

藤茶总黄酮检测方法的对比研究

秦亚茹^{1,2}, 张友胜², 张凯¹, 丁振东¹, 曾萍³, 孔繁晟¹

(1. 广东药科大学药学院, 广东广州 510006) (2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610)
(3. 深圳市绿航星际太空科技研究院, 广东深圳 518117)

摘要: 本文对比研究了直接测定法、硝酸铝-亚硝酸钠-氢氧化钠比色法、三氯化铝比色法、差分分光光度法测定藤茶样品中总黄酮含量的准确性, 并对方法的精密度、重复性、稳定性、加标回收率以及白砂糖、 β -环糊精、羧甲基纤维素钠、果葡糖浆和焦糖色素对方法的干扰进行测定, 最终用高效液相色谱法对结果进行验证。结果表明, 以二氢杨梅素为对照品, 在没有干扰物质的条件下, 差分分光光度法最适合藤茶总黄酮的测定; 该方法的精密度、重复性、稳定性和加标回收率的相对标准偏差(RSD)值分别为0.19%、2.26%、1.67%和100.97 $\pm$ 1.63%。单独或者复合加入不同浓度的干扰物质, 均对4种方法的检测结果造成明显的干扰。在复合干扰物存在时, 直接测定法所测总黄酮含量最接近高效液相色谱法的测定结果。

关键词: 藤茶; 总黄酮; 二氢杨梅素; 干扰物质; 方法对比

文章编号: 1673-9078(2019)12-302-309

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.12.038

Comparative Study of Determination Methods of Total Flavonoids in Vine Tea (*Ampelopsis grossedentata*)

QIN Ya-ru^{1,2}, ZHANG You-sheng², ZHANG Kai¹, DING Zhen-dong¹, ZENG Ping³, KONG Fan-sheng¹

(1. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China) (2. Sericulture & Agri-food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences/ Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture/Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China)
(3. SPACenter Space Science and Technology Institute, Shenzhen 518117, China)

Abstract: The accuracy of direct measurement method, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaNO_2 - NaOH colorimetric method, AlCl_3 colorimetric method and differential spectrophotometry for determining the total flavonoids in vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) were studied in this work. The accuracy, repeatability, stability, recovery rates of four methods were evaluated. The effects of white granulate sugar, β -CD, CMC-Na, fructose syrup and caramel on the interference for four methods were investigated. The results were validated by high performance liquid chromatography. The result showed that differential spectrophotometry was the most suitable method for determining the total flavonoids in vine tea with dihydromyricetin as the control and without interferent. The RSD for accuracy, repeatability, stability and recovery rates were 0.19%, 2.26%, 1.67% and 100.97 $\pm$ 1.63%, respectively. The addition of interferent with different concentration could cause the obvious interference to the detection results of the four methods. In the presence of complex interferent, the contents of total flavonoids determined by direct measurement method were most close to that determined by high performance liquid chromatography.

Key words: *Ampelopsis grossedentata*; total flavonoids; dihydromyricetin; interferent; method comparison study

藤茶为葡萄科蛇葡萄属中的显齿蛇葡萄

收稿日期: 2019-07-20

基金项目: 湖南省科技计划项目(2019NK3013-01; 2018XF5050); 广东省重点研发计划项目(2019B020212003); 广州市科技项目(2016SK3038); 深圳市基础研究(自由探索)项目(JCYJ2018 0305163647462)

作者简介: 秦亚茹(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 药物研发与转化
通讯作者: 张友胜(1965-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 天然产物、农产品和水产品加工; 共同通讯作者: 孔繁晟(1976-), 男, 博士, 高级实验师, 研究方向: 制药工程、天然药物制剂和功能性食品的开发

(*Ampelopsis grossedentata*), 是一种广泛分布于我国南部山区的药食两用植物。数百年来一直作为保健茶饮和中草药在民间广泛使用^[1,2]。据《中草药汇编》、《广东药用植物手册》等记载藤茶具有清热解暑、祛风湿的功效, 可用于治疗风热感冒、咽喉肿痛等^[3]。现代医学研究表明, 藤茶中含有丰富的黄酮类化合物。其中, 二氢杨梅素是藤茶总黄酮中的主要单体活性成分, 在干燥的幼嫩茎叶中含量超过30%^[4,5]。2013年藤茶被中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会批准为

新资源食品, 2015 年, “藤茶提取物”已被收录到可使用的化妆品原料名称目录(2015 版)。

总黄酮含量作为中草药质量控制指标, 测定方法众多^[6]。其中, 紫外可见分光光度法是测定总黄酮含量的常用方法, 也是历版《中华人民共和国药典》测定总黄酮广泛采用的方法^[7]。主要包括比色法、差分分光光度法和直接测定法等类型。其中, 比色法是最经典的用于中药材或中药制剂中总黄酮含量测定的方法^[8-11]。目前藤茶总黄酮含量的测定多采用硝酸铝-亚硝酸钠-氢氧化钠比色法^[12]、三氯化铝比色法^[13]、差分分光光度法^[14]和直接测定法^[15], 但未见几种测定方法的比较研究; 尤其是随着藤茶可应用于食品和化妆品行业法律依据的确认, 市场上藤茶深加工产品不断涌现, 为改善深加工产品的性能或者口感, 常常在深加工产品的生产过程中, 单独或复合加入甜味剂、粘稠剂以及色素等食品添加剂, 但未见食品添加剂在总黄酮测定时的干扰性研究报道。

