苦水玫瑰干花蕾中总黄酮的提取工艺及其主要成分的测定

陈继华[1]，王 波[2,3]，刘倩倩[2]，周 围[*1,2,3]

（1. 甘肃农业大学 食品科学与工程学院，甘肃 兰州 730070；2. 甘肃出入境检验检疫局 综合技术中心，甘肃 兰州 730010；3. 甘肃检科院 玫瑰工程技术研究中心，甘肃 兰州 730010）

摘要：采用响应面分析法优化苦水玫瑰中总黄酮的提取工艺，在此基础上使用超高效合相色谱（Ultra Performance Convergence Chromatography，UPC²）对总黄酮中的槲皮素和山柰酚的质量分数进行检测。以提取溶剂、液料体积质量比、提取时间和提取温度为响应因子，总黄酮得率为响应值，采用 3 因素 3 水平的响应面分析法优化苦水玫瑰中总黄酮的提取工艺参数。结果表明，最佳提取工艺条件为乙醇体积分数 66%、液料体积质量比 16 mL/g、提取时间 120 min，提取温度 70 ℃，在此最优条件下，分别做 3 次平行实验进行验证，总黄酮提取量为 5.85 mg/g，与模型预测值 5.87 mg/g 基本相符。说明了响应面模型可较好地预测苦水玫瑰总黄酮的提取量，对提取条件参数的优化具有可行性。实验还研究了苦水玫瑰总黄酮中槲皮素和山柰酚的测定方法。槲皮素和山柰酚在一定范围内线性良好，相关系数为 0.998 2~0.999 3；精密度 RSD 均低于 1.76%；平均回收率为 96.05%~101.15%。该方法能够满足苦水玫瑰总黄酮中槲皮素和山柰酚的快速检测。

关键词：苦水玫瑰；响应面；总黄酮；超高效合相色谱；检测

中图分类号：TS 201.1　**文章编号：**1673-1689(2019)05-0153-07　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.05.022

Extraction Total Flavonoids and Determination of Main Compounds in Kushui Rose

CHEN Jihua[1]，*WANG Bo*[2,3]，*LIU Qianqian*[2]，*ZHOU Wei*[*1,2,3]

（1. College of Food Science and Engineering，Gansu Agricultural University，Lanzhou 730070，China；2.Central Laboratory of Technical Center of Gansu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau，Lanzhou 730010，China；3. Gansu Province Academy of Inspection Rose Engineering Technology Research Center，Lanzhou 730010，China）

Abstract： Surface response optimized and extraction total flavonoids and determination of main compounds in kushui rose，under this condition，using Ultra Performance Convergence Chromatography（UPC²）to determined quercetin and kaempferol in total flavonoids. The parameters of extraction technology of total flavonoids from kushui rose were optimized by four factors and three levels response methodology using ethanol concentration，issue-liquid ratio，extraction time and

收稿日期：2016-07-06

*** 通信作者：**周 围（1957—），男，博士，研究员，主要从事食品安全检测及色谱分析研究。E-mail：zhouwei845@163.com

引用本文：陈继华，王波，刘倩倩，等. 苦水玫瑰干花蕾中总黄酮的提取工艺及其主要成分的测定[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(05)：153-159.

extraction temperature as the response factors and with yeild rate of total flavonoids as response value. The results shows that the optimal extraction technology was as follows:ethanol concentration 66%,issue-liquid ratio 16:1 (mL/g),extraction time 120min and extraction temperature 70 ℃. Under these conditions,every sample was tested three times,the maximal yield of total flavonoids reached 5.85 mg/g. The total flavonoids the same as model predicated contents which was 5.87mg/g. The technology can be used as the extraction process of total flavonoids from kushui rose. This article also studied the content of quercetin and kaempferol in total flavonoids. Quercetin and kaempferol in a range of good linearity,the correlation coefficient was 0.998 2~0.999 3;precision (RSD) were less than 1.76%;the average recovery was 96.05%~101.15%. This methods was suitable to rapid detection of quercetin and kaempferol in total flavonoids.

