

# 鸡足葡萄黄酮类成分的分析

胡松梅<sup>1</sup>, 李思长<sup>2\*</sup>, 禹华芳<sup>1</sup>

<sup>1</sup>湖南娄底职业技术学院, 娄底 417000; <sup>2</sup>湖南九鼎科技有限公司, 岳阳 414000

**摘要:**通过高效液相色谱、紫外双光束检测手段对鸡足葡萄样品中的黄酮类化学成分进行了分析。结果表明其嫩叶、成熟叶中均含有丰富的黄酮类化合物,且分析其主要化学成分为二氢黄酮类。通过对其黄酮类成分的薄层层析鉴别,确定最佳薄层系统为石油醚:乙酸乙酯:甲酸=3:12:1,通过薄层层析比较了湖南邵阳与衡山的样品中黄酮类成份种类,发现湖南邵阳的鸡足葡萄中黄酮类成分种类比后者丰富;运用液相色谱法、紫外双光束分光光度法等初步探明其黄酮类成分为二氢黄酮类,并含有黄酮、黄酮醇(芦丁)类等其它成分,其中产自湖南邵阳的鸡足葡萄的芦丁含量为4.27 mg/g。

**关键词:**鸡足葡萄;黄酮成分;液相色谱法;紫外双光束分光光度法

中图分类号:O629

文献标识码:A

## Analysis of Flavonoid Components of *Vitis lanceolatifolia* C. L

HU Song-mei<sup>1</sup>, LI Si-zhang<sup>2\*</sup>, YU Hua-fang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hunan Loudi Vocational and Technical College, Loudi 417000, China;

<sup>2</sup>Hunan Jiuding Science and Technology Limited Company, Yueyang 414000, China

**Abstract:** In this study the flavonoid components in stems and leaves of *Vitis lanceolatifolia* C. L from Hengshan mountain and Shaoyang of Hunan province were determined and analyzed by HPLC and UV double beam spectrophotometer. The results indicated the main flavonoids in *V. lanceolatifolia* were dihydroflavones. The optimal TLC elution system used for the flavonoids identification was petroleum ether: ethyl acetate: formic acid at 3: 12: 1, and the kinds of flavonoids in Shaoyang samples were richer than that of Hengshan mountain samples. Flavonoids in tested samples were mainly dihydroflavone, flavonol (rutin), flavone, flavonoid glycosides. The content of rutin in samples from Shaoyang was 4.27 mg/g.

**Key words:** *Vitis lanceolatifolia* C. L; flavonoids; HPLC; UV double beam spectrophotometer

鸡足葡萄(*Vitis lanceolatifolia* C. L)为葡萄科葡萄属多年生木质藤本植物<sup>[1]</sup>,民间常当作一种很好的保健品饮用,是最近发现的一种新型甜味剂植物,具有较大的开发利用价值,其黄酮含量的测定国内未见报道。本文通过分光光度法,对不同产地,不同时期叶、茎总黄酮含量进行测定比较,以期得到含量最高的部位,含量最高的产地,为鸡足葡萄将来更好的开发和利用奠定良好的基础。本试验对鸡足葡萄的黄酮类成分进行了初步研究,为进一步进行其黄酮类化学成分的分离、鉴定打下良好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、仪器与试剂

#### 1.1.1 材料与主要仪器

鸡足葡萄采自湖南邵阳和衡山,为春、夏嫩茎叶混合样。鉴定者为湖南农业大学蒋道松教授,凭证样品保存于湖南农业大学。主要仪器为UV-2100双光束紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);LC-20AT液相色谱仪(日本岛津);2537A短波紫外分析仪(上海分析仪器厂);载玻片;玻板;点样毛细管,层析缸,层析用纸。

#### 1.1.2 主要试剂

甲醇(FCP)、盐酸(AR)、氢氧化钠(AR)、镁粉(CP)、锌粉(CP无铅)、硼酸(AR)、薄层层析硅胶G,柱层析聚酰胺(80~100目)等。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 样品处理

