

# 高通量检测大样本桑黄发酵液总黄酮含量方法的建立

毛东霞<sup>1</sup>, 阮芹芹<sup>1</sup>, 赵敏<sup>2</sup>, 郭丹丹<sup>1</sup>, 王苗<sup>1</sup>, 田晓雪<sup>1</sup>, 刘陶<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>陕西师范大学生命科学学院, 西安 710100; <sup>2</sup>长庆油田分公司油气工艺研究院, 西安 710021

**摘要:**建立了大样本的桑黄发酵液样品中总黄酮的高通量测定方法。通过  $L_9(3^4)$  正交实验设计优化, 确定了基于亚硝酸钠-硝酸铝比色法的微孔板检测方法, 优化后总黄酮含量测定的最佳反应条件: 5% 亚硝酸钠 30  $\mu\text{L}$ , 10% 硝酸铝 30  $\mu\text{L}$ , 10% 氢氧化钠 50  $\mu\text{L}$ , 室温反应 10 min, 检测波长为 510 nm。检测结果表明, 针对大样本检测, 该法稳定性高, 平均回收率为 100.7%, 相对标准偏差为 0.607%, 线性范围为 0~50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 线性相关系数  $r^2=0.9994$ 。比较分析结果显示, 和多种传统总黄酮测定方法相比, 实验所建立的高通量测定方法检测大样本快速、准确、用量小, 且稳定性高。

**关键词:** 高通量; 超微量微孔板分光光度计; 亚硝酸钠-硝酸铝比色法; 桑黄; 总黄酮

中图分类号: Q93; TS3

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.10.004

## High-throughput Quantitative Assay of Total Flavonoids in Large-scale Samples

MAO Dong-xia<sup>1</sup>, RUAN Qin-qin<sup>1</sup>, ZHAO Min<sup>2</sup>, GUO Dan-dan<sup>1</sup>, WANG Miao<sup>1</sup>, TIAN Xiao-xue<sup>1</sup>, LIU Tao<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710100, China; <sup>2</sup>Oil&Gas Technology

Research Institute of Changqing Oilfield Company, Xi'an 710021, China

**Abstract:** The aim of this study was to develop a high-throughput quantitative assay for detecting the total flavonoids in large-scale samples from the broth of *Phellinus* sp. The orthogonal experimental design was preformed according to  $L_9(3^4)$  orthogonal table using 96 microplate. Based on the variance analysis of the results from the orthogonal experiments, the optimum experimental chromogenic conditions were obtained as follows: the addition volume of 5% sodium nitrite, 10% aluminum nitrate, 10% sodium hydroxide were 30  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , respectively, and then the sample should be kept for 10 min at room temperature. The maximum absorption wavelength for detecting the total flavonoids from the broth of *Phellinus* sp. was determined to be 510 nm. The results showed that the developed method was precision and stable. The average recovery was 100.7%. The relative standard deviations of the evaluation test was 0.607%, and the linear range was 0-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $r^2=0.9994$ ). The comparative results between different methods indicated that the developed high-throughput assay for the total flavonoids content determination assay of large-scale samples hereby was more accurate, rapid, reliable and using less sample than the traditional method.

**Key words:** high-throughput assay; multi-volume spectrophotometer system; sodium nitrite-aluminum nitrate colorimetry; *Phellinus* sp; the total flavonoids

黄酮类化合物(Flavonoids)是以 C6-C3-C6 结构为基本母核的色原烷或色原酮的衍生物<sup>[1]</sup>。黄酮类化合物具有抗氧化、抗炎镇痛、调节免疫、抗衰老、降血脂、抗肿瘤等药理作用<sup>[2]</sup>, 在葛根、黄芩、桑白皮、银杏叶等中药及大型药用真菌桑黄的药理作用中扮演着重要角色。

各类样品中黄酮类物质含量的检测方法主要包

括分光光度计比色法、气相色谱法(Gas Chromatography, GC)、高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)、毛细管电泳等<sup>[3]</sup>。其中分光光度计比色法是被中国药典所采用的最常见的总黄酮测定方法, 而其中又以  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$  比色法最为常用<sup>[4]</sup>。 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$  比色法测定原理主要是基于黄酮类化合物的紫外吸收光谱中的环肉桂酰系统引起的吸收带 I (300~550 nm) 和环苯酰系统引起的吸收带 II (220~280 nm)。铝离子可以与黄酮类化合物形成稳定的配合物, 从而使带 II 发生红移<sup>[5]</sup>; 在  $\text{NaNO}_2$  的强碱性溶液中,

