

柿叶多酚测定条件及其抗氧化活性的研究

赵丰丽*, 张云鸽, 庞冠兰

(广西师范大学生命科学学院, 珍稀濒危动植物生态与环境保护省部共建教育部重点实验室,
广西环境工程与保护评价重点实验室, 广西 桂林 541004)

[摘要] **目的:**研究柿叶多酚测定条件及其抗氧化活性。**方法:**采用 Folin-Ciocalteu (简称 FC) 比色法研究多酚测定的显色条件,并测定柿叶多酚和阳性对照维生素 C(VC)的抗氧化活性。**结果:**FC 法显色的最佳条件为:FC 试剂 1.5 mL,碳酸钠溶液($75\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)6 mL,温度 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,反应 60 min。其精密度试验的标准偏差为 0.51%,重复性偏差值 1.02%,回收率 96.7%~100.4%;柿叶多酚体外清除自由基的能力为:清除羟自由基($\text{HO}\cdot$)>清除超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)>清除 1,1-二苯基-2-苦肟基自由基(DPPH \cdot)。对 $\text{HO}\cdot$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、DPPH \cdot 的半数清除浓度(IC_{50})分别为 $39.33\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、0.53、 $0.85\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。其中清除 $\text{HO}\cdot$ 和 DPPH \cdot 的能力超过 VC,清除 $\text{HO}\cdot$ 的 IC_{50} 仅为 VC 的 1/6,清除 DPPH \cdot 的 IC_{50} 约为 VC 的 1/3。**结论:**采用 FC 法显色的最佳条件测定多酚,结果重复性、准确度良好;柿叶多酚具有较强的抗氧化作用。

[关键词] 柿叶;多酚;测定条件;抗氧化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0173-04

Determination Conditions and Antioxidant Activity of Polyphenol from *Diospyros kaki* Leaf

ZHAO Feng-li*, ZHANG Yun-ge, PANG Guan-lan

(College of Life Science, Guangxi Normal University, Key Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection, Ministry of Education, The Guangxi Key Laboratory of Environmental Engineering, Protection and Assessment, Guilin 541004, China)

[Abstract] **Objective:** The determination conditions and antioxidant activity of polyphenol from *Diospyros kaki* leaf was studied. **Method:** Color conditions of polyphenol determination by using Folin-Ciocalteu (FC) colorimetric method were obtained, and anti-oxidation activity of polyphenol from *D. kaki* leaf and a positive control Vitamin C (VC) were determined. **Result:** The best color reaction conditions of FC colorimetric method were as follows: Folin-Ciocalteu was 1.5 mL, $75\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, Na_2CO_3 was 6 mL, temperature was $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, reaction time was 60 min, the standard deviation of its accuracy test was 0.51%, the deviation of reproducibility was 1.02%, and the recovery was 96.7%-100.4%. Free radical scavenging ability *in vitro* was that: $\text{HO}\cdot > \text{O}_2^{\cdot-} > \text{DPPH}\cdot$. Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of polyphenol on $\text{HO}\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, DPPH \cdot were $39.33\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 0.53, $0.85\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. And eliminated capacity on $\text{HO}\cdot$ and DPPH \cdot went beyond VC, $\text{HO}\cdot$ was eliminated by IC_{50} was only 1/6 of the VC, DPPH \cdot was eliminated by IC_{50} was 1/3 of the VC. **Conclusion:** The optimum conditions of determinate polyphenol by using Folin-Ciocalteu method have a well accuracy and repeatability. Polyphenol from *D. kaki* leaf have strong antioxidation.

[Key words] *Diospyros kaki* leaf; polyphenol; determination conditions; antioxidation

[收稿日期] 20110926(013)

[基金项目] 广西桂林市科学研究与技术开发计划项目(20070304-1)

[通讯作者] * 赵丰丽, 硕士, 教授, 从事生物活性物质开发利用与发酵工程研究, Tel: 0773-5845952, E-mail: zhaof4731@163.com