取鸡足葡萄干粉500g,75%乙醇浸泡过夜,料

液比 1:10, 80 °C 溶剂回流两次, 每次 4 h, 合并, 减压过滤回流提取液得粗提液 1、2, 将粗提液 1 用石油醚萃取数次直至萃取液石油醚无色为止, 除去脂溶性色素, 将水层挥发除去残留石油醚, 再用乙酸乙酯等体积萃取数次, 至乙酸乙酯层色淡为止, 旋转蒸发, 回流回收乙酸乙酯, 得乙酸乙酯浸膏。

### 1.2.2 乙酸乙酯浸膏的处理

取部分粗提液的乙酸乙酯浸膏用甲醇溶解后加少许聚酰胺拌样, 挥干溶剂, 上聚酰胺柱, 用乙醇梯度依次洗脱, 洗脱开始后, 即按 50 mL/份接收洗脱液, 同时用检测黄酮类物质的特征反应 (HCl-MgCl<sub>2</sub>) 随时检测流出液的情况, 至第 35 馏份时开始呈特征反应, 以上共接受 160 瓶洗脱液。

### 1.2.3 粗提液定性检验

通过紫外分析仪检视反应、盐酸-锌粉反应、与金属离子的络合反应、四氢硼钠反应、Molish 反应等来进行黄酮类别的确认。

### 1.2.4 薄层层析鉴别

#### 1.2.4.1 薄层层析鉴别系统的选择

使用硅胶 G 薄层板 (点样量 0.5 μL), 经过试验, 选定 3 组展开系统, 将粗提液间隔 1 cm 多次点样, 待样点充分干燥后, 将硅胶薄层板直立于盛有展开剂的层析缸中, 浸没薄层板下端 0.3 cm, 上行展开, 至展开剂上行至 7.5 cm 时, 取出聚酰胺薄层板, 用吹风机吹干后于紫外分析仪下检视。

#### 1.2.4.2 不同产地总黄酮的薄层层析鉴别比较

将粗提液 1 (湖南衡山)、粗提液 2 (湖南邵阳) 间隔 1 cm 多次点样 (点样量 0.5 μL), 待样点充分干燥后, 将硅胶薄层板直立于盛有展开剂的层析缸中, 以石油醚: 乙酸乙酯: 甲酸 = 3: 12: 1 为展开剂展开, 浸没硅胶薄层板下端 0.3 cm, 上行展开, 至展开剂上行至 7.5 cm 时, 取出硅胶薄层板, 用吹风机吹干后于紫外分析仪下检视。

#### 1.2.4.3 洗脱液不同馏份的薄层层析鉴别分析

在以上 160 馏份中, 从第 35 份开始, 间隔用 TLC 方法检测 (吸附剂: 硅胶 G<sub>F254</sub>-CMC-Na, 显色剂: 1% AlCl<sub>3</sub>/EtOH, 展开剂见表 1)。

表 1 各薄层层析方法检测所用展开剂

Table 1 Elution solvents for different TLC methods

展开剂 Elution solvents	检测馏份号码 No.
石油醚: 乙酸乙酯: 甲酸 (3: 15: 1)	35 ~ 61

石油醚: 乙酸乙酯: 甲酸 (3: 13: 1)	62 ~ 78
石油醚: 乙酸乙酯: 甲酸 (3: 12: 1)	79 ~ 120
石油醚: 乙酸乙酯: 甲酸 (3: 10: 1)	121 ~ 138
石油醚: 乙酸乙酯: 甲酸 (3: 9: 1)	139 ~ 160

### 1.2.5 紫外光谱扫描

将 1 mg 乙酸乙酯浸膏用甲醇 (FCP) 溶解过滤制得样品液, 又以甲醇 (FCP) 作参比液, 用 UV-2100 双光束紫外可见分光光度计, 在波长 200 ~ 500 nm 范围, 对芦丁、槲皮素、二氢杨梅素标准液和样品液进行紫外光谱扫描。

