

富含维生素 C 食品中总黄酮含量的测定

虞哲高*, 林冰东*, 邢月寒, 王晓燕

(帝斯曼营养产品部中国研发中心, 帝斯曼中国有限公司, 上海 201203)

摘要: **目的** 建立富含维生素 C 食品中总黄酮的定量分析方法, 解决维生素 C 干扰络合法测定总黄酮的问题。**方法** 使用 Waters Sep-Pak C₁₈ 固相萃取小柱对提取物进行脱脂和去除色素, D101 大孔固相萃取(SPE)小柱去除维生素 C, 得到总黄酮洗脱液, 用硝酸铝比色法进行测定, 检测波长 510 nm。**结果** 总黄酮在 0~48 μg/mL 具有良好的线性关系, 相关系数为 0.9998, 相对标准偏差(RSD)小于 5%, 三个水平的添加回收率为 95.31%~98.38%。考察三种不同总黄酮和维生素 C 比例含量的食品(Vc:总黄酮=1:1, 2:1, 10:1), 发现随着维生素 C 含量增加, 对总黄酮测定结果的影响越大。因此,对样品进行前处理, 可以测得较为准确的总黄酮含量。**结论** 本方法样品前处理简单、环保、快速、准确, 适用于富含维生素 C 食品中总黄酮的含量测定。

关键词: 维生素 C; 总黄酮; 固相萃取; D101 大孔树脂; 硝酸铝比色法

Determination of total flavonoids in rich ascorbic acid food

YU Zhe-Gao*, LIN Bing-Dong*, XING Yue-Han, WANG Xiao-Yan

(DSM Nutritional Products China Research Center, DSM China Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: Objective To establish a quantitative analysis of total flavonoids with high content of ascorbic acid(vitamin C) in food and solve the interference of ascorbic acid on the measurement of total flavonoids by complexation reaction. **Methods** A solid phase extraction procedure was developed to degrease and remove pigments by Sep-Pak C₁₈, vitamin C was removed with D101 macro-porous resin, total flavonoids were determined by aluminum nitrate colorimetric using detection wavelength at 510 nm. **Results** The developed method was successfully used to determine total flavonoids in vitamin C rich fruits/plant extracts. It showed a good linearity in the range of 0~48 μg/mL with $r=0.9998$. The recoveries were 95.31%~98.38% at 3 spiked levels, and the relative standard deviations (RSDs) were less than 5%. Three kinds of food (ascorbic acid:flavonoids=1:1, 2:1, 10:1) were analyzed, which showed that higher ascorbic acid content could affect the testing result. So, it is necessary to remove the ascorbic acid before coloration in rich ascorbic acid products. **Conclusion** The method is suitable for simple, environmental, and effective determination of total flavonoids in rich ascorbic acid foods.

KEY WORDS: vitamin C; total flavonoids; solid phase extraction; D101 macro-porous resin; aluminum nitrate colorimetric

*通讯作者: 虞哲高, 硕士, 主要研究方向为食品/饲料检测。E-mail: Zhe-Gao.Yu@dsm.com

林冰东, 博士, 分析研究员, 主要研究方向为天然产物相关食品及保健品的分析和检测。E-mail: linda.lin@dsm.com

*Corresponding author: YU Zhe-Gao, Master, Nutrition Analytics Executive, Nutritional Products China Research Center, DSM China Co., Ltd., Shanghai 201203, China. E-mail: Zhe-Gao.Yu@DSM.com

LIN Bing-Dong, Scientist Analysis, Nutritional Products China Research Center, DSM China Co., Ltd., Shanghai 201203, China. E-mail: linda.lin@dsm.com

1 引言

天然生物类黄酮多为 2-苯基色原酮的衍生物,以糖苷形式存在,在蔬菜、作物和水果等植物中均有分布,具有保护心脑血管、利胆保肝、清除自由基、抗氧化、抗癌、抗菌、抗过敏、抗炎症、抗病毒等多种生物活性及药理作用,广泛应用于药品与保健品中。这些功效与其含有的黄酮类化合物有密切关系,建立相应的检测方法在食品和保健品中进行质量控制具有重要意义。

