

## FOLIN-酚比色法测定裸花紫珠中总酚含量

颜小捷<sup>1</sup>, 谷陟欣<sup>2</sup>, 卢凤来<sup>1</sup>, 黄胜<sup>2,3</sup>, 宁德生<sup>1</sup>, 李典鹏<sup>1\*</sup>

(1. 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西 桂林 541006;

2. 九芝堂股份有限公司, 长沙 410021; 3. 海南九芝堂药业有限公司, 海口 570311)

**[摘要]** 目的: 建立裸花紫珠总酚的含量测定方法。方法: 采用 Folin-酚比色法测定裸花紫珠中总酚的含量, 确定以没食子酸为对照品的最佳测定条件。结果: Folin-酚用量为 0.5 mL, 7.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 用量为 1.5 mL, 反应条件为 40 °C 下加热 10 min, 显色条件为 25 °C 下显色 60 min, 没食子酸浓度在 0~18 μg 时与其吸光度有良好线性关系, 其回归方程  $Y = 32.262X - 0.0012$  ( $n = 7$ ),  $r = 0.9999$ , 根据此线性回归方程进行裸花紫珠总酚的含量测定。结论: 该方法简单方便、稳定性好、准确度高, 可用于裸花紫珠原料及其制剂的质量控制和定量分析。

**[关键词]** 裸花紫珠; 总酚; 福林-酚

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0074-05

**[doi]** 10.11653/syjf2013180074

## Determination of Total Polyphenol from *Callicarpa nudiflora* by Folin-phenol Colorimetry

YAN Xiao-jie<sup>1</sup>, GU Zhi-xin<sup>2</sup>, LU Feng-lai<sup>1</sup>, HUANG Sheng<sup>2,3</sup>, NING De-sheng<sup>1</sup>, LI Dian-peng<sup>1\*</sup>

(1. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences,

Guilin 541006, China; 2. Jiuzhitang Co., Ltd, Changsha 410021, China;

3. Hainan Pharmaceutical Co., Ltd, Haikou 570311, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for determination of total polyphenol from *Callicarpa nudiflora*. **Method:** The total polyphenol content of *C. nudiflora* was analyzed by folin-phenol colorimetry. The optimum conditions were investigated using gallic acid as standard. **Result:** The polyphenol content of *C. nudiflora* could be well calculated by applying folin-phenol reagent 0.5 mL, 7.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.5 mL, reacted 10 min at 40 °C, color condition 60 min at 25 °C for colorimetric reaction. The linear range of standard curve was 0-18 μg. The regression equation was found as follows  $Y = 32.262X - 0.0012$  ( $n = 7$ ) with the correlation coefficient  $r = 0.9999$ . **Conclusion:** The method established is simple, stable and accurate, which is suitable for analysis of total polyphenol and quality control in *C. nudiflora*.

**[Key words]** *Callicarpa nudiflora*; total polyphenol; folin-phenol

**[收稿日期]** 20130131(002)

**[基金项目]** 国家科技支撑计划项目(SQ2010BAJY1411-07-05); 海南省中药现代化专项(2012ZY020); 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 11107010-3-10)

**[第一作者]** 颜小捷, 硕士, 实习研究员, 从事植物资源开发与利用研究, Tel: 0773-3550682, E-mail: xiaojie128@126.com

**[通讯作者]** \* 李典鹏, 药学博士, 研究员, 从事植物资源开发与利用研究, Tel: 0773-3550682, E-mail: ldp@gxib.cn

裸花紫珠为马鞭草科紫珠属植物, 主产于我国海南, 在我国广西、广东也有分布<sup>[1]</sup>; 国外主要分布于印度、越南和马来西亚。其味苦、微辛、性平; 其根、茎、叶皆可入药; 有收敛止血、抗菌消炎、散瘀消肿、解毒等功效; 主要用于治疗呼吸道及消化道出血、急性传染性肝炎、化脓性炎症、血小板减少性紫癜等症, 外用主治外伤出血、肺结核咳血、胃肠出血、烧伤、烫伤、风湿肿痛、跌打肿痛等症, 是海南黎族医生的常用药材之一<sup>[2]</sup>。裸花紫珠成分杂, 主要含有

