

藤茶黄酮含量 及其体外抗脂质过氧化能力研究

付明,胡朝暾,周亮,李胜华

(民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室,湘西药用植物
与民族植物学湖南省高校重点实验室,怀化学院生命科学系,湖南怀化 418008)

摘要:分别采用超声波辅助热水法、超声波辅助乙醇法、乙醇浸提法、酶解法的最佳提取工艺提取藤茶黄酮,以 AlCl_3 显色法测定黄酮含量;选择最佳方法测定不同时期、不同部位藤茶黄酮含量。对比研究了藤茶叶和维生素体外抗脂质过氧化作用。结果表明:不同时期、不同部位藤茶黄酮含量具有明显差别,叶中黄酮含量明显高于茎,高达 41.25%;在 $555 \mu\text{g}/\text{mL}$ 内藤茶叶的抗脂质过氧化作用明显强于维生素 C,并且在实验浓度范围内呈剂量关系。

关键词:藤茶,黄酮,脂质过氧化,维生素 C

Study on content and anti-lipoperoxidation activity *in vitro* of flavonoids extracted from *Ampelopsis grossedentata*

FU Ming, HU Zhao-tun, ZHOU Liang, LI Sheng-hua

(Key Laboratory of Research and Utilization of Ethnomedicinal Plant Resources of Hunan Province,
Key Laboratory of Xiangxi Medicinal Plant and Ethnobotany of Hunan Higher Education,
Department of Life Sciences, Huaihua University, Huaihua 418008, China)

Abstract: The flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* were extracted respectively by the best extraction technology of ultrasonic auxiliary hot water method, ultrasonic auxiliary ethanol method, ethanol leaching method and enzyme method. The content of flavonoids were determined by spectrophotometry using chromogenic reaction of AlCl_3 . Choosing the ultrasonic auxiliary ethanol method from which the content of flavonoids was the highest to determine the content of different periods and different parts. The anti-lipoperoxidation activity *in vitro* on the liver homogenate of mouse which was made by the flavonoids in *Ampelopsis grossedentata* leaves and vitamin C was studied contrastively. The result showed: the content of flavonoids in different periods and different parts had evident difference. Namely, the content in leaves was much higher than in stem (41.25%); the anti-lipoperoxidation effect of the flavonoids in *Ampelopsis grossedentata* leaves was evident stronger than vitamin C and it showed did relationship within the experimental concentration range.

Key words: *Ampelopsis grossedentata*; flavonoids; lipoperoxidation; vitamin C

中图分类号: TS272.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)07-0146-04

藤茶即显齿蛇葡萄(*Ampelopsis grossedentata*),属于葡萄科蛇葡萄属。味甘、性凉,将其幼嫩茎叶制成保健茶,常饮能调节肾功能,可治疗感冒发热、咽喉肿痛、黄疸型肝炎等。其提取物可预防心脑血管疾病、降血糖、抗氧化、增强免疫力^[1]。其有效成分主要为黄酮类物质,含量高达 45.3%~45.5%^[2-3],其中二氢杨梅素(dihydromyricetin, DMY)含量最高,但与地理、气候环境、栽培条件等因素有关。近年来,国内

外已有学者开展了从藤茶中提取二氢杨梅素的研究^[4-5]。过氧化脂质具有破坏生物膜的作用,导致细胞破坏、机体损伤。动物组织中脂质过氧化产物丙二醛(MDA)在酸性条件下可与硫代巴比妥酸(TBA)显色,产物在 532nm 处有最大吸收峰,由此可以判断脂质的过氧化程度。目前对藤茶的研究主要集中在成分提取、提取方法等方面,关于其抗脂质过氧化作用的详细报道较少。本研究采用四种不同方法的最佳提取工艺提取藤茶黄酮,以分光光度法测定黄酮含量,再选择黄酮含量最高的方法测定不同时期、不同部位黄酮的含量,以确定最佳采摘时期;对藤茶和 V_c 抗小鼠肝脂质过氧化作用进行了初步的比较研究,为其应用研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