鉴于此, 本研究以二氢杨梅素为标准对照品, 选择硝酸铝-亚硝酸钠-氢氧化钠比色法、三氯化铝比色法、差分分光光度法和直接测定法, 通过光谱扫描, 方法学考察以及深加工产品经常添加的白砂糖、 β -环糊精、羧甲基纤维素钠、果葡糖浆和焦糖色素对方法的干扰性实验, 比较分析四种方法测定结果的准确性, 并以高效液相色谱法加以验证, 旨在确定出可快速、准确、简便、灵敏测定出藤茶原茶及深加工产品中总黄酮含量的方法。

1 材料与方法

1.1 原料

原材料: 藤茶原茶, 用藤茶幼嫩茎叶按传统的茶叶加工工艺制成, 由湖南乾坤生物科技有限公司提供;

主要试剂: 二氢杨梅素标准品 (HPLC $\geq$ 98%), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司提供; 甲醇、乙酸(色谱纯), 天津科密欧化学试剂有限公司提供; 白砂糖、 β -环糊精(β -CD)、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、果葡糖浆、焦糖色素均为食用级; 所用试剂均为国产分析纯。

主要仪器设备: UV-1800 型紫外分光光度计, 日本岛津有限公司; Agilent 1260 高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; RE-52AA 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; SHZ-D (III) 循环水式真空泵, 巩义市予华仪器有限责任公司。

1.2 二氢杨梅素标准品溶液的制备

精密称定适量二氢杨梅素标准品, 用 95%乙醇溶解并定容于 25 mL 容量瓶中, 配成 0.504 mg/mL 的标准品溶液, 备用。

1.3 样品溶液制备

称取 500 g 藤茶原茶, 按液料比为 1:30 (W/V) 的比例加入 70%的乙醇进行提取。提取时间 60 min, 提取温度 95 $^{\circ}$ C, 提取次数 2 次, 合并滤液, 减压浓缩后冷冻干燥成醇提藤茶粉^[16]。取 1.0 g 醇提藤茶粉, 精密称定, 用 100 mL 95%乙醇溶解, 过滤; 收集滤液, 并用 95%乙醇定容至 100 mL, 然后取 2 mL 于 50 mL 容量瓶中, 用 95%乙醇稀释至刻度, 备用。

1.4 4 种方法对藤茶样品中总黄酮含量的比较测定

1.4.1 直接测定法

分别准确吸取 0.20 mL 样品溶液和二氢杨梅素标准溶液于 10 mL 具塞比色管中, 用 95%乙醇稀释至刻度后摇匀, 静置 10 min, 在 200~700 nm 波长范围内进行扫描, 根据扫描光谱图, 确定该方法的最适吸收波长^[15]。然后分别准确吸取 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 mL 二氢杨梅素标准溶液, 按上述进行同样处理后, 在该方法的最适吸收波长处测定吸光度, 绘制标准曲线。最后, 测定样品吸光值并计算总黄酮含量。

1.4.2 硝酸铝-亚硝酸钠-氢氧化钠 ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaNO_2 - NaOH) 比色法 (简称硝酸铝法)

分别准确吸取 0.40 mL 样品溶液和二氢杨梅素标准溶液于 25 mL 具塞比色管中, 加入蒸馏水至 6 mL, 摇匀后加入 1.00 mL 5%的 NaNO_2 溶液, 摇匀静置 6 min 后, 加入 1.00 mL 10%的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液, 摇匀静置 6 min 后, 加入 10 mL 4%的 NaOH 溶液, 加蒸馏水稀释至刻度后摇匀, 放置 15 min 后在 200~700 nm 波长范围内进行扫描, 根据扫描光谱图, 确定该方法的最适吸收波长^[12]。然后, 分别准确吸取 0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.70、0.80 mL 二氢杨梅素标准品溶液, 按上述进行同样处理后, 在该方法的最适吸收波长处测定吸光度, 绘制标准曲线。最后, 测定样品吸光值并计算总黄酮含量。

1.4.3 三氯化铝 (AlCl_3) 比色法

分别准确吸取 0.15 mL 样品溶液和二氢杨梅素标准溶液于 10 mL 具塞比色管中, 加入 3.00 mL 5%的 AlCl_3 溶液, 用 95%乙醇稀释至刻度后摇匀, 放置 40 min 后在 200~700 nm 波长范围内进行扫描, 根据扫描

光谱图, 确定该方法的最适吸收波长^[17]。然后, 分别准确吸取 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 mL 二氢杨梅素标准溶液, 按上述做同样处理后, 在该方法的最适吸收波长处测定吸光度, 绘制标准曲线。最后, 测定样品吸光值并计算总黄酮含量。

1.4.4 差示分光光度法

分别准确吸取 0.80 mL 样品溶液和二氢杨梅素标准溶液各 2 份, 再分别置于 25 mL 具塞比色管中, 1 份加 95%乙醇稀释至刻度, 1 份加入 2%八水合二氯化锆 ($\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) 甲醇溶液 1.50 mL 后再加 95%乙醇稀释至刻度, 摇匀, 放置 1 h 后将未加 $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 甲醇溶液的反应液置于参比池, 加入的置于样品池在 200~700 nm 波长范围内进行扫描, 根据扫描光谱图, 确定该方法的最适吸收波长^[14]。然后, 分别准确吸取 0.20、0.40、0.60、0.80、1.00、1.20、1.40 mL 二氢杨梅素标准品溶液, 按上述做同样处理后, 在该方法的最适吸收波长处测定吸光度, 绘制标准曲线。最后, 测定样品吸光值并计算总黄酮含量。