萜类、黄酮类、苯乙醇苷类、缩合鞣质、羟基化合物等成分<sup>[3-8]</sup>,提取液颜色深、作用物质基础不明,缺乏科学规范的控制标准和检测方法。而裸花紫珠酚酸类成分具有显著缩短活化部分凝血活酶时间活性等药理作用,在裸花紫珠中含量很高,该类成分可能是裸花紫珠止血作用的主要活性成分<sup>[3]</sup>。多酚的经典含量测定方法有很多种,如质量法、容量法、比色法、紫外分光光度法和 Folin-酚法等,且不同药材的 Folin-酚法测定总酚也均有所差异<sup>[9-11]</sup>。本文对裸花紫珠提取物中总多酚的测定条件进行了研究,为进一步开发制剂提供了稳定、可靠的分析评价手段。

## 1 材料

裸花紫珠干浸膏粉末(以下简称干浸膏),由九芝堂药业海南分公司提供(批号 110500),提取溶剂为饮用水,植物部位为枝叶,深棕色粉末,易受潮。

毛蕊花糖苷(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号 M-011-110622),原儿茶酸(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号 Y-031-111227),没食子酸(实验室制备所得,经 HPLC 分析纯度 >98%)。

甲醇(AR,西陇化工股份有限公司,批号 1103201),福林酚试剂(上海荔达生物科技有限公司,货号 PRLB09125),无水碳酸钠(AR,广州化学试剂厂,批号 830902)。

XS205 型电子天平(METTLER TOLEDO),XS225A-SCS 型电子天平(Precisa),HH-S 型水浴锅(郑州长城科工贸有限公司),T6 型新世纪紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

## 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的制备** 精密称取毛蕊花糖苷对照品 1.68 mg,置 10 mL 棕色量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀得质量浓度为  $0.168 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的毛蕊花糖苷对照品溶液。精密称取原儿茶酸对照品 1.84 mg,得质量浓度为  $0.184 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的原儿茶酸对照品溶液。

精密称取没食子酸 10.0 mg,置 10 mL 棕色量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品储备液。精密移取 1 mL 对照品储备液置于 10 mL 棕色量瓶中,用 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的没食子酸对照品溶液。

**2.2 供试品溶液的制备** 精密称取干浸膏粉末 100.0 mg,加 50% 甲醇 10 mL 超声溶解,转移至 100 mL 量瓶中(洗涤 3 次),用 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀备用。

**2.3 最佳测量波长和最佳对照品溶液的选择** 分别移取 0.1 mL 的干浸膏溶液及 3 组对照品溶液,加入 0.3 mL Folin 试剂,黑暗条件下放置 2 min,然后加入 2 mL 7.5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液,加蒸馏水至 5 mL,摇匀置于 40 °C 水浴 10 min 后 25 °C 暗置水浴 30 min。以空白试剂为参比。用紫外-可见分光光度计在 400 ~ 800 nm 每隔 20 nm 测吸光度,绘制得到波长扫描图(图 1)。

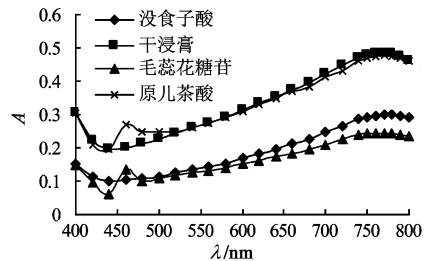


图 1 裸花紫珠样品及对对照品紫外吸收

由图 1 所示,四者均在 760 nm 波长处有最大吸收,故选择 760 nm 为紫外总酚检测波长。此外,没食子酸和干浸膏趋势较一致,且没食子酸对照品较容易获得,故选择没食子酸为总酚检测最佳对照品溶液。

**2.4 碳酸钠溶液质量浓度的确定** 分别移取 7 份 0.1 mL 最佳对照品溶液,加入 0.3 mL Folin 试剂,黑暗条件下放置 2 min,然后加入 2 mL 质量浓度为 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, 15%, 17.5%, 20% 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液,加水至 5 mL,40 °C 水浴 10 min 后 25 °C 暗置水浴 30 min,以空白试剂为参比,在最佳检测波长处测量其吸光度,结果见图 2。

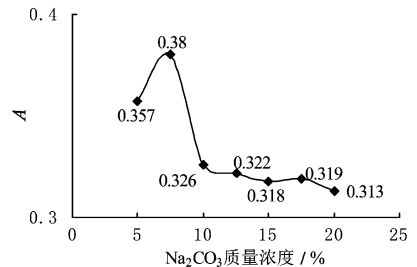


图 2 碳酸钠溶液质量浓度的考察

由图 2 的可知,在一定范围内,总酚测定吸光度随碳酸钠溶液质量浓度的升高呈现先升后降的趋势,故实验选择  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液质量浓度为 7.5%。

