

软枣猕猴桃总黄酮含量测定的方法研究

栾云峰, 王菲, 刘长江*, 宗绪岩
(沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 选用 $ZrOCl_2$ 比色法、 $NaNO_2-Al(NO_3)_3$ 比色法、 $AlCl_3$ 比色法以及 HPLC 法测定软枣猕猴桃总黄酮含量, 通过对黄酮粗提液和芦丁标准品与不同显色剂反应后进行 200 ~ 600nm 波长扫描, 根据扫描结果确定各种反应的适合波长并进行定量分析比较。结果表明, $NaNO_2-Al(NO_3)_3$ 比色法与 $AlCl_3$ 比色法不适合软枣猕猴桃总黄酮测定。在 284nm 波长处, $ZrOCl_2$ 比色法的线性方程 $Y=0.0114X - 0.0001$, $R^2=0.9991$, 平均加样回收率为 99.4%, $RSD=1.61\%$ ($n=5$)。 $ZrOCl_2$ 比色法是一种快捷、准确的检测方法, 适用于软枣猕猴桃总黄酮含量测定。
关键词: 软枣猕猴桃; 总黄酮; 比色法

A Comparative Study of Different Methods for the Determination of Total Flavonoids in *Actinidia arguta*

LUAN Yun-feng, WANG Fei, LIU Chang-jiang*, ZONG Xu-yan
(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: Total flavonoids in *Actinidia arguta* were determined separately by $ZrOCl_2$ colorimetry, $NaNO_2-Al(NO_3)_3$ colorimetry, $AlCl_3$ colorimetry and HPLC. Wavelength scanning of flavonoid extracts and rutin after reaction with different chromogenic reagents was performed in a range of 200 - 600 nm. Results showed that $NaNO_2-Al(NO_3)_3$ colorimetry and $AlCl_3$ colorimetry were found not suitable for the determination of total flavonoids in *Actinidia arguta*. An excellent linear equation for $ZrOCl_2$ colorimetric determination at 284 nm wavelength was obtained as follows: $Y_{284} = 0.0114X - 0.0001$, $R^2 = 0.9991$. The average recovery rate was 99.4% with a RSD of 1.61% ($n = 5$). $ZrOCl_2$ colorimetry is a quick accurate method for the determination of total flavonoids in *Actinidia arguta*.

Key words: *Actinidia arguta*; total flavonoids; colorimetry

中图分类号: S663.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)04-0155-04

软枣猕猴桃(*Actinidia arguta* Sieb.et Zucc.), 又名软枣子, 猕猴桃, 藤瓜, 属于猕猴桃科(Actinidiaceae)、猕猴桃属(*Actinidia*)多年生落叶藤本植物^[1-2]。果实可食用, 多汁, 酸甜适口, 风味独特。营养价值很高, 含大量 VC、VB 族维生素、氨基酸、类胡萝卜素等多种营养成分。

黄酮类化合物是一类植物中分布很广而且重要的多酚类天然产物, 泛指两个具有酚羟基的苯环(A-与 B-环)通过中央三碳原子相互连接而成的一系列化合物^[3]。的生长、发育、开花、结果以及抵御异物的侵袭起着重要作用。黄酮化合物有具有广泛的药理活性, 如抗菌作用、抗氧化作用和抗自由基作用^[4]。

目前测定食品及中草药中黄酮类的方法有直接测定法^[5]、 $AlCl_3$ 法^[6-8]、 $Al(NO_3)_3$ 法^[9-10]、紫外法^[11]、HPLC^[12-13]法等。有关食品及中草药中黄酮类的含量测

定, 当前用得较多的方法之一是以芦丁为标样的 $NaNO_2-Al(NO_3)_3$ 显色法, 但是此反应并不专一, 很多非黄酮类物质也可参与反应对测定结果产生影响^[14]。本实验以芦丁为标样, 通过分析研究, 确定适合软枣猕猴桃黄酮类测定的简便方法, 为软枣猕猴桃这一野生资源的进一步开发利用提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

软枣猕猴桃 辽宁省本溪市。

芦丁(rutin)、槲皮素(quercentin) 中国药品生物制品鉴定所; 甲醇(色谱纯) Dikma 公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

600E-2487 高效液相色谱仪 美国 Waters 公司;

收稿日期: 2010-03-20

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(200903013)

作者简介: 栾云峰(1986—), 男, 硕士研究生, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: fluyuan@126.com

