

坚杆火绒草中总酚酸的提取及含量测定

赵小燕¹, 李波¹, 杨正明¹, 滕云¹, 刘圆^{2*}

(1. 西南民族大学 化学与环境保护工程学院, 成都 610041;

2. 西南民族大学 民族医药研究院, 成都 610041)

[摘要] **目的:**考察不同采收期坚杆火绒草不同部位中总酚酸含量的差异,验证“坚杆火绒草的采收时间为花期,使用部位为叶子和花”的合理性。**方法:**以绿原酸为对照品,以福林酚为显色剂,检测波长765 nm,采用紫外-可见分光光度法测定总酚酸含量。**结果:**绿原酸吸光度与质量浓度在0~20 mg·L⁻¹线性良好($R^2 = 0.9997$),平均加样回收率95.8% (RSD 1.0%)。坚杆火绒草花期的叶中总酚酸提取量高达190.606 mg·g⁻¹;花期总酚酸含量明显高于果期,同一植株叶子和花中总酚酸含量明显高于其他部位。**结论:**总酚酸可作为坚杆火绒草最佳采收期及药用部位的评价指标,为该药材的质量控制提供参考。

[关键词] 坚杆火绒草; 总酚酸; Folin-酚显色法; 绿原酸

[中图分类号] R283.6;R284.1;R284.2;R282.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)09-0019-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015090019

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150317.1045.006.html>

[网络出版时间] 2015-03-17 10:45

Extraction and Determination of Total Phenolic Acids in *Leontopodium franchetii* at Different Harvest Time

ZHAO Xiao-yan¹, LI Bo¹, YANG Zheng-ming¹, TENG Yun¹, LIU Yuan^{2*} (1. School of Chemistry and Environmental Protection Engineering, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China; 2. Ethnic Medicine Institute, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective:** To verify that acquisition time of *Leontopodium franchetii* was florescence and application parts were leaf and flower by investigating content differences of total phenolic acids in *L. franchetii* at different harvesting time. **Method:** UV-Vis spectrophotometry was adopted to determine the content of total phenolic acids with chlorogenic acid as standard, Folin-phenol as chromogenic agent and detection wavelength at 765 nm. **Result:** Linearity range of chlorogenic acid was 0-20 mg·L⁻¹ ($R^2 = 0.9997$), average recovery was 95.8% with RSD of 1.0%. The content of total phenolic acids from leaves of *L. franchetii* was up to 190.606 mg·g⁻¹ in florescence. It showed that the content of total phenolic acids at florescence was significantly higher than other periods in *L. franchetii*, it in leaves and flowers were significantly higher than other plant parts. **Conclusion:** Total phenolic acids can be used as an evaluation index to confirm optimum acquisition time and effective parts of *L. franchetii*. It provides scientific basis for rational utilization and quality control of *L. franchetii*.

[Key words] *Leontopodium franchetii*; Folin-phenol chromogenic assay; chlorogenic acid

坚杆火绒草别名莪药、山毛香,藏药名扎托巴、扎果^[1-2]。《藏药晶镜本草》记载:“扎托巴生长于3000~5000米的高山草甸,具有治疗吉祥天母瘟,止血,解矿石合毒,肉瘤等功效,多用于灸疗”^[3]。藏族药草灸疗法以其疗效显著、成本低廉、操作简便

等优势而被沿用至今。坚杆火绒草作为藏医临床施灸的原材料,每年7~8月份花开旺盛,此时灸草的叶和花朵生长茂盛,无籽且叶不宜断残,是采集灸草的最佳时节^[4]。国内外关于火绒草属植物的化学成分研究报道较多^[5],主要成分为有机酸^[6-7]、黄酮

[收稿日期] 20140915(018)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2012BAI27B07);西南民族大学研究生学位点建设项目(2015XWD-S0703)

[第一作者] 赵小燕,在读硕士,从事少数民族药物研究,Tel:13684060253,E-mail:718389925@qq.com

[通讯作者] *刘圆,博士,教授,从事少数民族药物的研究和教学,Tel:028-85528812,E-mail:499769896@qq.com

类^[8-9]、挥发油^[10]、倍半萜类^[11]、甾体类^[12]等,但尚无坚杆火绒草化学成分研究的报道。前期通过化学成分预试验已确定坚杆火绒草中总酚酸含量较高,酚酸类化合物是许多中草药的有效成分,具有清除自由基、抗菌、抗炎、抗氧化和调节心血管疾病的作用^[13-15]。本实验拟采用紫外分光光度法测定不同采收期坚杆火绒草的不同植物部位中总酚酸含量,通过单因素试验优选该药材中总酚酸的提取条件,以验证采收时间和使用部位的合理性。