**2.5 碳酸钠溶液用量的测定** 分别移取 9 份 0.1 mL 最佳对照品溶液,加入 0.3 mL Folin 试剂,黑暗条件下放置 2 min,然后加入最佳质量浓度的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液,用量分别为 0.15, 0.30, 0.60, 0.90, 1.20, 1.50, 1.80, 2.10, 2.40 mL,加水至 5 mL,40 °C

水浴 10 min 后 25 °C 暗置水浴 30 min, 以空白试剂为参比, 在最佳检测波长处测量其吸光度, 结果见图 3。

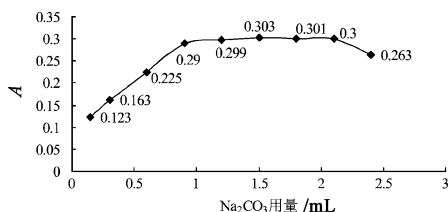


图 3 碳酸钠溶液用量的考察

由图 3 的可知, 在一定范围内, 总酚测定吸光度随碳酸钠溶液用量的增多亦呈现先升后降的趋势, 故实验选择 7.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液用量为 1.5 mL。

**2.6 福林酚试剂用量的选择** 分别移取 8 份 0.1 mL 最佳对照品溶液, 加入 Folin 试剂, 用量分别为 0.15, 0.30, 0.45, 0.60, 0.75, 0.90, 1.20, 1.50 mL, 黑暗条件下放置 2 min, 然后加入最佳质量浓度及最佳用量的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液, 加水至 5 mL, 40 °C 水浴 10 min 后 25 °C 暗置水浴 30 min, 以空白试剂为参比, 在最佳检测波长处测量其吸光度, 结果见图 4。

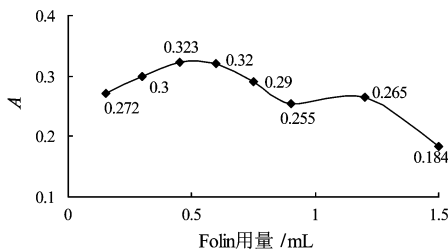


图 4 福林酚试剂用量的考察

由图 4 的可知, 在一定范围内, 总酚测定吸光度随福林酚试剂用量的增多呈现波动趋势, 在 0.45 mL 时吸光度最高, 故实验选择福林酚溶液用量为 0.45 mL。

**2.7 最佳反应温度的确定** 分别移取 8 份 0.1 mL 最佳对照品溶液, 最佳 Folin 试剂用量, 黑暗条件下放置 2 min, 然后加入最佳质量浓度及最佳用量的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液, 加水至 5 mL, 选择反应温度分别为 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 °C 水浴 10 min 后 25 °C 暗置水浴 30 min, 以空白试剂为参比, 在最佳检测波长处测量其吸光度, 结果见图 5。

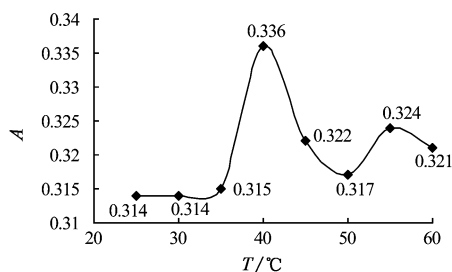


图 5 最佳反应温度的考察

2 min, 然后加入最佳质量浓度及最佳用量的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液, 加水至 5 mL, 选择最佳反应温度水浴 10 min 后在显色 20 ~ 150 min 每隔 10 min 以最佳检测波长测量其吸光度, 确定最佳显色时间, 见图 6。

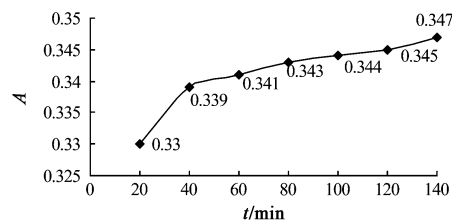


图 6 最佳显色时间的考察

由图 6 可知, 在一定范围内, 总酚测定吸光度随显色时间的延长略呈升高趋势。但实验中发现, 显色时间 60 min 后, 吸光度变化不大, 考虑时效性等因素, 故实验选择最佳显色时间为 60 min。

**2.9 正交试验** Folin 试剂的用量、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 的用量以及水浴显色时间对整个反应体系均具有一定的影响。本实验采用正交试验对此进行了考察。取 0.1 mL 的对照品溶液, 选择表 1 的因素、水平, 按表 2 加好试剂后, 按要求操作, 最大吸收波长处测定吸光度, 考察最佳的显色条件。

