

## 浙江引种显齿蛇葡萄二氢杨梅素提取工艺优化及含量分析

黄旭波, 秦玉川, 刘本同, 王丽玲, 童晓青, 方茹, 王衍彬

(浙江省林业科学研究院, 浙江 杭州 310023)

**摘要:** 显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* 叶片中富含二氢杨梅素, 其嫩叶可加工成藤茶。本研究建立了显齿蛇葡萄叶中二氢杨梅素的 HPLC 检测方法, 并对浙江引种的 3 个种源 4 个种质 (广西种源、贵州种源、湖北种源、湖北大叶种源) 显齿蛇葡萄老叶和嫩叶中二氢杨梅素的含量进行对比分析。结果表明, 显齿蛇葡萄叶片中二氢杨梅素的最佳萃取条件为: 液料比 20:1, 萃取溶剂 75%乙醇, 萃取温度 40 °C, 频率 20 kHz、功率 500 W 超声萃取 3 次, 每次 25 min, 在此条件下二氢杨梅素的提取得率可以达到 16.21%; 二氢杨梅素 HPLC 检测方法的标样拟合方程为  $y = 218.74x$ ,  $R^2 = 0.9997$ , 平均加标回收率为 98.88%, 能较好地满足研究的需求; 3 个种源普通显齿蛇葡萄, 湖北种源叶片 (嫩叶) 中二氢杨梅素含量最高, 达 291.87 mg g<sup>-1</sup>, 但 3 个种源间并无显著性差异; 湖北大叶种源叶片 (嫩叶) 中二氢杨梅素含量最低, 并与其它 3 个种源均存在极显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 显齿蛇葡萄嫩叶与老叶中的二氢杨梅素含量差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 其中贵州种源 2 种叶片中的二氢杨梅素差异最大, 嫩叶中二氢杨梅素的含量是老叶中含量的 2.07 倍, 其次是广西种源、湖北大叶种源和湖北种源。在实际生产中, 建议以嫩叶采摘加工为主。

**关键词:** 藤茶; 显齿蛇葡萄; 引种; 二氢杨梅素; 工艺优化; 含量分析

中图分类号: S571.9 文献标识码: A 文章编号: 1001-3776 (2023) 01-0023-07

### Optimized Extraction and Determination of Dihydromyricetin Content from Local and Introduced *Ampelopsis grossedentata* to Zhejiang Province

HUANG Xu-bo, QIN Yu-chuan, LIU Ben-tong, WANG Li-lin, TONG Xiao-qing, FANG Ru, WANG Yan-bin

(Zhejiang Academy of Forestry, Hangzhou 310023, China)

**Abstract:** In March 2015, leaves of *Ampelopsis grossedentata* were collected in Guangxin, Guizhou and Hubei, and *A. grossedentata* a HPLC method was established for the determination of dihydromyricetin in the leaves of *Ampelopsis grossedentata*, and the contents in the old and young leaves from 4 germplasm (Guangxi, Guizhou, Hubei and Hubei large leaf provenances) introduced in Zhejiang were analyzed. The results showed the optimal extraction conditions of dihydromyricetin from the leaves of *Ampelopsis grossedentata* were as follows: liquid-solid ratio 20:1, extraction solvent 75% ethanol, extraction temperature 40 °C, extraction three times under 500 W ultrasonic power and 20 kHz frequency, 25 min each time, and under these conditions, the extraction rate of dihydromyricetin could reach 16.21%. The fitting equation of the standard sample of the HPLC method for dihydromyricetin was  $y = 218.74x$ ,  $R^2 = 0.9997$ , and the average recovery was 98.88%, which could well meet the needs of the study. The dihydromyricetin content in young leaves from Hubei provenance was the highest, up to 291.87 mg g<sup>-1</sup>, but there was no significant difference among the three provenances. The content of dihydromyricetin in young leaves from large leaf provenances was the lowest, which was significantly different from the other three provenances ( $P < 0.01$ ). The difference of dihydromyricetin content between young leaves and old leaves was very significant ( $P < 0.01$ ).

收稿日期: 2022-08-16; 修回日期: 2022-11-26

基金项目: 浙江省林业科技计划 (2019B07), 浙江省科技计划 (2015F50052)

作者简介: 黄旭波, 工程师, 从事森林培育与推广工作; E-mail:42243901@QQ.com。王衍彬, 副研究员, 从事木本油料加工与天然产物化学研究; E-mail: numbsword@126.com。

<0.01), and the difference was the largest in Guizhou provenances. The content of dihydromyricetin content in young leaves was 2.07 times that of old leaves. Therefore, it was suggested to pick and process young leaves in actual tea production.