1.5 方法学考察

1.5.1 精密度测定

准确吸取适量藤茶醇提样品溶液, 分别按照“1.4”项下 4 种方法进行处理, 然后在各方法的最大吸收波长处, 在 2 min 内对同一样品液连续测定 6 次, 计算测定结果的 RSD 值。

1.5.2 重复性测定

准确称取 1.002 g 藤茶醇提粉 5 份, 按照“1.3”项方法制备样品溶液后, 分别按照“1.4”项下 4 种方法进行处理, 然后在各方法的最大吸收波长处测定, 并计算测定结果的 RSD 值。

1.5.3 加标回收率测定

准确吸取 5 份已知含量的藤茶醇提样品溶液, 各精密加入一定量的二氢杨梅素标准品溶液后, 分别按照“1.4”项下 4 种方法进行处理, 然后在各方法的最大吸收波长处测定吸光值, 并计算回收率。

1.5.4 稳定性测定

准确吸取适量藤茶醇提样品溶液, 分别按照“1.4”项下 4 种方法进行处理, 然后在各方法最大吸收波长处每隔 30 min 测定一次吸光值, 共测定 9 次, 计算各方法测定结果的 RSD 值。

1.6 干扰性试验

1.6.1 单一干扰物质对测定方法的影响

准确吸取样品溶液 30 份, 分为 5 组 (每组 6 份), 分别在不同组的样品溶液中加入适量白砂糖、 β -CD、

CMC-Na、果葡糖浆和焦糖色素, 100 °C 水浴锅中加热处理 15 min, 溶解干扰物质, 冷却后分别按“1.4”项测定样品液中总黄酮的含量。

1.6.2 复合干扰物质对测定方法的影响

准确吸取样品溶液 6 份, 同时在样品溶液中加入一定量的白砂糖、 β -CD、CMC-Na、果葡糖浆和焦糖色素, 按“1.6.1”项测定样品液中总黄酮的含量。

1.7 高效液相色谱法验证

1.7.1 标准曲线的建立

精密称定二氢杨梅素标准品适量, 用甲醇配制成 1.0 mg/mL 的标准品溶液。0.22 μm 的滤膜过滤后, 分别进样 2、4、6、8、10 μL , 记录峰面积, 并绘制标准曲线。测得的标准曲线为: $y=3163x+301.09$, $R^2=0.9995$, 线性范围为: 2~12 μg 。

色谱条件: Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱 (150 $\times$ 4.6 mm, 3.5 μm), 流动相为甲醇 (A) -0.1%乙酸水 (B), 梯度洗脱: 0~5 min, 90% B; 5~10 min, 90%~80% B; 10~20 min, 80%~70% B; 20~25 min, 70%~90% B; 25~30 min, 90% B。测定波长: 292 nm, 流速为 1 mL/min, 柱温为 35 °C^[18]。

1.7.2 藤茶样品溶液中总黄酮的检测

按照“1.3”项制备样品, 0.22 μm 的滤膜过滤后, 分别进样 10 μL , 记录样品溶液中二氢杨梅素的峰面积及峰面积比, 依据二氢杨梅素标准曲线计算样品溶液中二氢杨梅素含量, 然后根据色谱峰面积归一法计算藤茶样品溶液中总黄酮的含量, 并用二氢杨梅素当量表示 (mg 二氢杨梅素/g 醇提藤茶粉)。

1.8 数据处理与结果分析

所有分析测定均采用 3 次平行处理, 采用 SPSS 23.0 软件包进行数据处理, 采用 origin pro 9.0 软件进行绘图处理; 显著性水平取 0.05, 数据表示为平均值 $\pm$ 标准差。

2 结果与讨论

2.1 四种方法最适吸收波长的确定

将二氢杨梅素对照品溶液与藤茶样品溶液分别按照四种方法处理后, 在 200~700 nm 波长范围内进行扫描。由扫描结果 (图 1) 可知, 直接测定法、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaNO_2 - NaOH 比色法、 AlCl_3 比色法和差示分光光度法的最适吸收波长分别为 292.5 nm、324 nm、312 nm 和 320 nm。与文献中所得结果相似^[19]。另外, 从波形的吻合度来看, 直接测定法 (图 1a)、 AlCl_3 比

色法(图 1c)和差示分光光度法(图 1d)可能比 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaNO}_2\text{-NaOH}$ 比色法(图 1b)更适合测定藤茶样品中总黄酮的含量。

