

白及须根和块茎总酚含量的测定

周云凯, 李伟平, 田莎莎, 马丹丹, 蒋福升, 丁志山*
(浙江中医药大学, 杭州 310053)

[摘要] 目的:测定白及块茎和须根中总酚的含量。方法:以没食子酸为对照品,采用 folin-酚比色法测定白及块茎和须根中的总酚含量。采用 TLC 对白及须根和块茎进行定性比较。结果:采用 folin-酚比色法测定白及中总酚含量,准确度好,精密度高。没食子酸对照品在 5~25 μg 的范围内线性良好,标准曲线方程为 $Y = 0.0332X + 0.0001$ 。白及须根中的总酚含量为 0.895%,块茎中的总酚含量为 0.394%。TLC 结果表明,白及须根的斑点比块茎多。结论:白及须根中总酚含量高于块茎。

[关键词] 白及;总酚;须根;块茎;薄层色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0161-04

Determination of Total Polyphenol Content in Different Parts of Rhizoma Bletillae Striatae

ZHOU Yun-kai, LI Wei-ping, TIAN Sha-sha, MA Dan-dan, JIANG Fu-sheng, DING Zhi-shan*
(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the total polyphenol content in the fibrous roots and tubers of Rhizoma Bletillae Striatae. **Method:** The content of total polyphenol in the fibrous roots and tubers of Rhizoma Bletillae Striatae was detected by folin colorimetry method using gallic acid as index, then using TLC method to qualitative compare fibrous roots with tubers of Rhizoma Bletillae Striatae. **Result:** There was a good linearity in the range of 5-25 μg for the gallic acid, the standard curve equation was $Y = 0.0332X + 0.0001$. The total polyphenol content in the fibrous roots was 0.895% while tubers was 0.394%. **Conclusion:** the total Polyphenol

[收稿日期] 20110906(001)

[基金项目] 浙江省公益性技术应用研究计划项目(2011C22047);江山市面上科技计划项目(2010B16);浙江省大学生科技创新活动计划项目(2010R410058)

[第一作者] 周云凯,硕士研究生,从事中西医结合基础研究,E-mail:571248lucky@163.com

[通讯作者] *丁志山,教授,博士生导师,E-mail:zjtcmdzs@163.com

系^[5]。但是不同单糖与硫酸-苯酚试剂显色后的最大吸收波长有一定差异,其标准曲线的斜率也不尽相同,如使用某一种单糖做标准曲线,则会造成较大误差。对于杂多糖,单纯以某一单糖作标准曲线来计算多糖含量与真实含量存在较大误差。采用测定换算因子的校正方法,可有效消除单纯以某一种单糖作标准曲线引起的误差。该方法简便快速,测得值更接近真实值。

大蒜多糖提取物中总多糖含量测定结果的准确性,对开发和利用大蒜多糖提取物有现实意义。本文采用方法操作简便、显色稳定、重复性好、灵敏度高,可作为大蒜多糖提取物的含量测定方法。

[参考文献]

- [1] 蔡飞,吴金良,陈金和.对病毒性心肌炎小鼠心肌酶的影响[J].咸宁学院学报,2003,17(1):1.
- [2] 郑颖,王辉,郭国庆.抗氧化活性及其对 PC12 细胞增殖的影响[J].暨南大学学报:医学版,2008,29(4):110.
- [3] 冯颖,王晶晶,孟宪军,等.无梗五加果粗多糖提取精制工艺研究[J].食品研究与开发,2006,27(8):42.
- [4] 刘昌盛,黄凤洪,夏伏建.茶皂素脱色工艺研究[J].粮食与油脂,2004(12):26.
- [5] 张惟杰.复合多糖生化研究技术[M].上海:上海科学技术出版社,1987:6.

[责任编辑 蔡仲德]

content in the fibrous roots of *Rhizoma Bletillae Striatae* is higher than tuber.

[Key words] *Rhizoma Bletillae Striatae*; total Polyphenol; fibrous roots; tubers; TLC

白及为兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reihb. f. 的干燥块茎, 具有收敛止血、消肿生肌等功效, 用于治疗咯血、吐血、外伤出血、疮疡肿毒、皮肤皲裂等症^[1]。研究表明, 白及中含有联苄类 (bibenzyls)、多糖、菲类 (phenanthrenes) 及其衍生物等化学成分, 如丁香树脂酚、 β -谷甾醇、没食子酸等^[2]。酚类物质具有抗氧化、清除自由基、延缓衰老、预防心血管疾病和癌症等多种生物活性^[3-5]。杨毅等^[6]就从白及块茎中分别得到 4 种多酚类物质。虽然白及中含有大量的多酚类物质, 但目前对白及多酚类物质缺乏系统的研究, 尤其是目前尚未有白及须根中总酚方面研究的报道。白及中含有丰富的多酚类物质, 如能进行合理的利用, 开发新的植物多酚资源, 应用于化妆品、食品、医药等领域, 则对我国白及资源的综合利用、白及产后深加工技术的开发有积极意义。本文采用 folin-酚比色法对白及块茎及须根中的总酚含量进行了测定。

1 材料

无水乙醇 (AR, 杭州长征化学试剂有限公司, 批号 20101201), 甲醇 (AR, 天津市永大化学试剂有限公司, 批号 20110316), 磷酸 (AR, 浙江新安化工集团股份有限公司, 批号 20010923), 无水碳酸钠 (AR, 天津市永大化学试剂有限公司, 批号 201003249), 30% 过氧化氢 (AR, 国药集团化学试剂有限公司, 批号 20090924), 硅胶 GF₂₅₄ 板 (青岛海洋化工厂分厂, 批号 20100808)。