**Key words:** Vine tea; *Ampelopsis grossedentata*; Introduction; Dihydromyricetin; Process optimization; Content analysis

藤茶, 又被称为莓茶、叶茅茶、雪茶、山甜茶等, 是由葡萄科 Vitaceae 蛇葡萄属 *Ampelopsis* 植物显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* 的嫩叶加工而成的茶饮。显齿蛇葡萄主要分布于我国的广西、贵州、湖南等省<sup>[1]</sup>, 在瑶族、壮族、土家族等少数民族地区有着广泛的食用和药用历史<sup>[2]</sup>, 其味甘性凉, 具有清热解毒, 祛风湿, 强筋骨等功效, 常被用于治疗感冒发烧以及咽喉肿痛等症状<sup>[3-4]</sup>。显齿蛇葡萄叶富含黄酮、多酚、多糖、维生素等成分, 其中以黄酮类, 特别是二氢杨梅素 (Dihydromyricetin) 含量最高, 其提取物具有抗氧化、增强免疫、抗炎抑菌、降三高、护肝和抗肿瘤等功效<sup>[5-9]</sup>。二氢杨梅素是一种双氢黄酮醇类化合物, 又被称为双氢杨梅素、双氢杨梅皮素等, 广泛存在于葡萄科植物中, 在杨梅科 Myricaceae、杜鹃花科 Ericaceae、橄榄科 Burseraceae、豆科 Fabaceae 等植物中也有发现。二氢杨梅素在显齿蛇葡萄叶片中的含量非常高, 可以达到干质量的 20% 以上<sup>[10]</sup>。研究表明, 二氢杨梅素具有抗氧化、抗肿瘤、降血压、降血糖和抑制血栓形成等功效<sup>[11-12]</sup>。

近年来, 随着《浙江省林下经济“十四五”发展规划纲要(2021—2025)》<sup>[13]</sup>的推进, 藤茶被引种到浙江省木本粮油(油茶 *Camellia oleifera*、香榧 *Torreya grandis* ‘Merrillii’等)经济林下作为林下经济资源进行种植。随着浙江省木本粮油基地建设的不断兴起, 藤茶的种植面积不断增加, 不仅解决了山地林下土壤裸露、水土流失和林地水分蒸发的问题, 而且有助于林农增收和经济林产业的可持续发展。但是鉴于浙江省境内尚未发现有显齿蛇葡萄的野生分布, 而藤茶评价研究多以异地或本地收集样品为研究对象, 未发现异地野生资源本地栽种评价的相关研究。

自 2015 年起, 我们将广西、湖北和贵州三地的野生显齿蛇葡萄引种至浙江进行栽培试验, 并以藤茶中重要的特征性成分二氢杨梅素含量为指标对资源进行评价, 避免了先评价产品后引进资源最终不适宜本地推广栽种的弊端, 为藤茶的引种、栽培与产品开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验原料

研究材料为广西、贵州、湖北的野生显齿蛇葡萄叶片, 以及这 3 种野生显齿蛇葡萄引种浙江后第 5 年的实生叶片(2015 年 3 月在广西、贵州、湖北三地进行采样的同时, 从 3 地引种采样的 4 个种质实生种源, 引种在浙江省杭州市午潮山林场), 样品与采样地点情况见表 1。除采自湖北省恩施市来凤县三湖乡的大叶(长 6~9 cm, 宽 4~5 cm)样品外, 其余均为小叶(长 3~5 cm, 宽 2~3 cm)样品。

表 1 采样地点与时间  
Tab. 1 Sampling location and time

序号	样品	采样地点	采样时间/(年.月.日)
1	野生显齿蛇葡萄嫩叶(广西)	广西壮族自治区柳州市融安县长安镇	2015.03.26
2	野生显齿蛇葡萄嫩叶(贵州)	贵州省铜仁市江口县太平土家族苗族乡	2015.03.25
3	野生显齿蛇葡萄嫩叶(湖北)	湖北省恩施市来凤县三湖乡	2015.03.30
4	野生显齿蛇葡萄嫩叶(湖北大叶)	湖北省恩施市来凤县三湖乡(大叶)	2015.03.30
5	引种显齿蛇葡萄嫩叶(广西种源)	浙江省杭州市午潮山林场	2020.03.28
6	引种显齿蛇葡萄嫩叶(贵州种源)	浙江省杭州市午潮山林场	2020.03.28
7	引种显齿蛇葡萄嫩叶(湖北种源)	浙江省杭州市午潮山林场	2020.03.28
8	引种显齿蛇葡萄嫩叶(湖北大叶种源)	浙江省杭州市午潮山林场	2020.03.28
9	引种显齿蛇葡萄老叶(广西种源)	浙江省杭州市午潮山林场	2020.10.10
10	引种显齿蛇葡萄老叶(广西种源)	浙江省杭州市午潮山林场	2020.10.10
11	引种显齿蛇葡萄老叶(广西种源)	浙江省杭州市午潮山林场	2020.10.10
12	引种显齿蛇葡萄老叶(湖北大叶种源)	浙江省杭州市午潮山林场	2020.10.10