藤茶 采摘于湖南省怀化市,从 4 月份到 9 月份

收稿日期:2012-10-17

作者简介:付明(1966-),女,本科,副教授,主要从事植物生物化学研究。

基金项目:怀化学院民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室资助项目(SYSXM200902);湖南省教育厅项目(09C756);湖南省高校科技创新团队支持计划资助(2010212);湖南省“十二五”植物学重点建设学科资助(201142)。

表1 四种不同方法提取藤茶黄酮的最佳工艺
Table 1 Optimization extraction conditions of flavonoids from *Ampelopsis grossedentata*

方法	最佳工艺			
超声波辅助乙醇法	料液比	乙醇浓度(%)	浸提时间(min)	超声波时间(min)
	1:40	65	30	20
超声波辅助热水法	料液比	浸提温度(℃)	浸提时间(h)	超声波时间(min)
	1:25	80	2	25
乙醇浸提法	料液比	乙醇浓度(%)	浸提时间(min)	浸提温度(℃)
	1:35	75	50	
酶解法	酶浓度(mg/mL)	酶解温度(℃)	酶解时间(h)	pH
	0.4	55	2	4.0

共采样7次;小鼠由怀化学院动物实验室提供;DMY标准品四川食品药品检验所,批号100080-200306;纤维素酶中科院上海生化所东风生化技术公司,15000U/g;AlCl₃·6H₂O、TBA、抗坏血酸(V_c)、三氯乙酸、石油醚、乙醇等均为分析纯。

DU-800紫外/可见分光光度计美国Beckman公司;3-18k冷冻高速离心机德国Sigma;JY98-III DN型超声波细胞粉碎机宁波新芝生物科技股份有限公司;SHZ-3型循环水多用真空泵上海沪西分析仪器厂;FW177型中草药粉碎机天津泰斯特仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品液的制备 将藤茶茎、叶分开干燥,粉碎并过60目筛后密封保存。取样品2.0g置索氏提取器中,加入适量石油醚回流,挥干样品中的石油醚后加入95%乙醇提取1h,抽滤后用95%的乙醇定容到100mL,待测。

1.2.2 最大吸收波长、标准曲线及回归方程的建立

分别取0.1mg/mL DMY的95%乙醇液1mL和1.2.1中制备的样品提取液0.2mL,加入5%的AlCl₃ 3mL,用95%乙醇定容至10mL,摇匀。以加蒸馏水的为空白,于250~800nm扫描。选取二者共同的最大吸收波长,分别吸取50μg/mL DMY标准液0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mL同扫描一样操作,测最大波长处的吸光值,制作标准曲线,得回归方程^[6]。

1.2.3 最佳提取方法的选择 分别采用超声波辅助乙醇法、超声波辅助热水法、乙醇浸提法、酶解法提取藤茶黄酮,在单因素实验基础上通过正交实验确定每种方法的最佳提取工艺。

提取黄酮的具体操作分别为:超声波辅助乙醇法:向样品中加入一定体积一定浓度的乙醇溶液,于80℃回流提取一定时间,再用超声波(450W)处理一定时间后抽滤,定容至100mL。超声波辅助热水法:向样品中加入一定体积的蒸馏水,置于一定温度下浸提一定时间,再用超声波(450W)处理一定时间后抽滤、定容至50mL。乙醇浸提法:称取一定量样品按一定比例,加入一定浓度的乙醇,在一定温度下浸提一定时间,过滤、定容至100mL。酶解法:称取一定量样品于100mL锥形瓶中加入15mL一定pH的HAc-NaAc缓冲液,加入一定量的纤维素酶摇匀,置于一定温度下酶解一定时间;再加95%乙醇使乙醇

