

保健酒中总黄酮测定方法的比选

金 红¹,段 辉²,何亚敦²,张 礼²,刘 飞²

(1.甘肃省轻工业科学研究所,甘肃 兰州 730000;2.敦煌酒业有限责任公司,甘肃 敦煌 736201)

摘 要: 比较了测定保健酒中总黄酮含量的两种方法。方法一以芦丁为对照品,硝酸铝-亚硝酸钠为显色剂,在波长 500 nm 处测定,方法二以 360 nm 处直接测定保健酒中黄酮的含量,不需硝酸铝显色。结果表明,方法二的 RSD 为 2.61%,略优于方法一的 RSD (2.79%);方法二灵敏度高,操作简便,结果可靠。

关键词: 保健酒; 总黄酮; 分光光度法

中图分类号: TS262.91 ;TS261.4 ;TS261.7 ;O657.3 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-9286(2009)02-0079-03

Comparison and Selection of the Determination Methods of Total Flavonoids Content in Healthcare Wine

JIN Hong¹, DUAN Hui², HE Ya-dun², ZHANG Li² and LIU Fei²

(1. Light Industry Scientific Research Institute of Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730000;

2. Dunhuang Wine Industry Co. Ltd., Dunhuang, Gansu 736201, China)

Abstract: The two determination methods of total flavonoids content in healthcare wine were compared. Method one used rutin as the contrast sample and the revealing agent was $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ and the detection was operated at 500 nm wavelength. Method two could be used to measure total flavonoids content directly at 360 nm wavelength without the use of $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$. The measurement results showed that RSD of method two (2.61 %) was better than RSD of method one (2.79 %) and method two had the advantages including high sensitivity, simple operation and reliable measurement results.

Key words: healthcare wine; total flavonoids; spectrophotometry

总黄酮具有氧自由基清除作用等多种生理活性,黄酮类化合物可能具有防治慢性退行性疾病的作用,大量细胞培养研究和动物实验结果均表明,一些类黄酮物质具有较强的抗氧化作用、抗微生物、螯合金属离子、保护 DNA;抑制低密度脂蛋白(LDL)氧化和肿瘤细胞生长等作用。因此,食物类黄酮物质生物学作用及其机制的研究已成为当今营养与食品科学研究领域内热点之一。研究保健酒中总黄酮的含量,对甘肃省中药材资源合理利用大有裨益。本文采用国家食品药品监督管理局先后公布的保健食品中总黄酮测定的两种方法进行比对,从而选定其中一种方法作为我公司保健酒中总黄酮含量的测定方法。

1 材料与方法

1.1 仪器

722S 分光光度计:上海精密科学仪器有限公司;真空干燥箱:北京科伟永兴仪器有限公司;电热恒温水浴锅:北京科伟永兴仪器有限公司;真空泵:上海豫康科教仪器设备有限公司 DT-100A 分析天平:北京医用天平

厂。

1.2 试剂

芦丁标准品:AC,南京替斯艾么中药技术研究所;甲醇:AC,天津市科密欧化学试剂有限公司;亚硝酸钠:AC,西安化学试剂厂;硝酸铝:AC,天津市科密欧化学试剂有限公司;氢氧化钠:AC,烟台市双双化工有限公司;苯:AC,天津市科密欧化学试剂有限公司;聚酰胺:30~60 目,上海中泰化学试剂有限公司;敦煌牌力酒:敦煌酒业有限责任公司。

1.3 实验方法

1.3.1 方法一

绝大部分的黄酮分子中均含有邻二酚羟基,这类分子在 NaNO_2 作用下,产生邻二醌结构,再在碱性条件下,与 Al^{3+} 形成红色络合物,在一定波长下有最大吸收峰的特点时,进行比色分析,测定其含量。

1.3.1.1 标准曲线的制作

精密称取在 120 °C 减压干燥至恒重的芦丁对照品 21 mg 于小烧杯中,取适量甲醇溶解,转移至 100 mL 量瓶中,定容至 100 mL 摇匀,即得(每 1 mL 中含无水芦

收稿日期:2008-10-13

作者简介:金红(1968-),女,工程师,学士。

丁 0.21 mg) 芦丁溶液。

分别精确量取标准芦丁溶液 0 mL、1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL、5.0 mL 和 6.0 mL, 分别置于 25 mL 比色管中, 各加水至 6 mL, 添加 0.7 mL/L 的亚硝酸钠溶液 1.0 mL, 混匀, 放置 6 min, 加 0.5 mL/L 的硝酸铝溶液 1.0 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 1 mol/L 的氢氧化钠试液 10.0 mL, 再加水至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 用 1 cm 比色皿, 在分光光度计的 500 nm 波长处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标, 得出标准曲线的回归方程。线性回归方程为 $y = 0.458x - 0.0048$, 相关系数 $r=0.9997$ 。标准曲线见图 1。