## 1.2 设备与试剂

GZX-9140MBE 鼓风干燥箱, 上海博迅实业有限公司; DFT-150 粉碎机, 温州顶历医疗器械有限公司; SY-1000E 恒温超声提取器, 北京弘祥隆生物技术股份有限公司; RE-5205 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; AL204-IC 电子天平, 梅特勒托利多集团; U3000 高效液相色谱仪, 赛默飞世尔科技有限公司; 明澈-D 高纯水机, 默克有限公司。

二氢杨梅素标样, 纯度 98%, 购自北京世纪奥科生物技术有限公司。甲醇、乙醇、丙酮均为分析纯; 磷酸、甲醇、乙醇、乙腈均为色谱纯。

## 1.3 样品采集与处理

嫩叶指春季采摘叶龄 15 d 左右的显齿蛇葡萄叶片; 老叶指春季发芽, 秋季采摘的显齿蛇葡萄叶片。

2015 年 3 月, 采摘广西、贵州、湖北三地野生显齿蛇葡萄嫩叶, 在采样地晾干, 然后于实验室烘箱中 35℃ 烘干。2020 年 3 月和 10 月分两次采摘引种栽培的 3 个种源 4 个种质显齿蛇葡萄嫩叶和老叶, 与野生样品同样处理。干燥后的样品于粉碎机中粉碎至 60 目, 备用。

## 1.4 二氢杨梅素提取方法

根据二氢杨梅素的特性和陈玉琼的研究结果<sup>[14]</sup>, 采用水和乙醇的混合溶液作为提取溶剂, 并分别考察了提取温度、水醇比例和超声时间对显齿蛇葡萄叶中二氢杨梅素提取率的影响, 根据预试验结果, 选择 75% (体积分数) 乙醇水溶液和 40℃ 作为超声提取的萃取溶剂和萃取温度条件。

精确称取粉碎好的显齿蛇葡萄叶样品 1.000 0 g, 加入 20 mL 75% 乙醇水溶液, 20 kHz 频率, 500 W 功率超声萃取 25 min, 过滤, 滤渣重复提取 3 次, 收集滤液, 于旋转蒸发器中浓缩, 再用乙醇定容至 100 mL 容量瓶中, 0.22 μm 膜过滤, 进行 HPLC 分析。

## 1.5 色谱分析方法

1.5.1 色谱条件 Agilent Extend-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 35℃, 紫外波长 292 nm, 流动相比例 A (甲醇) : B (0.1% 磷酸水溶液) = 25 : 75 (体积比), 进样量 10 μL, 流速 1.0 mL min<sup>-1</sup>, 等度洗脱。

1.5.2 标准曲线绘制 精确称取二氢杨梅素 100.0 mg, 用色谱纯乙醇溶解, 定容至 25 mL 容量瓶中, 配制成浓度 4.0 mg mL<sup>-1</sup> 标准溶液, 并以此为母液, 用乙醇梯度稀释配制成 0.2 mg mL<sup>-1</sup>、0.4 mg mL<sup>-1</sup>、0.8 mg mL<sup>-1</sup>、1.6 mg mL<sup>-1</sup>、3.2 mg mL<sup>-1</sup> 和 4.0 mg mL<sup>-1</sup> 浓度的标准溶液, 0.22 μm 膜过滤, 进行 HPLC 分析。以进样的质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程。

1.5.3 精密度试验 取 0.8 mg mL<sup>-1</sup> 标准样品溶液, 按照 1.5.1 方法进行进样分析 6 次, 根据二氢杨梅素的吸收峰面积计算精密度。

1.5.4 稳定性试验 取显齿蛇葡萄叶萃取液样品 1 份, 分别在 0、4、8、16、24、48 h 时进行分析, 测定二氢杨梅素含量, 以峰面积计算稳定性。

1.5.5 重复性试验 称取同一样品 6 份, 按照 1.4 方法制备样品, 按 1.5.1 方法进行液相色谱分析, 进行重复性试验, 按照峰面积计算重复性。

1.5.6 回收率试验 取已测定的样品 6 份, 按照样品中二氢杨梅素含量的 0.8 倍、1.0 倍和 1.2 倍加入对照品, 按照 1.4 方法制备样品, 按照 1.5.1 方法进行液相色谱分析, 根据公式 (1) 计算加标回收率。

$$P = (m_2 - m_1) / m \times 100\% \quad (1)$$

式中,  $P$  为加标回收率;  $m_1$  为试样中的二氢杨梅素含量, 单位 mg;  $m_2$  为加标试样中的二氢杨梅素含量, 单位 mg;  $m$  为加标量, 单位 mg。

