

铁皮石斛中总酚的含量测定

李娟,麻晓雪,李顺祥*,张家曾

(湖南中医药大学中药现代化教育厅重点实验室,长沙 410208)

[摘要] **目的:**建立铁皮石斛总酚含量的快速测定方法。**方法:**以阿魏酸为对照品,采用福林酚比色法测定铁皮石斛中总酚含量。通过单因素试验筛选检测波长、显色时间和温度等显色条件;以总酚含量为指标,通过 $L_9(3^4)$ 正交试验考察乙醇体积分数、料液比、提取时间和提取次数对总酚提取工艺的影响,确定含量测定中供试品溶液的制备方法。**结果:**显色条件为检测波长 760 nm,福林酚试剂用量 3.5 mL,10% 碳酸钠溶液用量 7 mL,显色温度 20~30 ℃,避光反应时间 0.5 h。铁皮石斛总酚的提取工艺为加 40 倍量 70% 乙醇提取 1 h。总酚含量测定的线性范围 3.168~9.504 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,平均加样回收率 97.9%,RSD 1.53%。**结论:**建立的含量测定方法操作简便、快速、准确、稳定、重复性好,可用于铁皮石斛中总酚含量的测定。

[关键词] 铁皮石斛;总酚;福林酚;含量测定;正交试验;单因素试验

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0060-03

[doi] 10.11653/syjf2013240060

Determination of Total Phenols in Dendrobii Officinalis Caulis

LI Juan, MA Xiao-xue, LI Shun-xiang*, ZHANG Jia-zeng

(Key Laboratory of Modernization of Chinese Medicine, Department of Education,
Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a rapid determination of total phenols in Dendrobii Officinalis Caulis. **Method:** Folin-Ciocalteu Colorimetry was adopted to determine the content of total phenols in Dendrobii Officinalis Caulis by taking ferulic acid as a reference. Single factor tests were adopted to screen chromogenic conditions, such as detection wavelength, chromogenic time and temperature, et al; With the content of total phenols as index, effects of ethanol concentration, solid-liquid ratio, extraction time and times on extraction technology of total phenols were investigated by $L_9(3^4)$ orthogonal test, in order to define preparation method of the test solution for determination. **Result:** Chromogenic conditions were as follows: detection wavelength 760 nm, the amount of Folin-Ciocalteu reagent 3.5 mL, the amount of 10% sodium carbonate solution 7 mL, chromogenic temperature 20-30 ℃, dark reaction time 0.5 h. Optimum extraction of total phenols from Dendrobii Officinalis Caulis was as following: extracted 1 h with 40 times the amount of 70% ethanol. The concentration of ferulic acid had a good linear relationship in range of 3.168-9.504 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, average recovery was 97.9% with a corresponding RSD of 1.53% ($n=6$). **Conclusion:** This determination method was simple, rapid, accurate, stable and reproducible for determining the content of total phenols in Dendrobii Officinalis Caulis.

[Key words] Dendrobii Officinalis Caulis; total phenols; Folin-Ciocalteu; determination; orthogonal test; single factor test

[收稿日期] 20130510(025)

[基金项目] 湖南省科技计划重大专项项目(2010FJ1010-3);国家中医药管理局“药用植物学”重点学科课题(国中医药发[2009]30号);湖南“中药学”重点学科(湘教通[2011]76号),湖南省高校科技创新团队项目(湘教通[2010]212号)

[第一作者] 李娟,助理研究员,从事中药物质基础与作用机制研究,Tel:0731-85189068,E-mail:forever_lijuan@163.com

[通讯作者] *李顺祥,教授,研究员,从事中药有效成分与资源研究,Tel:0731-88458229,E-mail:lishunxiang@hotmail.com

铁皮石斛具有益胃生津、滋阴清热之功效,临床用于治疗阴伤津亏、口干烦渴、胃阴不足、食少干呕、病后虚热不退、阴虚火旺、骨蒸劳热、目暗不明、筋骨痿软^[1]。现代药理学研究表明,铁皮石斛具有抗衰老、抗肿瘤、降低血糖和提高免疫等生物活性^[2-4]。其化学成分包括石斛多糖、氨基酸、微量元素、菲类化合物、联苳类化合物、酚酸类化合物、生物碱等,大部分化合物具有酚类结构。酚类化合物是铁皮石斛的药用活性成分之一,如鼓槌菲和毛兰素可抑制肝癌和艾氏腹水癌细胞的活性,4,4'-二羟基-3,5-二甲氧基联苳可抑制人卵巢癌细胞株(A2780)活性,4,4'-二羟基-3,3',5-三甲氧基联苳可抑制人胃癌细胞株(BGC-823)和人卵巢癌细胞株(A2780)的活性^[5]。目前尚无铁皮石斛中总酚含量测定的报道,本实验以阿魏酸为对照品,采用福林酚比色法测定铁皮石斛中总酚含量,为有效控制铁皮石斛药材的质量提供较简便的检测方法。