1 材料

AE240S型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],TU-1950型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。坚杆火绒草于2013年7月2日和9月24日采自西南民族大学青藏高原研究基地红原草地,经西南民族大学民族医药研究院刘圆教授鉴定为坚杆火绒草 *Leontopodium franchetii* 的全草,用水洗净晒干,于60℃烘干,粉碎,过4号筛,得坚杆火绒草粗粉。福林酚试剂(美国Biosharp公司),绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号110753-200413),水为自制超纯水,试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品5.0 mg,置50 mL棕色量瓶中,加无水乙醇适量使溶解,放冷,加无水乙醇至刻度,摇匀,即得。

2.2 供试品溶液制备方法考察

2.2.1 提取溶剂 精密称取坚杆火绒草粗粉1 g,共8份,分别以水及10%,20%,30%,40%,50%,70%,95%的乙醇溶液为溶剂,料液比1:75,水浴加热回流提取3次,每次1 h,滤过,分别合并滤液,加相应溶剂定容于250 mL,计算总酚酸提取得率依次为60.959,62.114,62.791,63.624,62.647,60.426,54.831,46.217 mg·g⁻¹,故选择30%乙醇。

2.2.2 料液比 精密称取坚杆火绒草粗粉1 g,共5份,分别按料液比1:25,1:50,1:75,1:100,1:125加30%乙醇回流提取1 h,重复提取3次,滤过,分别合并滤液,加30%乙醇定容至250 mL,结果总酚酸提取得率依次为33.273,52.469,63.624,63.878,63.232 mg·g⁻¹,故确定料液比1:75。

2.2.3 提取方式 精密称取坚杆火绒草粗粉1 g,共5份,以30%乙醇为提取溶剂,料液比1:75,分别采用不同方式提取3次(45℃热浸提取1 h,35℃超声提取1 h,60℃超声提取1 h,水浴加热回流提取1 h,35℃超声辅助提取0.5 h后再水浴加热回流

提取1 h),滤过,分别合并滤液,加30%乙醇定容于250 mL量瓶中,结果总酚酸提取得率依次为35.783,55.627,53.339,63.624,58.265 mg·g⁻¹,故确定总酚酸提取方式为水浴加热回流法。

2.2.4 提取次数 精密称取坚杆火绒草粗粉1 g,共5份,以30%乙醇为提取溶剂,料液比1:75,水浴加热回流提取1 h,分别重复提取1,2,3,4,5次,滤过,分别合并滤液,加30%乙醇定容至250 mL,计算总酚酸提取得率依次为25.921,55.566,63.624,64.368,64.826 mg·g⁻¹,故确定提取数3次。

2.3 检测波长的选择^[16] 准确吸取绿原酸对照品溶液和供试品溶液适量,分别置于10 mL比色管中,加水至5 mL,加入福林酚试剂0.5 mL,摇匀,放置1 min;加入20%碳酸钠溶液1.5 mL,加水稀释至刻度,充分摇匀后于75℃水浴中放置10 min,速冷至室温,以提取溶剂为空白参比,在300~900 nm扫描,记录紫外吸收光谱,结果2种溶液显色后均在765 nm处有最大吸收峰,故确定检测波长765 nm。

2.4 标准曲线的绘制 精密吸取2.1项下对照品溶液0,0.2,0.4,0.8,1.2,1.6,2.0 mL,分别置于10 mL比色管中,按2.3项下方法进行显色,由于绿原酸长时间高温光照易分解,故全程操作均应尽量低温避光完成^[17]。于765 nm处测定吸光度(A),以A为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程 $A = 0.0575C + 0.0443$ ($R^2 = 0.9997$),线性范围0~20 mg·L⁻¹。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密密度试验 精密量取2.1项下对照品溶液1 mL,共6份,按2.4项下方法于765 nm处测定A,计算RSD 0.9%,表明仪器精密密度良好。

2.5.2 稳定性试验 取同批坚杆火绒草粗粉,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.4项下方法处理,分别于显色后15,30,60,90,120 min于765 nm处测定A,计算RSD 1.2%,表明供试品溶液在120 min内稳定性良好。

2.5.3 重复性试验 称取坚杆火绒草粗粉6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.4项下方法测定A,计算RSD 1.1%,表明本方法重复性较好。

2.5.4 回收率试验 精密称取已知含量的坚杆火绒草粗粉约10 mg,共6份,各加入绿原酸对照品0.5 mg,按2.2项下方法制备供试品溶液,以福林酚试剂显色后测定A,计算平均加样回收率95.8%,RSD 1.0%,表明该方法准确可靠。

2.6 不同采收期坚杆火绒草不同部位中总酚酸的

含量测定 精密称取不同采收期茎秆火绒草不同部位的粗粉各 1.0 g ($n=3$), 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.4 项下方法测定 A, 计算总酚酸含量, 见图 1。结果表明茎秆火绒草总酚酸含量随采收期的不同而变化, 花期总酚酸含量明显高于果期; 对同一植株不同部位总酚酸的含量进行统计学分析, 发现花期采样的 4 个部位及果期采样的 4 个部位的 P 均 <0.05 , 说明同一植株不同部位总酚酸的含量有显著性差异。花期采收的茎秆火绒草叶子总酚酸含量最高, 平均高达 $190.606 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