1.5.7 二氢杨梅素含量计算 获得样品中二氢杨梅素 HPLC 检测峰面积, 根据 1.5.2 中获得的二氢杨梅素标准样品浓度与峰面积回归方程, 获得样品浓度, 根据下式 (2) 计算样品中的二氢杨梅素含量。

$$C = (\omega \times v) \div m \quad (2)$$

式中,  $C$  为样品中的二氢杨梅素含量, 单位 mg g<sup>-1</sup>;  $\omega$  为测试样品中的二氢杨梅素浓度, 单位 mg mL<sup>-1</sup>;  $v$  为测

试样品定容体积, 单位 mL;  $m$  为样品质量, 单位 g。

## 1.6 数据处理

数据整理、平均数、标准差等计算采用 WPS 2019, 显著性分析和制图采用 Origin 2019。

## 2 结果与分析

### 2.1 方法学结果

图 1 为液相色谱测定二氢杨梅素的标准曲线, 其拟合方程为:  $y = 218.74x$ ,  $R^2 = 0.9997$ , 表明在  $0.20 \sim 4.0$   $\text{mg mL}^{-1}$  浓度范围内线性关系良好。图 2 为二氢杨梅素标样和显齿蛇葡萄叶萃取样品的 HPLC 色谱图。根据 1.5.3 ~ 1.5.5 方法进行精密度的、稳定性和重复性试验, 仪器分析精密度  $RSD = 0.17\%$ , 重复性试验  $RSD = 0.83\%$ , 稳定性试验  $RSD = 1.15\%$ , 表明本仪器分析方法的精度可以满足试验的要求, 且供试样品溶液在 48 h 内是稳定的。

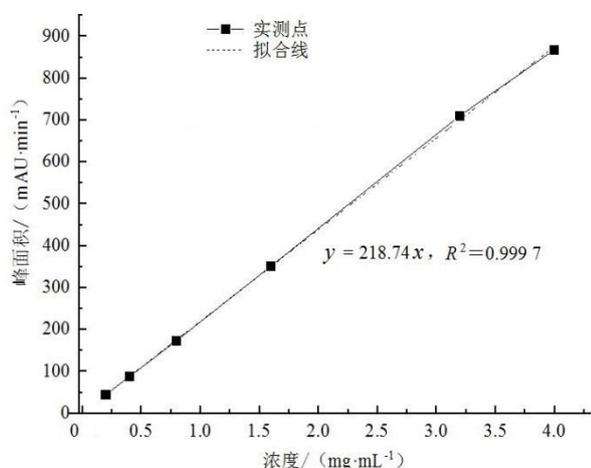


图 1 HPLC 测定二氢杨梅素标准曲线

Fig. 1 Standard curve of Dihydropyricetin by HPLC

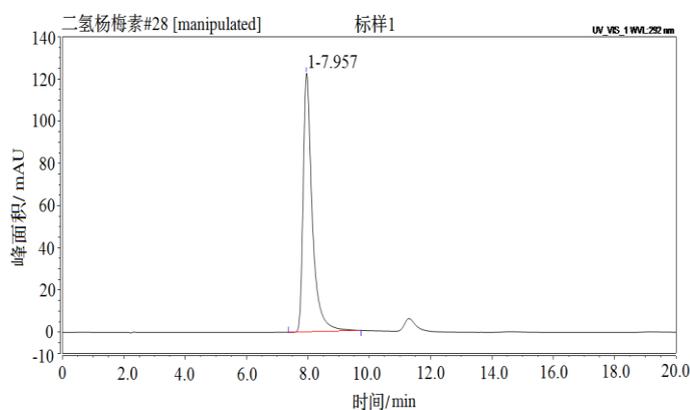


图 2 二氢杨梅素标样 (上) 和藤茶样品 (下) HPLC 检测图

Fig. 2 Standard Dihydropyricetin curve (top) and that of samples by HPLC (bottom)

表 2 为本方法加样回收率试验结果。从表中可以看出, 加样回收率为  $97.71\% \sim 101.34\%$ , 平均加样回收率为  $98.88\%$ ,  $RSD = 1.42\%$ 。由方法学结果表明, 本研究建立的提取与分析方法可以满足显齿蛇葡萄叶中二氢杨梅素定量分析的要求。

表 2 加样回收率试验结果  
Tab. 2 The results of standard recovery rate

样品	二氢杨梅素/mg			回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
	样品中的质量	加入的质量	回收的质量			
1	8.2	6.56	14.65	98.32	98.88	1.42
2	8.2	6.56	14.61	97.71		
3	8.2	8.20	16.22	97.80		
4	8.2	8.20	16.51	101.34		
5	8.2	9.84	17.88	98.37		
6	8.2	9.84	18.01	99.70		