黄酮含量测定方法有多种^[1-3],如紫外分光光度法(直接法)^[4]、硝酸铝比色法(络合法)^[5]、液相色谱法^[6]、差示分光光度法^[7]等。硝酸铝比色法用于测定食品和保健品中总黄酮含量的常用方法,该方法也被中国药典所收载。液相色谱法主要应用于特定黄酮化合物或其黄酮苷元的测定,需要用标准品制备工作曲线,如需获得黄酮总量,要对黄酮在酸性条件下水解,操作繁琐并会引起黄酮苷元的降解造成测量误差^[6]。紫外分光光度法是直接通过测定特定波长的黄酮的吸收,专一性差,基底液中如含有具紫外吸收的物质会干扰测定,对含有复杂体系的食物如天然提取物等不适用。硝酸铝比色法,应用最为广泛,利用黄酮类成分被亚硝酸钠还原,与铝离子生成络合物,在氢氧化钠溶液碱性条件下溶液显橙红色,在 510 nm 波长处测定吸光度,测量样品中总黄酮的含量。

天然食品中会同时存在黄酮类化合物和维生素 C,维生素 C 和黄酮类物质也会作为添加剂一同加入到保健食品中。维生素 C 是抗氧化剂,具有复杂的作用机制,在特定条件下具有抗氧化促氧化双向作用^[8]。相关研究中发现高含量的维生素 C 会参与硝酸铝与黄酮的络合反应,使总黄酮的测定结果偏低。用于保健品中测定总黄酮含量的硝酸铝比色法^[5],未考虑高含量维生素 C 对总黄酮测定结果的影响。为解决维生素 C 干扰络合法测定总黄酮的问题,使富含维生素 C 这类食品有准确测定总黄酮含量的方法,有必要建立富含维生素 C 食品中总黄酮的定量分析方法。

2 材料与方法

2.1 材料和仪器

芦丁对照品(含量 92.8%,中国食品药品检定研

究所);异槲皮苷(含量 98%,北京恒元启天化工技术研究院);槲皮素(含量 98% 北京恒元启天化工技术研究院);紫云英苷(98%含量,北京恒元启天化工技术研究院);山萘酚(含量 98%,北京恒元启天化工技术研究院);无水乙醇(分析纯,上海润捷化学试剂有限公司);亚硝酸钠(分析纯,江苏强盛功能化学股份有限公司);九水合硝酸铝(分析纯,上海润捷化学试剂有限公司);氢氧化钠(分析纯,上海润捷化学试剂有限公司);桑叶提取物(宁波立华植物提取技术有限公司);抗坏血酸(分析纯,上海润捷化学试剂有限公司);沙棘荷叶复合浓缩液(北京宝得瑞食品有限公司);针叶樱桃冻干粉(Swissur GmbH 公司);刺梨果汁(Maruei 公司)。

紫外-可见分光光度仪(HELIOS ZETA, 美国 Thermo Scientific 公司);电子分析天平(AT 261, 瑞士 Mettler Toledo 公司);真空快速浓缩仪(SPD 2010, 美国 Thermo Scientific 公司);离心机(Multifuge X3R, 美国 Thermo Scientific 公司);数显控温水浴锅(DK-S14 型,上海森信实验仪器有限公司);多功能料理机(SS680-B, 上海余阳电器有限公司);冷冻干燥机(LSC, 德国 CHRIST 公司);-80℃ 冰箱(FORMA700 series plus, 美国 Thermo Scientific 公司);HPLC 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Sep-Pak-C₁₈ 固相萃取小柱(500 mg/3 mL, 美国 Waters 公司);D101 大孔吸附萃取小柱(500 mg/6 mL, 北京康农兴牧科技发展中心);Oasis HLB cartridge(500 mg/6 mL, 美国 Waters 公司);Discovery DPA-6s (500 mg/6 mL, 美国 SUPELCO 公司);

2.2 分析方法

2.2.1 标准曲线的制备

取芦丁对照品约 10 mg,精密称定,置于 50 mL 的棕色容量瓶中,加乙醇约 40 mL,超声处理 10 min,用乙醇定容至 50 mL。

精密量取对照品溶液 0、2、4、6、8、10 与 12 mL,分别置于 50 mL 容量瓶中,用乙醇溶液调节容量瓶内溶液体积,使每个容量瓶内溶液体积为 20 mL。在每个容量瓶中各加入亚硝酸钠溶液(5 g/100 mL)2 mL,混匀,放置 6 min;再各加入硝酸铝溶液(10 g/100 mL)2 mL,摇匀后放置 6 min;最后加 20 mL 1 mol/L 氢氧化钠溶液,加水至刻度,摇匀,放置 15 min。以未加对照品的容量瓶内的溶液作为空白溶液,在显