终浓度为70%,在80℃下回流提取2h过滤、定容至100mL。

将样品按1.2.1方法处理后,分别按上述四种方法制备样品提取液,再取一定量提取液按1.2.2的方法测A₃₁₀。根据吸光值通过回归方程求出X,按公式(1)计算黄酮含量:

$$\text{黄酮含量}(\%) = \frac{X \times V_2 \times 10^{-6}}{W \times V_1} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

采用每种方法的最佳提取工艺(见表1)提取同一时期、同一部位藤茶黄酮,根据黄酮含量选择提取藤茶黄酮的最佳方法。

1.2.4 不同时期藤茶茎、叶中黄酮含量的测定 采用1.2.3中黄酮含量最高的方法提取不同时期藤茶茎、叶的黄酮,测A₃₁₀。实验重复3次,取平均值根据回归方程计算出样品中黄酮含量。

1.2.5 藤茶和V_c抗氧化实验 选取黄酮含量最高的藤茶材料提取黄酮,计算出黄酮浓度。为便于比较,配制相同浓度的V_c溶液。将小鼠禁食一夜后处死,取鼠肝用pH7.4的磷酸盐缓冲液制成5%的组织匀浆。向离心管内加入0.5mL组织匀浆,再分别加入一定体积的样品液和V_c,用生理盐水补充至1mL,使黄酮和V_c的终浓度相同。对照管中加0.5mL组织匀浆、0.5mL生理盐水,空白管加1mL生理盐水。37℃振荡温育1.5h,加1mL 20%三氯乙酸、1mL 0.67% TBA,沸水浴15min,冷却。3000r/min离心20min,取上清液测A₅₃₂。根据公式(2)计算出黄酮和V_c对脂质过氧化的抑制率^[7-8]:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

2 结果与讨论

2.1 最大吸收波长、标准曲线及回归方程

对DMY标准液和藤茶提取液的扫描结果见图1。由图可知,二者在310nm处都有最大吸光值,波峰比较单一,故选择测定波长为310nm。分别测定不同浓度DMY标准液的A₃₁₀,以A₃₁₀对DMY含量作图,得回归方程A=0.0060X-0.0044, R²=0.9997,说明在0~12.5μg/mL时线性关系良好。

2.2 四种不同方法提取藤茶黄酮结果

采用四种不同方法的最佳工艺提取6月5日藤茶叶中的黄酮,结果表明黄酮含量最高的提取方法是超声波辅助乙醇法(41.25%),超声波辅助热水法

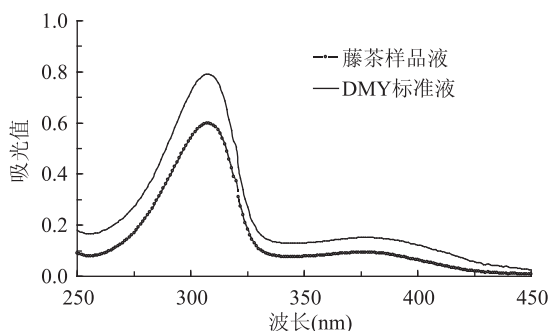


图1 DMY标准液和样品提取液扫描图

Fig.1 Comparison UV absorption

of *Ampelopsis grossedentata* extract and DMY standard

提取的黄酮含量最低(24.92%),乙醇浸提法和酶解法无显著性差异,见图2。可能是因为超声波能有效地将细胞壁破裂,使黄酮类物质充分释放出来,并且不会使物质的性质发生变化,提取率高。故选择超声波辅助乙醇法来提取、测定不同时期、不同部位的藤茶黄酮含量。