### 2.2 萃取方法的研究结果

2.2.1 乙醇浓度对二氢杨梅素萃取得率的影响 二氢杨梅素, 分子式为  $C_{15}H_{12}O_8$ , 相对分子质量为 320.25, 其化学结构式如图 3, 微溶于冷水和乙酸乙酯, 易溶于甲醇、乙醇和丙酮, 不溶于氯仿和石油醚。根据二氢杨梅

素的溶解特性, 摒弃毒性较大的甲醇和丙酮, 分别用不同浓度的水醇混合溶液作为提取溶剂, 考察其提取得率。

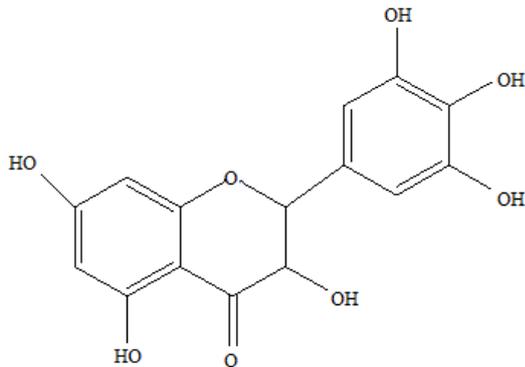


图 3 二氢杨梅素化学结构式

Fig. 3 Structural formula of Dihydromyricetin

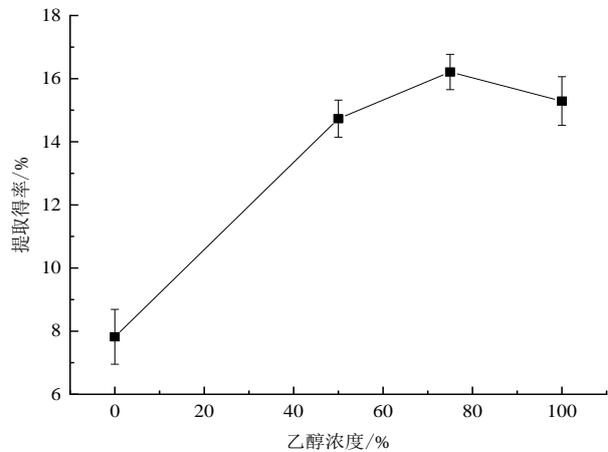


图 4 乙醇浓度对二氢杨梅素萃取得率的影响( $n=3$ )

Fig. 4 Effect of ethanol concentration on extraction yield of Dihydromyricetin ( $n=3$ )

图 4 为不同乙醇浓度萃取显齿蛇葡萄叶中二氢杨梅素的结果图。其萃取条件为: 温度  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 液料比  $20:1$ , 萃取时间  $25\text{ min}$ , 振荡浸提。从图中可以看出, 二氢杨梅素提取率先随乙醇浓度的增加而增加, 达最高点 after 降低, 萃取效果最优的比例是水: 乙醇 =  $25:75$ , 在此条件下二氢杨梅素的提取得率可以达到  $16.21\%$ 。

2.2.2 萃取温度和超声次数对二氢杨梅素得率的影响 采用液料比  $20:1$ , 萃取溶剂水: 乙醇 =  $25:75$ , 以  $25\text{ min}$  为一个萃取时间段, 超声条件为: 频率  $20\text{ kHz}$ ,

功率  $500\text{ W}$ , 考察不同温度和超声次数对显齿蛇葡萄叶中二氢杨梅素萃取得率的影响。从图 5 可看出, 在不施加超声的情况下, 温度对提取得率的影响较大, 提取得率随着温度的上升而提高, 在  $70\sim 80\text{ }^{\circ}\text{C}$  时达到最大, 达  $19.42\%$ 。但有研究表明<sup>[16]</sup>, 提取温度超过  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  以后, 二氢杨梅素的萃取得率反而降低, 这可能是因为热敏感性的二氢杨梅素受高温破坏而造成的。超声波辅助萃取显齿蛇葡萄叶中二氢杨梅素效果好于普通萃取,  $3$  次超声萃取效果好于  $1$  次超声萃取, 在  $1$  次超声萃取时, 随着温度的升高, 萃取得率也随之提高, 而在  $3$  次超声萃取时, 温度升高对萃取得率的影响较小, 说明  $3$  次萃取已经基本上可以将显齿蛇葡萄叶中的二氢杨梅素萃取干净, 其最高萃取得率达  $30.66\%$ 。因考虑到温度可能会对二氢杨梅素的稳定性造成影响, 所以本试验选择最适的萃取条件为: 液料比  $20:1$ , 萃取溶剂水: 乙醇 =  $25:75$ , 萃取温度  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 频率  $20\text{ kHz}$ 、功率  $500\text{ W}$  条件下超声萃取  $3$  次, 每次  $25\text{ min}$ 。