Keywords: Rosa rugosa,response surface,total flavonoids,ultra-performance convergence chromatography,detection

玫瑰(*Rosa ragosa*)为蔷薇属植物,是一种集观赏、食用、药用、酿酒及香料等多种用途于一身的植物资源。苦水玫瑰是中国玫瑰和钝齿蔷薇的杂交种,盛产于甘肃永登苦水镇,耐碱耐旱。苦水玫瑰花色泽殷红,品质可与久负盛名的大马士革玫瑰媲美。同时,玫瑰花蕾作为花茶具有消炎杀菌、消除疲劳、改善体质、润泽肌肤的功效[1]。研究表明:苦水玫瑰富含黄酮类及多酚类化合物,黄酮类化合物是玫瑰花中最重要的活性成分之一,具有清除自由基、抗氧化、抗衰老等作用[2-4]。此外,苦水玫瑰中的黄酮还可以抑制红细胞溶血和脂质过氧化过程,具有体外抗补体作用[5-6]。目前由于国内外比较注重玫瑰挥发油的开发和利用,而对玫瑰总黄酮的研究相对比较少,且多采用超声波辅助进行总黄酮的提取,虽然提取时间较短,但是运行成本高,仅限于小型实验研究而难以对其进行工业化生产。另外,玫瑰总黄酮的提取材料多使用平阴玫瑰,对苦水玫瑰总黄酮的提取鲜有研究[7-8]。

对于黄酮类化合物的检测,通常使用液相色谱[12-14]、液相色谱串联质谱[15-16]以及紫外分光光度法[17-18]等。超高效合相色谱法(UPC^2)是传统超高效液相色谱(UPLC)和超临界流体色谱(SFC)技术的结合,主要使用超临界 CO_2 为流动相的主体,依靠流动相的溶剂化能力进行分离、分析;因超临界 CO_2 相对于液体作为流动相的传统液相色谱来说,它具有较小的粘度、较高的扩散系数和传质速率,在分离操作时所用的时间短,单位时间内分离效能高[19-20]。作者在使用响应面分析法优化检测苦水玫瑰总黄酮含量的同时,还使用了区别于传统液相色谱(LC)和气相色谱(GC)的超高效合相色谱(UPC^2)检测苦水玫瑰总黄酮中的槲皮素和山奈酚的含量,为黄酮类化合物的检测提供新的方法及思路,并为干制苦水玫瑰的质量评价提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

苦水玫瑰花:摘自甘肃检科院玫瑰工程技术研究中心实验基地,80 ℃热风烘干,密封备用。

芦丁标准品(纯度>98%):中国药品生物制品检定所提供;槲皮素、山奈酚(纯度 99%):Dr. Ehrenstorfer 公司产品。

1.2 仪器与设备

超高效合相色谱仪(配有 Waters Empower™3 数据处理系统):美国 Waters 公司产品;Lambda 25UV 紫外可见分光光度计:美国珀金埃尔默公司产品;多功能偏程干燥箱:德国 memmert 公司产品;冷冻离心机:德国 Sigma 公司产品;均质机:美国 Tomtec 公司产品;移液枪:美国 Thermo Electron 公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 芦丁标准曲线绘制 准确称取于 120 ℃烘至恒重的芦丁标准品 25.0 mg,用体积分数为 70% 的乙醇溶液定容于 25 mL 容量瓶中,得到质量浓度 1 mg/mL 的芦丁标准液,准确移取芦丁标准液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 于 50 mL 容量瓶中,依次加入质量分数 5% $NaNO_2$ 溶液 0.5 mL,摇匀静置 5 min 后,加入质量分数 10%硝酸铝溶液 0.5 mL,摇匀静

置 5 min 后，加入质量分数 4%氢氧化钠溶液 4 mL 摇匀,用体积分数 70%乙醇定容至 50 mL,摇匀静置 15 min,用 1 cm 比色皿于 510 nm 测定样品吸光度。以芦丁质量浓度 C(mg/mL)为纵坐标,吸光度 A 为横坐标，绘制标准曲线拟合方程为 C=0.059 9A−0.000 3，相关系数 R^2=0.999 3，表明在 0.02~0.10 mg/mL 范围内,线性关系良好。