柿树 (*Diospyros kaki*) 为柿树科柿树属植物,在我国有着广泛的分布。柿叶中含有丰富的抗坏血酸 (VC)、黄酮苷、酚类、糖类、有机酸等化学成分并具有广泛的药理作用,具有抗菌消炎、清热解毒、润肺强心、抗癌防癌等多种功能^[1]。其入药始见于明《滇南本草》记载“经霜叶敷臃疮”。《本草再新》记载用于“治咳嗽吐血,止渴生津”,主要用于止血、降压、治疗冠心病、心绞痛及胃溃疡出血、肺结核出血、功能性子宫出血等内脏出血病症^[2]。多酚类物质具有抗氧化、抗辐射、清除自由基、抗病毒等作用^[3],是目前天然产物中研究较多的一个化学成分,柿叶中含有较多的酚类物质。因此,本研究在对柿叶多酚超声波提取以及纯化的基础上,研究柿叶多酚的抗氧化活性,并与阳性对照维生素 C (VC) 对比。由于生物体内常见的自由基有超氧自由基阴离子 (O_2^-)、羟自由基 ($HO\cdot$)、烷氧自由基 ($RO\cdot$) 等。其中 O_2^- 形成最早, $HO\cdot$ 的作用最强,一旦清除了 O_2^- , $HO\cdot$ 的形成便中断,则可以从根本上预防体内过多的 $HO\cdot$ 和其他活性氧自由基,达到防癌、抗癌、抗心血管病的目的^[4]。体外抗氧化的评价方法有许多种,本课题将利用体外研究的方法,研究柿叶多酚用于阻断形成最早的自由基和作用最强的自由基的研究。但它们多数是针对某一种自由基的,不能反映总的抗氧化能力。因此,本课题同时采用另一种反映总抗氧化能力的测定方法 DDPH· 法来检测柿叶多酚总的抗氧化能力,以期对柿叶的开发利用打下基础。

目前多酚含量的测定方法有纸层析、薄层层析、高效液相色谱、原子吸收法、Folin-Ciocalteu (简称 FC 法) 比色法等^[5]。其中纸层析、薄层层析在分离效果、准确定量方面存在缺陷;高效液相色谱法和原子吸收法比较昂贵。而 FC 比色法由于具有价格低、操作方便等特点,被普遍采用,但不同报道中 FC 法不尽相同,尤其是显色条件。因此,本研究对 FC 法显色的主要影响因素进行了探索,以期对多酚类物质的测定提供一个较为准确、稳定、快速的测定方法。

1 材料

1.1 柿叶 采摘于广西桂林市郊毛村,经广西师范大学生命科学学院谢强副教授鉴定为柿树科 *Diospyros kaki* L. f. 柿树的叶子。

1.2 试剂 无水乙醇、甲醇、丙酮、无水碳酸钠、没食子酸、钨酸钠、钼酸钠、硫酸锂等均为分析纯试剂。

1.3 仪器 KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山

市超声仪器有限公司), UV-1201 紫外-可见分光光度计 (北京瑞利分析仪器公司), RE-52A 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂), HWS26 型电热恒温水浴锅 (上海一恒科技有限公司), BS224S 型电子天平 (北京赛多斯仪器有限公司) 等。

2 方法与结果

2.1 柿叶多酚测定方法的研究

采用 FC 法测定柿叶多酚含量,选择影响测定比色的主要因素:显色剂的比例、最佳浓度、反应时间和反应温度等进行试验,以得到稳定的比色条件。每个试验均重复 3 次,数据处理采用 Q 检验法^[6]。

2.1.1 FC 试剂和标准品溶液的配制 FC 试剂配制:在 1 000 mL 的磨口回流装置内加入 50 g 钨酸钠, 12.5 g 钼酸钠, 350 mL 蒸馏水, 25 mL 浓磷酸及 50 mL 浓盐酸,充分混匀,以小火回流 10 h,再加入 75 g 硫酸锂, 25 mL 蒸馏水,数滴溴水,然后开口继续沸腾 15 min 使溴完全挥发,冷却后定容至 500 mL,过滤,滤液呈绿色,置于棕色试剂瓶中保存。

没食子酸对照品溶液的配制:准确称取没食子酸对照品 0.1000 g,用蒸馏水溶解定容到 100 mL 的量瓶中,配制成 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的没食子酸对照品溶液。