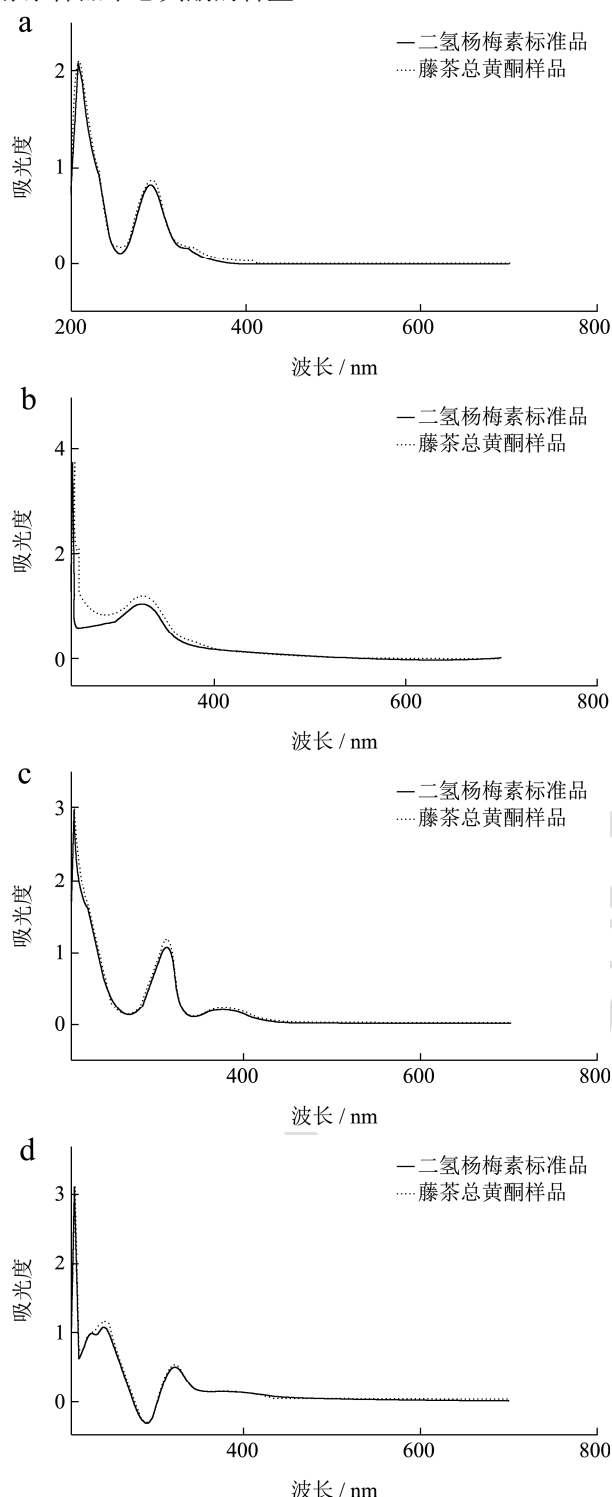


图1 四种方法在 200~700 nm 波长处的紫外扫描图

Fig.1 The results of ultraviolet scanning of four methods at 200~700 nm

注: a: 直接测定法; b: 硝酸铝-亚硝酸钠-氢氧化钠比色法; c: 三氯化铝比色法; d: 差示分光光度法。

2.2 四种方法标准曲线的建立

按照“1.4”项下操作,以二氢杨梅素标准品溶液的系列浓度 C ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标,吸光度 A 为纵坐标绘制标准曲线,分别得到四种方法相应的线性回归方程:直接测定法: $A=0.0559C-0.0258$, $R^2=0.999$,线性范围为 2.52~17.64 $\mu\text{g/mL}$; $\text{Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaNO}_2\text{-NaOH}$ 比色法: $A=0.0772C-0.0266$, $R^2=0.9995$,线性范围为 4.03~16.13 $\mu\text{g/mL}$; AlCl_3 比色法: $A=0.0755C-0.0459$, $R^2=0.9994$,线性范围为 2.52~17.64 $\mu\text{g/mL}$; 差示分光光度法: $A=0.032C+0.0021$, $R^2=0.9993$,线性范围为 4.03~28.22 $\mu\text{g/mL}$ 。四种方法的相关系数 R^2 表明,在相应的线性范围内,四种方法的标准曲线均线性良好。

2.3 四种方法总黄酮含量测定比较及方法学

考察结果

由表 1 可知,4 种方法对同一样品测得的总黄酮含量均具有显著性差异 ($p<0.05$)。其中, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaNO}_2\text{-NaOH}$ 比色法测得的总黄酮含量最高,为 931.65 mg/g,可能是因为该法的专属性不强,凡具有邻苯二羟基的物质均能显色,而本实验中所用的藤茶醇提粉未经纯化处理,还含有其它杂质,可能对待测物质产生干扰,故所测得的总黄酮含量偏高^[20];差示分光光度法测得的总黄酮含量最低,为 813.56 mg/g,可能是因为该法通过测定藤茶样品溶液与 ZrOCl_2 络合前后的差值,消除了背景吸收所致^[21]。

方法学分析结果如表 1 所示,四种方法精密度的 RSD 值均小于 1%,说明仪器的精密度较好;四种方法重复性的 RSD 值均小于 5%,在误差允许范围内,说明均有较好的重现性;直接测定法在 4 h 内的稳定性最好, RSD 值仅为 0.89%, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaNO}_2\text{-NaOH}$ 比色法在 4 h 内的稳定性最差, RSD 值为 11.00%,而在 30 min 内的 RSD 值为 3.75%,说明 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaNO}_2\text{-NaOH}$ 比色法在 30 min 内基本稳定,使用时要严格控制测定时间;成桂凤等^[22]在测定鄂西藤茶总黄酮含量时,比较发现直接测定法具有较高的稳定性,本文结果与其一致;四种方法的加标回收率结果显示,相互之间没有显著性差异。

综合表 1 中四种测定方法的精密度、重复性、稳定性和加标回收率的相对标准偏差(RSD)值分析可知,在误差允许范围内,直接测定法、 AlCl_3 比色法和差示分光光度法均适宜测定藤茶原茶中总黄酮含量。