收稿日期: 2015-06-16 接受日期: 2015-09-02

基金项目: 陕西省特种资源开发与利用项目(693102); 中央高校科研业务费特别支持项目(1301030208)

\* 通讯作者 Tel: 86-29-85310266; E-mail: liutao@snnu.edu.cn

其在 510 nm 处具有最大吸收值,从而为  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$  比色法测定黄酮类化合物提供了依据<sup>[6]</sup>。王勇等<sup>[7]</sup>使用硝酸铝显色法、直接测定法、三氯化铝显色法对 4 种甘草中黄酮含量测定的比较结果表明,亚硝酸钠-硝酸铝显色法测定结果准确性高,重现性好。国外文献资料中,黄酮含量的测定也主要集中于使用此法<sup>[8-10]</sup>。

然而在实际测定中,使用该法测定样品需要量大,反应试剂消耗多,操作步骤繁琐,因此对微量和大量样品的测定难以快速、准确地进行。在建立高通量微孔板法测试桑黄多糖含量方法的基础上<sup>[11]</sup>,本次实验以桑黄液体发酵液中的黄酮含量为测试对象,使用 96 微孔板,以正交设计法对在高通量条件下对测定黄酮含量的主要影响因素亚硝酸钠添加量、硝酸铝添加量、氢氧化钠添加量及反应时间进行了优化,并对所建立体系的准确性和稳定性进行了考察和验证,同时通过和标准黄酮含量检测方法比较,为此类大样本中总黄酮含量的检测提供了一个更简便和经济的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

桑黄菌(*Phellinus* sp. P0988),保藏于中国典型培养物保藏中心,编号为 CCTCC NO:M 2012080。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

Epoch 超微量微孔板分光光度计(美国 BioTek);SB5200DT 型数控超声波清洗器(宁波新芝生物科技有限公司);FA2004N 分析天平(上海精科仪器有限公司);DGG-9053A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司);MH-2 微量振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

芦丁(三水芸香叶苷)标准品购自国药集团上海化学试剂有限公司,生产批号 F20090115;无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等均为国产分析纯。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 检测波长确定

据文献报道<sup>[12-15]</sup>,选定芦丁作为测定的标准品,量取桑黄发酵液中的黄酮提取物及芦丁溶液,按照传统亚硝酸钠-硝酸铝显色方法<sup>[4]</sup>反应之后,于 200~600 nm 进行全波长扫描,确定测定该类样品检测的最佳检测吸收波长。

#### 1.2.2 显色条件优化

以桑黄发酵液提取物为测试对象,选择亚硝酸钠添加量(A)、硝酸铝添加量(B)、氢氧化钠添加量(C)以及反应时间(D)为主要考察因素,进行  $L_9(3^4)$  正交实验。每个因素选择 3 个水平,因素水平如表 1 所示( $n=3$ )。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments

水平 Level	因素 Factor			
	A ( $\mu\text{L}$ )	B ( $\mu\text{L}$ )	C ( $\mu\text{L}$ )	D (min)
1	10	10	50	10
2	20	20	100	15
3	30	30	150	20

#### 1.2.3 标准曲线的制作及线性范围的确定

精密吸取标准品溶液,按照 1.2.2 中优化后的显色条件反应之后,使用超微量微孔板分光光度计于最佳检测吸收波长处测定其吸收值,以标准品浓度(X)为横坐标,吸收值(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,得到线性回归方程,确定其线性范围。

#### 1.2.4 稳定性实验

精密量取一定浓度的桑黄发酵液提取物,按照 1.2.2 中确定的测定条件检测。每隔 1 h 测定一样品的吸收值,比较多次的测定结果。

#### 1.2.5 精密度实验

精密吸取一定浓度的桑黄发酵液提取物,按照 1.2.2 中确定的测定条件连续独立测定 6 次,对实验精密度及相对标准偏差(Relative standard deviations, RSD)进行评估。

#### 1.2.6 加样回收率实验

分别向 3 种不同浓度的桑黄发酵液提取物中定量加入标准品溶液,按照 1.2.2 中确定的测定条件测定总黄酮含量并计算加样回收率。

#### 1.2.7 和传统测定方法检测的比较分析

为了验证所建立的高通量微孔板测定法的准确性,以 5 个黄酮桑黄发酵液中的黄酮样品为测试对象,分别使用本实验所确定的微孔板高通量测定方法、保健食品中总黄酮的测定方法<sup>[16]</sup>和中国药典(2010)中总黄酮含量的测定方法<sup>[4]</sup>进行比较分析测定。每个样品重复三次,计算其测定相对标准偏差。