2.1.2 FC 法的基本显色条件 取稀释 100 倍的没食子酸对照品溶液 1 mL 于 10 mL 的量瓶中,加入 1 mL 的 FC 试剂,约 7 ~ 8 min 后,再加入一定 (或适量) 体积的碳酸钠溶液 ($75\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),室温反应 1 h,定容至刻度,以蒸馏水代替没食子酸加入同样的试剂作参比溶液,于 765 nm 处测吸光度 (A)^[7]。

2.1.3 FC 法显色条件的研究 按照 2.1.2 的基本显色条件,选择影响显色反应的 FC 试剂与碳酸钠溶液 ($75\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的比例、FC 试剂用量、反应温度和时间等几个主要因素,研究它们对显色反应的影响。

2.1.3.1 FC 试剂与碳酸钠溶液比例的确定 按照 2.1.2 对显色剂的比例进行研究,当比例为 1:4 时,吸光度达到最大值。因此,显色时选择 FC 试剂: Na_2CO_3 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 为 1:4。

2.1.3.2 FC 试剂用量对吸光度的影响 当 FC 试剂用量为 1.5 mL 时,吸光度最大。因此,显色时宜选择 1.5 mL。见图 1。

2.1.3.3 反应温度对吸光度的影响 显色的最佳反应温度为 25 °C,见图 2。

2.1.3.4 反应时间对吸光度的影响 显色反应的最佳时间为 60 min。见图 3

显色试验结果表明,FC 法显色的较佳条件为:FC 试剂与 $75\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸钠溶液的比例为 1:4,FC 试

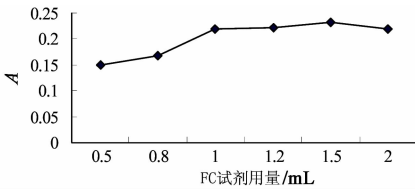


图1 FC试剂用量对吸光度的影响

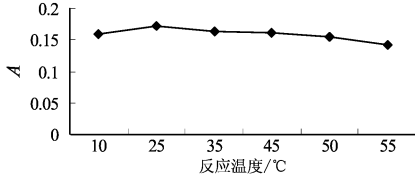


图2 反应温度对吸光度的影响

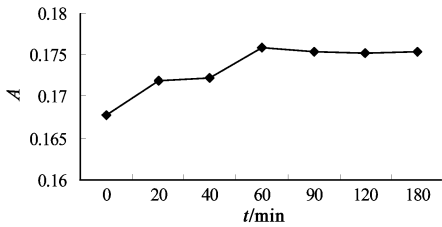


图3 反应时间对吸光度的影响

剂用量为 1.5 mL, 75 g·L⁻¹ 碳酸钠溶液 6 mL, 反应温度 25 °C, 时间 60 min。

2.1.4 FC法显色条件的评价

2.1.4.1 精密度 按 2.1.3 获得的显色条件, 对同一份样品测定 5 次多酚的含量, 评价该方法的精密度。对同一样品 5 次测定多酚的结果分别为: 3.89, 3.91, 3.94, 3.93, 3.93 g·L⁻¹, RSD 0.51%。RSD < 1.5% 的要求, 说明该方法精密度良好。

2.1.4.2 重复性 按 2.1.3 获得的显色条件, 对 5 份样品测定多酚的含量。对 5 份样品多酚的测定结果分别为: 3.97, 3.95, 3.94, 3.92, 3.88 g·L⁻¹, 其 RSD 为 1.02%, 说明该方法重复性比较好。

2.1.4.3 准确度 采用加样回收率评价: 按 2.1.3 获得的显色条件, 在含量相同的样品中加入不同量的没食子酸对照品溶液, 测定多酚的含量, 以评价该方法的准确性。均采用 2.1.5 方法测定多酚的含量。见表 1。

回收率的可置信度为 95% ~ 105%, 由表 1 可知回收率为 96.7% ~ 100.4%, 在置信区间内。其 RSD 为 1.64%, 表明该方法具有较高的准确性和可靠性。由 FC 法显色条件的评价结果可知, 本研究所得的 FC 比色法显色条件适合多酚含量的检测。