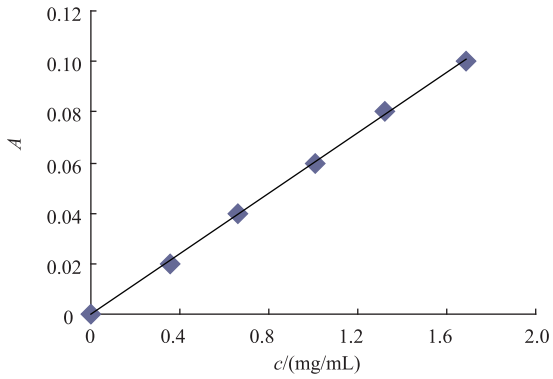


图 1　芦丁标准曲线

Fig. 1　Standard curves of rutin

1.3.2　总黄酮的提取　苦水玫瑰花蕾于 80 ℃烘干后粉碎(60 目),准确称取 1.0 g 玫瑰粉末于 50 mL 离心管中，加入 15 mL 体积分数为 70%的乙醇,置于漩涡振荡器上摇匀，然后在 70 ℃恒温水浴振荡条件下提取 30 min，冷却后在 4 ℃下 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 1.0 mL 过 0.22 μm 有机相膜后待 UPC² 分析；另移取 1.0 mL 于 15 mL 离心管中,按照芦丁标准曲线测定方法测定吸光度。每个样品重复 3 次。

1.3.3　标准溶液配制　标准贮备液:分别精确称取 0.010 g 槲皮素和山奈酚，用含质量分数 0.05% H_3PO_4 的体积分数 80%乙醇溶液，准确定容至 100 mL 容量瓶中,配制成 100 mg/L 的标准储备液,4 ℃下冷藏待用。

标准工作液：准确转移 1 000、750、500、250、100、50、25 μL 标准贮备液分别稀释为 100、75、50、25、10、5、2.5 mg/L 的标准工作液,4 ℃下冷藏待用。

1.3.4　UPC² 条件　色谱柱:Waters CSH Fluoro-Phenyl C18 2.1 mm×100 mm×1.7 μm；流动相:A:CO_2,B:甲醇(含质量分数 0.2% H_3PO_4);流量:0.4 mL/min,进样体积:1.0 μL,柱温:50 ℃,检测波长:360 nm,动态背压(ABPR):12.4 MPa。

梯度洗脱:0~0.25 min 时甲醇体积分数为 20%,25 min 时甲醇体积分数由 20%变为 35%,27 min 时甲醇体积分数由 35%变为 20%,保持 3 min。标准色谱图及样品图见图 2。

