

假龙胆总多酚含量测定及抗氧化活性研究

宋海龙 朱国强 卢晓丽 田树革 贾晓光

【摘要】 目的 建立假龙胆总多酚含量的测定方法。**方法** 采用可见分光光度法测定假龙胆中总多酚的含量,并建立清除羟基自由基和超氧阴离子自由基两种抗氧化模型对假龙胆抗氧化能力进行评价。**结果** 以没食子酸作为测定总多酚含量的对照品,在浓度 0.05 ~ 0.3 mg ($r = 0.9999$) 范围内呈良好的线性关系,结果表明,总多酚含量平均值为 7.63 mg,假龙胆提取液具有良好的抗氧化能力。**结论** 此方法操作简便,重现性良好、稳定,可作为假龙胆总多酚的检测方法,并可作为天然抗氧化剂资源进行开发研究。

【关键词】 假龙胆; 总多酚; 抗氧化

【中图分类号】 R284.2 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.02.007

Gentianella turkestanorum (Gand.) Holub. total polyphenol content and antioxidant activity determination SONG Hai-long, ZHU Guo-qiang, LU Xiao-li, et al. Xinjiang Institute of Chinese Materia Medica and Ethical Materia Medica, Urumqi 830002, China

Corresponding author: JIA Xiao-guang, E-mail: xgjia@vip.sina.com.cn

【Abstract】 Objective To establish a method for the determination of total Polyphenol in *Gentianella turkestanorum* (Gand.) Holub. **Methods** The total Polyphenol in Gentianaceae was determined by visible spectrophotometry, and establish two kinds of anti-oxidation model-scavenging hydroxyl radicals and scavenging superoxide anion radicals-to evaluate *Gentianella turkestanorum* (Gand.) Holub. in its antioxidant ability. **Results** The method had a good linearity in the range of 0.05 ~ 0.3 mg ($r = 0.9999$) with gallic acid as the reference substance. The results showed that an average total polyphenol content of 7.63 mg, *Gentianella turkestanorum* (Gand.) Holub. extracts had good oxidation resistance. **Conclusions** This method was simple, with good reproducibility, and stability, and could be adopted as the standard method for detecting *Gentianella turkestanorum* (Gand.) Holub. total polyphenols. *Gentianella turkestanorum* (Gand.) Holub., as a natural anti-oxidant resources, is worth further research and development.

【Key words】 *Gentianella turkestanorum*(Gand.) Holub.; Total Polyphenol; Antioxidant activity

假龙胆属 *Gentianella* 属于龙胆科,根据多方面的研究结果,假龙胆属为一单系属,全球约有 125

种,中国有 9 种,主要分布于东北、西北及西南部^[1]。新疆假龙胆 *Gentianella turkestanorum* 为 1 年或 2 年生草本植物,全草入药^[2-4]。本文对新疆假龙胆的总多酚及抗氧化能力进行测定,为假龙胆检测提供新的方法依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Spectrumlab 22 可见分光光度计(上海棱光技术有限公司制造);KQ2200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AL204 电子天平(梅特勒—托利多仪器有限公司)。

基金项目:新疆维吾尔药与特色天然药物创制及产业化示范项目(201130105-1);重大公共卫生专项——全国第四次中药资源普查新疆(试点)项目(2100409)

作者单位:830001 乌鲁木齐,新疆中药民族药研究所科教科[宋海龙(硕士研究生)、朱国强、贾晓光];新疆医科大学医学院中药系[卢晓丽(硕士研究生)、田树革]

作者简介:宋海龙(1973 -),2102 级在职硕士研究生,实验师。研究方向:食品加工与安全。E-mail: xjwssong@126.com

通讯作者:贾晓光(1955 -),硕士,主任药师,硕士生导师。研究方向:中药资源与化学。E-mail: xgjia@vip.sina.com.cn

1.2 实验材料

药材:假龙胆(产地:新疆奇台县兴场大东沟;经纬度:E89°53' N43°35' 高度:1659.8 m)药材粉碎,过 40 目筛,即得。

试剂:维生素 C(vitamin C, Vc) 三羟基甲基氨基甲烷、冰醋酸、香草醛、碳酸钠、钨酸钠、钼酸钠、磷酸、浓盐酸、硫酸锂、双氧水、无水乙醇、甲醇均为分析纯,实验用水为蒸馏水。没食子酸对照品(天津市光复精细化工研究所,含量:99%)。

