054	0.3042	98.82
2	0.2	0.3021	0.4946	96.25
3	0.4	0.4214	0.8239	100.63
4	0.6	0.4025	0.9912	98.12
5	0.8	0.2112	0.9927	97.69

3.7 稳定性试验

供试品溶液于制样后不同时间进样测定,结果见表 4。实验所得 RSD 为 1.62%,说明供试品溶液在制样后 30 min 内测定稳定。

表 4 稳定性考察

Table 4 Stability inspection

测定时间/min	15	20	25	30	RSD/%
吸收度/Abs	0.521	0.517	0.506	0.504	1.62

3.8 样品测定结果

对 10 组不同产地的显齿蛇葡萄样品按本方法进行测定,测定结果如表 5 所示,不同产地的显齿蛇葡萄的总黄酮含量有一定的区别。

表 5 不同产地显齿蛇葡萄中总黄酮的含量

Table 5 Content of total flavonoids in ampelopsis grossedentata from different habitats

样品编号	测定结果/%
1	23.5
2	19.4
3	14.5
4	26.7
5	30.5
6	20.4
7	15.7
8	19.5
9	11.8
10	18.5

注:编号 1~3 产地为株洲;编号 4~7 产地为张家界;编号 8~10 产地为湘潭。

3.9 标准测定方法对比

选择 4 种样品进行了对比实验,结果统计如下表 6。

表6 不同实验室比对结果
Table 6 Comparison results of different laboratories

样品标号	实验室 A/%	实验室 B/%	实验室 C/%	平均值/%	RSD/%
1	23.71	23.37	23.43	23.50	0.77
2	13.59	13.54	13.62	13.58	0.30
3	14.42	14.65	14.28	14.45	1.29
4	16.34	16.70	16.54	16.52	1.09

注: 实验室 A 为本实验室; 实验室 B 为长沙市食品质量监督检测中心; 实验室 C 为湖南省疾病预防控制中心。

4 结论与讨论

本文通过单因素试验研究了不同条件对黄酮提取率的影响, 结果表明在提取温度 50 °C、提取溶剂为 95%乙醇、提取时间为 30 min、料液比为 1:30(*m:V*)的条件下总黄酮的提取效率最高。在此条件下建立的总黄酮检测方法中, 标液浓度在 0.5 ~ 56 μg/mL 范围内, 吸光度与浓度呈良好的线性关系, 回归方程为 $Y=0.0287X$, $r^2=0.9998$, 检出限为 2 mg/kg。样品加标的平均回收率为 98.30%, 精密性及稳定性好, RSD 分别为 0.94%、1.62%。本方法操作简便、快速、准确, 可作为该药材质量评价方法, 也可填补显齿蛇葡萄黄酮检测方法的空白。

此外, 不同产地的显齿蛇葡萄中黄酮的含量有明显的区别, 这对于需要高含量黄酮类化合物的采集有针对性的指导意义, 也对于进一步控制、评价和监督显齿蛇葡萄等含黄酮的功能性食品的质量具有非常重要意义。