*通信作者: 刘长江(1955—), 男, 教授, 博士, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: liucj597@sohu.com

Waters Nova-pak C₁₈ 60Å 4μm 3.9mm × 150mm 色谱柱；TU-180 型紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司；移液器 德国 Eppendorf 公司；himac CR-21G 高速冷冻离心机 日本日立公司；BP120S 电子天平 德国 Sartorius 公司；JY92- 超声波细胞粉碎机 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 软枣猕猴桃黄酮提取

取软枣猕猴桃鲜果 100g，匀浆，加入匀浆 4 倍体积 70%(V/V)乙醇超声处理，超声功率 300W，超声时间 25s，间隔 10s，作用 30 次，超声处理后 60℃ 水浴 2h，冷却后 4000r/min 离心 15min，取上清液备用。

1.3.2 不同显色反应反应液的紫外-可见光谱扫描

分别将不同显色反应的芦丁及粗提样品反应液进行 200~600nm 波长扫描，以确定检测波长。

1.3.3 粗提液中总黄酮含量的测定

ZrOCl₂ 比色法^[15]：取 0.5mL 黄酮粗提液置于比色管中，加入甲醇至 5mL，再加入质量浓度 2g/mL ZrOCl₂ 甲醇溶液 1.5mL，以甲醇定容至 10mL，静置 10min 测定 A_{284nm} 、 A_{430nm} 。

AlCl₃ 比色法^[6-8]：取 1mL 黄酮粗提液置于比色管中，加入质量浓度 1.5g/100mL AlCl₃-50% 乙醇溶液 8mL，以 50% 乙醇定容至 25mL，静置 30min 后测定 A_{279nm} 、 A_{315nm} 。

NaNO₂-Al(NO₃)₃ 比色法^[9-10]：取 1mL 黄酮粗提液置于比色管中，加入 30% 乙醇至 10mL，加入 1mL 质量浓度 5g/mL NaNO₂ 溶液，摇匀，静置 6min，加入 1mL 质量浓度 10g/mL Al(NO₃)₃ 溶液，摇匀，静置 6min，加入 5g/mL NaOH 溶液 10mL，以 30% 乙醇定容至 25mL，静置 15min 后测定 A_{330nm} 、 A_{510nm} 。

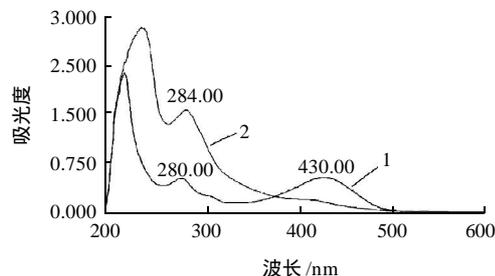
HPLC 法^[12-13]：流动相：甲醇-水-1% 磷酸梯度洗脱；流速：0.5 mL/min；柱温：30℃；检测波长：350nm；进样量：10μL。取黄酮粗提液 20mL，加入 3mol/L HCl 溶液 3mL，80℃ 冷凝回流 2h，冷却，用碱中和，减压蒸干，定容至 5mL，取 10μmL 进行 HPLC 测定。以槲皮素为外标，计算粗提液中黄酮含量。

每种检测方法均做 4 组平行。

2 结果与分析

2.1 检测波长的确定

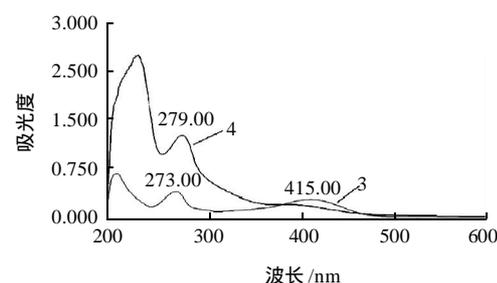
ZrOCl₂ 比色法波长扫描结果见图 1。芦丁在 219、280、430nm 有吸收峰，黄酮粗提液在 273、284nm 处有吸收峰。284nm 处芦丁与粗提物的吸收峰基本吻合，选择为检测波长；在可见区芦丁与黄酮粗提液吸收峰不吻合，选择芦丁的吸收峰处 430nm 作为参考。



1. 芦丁标准品 ZrOCl₂ 显色扫描结果；2. 黄酮粗提液 ZrOCl₂ 显色扫描结果。

图 1 ZrOCl₂ 显色法在波长 200~600nm 处的光谱扫描图

Fig.1 Ultraviolet scanning of flavonoid extracts and rutin for ZrOCl₂ colorimetric determination