色反应后的最大吸收波长 510 nm 处测定吸光度。以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

2.2.2 样品的前处理

(1) 固体样品的前处理

称取样品 2 g(约含 350 mg 总黄酮), 粉碎, 混匀, 用滤纸包紧, 置于烧瓶内, 加入 30 mL 70%乙醇, 浸润后, 在 80 °C 水浴下回流 2 h。冷却后将提取液转移至 50 mL 容量瓶, 用少量 70%乙醇洗涤滤渣和烧瓶, 洗液并入容量瓶内, 用 70%乙醇定容。摇匀后取适量溶液, 以 4000 r/min 离心 10 min, 上清液作为溶液 A。取 10 mL 溶液 A 过 Sep-Pak-C₁₈ 固相萃取小柱, 初始的 5 mL 溶液润洗小柱, 收集后面约 5 mL 溶液, 作为溶液 B。取 2.0 mL 溶液 B 于 50 mL 的容量瓶内, 用 70%乙醇定容, 摇匀后作为样品测试时的空白溶液。另取 2.0 mL 溶液 B, 置于浓缩仪内, 在 60 °C 条件下旋转蒸发至干。冷却至室温后, 加 2 mL 水溶解, 残渣, 上样于 D101 大孔吸附固相萃取小柱内。对于不含有疏水性色素的样品可以略去 Sep-Pak-C₁₈ 的处理步骤。加入 10 mL 的水洗涤, 再用乙醇洗脱, 收集乙醇洗脱液 20 mL 转移至 50 mL 的容量瓶内。照标准曲线的制备项下的方法, 自加入亚硝酸钠溶液(5 g/100 mL) 2 mL 起, 按照紫外吸光度法测定吸光度。

(2) 液体样品的前处理

取液体样品 20 mL, -80 °C 冰箱冷冻 8 h, 冻干机干燥成固体。照固体样品的前处理进行操作, 测定。

2.2.3 分析结果计算

根据标准工作曲线, 求出相当于试样吸光度的芦丁的浓度 C, 按下式求出总黄酮的含量:

$$X = \frac{C \times 1250}{m \times 10^6} \times 100$$

式中: X——样品中总黄酮的含量(以芦丁计), g/100 g

C——根据标准曲线算出的样品溶液中黄酮浓度, μg/mL

m——样品的称样量, g

1250——样品的稀释体积, mL

2.2.4 高效液相色谱(HPLC)条件

色谱柱: Hydrosphere C₁₈(150 mm×4.6 mm I.D.), S-5 μm, 日本 YMC 有限公司); 柱温: 25 °C; 检测波长: 254 nm; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 5 μL; 流动相: 0.025%TFA 水溶液为 A 溶液, 0.025%TFA 乙腈为 B 溶液, 洗脱程序如下:

0~10 min, 流动相 A 70%→20%; 10~18 min, 流

动相 A 20%; 18~20 min, 流动相 A 20%→0%; 20~25 min, 流动相 A 0%; 25~27 min, 流动相 A 0%→70%。

3 结果和讨论

本文采用分光光度法测定食品中总黄酮的含量, 原理是基于黄酮类化合物与铝盐进行络合反应, 在碱性条件下能生成红色的络合物。根据 510 nm 波长处测得的吸光度, 在芦丁标准曲线上查得对应的黄酮浓度, 对待测物中总黄酮作定量分析。为解决维生素 C 干扰络合法测定总黄酮的问题, 在固相萃取小柱的选择和考察维生素 C 通过 D101 大孔固相萃取小柱前后的量的变化情况时, 需使用高效液相色谱, 其条件见 2.2.4。

3.1 样品前处理的优化

3.1.1 黄酮类物质在不同固相萃取小柱吸附和洗脱能力

相关文献报道, D101 大孔吸附树脂^[9,10], Oasis HLB 固相萃取柱吸附^[11]和聚酰胺柱^[5]等可用于黄酮成分的分离纯化。本文比较三种固相萃取小柱对黄酮类物质的吸附和洗脱能力。选取芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素和山萘酚 5 种黄酮标志性化合物进行分析。各取 1 mg 标样, 配置 5 个混标溶液于 10 mL 容量瓶中, 各取混标溶液 5 mL 于三种不同的固相萃取小柱上上样, 并用 5 mL 的乙醇作为洗脱剂, 收集柱前溶液和洗脱液分别注入高效液相色谱, 按 2.2.4 操作并计算回收率, 结果如表 1 所示。数据表明 5 种黄酮类物质在 D101 大孔吸附树脂上达到最优吸附和洗脱能力, 回收率都大于 90%。3.1.2 高含量维生素 C 对总黄酮测定的影响及其消除