### 1.2.6 鸡足葡萄总黄酮成份的 HPLC 分析

色谱柱: Agilent Zorbax SB-C18, 流动相: 甲醇: 水 = 60: 40, 体积流量: 0.09 mL/min, 检测波长: 254、290、360 nm。

分别精密称取经五氧化二磷干燥 24 h 的槲皮素、芦丁、二氢杨梅素对照品, 各加甲醇制成 200、100、50 μg/mL 的储备液。以流动相为稀释液配之每 1 mL 分别含 4 μg 槲皮素、4 μg 芦丁、1 μg 二氢杨梅素的混合液, 作为对照品溶液。

### 1.2.7 洗脱液不同馏份的 HPLC 分析

色谱柱: Agilent Zorbax SB-C18, 流动相: 甲醇: 水 = 60: 40, 流速: 0.08 mL/min, 检测波长: 254 nm。

在以上 160 馏份中, 从第 35 份开始, 间隔取 5 mL, 转入 50 mL 容量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.145 μm) 滤过, 取滤液作为供试品溶液。

### 1.2.8 鸡足葡萄的芦丁含量的测定

色谱柱: Agilent Zorbax SB-C18, 流动相: 甲醇: 水 = 60: 40, 体积流量: 1.00 mL/min, 检测波长: 257 nm。

#### 1.2.8.1 芦丁标准曲线的制定

称取 120 °C 减压干燥至恒重的芦丁对照品 14.95 mg, 置 50 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解至刻度。精密吸取上述芦丁对照品溶液 3、6、10、15、20、25 μL (进样量分别为 0.897、1.794、2.990、4.485、5.980、7.475 μg) 进样检测, 测得峰面积以对照品量 (μg) 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标, 计算回归方程。

#### 1.2.8.2 精密度试验

取浓度为 45.07 mg/L 的对照品溶液, 重复进样 5 次, 计算峰面积, 计算 RSD。

#### 1.2.8.3 稳定性试验

在本试验条件下, 供试品溶液室温放置 8 h, 每

隔 2 h 进料 20  $\mu\text{L}$ , 记录峰面积, 计算 RSD。

#### 1.2.8.4 回收率试验

精确称取已知含量的样品 5 份, 加入 1.5 mg 芦丁对照品, 测定芦丁的含量, 计算回收率及 RSD 值。

#### 1.2.8.5 样品中芦丁含量的测定

取产自湖南邵阳的鸡足葡萄叶, 茎混合干份 5 份, 每份 1 g, 75% 乙醇浸泡过夜, 料液比 1:10, 80  $^{\circ}\text{C}$  溶剂回流两次, 每次 4 h, 合并, 减压过滤回流提取液得粗提液, 移入 100 mL 的容量瓶中, 甲醇定容, 得供

表 2 黄酮类物质的定性检验结果

Table 2 Qualitative analysis results of flavonoid component

检验方法 Methods	试剂 Reagents	现象 Phenomenon	结论 Conclusions
紫外分析仪检视	氨熏蒸层析滤纸盐酸 + 锌粉	明显的黄绿色荧光斑点淡粉红色泡沫反应	表明有明显的黄酮类化合物
还原反应			黄酮类、二氢黄酮及 $\text{C}_3\text{-OH}$ 糖苷类
与金属离子的络合反应	1% 三氯化铝乙醇液、1% 醋酸镁甲醇液 + 1% 醋酸铅水液	呈黄绿色, 出现绿黄色荧光	示黄酮类和黄酮醇类
四氢硼钠反应	浓盐酸或浓硫酸 2% $\text{NaBH}_4$	紫-紫红色	含二氢黄酮类
Molish 反应	1% $\alpha$ -萘酚, 浓硫酸	液面交界有紫环	示黄酮苷类物质
	1:1 硼酸 + 柠檬酸	溶液出现绿黄色	$\text{C}_5\text{-OH}$ 黄酮类
其它显色反应	20% 氢氧化钠	溶液呈棕黄色	黄酮醇量大于黄酮
	浓盐酸	无	表明不含花青素
	20% 三氯化铁醇液	呈深棕色反应	示 $\text{C}_5\text{-OH}$ 黄酮类

