

# 饿蚂蝗中多酚的含量测定<sup>Δ</sup>

袁见萍<sup>1\*</sup>, 张 龙<sup>1</sup>, 张前军<sup>1,2#</sup>, 康文艺<sup>3</sup>, 周清娣<sup>4</sup>(1. 贵州大学精细化工研究开发中心, 贵阳 550025; 2. 贵州大学化学与化工学院, 贵阳 550025; 3. 河南大学中药研究所, 河南 开封 475004; 4. 澳大利亚悉尼大学化学学院, 悉尼 1797)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)43-4078-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.43.16

**摘要** 目的: 建立测定饿蚂蝗中多酚含量的方法。方法: 以没食子酸为对照品, 采用优化后的Folin-Ciocalteu比色法(考察了测定波长、碳酸钠溶液体积、Folin-Ciocalteu显色剂加入量、反应温度及时间等)测定饿蚂蝗不同提取物中多酚的含量。结果: 没食子酸的质量浓度在0.001 0~0.006 1 mg/ml范围内与其吸光度呈良好的线性关系( $r=0.999 4$ ); 平均加样回收率为99.99%, RSD=0.59% ( $n=6$ )。饿蚂蝗75%乙醇提取物中多酚的质量分数最高, 为9.83%; 其次为40%乙醇提取物, 多酚质量分数为8.55%; 80%乙醇提取物中多酚的质量分数最低, 为0.32%。结论: 采用优化后的Folin-Ciocalteu比色法测定饿蚂蝗中多酚的含量, 精密度和灵敏度高、稳定性和重复性好、操作简单。

**关键词** 饿蚂蝗; 多酚; Folin-Ciocalteu比色法; 含量测定

## Content Determination of Polyphenols in *Desmodium sambuense*

YUAN Jian-ping<sup>1</sup>, ZHANG Long<sup>1</sup>, ZHANG Qian-jun<sup>1,2</sup>, KANG Wen-yi<sup>3</sup>, ZHOU Qing-di<sup>4</sup>(1. Fine Chemical R&D Center, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. College of Chemistry and Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 3. Institute for TCM Research, Henan University, Henan Kaifeng 475004, China; 4. College of Chemistry, Sydney University, Sydney 1797, Australia)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of polyphenols in *Desmodium sambuense*. METHODS: Using gallic acid as control, the content of polyphenols in different extracts of *D. sambuense* was determined by Folin-Ciocalteu colorimetry. The absorption wavelength, the volume of sodium carbonate, the amount of Folin-Ciocalteu reagent, reaction temperature and time were explored. RESULTS: The linear range of gallic acid were 0.001 0-0.006 1 mg/ml ( $r=0.999 4$ ) with an average recovery of 99.99% (RSD=0.59%,  $n=6$ ). The mass fraction of polyphenols in 75% ethanol extracts of *D. sambuense* was the highest, being 9.83%; followed by 40% ethanol extracts, being 8.55%; that of polyphenols in 80% ethanol extract was the lowest (0.32%). CONCLUSIONS: Optimized Folin-Ciocalteu colorimetry is adopted to determine the content of polyphenols in *D. sambuense*, which is simple, stable and repeatable with high precision and sensitivity.

**KEY WORDS** *Desmodium sambuense*; Polyphenols; Folin-Ciocalteu colorimetry; Content determination

饿蚂蝗为豆科山蚂蝗植物, 具有活血止痛、解毒消肿、清热解暑、消食的功效, 民间常用其治疗胃痛、小儿疳积、腮腺炎、淋巴结炎、毒蛇咬伤、腕腹疼痛、妇女干血癆、腰扭伤、创伤、尿道炎等症<sup>[1]</sup>。贵州省饿蚂蝗(*Desmodium sambuense*)植物资源丰富, 是民间广泛应用的药用植物, 但有关其化学成分及药理活性的研究报道较少。本课题组前期研究发现, 饿蚂蝗的醇提取物及其各部位具有良好的抗氧化作用和保肝活性<sup>[2]</sup>, 并通过化学成分研究推测其有效成分为黄酮和酚类化合物; 笔者认为饿蚂蝗抗氧化活性的强弱与其中黄酮和多酚的含量有关, 因此优化了以Folin-Ciocalteu法测定其中多酚含量的试验条件, 并对饿蚂蝗75%乙醇提取物及其各部位多酚的含量进行了测定。