### 2.3 引种显齿蛇葡萄叶中二氢杨梅素含量比较

图 6 为广西、贵州、湖北 3 个地区 4 种显齿蛇葡萄叶野生嫩叶样品及浙江引种栽培 5 年后的实生显齿蛇葡萄嫩叶样品中二氢杨梅素的含量比较。从图中可以看出, 3 个地区的普通野生显齿蛇葡萄叶样品及引种至浙江的样品中, 二氢杨梅素含量都比较高, 均超过  $200\text{ mg g}^{-1}$ , 其中二氢杨梅素含量最高的是采自湖北省恩施市来凤

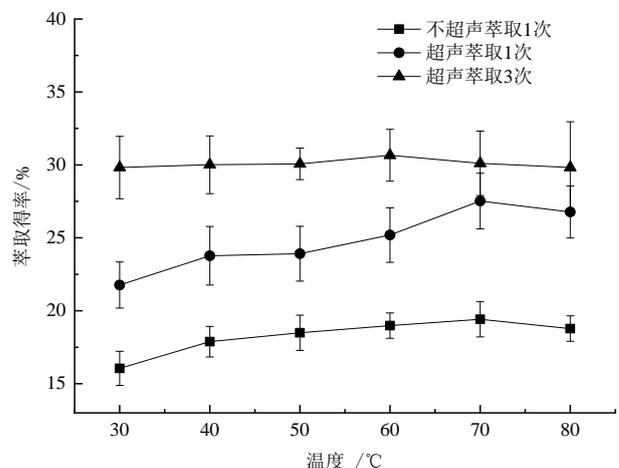


图 5 温度和超声萃取次数对显齿蛇葡萄叶中二氢杨梅素萃取得率的影响 ( $n=3$ )

Fig. 5 Effect of temperature and ultrasonic times on extraction yield of dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata* leaves ( $n=3$ )

县三胡乡的引种样品,含量高达  $291.87 \text{ mg g}^{-1}$ 。来自湖北的大叶显齿蛇葡萄,叶片大,产量高,但叶片中的二氢杨梅素含量最低,野生样品与栽培样品中的含量均未超过  $70 \text{ mg g}^{-1}$ 。

从图 6 中可以得出,引种的 4 个种质显齿蛇葡萄嫩叶样品中,栽培样品与野生样品中的二氢杨梅素含量相近。其中,从广西、贵州两地引种的样品中,野生样品二氢杨梅素含量略高于与引种栽培样品,从湖北恩施引种的普通样品与大叶样品中,野生样品中的二氢杨梅素含量略低于引种栽培样品,但均无显著性差异 ( $P > 0.1$ )。

3 个种源的小叶样品中,湖北样品的二氢杨梅素含量最高,其次为贵州样品和广西样品,但湖北样品与贵州样品、贵州样品与广西样品的二氢杨梅素含量,并无显著性差异 ( $P > 0.1$ ),湖北种源的栽培样品与广西种源的栽培样品二氢杨梅素含量存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。从图中 6 可以明显看出,采自湖北的大叶样品,其二氢杨梅素含量远低于其它 3 个小叶种源样品,并存在极显著性差异 ( $P < 0.01$ ),引种至浙江栽培的湖北大叶样品,亦存在同样规律。

#### 2.4 显齿蛇葡萄叶中二氢杨梅素含量的比较

图 7 为 3 个种源 4 份种质的显齿蛇葡萄老叶与嫩叶中二氢杨梅素含量比较图。从图中可以明显看出,显齿蛇葡萄老叶和嫩叶中的二氢杨梅素含量存在极显著差异,嫩叶中的二氢杨梅素含量均高于老叶,且差异极显著 ( $P < 0.01$ ),其中贵州引种样品老叶与嫩叶中的含量差异最大,嫩叶中的二氢杨梅素含量是老叶的 2.07 倍,其次是广西种源、湖北大叶种源和湖北种源,嫩叶中的二氢杨梅素含量分别为老叶的 1.58 倍、1.53 倍和 1.25 倍。陈玉琼<sup>[15]</sup>研究也表明,显齿蛇葡萄在生长过程中,随着叶片的老化,其二氢杨梅素的含量随之降低。上述研究表明,显齿蛇葡萄在叶片采摘加工成藤茶时,应该尽量采摘嫩叶,以保证产品中二氢杨梅素的含量。

### 3 讨论与结论

天然植物应用于人类的保健与医疗已有几千年的历史,植物体内存在的天然活性成分,包括黄酮、多酚、多糖、生物碱等,具有多种生理功能<sup>[16-17]</sup>,是天然植物体在生长过程中所产生的次生代谢产物,也是中药学发展的物质基础<sup>[18]</sup>,是现代保健食品和药物开发的重要目标之一。由显齿蛇葡萄嫩叶制成的藤茶,因其次生代谢产物二氢杨梅素含量高,并具有多种生理活性功能而备受关注,国内外进行了许多萃取、纯化和生理功能方面的研究<sup>[19-20]</sup>,市场需求也在急剧扩大。