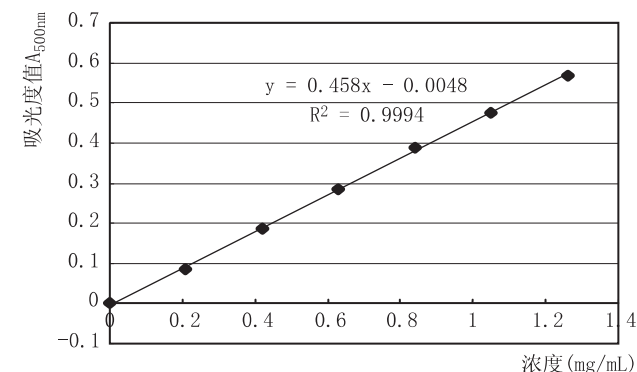


图 1 芦丁标准曲线

1.3.1.2 样品的制备

精密量取 5 mL 敦煌牌力酒, 置于水浴上蒸干, 以甲醇溶解, 过滤, 滤液至 100 mL 容量瓶中, 并定容至刻度, 摇匀即得。

1.3.1.3 样品含量的测定

吸取待测样液 2 mL 及 2 mL 蒸馏水作为空白对照, 分别置于 25 mL 比色管中, 加水至 6 mL, 及加 0.7 mL/L 的亚硝酸钠溶液 1.0 mL, 混匀, 放置 6 min, 加 0.5 mL/L 的硝酸铝溶液 1.0 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 1 mol/L 的氢氧化钠试液 10.0 mL, 再加水至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 用 1 cm 比色皿, 在分光光度计的 500 nm 波长处测定吸收度, 对比标准曲线, 计算总黄酮含量。

1.3.1.4 重复性实验

吸取一定量的样品, 测定吸光度, 重复测定 6 次, 得出敦煌牌力酒中总黄酮含量, $RSD=2.79\%$ 。

1.3.1.5 标准回收率实验

对已测定含量的样品敦煌牌力酒, 添加一定标准品芦丁, 测定回收率。结果见表 1。

由表 1 可计算出, 其平均回收率为 101.13%, 标准差为 2.82, RSD 为 2.79%。

1.3.2 方法二

许多黄酮分子在 360 nm 波长处有最大的吸收值。

表 1 方法一回收率测定结果 (n=6)

加入标准芦丁量 (mg)	回收芦丁 (mg)	回收率 (%)
4.0027	3.9411	98.46
	3.9074	97.62
	3.9411	98.46
4.0027	4.1604	103.94
	4.1772	104.36
	4.1604	103.94
4.0027	4.0423	100.99
	3.9074	97.62
	3.8906	97.20
4.0027	4.1100	102.68
	4.0928	102.25
	4.0759	101.83
4.0027	3.9751	99.31
	3.9579	98.88
	3.9579	98.88
4.0027	4.1940	104.78
	4.1940	104.78
	4.1772	104.36

1.3.2.1 标准曲线的制作

称取 4.2 mg 芦丁, 加甲醇溶解并定容至 100 mL, 即得 42 mg/mL。分别吸取芦丁标准溶液: 0 mL、1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL 和 5.0 mL, 于 10 mL 比色管中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 于波长 360 nm 比色。测定标准曲线, 求出回归方程为 $y = 0.0233x + 0.0098$, $r=0.9992$ 。标准曲线见图 2。

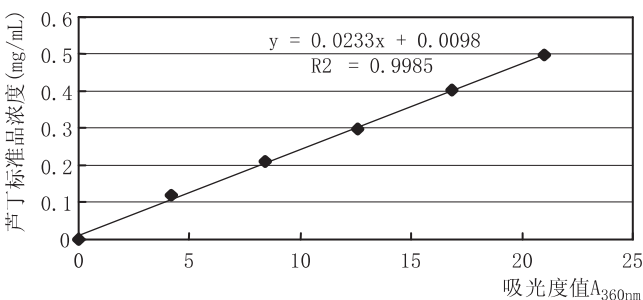


图 2 芦丁在 360 nm 处的标准吸收曲线

1.3.2.2 样品的制备

吸取样液敦煌牌力酒 1.0 mL, 于蒸发皿中, 加 1 g 聚酰胺粉吸附, 于水浴上蒸发掉乙醇, 然后转入层析柱。先用 20 mL 苯洗, 苯液弃去, 然后用甲醇洗脱黄酮, 定容至 25 mL, 样液待测。

1.3.2.3 样品的测定

以甲醇为空白, 将待测样液于 1 cm 比色皿中, 于波长 360 nm 测定吸光度值。依据回归方程, 计算试样中总黄酮含量。

1.3.2.4 重复性实验

吸取一定量的样品, 测定吸光度, 重复测定 6 次, 得

出敦煌牌力酒中总黄酮含量, RSD=2.61 %。

1.3.2.5 回收率实验

对已测定含量的样品敦煌牌力酒, 添加一定标准品芦丁, 测定回收率。结果见表 2。

表 2 方法二回收率测定结果 (n=6)