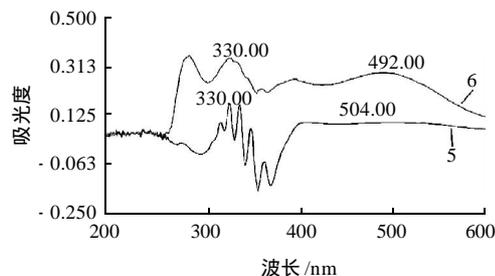


3. 芦丁标准品 AlCl₃ 显色扫描结果；4. 黄酮粗提液 AlCl₃ 显色扫描结果。

图 2 AlCl₃ 显色法在波长 200~600nm 处的光谱扫描图

Fig.2 Ultraviolet scanning of flavonoid extracts and rutin for AlCl₃ colorimetric determination

AlCl₃ 比色法波长扫描结果见图 2。芦丁在 210、273、415nm 处有吸收峰，黄酮粗提液在 233、279nm 处有吸收峰。279nm 处芦丁与粗提物的吸收峰基本吻合，选择为检测波长；在可见区芦丁与黄酮粗提液吸收峰不吻合，选择芦丁的吸收峰处 415nm 作为参考。



5. 芦丁标准品 NaNO₂-Al(NO₃)₃ 显色扫描结果；

6. 黄酮粗提液 NaNO₂-Al(NO₃)₃ 显色扫描结果。

图 3 NaNO₂-Al(NO₃)₃ 显色法在波长 200~600nm 处的光谱扫描图
Fig.3 Ultraviolet scanning of flavonoid extracts and rutin for NaNO₂-Al(NO₃)₃ colorimetric determination

由图 3 可知，400~600nm 范围内，芦丁在 504nm 处有一不明显的吸收峰，黄酮粗提液在 492nm 处有明显的吸收峰；280~400nm 范围内，芦丁在 367、352、340、330、320nm 处有吸收峰，黄酮粗提液在 339、

363、330、287nm 处有吸收峰；波长小于 280nm，芦丁与黄酮粗提液吸收峰非常杂乱，并且吸收较弱。330nm 处芦丁与粗提物的吸收峰基本吻合，选择为检测波长；在可见区芦丁与黄酮粗提液吸收峰不吻合，选择标准品吸收峰处 510nm 作为参考。

2.2 标准曲线的绘制

ZrOCl₂ 比色法：分别取 0.2mg/mL 芦丁标准品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL，按 1.3.3 节 ZrOCl₂ 比色法进行显色反应，测定 A_{284nm}、A_{430nm} 制作标准曲线。回归方程： $Y_{284}=0.0114X - 0.0001$ ， $R^2=0.9991$ ； $Y_{430}=0.008X + 0.0001$ ， $R^2=0.9992$ 。

AlCl₃ 比色法：分别取 0.2mg/mL 芦丁标准品溶液 0、0.5、1.0、1.5、2、2.5mL，按 1.3.3 节 AlCl₃ 比色法进行显色反应，测定 A_{279nm}、A_{315nm} 制作标准曲线。回归方程为： $Y_{279}=0.0316X - 0.0006$ ， $R^2=0.9996$ ； $Y_{315}=0.0315X - 0.0002$ ， $R^2=0.9999$ 。

NaNO₂-Al(NO₃)₃ 比色法：分别取 0.2mg/mL 芦丁标准品溶液 0、0.5、1.0、1.5、2、2.5mL，按 1.3.3 节 NaNO₂-Al(NO₃)₃ 比色法进行显色反应，测定 A_{330nm}、A_{492nm} 制作标准曲线。回归方程： $Y_{330}=0.0196X + 0.0019$ ， $R^2=0.9416$ ； $Y_{492}=0.0727X + 0.0004$ ， $R^2=0.9999$ 。NaNO₂-Al(NO₃)₃ 比色法在 330nm 处的吸收很不稳定，标准曲线线性差，不适合进行黄酮含量测定。

HPLC 法：配制 0.2mg/mL 槲皮素标准品溶液，以进样量为纵坐标，以峰面积为横坐标绘制标准曲线，回归方程： $Y=2 \times 10^{-7}X + 0.1292$ ， $R^2=0.9938$ 。标准品和样品色谱图见图 4、5。

