

# 苦荞酒中总黄酮含量的测定

安 军

(海南椰岛酒业发展有限公司, 海南海口 570100)

**摘 要:** 本文采用分光光度法测定苦荞酒中的总黄酮含量。在弱碱性条件下, 苦荞酒中的黄酮类物质与显色剂中的三价铝离子结合生成具有特征峰的有色络合物, 在 510 nm 处测其吸光度, 在 0 ~ 205.682  $\mu\text{g}$ , 该络合物的吸光度与黄酮类的含量成正比。通过精密度、重复性、回收率和检出限等相关实验均符合分析标准要求, 得出苦荞酒中总黄酮含量的检测方法。实验结果表明, 该方法操作简便、灵敏度高、结果准确可靠。

**关键词:** 苦荞酒; 总黄酮; 分光光度法

DOI:10.16043/j.cnki.cfs.2022.23.040

## Determination of Total Flavonoids in Tartary Buckwheat Wine

AN Jun

(Hainan Yedao Wine Development Co., Ltd., Haikou 570100, China)

**Abstract:** In this paper, the content of total flavonoids in tartary buckwheat wine was determined by spectrophotometry. Under weak alkaline conditions, flavonoids in tartary buckwheat wine combined with trivalent aluminum ions to form a colored complex with characteristic peaks. Its absorbance was measured at 510 nm. At 0 ~ 205.682  $\mu\text{g}$ , the absorbance of the complex was directly proportional to the content of flavonoids. Through the precision, repeatability, recovery, detection limit and other related experiments, the detection method of total flavonoids in tartary buckwheat wine was obtained. The experimental results show that the method is simple, sensitive, accurate and reliable.

**Keywords:** tartary buckwheat wine; total flavonoids; spectrophotometry

苦荞麦具有较高的营养价值, 含有蛋白质、生物类黄酮、多种维生素、纤维素和 18 种氨基酸等多种成分。此外, 它还是一味药用价值较高的中药。现代医学研究表明, 苦荞麦具有降血糖、降血脂、抗疲劳和增强免疫的功能, 这都与其中所含的黄酮类化合物有关<sup>[1]</sup>。本文通过方法学相关系列实验, 采用分光光度法对苦荞酒中的总黄酮含量进行检测, 为苦荞酒中总黄酮的相关研究提供参考<sup>[2]</sup>。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器

电子天平 XS205 (梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); 紫外-可见分光光度计 TU-1810 (北京普析通用仪器有限责任公司); 超纯水机 MUL-9000 (B)-1-10 (南京总馨纯水设备有限公司); 移液枪 (200  $\mu\text{L}$ 、1 000  $\mu\text{L}$ 、5 mL, 上海宝予德科学仪器有限公司); 涡旋混匀仪 ZX4 (意大利 VELP); 超声波清洗器 KQ-300VDB (昆山市超声仪器有限

公司)。

#### 1.2 溶液配制

① 40% 乙醇溶液。量取 40 mL 无水乙醇, 定容至 100 mL, 混匀。② 5% 亚硝酸钠溶液。称取 5.0 g 亚硝酸钠, 用水溶解, 定容至 100 mL, 混匀。③ 10% 硝酸铝溶液。称取 10.0 g 硝酸铝, 用水溶解, 定容至 100 mL, 混匀。④ 4% 氢氧化钠溶液。称取 4.0 g 氢氧化钠, 用水溶解, 定容至 100 mL, 混匀。⑤ 200 mg/L 芦丁标准溶液。准确称取 10.0 mg 芦丁标准品至 50 mL 容量瓶中, 加入 40% 乙醇溶液充分溶解后, 定容、混匀。本方法中的水为 GB/T 6682—2008 规定的一级水。

#### 1.3 测定方法

##### 1.3.1 检测波长的选择

准确称量芦丁标准物质 11.13 mg (100080-201811, 92.4%, 中国食品药品检定研究院) 于 50 mL 容量瓶中, 用 40% 乙醇定容并摇匀。吸取芦丁标准溶液 1.0 mL 置于 10 mL 具塞比色管中, 加入 0.3 mL 5% 亚硝酸钠

溶液并摇匀,静置 6 min,再加入 0.3 mL 10% 硝酸铝溶液,摇匀,静置 6 min,加入 4 mL 4% 氢氧化钠溶液,充分摇匀,用 40% 乙醇定容至刻度,摇匀静置 12 min,在波长 400 ~ 600 nm 下进行扫描,确定最佳吸收波长。