#### 1.2.8 大样本检测验证

为了进一步验证所建立的微孔板高通量测定方

法的可行性和准确性,以 24 个桑黄发酵液的黄酮样品为测试对象,使用本实验建立的微孔板法检测此大样本中的总黄酮含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 最佳检测波长确定

对桑黄发酵液提取物和芦丁标准品的波谱扫描比较结果表明二者在可见光区 510 nm 左右处均有最大光吸收峰,与有关黄酮最大光吸收值的文献报道一致<sup>[17-21]</sup>。本实验确定选择芦丁为检测标准品,选择 510 nm 为检测反应的最佳检测波长。

### 2.2 正交设计实验及方差分析

准确吸取桑黄发酵液提取物于微孔板中,按表 2 中的各因素的添加量进行试验,使用超微量微孔板分光光度计在 510 nm 处测定其吸光值。实验结果见表 2、表 3。极差分析(*Rj*)显示(表 2),硝酸铝添加量是影响显色反应后样品吸收值最重要的影响因素,亚硝酸钠加入量和反应时间的影响相对较小,且这些因素对显色反应的吸收值影响作用显著(表 3,  $\alpha = 0.05$ )。结果还显示,影响因素包括亚硝酸钠、硝酸铝和氢氧化钠的最佳用量分别为 30  $\mu\text{L}$ 、30  $\mu\text{L}$  和 50  $\mu\text{L}$ ,反应时间为 10 min。

表 2 正交实验设计及结果

Table 2 The orthogonal experimental design and results

序号 No.	因素水平 Level				吸收值 Abs.
	A ( $\mu\text{L}$ )	B ( $\mu\text{L}$ )	C ( $\mu\text{L}$ )	D (min)	
1	1	1	1	1	0.91 $\pm$ 0.011
2	1	2	2	2	1.14 $\pm$ 0.017
3	1	3	3	3	1.29 $\pm$ 0.004
4	2	1	2	3	0.83 $\pm$ 0.003
5	2	2	3	1	1.24 $\pm$ 0.014
6	2	3	1	2	1.37 $\pm$ 0.011
7	3	1	3	2	0.88 $\pm$ 0.008
8	3	2	1	3	1.29 $\pm$ 0.006
9	3	3	2	1	1.55 $\pm$ 0.011
T1 *	1.11	0.87	1.19	1.24	
T2 *	1.15	1.23	1.17	1.13	
T3 *	1.24	1.41	1.14	1.14	
Rj *	0.13	0.53	0.05	0.10	

\* T1、T2、T3 分别为各因素对应 1、2、3 水平的实验均值,*Rj* 为极差。

\* T1, T2, T3 were the average experimental value of level 1, 2 and 3, respectively. *Rj* is the range.

表 3 方差分析表

Table 3 ANOVA table

因素 Factors	偏差平方和 SS	自由度 DOF	F 比 Ratio	F 临界值 Critical value
亚硝酸钠(A) Sodium nitrite	0.026	2	10.212	4.46
硝酸铝(B) Aluminum nitrate	0.440	2	21.592	4.46
氢氧化钠(C) Sodium hydroxide	0.004	2	9.033	4.46
震荡时间(D) Time	0.020	2	8.163	4.46
误差 Mean error	0.490	8		

### 2.3 标准曲线制作及线性范围确定

如表 4 所示,在不同测定范围内,使用该方法测定的  $r^2$  均接近于 1,标准偏差均满足要求。其中,当

线性范围为 0 ~ 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,  $r^2$  值最大达到 0.9994,因此,实验选定 0 ~ 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  为测定的线性范围。

表4 线性范围考察表

Table 4 Table of linear range examination

浓度范围 Concentration range( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	回归方程 Linear regressive equation	$r^2$	标准偏差 Standard deviations, $SD$
0 ~ 50	$Y = 1.9052X - 0.0009$	0.9994	0.01
0 ~ 15	$Y = 1.5328X + 0.0007$	0.9980	0.01
1.5 ~ 30	$Y = 0.96454X - 0.004$	0.9910	0.02

## 2.4 稳定性实验

实验结果显示,在4 h内供试液吸收值由0.1016变为0.1005,相对标准偏差RSD为0.607%。表明使用此法检测黄酮含量稳定性良好,在4 h内显色较稳定。

## 2.5 精密度与加样回收率实验

以桑黄发酵液提取物为样品平行测定6次,吸收值测定结果分别为0.0528、0.0489、0.0505、

0.0511、0.0497和0.0503,RSD为2.63%。表明该方法精确度高。加样回收率在98%~104%之间,平均为100.7%,变异系数在0.67%~1.50%之间。结果显示,该方法准确、可靠。