1 材料

UV-1800型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),T-214型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

铁皮石斛(由湖南龙石山铁皮石斛基地有限公司提供,经湖南中医药大学刘塔斯教授鉴定为兰科植物铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 的干燥茎),阿魏酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号110773-201012),所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精确称取阿魏酸对照品4.95 mg,置于25 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2 福林酚试剂的制备^[1] 分别称取钨酸钠、钼酸钠25,6.25 g,置于磨口圆底烧瓶中,依次加入水、85%磷酸、盐酸175,12.5,25 mL,缓缓加热回流10 h,放冷,加入硫酸锂37.5 g,水12.5 mL和溴水数滴,加热煮沸15 min,冷却,加水稀释至250 mL,滤过,续滤液作为贮备液,置棕色瓶中,临用前加1倍量水稀释,摇匀,即得。

2.3 分析条件的确定^[6]

2.3.1 供试品溶液的制备 精密称取铁皮石斛粗粉0.3004 g,加70%乙醇50 mL回流提取2 h,冷却,过滤,滤液移至50 mL量瓶中,加70%乙醇定容至刻度,即得。

2.3.2 检测波长 精密吸取供试品溶液3 mL与对照品溶液0.6 mL,分别置于25 mL具塞试管中,各

加入福林酚试剂2 mL,10%碳酸钠溶液8 mL,加水定容至刻度,于50℃避光反应1.5 h,在400~800 nm进行全波长扫描,结果发现供试品和对照品溶液均在760 nm处有最大吸收。

2.3.3 显色温度 精密吸取供试品溶液6份,每份3 mL,分别在20,30,40,50,60,70℃反应,于760 nm处测定吸光度(A),其他操作同2.3.2项,结果表明随显色温度的升高,A逐渐减小,20℃与30℃结果无差异,故确定显色温度20~30℃。

2.3.4 显色时间 精密吸取供试品溶液6份,每份3 mL,分别于20~30℃避光反应0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 h,于760 nm处测定A,其他操作同2.3.2项,结果A的RSD 1.27%,表明显色时间对检测方法影响不大,故选择显色时间0.5 h。

2.3.5 福林酚试剂用量 精密吸取供试品溶液8份,每份3 mL,分别加入福林酚试剂0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,4.0 mL,于20~30℃避光反应0.5 h,在760 nm处测定A,其他操作同2.3.2项,结果发现A随福林酚试剂加入量的增加而增大,但当加入量>3.5 mL时,A降低,故确定福林酚试剂加入量3.5 mL。

2.3.6 碳酸钠溶液用量 精密吸取供试品溶液6份,每份3 mL,分别加入10%碳酸钠溶液1,3,5,7,9,11 mL,福林酚试剂3.5 mL,于20~30℃避光反应0.5 h,于760 nm处测定A,其他操作同2.3.2项,结果显示10%碳酸钠溶液加入量为7 mL时,铁皮石斛中总酚含量最高。

2.4 标准曲线的制备 精密量取阿魏酸对照品溶液0,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2,1.4 mL,分别置于25 mL棕色量瓶中,各加入福林酚试剂3.5 mL,摇匀,加入10%碳酸钠溶液7 mL,加水定容至刻度,于20~30℃避光反应0.5 h,同时配制空白溶液,在760 nm处测定A,以质量浓度(C)为横坐标,A为纵坐标,得线性方程 $A = 0.0765C + 0.0638$ ($r = 0.9996$),表明阿魏酸对照品质量浓度在3.168~9.504 mg·L⁻¹与A呈良好线性关系。

2.5 供试品溶液的制备工艺考察^[7] 选取乙醇体积分数、料液比、提取时间和提取次数为考察因素,以总酚提取量为评价指标,精密称取铁皮石斛粗粉约0.3 g,共9份,按L₉(3⁴)正交表进行试验,因素水平见表1,提取液定容至50 mL,按2.4项下方法显色,试验安排及结果见表2,方差分析见表3。

由直观分析可知,各因素对总酚提取量的影响顺序为A>B>D>C。以极值最小的C因素为误差

表 1 铁皮石斛总酚提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积 分数/%	B 料液比	C 提取时间 /h	D 提取数 /次
1	90	1:30	1.0	1
2	80	1:40	1.5	2
3	70	1:50	2.0	3