以实验室自制样品(总黄酮:维生素 C=1:7.5, 其中总黄酮量为 2.40 g/100 g)为研究对象, 取 70%乙醇回流提取后溶液, 过 Waters Sep-Pak C₁₈ 固相萃取小柱后, 直接用硝酸铝比色法测定总黄酮含量。6 次测定总黄酮的平均含量 1.67 g/100 g, 相对标准偏差为 4.7%。将回流提取后溶液先经 D101 大孔吸附树脂固相萃取小柱处理, 再通过 Waters Sep-Pak C₁₈ 固相萃取小柱进行脱脂和去除色素, 用硝酸铝比色法测定总黄酮含量。6 次测定总黄酮的平均含量 2.34 g/100 g, 相对标准偏差为 3.5%。实验表明, 是否使用 D101 大孔吸附树脂固相萃取小柱, 对总黄酮检测的结果是有差异的。

表 1 3 种不同固相萃取小柱回收率比较(HPLC)
Table 1 Comparison of 3 different solid phase extraction recovery

化合物	固相萃取小柱处理后回收率 %		
	D101 大孔树脂	Oasis HLB	聚酰胺(Discovery DPA -6s)
芦丁	90.05%	84.56%	32.76%
异槲皮苷	96.10%	99.46%	35.01%
紫云英苷	92.60%	88.06%	28.83%
槲皮素	101.09%	44.09%	23.64%
山萘酚	100.01%	46.00%	52.67%

将未用 D101 大孔吸附树脂固相萃取小柱处理的待测液和经 D101 大孔吸附树脂固相萃取小柱处理的待测液分别注入 HPLC, 结果显示, 在经 D101 大孔吸附树脂固相萃取小柱处理的待测液中, 在色谱图中未发现维生素 C 的色谱峰(见图 1)。

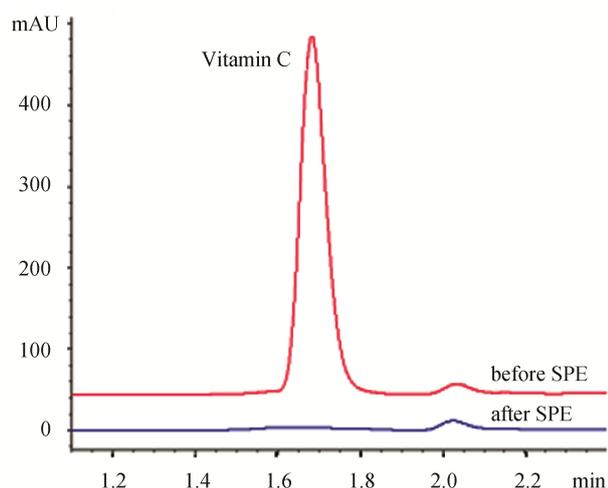


图 1 D101 大孔吸附树脂固相萃取小柱处理前后的色谱图比较

Fig. 1 Chromatogram of flavonoids with ascorbic acid solution before and after D101 macroporous resin solid phase extraction

上述实验结果表明, 黄酮类化合物吸附在 D101 大孔吸附树脂上, 用有机溶剂洗脱, 得到黄酮类的回收率高, 而维生素 C 在 D101 大孔吸附树脂上无吸附。在富含维生素 C 食品的前处理过程中, 使用 D101 大孔吸附树脂可有效去除维生素 C。

3.2 线性范围

选定 510 nm 作为测定波长, 以吸光度(Y)为纵坐标, 以芦丁质量浓度(X)为横坐标, 绘制标准曲线, 如

图 2 所示, 得出回归方程为 $Y=0.0151X+0.0023$, $r=0.9998$ 。由图可知, 在黄酮浓度 0~48 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内, 其浓度与吸光度有良好的线性关系。

