

文章编号:1673-1689(2009)04-0483-04

三波长-分光光度法测定山楂叶、果总黄酮的含量

张兰杰, 辛广, 陈华, 刘凯

(鞍山师范学院 化学系, 辽宁鞍山 114007)

摘要: 采用三波长-分光光度法测定山楂叶和果中黄酮的含量, 消除了由于山楂叶和果中黄酮光谱吸收峰不对称给定量分析造成的影响, 并校正了由于干扰组分的吸收光谱具有线性吸收产生的基线倾斜。实验结果: 回归方程 $\Delta A = 88.795C - 0.2060$; 相关系数 $r = 0.9994$; 黄酮质量浓度在 $0 \sim 40.6 \mu\text{g/mL}$ 范围内, 分别在波长 $\lambda_1 = 463 \text{ nm}$ 、 $\lambda_2 = 417 \text{ nm}$ 、 $\lambda_3 = 382 \text{ nm}$ 测吸光度时, 则 ΔA 与质量浓度 C 之间呈良好的线性关系, 可按标准曲线法进行定量分析。回收率为 $96.86\% \sim 102.46\%$; 变异系数小于 0.136% 。方法的准确度与精密度较好, 且操作简便易行。

关键词: 黄酮类化合物; 山楂; 三波长-分光光度法

中图分类号: O 657.3

文献标识码: A

Determination of Total Flavonoids in Hawthorn Leaves and Fruits by Three - Wavelength Spectrophotometry

ZHANG Lan-jie, XIN Guang, CHEN Hua, LIU Kai

(Department of Chemistry, Anshan Normal University, Anshan 114007, China)

Abstract: In this study, a three-wavelength spectrophotometry method, could eliminate the absorbance error of interfering components, turbid solution and the scattering effect, was developed to determination of flavonoids in hawthorn leaves and fruits. Back-ground changed with concentration changed and asymmetric absorption peak problems can be solved also. The regression equation of concentration ΔA was obtained and listed as follows: $\Delta A = 88.795C - 0.2060$ with a relation coefficient $r = 0.9994$. The experimental results demonstrated the total flavonoids concentrations in $0 \sim 40.66 \mu\text{g/mL}$ with ΔA obeying linear relation. when the absorbance was measured at wavelength $\lambda_1 = 463 \text{ nm}$ 、 $\lambda_2 = 417 \text{ nm}$ and $\lambda_3 = 382 \text{ nm}$. The recovery is $96.86\% \sim 102.46\%$ and the coefficient of variation is 0.136% . The method exhibited more advantages over the traditional spectrophotometry method.

Key words: flavonoids, hawthorn, three-wavelength spectrophotometry

山楂为蔷薇科植物野山楂的果实。中医认为山楂果具有健胃消食、降压降脂之功效, 是保健食疗的佳品^[1]。

山楂叶中黄酮类化合物含量较高, 种类较多, 山楂是我国东北地区典型的药、食两用植物, 鞍山地区山楂资源十分丰富, 当地居民用其叶、果泡茶

收稿日期: 2008-04-28

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究计划项目(200502)。

作者简介: 张兰杰(1957-), 女, 辽宁鞍山人, 教授, 主要从事生物化学研究。Email: zhanglanjieas@163.com

的习惯具有悠久的历史。而这些人中患高血压等心脑血管疾病的人甚少。为了更好的开发利用山楂这一野生资源,作者采用三波长分光光度法,对山楂叶和果的总黄酮含量进行了测定。

1 方法和原理

在黄酮类化合物的紫外吸收光谱中,主要是由300~400 nm之间的吸收带I和240~280 nm之间的吸收带II组成。因为山楂叶和果中含有的其它成分在带I和带II范围内均有一定程度的吸收,因此对总黄酮的含量测定产生干扰。加入铝盐后使黄酮类化合物与铝离子形成稳定的化合物,吸收带I会产生明显红移,同时吸光度也大大增加。因此,选择铝配合物显色体系来测定样品中总黄酮的质量浓度。^[2]