2.1.5 柿叶多酚含量的测定

2.1.5.1 没食子酸标准曲线的制作 按 2.1.3 研究的最佳显色条件制作没食子酸标准曲线^[7], 其回

表1 加样回收试验

样品	加样的量 /mg	测定值 /mg	回收率 /%	RSD /%
1	0.00	0.071	100.0	
2	0.05	0.123	100.4	
3	0.07	0.139	97.1	
4	0.09	0.159	98.6	1.64
5	0.10	0.172	100.1	
6	0.15	0.216	96.7	

归方程为: $Y = 0.1453X + 0.0317 (R^2 = 0.9993)$, 表明没食子酸在 1 ~ 7 g·L⁻¹ 有良好的线性关系。

2.1.5.2 柿叶多酚含量的测定 按 2.1.3 研究的最佳显色条件显色, 测定吸光度, 根据没食子酸标准曲线求出柿叶多酚的含量。

2.2 柿叶多酚抗氧化活性的研究 柿叶多酚抗氧化活性测定中每个试验均重复 3 次, 用 Q 检验法^[6] 确定测定结果。

2.2.1 柿叶多酚的制备 采用超声波提取法在单因素试验的基础上进行正交试验获得柿叶多酚的最佳提取工艺, 按照该工艺提取柿叶多酚(得粗提物), 采用大孔树脂对多酚进行纯化, 采用 TLC 和 HPLC 鉴定(结果显示提取液中主要成分为儿茶素、没食子酸), 获得柿叶纯多酚, 按 2.1.5 测定柿叶多酚的含量, 备用(方法略)。

2.2.2 柿叶多酚清除羟自由基(HO·)能力的测定(邻二氮菲-Fe²⁺氧化法) 将柿叶粗多酚与纯多酚用蒸馏水分别稀释到多酚质量浓度为 16, 24, 33, 40, 48 mg·L⁻¹, 并以相同浓度的维生素 C(VC) 为阳性对照, 参考文献[8]进行清除 HO· 能力的测定, 并计算 HO· 清除率。见表 2。

$$\text{HO}\cdot\text{清除率} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{损伤}}) / (A_{\text{未损伤}} - A_{\text{损伤}}) \times 100\%$$

表2 柿叶多酚对HO·的清除

样品质量浓度 /mg·L ⁻¹	清除率/%		
	粗多酚	纯多酚	VC
16	8.63	11.00	4.08
24	12.94	22.49	7.57
32	23.69	30.98	9.84
40	37.34	50.85	12.11
48	46.96	61.67	15.89

表 2 显示, 随样品浓度的增加, 其清除 HO· 的能力逐渐增加。在相同浓度下, 总的清除趋势是: 纯多酚 > 粗多酚 > VC。其中纯多酚清除 HO· 的半数清除浓度(IC₅₀) 为 39.33 mg·L⁻¹ 时, 粗多酚的为 51.11 mg·L⁻¹, VC 的为 241.21 mg·L⁻¹。经计算可

知纯多酚清除 HO· 的 IC₅₀ 是 VC 的 1/6, 粗多酚的约为 VC 的 1/5。表明柿叶多酚具有较强的清除氧化作用最强的 HO· 的能力。

2.2.3 清除超氧阴离子(O₂⁻)能力的测定(邻苯三酚自氧化法) 将粗多酚与纯多酚用蒸馏水分别稀释到多酚质量浓度为 0.18, 0.28, 0.38, 0.48, 0.58 g·L⁻¹, 并以相同浓度的 VC 为阳性对照, 参考文献 [9] 进行清除 O₂⁻ 能力的测定, 计算 O₂⁻ 清除率。见表 3。

$$O_2^- \text{清除率} = (A_{原} - A_{样品}) / (A_{原} - A_{空白}) \times 100\%$$

表 3 柿叶中多酚样品对 O₂⁻ 的清除

样品质量浓度 /g·L ⁻¹	清除率/%		
	粗多酚	纯多酚	VC
0.18	3.12	5.16	44.52
0.28	7.75	14.27	57.69
0.38	18.33	23.26	66.32
0.48	34.98	39.72	76.32
0.58	44.18	54.35	84.32