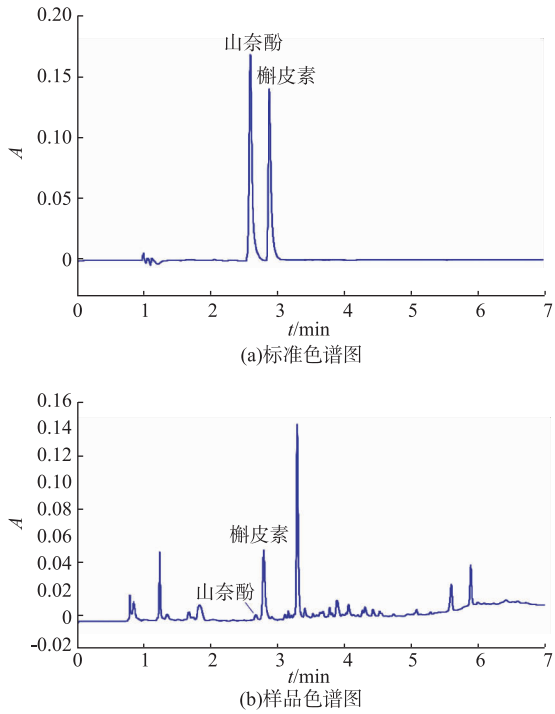


图 2　标准色谱图及样品图

Fig. 2　Chromatography of standards and sample

2　结果与讨论

2.1　单因素实验

2.1.1　提取溶剂的选择　控制提取条件在液料体积质量比 15 mL/g、提取温度 70 ℃、提取时间 90 min 的条件下，分别在乙醇体积分数为 60%、70%、80%、90%和 100%的条件下提取苦水玫瑰中总黄酮。以总黄酮质量分数为考察指标,研究提取溶剂对苦水玫瑰总黄酮提取率的影响,选取最适提取溶剂。从图 3 中可以看出,乙醇体积分数为 60%~70%时,黄酮质量分数在逐渐增大,在 70%时达到最大值,随后逐渐降低。由此可以得知乙醇体积分数为 70%时提取效果较好。

2.1.2　液料体积质量比的选择　控制提取条件在乙醇体积分数 70%、提取温度 70 ℃、提取时间 90 min 的条件下，分别在液料体积质量比为 10、15、20、25、30 mL/g 的条件下提取苦水玫瑰中的总黄酮。以黄酮质量分数为考察指标,研究液料体积质量比对苦水玫瑰总黄酮提取率的影响,选取最适液

料体积质量比。从图 4 中可以看出,液料体积质量比为 10~15 mL/g 时，黄酮质量分数在逐渐增大,液料体积质量比为 15 mL/g 时达到最大值，随后逐渐降低。由此可以得知液料体积质量比为 15 mL/g 时提取效果较好。

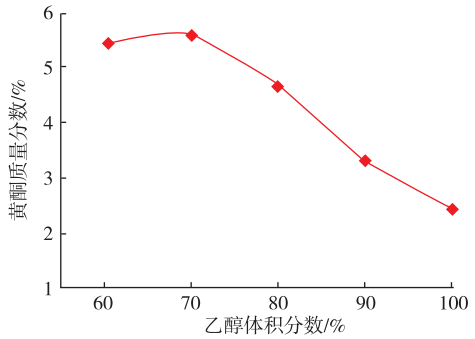


图 3　不同乙醇体积分数对黄酮质量分数的影响

Fig. 3　Effect of ethanol concentration on the extraction rate of total flavonoids

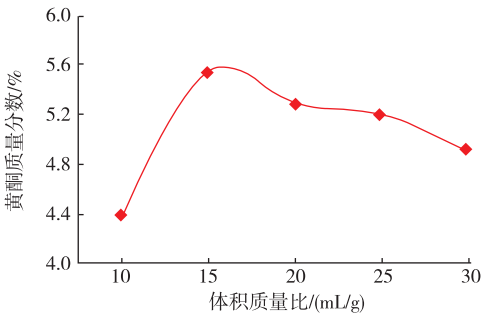


图 4　不同液料体积质量比对黄酮质量分数的影响

Fig. 4　Effect of material-liquid ratio on the extraction rate of total flavonoids

2.1.3　提取温度的选择　控制提取条件在乙醇体积分数 70%、液料体积质量比 15 mL/g、提取时间 90 min 的条件下,在提取温度为 40~95 ℃的条件下提取苦水玫瑰中总黄酮。以黄酮质量分数为考察指标,研究提取温度对苦水玫瑰总黄酮提取率的影响,选取最适提取温度。从图 5 中可以看出,随着提取温度的升高,黄酮质量分数在逐渐增大,在提取温度为 40~70 ℃时显著增大,在 70 ℃以后呈平稳状态。由此可以得知提取温度为 70 ℃时提取效果较好。