表1 四种方法的藤茶样品总黄酮含量测定结果及方法学比较

Table 1 The comparison of methodological and results of total flavonoids in *Ampelopsis grossedentata* by four methods ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=3$)

方法	总黄酮含量/(mg/g)	精密度 RSD/%	重复性 RSD/%	稳定性 RSD/%	加标回收率/%
直接测定法	861.43±6.87 ^b	0.16 ^c	0.61 ^d	0.89 ^d	99.32±0.53 ^a
三氯化铝比色法	838.08±15.80 ^c	0.14 ^d	2.67 ^a	2.29 ^b	98.78±0.60 ^a
差示分光光度法	813.56±14.41 ^d	0.19 ^b	2.26 ^b	1.67 ^c	100.97±1.63 ^a
硝酸铝比色法	931.65±10.64 ^a	0.22 ^a	1.17 ^c	11.00 ^a	100.67±2.36 ^a

注: 表中不同字母表示差异性显著 ($p<0.05$); 差异性分析为相关指标同一列数据之间的比较。表 2~6 同。

表2 白砂糖对4种测定方法的影响

Table 2 The effect of white granulate sugar on four methods

白砂糖添加量/%	直接测定法/(mg/g)	硝酸铝比色法/(mg/g)	AlCl ₃ 比色法/(mg/g)	差示分光光度法/(mg/g)
0	863.30±13.03 ^a	929.96±6.30 ^a	826.43±8.79 ^b	808.70±10.83 ^a
2	846.93±6.58 ^b	911.20±11.65 ^b	868.82±11.01 ^a	786.35±4.48 ^b
4	844.88±11.50 ^b	913.02±7.18 ^b	868.82±11.99 ^a	793.06±22.11 ^b
6	842.83±6.80 ^b	907.58±5.04 ^b	859.00±9.86 ^{ab}	790.82±2.24 ^b
8	846.93±6.73 ^b	914.83±6.67 ^b	868.82±18.86 ^a	795.29±4.48 ^b
10	842.83±10.53 ^b	905.77±5.40 ^b	860.74±15.07 ^{ab}	790.82±2.01 ^b

表3 β -环糊精对4种测定方法的影响Table 3 The effect of β -CD on four methods

β -环糊精添加量/%	直接测定法/(mg/g)	硝酸铝比色法/(mg/g)	AlCl ₃ 比色法/(mg/g)	差示分光光度法/(mg/g)
0.0	855.77±11.03 ^a	937.65±6.30 ^a	826.24±8.79 ^a	808.70±2.83 ^a
0.2	847.39±12.58 ^{ab}	927.58±8.67 ^a	830.22±11.71 ^a	794.35±3.48 ^b
0.4	833.07±11.50 ^b	929.39±7.18 ^a	838.31±11.90 ^a	810.23±2.11 ^a
0.6	839.21±9.80 ^b	922.14±8.04 ^a	834.26±9.85 ^a	803.06±5.27 ^{ab}
0.8	847.39±6.73 ^{ab}	931.27±6.67 ^a	826.18±18.80 ^a	796.35±4.45 ^b
1.0	853.53±13.43 ^a	927.58±6.46 ^a	826.18±15.00 ^a	798.35±5.01 ^b

2.4 干扰性分析

干扰性实验主要是针对藤茶深加工产品中的总黄酮含量测定而言。藤茶深加工产品, 一般包括饮料、口服液、含片、冲剂、浸膏等。为改善产品的性能或者口感, 常常在产品的生产过程中, 单独或复合加入甜味剂、粘稠剂、或者色素等食品添加剂。本实验选用了产品生产中应用较多的 CMC-Na、 β -CD、白砂糖、果葡糖浆、焦糖色素作为干扰因素进行了总黄酮含量比较测定。

2.4.1 加入单一干扰物质

由表 2 可以看出, 在藤茶样品溶液中, 加入 2%~10% 的白砂糖之后, 4 种方法测定的总黄酮含量与未加白砂糖时均具有显著性差异 ($p<0.05$), 其中除 AlCl₃ 比色法显示样品中总黄酮含量增加外, 其余 3 种方法均显示样品中总黄酮含量减少, 但总黄酮含量的增加或者减少均与加入的白砂糖的浓度不具有显著性差异 ($p<0.05$) (差异性分析中有少量数据显示不一致, 可视为实验误差)。相似的, 刘尧^[23]采用

Al(NO₃)₃-NaNO₂-NaOH 比色法测定糖类对稻壳总黄酮含量的影响, 发现糖类可使稻壳总黄酮含量下降。

由表 3 可以看出, 在藤茶样品溶液中, 加入 0.2%~1.0% 的 β -CD 之后, 除 AlCl₃ 比色法的测定结果与未加入 β -CD 时没有明显差异外, 其余方法均显示样品中总黄酮含量减少, 且数据具有差异或者显著性差异 ($p<0.05$)。

由表 4 可以看出, 在藤茶样品溶液中, 加入 0.1%~0.5% CMC-Na 之后, 直接测定法与 Al(NO₃)₃-NaNO₂-NaOH 比色法的测定结果均显示样品中总黄酮含量减少, 且数据之间有差异或者显著性差异 ($p<0.05$) (AlCl₃ 比色法与差示分光光度法在 CMC-Na 添加量为 0.3% 时有絮状物开始生成, 因而停止实验, 数据未在表格中列出)。