<sup>Δ</sup> 基金项目: 教育部“春晖计划”立项资助合作科研项目(No. Z2011036); 贵阳市科技计划项目(No. 筑科合同[2012204]号)

\* 硕士研究生。研究方向: 天然有机化学。电话: 0851-3620746。E-mail: 244374058@qq.com

# 通信作者: 教授。研究方向: 天然产物化学。E-mail: qianjun-zhang@126.com

## 1 材料

### 1.1 仪器

TU-1901型紫外分光光度计(北京谱析通用仪器有限责任公司); TP-114型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); SB-5200D型超声波清洗器[宁波新芝生物科技股份有限公司, 功率: 200 W, 频率: (40±1) kHz]。

### 1.2 试剂

没食子酸对照品(贵州迪大科翔生物有限公司, 批号: 149917, 纯度≥98%); 钨酸钠( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、钼酸钠( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、硫酸锂( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ )、磷酸(≥85%)、碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )、浓盐酸、溴水等试剂均为分析纯, 水为蒸馏水; HPD-100型大孔树脂(河北沧州宝恩化工有限公司)。

### 1.3 药材

饿蚂蝗于2012年采自贵阳市, 经贵阳中医学院陈德媛教授鉴定为豆草科山蚂蝗属(*Desmodium*)植物饿蚂蝗 *D. sambuense* DC的全草。

## 2 方法与结果

### 2.1 供试品溶液的制备

将饿蚂蝗粉碎后用75%乙醇浸提, 滤过, 滤液浓缩后得浸

膏,浸膏用水分散,上大孔树脂,分别用水与20%、40%、60%、75%、80%、100%乙醇过柱分段,减压浓缩各部位,称取浸膏及各部位适量,以水溶解并定容至25 ml量瓶中,滤过,即得<sup>[3]</sup>。

## 2.2 福林酚试剂(FC试剂)的制备

称取钨酸钠25 g、钼酸钠6.25 g,加水175 ml、85%磷酸12.5 ml、浓盐酸25 ml,置磨口圆底烧瓶中,缓缓加热回流10 h,放冷,再加硫酸锂37.5 g、水12.5 ml和溴水适量,加热煮沸15 min,得金黄色溶液,冷却,加水稀释至250 ml,滤过并转移至量瓶中,即得。临用前加水1倍,摇匀<sup>[4]</sup>。

## 2.3 对照品贮备液的制备

精密称取没食子酸对照品0.050 5 g,用60%乙醇溶解并转移至100 ml量瓶中,以60%乙醇稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为0.505 0 mg/ml的对照品贮备液<sup>[5]</sup>。

## 2.4 标准曲线的制备<sup>[6]</sup>

分别精密吸取对照品贮备液0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 ml,置于50 ml量瓶中,补加水10 ml,再分别加入FC试剂1.5 ml和10%碳酸钠溶液7.5 ml,以水定容,摇匀,室温下显色40 min,以第一瓶为空白试剂,在765 nm波长处分别测定吸光度。以对照品质量浓度(x)为横坐标,吸光度(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得线性回归方程为 $y=7.215 9E-3x$ ( $r=0.999 4$ ,  $n=6$ )。结果表明,没食子酸的质量浓度在0.001 0~0.006 1 mg/ml范围内与吸光度呈良好线性关系。

## 2.5 测定条件的确定<sup>[7-11]</sup>

2.5.1 测定波长的确定 精密吸取对照品贮备液0.1 ml,置于50 ml量瓶中,补加水10 ml,再分别加入1.5 ml FC试剂和7.5 ml 10%碳酸钠溶液,以水定容,置55 °C恒温水浴锅中显色40 min,以相应试剂为空白,在200~900 nm波长范围内进行扫描,重复3次。结果,该溶液在765 nm波长处有最大吸收峰,故确定765 nm为测定波长。