三波长-分光光度法的基本原理如图1所示:在一吸收光谱曲线上,可以适当选择3个波长 λ_1 、 λ_2 、 λ_3 处分别测定吸光度 A_1 、 A_2 和 A_3 ,由图1可知。

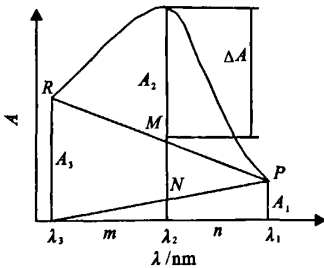


图1 三波长-分光光度法原理

Fig.1 Principle of three wavelength spectrophotometry

$$\begin{aligned} \Delta A &= A_2 - (N\lambda_2 + MN) = \\ &= A_2 - \frac{mA_1 + nA_3}{m+n} = \\ &= A_2 - \frac{(\lambda_2 - \lambda_3)A_1 + (\lambda_1 - \lambda_2)A_3}{\lambda_1 - \lambda_2} = \\ &= \left\{ \epsilon_{\lambda_2} - \frac{(\lambda_2 - \lambda_3)\epsilon_{\lambda_1} + (\lambda_1 - \lambda_2)\epsilon_{\lambda_3}}{\lambda_1 - \lambda_2} \right\} bc \quad (1) \end{aligned}$$

式中: e 为待测组分在各波长处的摩尔吸光系数; b 为光程; c 为待测组分的摩尔浓度。由式(1)可知, ΔA 值与待测组分的浓度成正比,可以用于对待测组分的测定。从图1又知,当选择的干扰组分的3个波长对应的 R 、 M 、 P 3个点在一条直线上时,干扰组分的 $\Delta A = 0$,则测得的 ΔA 值与该干扰组分浓度无关。

三波长-分光光度法测定黄酮含量,能有效地消除吸收峰不对称给黄酮定量分析造成的影响,并校正了干扰组分的吸收光谱具有可能是散射造成的背景(散射与波长有关,在短波处散射较强)线性万方数据

吸收产生的基线倾斜,提高了定量分析的准确度^[3]。

2 实验部分

2.1 实验材料、试剂与仪器

山楂叶和果,采自辽宁千山;芦丁标准品:上海试剂二厂产品;其它试剂均为国产分析纯。紫外分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司产品;KG-250型渣油超声波清洗器:昆山市超声波仪器厂产品。

2.2 黄酮的定性鉴定

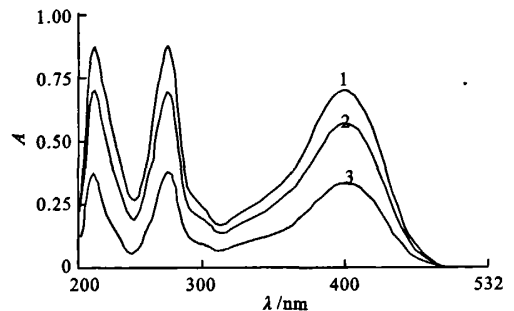
首先取山楂叶和果,溶于体积分数70%乙醇溶液,与 $HCl-Mg$ 、 $AlCl_3$ 、 $Pb(Ac)_3$ 反应均为阳性,表明其中含有黄酮类化合物。

2.3 山楂叶、果总黄酮的提取

取山楂叶、果细粉1.0000 g,置索氏提取器中,加三氯甲烷加热回流提取至提取液无色,弃去三氯甲烷液,药渣除去三氯甲烷,加甲醇继续提取至无色,提取液在鼓风干燥箱中蒸干,残渣加体积分数50%乙醇溶液溶解,转移至50 mL容量瓶,加体积分数50%乙醇溶液至刻度,摇匀,作为供试品储备液I。取供试品储备液I,滤过。准确量取滤液5 mL,置于25 mL容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,作为供试品储备液II^[4]。