2.1.4　提取时间的选择　控制提取条件在乙醇体积分数 70%、液料体积质量比 15 mL/g、提取温度 70 ℃的条件下,分别在提取时间为 30~150 min 的条件下提取苦水玫瑰中总黄酮。以黄酮质量分数为考察指标,研究提取时间对苦水玫瑰总黄酮提取率的影响,选取最适提取时间。从图 6 中可以看出,提取时间为 30~90 min 时,黄酮质量分数逐渐增大,时间为 90 min 时达到最大值,随后逐渐降低。由此可以得知提取时间为 90 min 时提取效果较好。

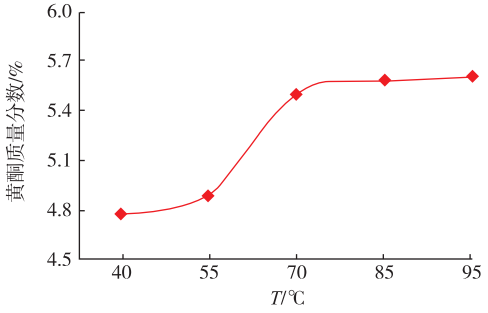


图 5　提取温度对黄酮质量分数的影响

Fig. 5　Effect of extraction temperature on the extraction rate of total flavonoids

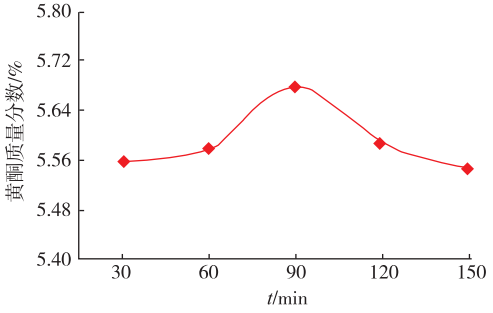


图 6　提取时间对黄酮质量分数的影响

Fig. 6　Effect of extraction time nn the extraction rate of total flavonoids

2.2　响应面实验

根据单因素实验,同时考虑到总黄酮提取过程中温度的变化规律，鉴于温度在 70 ℃之后呈平稳状态,为了节约能源,直接选取 70 ℃为最佳提取温度,选择 3 因素 3 水平进行响应面实验,以黄酮质量分数为响应值,采用中心组合设计,得到 3 因素 3 水平优化模型共 17 个试验组,其中中心点“0”水平重复 5 次以计算误差。各因素与水平的设计如表 1 所示,实验结果见表 2。

表 1　响应面分析因素与水平

Table 1　Experimental design and results for response surface analysis

水平	液料质量体积比 *A*/(mL/g)	乙醇体积分数 *B*/%	提取时间 *C*/min
−1	10	60	60
0	15	70	90
1	20	80	120

表 2　实验设计及结果

Table 2　Design and results

试验号	因素			黄酮质量分数/(mg/g)
	A	B	C	
1	20	70	60	5.58
2	15	80	120	4.59
3	15	60	60	5.53
4	15	70	90	5.76
5	15	60	120	5.66
6	15	70	90	5.78
7	20	70	120	5.7
8	15	70	90	5.68
9	15	70	90	5.71
10	10	80	90	4.14
11	10	70	60	5.34
12	15	70	90	5.71
13	15	80	60	4.58
14	20	80	90	4.61
15	20	60	90	5.44
16	10	70	120	5.33
17	10	60	90	5.39

Box-Behnken 设计回归分析结果显示，总黄酮质量分数与各个因素之间的关系为:$y=5.73+0.14A+0.031B-0.51C+0.032AB+0.11AC-0.030BC-0.22A^2-0.023B^2-0.62C^2$,决定系数 $R^2=0.998\ 0$,说明该回归模型的拟合情况较好，试验值与预测值较为接近，模型的可靠性可通过方差分析及相关系数来考察。

响应面方差分析表见表 3。

由表 3 可知模型 $P<0.000\ 1$,表明模型极显著，失拟项 $P=0.815\ 5>0.05$ 不显著,说明该模型拟合程度良好,可以用此模型对苦水玫瑰总黄酮的超声辅助提取效果进行分析和预测。由回归模型系数显著性检验结果可知，模型的一次项 *A*（液料体积质量比）、*B*(乙醇体积分数)、二次项 A^2、C^2 和交互项 *AC* 均对苦水玫瑰中总黄酮提取的线性效应极显著;一次项 *C*(提取时间)对苦水玫瑰中总黄酮提取的曲面效应显著；交互项 *AB*、*BC* 对苦水玫瑰中总黄酮提取的曲面效应不显著。