参考文献

- [1] 中国科学院研究所. 中国高等植物图鉴补编: 第二册[M]. 北京: 科学出版社, 1979.
Institute of Chinese academy of sciences. Supplement to higher plant atlas of China: Volume II [M]. Beijing: Science Press, 1979.
- [2] 张命龙, 彭密军, 杨秋玲, 等. 显齿蛇葡萄抗氧化活性与主要成分相关性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(3): 387-394.
Zhang ML, Peng MJ, Yang QL, et al. Antioxidant properties and correlation with major chemical components in ampelopsis grossedentata [J]. Nat Prod Res Dev, 2019, 31(3): 387-394.
- [3] 焦思棋, 廖利, 冯淳, 等. 显齿蛇葡萄中黄酮类化合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用研究[J]. 食品科技, 2019, 44(1): 269-273.
Jiao SQ, Liao L, Feng C, et al. Inhibition effects of flavonoids from ampelopsis grossedentata on α -glucosidase [J]. Food Sci Technol, 2019, 44(1): 269-273.
- [4] Liu TT, Zeng Y, Tan KG, et al. Dihydromyricetin ameliorates atherosclerosis in LDL receptor deficient mice [J]. Atherosclerosis, 2017, 5(3): 39-50.
- [5] 焦思棋. PAL 与 CHI 活性对显齿蛇葡萄中主要黄酮代谢的影响研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2019.
Jiao SQ. Effects of PAL and CHI activities on the metabolism of flavonoids in ampelopsis grossedentata [D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2019.
- [6] 冯淳, 张妮, 周大颖, 等. HPLC 测定显齿蛇葡萄叶中 4 种黄酮类化合物的含量[J]. 食品工业科技, 2018, 39(24): 240-245.
Feng C, Zhang N, Zhou DY, et al. Determination of the Content of 4 Flavonoids in Ampelopsis grossedentatas Leaves by HPLC [J]. Sci Technol Food Ind, 2018, 39(24): 240-245.
- [7] 漆姣媚, 蒋燕群, 张杰, 等. 显齿蛇葡萄总黄酮降血糖作用研究[J]. 中国药学杂志, 2017, 52(19): 1685-1690.
Qi JM, Jiang YQ, Zhang J, et al. Hypoglycemic effect of total flavonoids from ampelopsis grossedentata [J]. Chin Pharm J, 2017, 52(19): 1685-1690.
- [8] 冯淳, 焦思棋, 余正文. 显齿蛇葡萄中黄酮类化合物的研究进展[J]. 中国药房, 2018, 29(20): 2871-2875.
Feng C, Jiao SQ, Yu ZW. Research progress of flavonoids in ampelopsis grossedentata [J]. Chin Pharm, 2018, 29(20): 2871-2875.
- [9] 张斌. 显齿蛇葡萄提取物的体内和体外降血糖效果[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(2): 321-323.
Zhang B. Hypoglycemic effect of extracts from ampelopsis grossedentata in vivo and in vitro [J]. Chin J Gerontol, 2017, 37(2): 321-323.
- [10] Ye LY, Wang HJ, Duncan SE, et al. Antioxidant activities of vine tea (ampelopsis grossedentata) extract and its major component dihydromyricetin in soybean oil and cooked ground beef [J]. Food Chem, 2015, 172: 416-422.
- [11] 雷华平, 冯纪南, 任名新, 等. 不同季节的显齿蛇葡萄中二氢杨梅素和总黄酮的含量测定[J]. 中国野生植物资源, 2017, 36(1): 37-39.
Lei HP, Feng JN, Ren MX, et al. Determination of dihydromyricetin and total flavones in ampelopsis grossedentata in different seasons [J]. Chin Wild Plant Res, 2017, 36(1): 37-39.
- [12] 刘浩, 镇兰萍, 王勇庆, 等. 湖南省显齿蛇葡萄资源调查研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(7): 44-47.
Liu H, Zhen LP, Wang YQ, et al. Resources investigation of ampelopsis grossedentata (Hand.-Mazz.) W.T.wang in Hunan province [J]. J Hunan Univ Tradit Chin Med, 2016, 36(7): 44-47.
- [13] 潘欣妍, 佟长青, 赵菲, 等. 显齿蛇葡萄多糖的提取及鉴定[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(23): 148-150.
Pan XY, Tong CQ, Zhao F, et al. The isolation and characterization of a polysaccharide from ampelopsis grossedentata [J]. J Anhui Agric Sci, 2018, 46(23): 148-150.
- [14] 付明, 黎晓英, 王登宇, 等. 显齿蛇葡萄叶中黄酮类化合物的研究[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(7): 574-578.
Fu M, Li XY, Wang DY, et al. Flavonoid constituents of leaves of ampelopsis grossedentata (Hand-Mazz)W.T.wang [J]. Chin Pharm J, 2015,

50(7): 574-578.

- [15] 孔琪. 显齿蛇葡萄提取物与主要黄酮类化合物及衍生物的抗菌抗氧化活性研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2015.

Kong Q. Study on the antibacterial and antioxidant activities of extracts from ampelopsis grossedentata and its main flavonoids and derivatives [J]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2015.

- [16] 汲军, 王丹丹. 显齿蛇葡萄及提取物在食品中的应用[J]. 食品安全导刊, 2016, (18): 46.

Ji J, Wang DD. Application of ampelopsis grossedentata and its extract in food [J]. Chin Food Saf Magaz, 2016, (18): 46.

- [17] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].

GB/T 27404-2008 Laboratory quality control specification-Food physical

and chemical testing [S].

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介

言 剑, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 827289007@qq.com