## 2.6 检测方法比较分析

比较结果显示(表5):和传统方法相比,本实验建立的高通量检测方法灵敏度更高,测定误差小,测定结果更准确、可靠。

表5 测定方法比较分析

Table 5 Results comparison between different methods

样品 Sam.	微孔板高通量测定方法 High-throughput micro-assay			保健食品检验与评价技术规范(2003年版) Technical standards for testing & assessment of health food(2003)			中国药典(2010) Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2010)		
	黄酮含量 Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Mean	SD	黄酮含量 Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Mean	SD	黄酮含量 Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Mean	SD
Sam. 1	9.88	9.90	0.12	9.7	9.77	0.17	9.76	9.94	0.19
	9.79			9.96			10.14		
	10.02			9.64			9.92		
Sam. 2	20.32	20.17	0.17	20.05	20.22	0.20	20.22	20.11	0.19
	19.98			20.17			19.89		
	20.21			20.44			20.21		
Sam. 3	43.76	43.54	0.32	43.14	43.36	0.28	43.18	43.49	0.25
	43.69			43.67			43.43		
	43.17			43.26			43.86		
Sam. 4	58.34	58.16	0.26	58.16	58.04	0.59	58.20	58.34	0.25
	57.86			58.56			58.63		
	58.27			57.39			58.19		
Sam. 5	76.54	76.57	0.32	76.38	76.51	0.33	76.26	76.53	0.37
	76.27			76.89			76.96		
	76.92			76.27			76.39		

## 2.7 大样本检测验证

使用该法一次性测定24个桑黄发酵液中总黄酮含量(表6)。结果显示,对于一次性测定大样本

样品,相对标准偏差分析均符合相关要求,证实该法可用于大样本检测。

表 6 高通量测定结果  
Table 6 High-throughput determination results

样品 Sam.	黄酮含量 Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	样品 Sam.	黄酮含量 Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	<i>Mean</i>	<i>SD</i>
Sam. 1	11.59	10.66	0.88	Sam. 13	79.29	79.08	0.22
	9.85				79.09		
	10.54				78.86		
Sam. 2	20.70	20.46	0.63	Sam. 14	26.68	26.24	0.38
	19.75				25.99		
	20.93				26.04		
Sam. 3	38.06	37.88	0.39	Sam. 15	25.25	25.28	0.55
	37.43				25.85		
	38.15				24.75		
Sam. 4	8.93	8.02	0.79	Sam. 16	12.63	12.25	0.35
	7.68				12.18		
	7.46				11.93		
Sam. 5	25.26	25.37	0.45	Sam. 17	44.18	43.97	0.20
	24.98				43.79		
	25.86				43.95		
Sam. 6	66.27	66.36	0.57	Sam. 18	59.47	59.14	0.29
	66.97				58.94		
	65.84				59.02		
Sam. 7	53.90	53.71	0.46	Sam. 19	25.55	25.25	0.31
	54.04				24.94		
	53.19				25.25		
Sam. 8	11.58	12.30	0.65	Sam. 20	30.05	29.88	0.16
	12.85				29.86		
	12.47				29.73		
Sam. 9	40.23	41.29	0.94	Sam. 21	26.54	26.22	0.29
	42.02				26.15		
	41.62				25.97		
Sam. 10	63.02	63.21	0.20	Sam. 22	38.97	38.41	0.52
	63.20				38.33		
	63.42				37.93		
Sam. 11	87.76	88.14	0.33	Sam. 23	22.37	22.26	0.24
	88.33				21.98		
	88.34				22.43		
Sam. 12	53.25	53.68	0.40	Sam. 24	39.39	39.15	0.23
	53.75				38.94		
	54.05				39.11		

### 3 讨论与结论

魏永生等<sup>[22]</sup>曾经对络合分光光度法测定黄酮含量的实验条件做过优化;于村等<sup>[23]</sup>也对保健食品中检测总黄酮方法做过优化,但这些研究主要集中于对不同样品的前处理方法的优化。虽然在具体操作过程中稍有不同,但改进后的测定方法都依然存在样品消耗大,耗时,化学药品损失大,且不适用于微量或痕量黄酮样品以及大样本的检测等缺点。本实验充分考虑了影响  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$  比色法的相关因素,并最终选择了四个关键因素作为考察对象,通过  $L_9(3^4)$  正交实验优化了显色条件,建立了基于使用 96 微孔板,利用超微量微孔板分光光度计的总黄酮含量的高通量测定方法。该方法对大样本黄酮含量测定的准确性、重现性、线性关系、样品回收率均能达到科研和生产分析的要求。