由于浙江省并无显齿蛇葡萄的天然分布<sup>[21]</sup>,2015 年将其从广西、湖北和贵州三地引种至浙江省杭州市西湖区、金华市武义县、绍兴市嵊州市、衢州市衢江区、丽水市青田县等地栽培研究,以丰富省内经济作物种类,

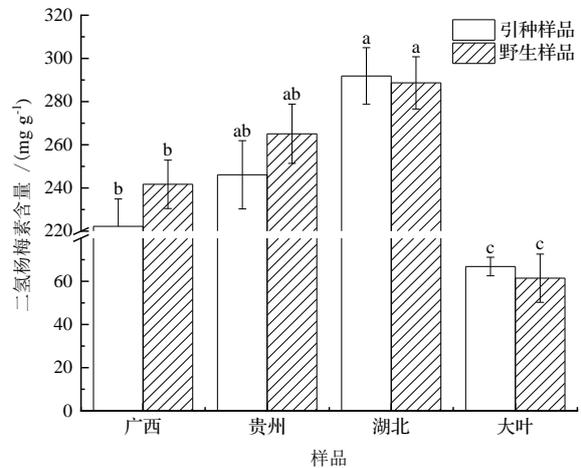


图 6 引种与野生嫩叶样品二氢杨梅素含量比较 ( $n=5$ )

Fig. 6 Dihydromyricetin content from local wild and introduced young leaves ( $n=5$ )

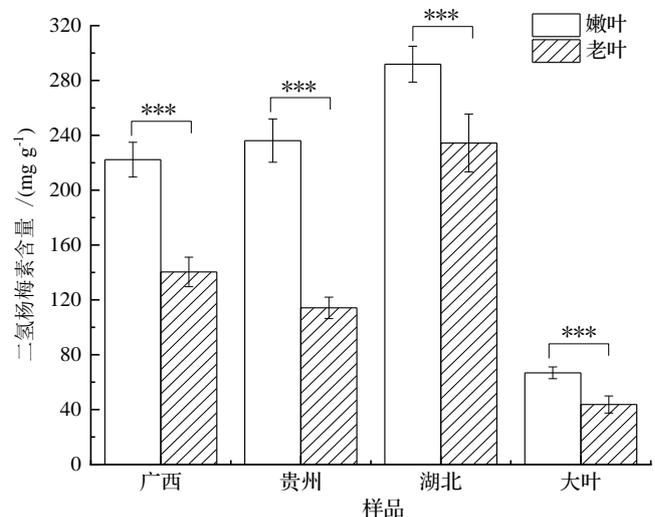


图 7 3 个种源 4 份种质显齿蛇葡萄老嫩叶二氢杨梅素含量比较 ( $n=5$ )

Fig. 7 Dihydromyricetin content from introduced *A. grossedentata* leaves collected in March and October ( $n=5$ )

选育适合浙江生长的显齿蛇葡萄品种。为探索浙江省外野生资源与省内引种资源叶片中二氢杨梅素含量的差异, 以及引种资源老叶和嫩叶中二氢杨梅素含量的差异, 进行了显齿蛇葡萄叶片中二氢杨梅素提取方法、HPLC 检测方法的研究, 获得显齿蛇葡萄叶片中二氢杨梅素的最佳萃取条件——液料比 20 : 1, 萃取溶剂水 : 乙醇 = 25 : 75, 萃取温度 40 ℃, 频率 20 kHz、功率 500 W 条件下超声萃取 3 次, 每次 25 min; 二氢杨梅素的 HPLC 检测方法的标样拟合方程为:  $y = 218.74x$ ,  $R^2 = 0.9997$ , 平均加标回收率为 98.88%, 能较好满足研究的需求。

有研究表明, 由于引种地与原产地环境差异和栽培技术的不同, 引种后植物体内黄酮等活性成分可能低于原产地<sup>[22]</sup>。采用上述研究方法对种源地野生资源与引种 5 年后栽培资源叶片中二氢杨梅素含量进行分析, 发现湖北种源引种普通显齿蛇葡萄样品中二氢杨梅素含量最高, 达  $(291.87 \pm 13.10) \text{ mg g}^{-1}$ , 湖北野生大叶显齿蛇葡萄样品中二氢杨梅素含量最低, 为  $(61.43 \pm 11.17) \text{ mg g}^{-1}$ 。4 个种源引种的样品中二氢杨梅素含量与野生样品并无显著性差异, 说明浙江杭州是显齿蛇葡萄的适生地, 环境的细微变化并未对二氢杨梅素这一次生代谢产物的积累造成不利影响。