2.4 测定波长的确定

将山楂叶和果及芦丁标准品在适当的介质条件下,与质量分数1%三氯化铝反应形成络合物而显颜色。显色后的对照品溶液和样品溶液的吸收光谱如图2。表明它们均在417 nm处均有最大吸收峰,因此可用芦丁作为标准品测定山楂叶和果中黄酮的含量。



1. 山楂叶;2. 山楂果;3. 芦丁对照品

图2 山楂叶和果及对照品的吸收光谱

Fig.2 Absorption spectra of extract solution from specimen and hawthorn leaves and fruits

准确吸取芦丁标准储备液1.0 mL分别注入10 mL容量瓶中,加质量分数1%的三氯化铝溶液,充

分混合至刻度,用 1 cm 的比色皿在波长 200~532 nm 范围内扫描,绘制出其吸收曲线(见图 3),用作图法确定 3 个测定波长分别为 $\lambda_1 = 463 \text{ nm}$ 、 $\lambda_2 = 417 \text{ nm}$ 、 $\lambda_3 = 382 \text{ nm}$ 。在测定波长处分别测定用质量分数 1% 的三氯化铝溶液定容过的黄酮溶液的吸光度值,给出 ΔA 值,并计算出相应的浓度值。

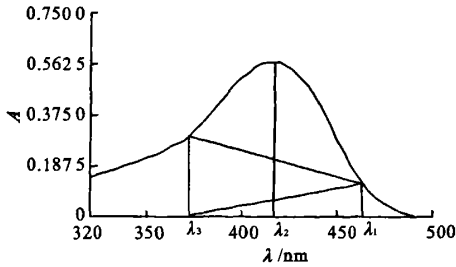


图 3 三波长的确定

Fig. 3 Determination of three-wavelength

3 结果与讨论

3.1 标准去曲线的绘制

准确吸取芦丁标准溶液 1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 mL 分别置于 10 mL 容量瓶中,加质量分数 1% AlCl_3 溶液,充分混合至刻度,在其波长为 $\lambda_1 = 463 \text{ nm}$ 、 $\lambda_2 = 417 \text{ nm}$ 、 $\lambda_3 = 382 \text{ nm}$ 分别测得吸光度,按公式(1)计算 ΔA 值,求得 ΔA 与浓度关系的

回归方程为: $\Delta A = 88.795C - 0.2060$,根据 ΔA 与质量浓度的关系可绘制出线性很好的标准曲线。求得相关系数 $r = 0.9994$,说明黄酮的质量浓度在 0~40 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,分别在波长为 $\lambda_1 = 463 \text{ nm}$ 、 $\lambda_2 = 417 \text{ nm}$ 、 $\lambda_3 = 382 \text{ nm}$ 处测吸光度时,则 ΔA 与质量浓度 C 之间呈良好的线性关系,可按标准曲线法进行定量分析。

3.2 样品中总黄酮含量的测定

将山楂叶和果,按上述实验方法制备样品溶液,按操作条件,在测定波长处测其吸光度,分析结果列于表 1。

表 1 山楂叶和果总黄酮质量浓度测定

Tab. 1 Determination of the total content of flavones in hawthorn leaves and fruits

样品	测定值/ $(\mu\text{g/mL})$			平均值/ $(\mu\text{g/mL})$
	第一次	第二次	第三次	
山楂叶	14.632	14.500	14.373	14.496
山楂果	7.375	7.197	7.045	7.202

3.3 回收率和方法精密度实验

根据前面确定的测试条件,按上述实验方法制备 6 个不同质量浓度的样品,按标准加入标准物,在测定波长下测定 ΔA ,求得其平均回收率,标准偏差及变异系数,结果列于表 2 和表 3。

表 2 精密度实验

Tab. 2 Precision of this method

样品	样品质量浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	测定值/ $(\mu\text{g/mL})(n=9)$	平均值/ $(\mu\text{g/mL})$	标准偏差/ $(\mu\text{g/mL})$	变异系数/%
山楂叶	23.36	24.37~24.39	24.38	0.033	0.135
	28.42	28.36~28.55	28.46	0.034	0.132
	32.48	32.39~32.57	35.54	0.031	0.130
山楂果	36.54	36.51~36.59	36.59	0.030	0.128
	41.12	41.05~41.22	41.02	0.035	0.136
	45.72	45.58~45.83	45.69	0.032	0.133