表 1 因素水平表

水平	A Folin/mL	B Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /%	C 时间/min
1	0.40	6.5	60
2	0.45	7.5	90
3	0.50	8.5	120

由表 3 的分析结果可知, 三因素的 *P* 均 > 0.05, 对结果影响不大, 不必再进行各因素水平间的多重比较。实验中发现, Folin 用量 0.5 mL, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 浓度为 8.5%, 显色时间为 90 min 时吸光度最大, 而 Folin 用量 0.5 mL, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 浓度为 7.5%, 显色时间为 60 min 时吸光度较最大值略低, 考虑时效性等因素, 故实验选择最佳显色条件为 Folin 用量 0.5 mL, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 浓度为 7.5%, 显色时间为 60 min。

表2 显色条件考察结果

No.	A	B	C	A760
1	1	1	1	0.315
2	1	2	2	0.321
3	1	3	3	0.326
4	2	1	2	0.324
5	2	2	3	0.324
6	2	3	1	0.326
7	3	1	3	0.321
8	3	2	1	0.332
9	3	3	2	0.338

表3 方差分析

因素	F	P
Folin 用量	3.938	0.203
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 浓度	1.233	0.448
显色时间	1.024	0.494

**2.10 Folin-酚比色法评价** 稳定性试验:取同一样品溶液 0.1 mL 按最佳显色条件显色完全后测定吸光度,每隔 10 min 测定吸光度,结果样品在 2.5 h 内稳定(RSD 0.47%)。

重复性试验:取 0.1 mL 待测溶液 6 份,按最佳显色条件显色完全后测定吸光度,测得样品总酚的平均含量为 0.02 mg(RSD 0.56%)。

精密度试验:取 0.1 mL 待测溶液 1 份,按最佳显色条件显色完全后测定吸光度,连续测定 6 次,吸光度分别为 0.498, 0.497, 0.497, 0.497, 0.497, 0.497(RSD 0.08%)。

加样回收试验:分别精密吸取 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 μL 没食子酸对照品溶液于试管中,加入 Folin 试剂 0.5 mL,混匀后静置 2 min,加入 7.5% 碳酸钠溶液 1.5 mL,加水至 5 mL,40 °C 水浴 10 min 后 25 °C 水浴暗置 60 min。760 nm 波长下测定吸光度,以没食子酸含量为横坐标,以其吸光度为纵坐标,得没食子酸含量测定标准曲线  $Y = 32.262X - 0.0012 (r = 0.9999)$ 。同时取 0.1 mL 干浸膏溶液按照最佳显色条件进行显色,760 nm 处测定吸光度。根据标准曲线方程计算样品中总酚的含量,得干浸膏溶液中总酚含量  $0.158 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取 0.1 mL 上述待测溶液 6 份,分别加入 30, 60, 90 μL 没食子酸对照品溶液,摇匀,平行操作 2 份,按最佳显色条件显色完全后测定吸光度,计算回收率。结果见表 4。

表4 没食子酸加样回收试验

No.	样品总酚含量/mg	加入量/mg	A	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.015 845	0.003	0.589	0.018 294	97.07		
2	0.015 845	0.003	0.592	0.018 387	97.57		
3	0.015 845	0.006	0.703	0.021 828	99.92		
4	0.015 845	0.006	0.701	0.021 766	99.63	99.60	2.00
5	0.015 845	0.009	0.817	0.025 361	102.08		
6	0.015 845	0.009	0.811	0.025 175	101.33		

### 3 讨论

裸花紫珠的主要化学成分有萜类、黄酮类、苯乙醇苷类、缩合鞣质、羟基化合物等。其中黄酮类成分,由于人们认识的较早并且测定方法较成熟,被首选为裸花紫珠的质量控制指标。目前报道多采用紫外-可见分光光度法,但实验中发现,测定总黄酮所用波长 495 nm 处受样品色素影响较大,此外,总皂苷含量虽比总酚含量高,但其极性相对较小(干浸膏的 HPLC 分析谱图上峰型较小较多,出峰时间较大),而我们分离鉴定所得的大极性化合物多为酚羟基类化合物。综合考虑,采用测定总酚含量作为下一步质量控制指标成分。

采用 Folin-酚比色法测定总酚的原理是:在碱

液中酚类化合物可以将钨酸钠还原生成蓝色化合物,此化合物的颜色和多酚的含量正相关。由于多酚类成分不稳定,溶液显色后应避光保存防止多酚在高温和光照下发生氧化或聚合<sup>[12]</sup>。本实验曾采用最佳反应温度反应后室温显色,但随着天气的变化,室温变化差异较大,实验结果重复性差,而采用 25 °C 显色,温度较为稳定,实验结果准确、重复性强。最后方法学考察认为该方法操作简单,稳定性好,准确度高。

[致谢]海南九芝堂药业有限公司为本实验提供裸花紫珠药材。

#### [参考文献]

[1] 徐国钧. 中国药材学[M]. 北京:中国科技医药出版社,1996.