表 3 显示, 随样品浓度的增加其清除 O₂⁻ 的能力增加, 在相同浓度下, 总的清除趋势是: VC > 纯多酚 > 粗多酚。其中 VC 清除 O₂⁻ 的 IC₅₀ 为 0.23 g·L⁻¹, 纯多酚的为 0.53 g·L⁻¹, 粗多酚的为 0.66 g·L⁻¹。表明柿叶多酚有一定的清除最早形成的 O₂⁻ 的能力。

2.2.4 清除 DPPH·能力的测定 将粗多酚与纯多酚用蒸馏水分别稀释到多酚质量浓度为 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 g·L⁻¹, 并以相同浓度的 VC 为阳性对照, 参考文献 [10] 进行清除 DPPH· 能力的测定, 并计算 DPPH· 清除率。结果见表 4。

$$DPPH \cdot \text{清除率} = [1 - (A_{样品} - A_{空白}) / A_{原}] \times 100\%$$

表 4 柿叶多酚样品对 DPPH· 的清除

样品质量浓度 /g·L ⁻¹	清除率/%		
	粗多酚	纯多酚	VC
0.1	5.88	8.97	4.15
0.3	12.97	15.78	9.13
0.5	15.92	20.56	12.61
0.7	31.69	36.57	16.99
0.9	45.44	53.08	21.98

表 4 结果显示, 随样品浓度的增加其清除 DPPH· 的能力逐渐增加, 在相同浓度下, 总的清除趋势是纯多酚 > 粗多酚 > VC。其中纯多酚清除 DPPH· 的 IC₅₀ 为 0.85 g·L⁻¹, 粗多酚的为 0.99 g·L⁻¹, VC

的为 2.13 g·L⁻¹。经计算可知纯多酚清除 DPPH· 的 IC₅₀ 约为 VC 的 1/3, 粗多酚的约为 VC 的 1/2。可见柿叶多酚具有较强的总的抗氧化效果。

3 讨论

本研究确定了柿叶多酚 FC 法测定显色的最佳条件: FC 试剂 1.5 mL、碳酸钠溶液 (75 g·L⁻¹) 6 mL, 25 °C, 60 min, 多酚测定结果的重复性、准确度良好, 可为多酚的测定提供一个简单、准确可靠的测定方法。

柿叶多酚抗氧化测定结果显示, 与阳性对照 VC 相比清除氧化作用最强的 HO· 和清除显示总氧化性的 DPPH· 的能力比 VC 强, 其中纯多酚清除 HO· 的 IC₅₀ 仅为 VC 的 1/6, 清除 DPPH· 的 IC₅₀ 约为 VC 的 1/3, 而清除 O₂⁻ 的能力比 VC 稍差, 总体表明柿叶多酚具有较强的抗氧化能力, 而自古我国就有利用柿叶的历史。因此, 有望将其开发为天然抗氧化的保健品。

[参考文献]

[1] 林娇芬, 林河通, 谢联辉, 等. 柿叶的化学成分、药理作用、临床应用及开发利用[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(7): 90.

[2] 陈光, 贾澎云, 徐绥绪, 等. 柿叶化学成分的研究[J]. 中草药, 2005, 36(1): 26.

[3] 刘运荣, 胡建华. 植物多酚的研究进展[J]. 武汉工业学院学报, 2005, 24(4): 63.

[4] 朴香兰. 常见天然抗氧化物质研究[M]. 北京: 中央民族大学出版社, 2008: 1.

[5] 徐宝才, 肖刚, 丁霄霖. 苦荞中酚酸和原花色素的分析测定[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(12): 32.

[6] 南京大学(无机及分析化学实验)编写组. 无机及分析化学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001: 35.

[7] 刘硕谦, 刘仲华, 黄建安. 紫外分光光度法检测水皂角总多酚的含量[J]. 食品工业科技, 2003(6): 75.

[8] 刘存芳. 秦巴山区 5 种花挥发性物质抗氧化和抗菌活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 103.

[9] 王晓春, 龙苏, 徐克前, 等. 车前草水煎液对氧自由基清除作用的研究[J]. 实用预防医学, 2002, 9(2): 139.

[10] 周向军, 高义霞, 袁毅君, 等. 乌龙茶茶褐素提取工艺的优化及抗氧化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 36.

[责任编辑 聂淑琴]