2 实验方法

2.1 试剂的制备

福林酚试剂的制备:称取钨酸钠 50 g, 钼酸钠 12.5 g, 用 350 ml 蒸馏水溶解于圆底烧瓶中,加入 25 ml 磷酸($\geq 85\%$)和 50 ml 浓盐酸充分混匀,小火加热回流 12 小时,放冷,再加入 75 g 硫酸锂、25 ml 蒸馏水及 0.1 ml 双氧水,开口继续沸腾 15 分钟,使得双氧水完全挥发,冷却后用蒸馏水定容至 500 ml,过滤,于棕色瓶中避光储存。试液应呈亮黄色,如放置后变为绿色,可加双氧水 0.2 ml,煮沸 15 分钟即可^[5-7]。

对照品溶液的制备:精密称取 5.0001 mg 没食子酸化学对照品于 100 ml 容量瓶中,用蒸馏水定容,制成浓度为 0.05 mg/ml 总多酚对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

称取假龙胆药材 1 g, 加入 65% 的乙醇 25 ml 超声处理 30 分钟,离心,将上清液定容至 100 ml,即得。

2.3 最佳测量波长的选择

准确吸取 1.5 ml 总多酚对照储备液于 25 ml 容量瓶中,分别加入 18.0 ml 蒸馏水、福林试剂 1 ml,用 15% Na_2CO_3 溶液定容,于 30℃ 水浴中恒温反应 1.5 小时。以蒸馏水为空白对照,在 650 ~ 800 nm 波长下扫描其吸光度,结果表明没食子酸在 758 nm 处有强吸收峰,故选择 758 nm 作为总多酚的测定波长。

2.4 清除羟基自由基能力

参照文献^[8-9]的实验方法,取 4.5 mmol/L 的 FeSO_4 溶液 1.00 ml,加 4.5 mmol/L 的水杨酸—乙醇溶液 1.00 ml,再加不同浓度的待测溶液 1.00 ml,最后加入 4.4 mmol/L 的 H_2O_2 溶液 1.00 ml 启动整个反应。37℃ 水浴中反应 0.5 小时,随行空白,并以 Vc 为阳性对照,在 510 nm 下测定吸光值。并以

Vc 为阳性对照,按公式:清除率 = $\left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \times 100\%\right)$ 计算清除能力。式中 A_0 为未加提取液时溶液的吸光度, A_i 为加提取液后溶液的吸光度, A_j 为提取液的吸光度。

2.5 清除超氧阴离子能力

参照文献^[10-14]的实验方法,取 pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液 3.00 ml,加入 0.50 ml 不同浓度的样品,置于 30℃ 水浴中预热 20 分钟,再加入 7 mmol/L 邻苯三酚 3.00 ml,混匀后于 25℃ 水浴中反应 5 分钟,加入 8 mol/L 的 HCl 溶液 1.00 ml 终止反应,以 Vc 为阳性对照,420 nm 处测吸光度值。按公式:清除率 = $\left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \times 100\%\right)$ 计算清除能力,式中 A_0 为未加提取液时溶液的吸光度, A_i 为加提取液后溶液的吸光度, A_j 为提取液的吸光度。

3 结果

3.1 标准曲线

取总多酚对照品溶液 1 ml、2 ml、3 ml、4 ml、5 ml、6 ml 于 10 ml 容量瓶中蒸馏水定容,分别取上述溶液各 3 ml 加 3 ml 水,然后加 0.5 ml 福林酚试剂,最后加 1.5 ml 的 20% 碳酸钠溶液混匀,加水定容,75℃ 加热 10 分钟,758 nm 波长下测定吸光度,以浓度为横坐标,测定得吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程 $Y = 0.2034X + 0.0502$, $r = 0.9999$,线性范围 0.005 ~ 0.03 mg/ml。

3.2 方法学考察

3.2.1 稳定性试验 精密吸取同一份总多酚供试品溶液 3 ml,加入蒸馏水 3 ml,分别于 0 分钟、10 分钟、20 分钟、30 分钟、40 分钟、50 分钟、60 分钟按照“3.1”方法显色后测定吸光度值,计算得到假龙胆总多酚含量的 RSD 为 1.05%,样品在 60 分钟内显色稳定。

3.2.2 精密度试验 取 6 份总多酚对照品溶液,每份 3 ml,按照“3.1”方法显色后测定吸光度值,计算得到薰衣草总多酚含量的 RSD 为 1.58%,说明该方法测定假龙胆总多酚含量精密度良好。

3.2.3 重现性试验 取同一批假龙胆样品 6 份,分别按照“2.2”方法制成总多酚供试品溶液,每份精密吸取 3 ml,按照“3.1”方法显色后测定吸光度值,计算得到 RSD 为 2.88%,表明该方法测定假龙胆总多酚含量重现性良好。

3.2.4 加样回收率试验 精密吸取已知浓度的总多酚供试品溶液 9 份分成 3 组,每份 1.5 ml,分别精密加入高、中、低不同浓度的总多酚对照品溶液适量,按照“3.1”方法显色后测定吸光度值,并计算回收率,结果见表 1。