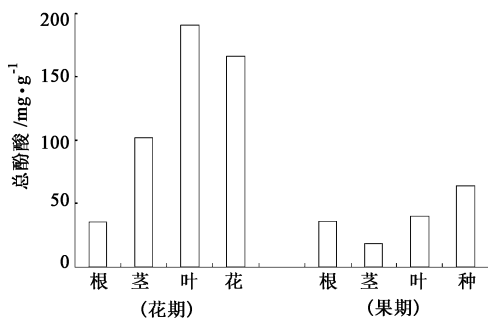


图 1 茎秆火绒草中总酚酸的含量 ($n=3$)

Fig. 1 Determination of total phenolic acids in *Leontopodium franchetii* ($n=3$)

3 讨论

福林酚显色法常用于测定蛋白, 以增加测定的灵敏度^[18]。该方法的原理为福林酚试剂在碱性条件下极不稳定, 其磷钼酸盐-磷钨酸盐易被酚酸类化合物还原而呈蓝色反应(钼蓝和钨蓝的混合物), 在可见光区能获得稳定的特征吸收峰, 且在一定浓度范围内蓝色的深浅度与酚酸类化合物浓度呈线性关系, 可用来定量测定总酚酸含量。研究表明福林酚显色法具有灵敏高、误差小、稳定等优点^[19], 故本文选择福林酚显色法测定茎秆火绒草中总酚酸含量。本文比较了不同采收期茎秆火绒草不同部位中总酚酸含量, 确定总酚酸可作为该药材最佳采收期及药用部位的评价指标, 为茎秆火绒草中酚酸类物质的开发利用及质量控制提供参考, 验证了藏医临床“在秋季花开旺盛时择吉日采集全草”的合理性, 确定其最佳药用部位为叶和花。

[参考文献]

[1] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社, 1991:201-202.
[2] 青海省藏医药研究所. 中国藏药. 第3卷[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1996:178-184.

[3] 嘎务. 藏药镜晶本草[M]. 藏文版. 北京:民族出版社, 1995:239.
[4] 索南卓玛, 扎西东主, 万玛太. 藏医灸草的辨认及炮制初探[J]. 中国民族医药杂志, 2011, 17(7):29-30.
[5] 武彦文, 高文远, 苏艳芳, 等. 火绒草属植物的化学成分和药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(4):245-248.
[6] 曹跃, 王丽, 陈昱竹, 等. 火绒草中酚类成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(8):606-608, 639.
[7] 姜鸿, 王光函, 张颖, 等. HPLC法测定火绒草中原儿茶酸、原儿茶醛、绿原酸和咖啡酸[J]. 中成药, 2011, 33(11):2023-2025.
[8] 张祎, 葛丹丹, 薛婧, 等. 火绒草黄酮类成分的分离与结构鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(3):186-189, 205.
[9] 陈秋, 王涛, 吴春华, 等. 火绒草化学成分的分离与鉴定(III)[J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(3):171-177.
[10] 高飞. 香芸火绒草挥发油提取工艺、化学成分及抑菌活性初步研究[D]. 成都:四川大学, 2007:24-26.
[11] Dobner M J, Ellemer E P, Schwaiger S, et al. New lignan, benzofuran and sesquiterpene derivatives from the roots of *Leontopodium alpinum* and *L. leontopodioides* [J]. Helvetica Chimica Acta, 2003, 86(3):733-738.
[12] 潘春媛, 武瑞, 贾永全, 等. 火绒草乙醇提取物的化学成分研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2011, 23(4):50-52.
[13] 张囡, 杜丽丽, 王冬, 等. 中药酚酸类成分的研究进展[J]. 中国现代中药, 2006, 8(2):25-28.
[14] Erkan N. Antioxidant activity and phenolic compounds of fractions from *Portulaca oleracea* L. [J]. Food Chem, 2012, 133(3):775-781.
[15] Sen S, De B, Devanna N, et al. Total phenolic, total flavonoid content, and antioxidant capacity of the leaves of *Meyna spinosa* Roxb., an Indian medicinal plant [J]. Chin J Nat Med, 2013, 11(2):149-157.
[16] 何文静, 张帆, 田树革, 等. Folin-Ciocalteu 比色法测定啤酒花中总多酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5):58-60.
[17] 顾利红, 朱品业. 日光和温度对绿原酸供试液稳定性的影响[J]. 中成药, 1999, 21(11):16-17.
[18] 张爱梅, 王荣, 谢华, 等. 蛋白质检测的方法学研究概述[J]. 生物技术通讯, 2011, 22(1):130-134.
[19] 颜小捷, 谷汾欣, 卢凤来, 等. FOLIN-酚比色法测定裸花紫珠中总酚含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18):74-78.

[责任编辑 刘德文]