## 2.2 薄层鉴别

### 2.2.1 薄层层析鉴别系统的选择

经过初步试验, 选定 3 组展开系统, 分别是石油醚: 乙酸乙酯: 甲酸 = 3:12:1; 石油醚: 乙酸乙酯: 甲酸 = 3:18:1; 乙酸乙酯: 丙酮: 甲酸: 水 = 8:3:1:1。3 个系统均有 3 个荧光斑点, 但斑点 1 较大, 拖尾较严重, 可能是多种物质混合所致, 对 3 个系统的样品的每个荧光斑点。展开系统石油醚: 乙酸乙酯: 甲酸 = 3:12:1 的分离度较其它两个系统大, 分离效果好, 且稳定, 因此更加适合该物种黄酮类物质的薄层鉴别分离。

### 2.2.2 不同产地总黄酮的薄层层析鉴别比较

将粗提液 1 (湖南衡山), 粗提液 2 (湖南邵阳) 分别在展开系统石油醚: 乙酸乙酯: 甲酸 = 3:12:1 中进行分离, 上行展开, 取出硅胶薄层板, 用吹风机吹干后于紫外分析仪下检视, 结果显示, 粗提液 2 的斑点数目比粗提液 1 的斑点数目要高, 且分离效果比粗提液 1 要好, 说明粗提液 1 中的黄酮类化学物质的种类数较粗提液 2 中丰富, 同时表明采自湖南邵阳的鸡足葡萄的黄酮类化学成分的种类较丰富, 有

进一步开发的潜力。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄酮类化合物定性检验结果

粗提液 1、2 的定性检验结果见表 2。由表 2 可以看出, 该植物粗提液中含  $\text{C}_5\text{-OH}$  黄酮类、黄酮醇类、二氢黄酮类、黄酮苷类等, 但浓盐酸反应溶液并没有明显的粉红色生成, 表明其不含花青素或含量很少。

### 2.2 紫外光谱扫描

将乙酸乙酯萃取液用甲醇 (FCP) 溶解过滤制得样品液, 又以甲醇 (FCP) 作参比液, 用 UV-2100 双光束紫外可见分光光度计, 在波长 200 ~ 400 nm 范围, 对芦丁、槲皮素、二氢杨梅素标准液和乙酸乙酯提取液进行紫外光谱扫描。见图 1。

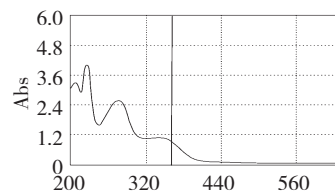


图 1 鸡足葡萄乙酸乙酯提取液的紫外吸收光谱

Fig. 1 UV spectrum of ethyl acetate extract of *V. lanceolata-fofoliosa*

由图1可以看出,鸡足葡萄乙酸乙酯提取液在226、290、350 nm处有特征吸收峰,峰值分别为3.9829、2.5604、1.0994,在350 nm处的吸收峰较弱,而226 nm处可能是溶剂所形成的峰,符合双氢黄酮类的紫外光谱特征,由此推断该提取液黄酮类成分的主要物质为双氢黄酮类。

## 2.4 鸡足葡萄总黄酮成分的HPLC分析

经初步分析,将甲醇溶解后的乙酸乙酯萃取液在254 nm波长下进行检测,结果见图2、3。

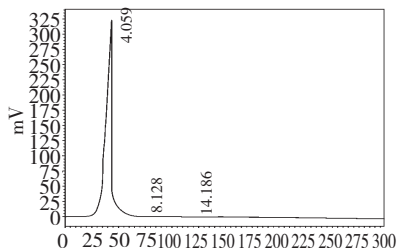


图2 芦丁标准液的HPLC色谱图(254 nm)