2.5.2 显色温度的确定 精密吸取没食子酸对照品贮备液0.2 ml,共6份,分别置于50 ml量瓶中,每份补加水10 ml,再分别加入FC试剂1.5 ml和10%碳酸钠溶液7.5 ml,以水定容,摇匀,在不同温度下显色40 min,以相应试剂为空白,在765 nm波长处测定吸光度,选择吸光度最大时的温度为最适显色温度。显色温度对多酚含量测定的影响见图1。

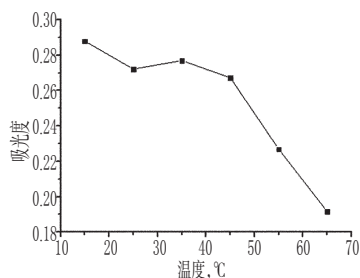


图1 显色温度对多酚含量测定的影响

Fig 1 Effect of reaction temperature on the content of polyphenols

由图1可知,吸光度随着温度的增加而减小。其中,室温(15 °C左右)下吸光度最大,故选择室温条件下测定多酚含量。

2.5.3 FC试剂体积的确定 精密吸取没食子酸对照品贮备液0.2 ml,共5份,分别置于50 ml量瓶中,每份补加水10 ml,再分别加入不同体积的FC试剂和7.5 ml 10%碳酸钠溶液,以水定容,摇匀,在室温下显色40 min,以相应试剂为空白,在765 nm波长处测定吸光度,选择吸光度最大时的FC体积为最适试剂

体积。FC试剂体积对多酚含量测定的影响见图2。

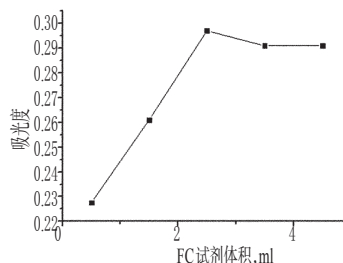


图2 FC试剂体积对多酚含量测定的影响

Fig 2 Effect of the amount of FC reagent on the content of polyphenols

由图2可知,随着FC试剂体积的增加,吸光度几乎呈直线上升,但当FC试剂体积为2.5 ml时,吸光度达到最大值,再增加FC试剂体积时,吸光度减小,并趋于稳定,故认为FC试剂体积为2.5 ml时最适宜。

2.5.4 10%碳酸钠溶液体积的确定 精密吸取没食子酸对照品贮备液0.2 ml,共5份,分别置于50 ml量瓶中,每份补加水10 ml,再分别加入2.5 ml FC试剂和不同体积的10%碳酸钠溶液,以水定容,摇匀,在室温下显色40 min,以相应试剂为空白,在765 nm波长处测定吸光度,选择吸光度最大时的体积为最适体积。

碳酸钠溶液是Folin-Ciocateau法测定多酚反应中的缓冲液,它能为显色剂与酚类反应提供碱性环境,使多酚与显色剂反应后在碱性环境下显蓝色。不同10%碳酸钠溶液体积对多酚含量测定的影响见图3。

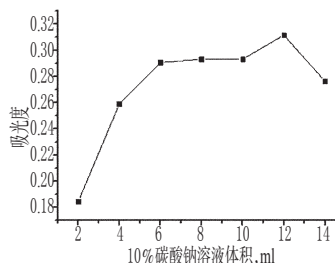


图3 10%碳酸钠溶液体积对多酚含量测定的影响

Fig 3 Effect of the amount of 10% sodium carbonate on the content of polyphenols

由图3可知,随着碳酸钠溶液体积的增加,吸光度逐渐增大,当碳酸钠溶液体积为12 ml时,吸光度达到最大值,此时再增加碳酸钠溶液体积,吸光度开始变小,故选择12 ml为缓冲溶液10%碳酸钠溶液的最适体积。

