

三波长 - 分光光度法测定千山刺五加叶和果总黄酮的含量

张兰杰, 辛 广, 陈 华, 周晓旋
(鞍山师范学院化学系, 辽宁 鞍山 114007)

摘 要: 采用三波长 - 分光光度法测定千山刺五加叶和果中黄酮的含量, 消除了由于刺五加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。结果表明: 回归方程 $\Delta A = 88.795C - 0.2060$; 相关系数 $r = 0.9994$; 黄酮浓度在 $0 \sim 40.6 \mu\text{g/ml}$ 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。本法的回收率为 $96.86\% \sim 102.46\%$; 变异系数小于 0.136% 。方法的准确度与精密度均令人满意, 而且操作简便易行。

关键词: 黄酮类化合物; 千山刺五加; 叶; 果; 三波长 - 分光光度法

Determination of Total Flavonoids in Qianshan *Acanthopanax senticosus* Leaves and Fruits by Three - wavelength Spectrophotometry

ZHANG Lan-jie, XIN Guang, CHEN Hua, ZHOU Xiao-xuan
(Department of Chemistry, Anshan Normal University, Anshan 114007, China)

Abstract: Determination of flavonoids in Qianshan *Acanthopanax senticosus* leaves and fruits by three-wavelength spectrophotometry can eliminate the absorbance error of interfering components, turbid solution and the scattering effect. Background changed with concentration changed and asymmetric absorption peak problems can be solved also. The regression equation of concentration ΔA was obtained: $\Delta A = 88.795C - 0.2060$ with a relation coefficient, $r = 0.9994$. The experimental results demonstrate 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 is more advantageous than traditional spectrophotometry method.

Key words flavonoids; Qianshan *Acanthopanax senticosus* leaves; fruits; three-wavelength spectrophotometry
中图分类号: TS207 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2008)03-0393-03

刺五加为五加科植物刺五加 (*Acanthopanax senticosus* (Rupr et Maxim.)) 的干燥根及根茎^[1-2], 含有多钟有效成分, 如刺五加甙、刺五加总黄酮、刺五加多糖、多种微量元素等。刺五加主要活性成分是其所含有的甙类化合物。赵余庆等从其甲醇提取物中得到了硬脂酸、 β -谷甾醇、胡萝卜素、芝麻素、丁香甙、白桦脂酸、苦杏仁甙和蔗糖^[3], 从其水提物中得到了芪类化合物: 反式 4, 4'-儿羟基, 3, 3'-二甲氧基芪^[4]。Kujawa 等^[5]还从刺五加根的甲醇提取物中分离得到了两种新的三萜、皂甙。刺五加是我国东北地区典型的药用植物, 主要分布在我国黑龙江、吉林、辽宁、河北等地, 其味辛、微苦、性温、无毒^[6], 具有益气健脾、补肾安神、益精壮骨之功效。

辽宁千山刺五加资源十分丰富, 当地居民用其叶、果泡茶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刺五加这一野生资源, 实验采用三波长分光光度法, 对刺五加叶和果的总黄酮含量进行测定。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

刺五加叶和果采自千山, 由鞍山林业所孙忠诚教授鉴定。自然干燥后, 加石英砂充分研磨备用。

芦丁标准品溶液: 105°C 干燥至恒重的芦丁 (中国药品生物制品检定所) 20.30mg , 用 70% 乙醇溶解定容至 100ml ; 其他试剂均为国产分析纯。

收稿日期: 2006-12-04

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究计划资助项目 (200502)

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

1.2 仪器

TU-1021 型紫外分光光度计 澳大利亚 GDC 公司;
KG-250 型渣油超声波清洗器 昆山市超声波仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 波长-分光光度法原理

在黄酮类化合物的紫外吸收光谱中, 主要是由 300~400nm 之间的吸收带 I 和 240~280nm 之间的吸收带 II 组成。因为刺五加叶和果中含有的其他成分在带 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含量。

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, 可以适当选择三个波长 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:

$$\Delta A = A_2 - n\lambda_2 + mN = A_2 - \frac{mA_1 + nA_3}{m+n}$$

$$= A_2 - \frac{(\lambda_2 - \lambda_3)A_1 + (\lambda_1 - \lambda_2)A_3}{\lambda_1 - \lambda_3}$$