Fig. 2 HPLC chromatogram of rutin standard

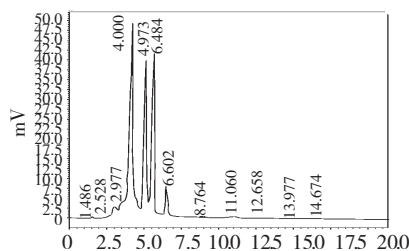


图3 乙酸乙酯提取液的HPLC色谱图(254 nm)

Fig. 3 HPLC chromatogram of ethyl acetate extract of *V. lanceolatifoliosa*

结合图2可以看出,芦丁标准液和乙酸乙酯提取液的出峰时间一致由此可以推断该峰为芦丁,该鸡足葡萄中有芦丁存在,而其它峰的出峰时间与槲皮素,二氢杨梅素标准品的出峰时间并不一致,可判定该物种中并不存在上述两种物质。

## 2.5 洗脱液不同馏份的HPLC分析

色谱柱:Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>,流动相:甲醇:水=60:40,体积流量:0.09 mL/min,检测波长:254 nm。浓缩液2、3、4的HPLC色谱结果见图4。

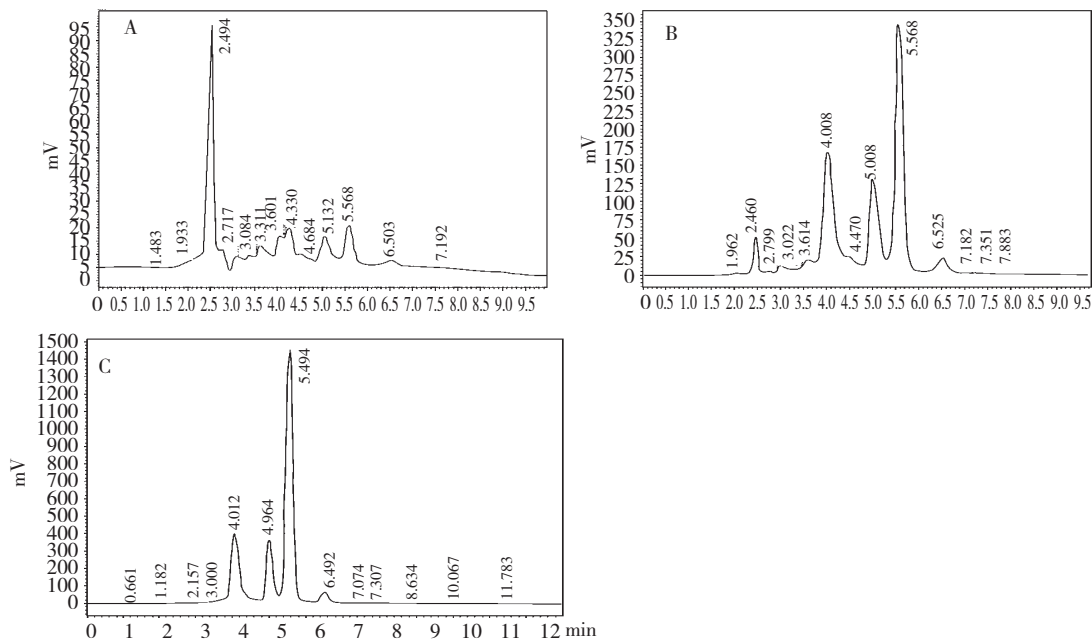


图4 浓缩液2(A)、3(B)及4(C)的HPLC色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of extract 2(A), 3(B) and 4(C)

从上图可知,芦丁主要存在于浓缩液3、4中,在浓缩液3、4中的主峰之一(出峰时间5.568 min, 5.495 min)的物质是该物种黄酮类的主要物质,综合乙酸乙酯萃取液的紫外光谱扫描研究,进而确定该物质为二氢黄酮类,但该物质和其它主峰物质的详细结构仍然需要通过制备液相色谱、核磁共振等