表 3 回收率实验

Tab. 3 Recovery ratio of the method

样品	样品质量浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	加入值/ $(\mu\text{g/mL})$	理论值/ $(\mu\text{g/mL})$	实测值/ $(\mu\text{g/mL})$	回收率/%	平均回收率/%
山楂叶	74.76	10.12	84.88	84.30	99.31	99.30
	74.76	12.15	86.91	85.70	98.61	
	74.76	14.18	88.94	87.35	98.21	
	74.76	16.24	91.00	92.89	101.07	
山楂果	16.36	10.12	26.48	27.12	102.41	99.67
	16.36	12.15	28.41	28.09	98.87	
	16.36	14.18	30.54	30.23	98.98	
	16.36	16.24	32.60	30.65	98.45	

3.4 稳定性实验

用与绘制吸收曲线相同的方法配制样品,进行稳定性实验,结果表明:样品在室温下放置4h,测得其吸光度值不变。

由表1可以看出山楂叶和果中黄酮含量差异很大,叶中黄酮的含量是果2.01倍,山楂叶具有更广泛的应用前景。

由表2和表3可以看出本法的回收率为

98.21%~102.41,变异系数小于0.136%,方法的准确度与精密度均较高。由于 ΔA 值与黄酮的质量浓度成正比,在所选择的3个波长处,其相应的吸收光谱曲线上三点在一条直线上,有效地消除本底漂移及吸收峰不对称给定量分析造成的影响,因此三波长一分光光度计法为测定山楂叶和果中黄酮含量提供了更准确可行的方法。

参考文献(References):

- [1] 宋立人. 现代中药学大词典[M]. 北京:人民卫生出版社,2001.
- [2] 肖坤福,三波长分光光度法测定多穗柯叶中黄酮的含量[J]. 时珍国医国药,2006,17(6):980-981.
XIAO Kun-fu. Determination of flavonoids in lithocarpus polysachyus rehd leaves by three— wave length spectrophotometry[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2006,17(6):980-981. (in Chinese)
- [3] 罗庆尧,邓延倬,蔡汝秀,等. 分光光度分析(第4卷第1册)[M]. 北京:科学出版社,1998.
- [4] 陈瑞娇,朱必凤,王玉珍,等. 辣木叶总黄酮的提取及其降血糖作用[J]. 食品与生物技术学报,2007,26(4):42-45.
CHEN Rui-jiao, ZHU Bi-feng, WANG Yu-zhen, et al. Extraction and hypoglycemic effect of the total flavonoid from leaves of *Moringa oleifera*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007,26(4):42-45. (in Chinese)

(责任编辑:朱明)

《江南大学学报(自然科学版)》

征稿、征订启事

《江南大学学报(自然科学版)》(双月刊)是由教育部主管、江南大学(国家“211工程”重点建设高校)主办的自然科学类学术期刊。本刊主要刊载通信与控制工程、信息工程、机械工程、产品设计理论、纺织工程、应用化学、材料工程、土木工程、数理科学等学科的学术论文、研究报告,以及反映学科前沿研究动态的高质量综述。

本刊优先刊登国家自然科学基金和省部级及其以上科研项目析出论文,同时发表与企业及生产实际密切相关的应用性研究成果。热忱欢迎广大高校教学、科研人员及相关领域的专家、学者,在读硕士、博士研究生赐稿。

本刊为A4开本,128页,每册订价8.00元;全年共6期,48.00元;本刊邮发代号:28-189,全国各地邮局均可订阅,亦可向本刊编辑部直接订购。本刊可破季订阅。热忱欢迎广大读者订阅本刊。

邮编:214122

电子邮箱:xbzrkx@jiangnan.edu.cn

地址:江苏省无锡市蠡湖大道1800号

电话:0510-85913519

《江南大学学报(自然科学版)》编辑部