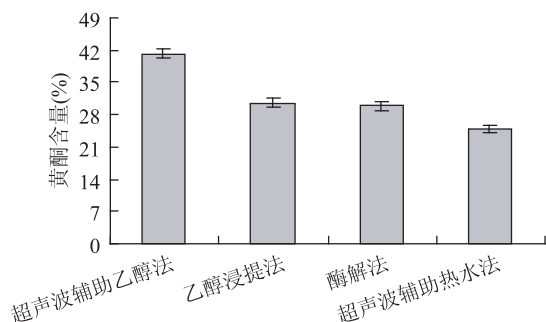


图2 不同提取方法的结果比较

Fig.2 Comparison of flavonoid concentration

of *Ampelopsis grossedentata* using four different methods

2.3 不同时期藤茶叶、茎中黄酮含量的测定

取不同时期藤茶叶、茎,按超声波辅助乙醇法提取黄酮,计算黄酮含量,共三份平行,结果见图3。

从图3可看出:不同时期藤茶叶和茎中黄酮含量有较大差异,黄酮含量以6月5号为最高(叶412.5mg/g,茎65.6mg/g),6月28号次之(叶398.4mg/g,茎60.7mg/g),9月的黄酮含量最低(叶294.1mg/g,茎29.2mg/g),并且其叶中黄酮含量大概是茎中的6~10倍。

向东山^[9]等采用超声波辅助乙醇法提取绿凤藤茶中总黄酮,以 $\text{NaNO}_2-\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 显色,结果6月份样品的黄酮含量最高(16.25%),与我们的工作有出入,可能是因为显色方法不同。有研究表明,采用

表3 精密度实验

Table 3 Precision of the methods

测定值(μg)					平均值(μg)	标准偏差	RSD(%)	平均RSD(%)
94.71	94.47	94.88	94.29	94.60	94.59	0.2253	0.24	0.26
105.17	105.79	105.54	105.38	105.92	105.56	0.3031	0.29	
103.96	104.12	104.29	104.52	104.67	104.31	0.2884	0.28	
99.97	99.86	99.72	100.15	100.29	100.00	0.2267	0.23	
93.30	93.02	93.15	92.88	93.49	93.17	0.2379	0.26	

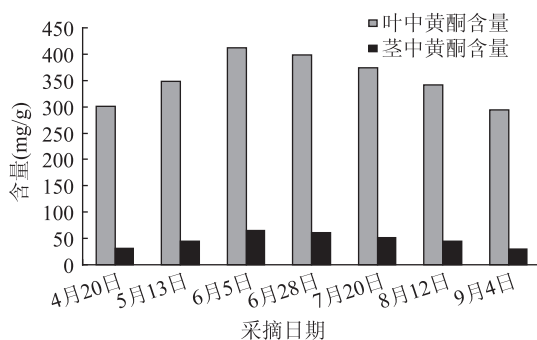


图3 藤茶黄酮含量的变化

Fig.3 Flavonoid concentration curves

of *Ampelopsis grossedentata*

$\text{NaNO}_2-\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 作为显色剂,测定黄酮含量时不能排除非黄酮类物质的干扰,专属性不强,而 AlCl_3 比色法可以消除非黄酮类物质对显色的干扰^[10-11],而且怀化地区藤茶在4月底发芽,6月中旬为生长旺盛期,此时期黄酮含量高是正常的。由此可见,可选择藤茶叶作为研究对象;藤茶叶的采摘可集中在6月初至中旬,因为这一时期黄酮含量相对较高,制作茶叶、饮料以及作为药用都可以发挥很强烈的作用,并且口感较好。

2.4 加样回收率和精密度实验

制备5份不同的藤茶叶样品液,分别加入一定量的DMY标准品,测 A_{310} ,计算黄酮含量,求出平均回收率,结果见表2;在同一份藤茶叶样品中连续测5次,计算相对标准偏差,结果见表3。

表2 加样回收率实验

Table 2 Spike recovery of the methods

样品中黄酮含量(μg)	加入DMY含量(μg)	测得黄酮含量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)
69.74	25.00	94.59	99.40	99.50 RSD = 0.78
80.5	25.00	105.56	100.24	
79.68	25.00	104.31	98.52	
74.92	25.00	100.00	100.32	
68.42	25.00	93.17	99.00	