手段进行进一步的研究。

## 2.6 鸡足葡萄的芦丁含量的测定

### 2.6.1 芦丁对照品的全波段扫描

根据扫描结果和扫描数据发现芦丁对照品在218、257、358 nm处有吸收峰,其中257 nm、358 nm处为黄酮类的特征峰,218 nm处可能是溶剂所形成

的峰,且最大吸收峰出现在 257 nm 处,故选择 257 nm 做为测定波长。

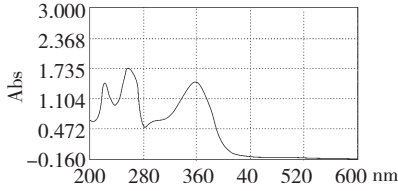


图5 芦丁(0.06 mg/mL)对照品 UV 扫描图

Fig. 5 UV spectrum of rutin standard(0.06 mg/mL)

### 2.6.2 芦丁标准曲线的制作

按前述方法,测定芦丁的吸收峰面积分别为

32. 291、50. 342、71. 991、100. 170、127. 121、152. 512,计算得到回归方程,表明芦丁含量在 0.897 ~ 7.475  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内与吸光度线性关系良好。

### 2.6.3 精密度试验

5 次的峰值面积分别为 33. 717、33. 661、33. 351、33. 153、33. 258,计算  $\text{RSD} = 0.73\%$  ( $n = 5$ )。

### 2.6.4 稳定性试验

在本次试验条件下,测得 5 次的供试品溶液的峰面积为 33. 221、33. 214、32. 730、32. 215、32. 126,计算  $\text{RSD} = 1.53\%$ 。

### 2.6.5 回收率试验

回收率结果见表 3。

表 3 回收率试验结果

Table 3 Test result of recovery rate

材料重量 Weight(g)	芦丁含量 Original amount(mg)	加入芦丁量 Added amount(mg)	测得量 Detected amount(mg)	回收率 Recovery rate(%)	平均回收率 Average recovery rate(%)	RSD, %
0. 3201	1. 45	1. 5	2. 91	98. 6		
0. 3302	1. 46	1. 5	2. 81	94. 6		
0. 3258	1. 45	1. 5	2. 89	98	96. 9	1. 63
0. 3652	1. 65	1. 5	3. 06	97. 1		
0. 3519	1. 59	1. 5	2. 97	96. 1		

### 2.6.6 样品中芦丁含量的测定

计算得该样品中的芦丁含量为 4. 27 mg/g,  $\text{RSD} = 1.2\%$ ,表明该方法重复性良好。

## 3 讨论

黄酮类化合物是一类在植物界中分布广泛、具有多种生物活性的多酚类化合物。如白果双黄酮和葛根总黄酮等,对心血管疾病有治疗作用;木犀草素、轻基芫花素和杜鹃素等能治疗气管炎;竹叶黄酮具有优良的抗自由基、抗氧化、抗衰老、降血脂、免疫调节、抗菌等生物学功效,在人类的营养、健康和疾病防治上有着广阔的应用前景<sup>[2-4]</sup>。

鸡足葡萄含有的黄酮类化合物是多样的,并多以苷的形式存在,通过定性检验、薄层色谱分析、紫外光谱扫描、液相色谱和物理性质检测。结果证实,鸡足葡萄所含黄酮类化合物的成分主要为黄酮、黄酮醇类(芦丁)、二氢黄酮类等,而二氢黄酮类的含

量较其它成分要高,初步确定黄酮类甜味成分为二氢黄酮类,并测得芦丁含量为 4. 27 mg/g。

### 参考文献

- 1 Flora of China Editorial Committee(中国植物志编委会). Flora of China(中国植物志). Beijing: Science Publishing House, 1959.
- 2 Middleton JR. Biological properties of plant flavonoid: a overview. *Int J Phannaecognos*, 1996, (34): 344-348.
- 3 HAVESTEEN B. Flavonoids, a class of natural products of high phannaecological poteny. *Biochemical Phanneology*, 1983, 32: 1141-1148.
- 4 Zhang Y(张英), Wu XQ(吴晓琴), Yu ZY(俞卓裕). Comparison study on total flavonoid content and anti-free radical activity of the leaves of Bamboo, phyllostachys nigra, and Ginkgo bilabo. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2002, 27: 254-257.