

分光光度法测定保健食品中总黄酮的含量

肖 晶 杨大进

(中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘 要:为建立一种检测保健食品中总黄酮含量的快速分析方法,以活性成分芦丁为标准品,在其紫外最大吸收峰 415 nm 处测定其总黄酮的含量。方法的最低检测浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$,芦丁标准品在 1.0 ~ 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内具有良好线性关系。平均加样回收率为 97.62%,相对标准偏差为 1.85%。该方法简便,重现性好,可作为检测保健食品中总黄酮含量方法之一。

关键词:分光光度法;营养保健品;黄酮类;食品分析

Quantitative Determination of total flavonoid in health foods by spectrophotometry

Xiao Jing, et al.

(National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021)

Abstract: A quick analysis method was established for the determination of total flavonoid in health foods. The absorption maxima of UV was at the wavelength of 415 nm by Lutin as standard. The detection limit was 0.1 $\mu\text{g/mL}$. There was a good linear relationship within the range of 1.00 ~ 25.00 $\mu\text{g/mL}$. The average recovery rate was 97.62%, RSD was 1.85%. This method is simple and reproducible. It may be one of the available methods for the determination of total flavonoid in health foods.

Key Words: Spectrophotometry; Dietary Supplements; Flavones; Food Analysis

黄酮类化合物广泛分布于植物界,大部分以甙的形式存在,种类较多。其生理作用^[1]也是多种多样的。例如芦丁、槲皮素、槲皮甙能增强心脏收缩,减少心脏搏动次数。有些黄酮类化合物还可以作甜味剂。总之,黄酮类化学成分的生物活性是多方面的,因而是药品、保健食品中的重要功效成分之一。

对制剂中黄酮类成分的测定,主要有薄层色谱法、高效液相色谱法和比色法。^[2]前两种方法需要多种类的单体标准品,且操作不便。黄酮类的比色法操作相对简单、快速,一般有不加显色剂和加显色剂两大类方法。不加显色剂法是将样品提取液直接在 360 nm 处测定吸收值,加显色剂法是在样品提取液中加入显色剂后,最大吸收峰向高波长移动,以此得到稳定的特征吸收峰,与芦丁标准品系列比较定量。

在保健食品的黄酮含量测定中,目前通用的是比色法,这一方法多用于总黄酮含量的测定。该方法的测定是将样品提取液过聚酰胺柱,用苯去除杂

质,甲醇洗脱,360 nm 处测定吸收值。这种方法往往样品损失大,上样量及聚酰胺粉用量不好掌握。此外,使用苯做洗脱剂毒性大,造成测定结果不准确。本实验是在样品提取液中加入显色剂,使铝盐与黄酮类化合物络合,吸收带向高波长移动,进一步消除因使用低波长测定而带来的杂质干扰,以便更准确地测定样品中黄酮的含量。

本实验方法是在中药“独一味胶囊”^[3]的总黄酮含量的测定方法上加以改进。原方法是将样品微热提取黄酮。而保健食品一般成分比较复杂,微热不能提取完全,改用超声提取。此外,原方法使用的显色剂亚硝酸钠、硝酸铝中,亚硝酸钠与有机物接触放出有毒和刺激性的气体,对人体造成伤害,污染环境。本实验改用三氯化铝为显色剂,得到稳定的特征吸收峰,与芦丁标准品系列比较定量。改进后不仅前处理简单,操作简便,重现性好,而且可以避免使用一些有毒试剂,污染环境。

基金项目:卫生部保健食品专项基金课题(BJ-01-20)

作者简介:肖 晶 女 硕士

This work was supported by the Special Health Food of Ministry of Health, China. (BJ-01-20)

1 实验原理 黄酮类化合物是泛指两个苯环(A环与B环)通过中央三碳相互连接而成的一系列化合物,由于其结构特点,多数黄酮类化合物在240~500 nm的区域内有两个吸收带,均由A环或B环的不同酰基系统电子跃迁引起,可用加入各种诊断试剂后得到的光谱图作为黄酮类化合物结构鉴定的依据之一。^[4]在适宜的pH条件下,黄酮类化合物与铝盐生成络合物,使带或带向高波长移动,以此得到稳定的特征吸收峰,与芦丁标准系列比较定量。

2 材料和方法

2.1 仪器与试剂 Biospec-1601型光谱仪,日本SHIMADZU公司;EB-330H型电子天平;芦丁标准品,中国药品生物制品检定所提供。三氯化铝(0.1 mol/L):取三氯化铝1.33 g,加乙醇至100 mL。醋酸钾(1 mol/L):取醋酸钾10 g,加水至100 mL。乙醇为分析纯。

