

# 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  $\text{ZrOCl}_2$  比色法、 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$  比色法、 $\text{AlCl}_3$  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,  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$  比色法与  $\text{AlCl}_3$  比色法不适合软枣猕猴桃总黄酮测定。在 284nm 波长处,  $\text{ZrOCl}_2$  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%,  $\text{RSD}=1.61\%$  ( $n=5$ )。  $\text{ZrOCl}_2$  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  $\text{ZrOCl}_2$  colorimetry,  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$  colorimetry,  $\text{AlCl}_3$  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  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$  colorimetry and  $\text{AlCl}_3$  colorimetry were found not suitable for the determination of total flavonoids in *Actinidia arguta*. An excellent linear equation for  $\text{ZrOCl}_2$  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% ( $n = 5$ ).  $\text{ZrOCl}_2$  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, 猕猴桃梨, 藤瓜, 属于猕猴桃科(*Actinidiaceae*)、猕猴桃属(*Actinidia*)多年生落叶藤本植物<sup>[1-2]</sup>。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<sup>[3]</sup>。的生长、发育、开花、结果以及抵御异物的侵袭起着重要作用。黄酮类化合物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<sup>[4]</sup>。

目前测定食品及中草药中黄酮类的方法有直接测定法<sup>[5]</sup>、 $\text{AlCl}_3$ 法<sup>[6-8]</sup>、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 法<sup>[9-10]</sup>、紫外法<sup>[11]</sup>、HPLC<sup>[12-13]</sup>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  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$  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<sup>[14]</sup>。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 C<sub>18</sub> 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-II 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 4℃ 10000r/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

**ZrOCl<sub>2</sub> 比色法<sup>[15]</sup>:** 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 ZrOCl<sub>2</sub> 甲醇溶液 1.5mL, 以甲醇定容至 10mL, 静置 10min 测定  $A_{284nm}$ 、 $A_{430nm}$ 。

**AlCl<sub>3</sub> 比色法<sup>[6-8]</sup>:** 取 1mL 黄酮粗提液置于比色管中, 加入质量浓度 1.5g/100mL AlCl<sub>3</sub>-50% 乙醇溶液 8mL, 以 50% 乙醇定容至 25mL, 静置 30min 后测定  $A_{279nm}$ 、 $A_{315nm}$ 。

**NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 比色法<sup>[9-10]</sup>:** 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 NaNO<sub>2</sub> 溶液, 摇匀, 静置 6min, 加入 1mL 质量浓度 10g/mL Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 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  $A_{330nm}$ 、 $A_{510nm}$ 。

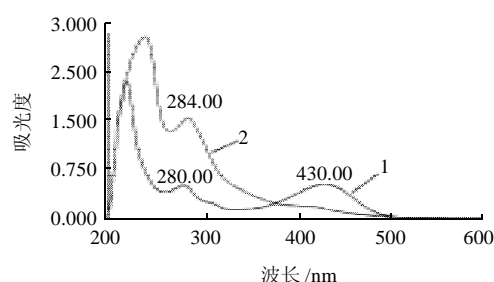
**HPLC 法<sup>[12-13]</sup>:** 流动相: 甲醇-水-1% 磷酸梯度洗脱; 流速: 0.5mL/min; 柱温: 30℃; 检测波长: 350nm; 进样量: 10μL。取黄酮粗提液 20mL, 加入 3mol/L HCl 溶液 3mL, 80℃ 冷凝回流 2h, 冷却, 用碱中和, 减压蒸干, 定容至 5mL, 取 10μL 进行 HPLC 测定。以槲皮素为外标, 计算粗提液中黄酮含量。

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

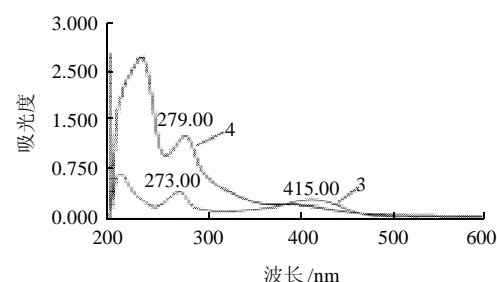
**ZrOCl<sub>2</sub> 比色法** 波长扫描结果见图 1。芦丁在 219、280、430nm 有吸收峰, 黄酮粗提液在 273、284nm 处有吸收峰。284nm 处芦丁与粗提物的吸收峰基本吻合, 选择为检测波长; 在可见区芦丁与黄酮粗提液吸收峰不吻合, 选择芦丁的吸收峰处 430nm 作为参考。



1. 芦丁标准品 ZrOCl<sub>2</sub> 显色扫描结果; 2. 黄酮粗提液 ZrOCl<sub>2</sub> 显色扫描结果。

图 1 ZrOCl<sub>2</sub> 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 ZrOCl<sub>2</sub> colorimetric determination