### 1.3.2 工作标准曲线的绘制

精确吸取芦丁标准溶液 0 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL 和 1.0 mL,分别置于 10 mL 具塞比色管中,分别添加 40% 乙醇至 1 mL,加入 0.3 mL 5% 亚硝酸钠溶液并摇匀,静置 6 min,再加入 0.3 mL 10% 硝酸铝溶液,摇匀,静置 6 min,加入 4 mL 4% 氢氧化钠溶液,充分摇匀,用 40% 乙醇定容至刻度,摇匀静置 12 min。于波长 510 nm 处测定吸光度值,同时以 40% 乙醇为空白测定吸光度。以吸光度为纵坐标,芦丁质量为横坐标,绘制标准曲线。

### 1.3.3 样品的测定

准确吸取苦荞酒样品 1.0 mL,置于 10 mL 比色管中,按照 1.3.2 中的方法,于波长 510 nm 处测定其吸光度值,并根据标准曲线计算出总黄酮含量。

### 1.3.4 总黄酮含量的计算

总黄酮含量的计算公式为

$$C=10\times\frac{A-X}{B} \quad (1)$$

式中:  $C$  为苦荞酒中总黄酮的含量,  $\mu\text{g/mL}$ ;  $A$  为样品吸光度;  $X$  为标准曲线截距;  $B$  为标准曲线斜率。

## 2 结果与分析

### 2.1 波长的确定

取芦丁标准溶液 1.0 mL,置于 10 mL 比色管中,按照 1.3.2 中的方法操作,最后摇匀静置 12 min。以试剂空白为参比,于 400 ~ 600 nm 波长下测定吸收曲线。结果表明芦丁标准溶液在 510 nm 处有最大吸收,因此选择 510 nm 作为测定波长。

### 2.2 显色条件的优化

#### 2.2.1 总黄酮在不同溶剂中吸收情况

取芦丁标准溶液各 1.0 mL 于 3 个 10 mL 比色管中,按照 1.3.2 中的方法,最后摇匀静置 12 min。以试剂空白为参比,于波长 510 nm 处测定其吸光度值,详见表 1。结果表明,在相同实验条件下总黄酮在 40% 乙醇溶剂中吸光度最大。

#### 2.2.2 显色剂硝酸铝浓度的选择

取芦丁标准溶液各 1.0 mL 于 5 个 10 mL 比色管中,按照 1.3.2 中的方法,加入 0.3 mL 5% 亚硝酸

钠溶液并摇匀,静置 6 min,再加入不同质量浓度(2%、5%、10%、15% 和 20%)硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀,静置 6 min,加 4 mL 4% 氢氧化钠溶液,充分摇匀,用 40% 乙醇定容至刻度,摇匀静置 12 min。以试剂空白为参比,于波长 510 nm 处测定其吸光度值,结果见表 2。随着硝酸铝浓度的增加,吸光度快速增加,在浓度为 10% 时达到最大值,此后再增加浓度,吸光度值缓慢下降,因此选择硝酸铝浓度为 10%。

表 1 不同试剂的吸光度情况

| 试剂名称   | 吸光度   |
|--------|-------|
| 无水乙醇   | 0.245 |
| 40% 乙醇 | 0.275 |
| 甲醇     | 0.255 |

表 2 不同硝酸铝浓度吸光度情况

| 硝酸铝浓度 /% | 吸光度   |
|----------|-------|
| 2        | 0.225 |
| 5        | 0.239 |
| 10       | 0.275 |
| 15       | 0.257 |
| 20       | 0.252 |

#### 2.2.3 显色剂硝酸铝用量的选择

取芦丁标准溶液各 1.0 mL 于 5 个 10 mL 比色管中,按照 1.3.2 中的方法,加入 0.3 mL 5% 亚硝酸钠溶液并摇匀,静置 6 min,再加入不同体积(0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL 和 0.5 mL)10% 硝酸铝溶液,摇匀,静置 6 min,加 4 mL 4% 氢氧化钠溶液,充分摇匀,用 40% 乙醇定容至刻度,摇匀静置 12 min。以试剂空白为参比,于波长 510 nm 处测定其吸光度值。如表 3 所示,随着硝酸铝使用量的增加,吸光度值迅速增大,在加入量 0.3 mL 时到达最大值,此后再增大加入量,吸光度呈现下降趋势并逐渐趋于稳定,因此选择硝酸铝用量为 0.3 mL。

表 3 不同硝酸铝用量吸光度情况

| 硝酸铝体积 /mL | 吸光度   |
|-----------|-------|
| 0.1       | 0.215 |
| 0.2       | 0.224 |
| 0.3       | 0.275 |
| 0.4       | 0.205 |
| 0.5       | 0.255 |

### 2.3 工作标准曲线及线性范围

按照 1.3.2 中的方法,得到回归方程:  $Y=0.00133X+0.00121$ ,其中斜率  $a=0.00133$ ,截距  $b=0.00121$ ,相关系数  $R=0.9999$ 。由试验结果可知,芦丁在 0 ~ 205.682  $\mu\text{g}$  呈良好的线性关系,详见表 4。