2.2 标准品溶液的制备 取干燥至恒重的芦丁标准品20 mg,置100 mL量瓶中,加70%乙醇适量使溶解,并稀释至刻度,摇匀,每1 mL中含芦丁0.2 mg。

2.3 试样溶液的制备 称取一定量的试样(大约含芦丁50 mg),置三角瓶中,精确加入70%乙醇50 mL,称定重量,超声提取30 min,再称定重量,加70%乙醇补足减失重量,摇匀,过滤,取滤液备用。

2.4 校正曲线的制备 精密吸取标准溶液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,分别置10 mL量瓶中,各加70%乙醇适量,使成5.0 mL。各加0.1 mol/L三氯化铝溶液2 mL,1 mol/L醋酸钾溶液3 mL,加70%乙醇至刻度,摇匀,放置30 min,同时作空白。按分光光度法,在420 nm的波长处测定吸收度,以吸收度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制校正曲线。

2.5 采用校正曲线法定量 本方法总黄酮的含量是以芦丁计算。

计算公式:

$$Cx = \frac{x}{m} \times \frac{100}{1000 \times 1000} \times 25$$

式中: Cx—试样中总黄酮含量(以芦丁计), g/100 g;
x—由校正曲线求得被测液中总黄酮含量, μg; m—试样质量, g; 25—稀释倍数。

3 结果与讨论

3.1 提取溶剂和提取时间的选择 芦丁可溶于甲醇、乙醇,将试样分别采用不同溶剂溶解,超声提取30 min加以比较,结果表明70%甲醇、70%乙醇、甲醇、乙醇提取较为完全,但考虑到甲醇、乙醇提取的杂质较多,甲醇污染环境等因素,故采用70%乙醇作为提取溶液,结果见表1。

分别考察试样用70%乙醇超声提取10、20、30、45和60 min的效果。实验结果表明,试样超声提取30 min后,含量即可保持恒定,因此选择30 min作为提取时间,结果见表2。

表1 不同溶剂的提取结果比较 g/100 g

30%甲醇	1.57
30%乙醇	1.55
50%甲醇	1.89
50%乙醇	1.90
70%甲醇	2.10
70%乙醇	2.11
甲醇	1.95
乙醇	1.90

表2 不同提取时间的比较

提取时间 min	含量 g/100 g
10	1.52
20	1.89
30	2.11
45	2.10
60	2.12

3.2 显色剂和测定波长的选择 目前,在测定保健食品黄酮含量的分光光度法中,多数是将提取液直接在360 nm处测定,由于低波长,杂质干扰往往较大,影响测定结果,故采用铝盐显色的方法进行测定。现将加显色剂和不加显色剂两种比色法加以比较,将芦丁对照液及保健食品配成适当浓度,用试剂做空白,在200~600 nm范围扫描,见图1。另取同样浓度的芦丁和保健食品试样液加入显色剂,在相同波长范围扫描,见图2。从图1可见未加显色剂时在400~600 nm区无最大吸收峰,且与基线几乎重合,表明在此波长范围它们本身的色泽对测定无干扰;在200~400 nm区芦丁和保健食品液的最大吸收峰位置不同。从图2可见加显色剂后芦丁对照液和样品液,分别在420 nm与419.5 nm处各有一吸收峰,在200~400 nm区峰形不规则。为此选择420 nm为芦丁对照液和保健食品液的测定波长。