加入标准芦丁量 (mg)	回收芦丁 (mg)	回收率 (%)
4.0027	3.9142	97.79
	3.8957	97.33
	3.9043	97.54
4.0027	3.8957	97.33
	3.9171	97.86
	3.9729	99.26
4.0027	4.0330	100.76
	3.9686	99.15
	3.9605	98.95
4.0027	3.9772	99.36
	4.1231	103.01
	4.1188	102.90
4.0027	4.1231	103.01
	4.1103	102.69
	4.1317	103.22
4.0027	3.8485	96.15
	3.8485	96.15
	3.8485	96.15

由表 2 可计算出, 表 2 中的平均回收率为 99.37 %, 标准差为 2.60, RSD 为 2.61 %。

2 结果与分析

由于保健酒中黄酮分子结构及含量的多重性, 其不同波长下的吸光度也有很大的差异, 本实验采用两种不同的检测方法对保健酒中总黄酮的含量进行测定分析, 并进行了回收率的试验, 根据实验结果, 两种测定方法各有利弊。

2.1 方法一的优缺点

方法一测定的数据有较好的稳定性, 但是存在不足。表现在: ①在对样液进行处理的过程中, 用甲醇对经过水浴蒸干的样品进行甲醇溶解过程中, 如果没有用甲醇进行浸泡、研磨、多次浸溶, 测定出来的数据重复性较差; ②在进行吸光度的测定过程中, 黄酮分子在碱性条件下, 与 Al^{3+} 形成的红色络合物性质不稳定, 随着时间的推移会发生褪色, 吸光度的测定必须在 10 min 内完

成; ③有 3 种以上的试剂参与试验, 同时, 加入试剂后, 要保证一定的反应时间, 某些黄酮分子与试剂的化学反应不显色, 或者显色后不稳定, 很快褪色, 均会影响测定的结果; ④空白对照采用的是 2.0 mL 蒸馏水, 而样品的溶解均为甲醇, 包括标准曲线的制作都是用甲醇进行溶解, 经过测试, 空白对照用 2.0 mL 的甲醇比用 2.0 mL 的蒸馏水的数据略高。

2.2 方法二的优缺点

方法二测定黄酮, 采用黄酮经甲醇溶解后, 直接测定其吸光度, 测定的数据有较好的重复性。

但也存在不足: ①本方法采用吸取样液 1.0 mL 于蒸发皿, 然后加入 1 g 聚酰胺粉进行吸收, 但是, 有部分的样液没有被聚酰胺粉吸附, 而是附着在蒸发皿的表面, 对数据有影响; ②将吸附了样液的聚酰胺粉转入层析柱时, 有部分聚酰胺粉颗粒散落在层析柱的外面, 影响分析的结果; ③该方法没有提供聚酰胺粉颗粒的粗细, 即目数的范围; 用苯洗脱时和用甲醇洗脱时的流速。④本方法没有说明用甲醇洗脱的终点应无色为止, 经过试验发现, 该方法对于黄酮含量较低的样品测试的数据较准确, 重现性也很好, 但是, 对于黄酮含量较高的样品测试的数据偏低, 经过分析和反复的试验, 如果样品的黄酮含量较高时, 25 mL 的甲醇根本没有把聚酰胺粉中吸附的黄酮分子洗脱完, 必须增加洗脱甲醇的用量, 等到洗脱下来的甲醇呈无色时, 再定容, 否则, 数据的误差较大。

3 结论

方法一以芦丁为对照品, 硝酸铝-亚硝酸钠为显色剂, 在波长 500 nm 处测定保健酒中的总黄酮含量, 与方法二在波长 360 nm 处直接测定保健酒中黄酮的含量, 不需硝酸铝显色, 实验结果比较, 方法二的 RSD 为 2.61 % 略优于方法一的 RSD 2.79 %, 方法二灵敏度高, 操作简便, 结果可靠。

参考文献:

- [1] 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. 159-160.
- [2] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

洋河酒厂跨入行业第一方阵

本刊讯 2008 年, 江苏洋河酒厂实现销售收入 37.4 亿元, 同比增长 52 %; 入库税收 9.13 亿, 同比增长 48 %。主营业务收入进入全国白酒行业第四位, 以稳健的脚步跨入行业第一方阵。

2006 年, 洋河酒厂销售收入达到 14 亿元; 2007 年, 销售收入突破 24 亿元; 2008 年, 销售收入突破 37 亿元。3 年间, 洋河酒厂实现了快速可持续发展, 实现了发展“三级跳”。

与此同时, 江苏洋河酒厂的单品牌蓝色经典的销售收入也突破 24.25 亿元, 同比增长 68.5 %, 雄踞江苏中高端白酒市场第一, 并被国家工商总局认定为行业最年轻的“中国驰名商标”, 获得了代表中国营销领域最高成就的“中国营销创新奖”。(小江)