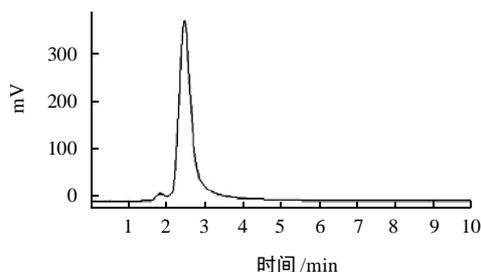


图 4 槲皮素标准品 HPLC 图谱
Fig.4 Chromatogram of quercetin standard

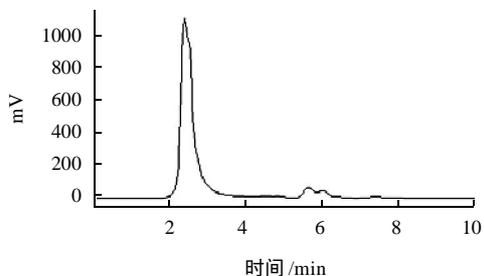


图 5 样品 HPLC 图谱
Fig.5 Chromatogram of sample

2.3 不同检测方法的比较

表 1 不同显色方法测定软枣猕猴桃粗提液中总黄酮含量的比较
Table 1 Comparison of total flavonoid contents in *Actinidia arguta* extract determined by different colorimetric methods

样品编号	ZrOCl ₂		AlCl ₃		Al(NO ₃) ₃	HPLC
	A _{284nm}	A _{430nm}	A _{279nm}	A _{415nm}	A _{492nm}	
1	0.185	0.019	0.412	0.056	0.818	0.179
2	0.181	0.020	0.412	0.049	0.794	0.176
3	0.189	0.017	0.408	0.050	0.821	0.183
4	0.181	0.019	0.419	0.051	0.813	0.178

比色法测定的粗提液中总黄酮含量，结果见表 1。通过 3 种比色方法与 HPLC 法比较可知，ZrOCl₂ 法在 430nm 处、AlCl₃ 法在 415nm 处测得量明显低于 HPLC 法，Al(NO₃)₃ 法在 492nm 处、AlCl₃ 法在 279nm 处测得量明显高于 HPLC 法，ZrOCl₂ 法在 284nm 处测得量与 HPLC 法基本吻合。

NaNO₂-Al(NO₃)₃ 法目前是在食品和中草药测定黄酮类时，用的较多的方法之一，NaNO₂-Al(NO₃)₃ 显色法发生在黄酮分子 B 环的 3',4'-邻二酚羟基部位，很多非黄酮类物质如原儿茶醛、原儿茶酸、咖啡酸、绿原酸、苯甲酸类、肉桂酸类及原花色苷等多种物质均具有邻二酚羟基结构并在 500nm 左右有最大吸收或有较强吸收^[12]，对测定结果产生严重影响。经此方法测定的软枣猕猴桃总黄酮含量明显偏高，此方法不适用于测定软枣猕猴桃总黄酮。黄酮分子 B-环中存在游离的 3-OH 或 5-OH 时，均可与 ZrOCl₂ 形成黄色螯合物^[3-4](图 6)，AlCl₃ 能使黄酮化合物 B-环的 3-OH 或 5-OH 与 4-羰基形成比较稳定的螯合物，这两种化合物与黄酮的反应均有较好的选择性，但 AlCl₃ 法仍然不能很好的排除干扰，显然 ZrOCl₂ 法更适合软枣猕猴桃总黄酮的测定。

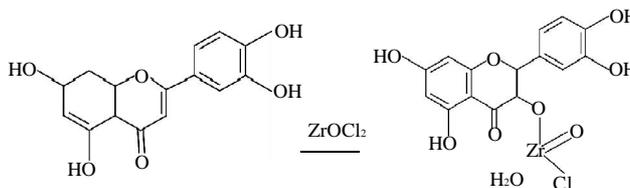


图 6 黄酮与 ZrOCl₂ 形成配合物的结构
Fig.6 Reaction mechanism between flavonoids and ZrOCl₂

2.4 ZrOCl₂ 比色法的方法评价

2.4.1 精密度实验

准确吸取标准品溶液 1.0mL，样品溶液 0.4mL 各 5 份，同 1.3.3 节中 ZrOCl₂ 比色法操作，测定吸光度。结

果表明,标准品吸光度的RSD=0.71%(n=5),样品吸光度的RSD=1.07%(n=5),说明精密度良好。精密度实验结果见表2。

表2 精密度实验结果
Table 2 Results of precision experiments

项目	样品					平均值	RSD/%
	1	2	3	4	5		
标准品吸光度	0.706	0.705	0.709	0.704	0.706	0.706	0.71
样品吸光度	0.665	0.654	0.668	0.673	0.662	0.664	1.07