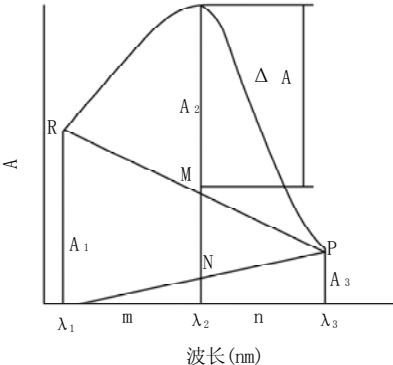
$$= [E\lambda_2 - \frac{(\lambda_2 - \lambda_3)E\lambda_1 + (\lambda_1 - \lambda_2)E\lambda_3}{\lambda_1 - \lambda_2}] bc \quad (1)$$


图 1 三波长-分光光度法原理

Fig.1 Principle of three wavelength spectrophotome

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三个波长对应的 R 、 M 、 P 三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。这是三波长法消除共存组分干扰的理论依据。

三波长-分光光度法测定黄酮含量, 有效地消除了吸收峰不对称给定量分析造成的影响, 并校正了基于

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)线性吸收产生的基线倾斜。因此, 三波长-分光光度法有效地消除了吸收峰不对称给定量分析造成的影响, 提高了定量分析的准确度。

1.3.2 黄酮的定性鉴定

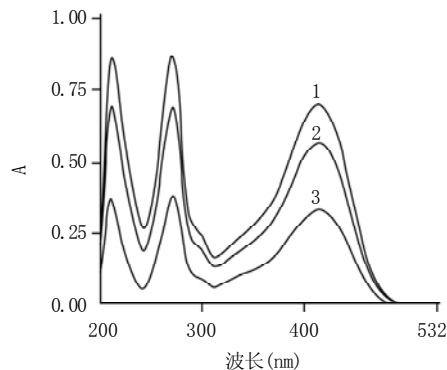
在进行含量测定之前, 首先取刺五加叶和果, 溶于 70% 乙醇, 与 $HCl-Mg$ 、 $AlCl_3$ 、 $Pb(Ac)_3$ 反应均为阳性, 表明其中含有黄酮类化合物。

1.3.3 刺五加叶、果总黄酮的提取

通过预试验发现水提法得到的黄酮量极少。本实验采用醇提法, 当乙醇浓度为 70% 时, 黄酮的提取率最高, 所以决定以 70% 乙醇为溶剂。精密称取称叶、果各 2.000g, 加入 70% 的乙醇 50ml, 室温浸提 24h 后, 在 50℃ 的条件下超声波振荡提取 1h, 离心分离, 取上清液备用, 重复操作三次, 减压浓缩后, 精密转移至 100ml 容量瓶, 乙醇定容备用。

1.3.4 测定波长的确定

将刺五加叶和果及芦丁标准品在适当的介质条件下, 与 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 417nm 处均有最大吸收峰, 因此可用芦丁作为标准品测定刺五加叶和果中黄酮的含量。



1. 刺五加叶; 2. 刺五加果; 3. 芦丁对照品。

图 2 千山刺五加叶和果及对照品的吸收光谱

Fig.2 Absorption spectra of extract solution from specimen and Qianshan *Acanthopanax senticosus* leaves and fruits

准确吸取芦丁标准储备液 1.0ml 分别注入 10ml 容量瓶中, 加 1% 的三氯化铝溶液, 充分混合至刻度, 用 1cm 的比色皿在波长 200~532nm 范围内扫描, 绘制出其吸收曲线(见图 3), 用作图法确定三个测定波长分别为 $\lambda_1=463nm$ 、 $\lambda_2=417nm$ 、 $\lambda_3=382nm$ 。在测定波长处分别测定用 1% 的三氯化铝溶液定容过的黄酮溶液的吸光度, 给出 ΔA 值, 并计算出相应的浓度。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