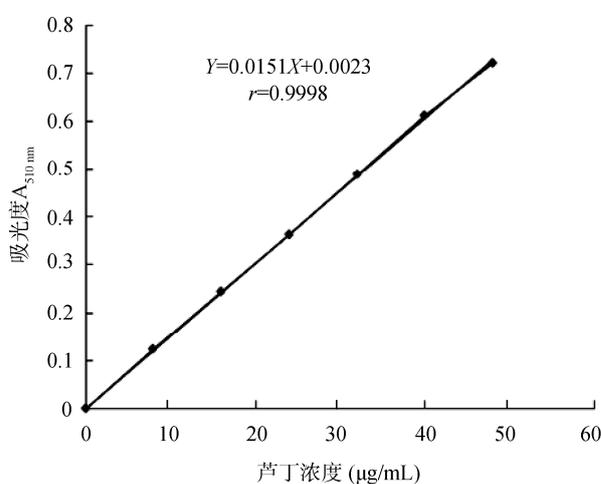


图 2 芦丁标准曲线

Fig. 2 The standard curve of rutin

3.3 精密度实验

按照 2.2 分析方法, 以实验室自制样品(总黄酮:维生素 C=1:7.5, 其中总黄酮量为 2.40 g/100 g)为研究对象采用分光光度法测定其精密度, 结果见表 2。由表 2 数据可知, 样品测定值和实际添加值基本一致, 6 个样品的相对标准偏差 < 5%, 表明此种方法对富含维生素 C 食品中总黄酮的测定精密度良好。

3.4 加标回收率实验

以实验室自制样品(总黄酮:维生素 C=1:7.5)为研究对象, 通过加标回收率实验来考察方法的准确度。自制样品中总黄酮的含量为 2.4 g/100 g, 以芦丁对照品为标准物质, 在 3 个添加水平进行回收率试验,

表 2 精密度实验结果 ($n=6$)
Table 2 Results of precision test ($n=6$)

名称	测定结果(g/100 g)						平均值(g/100g)	标准偏差	RSD(%)
样品 1	2.48	2.31	2.29	2.38	2.30	2.26	2.34	0.082	3.5%

表 3 加标回收率实验结果($n=3$)
Table 3 Results of recovery test ($n=3$)

添加水平	平均回收率(%)	相对标准偏差(%)
试样中黄酮:添加黄酮		
2:1	98.38	3.03
1:1	95.31	4.51
1:2	97.95	5.16

表 4 3 种食品总黄酮测定结果(分光光度法)
Table 4 Results of total flavonoids content of 3 kinds of foods

产品名称	产品信息		总黄酮含量		A 法与 B 法测定的 相对偏差
	内含维生素 C 与总黄酮比例(v/v)		A 法测定值(g/100 g)	B 法测定值(g/100 g)	
沙棘荷叶复合浓缩液	1:1		1.51	1.45	3.97%
刺梨	2:1		8.72	7.27	16.6%
针叶樱桃	10:1		1.52	1.09	28.3%

注: A 法指使用 D101 大孔吸附树脂固相萃取小柱, 按 2.2 分析方法中操作步骤测定。

B 法指未使用 D101 大孔吸附树脂固相萃取小柱, 黄酮提取液直接过 Waters Sep-Pak C₁₈ SPE 小柱。

每个水平重复 3 次。3 个添加水平依此为样品中黄酮: 添加黄酮=2:1, 样品中黄酮:添加黄酮=1:1, 样品中黄酮:添加黄酮=1:2。测得的回收率在 95.31%~98.38% 之间, 相对标准偏差为 3.03%~5.16%, 结果见表 3。

3.5 实际样品检测结果

使用本方法检测含有黄酮的提取物 3 种, 分别是沙棘荷叶复合浓缩液, 针叶樱桃和刺梨冻干粉。从表 4 数据可以看出, 随着维生素 C 比例增大, 在不去除维生素 C 条件下, 对总黄酮含量的影响也逐渐增大。因此, 对富含维生素 C 的食品进行总黄酮测定时, 本方法可有效去除维生素 C, 确保总黄酮测定结果的准确性。

尚没有文献报道高浓度维生素 C 下测定总黄酮的有效方法。为评定文中方法的可靠性, 以实验室自制的 3 批样品, 按文中的方法测定总黄酮的含量。这 3 批自制样品, 总黄酮:维生素 C=1:7.5, 总黄酮的添加值为 2.4 g/100 g。测试结果显示。这三批样品的总黄酮的含量分别为 2.21 g/100 g, 2.33 g/100 g 和 2.26 g/100 g。

4 结 论

本文建立富含维生素 C 食品中总黄酮的测定方法, 开发简单的样品前处理方法, 即联合使用 Waters Sep-Pak C₁₈ 和 D101 大孔吸附树脂固相萃取小柱对食品进行脱脂, 去除色素与维生素 C。避免在维生素 C 高浓度的环境下对总黄酮测定的影响。在制备样品的同时, 制备与样品溶液对应的空白溶液, 扣除背景吸收, 以提高测定的准确性。精密度实验和加标回收率实验表明该方法能满足分析要求, 回收率高, 大于 90%。本文为准确测定食品, 特别是富含维生素 C 食品中总黄酮的含量提供依据, 具有较高的实际应用价值。