2.4.2 稳定性实验

准确吸取标准品溶液1.0mL,样品溶液0.4mL,同1.3.3节ZrOCl₂比色法操作在0、10、20、30、45、60、90、120min测定其吸光度。结果表明,标准品在120min内稳定,样品在60min内基本稳定。稳定性实验结果见表3。

表3 稳定性实验结果
Table 3 Results of stability experiments

项目	时间/min							
	0	10	20	30	45	60	90	120
标准品吸光度	0.624	0.696	0.704	0.705	0.704	0.709	0.707	0.706
样品吸光度	0.562	0.659	0.661	0.669	0.652	0.687	0.628	0.650

2.4.3 加标回收率实验

分别取已知浓度的粗提液1mL与5个比色管中,向每个比色管中加入一定量的芦丁标准溶液,按1.3.3节ZrOCl₂比色法测定含量并计算加标回收率。

表4 加标回收率测定结果
Table 4 Results of recovery rate experiments

测定次数	样品中总黄酮/mg	芦丁标准品加入量/mg	实测值/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.179	0.10	0.279	100.0		
2	0.179	0.15	0.330	100.6		
3	0.179	0.175	0.352	98.9	99.4	1.61
4	0.179	0.200	0.375	98.0		
5	0.179	0.225	0.438	102.2		

3 结论

通过对黄酮粗提液和芦丁标准品与不同显反应后进行200~600nm波长扫描结果分析,确定各种显色反应的适合波长,并以芦丁标准品峰值作为参考值。将NaNO₂-Al(NO₃)₃法、ZrOCl₂法、AlCl₃法定量分析结果与HPLC测定结果比较,其中ZrOCl₂法测定结果与HPLC测定结果基本一致。通过比较分析,得到了ZrOCl₂比色法(测定波长为284nm)与HPLC法之间的校正系数为0.89。HPLC法虽然可以较准确地测定总黄酮含量,但对设备和操作要求较高,计算繁琐。以芦丁为标准品的ZrOCl₂比色法是一种操作简便、结果较准确的方法,可用于软枣猕猴桃总黄酮类含量的快速测定。

参考文献:

- [1] 赵淑兰. 软枣猕猴桃品种简介[J]. 特种经济动植物, 2002(2): 35.
- [2] 刘慧涛, 张冰冰, 吕耀双. 东北地区野生猕猴桃资源现状及开发利用[J]. 河北林果研究, 1999(4): 327-330.
- [3] 吴立军. 天然药物化学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 173-184.
- [4] 张培成. 黄酮化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 1-4; 227-243.
- [5] 梁红, 潘伟明, 张伟锋. 银杏叶黄酮提取方法比较[J]. 植物资源与环境, 1999, 8(3): 12-17.
- [6] 何书美, 刘敬兰. 茶叶中总黄酮含量测定方法的研究[J]. 分析化学研究简报, 2007, 35(9): 1365-1368.
- [7] 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.
- [8] 丁明玉, 赵纪萍, 李擎阳. 贯叶金丝桃提取物中总黄酮的测定方法[J]. 分析实验室, 2001, 20(6): 45-47.
- [9] 赵二芳, 段晋峰. 分光光度法测定黄花菜中总黄酮[J]. 分析实验室, 2008, 27(9): 94-96.
- [10] 薛长晖, 端允. 山丹叶中总黄酮含量测定方法的建立[J]. 中国酿造, 2009(8): 152-154.
- [11] 李凤林, 李青旺, 高大威, 等. 天然黄酮类化合物含量测定方法研究进展[J]. 江苏调味副食品, 2008, 25(4): 8-13.
- [12] 任顺成, 丁霄霖. 玉米须黄酮类测定方法的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(3): 139-142.
- [13] OSTICHER A. Identification and determination of the flavonoids from Gingo biloba by high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography, 1992, 605(1): 41-48.
- [14] 周春华, 孙崇德, 李鲜. 富含绿原酸的植物中类黄酮测定方法探讨[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(5): 902-904.
- [15] 康旭珍. 差示分光光度法测定桑叶总黄酮含量[J]. 光谱实验室, 2005, 22(3): 506-508.