由表 5 可以看出, 在藤茶样品溶液中, 加入 5%~25% 的果葡糖浆之后, 直接测定法的测定结果与未加入果葡糖浆时没有显著性差异 ($p<0.05$); 其它 3 种方法均有显著性差异 ($p<0.05$), 其中, AlCl₃ 比色法的测定结果显示总黄酮含量明显增加, Al(NO₃)₃-NaNO₂-

NaOH 比色法和差示分光光度法的测定结果显示总黄酮含量显著减少。

由表6可以看出,在藤茶样品溶液中,加入0.01%~0.08%的焦糖色素之后,焦糖色素对4种方法的干扰

显得更加复杂。除差示分光光度法的测定结果显示样品总黄酮含量先增加后减少之外,其他三种方法测定结果均呈先增加后减少再增加的波动性变化,并在焦糖色素浓度达到0.08%时接近未加色素时的测定值。

表4 CMC-Na 对直接测定法和硝酸铝比色法的影响

Table 4 The effect of CMC-Na on direct measurement method and $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaNO_2 - NaOH colorimetric method

CMC-Na 添加量/%	直接测定法/(mg/g)	硝酸铝比色法/(mg/g)
0.0	853.95±13.01 ^a	923.65±10.78 ^a
0.1	839.25±17.18 ^{ab}	922.64±5.60 ^a
0.2	833.25±11.58 ^b	931.15±9.15 ^{ab}
0.3	839.44±9.80 ^{ab}	925.71±9.04 ^{ab}
0.4	847.63±8.43 ^{ab}	916.64±5.37 ^b
0.5	845.58±13.41 ^{ab}	916.64±7.40 ^b

表5 果葡糖浆对4种测定方法的影响

Table 5 The effect of fructose syrup on four methods

果葡糖浆添加量/%	直接测定法/(mg/g)	硝酸铝比色法/(mg/g)	AlCl_3 比色法/(mg/g)	差示分光光度法/(mg/g)
0	857.77±11.03 ^a	930.15±6.30 ^a	829.24±11.79 ^b	810.70±2.83 ^a
5	865.77±13.58 ^a	904.14±8.67 ^b	834.31±9.51 ^{ab}	786.82±3.48 ^b
10	851.49±10.50 ^a	896.51±9.18 ^b	838.31±11.37 ^{ab}	789.23±2.11 ^b
15	849.44±10.40 ^a	896.51±14.04 ^b	830.22±11.63 ^b	650.04±5.27 ^c
20	861.72±6.53 ^a	898.64±5.60 ^b	854.51±9.88 ^a	600.12±4.45 ^d
25	853.53±13.43 ^a	898.64±7.16 ^b	856.57±7.98 ^a	587.36±5.01 ^d

表6 焦糖色素对4种测定方法的影响

Table 6 The effect of caramel on four methods

焦糖色素添加量/%	直接测定法/(mg/g)	硝酸铝比色法/(mg/g)	AlCl_3 比色法/(mg/g)	差示分光光度法/(mg/g)
0.00	854.28±11.11 ^{bc}	928.35±6.30 ^{ab}	836.95±12.26 ^{bc}	805.38±15.95 ^{ab}
0.01	872.14±3.19 ^a	938.45±8.67 ^{ab}	854.58±8.89 ^a	798.94±4.44 ^{ab}
0.02	852.06±2.05 ^{bc}	944.52±9.18 ^a	872.21±7.71 ^a	779.45±5.03 ^b
0.04	863.48±5.08 ^{ab}	946.53±14.04 ^a	821.54±4.86 ^c	815.99±13.42 ^a
0.06	845.36±4.51 ^b	920.83±5.60 ^b	839.16±7.42 ^b	803.81±29.51 ^{ab}
0.08	854.28±3.04 ^{bc}	946.53±7.16 ^a	841.36±8.49 ^b	779.45±11.04 ^b

表7 复合干扰物质对4种测定方法的影响

Table 7 The effect of complex interferent on four methods

方法	直接测定法/(mg/g)	硝酸铝比色法/(mg/g)	AlCl_3 比色法/(mg/g)	差示分光光度法/(mg/g)
配方一	未加复合干扰物	856.52±6.13 ^a	930.35±17.94 ^a	830.34±16.12 ^b
	加入复合干扰物	771.71±11.11 ^b	835.44±11.13 ^b	865.60±4.52 ^a
配方二	未加复合干扰物	858.75±11.16 ^a	934.42±9.11 ^a	836.34±9.17 ^a
	加入复合干扰物	798.66±3.06 ^b	813.22±12.18 ^b	806.60±10.26 ^b

注:表中不同字母表示差异性显著($p<0.05$);差异性分析为相关指标同一列数据之间的比较;复合干扰物质配方一的比例为10%白砂糖、0.05% β -CD、0.05% CMC-Na、10%果葡糖浆和0.05%焦糖色素;复合干扰物质配方二的比例为:2%白砂糖、0.2% β -CD、0.1% CMC-Na、5%果葡糖浆和0.01%焦糖色素。

2.4.2 加入复合干扰物质

实验选择两种不同的复合干扰物质配比加入样品液中,研究了复合干扰物质对4种测定方法结果的影响,其中配方一固形物含量高,可视为口服液类产品

的基础配方,配方二固形物含量低,可视为饮料类产品的基础配方。由表7可以看出,加入复合干扰物质后,4种方法测定的结果均与未加入复合干扰物质的结果具有显著性差异($p<0.05$)。其中,直接测定法和