实验以桑黄发酵液黄酮提取物为研究对象,通过  $L_9(3^4)$  正交实验设计优化,建立了检测大样本的黄酮样品中总黄酮含量的高通量测定方法。优化后总黄酮含量测定的最佳显色条件为 5% 亚硝酸钠 30  $\mu\text{L}$ , 10% 硝酸铝 30  $\mu\text{L}$ , 10% 氢氧化钠 50  $\mu\text{L}$ , 室温反应 10 min, 最佳检测波长为 510 nm。

#### 参考文献

- 1 Ma TT (马陶陶), Zhang QL (张群林), Li J (李俊), *et al.*  $\text{AlCl}_3$  colorimetry for determination of total flavonoids. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2008, 19: 54-56.
- 2 Ma R (马锐), Wu SB (吴胜本). Research progress about pharmacological effect and mechanism of flavonoids in traditional Chinese medicine. *Chin J Pharmacovigil* (中国药物警戒), 2013, 10: 286-290.
- 3 Zhang Y (张岩), Cao GJ (曹国杰), Zhang Y (张燕), *et al.* Research on the extraction and identification of flavonoids. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2008, 29: 154-158.
- 4 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010.
- 5 Ha B (哈本). Flavonoids (黄酮类化合物). Beijing: Science Press, 1983. 53-70.
- 6 Han WJ (韩卫娟), Liang YQ (梁玉琴), Zhang JJ (张嘉嘉), *et al.* Review on the quantitative analysis methods of polyphenols and flavonoids in the leaf of persimmon. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2014, 30(31): 52-56.
- 7 Wang Y (王勇), Zhao HY (赵海燕), Feng L (封琳), *et*

- al.* Comparison and evaluation of methods for licorice flavonoids content determination. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2009, 37: 13593-13595.
- 8 Moniruzzaman M, Yung AC, Rao PV, *et al.* Identification of phenolic acids and flavonoids in monofloral honey from bangladesh by high performance liquid chromatography; determination of antioxidant capacity. *Bio Med Res Int*, 2014, 2014.
- 9 Suhartono E, Viani E, Rahmadhan MA, *et al.* Total flavonoid and antioxidant activity of some selected medicinal plants in South Kalimantan of Indonesian. *APCBEE Procedia*, 2012, 4: 235-239.
- 10 Silva SD, Feliciano RP, Boas LV, *et al.* Application of FTIR-ATR to Moscatel dessert wines for prediction of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity. *Food Chem*, 2014, 150: 489-493.
- 11 Ma XK, Ruan QQ, Zhang H, *et al.* Developing a high-throughput microassay for large samples of fungal polysaccharides. *Anal Methods*, 2013, 17: 4310-4316.
- 12 Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission (中国兽药典委员会). Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国兽药典). Beijing: China Agriculture Press, 2011.
- 13 Wu LL (吴亮亮), Shi XP (石雪萍), Zhang WM (张卫明). Study on the determination method of total flavonoids content in *Zanthoxylum* by spectrophotometry. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2010, 31: 372-374.
- 14 Li N (李娜), Jiang HF (姜洪芳), Jin JH (金敬宏), *et al.* Total flavones content analysis of *Chaenomeles speciosa* by different harvest times. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2011, 32(2): 112-114.
- 15 Li HL (李海龙), Liu MS (刘明生), Zhang JQ (张俊清), *et al.* Determination of total flavonoids in *Daphniphyllum calycinum*. *Hainan Med J* (海南医学), 2012, 23: 106-108.
- 16 Ministry of Health of the People's Republic of China (中华人民共和国卫生部). Technical standards for testing & assessment of health food(2003) (保健食品检验与评价技术规范 2003 年版). Beijing: Chinese Ministry of Health, 2003.
- 17 Zhang XH (张夏辉). Studies on extraction of flavonoids in *Spatholobus suberectus* dunn and antioxidation activity of the different extract from it. Liuzhou: Guangxi University of Science and Technology (广西科技大学), MSc. 2013.
- 18 Liu HM (刘洪梅), Chen YT (陈玉婷), He LM (何立美), *et al.* Determination of total flavonoids in *Fengliao* decoction by UV-visible spectrophotometry. *Chin Animal Husbandry Veterin Med* (中国畜牧兽医), 2014, 41: 140-144.