熊璞等^[12]采用热水二级提取法提取藤茶DMY, HPLC法测其含量,在最佳工艺下DMY含量为30.81%,是因为提取黄酮、测定含量的方法不同。我们在单因素实验的基础上进行了正交实验,选择的是最佳提取工艺,而且本研究的平均加样回收率为99.50%,精密度实验的平均RSD为0.26%,使实验数据更准确,结果可信。

(下转第214页)

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2005 年版第一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 218.
- [2] 贾凌云, 孙启时, 黄顺旺. 滁菊中黄酮类化学成分分离与鉴定[J]. 中国药物化学杂志, 2003, 13(3): 159-161.
- [3] 聂莹, 陈俊帆, 苏东海, 等. α -葡萄糖苷酶抑制剂的研究进展及食品源抑制剂的开发前景[J]. 农产品加工·学刊, 2012(3): 18-23.
- [4] 王松, 鲍方印, 郑玉华. 滁菊中黄酮类化合物提取方法的优化[J]. 食品科学, 2010, 31(12): 80-82.
- [5] 卫强, 汪庆健. 滁菊中茎、叶中总黄酮的提取工艺研究[J]. 中兽医医药杂志, 2009(1): 39-40.
- [6] 袁敏, 刘道芳. 正交实验优选滁菊总黄酮的提取工艺[J]. 安徽医药, 2006, 10(8): 569-570.
- [7] 安凤平, 刘燕, 宋江良. 白茶低温浸提工艺[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2010, 39(6): 595-599.

- [8] 史玉汉, 罗栋源, 万端极. 速溶红茶粉的低温浸提工艺[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(10): 71-74.
- [9] 李凤娟, 丁兆堂, 杜金华. 低温浸提茶汁的最优工艺条件[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(4): 114-116.
- [10] 梁新红, 赵功玲, 赵瑞香. 分光光度法测定仙人掌酒中总黄酮含量[J]. 中国酿造, 2007(6): 67-69.
- [11] 赵佳, 霍俊伟. 蓝果忍冬总黄酮提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(11): 243-244.
- [12] 王丽珠, 吴棣, 姚元根, 等. 酒石酸亚铁分光光度法测定茶多酚[J]. 光谱实验室, 1997, 14(3): 26-29.
- [13] 胡玲珍, 韩丽丽, 张超霞, 等. 茶叶废料中茶多酚提取工艺优化研究[J]. 广东化工, 2011, 38(6): 30-31.
- [14] 张丽, 李彩芳, 李晓梅, 等. 加拿大蓬 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 河南大学学报: 医学版, 2008, 27(4): 39-41.
- [15] 王倩, 常丽新, 贾长虹, 等. 狗枣猕猴桃叶黄酮提取工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(5): 235-237.

(上接第 148 页)

2.5 藤茶叶和 V_C 抗氧化作用的比较

取 6 月 5 日的藤茶叶提取黄酮, 测 A_{310} 后计算出黄酮浓度为 $1.85 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$, 再配制相同浓度的 V_C , 然后制成终浓度为 46.25、92.5、185、277.5、370、462.5、555 $\mu\text{g/mL}$ 的系列, 用空白管调零, 测对照管、样品组和 V_C 组的 A_{532} 。由公式(2)求出不同浓度样品和 V_C 对自发性肝脂质过氧化抑制率, 结果见图 4。

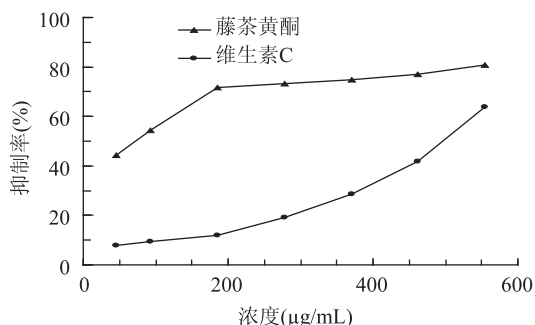


图 4 藤茶和 V_C 抗脂质过氧化作用比较

Fig.4 The anti-lipid peroxidation effect of *Ampelopsis grossedentata* extract and vitamin C