## HPLC 测定醋艾炭间羟基安息香酸的含量

王永丽, 尉小慧, 赵森森, 刘伟, 李思蒙, 俞桂新\*, 王峥涛

(上海中医药大学中药研究所; 中药标准化教育部重点实验室; 中药新资源与质量标准综合评价国家中医药管理局重点研究室; 上海中药标准化研究中心 上海 201203)

**[摘要]** 目的: 对不同产地醋艾炭间羟基安息香酸的含量进行比较研究, 为醋艾炭的质量控制及合理利用提供科学依据。方法: 采用 HPLC, Prevail C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸 (15:85), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 240 nm, 柱温 25 °C。结果: 间羟基安息香酸在 0.010 02 ~ 0.501 00 μg 具有良好的线性 ( $r = 1.000 0$ ), 平均回收率 ( $n = 9$ ) 97.39%, RSD 0.99%。结论: 所建方法准确、简单、重复性好, 不同产地醋艾炭间羟基安息香酸的含量差异显著。

**[关键词]** 醋艾炭; 高效液相色谱; 间羟基安息香酸

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0078-04

**[doi]** 10.11653/syfy201318078

## Content Determination of 3-Hydroxybenzoic Acid in Artemisiae Argyi Folium (Carbonized and Processed with Vinegar) by HPLC

WANG Yong-li, WEI Xiao-hui, ZHAO Sen-miao, LIU Wei, LI Si-meng, CHOU Gui-xin\*, WANG Zheng-tao  
(Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; the MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and the SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines; Shanghai R&D Centre for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201203, China)

**[收稿日期]** 20130314(007)

**[基金项目]** 国家药品标准提高研究项目(778)

**[第一作者]** 王永丽, 在读硕士生, 从事中药活性成分与质量标准研究, Tel: 021-50271706, E-mail: ylwang521@126.com

**[通讯作者]** \* 俞桂新, 教授, 博士生导师, 从事中药活性成分与质量标准研究, Tel: 021-50271706, E-mail: chouguxinzyb@126.com

- [2] 张艳秋, 洪金波, 刘文林. HPLC 法测定裸花紫珠中齐墩果酸与熊果酸的含量[J]. 海南医学院学报, 2009, 15(1): 5.
- [3] 张洁, 李宝泉, 冯锋, 等. 裸花紫珠的化学成分及其止血活性研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(24): 3297.
- [4] Mei W L, Zhuang H, Cui H B, et al. A new cytotoxic iridoid from *Callicarpa nudiflora* [J]. Nat Prod Res, 2010, 24(10): 899.
- [5] 巩珺, 麦锦富, 彭素萍, 等. Doehlert 设计法优化紫珠中苯乙醇苷的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 7.
- [6] 高飞鹏, 汪豪, 叶文才, 等. 裸花紫珠叶的化学成分[J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(2): 120.
- [7] 董琳, 刘明生, 王金辉. 裸花紫珠的脂溶性化学成分[J]. 中国药物化学杂志, 2009, 19(5): 371.
- [8] 李才堂, 文萍, 郭琦丽, 等. HPLC 测定裸花紫珠药材中毛蕊花糖苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 84.
- [9] 张毛莉, 罗仓学. 石榴皮中总酚含量测定方法的比较[J]. 食品工业科技, 2011, 32(5): 383.
- [10] 周云凯, 李伟平, 田莎莎, 等. 白及须根和块茎总酚含量的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 161.
- [11] 王恩, 汪保林, 董慧君, 等. 紫外-可见分光光度法测定火绒草提取物中总酚酸含量[J]. 现代中药研究与实践, 2012, 26(4): 69.
- [12] 李囡囡, 贾倩, 杜海红, 等. Folin 比色法测定鹿衔草提取物中总多酚的含量[J]. 长治医学院学报, 2010, 24(1): 8.

[责任编辑 顾雪竹]