表 2 铁皮石斛总酚提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	总酚提取量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
1	1	1	1	1	4.11
2	1	2	2	2	4.09
3	1	3	3	3	3.78
4	2	1	2	3	4.66
5	2	2	3	1	5.18
6	2	3	1	2	5.15
7	3	1	3	2	4.93
8	3	2	1	3	5.22
9	3	3	2	1	5.44
K_1	11.98	13.70	14.48	14.73	
K_2	14.99	14.49	14.19	14.17	
K_3	15.59	14.37	13.89	13.66	
R	1.21	0.26	0.20	0.36	

表 3 总酚提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	2.49	2	1.24	41.33	<0.05
B	0.12	2	0.06	2.00	>0.05
C(误差)	0.06	2	0.03	1.00	
D	0.19	2	0.10	3.33	>0.05

注： $F_{0.10}(2,2) = 9.0$ ； $F_{0.05}(2,2) = 19.0$ 。

项进行方差分析，A 因素影响显著，其他因素则无显著性影响。确定最佳提取工艺组合为 $A_3B_2C_1D_1$ ，即加 40 倍量 70% 乙醇提取 1 h，冷却，过滤，滤液移至 50 mL 量瓶中，加 70% 乙醇定容至刻度，即得供试品溶液。取铁皮石斛粗粉 3 份，每份约 0.3 g，按优选的提取工艺进行 3 次验证试验，结果总酚含量的 RSD 1.14%，表明优选的提取工艺稳定可行。

2.6 精密度试验 精密称取铁皮石斛粗粉约 0.3 g，按 2.5 项下方法制备供试品溶液，精密量取供试品溶液 6 份，每份 3 mL，按 2.4 项下方法测定，计算 A 的 RSD 0.75%，表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一铁皮石斛药材粗粉 6 份，每份约 0.3 g，按 2.5 项下方法制备供试品溶液，按 2.4 项下方法测定，计算 A 的 RSD 1.13%。

2.8 稳定性试验 精密量取同一供试品溶液 3 mL，分别于 0, 1, 2, 3, 4, 5 h 按 2.4 项下方法测定 A，计算 RSD 1.43%，表明供试品溶液显色后在 5 h 内基本稳定。

2.9 加样回收率试验 分别取铁皮石斛粗粉 6 份，

每份约 0.15 g，精密称定，每份精密加入阿魏酸对照品 792 μg ，按 2.5 项下方法制备供试品溶液，提取液定容至 50 mL，精密量取 3 mL，按 2.4 项下方法测定总酚含量，计算回收率，结果见表 4。

表 4 铁皮石斛总酚含量测定的加样回收率试验

称样量 /g	样品中 含量/ μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.150 6	825.3	1 551.0	95.9	97.9	1.53
0.150 1	822.5	1 570.9	97.3		
0.149 8	820.9	1 561.3	96.8		
0.149 5	819.3	1 587.1	98.5		
0.151 2	828.6	1 617.4	99.8		
0.149 3	818.2	1 597.3	99.2		

3 讨论

采用福林酚比色法测定铁皮石斛中总酚含量，反应原理为酚类化合物在碱性条件下可将钨钼酸还原，生成蓝色的化合物，颜色的深浅与酚含量呈正相关。阿魏酸为铁皮石斛药材中主要酚类成分之一，选取阿魏酸为对照品，采用福林酚比色法测定总酚含量，为有效控制铁皮石斛药材的质量提供较为简便的检测方法。

预试验分别选取甲醇、乙醇、丙酮和水为铁皮石斛总酚的提取溶媒，结果总酚得率顺序为乙醇 > 甲醇 > 丙酮 > 水，水提取率最低的主要原因可能是药材中含有大量多糖，遇水溶胀，影响酚类成分的提取；当选用体积分数 < 70% 的乙醇作为提取溶剂时，同样会发生多糖溶胀的情况，故最终选择体积分数 $\geq 70\%$ 的乙醇作为提取溶剂。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 265, 附录 54.
- [2] 鹿伟, 陈玉满, 徐彩菊, 等. 铁皮石斛抗疲劳作用研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(10): 2488.
- [3] 洪卫, 郭勇, 马胜林, 等. 毛兰素对胃癌细胞 SGC-7901 端粒酶活性的影响[J]. 浙江实用医学, 2009, 14(3): 181.
- [4] 吴昊妹, 徐建华, 陈立钻, 等. 铁皮石斛降血糖作用及其机制的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(2): 160.
- [5] 李娟, 李顺祥, 黄丹, 等. 铁皮石斛资源、化学成分及药理作用研究进展[J]. 科技导报, 2011, 29(18): 74.
- [6] 王博, 蔡光华, 杨梅, 等. 香柏总酚酸的含量测定[J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2010, 36(4): 600.
- [7] 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.

[责任编辑 全燕]