表4 标准含量系列与相应的吸光度

| 芦丁质量/ $\mu\text{g}$ | 吸光度   |
|---------------------|-------|
| 0                   | 0.003 |
| 41.137              | 0.054 |
| 82.273              | 0.109 |
| 123.409             | 0.166 |
| 164.546             | 0.221 |
| 205.682             | 0.275 |

## 2.4 检出限与测定下限

根据《环境监测分析方法标准制订技术导

则》(HJ 168—2020)<sup>[3]</sup>的技术要求,结合回归方程 $Y=0.001\ 33X+0.001\ 21$ ,可计算出检出限为 $7.5\ \mu\text{g}$ ,测定下限为 $30\ \mu\text{g}$ 。

## 2.5 精密度

选取两种苦荞酒样品,每份各 $1.0\ \text{mL}$ ,按照1.3.2中的方法连续测定6次,详见表5。结果显示RSD值为3.54%,说明该方法精密度高。实验过程中,发现两种苦荞酒经显色剂显色后,其络合物颜色分别为淡红色和橙黄色。

表5 精密度实验测定结果

| 样品名称 | 样品测定质量/ $\mu\text{g}$ |        |        |        |        |        | 平均值    | RSD/% |
|------|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
|      | 1                     | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      |        |       |
| 样品1  | 8.845                 | 8.845  | 8.845  | 8.845  | 8.09   | 8.845  | 8.719  | 3.54  |
| 样品2  | 88.395                | 88.395 | 88.395 | 88.395 | 88.395 | 88.395 | 88.395 | 0     |

## 2.6 稳定性

取苦荞酒样品 $1.0\ \text{mL}$ ,按照1.3.2中的方法将样品制备完成后,于不同时间测其吸光度,观察2 h内吸光度变化趋势(见表6)。结果表明,该方法在2 h内稳定性良好。

表6 稳定性试验

| 时间/min | 吸光度   |
|--------|-------|
| 0      | 0.109 |
| 15     | 0.109 |
| 30     | 0.109 |
| 45     | 0.109 |
| 60     | 0.109 |
| 90     | 0.110 |
| 120    | 0.109 |

## 2.7 重复性

由两名实验人员取两种苦荞酒样品,每种6份各 $1.0\ \text{mL}$ ,按照1.3.2中的方法测定吸光度,并根据标准曲线计算出总黄酮含量(见表7)。结果表明,该方法重复性较好。

## 2.8 加标回收率

取两种苦荞酒样品,按照1.3.2中的方法进行加标回收率检测,平行测定3次。实验结果表明,该方法的回收率为88.88%~98.28%,满足分析要求(见表8)。

## 3 讨论与结论

实验过程中发现,芦丁标准溶液、苦荞酒经显色剂显色后,其络合物颜色分别为淡红色和橙黄色,

表7 样品重复性试验

| 编号  | 实验人员 | 芦丁质量/ $\mu\text{g}$ |          |          |          |          |          | 平均值/ $\mu\text{g}$ | RSD/% |
|-----|------|---------------------|----------|----------|----------|----------|----------|--------------------|-------|
|     |      | 1                   | 2        | 3        | 4        | 5        | 6        |                    |       |
| 样品1 | A    | 8.845 0             | 8.174 2  | 8.845 0  | 8.845 0  | 8.174 2  | 8.845 0  | 8.621 4            | 4.02  |
|     | B    | 8.845 0             | 8.845 0  | 8.845 0  | 8.845 0  | 8.845 0  | 8.845 0  | 8.845 0            | 0     |
| 样品2 | A    | 88.395 0            | 88.395 0 | 88.395 0 | 89.315 8 | 89.315 8 | 88.395 0 | 88.701 9           | 0.54  |
|     | B    | 88.395 0            | 87.812 0 | 87.812 0 | 88.395 0 | 87.812 0 | 88.395 0 | 88.103 5           | 0.36  |

表8 样品回收率试验

| 编号  | 本底质量/ $\mu\text{g}$ | 加标质量/ $\mu\text{g}$ | 测量质量/ $\mu\text{g}$ |           |           | 平均回收率/% |
|-----|---------------------|---------------------|---------------------|-----------|-----------|---------|
|     |                     |                     | 1                   | 2         | 3         |         |
| 样品1 | 8.8450              | 7.404 6             | 15.599 0            | 15.599 0  | 15.599 0  | 91.21   |
|     |                     | 9.050 0             | 17.100 0            | 17.100 0  | 17.100 0  | 91.22   |
|     |                     | 10.695 5            | 18.601 0            | 18.601 0  | 17.850 0  | 88.88   |
| 样品2 | 88.3950             | 74.045 5            | 155.990 0           | 155.990 0 | 155.990 0 | 91.29   |
|     |                     | 90.500 0            | 178.500 0           | 178.500 0 | 171.000 0 | 96.80   |
|     |                     | 106.954 6           | 193.510 0           | 193.510 0 | 193.510 0 | 98.28   |