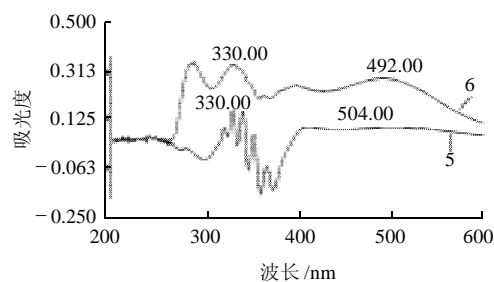


3. 芦丁标准品 AlCl<sub>3</sub> 显色扫描结果; 4. 黄酮粗提液 AlCl<sub>3</sub> 显色扫描结果。

图 2 AlCl<sub>3</sub> 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 AlCl<sub>3</sub> colorimetric determination

**AlCl<sub>3</sub> 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 NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 显色扫描结果;

6. 黄酮粗提液 NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 显色扫描结果。

图 3 NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 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 NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 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的吸收峰不吻合, 选择标准品吸收峰处 510nm 作为参考。

## 2.2 标准曲线的绘制

**ZrOCl<sub>2</sub> 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 ZrOCl<sub>2</sub> 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:  $Y_{284}=0.0114X-0.0001$ ,  $R^2=0.9991$ ;  $Y_{430}=0.008X+0.0001$ ,  $R^2=0.9992$ 。

**AlCl<sub>3</sub> 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 AlCl<sub>3</sub> 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:  $Y_{279}=0.0316X-0.0006$ ,  $R^2=0.9996$ ;  $Y_{415}=0.0315X-0.0002$ ,  $R^2=0.9999$ 。

**NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 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 NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 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:  $Y_{330}=0.0196X+0.0019$ ,  $R^2=0.9416$ ;  $Y_{510}=0.0727X+0.0004$ ,  $R^2=0.9999$ 。NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 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。

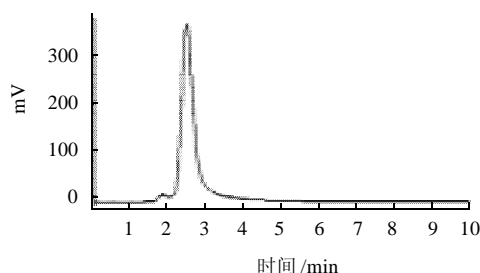


图 4 槲皮素标准品 HPLC 图谱  
Fig.4 Chromatogram of quercetin standard

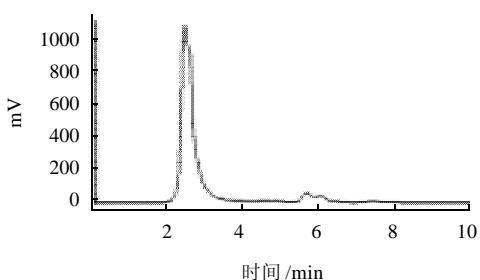


图 5 样品 HPLC 图谱  
Fig.5 Chromatogram of sample

## 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 <sub>2</sub> |             | AlCl <sub>3</sub> |             | Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> | 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, ZrOCl<sub>2</sub> 法在 430nm 处、AlCl<sub>3</sub> 法在 415nm 处测得量明显低于 HPLC 法, Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 法在 492nm 处、AlCl<sub>3</sub> 法在 279nm 处测得量明显高于 HPLC 法, ZrOCl<sub>2</sub> 法在 284nm 处测得量与 HPLC 法基本吻合。

NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 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, NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 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、肉桂酸类及原花色素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<sup>[12]</sup>, 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 ZrOCl<sub>2</sub> 形成黄色螯合物<sup>[3-4]</sup>(图 6), AlCl<sub>3</sub> 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 AlCl<sub>3</sub> 法仍然不能很好的排除干扰, 显然 ZrOCl<sub>2</sub> 法更适合软枣猕猴桃总黄酮的测定。

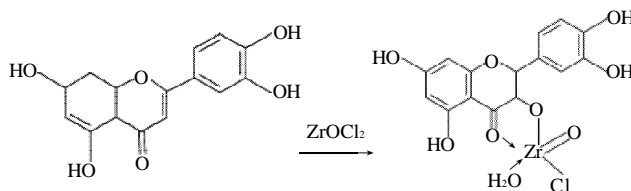


图 6 黄酮与 ZrOCl<sub>2</sub> 形成配合物的结构  
Fig.6 Reaction mechanism between flavonoids and ZrOCl<sub>2</sub>

## 2.4 ZrOCl<sub>2</sub> 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 ZrOCl<sub>2</sub> 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ZrOCl<sub>2</sub>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ZrOCl<sub>2</sub>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NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>法、ZrOCl<sub>2</sub>法、AlCl<sub>3</sub>法定量分析结果与HPLC测定结果比较,其中ZrOCl<sub>2</sub>法测定结果与HPLC测定结果基本一致。通过比较分析,得到了ZrOCl<sub>2</sub>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ZrOCl<sub>2</sub>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.