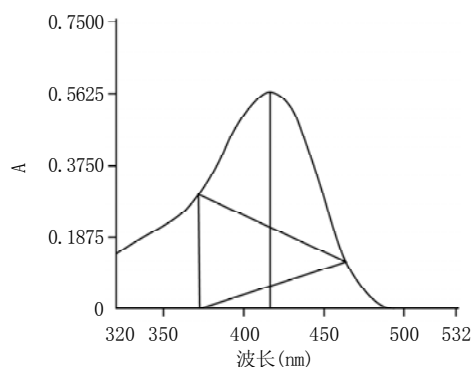


图3 三波长的确定

Fig.3 Determination of three-wavelength

准确吸取芦丁标准溶液 1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0ml 分别置于 10ml 容量瓶中,加 1%AlCl₃ 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 $r=0.9994$,说明黄酮的浓度在 $0\sim 40\mu\text{g/ml}$ 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。

2.2 样品中总黄酮含量的测定

取 10 月份采集的刺五加叶和果,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,分析结果见表 1。

表1 千山刺五加叶和果总黄酮含量测定

Table1 Determination of total content of flavones in Qianshan *Acanthopanax senticosus* leaves and fruits

测定部位	黄酮含量测定值($\mu\text{g/ml}$)			平均值($\mu\text{g/ml}$)
	一次	二次	三次	
刺五加叶	186.96	187.32	188.46	187.58
刺五加果	8.18	7.99	8.01	8.06

2.3 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 个不同浓度的样品,按标准加入标准物,在测定波长下测定 ΔA ,求得平均回收率,标准偏差及变异系数,结果见表 2、3。

表2 精密度实验

Table 2 Precision of method

样品浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	测定值(n=9) ($\mu\text{g/ml}$)	平均值 ($\mu\text{g/ml}$)	标准偏差 ($\mu\text{g/ml}$)	变异系数 (%)
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
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

Table 3 Recovery of method

样品	样品浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	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 (%)
刺五加叶	74.76	8.12	82.88	82.25	99.23	
	74.76	10.15	84.91	83.80	98.69	
	74.76	12.18	86.94	84.21	96.85	99.29
	74.76	14.24	89.00	90.09	101.22	
刺五加果	16.36	8.12	24.48	25.08	102.46	
	16.36	10.05	26.41	26.13	98.93	
	16.36	12.18	28.54	27.63	96.81	98.63
	16.36	14.24	30.60	30.65	100.16	

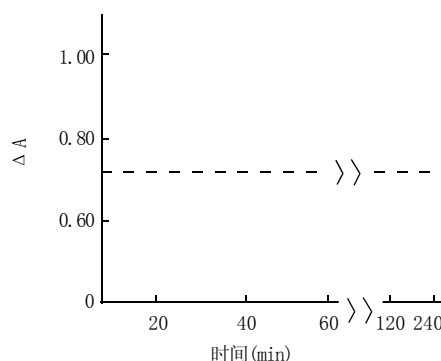


图5 黄酮稳定性实验

Fig.5 ΔA -time relation curve

2.4 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 240min,测得其吸光度不变(图 5)。

由表 1 可以看出,刺五加叶和果中黄酮含量差异很大,叶中黄酮的含量是果的 23.27 倍,刺五加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 96.81%~102.46%,变异系数小于 0.136%,方法的准确度与精密度均较高。由于 ΔA 值与黄酮的浓度呈正比,在所选择的三个波长处,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-分光光度计法为测定刺五加叶和果中黄酮含量提供了更准确可行的方法。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会中华人民共和国药典:一部[M].北京:化学工业出版社,2005:59.
- [2] 赵敏,王炎,康莉.刺五加果实及种子内源萌发物质活性的研究[J].中国中药杂志,2001,26(8):534-538.
- [3] 赵余庆,吴立军.刺五加叶中活性成分的结构研究[J].中草药,1990,21(3):44-45.
- [4] 赵余庆,杨松松.刺五加异秦皮啶和甙类化合物的分离鉴定[J].中草药,1991,22(11):516-517.
- [5] KUJA W E, MACKI K. Triterpenoid saponins of *Eleutherococcus senticosus* roots[J]. J Nat Prod, 1991, 54(4): 1044-1048.
- [6] 李庆勇,付玉杰,吕欣,等.超声法提取刺五加中丁香苷的研究[J].植物研究,2003,23(2):182-184.