$\text{Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaNO}_2\text{-NaOH}$ 比色法的测定结果明显降低, 差示分光光度法的测定结果明显升高, 高固形物含量的情况下, AlCl_3 比色法可使结果升高, 但低含量的情况下可使结果降低。

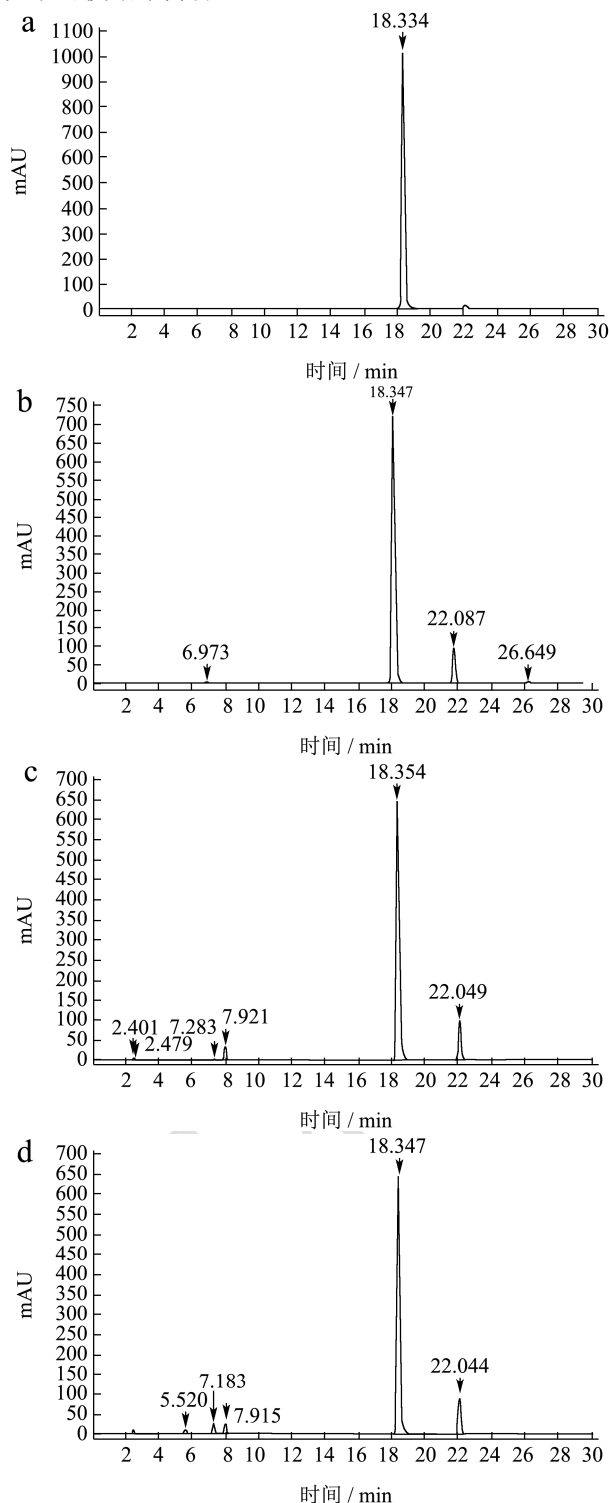


图2 二氢杨梅素标准品与藤茶醇提样品的 HPLC 图

Fig.2 HPLC chromatograms of dihydromyricetin standard and extraction sample of *Ampelopsis grossedentata*

注: a: 二氢杨梅素标准品; b: 藤茶醇提样品; c: 加入配方一的藤茶醇提样品; d: 加入配方二的藤茶醇提样品。

2.5 高效液相色谱法验证

高效液相色谱法以二氢杨梅素为标准对照品, 根据峰面积归一法可知, 样品液中二氢杨梅素的峰面积在总黄酮中所占比例为 89.52%, 然后利用该标准曲线得到的藤茶醇提粉中总黄酮的含量为 732.67 mg/g (二氢杨梅素标准品与藤茶醇提样品的高效液相色谱图见图 2a 与 2b)。与表 1 中样品总黄酮含量数据相比较可知, 4 种测定方法中差示分光光度法所测总黄酮的含量最接近高效液相色谱法的结果。而加入配方一和配方二的藤茶样品液中二氢杨梅素的峰面积在总黄酮中所占比例分别为 83.99% 和 84.23%, 同法得到总黄酮的含量分别为 691.57 mg/g 和 697.71 mg/g (图 2c 与 2d)。与表 7 中加入复合干扰物后样品总黄酮含量数据相比较可知, 直接测定法所测结果与高效液相色谱法的结果最接近。

3 结论

3.1 以二氢杨梅素为对照品, 选用直接测定法、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaNO}_2\text{-NaOH}$ 比色法、 AlCl_3 比色法和差示分光光度法对藤茶中总黄酮含量进行测定, 4 种测定方法相对应的最适吸收波长分别为 292.5 nm、324 nm、312 nm 和 320 nm, 此时样品与标准品的峰形一致, 对称性较好。

3.2 在没有干扰物质的情况下, 四种测定方法在各自的线性范围内, 吸光值与样品浓度均有良好的相关性, 线性回归方程的相关系数 R^2 均大于或等于 0.999。方法学考察结果表明, 直接测定法、 AlCl_3 比色法和差示分光光度法适合藤茶总黄酮含量的测定, 其中差示分光光度法的测定值更接近高效液相色谱法的测定结果。