表 1 假龙胆中总多酚的回收率

编号	样品含量 (mg)	对照品加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均值	RSD%
1	0.76	0.3	1.098	105		
2	0.76	0.3	1.041	97.5		
3	0.76	0.3	1.070	101.3		
4	0.76	0.45	1.224	101.8		
5	0.76	0.45	1.196	98.2	101.1	2.4
6	0.76	0.45	1.239	103.8		
7	0.76	0.6	1.365	100.7		
8	0.76	0.6	1.337	97.0		
9	0.76	0.6	1.393	104.3		

3.3 样品含量测定

取假龙胆三份,每份平行 3 个样品,按照“2.2”方法制成总多酚样品溶液,每份精密吸取 3 ml,按照“3.1”方法显色后测定吸光度值,结果如表 2。

表 2 假龙胆中总多酚含量($n=3$)

样品编号	1	2	3
总多酚的含量(mg/g)	7.96 ± 0.06	7.66 ± 0.30	7.27 ± 0.67

3.4 对羟基自由基的清除能力

由图 1 分析可知,假龙胆提取液和阳性对照 Vc 对羟基自由基的清除作用均随着浓度的增大而增加。当浓度为 40 $\mu\text{g/ml}$ 时,假龙胆提取液对羟基自由基的清除作用是 Vc 对羟基自由基的清除作用的 2.97 倍;当浓度为 400 $\mu\text{g/ml}$ 时,假龙胆提取液对羟基自由基的清除作用是 Vc 对羟基自由基的清除作用的 1.13 倍。假龙胆提取液对羟基自由基的清除作用整体大于 Vc 对羟基自由基的清除作用。

3.5 对超氧阴离子的清除能力

由图 2 分析可知,假龙胆提取液和阳性对照 Vc 对超氧阴离子的清除作用均随着浓度的增大而增加。当浓度为 40 $\mu\text{g/ml}$ 时,Vc 对超氧阴离子的清除作用比假龙胆提取液对超氧阴离子的清除作用小;当浓度为 400 $\mu\text{g/ml}$ 时,Vc 对超氧阴离子的清

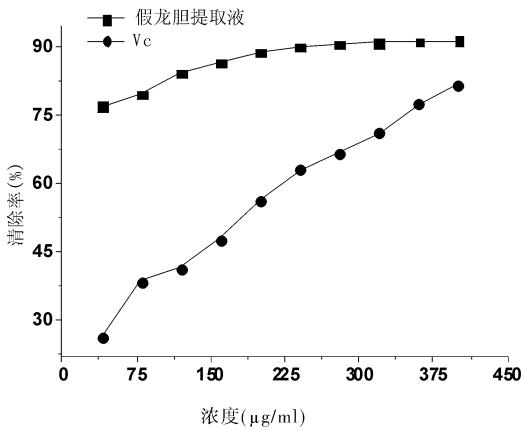


图 1 对羟基自由基的清除能力

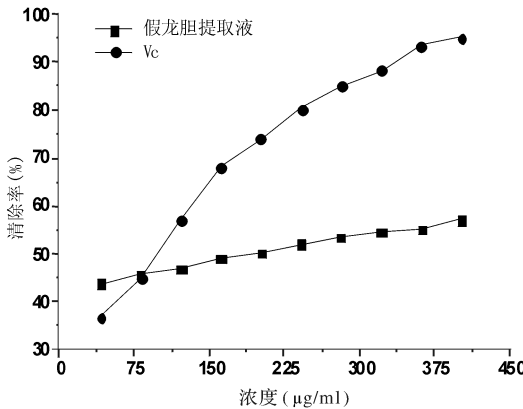


图 2 对超氧阴离子的清除能力

除作用是假龙胆提取液对超氧阴离子的清除作用的 1.66 倍。在 40~400 $\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内,假龙胆提取液对超氧阴离子的清除率增长趋势较为平缓,而 Vc 对超氧阴离子的清除作用增长趋势较大。

4 结论

从研究结果可以看出,假龙胆中具有较为丰富的总多酚,采用可见分光光度法测定假龙胆总多酚含量,简单易行,重现性好,结果稳定可靠,可作为测定假龙胆药材总多酚含量的检测方法。对假龙胆抗氧化作用研究发现,假龙胆提取液具有一定的抗氧化能力,可作为天然抗氧化资源进行开发。

参 考 文 献

[1] 李曼辉,孙亚红,宋晓玲. 中国假龙胆属植物传统药物学的调查研究[J]. 包头医学院学报,2010,26(3):3-6.
[2] 新疆维吾尔自治区卫生厅. 维吾尔药材标准(上册)[S]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1993.
[3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(六十二