模型响应曲面见图 7~9。从响应面分析图上看出最佳参数及各参数之间的相互作用。

表 3　回归分析结果

Table 3　Results of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值	显著性
模型	4.2	9	0.47	395.60	<0.000 1	**
A	0.16	1	0.16	135.35	<0.000 1	**
B	2.10	1	2.10	1781.8	<0.000 1	**
C	0.007 813	1	0.007 813	6.62	0.036 8	*
AB	0.004 225	1	0.004 225	3.58	0.100 3	
AC	0.044	1	0.044	37.40	0.000 5	**
BC	0.003 6	1	0.003 6	3.05	0.124 1	
A^2	0.20	1	0.20	169.29	<0.000 1	**
B^2	0.002 179	1	0.002 179	1.85	0.216 2	
C^2	1.59	1	1.59	1 351.51	<0.000 1	**
残差	0.008 255	7	0.001 179			
失拟项	0.001 575	3	0.000 525 0	0.31	0.815 5	
纯误差	0.006 680	4	0.001 670			

对模型方程解逆矩阵得苦水玫瑰中总黄酮提取最佳工艺为:液料体积质量比 16.49 mL/g,乙醇体积分数 65.85%,提取时间 120 min。为检验试验结果与实际情况是否相一致,对上述条件进行修正后进行验证,即:液料体积质量比 16 mL/g,乙醇体积分数 66%,提取时间 120 min。用此最佳试验条件重复 3 次,得到平均总黄酮质量分数为 5.85 mg/g,与理论最佳总黄酮质量分数 5.87 mg/g 基本一致。

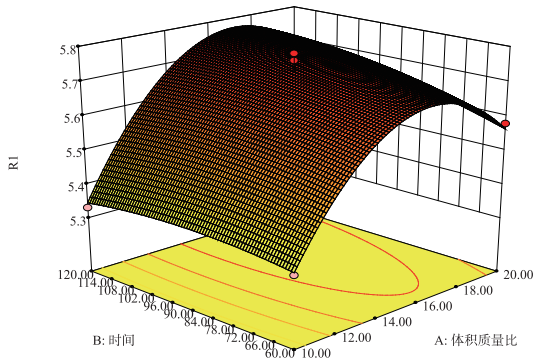


图 7 液料体积质量比和时间对黄酮质量分数的交互作用的响应曲面

Fig. 7 Response surface plot showing the interactive effects of extraction ratio and time on the content of total flavonoid

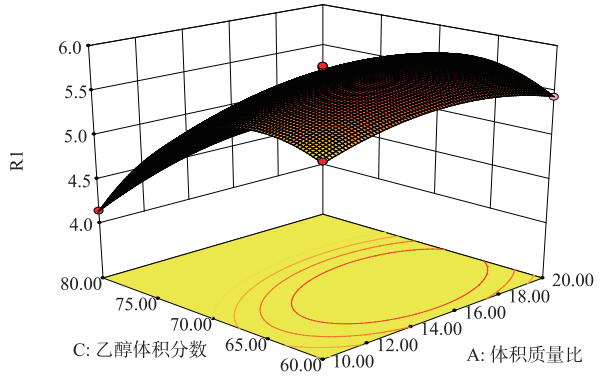


图 8 液料体积质量比和乙醇体积分数对黄酮质量分数的交互作用的响应曲面

Fig. 8 Response surface plot showing the interactive effects of extraction ratio and ethanol? concentration on the content of total flavonoids