3.3 在藤茶提取液中, 单独或者复合加入不同浓度的白砂糖、 $\beta\text{-CD}$ 、CMC-Na、果葡糖浆和焦糖色素, 均对 4 种方法的检测结果造成明显的干扰。在复合干扰物存在时, 直接测定法所测总黄酮含量最接近高效液相色谱法的测定结果。

参考文献

- [1] Chen J, Wu Y C, Zou J W, et al. a-Glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* and the flavonoid derivatives [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2016, 24: 1488-1494
- [2] Ye L Y, Wang H J, Duncan S E, et al. Antioxidant activities of vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) extract and its major component dihydromyricetin in soybean oil and cooked

- ground beef [J]. Food Chemistry, 2015, 172: 416-422
- [3] Hou X L, Tong Q, Wang W Q, et al. Suppression of inflammatory responses by dihydromyricetin, a flavonoid from *Ampelopsis grossedentata*, via inhibiting the activation of NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. Journal of Natural Products, 2015, 78(7): 1689-1696
- [4] Ma R Y, Zhou R R, Tong R N, et al. At-line hyphenation of high-speed countercurrent chromatography with sephadex LH-20 column chromatography for bioassay-guided separation of antioxidants from vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) [J]. Journal of Chromatography B, 2017, 1040: 112-117
- [5] Wang L L, Zhou Y F, Wang Y B, et al. Two green approaches for extraction of dihydromyricetin from Chinese vine tea using β -Cyclodextrin-based and ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction methods [J]. Food and Bioproducts Processing, 2019, 116: 1-9
- [6] 张敏,李志英,不同中药总黄酮含量测定方法的选择研究[J]. 海南师范大学学报(自然科学版),2017,30(3):307-310, 343
ZHANG Min, LI Zhi-ying. Research on determination method of flavonoids of different traditional Chinese medicine [J]. Journal of Hainan Normal University (Natural Science), 2017, 30(3): 307-310, 343
- [7] 杨慧海,张雪,孙倩怡,等.3 种规范中总黄酮定量分析法的比较[J].国际药学研究杂志,2017,44(6):656-659
YANG Hui-hai, ZHANG Xue, SUN Qian-yi, et al. Comparison of the quantitative analytical methods of total flavones in three quality inspection regulations [J]. Journal of International Pharmaceutical Research, 2017, 44(6): 656-659
- [8] 包强,刘丽梅,王延玲,等.中药材有效部位总黄酮含量测定方法研究概述[J].中国中医药信息杂志,2018,25(4):136-140
BAO Qiang, LIU Li-mei, WANG Yan-ling, et al. Research overview on content determination methods of total flavonoids in effective parts of Chinese materia medica [J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2018, 25(4): 136-140
- [9] Wang J, Vanga S K, Raghavan V. High-intensity ultrasound processing of kiwifruit juice: Effects on the ascorbic acid, total phenolics, flavonoids and antioxidant capacity [J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 107: 299-307
- [10] 王宁,林小翠,王文君.响应面法优化黄金茶总黄酮提取工艺及对胰蛋白酶活性影响的研究[J].现代食品科技,2018, 34(3):121-130
WANG Ning, LIN Xiao-cui, WANG Wen-jun. Optimization of extraction process of total flavonoids from *Chimonanthus salicifolius* leaves by response surface methodology and its effect on trypsin activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(3): 121-130
- [11] Mansur A R, Song N E, Jang H W, et al. Optimizing the ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of flavonoids in common buckwheat sprouts [J]. Food Chemistry, 2019, 293: 438-445
- [12] Gao Q P, Ma R Y, Chen L, et al. Antioxidant profiling of vine tea (*Ampelopsis grossedentata*): Off-line coupling heart-cutting HSCCC with HPLC-DAD-QTOF-MS/MS [J]. Food Chemistry, 2017, 225: 55-61
- [13] 杨志坚,温杭凯,陈选阳,等.藤茶总黄酮和二氢杨梅素含量研究[J].福建农业科技,2017,10:6-9
YANG Zhi-jian, WEN Hang-kai, CHEN Xuan-yang, et al. Study on the total flavones and dihydromyricetin contents in *Ampelopsis grossedentata* [J]. Fujian Agricultural Science and Technology, 2017, 10: 6-9
- [14] 覃洁萍,梁山丹,何翠薇.差分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
QIN Jie-ping, LANG Shan-dan, HE Cui-wei. Determination of flavonoids in tender stem and leaf of *Ampelopsis grossedentata* by differential spectrophotometry [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2002, 33(7): 607-609
- [15] 陈倩,张雨林,刘赫男,等.藤茶不同部位制茶后功能性成分的含量比较[J].中国现代应用药学,2017,34(11):1542-1545
CHEN Qian, ZHAN Yu-lin, LIU He-nan, et al. Comparison of the content of functional components in different parts of vine tea [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2017, 34(11): 1542-1545
- [16] Fan Li, Tong Qing, Dong Weiwei, et al. Tissue distribution, excretion, and metabolic profile of dihydromyricetin, a flavonoid from vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) after oral administration in rats [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65: 4597-4604
- [17] 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 Hua-ping, FENG Ji-nan, REN Ming-xin, et al. Determination of dihydromyricetin and total flavonoids in *Ampelopsis grossedentata* in different seasons [J]. Chinese Wild Plant Resources, 2017, 36(1): 37-39