植物体内活性成分的产生、积累与生长季节密切相关, 有研究表明, 随着生长时间的增加, 茶 *Camellia sinensis* 中茶多酚含量会随之增加<sup>[23-24]</sup>, 秋季含量最高, 而北京地区铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 中多糖含量在 8—9 月最高, 生物碱含量在 4—5 月最高<sup>[25]</sup>。植物体内二氢杨梅素的含量与季节应该也存在类似相关性, 本研究针对茶叶加工的春秋两季, 对显齿蛇葡萄老叶 (10 月) 与嫩叶 (3 月) 中的二氢杨梅素含量进行了分析对比, 结果表明, 嫩叶中的二氢杨梅素含量远高于老叶, 差异最大的是贵州引种显齿蛇葡萄, 嫩叶中二氢杨梅素含量是老叶中的 2.07 倍, 说明在实际生产中, 应该尽量在春季进行采摘加工。

#### 参考文献:

- [1] 王文采. 葡萄科的新发现[J]. 植物分类学报, 1979, 17 (3): 73-96.
- [2] 冉京燕, 方建国, 谢雪佳, 等. 藤茶的本草资源学研究概况[J]. 中草药, 2016, 47 (20): 3728-3735.
- [3] 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, 1978: 788.
- [4] 广西中医药研究所. 广西药用植物名录[M]. 广西人民出版社, 1986: 300.
- [5] 叶勇, 欧贤红, 黄秋洁, 等. 藤茶总黄酮及黄酮醇类化合物的抗血栓作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24 (1): 33-36.
- [6] 欧贤红, 叶勇, 黄秋洁, 等. 藤茶抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25 (2): 245-248.
- [7] 周春权, 林静瑜, 姚欣, 等. 藤茶总黄酮体外抗肿瘤实验研究[J]. 中国医药科学, 2012, 2 (9): 50-51.
- [8] 陈帅, 郁建平. 藤茶总黄酮抗炎及抑菌作用的实验研究[J]. 贵阳中医学院学报, 2013, 35 (1): 1-3.
- [9] 祁佳, 李莉霞, 卜书红, 等. 藤茶提取物清咽抗炎作用及其机制的研究[J]. 贵阳中医学院学报, 2013, 35 (1): 19-21.
- [10] 陈夏静, 姚汉玲, 张秋琼, 等. 大叶蛇葡萄中蛇葡萄素含量的高效液相色谱法测定[J]. 时珍国医国药, 2010, 21 (5): 1053-1054.
- [11] 侯小龙, 王文清, 施春阳, 等. 二氢杨梅素药理作用研究进展[J]. 中草药, 2015, 46 (4): 603-609.
- [12] 陈玉琼, 倪德江, 程倩, 等. 藤茶总黄酮及二氢杨梅素降血脂作用研究[J]. 茶叶科学, 2007, 27 (3): 221-225.
- [13] 浙江省发展和改革委员会, 浙江省林业局. 浙江省林业发展“十四五”规划[Z]. 2021-05-11.
- [14] 陈玉琼, 李安琪, 孟燕. 藤茶黄酮及二氢杨梅素提取条件的优化[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28 (1): 106-110.
- [15] 陈玉琼. 藤茶中黄酮、二氢杨梅素的提取分离、降血脂作用及藤茶安全评价的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007: 29, 46.
- [16] 杨丽, 赵伯原, 李春龙, 等. 亲和超滤-液质联用技术在药用植物活性成分筛选中的应用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (8): 196-208.
- [17] 金斐, 朱丽云, 高永生, 等. 植物源活性成分降血糖作用及其机理研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42 (21): 322-330.
- [18] 焦松林, 任建国, 王俊丽. 药用植物药效活性成分积累调控的蛋白质组学研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2021, 35 (2): 91-95.
- [19] 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.
- [20] WANG L L, ZHOU Y F, WANG Y B, et al. Two green approaches for extraction of dihydromyricetin from Chinese vine tea using Cyclodextrin-based and ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction methods[J]. Food Bioprod Proc, 2019, 116 (1): 1-9.
- [21] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志第四十八卷第二分册[D]. 北京: 科学出版社, 1998: 53.
- [22] 白明生, 李国旗, 姚澎辉, 等. 宁夏引种金银花与原产地金银花中绿原酸和总黄酮含量的比较测定[J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (28): 12308-12310.
- [23] 冯国栋, 张鸿, 马意龙, 等. 茶叶品种及采摘时节对其活性成分的影响分析[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29 (11): 1882-1887.
- [24] 陈圆圆, 钱靖, 李仲彩, 等. 云南省不同季节茶产品茶多酚含量调查研究[J]. 昆明学院学报, 2016, 38 (6): 30-33.
- [25] 陆方舟, 张诗靖, 戴亚峰, 等. 铁皮石斛引种前后主要生物活性成分对比分析[J]. 核农学报, 2021, 35 (10): 2361-2368.