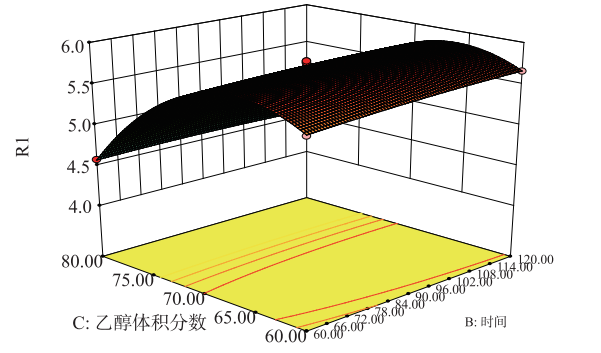


图 9 乙醇体积分数和时间对黄酮质量分数的交互作用的响应曲面

Fig. 9 Response surface plot showing the interactive effects of ethanol concentration and time on the content of total flavonoids

2.3 UPC² 方法学考察

2.3.1 线性范围和灵敏度 在优化实验条件下,选取 100、75、50、25、10、5、2.5 mg/kg 的槲皮素和山奈酚系列混合标准溶液按“1.7 色谱条件”进行测定。结果表明,该方法在 5.0~100 mg/kg 范围内有较好的线性关系,线性相关系数分别为 R^2=0.998 9 及 0.999 3。该方法对槲皮素和山奈酚的检出限(LOD)分别为 0.75 mg/kg 和 1.25 mg/kg,定量限(LOQ)分别为 2.5 mg/kg 和 3.75 mg/kg。

2.3.2 回收率和精密度 分别准确称取 1.00 g 粉碎后的烘干苦水玫瑰花,分别加入高、中、低 3 个质量分数(5、50、100 mg/kg)的槲皮素和山奈酚混合标准溶液,置于 50 mL 聚乙烯管中,分别按照最佳提取条件和“1.7 色谱条件”进样测定,计算其回收率。结果表明,该方法的加标回收率在 96.05%~101.15%之间,相对标准偏差(RSD)为 0.52%~1.76%。方法的回收率和重现性均较好。

2.3.3 稳定性实验 取同一份苦水玫瑰供试品溶液,每隔 0、1、5、10、24 h 进样 10 μL 测定槲皮素和山奈酚的质量分数,其相对标准偏差(RSD)为 3.17%,表明槲皮素和山奈酚在 24 h 内基本稳定。

2.3.4 实际样品测定 作者利用上述最佳优化条件,分别称取 5 个不同批次的烘干苦水玫瑰花 10.00 g,粉碎后称取1.00 g,置于 50 mL 聚乙烯管中,分别按照最佳提取条件和“1.7 色谱条件”进样测定,结果见表 4,色谱图见图 2。

表 4 不同批次烘干玫瑰花蕾中槲皮素和山奈酚的质量分数

Table 4 Contents of quercetin and kaempferol in different batches of dried rose

编号	烘干时间(批次)	山奈酚/(mg/kg)	槲皮素/(mg/kg)
1	2015.07	57.32	322.41
2	2015.07	59.47	354.20
3	2015.08	62.47	359.80
4	2015.08	58.23	337.45
5	2015.09	56.86	351.08

3 结 语

响应面分析法在优化中药提取工艺方面具有一定的优势。在使用 UPC² 检测总黄酮中槲皮素和山奈酚中,由于 UPC² 的分离机理与传统液相色谱

不同，在分离总黄酮中槲皮素和山奈酚的过程中，具有效率高、成本低、所需时间短、测定结果准确等特点。该方法准确可靠，重现性好，可用于苦水玫瑰花中主要活性成分含量的分析与质量控制，具有很好的实用价值。

参考文献：

[1] GAO Yan，YANG Liying，MA Yinhai. HPLC determination of 9 flavones in rose [J]. **The Physical and Chemical Inspection–Chemical Booklet**，2014，50(3)：353-356.(in Chinese)

[2] WANG Benxiao，PENG Yanli. HPLC analysis of flavonoids in flowers of rose rugosa thunb [J]. **Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine**，2010，12(3)：57-58.(in Chinese)

[3] WANG Yuanfang，XIU Jinxia，ZHAO Feng，et al. Antioxidant activity of flavonoids from cherry leaf in vitro[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2014，33(9)：966-970.(in Chinese)

[4] YASUYUKI H. The phytochemistry of rosa rugosa[J]. **Phytochemistry**，1996，43：535-549.