2.5.5 显色时间的确定 精密吸取没食子酸对照品贮备液0.2 ml,置于50 ml量瓶中,补加水10 ml,再分别加入2.5 ml FC试剂和12 ml 10%碳酸钠溶液,以水定容,摇匀,在室温下显色不同时间,以相应试剂为空白,分别在765 nm波长处测定吸光度。显色时间对多酚含量测定的影响见图4。

由图4可知,当显色时间为80 min时,吸光度最大,以后随着时间的延长,吸光度减小,故选择最佳显色时间为80 min。

## 2.6 精密度试验<sup>[12]</sup>

精密吸取0.2 ml对照品贮备液,共6份,分别置于50 ml量瓶中,每份补加水10 ml,再分别加入FC试剂2.5 ml和10%碳酸钠溶液12 ml,以水定容,摇匀,室温下显色80 min,以相应试剂为空白,在765 nm波长处测定吸光度。结果显示,6份溶液的吸光度分别为0.336 3、0.336 3、0.337 1、0.336 6、0.337 6、

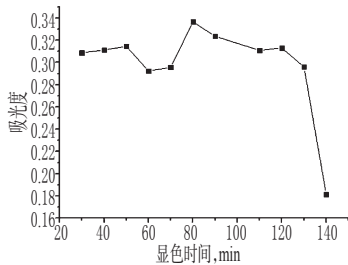


图4 显色时间对多酚含量测定的影响

Fig 4 Effect of reaction time on the content of polyphenols 0.335 6, RSD=0.21% (n=6), 表明仪器精密度良好。

### 2.7 稳定性试验<sup>[13]</sup>

称取饿蚂蝗75%乙醇提取物的浸膏22.1 mg,以水溶解并转移至25 ml量瓶中,精密吸取1 ml,共6份,分别置于50 ml量瓶中,其中3份加入对照品贮备液0.1 ml,另3份加入对照品贮备液0.2 ml,补加水10 ml,分别加入FC试剂2.5 ml和10%碳酸钠溶液12 ml,以水定容,摇匀,室温下显色80 min,以相应试剂为空白,在765 nm波长处于0、10、20、30、40 min测定吸光度。结果显示,RSD=1.23% (n=5),表明供试品溶液在制备显色80 min后的40 min内稳定。

### 2.8 重复性试验

精密吸取“2.7”项下制备的供试品溶液适量,共6份,依法显色后测定吸光度,计算样品含量。结果显示,饿蚂蝗75%乙醇提取物中多酚的平均质量分数为9.80%,RSD=1.37% (n=6),表明本方法重复性良好。

### 2.9 加样回收率试验<sup>[13]</sup>

精密吸取“2.7”项下制备的供试品溶液适量,共9份,每3份为一组,分别精密加入低、中、高剂量的没食子酸对照品溶液,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,再按上述方法测定吸光度,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

编号	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$ ,%	RSD,%
1	0.087 7	0.050 5	0.138 7	100.95		
2	0.086 5	0.050 5	0.136 8	99.56		
3	0.086 8	0.050 5	0.137 3	99.92		
4	0.086 9	0.086 9	0.172 1	98.04		
5	0.086 9	0.086 9	0.173 1	99.19	99.61	1.16
6	0.086 9	0.086 9	0.175 0	101.38		
7	0.086 9	0.101 0	0.188 0	100.05		
8	0.086 9	0.101 0	0.185 8	97.92		
9	0.086 4	0.101 0	0.186 9	99.46		

### 2.10 样品中多酚含量的测定

以优化后的试验条件测定饿蚂蝗75%乙醇提取物及其各部位浸膏中多酚的含量。分别称取饿蚂蝗75%乙醇提取物及其各部位浸膏适量,用水溶解并定容至25 ml,得各浸膏的水溶液。分别吸取各浸膏水溶液适量,置于50 ml量瓶中,补加10 ml水,再加入2.5 ml FC试剂和12 ml 10%碳酸钠溶液,以水定容至50 ml,在室温下显色80 min,于765 nm波长处测定吸光度,计算各样品中多酚的含量,结果见表2。