(下转第68页)

表3 回收率测定结果及精密度(辣椒酱)

| 添加剂  | 本底值/mg | 沉淀剂1前处理 |       |         |       | 沉淀剂2前处理 |       |         |       |
|------|--------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|
|      |        | 测得值/mg  | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% | 测得值/mg  | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
| 安赛蜜  | 0.735  | 0.981   | 98.4  | 97.4    | 2.1   | 1.002   | 106.8 | 104.4   | 4.6   |
|      |        | 0.976   | 96.4  |         |       | 0.990   | 102.0 |         |       |
| 苯甲酸  | 0      | 0.247   | 98.8  | 98.0    | 1.6   | 0.250   | 100.0 | 98.2    | 3.7   |
|      |        | 0.243   | 97.2  |         |       | 0.241   | 96.4  |         |       |
| 山梨酸  | 0      | 0.252   | 100.8 | 99.2    | 3.2   | 0.245   | 98.0  | 97.0    | 2.1   |
|      |        | 0.244   | 97.6  |         |       | 0.240   | 96.0  |         |       |
| 糖精钠  | 0      | 0.260   | 104.0 | 101.8   | 4.3   | 0.232   | 92.8  | 91.6    | 2.6   |
|      |        | 0.249   | 99.6  |         |       | 0.226   | 90.4  |         |       |
| 脱氢乙酸 | 0      | 0.236   | 94.4  | 95.4    | 2.1   | 0.241   | 96.4  | 95.6    | 1.7   |
|      |        | 0.241   | 96.4  |         |       | 0.237   | 94.8  |         |       |

### 3 结论

本文建立了同时测定食品中5种添加剂的高效液相色谱法,该方法简单快速,分离效果好,回收率高,精密度好,提高了检测效率,降低了检验成本。选用的2种沉淀剂(亚铁氰化钾溶液+乙酸锌溶液、硫酸锌+氢氧化钠)回收效果好,均适用于样品中蛋白质的沉淀处理。

### 参考文献

[1] 袁文新.超高效液相色谱法测定烘焙类食品中安赛蜜、糖精钠、苯甲酸、山梨酸和脱氢乙酸[J].卫生研究,2015,44(4):681-683.

[2] 国家卫生和计划生育委员会.食品安全国家标准食品添加剂使用标准:GB 2760—2014[S].北京:中国标准出版社,2014.

出版社,2014.

[3] 杨红梅,刘艳琴,殷晓燕.高效液相色谱法同时测定食品中安赛蜜、糖精钠、苯甲酸、山梨酸和脱氢乙酸[J].食品科技,2007(10):213-214.

[4] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定:GB 5009.28—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.

[5] 国家卫生和计划生育委员会.食品安全国家标准食品中脱氢乙酸的测定:GB 5009.121—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.

[6] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会.饮料中乙酰磺胺酸钾的测定:GB/T 5009.140—2003[S].北京:中国标准出版社,2003.

(上接第64页)

是由于黄酮类化合物泛指这种两个苯环通过中央三碳链相互连接而成的一系列化合物,而黄酮类化合物的颜色根据中间吡喃环的不同氧化水平和两侧A、B环上连接的各种取代基而分为不同的黄酮类型<sup>[4-5]</sup>。只有物质中含有邻二酚羟基,并且邻二酚羟基没有取代基时,该法才在510 nm处有最大吸收。通过上述实验可以得出,该方法能快速准确地检测苦荞酒中总黄酮的含量,操作简单,其精密度、重复性和加标回收率等各项指标均符合相关标准的分析检测要求,结果准确可靠。

### 参考文献

[1] 祁学忠,吉锁兴,王晓燕,等.苦荞黄酮及其降血糖作用的研究[J].科技情报开发与经济,2003,13(8):111-112.

[2] 韩旭,吴宏萍,吴丽华,等.两种方法测定苦荞酒中总黄酮含量的比选[J].酿酒,2019,46(3):79-81.

[3] 中华人民共和国生态环境部.分析方法标准制订技术导则:HJ 168—2020[S].北京:中国环境科学出版社,2020.

[4] 郑裕国,王远山,薛亚平,等.抗氧化剂的生产及应用[M].北京:化学工业出版社,2004.

[5] 尹爱群,穆惠军,江雪欣,等.黄酮类化合物研究进展[J].中国药事,2005,19(11):689-692.