[5] NIIU Shumin，LI Wei，LI Le，et al. separation appraisal and activity test of the two kinds of antioxidants in Roses [J]. **Journal of Nankai university：Natural Science**，2006，39(1)：90-94.(in Chinese)

[6] YANG Qingxiong，ZHANG Wanquan，YU Tianhua，et al. Study on anticomplement activity of extracts from flowers of rosa rugosa[J]. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**，2011，39(26)：15962-15964.(in Chinese)

[7] WANG Haiyan，LI Rui，ZENG Xiu，et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of quercetin from mulberry leaves by response surface methodology[J]. **Food Science**，2014，35(22)：56-62.(in Chinese)

[8] WEI Zheng，ZHAO Yajiao，HUANG Yu，et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of ellagic acid and total phenols from muscadine(Vitis rotundifolia) by response surface methodology[J]. **Food Science**，2015，36(12)：29-35.(in Chinese)

[9] HOU Xuemin，LI Linxia，ZHANG Zhifeng，et al. Total flavonoids from mentha haplocalyx briq. leaves：optimization of extraction process by response surface methodology and antioxidant activity[J]. **Food Science**，2014，34(6)：124-128.(in Chinese)

[10] YANG Jia，ZHANG Guowen，WANG Jiarong，et al. Response surface methodology as an approach to optimizing ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from navel orange peel[J]. **Food Science**，2009，30(16)：94-97.(in Chinese)

[11] WANG Min，LU Zhaoxin，LV Fengxia. Optimization of total flavonoids extraction from ginkgo biloba leaves by enzymatic hydrolysis using response surface methodology[J]. **Food Science**，2007，28(3)：117-120.(in Chinese)

[12] SUN Lifang，LIU linwei，LV Junli，et al. HPLC analysis of flavonoids from reed leaves[J]. **Food Science**，2011，32(10)：241-245.(in Chinese)

[13] RAN Yue，JIAO Bining，ZHAO Qiyang，et al. Simultaneous determination of 11 flavonoids in citrus fruits by ultra performance liquid chromatography[J]. **Food Science**，2013，28(3)：168-172.(in Chinese)

[14] ZHANG Yuanmei，ZHOU Zhiqin，SUN Yujing，et al. Simultaneous determination of 18 flavonoids in citrus fruits by high-performance liquid chromatography[J]. **Chinese Agricultural Science**，2012，45(7)：3558-3565.(in Chinese)

[15] LI Yong，LIN Qian，PANG Tao，et al. Determination of 12 flavonoids in bacco leaves using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. **The Chromatographic**，2015，33(7)：746-752.(in Chinese)

[16] YE Xiaoke，Qin Pei，LI Wei，et al. Separation and identification of flavonids of leaves of rubus idaeus by high performance liquid chromatography electropray ionization multi-stage tandem mass spectrometry[J]. **Journal of Mass Spectrometry**，2011，32(5)：271-277.(in Chinese)

[17] ZHANG Xue，DING Changhe. The establishment of testing method of total flavonoids in hawthorn by UV spectrophotometry[J]. **Science and Technology of Food Industry**，2007，28(7)：200-202.(in Chinese)

[18] LIU Yufen，XIA Haitao，YANG Shuping. Quantitative determination of total flavonoids in sisal flower by UV spectrophotometry [J]. **Food Science**，2005，26(9)：418-419.(in Chinese)

[19] LIU Qianqian，ZHOU Wei，WANG Bo，et al. Direct determination of vitamin C by ultra performance convergence chromatography[J]. **Food Science**，2014，35(16)：208-212.(in Chinese)

[20] XU Yongwei，SUN Qinglong，HUANG Jing，et al. Ultra performance convergence chromatography of waters [J]. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**，2012(40)：674.(in Chinese)