由表2可知,饿蚂蝗不同体积分数的乙醇浸膏中多酚的质量分数差异明显,其中以75%乙醇浸膏中多酚的质量分数最高,为9.83%;40%乙醇浸膏中多酚的质量分数其次,为8.55%;80%乙醇浸膏中多酚的质量分数最低,只有0.32%。

表2 不同样品中多酚含量的测定结果

Tab 2 Results of content determination of the samples in different extract solutions

样品	浸膏称样量,mg	多酚测得量,mg	多酚质量分数,%
水	27.7	0.594 1	2.14
20%乙醇	13.8	0.781 1	5.66
40%乙醇	21.4	1.829 7	8.55
60%乙醇	21.4	0.875 8	4.09
75%乙醇	22.1	2.170 0	9.83
80%乙醇	58.8	0.188 2	0.32
100%乙醇	82.1	0.327 6	0.40

## 3 讨论

多酚是一大类物质,每种植物中所含多酚的种类和含量不同,所以不同植物中多酚的提取方法和测定方法各异<sup>[14-15]</sup>。本试验以没食子酸为对照品,采用Folin-Ciocalteu法测定饿蚂蝗中多酚的含量,并对测定条件进行了改进,使该法具有精密度、灵敏度高,操作简单,稳定性和重复性好等优点,这也表明Folin-Ciocalteu法适于饿蚂蝗中多酚含量的测定。

## 参考文献

- [1] 李传宽,张前军,康文艺,等.饿蚂蝗中总黄酮含量的测定[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(23):58.
- [2] 张前军,于海林,李传宽,等.饿蚂蝗对四氯化碳致急性肝损伤小鼠保护作用研究[J].中成药,2011,33(11):1 993.
- [3] 李传宽,张前军,黄钟碧,等.饿蚂蝗化学成分研究[J].中国中药杂志,2010,35(18):2 420.
- [4] 吴晓青,陈丹,邱红鑫,等.芙蓉李中总多酚含量测定方法的优选[J].中国中医药科技,2011,18(2):131.
- [5] 陈晨,文怀秀,罗智敏,等.白刺色素和黑果枸杞色素中花色苷与总多酚的测定[J].光谱实验室,2010,27(5):1 796.
- [6] 任飞,杜宏涛,张继文,等.柿子皮提取物中多酚含量及其抗氧化活性[J].西北农业学报,2011,20(4):144.
- [7] 李文仙,俞丹,林玲,等.Folin-Ciocalteu比色法应用于蔬菜和水果总多酚含量测定的研究[J].营养学报,2011,33(3):302.
- [8] 卜彦花,周娜娜,王春悦,等.福林酚试剂法和紫外分光光度法测定冬枣多酚含量的比较研究[J].中国农学通报,2012,28(1):212.
- [9] 贾冬英,李尧,姚开,等.香蕉皮中多酚的提取工艺条件研究[J].四川大学学报,2005,37(6):52.
- [10] 王岸娜,徐山宝,刘小彦,等.福林法测定猕猴桃多酚含量的研究[J].食品科学,2008(7):398.
- [11] 江丽芬.雪花梨梨皮多酚含量测定[J].化学工程与装备,2011(12):168.
- [12] 罗杨合.Folin-Ciocalteu法测定马蹄皮中多酚的含量[J].湖北农业科学,2009,48(9):2 247.
- [13] 陈军,陈燕华,刁羽辉,等.双波长分光光度法测定复方间苯二酚洗剂中间苯二酚的含量[J].中国药房,2003,14(6):362.
- [14] 刘顺航,孟宪军,牛涛,等.葡萄籽中总多酚成分的测定[J].中华中医药杂志,2007,22(10):715.
- [15] 王建方,陈佳铭,吴德峰,等.加拿大一枝黄花不同部位酚类化合物的含量测定[J].中国中医药信息杂志,2011,18(2):59.

(收稿日期:2012-10-24 修回日期:2013-03-07)