从图 4 看出: 样品和 V_C 分别与小鼠肝匀浆共同温育后都能抑制肝脂质的自发性氧化, 这种抑制作用在 46.25~555 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与浓度呈正相关, 藤茶的抗氧化作用明显强于 V_C 。在 46.25~185 $\mu\text{g/mL}$ 时藤茶的抗氧化作用与浓度的依赖关系更明显, 抑制作用远远超过 V_C ; 而在 370~555 $\mu\text{g/mL}$ 时 V_C 的抗氧化作用对浓度的依赖关系更大, 但抑制作用仍然不如藤茶。藤茶与 V_C 的抗氧化作用差异随浓度的增加而缩小, 至于在更高浓度时 V_C 的抗氧化作用是否会和藤茶一样, 有待于进一步研究。

何桂霞等^[7]发现藤茶总黄酮可抑制脂质过氧化产物 MDA 的升高, 抑制作用在 2.5~40.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈浓度依赖性变化, 这与本工作的结果一致, 说明即使在很低浓度时藤茶也有很强的抗脂质过氧化作用。由于藤茶中黄酮含量高, 提取方法简单易行, 抗氧化作用强, 有望开发成抗氧化剂, 作为绿色的食品添加剂。

3 结论

不同时期、不同部位藤茶黄酮含量具有明显差别: 6 月初至中旬黄酮含量最高, 5 月、7 月、8 月次之, 4 月和 9 月黄酮含量最低; 叶中黄酮含量明显高于茎中黄酮含量, 前者约为后者的 6~10 倍; 本研究中 6 月 5 日采摘的叶中黄酮含量高达 41.25%。在 555 $\mu\text{g/mL}$ 浓度内藤茶叶的抗氧化作用明显强于 V_C , 并且在实验浓度范围内呈剂量关系。

参考文献

- [1] 胡远艳. 藤茶中双氢杨梅树皮素的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(2): 157-158.
- [2] 覃洁萍, 梁山丹, 何翠薇. 差示分光光度法测定广西瑶族藤茶中黄酮类成分的含量[J]. 中草药, 2002, 33(7): 607-609.
- [3] 何桂霞, 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, 24(1): 13-15.
- [4] 赖毅勤, 周宏兵. 近年来黄酮类化合物提取和分离方法研究进展[J]. 食品与药品, 2007, 9(4): 54-58.
- [5] 王晓云, 姜子涛. 天然抗氧化剂二氢杨梅素研究进展[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(2): 185-188.
- [6] 熊皓平, 杨伟丽, 何国庆, 等. 分光光度法测定显齿蛇葡萄总黄酮含量[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 144-145.
- [7] 何桂霞, 杜方麓, 杨伟丽, 等. 藤茶总黄酮清除氧自由基与抗脂质过氧化作用[J]. 中药材, 2003, 26(5): 338-340.
- [8] 尹学哲, 李天, 汪霞. 大豆皂甙抗脂质过氧化作用的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(7): 143-145.
- [9] 向东山, 刘晓鹏, 翟琨, 等. 不同采收时期及不同部位绿风藤茶中总黄酮含量比较与分析[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(7): 1745-1746.
- [10] 马陶陶, 张群林, 李俊, 等. 三氯化铝比色法测定中药总黄酮方法的探讨[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(1): 54-56.
- [11] 石秀梅, 邹辉, 李春彦. 近年来茶叶中总黄酮类化合物测定方法研究概况[J]. 中国民族民间医药, 2007, 88(5): 273-274.
- [12] 熊璞, 姚茂君, 肖凯军. 藤茶中二氢杨梅素的提取工艺研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(8): 907-910.