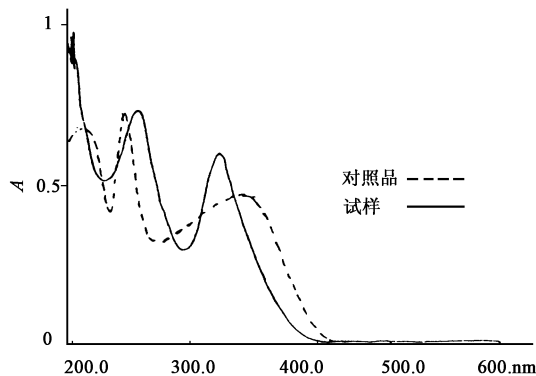


图1 芦丁对照品及试样未加显色剂的光谱图

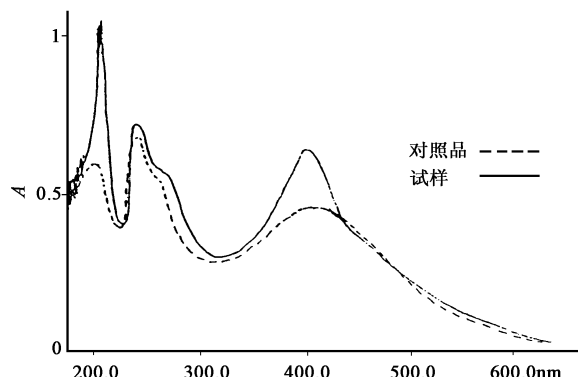


图2 芦丁对照品及试样加入显色剂的光谱图

3.3 方法线性范围及最低检测限 回归方程 $y = 0.0320x - 0.00715$, $r = 0.9999$ 。表明芦丁标准品在 $1.00 \sim 25.00 \mu\text{g/mL}$ 范围内具有良好线性关系,结果见表3。

方法的最低检测浓度为 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 。

表3 校正曲线与回归方程 $\mu\text{g/mL}$

编号	0.2	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	
芦丁对照品	0.966	2.42	4.83	9.66	14.5	19.3	24.2	x
A	0.024	0.070	0.142	0.309	0.458	0.606	0.767	y

3.4 精密度试验 取保健食品试样各5份,依照上述方法测定黄酮含量,计算精密度,结果见表4。

表4 精密度试验结果 $\text{g}/100 \text{g}(\text{mL})$

试样	剂型	1	2	3	4	5	均值	RSD %
1	片剂	1.60	1.65	1.73	1.61	1.70	1.66	3.40
2	丸剂	0.56	0.50	0.50	0.55	0.53	0.53	5.26
3	胶囊剂	1.18	1.15	1.23	1.25	1.19	1.20	3.33
4	胶囊剂	1.79	1.77	1.80	1.90	1.85	1.82	2.89
5	茶剂	2.11	2.10	2.20	2.09	2.21	2.14	2.71
6	口服液	22.20	23.20	25.10	22.80	24.30	23.50	4.97

3.5 回收率试验 采用加样回收法,取已知含量的保健食品试样适量,分别精密加入芦丁标准品溶液(1.51 mg 芦丁标准品,加 70% 乙醇稀释至 10 mL ,浓度为 0.151 mg/mL) 1 mL (1.51 mg)、 2 mL (3.02 mg),按上述测定方法操作,计算回收率,结果见表5,表明本法具有良好的回收率。

3.6 稳定性考察 取保健食品试样按上述测定方法操作,每隔 1 h 测定 1 次,结果表明吸收值在 5 h

内保持稳定(结果见表6)。

表5 回收率试验结果 mg

试样	取样量 g	本底	加标量	实测值	回收率 %	平均回收率 %
1	0.150	2.49	1.51	3.84	89.40	90.72
	0.157	2.61	3.02	5.39	92.05	
2	0.501	2.66	1.51	3.99	88.08	88.74
	0.503	2.67	3.02	5.37	89.40	
3	0.208	2.50	1.51	3.86	90.07	90.56
	0.212	2.54	3.02	5.29	91.06	
4	0.150	2.73	1.51	4.12	92.05	93.04
	0.159	2.89	3.02	5.73	94.04	
5	0.153	3.23	1.51	4.68	96.03	97.18
	0.141	2.98	3.02	5.95	98.34	
6	10 mL	2.35	1.51	3.64	85.43	85.92
	10 mL	2.35	3.02	4.96	86.42	

表6 稳定性考察结果

试样	RSD % ($n = 5$)
1	1.23
2	1.55
3	1.98
4	1.34
5	1.86
6	2.01

对于某些成分复杂的保健食品,如含油脂、色素较多,杂质干扰大的样品,可根据紫外分光光度法的谱图参考使用,或使用导数分光光度法,解决光谱干扰,消除背景吸收,提高光谱分辨率。还可使用双波长薄层扫描法或高效液相色谱法等方法来测定。

参考文献:

- [1] 肖崇厚,主编. 中药化学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1997,595.
- [2] 阚毓铭,主编. 中药制剂分析[M]. 南京:南京大学出版社,1992,293.
- [3] 国家药典委员会,编. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社出版,2000,533.
- [4] 侯世祥,邓定刚,蒋学华,等. 复方中药制剂中总黄酮含量测定方法探讨[J]. 华西药学杂志,1993,8(3): 131—134.

[收稿日期:2003-02-23]

中图分类号:R15;Q657.32 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2003)06-0505-03