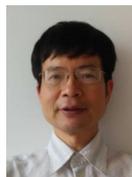
参考文献

- [1] Megan EW, Lisa J. Mauer. Development of an integrated approach for the stability testing of flavonoids and ascorbic acid in powders [J]. Food Chem, 2011, 129: 51-58.
- [2] 肖香兰, 罗仁才, 张楠. 保健食品中总黄酮的测定方法[J]. 中

- 国卫生检验杂志, 2007, 17(6): 1037.
- Xiao XL, Luo RC, Zhang N. Determination of total flavonoids in health food [J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, 17(6): 1037.
- [3] 于村, 俞莎, 沈向红. 保健食品中总黄酮测定方法的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(4): 401-402.
- Yu C, Yu S, Shen XH. Study on determination method of general flavone in health foods [J]. Chin J Health Lab Technol, 2002, 12(4): 401-402.
- [4] 刘建祥, 李英, 卢新宁, 等. 保健食品中总黄酮的提取及含量测定研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(9): 116-118.
- Liu JX, Li Y, Lu XN, *et al.* Study on the extraction technology and determination of the flavonoid in health food [J]. Food Res Devel, 2008, 29(9): 116-118.
- [5] 王光亚. 保健食品功效成分检测方法 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002.
- Wang GY. Determination of efficacy in health food [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2002.
- [6] 彭永芳, 马银海, 郭亚东, 等. 高效液相色谱法快速测定三白草中黄酮类物质[J]. 理化检验-化学分册, 2007, 43: 463-464, 467.
- Peng YF, Ma YH, Guo YD, *et al.* Rapid determination of flavonoid in *Saururus chinensis* (Lour) baill by high performance liquid chromatography [J]. Phys Test Chem Anal, (Part Chem Anal), 2007, 43: 463-464, 467.
- [7] 池玉梅, 于生, 郭戎, 等. 差示分光光度法测定猫爪草中总黄酮的含量[J]. 江苏中医药, 2007, 39(12): 56-58.
- Chi YM, Yu S, Guo R, *et al.* Determination of flavonoids from radix ranunculi ternati with difference spectrophotometry [J]. Jiangsu J Tradit Chin Med, 2007, 39(12): 56-58.
- [8] 崔乃杰, 崔乃强, 傅强, 等. 维生素 C 抗氧化促氧化双向作用的研究[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2004, 10(6): 419-421.
- Cui NJ, Cui NQ, Fu Q, *et al.* Bidirectional effect of vitamin C on pro-oxidation/antioxidation [J]. Chin J Surg Integrated Tradit West Med, 2004, 10(6): 419-421.
- [9] 裴咏萍, 李维林, 张涵庆. 大孔树脂对红凤菜总黄酮的吸附分离特性研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(1): 8-9.
- Pei YP, Li WL, Zhang HQ. The property of the macroporous resin for isolation of total flavones from *Gynura bicolor DC* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2010, 21(1): 8-9.
- [10] 胡志军, 郝利君, 王南溪, 等. D-101 大孔吸附树脂分离纯化橘皮中的黄酮类物质[J]. 食品科学, 2010, 31(8): 61-69.
- Hu ZJ, Hao LJ, Wang NX, *et al.* Purification of crude total flavonoids extracted from citrus peel using D-101 macroporous adsorption resin [J]. Food Sci, 2010, 31(8): 61-69.
- [11] 梁铖, 卢焕仙, 刘宏程, 等. 蜂蜜黄酮类化合物检测方法建立及其在云南 5 种特色蜂蜜中的分布[J]. 食品科学, 2013, 34(6): 148-151.
- Liang C, LuH X, Liu HC, *et al.* Establishment of determination method for flavonoids in honey and distribution of flavonoids in 5 kinds of characteristic honey from Yunan [J]. Food Sci, 2013, 34(6): 148-151.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



虞哲高, 硕士, 主要研究方向为食品/饲料检测。

E-mail: Zhe-Gao.Yu@DSM.com



林冰东, 博士, 分析研究员, 主要研究方向为天然产物相关食品及保健品的分析和检测。

E-mail: linda.lin@dsm.com