白及采自浙江省衢州市江山白及 GAP 基地, 二年生。

Folin-酚试剂的配制: 准确称取 20 g 钨酸钠和 5 g 钼酸钠于圆底烧瓶中, 用 140 mL 蒸馏水溶解, 加入 85% 的磷酸溶液 10 mL 和 20 mL 浓盐酸, 文火回流 10 h, 然后依次加入 3 g 硫酸锂及 15 mL 双氧水, 加热沸腾 15 min 至亮黄色, 不得带微蓝和绿色。冷却, 移入 250 mL 量瓶中, 定容, 贮于棕色瓶中, 4 °C 冰箱保存备用。

DK-S24 型电热恒温水浴锅 (上海森信实验仪器有限公司), LDZ5-2 型低速自动平衡离心机 (北京医用离心机厂), AR2130 型电子精密天平 (Ohaus Corp. Pine Brook, NJ, USA), D180C 型自动双重纯水蒸馏器 (上海申胜生物技术有限公司), S54 型紫外-

可见分光光度计 (上海棱光技术有限公司), ZF-40 型紫外-可见检测仪 (上海顾村光学仪器厂), UV8500 型紫外分光光度计 (上海天美光学仪器有限公司), R-201 型旋转式蒸发器 (上海申顺生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备 分别取白及块茎及须根, 烘干, 碾碎后取 1 g, 精密称定, 加入 50 mL 95% 乙醇回流提取 1.5 h, 过滤, 取续滤液, 4 °C 冰箱保存备用。

2.2 对照品溶液的制备 取没食子酸 10 mg, 精密称定, 加无水乙醇定容至 10 mL, 得 1.0 g·L⁻¹ 的没食子酸对照品溶液, 4 °C 冰箱保存备用。用时用无水乙醇稀释 10 倍, 然后取 1 mL 用蒸馏水稀释 8 倍。

2.3 测定波长的选择 分别取 0.1 mL 的供试品溶液及 0.4 mL 对照品溶液, 加入 1 mL 的 folin-酚试剂, 黑暗条件下放置 10 min, 然后加入 2 mL 的 1 mol·L⁻¹ 的 Na₂CO₃, 加水至 5 mL, 50 °C 水浴 10 min, 同时取 0.1 mL 95% 乙醇, 加入 1 mL 的 folin-酚试剂, 黑暗条件下放置 10 min, 然后加入 2 mL 的 1 mol·L⁻¹ 的 Na₂CO₃, 加水至 5 mL, 50 °C 水浴 10 min 为空白, 紫外全波长扫描。以 770 nm 为测定波长。

2.4 最佳显色条件的选择 Folin 试剂的量、Na₂CO₃ 的量以及水浴加热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 0.4 mL 的对照品溶液, 按表 1 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 ₂ CO ₃ /mL	C 时间 /min
1	0.5	0.5	5
2	1	1	10
3	2	2	15

2.5 标准曲线的制备 分别取没食子酸对照溶液 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2 mL, 按照最佳显色条件进行显色, 770 nm 处测定吸光度。以没食子酸的量为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。结果发现, 没食子酸在 5 ~ 25 μg 线性良好, 标准曲线方程为 $Y = 0.0332X + 0.0001$ ($R^2 =$

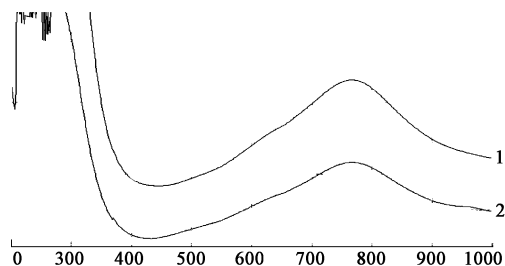
0.997 6)。

2.6 样品中总酚含量的测定及方法学考察 取供试品溶液 0.1 mL,按照最佳显色条件进行显色,770 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,并对测定方法的准确度、精密性及稳定性进行考察。

2.7 白及块茎和须根 TLC 定性比较 参照《中国药典》2010 年版中白及 TLC 展开供试品溶液的制备方法,按如下操作制备供试品溶液,分别取白及块茎及须根各 1 g,精密称定,加入 50 mL 95% 的乙醇回流提取,过滤,取乙醇液蒸干,加入 5 mL 的蒸馏水溶解,加 10 mL 的乙酸乙酯萃取,蒸干乙酸乙酯,用 1 mL 的乙酸乙酯溶解后,在硅胶 GF₂₅₄ 板上各点样 10 μL。展开剂为石油醚-乙酸乙酯-甲醇-氨水(1:0.5:0.1:0.05)。展开后分别在 365 nm 紫外灯下观察,然后用硫酸乙醇显色。

3 实验结果

3.1 测定波长选择结果 实验结果表明,样品在 770 nm 有最大吸收峰,对照品在 772 nm 有最大吸收峰(结果见图 1),两者相差仅 2 nm,结合 Folin-酚比色法的原理:在碱溶液中酚类化合物可以将钨酸钠还原生成蓝色化合物,该化合物在 770 nm 附近有最大吸收峰。故本实验选择 770 nm 为测定波长。



1. 没食子酸对照品; 2. 白及块茎

图 1 全波长扫描结果

3.2 最佳显色条件的选择 对 folin 试剂的用量,水浴反应时间以及 Na₂CO₃ 加入的量进行考察。根据所测定的吸光度,计算最佳显色条件,结果见表 2。从表 2 中的结果可以看出,最佳的显色条件是 B₃C₂A₂,即加入 2 mL 的 Na₂CO₃, 1 mL 的 Folin 试剂,水浴反应时间为 10 min。影响试验结果最优的因素是 Na₂CO₃ 的量,其次是水浴的时间,再次是 Folin 试剂的量。

3.3 方法学考察结果

3.3.1 精密度考察 取已配置好的供试品溶液 0.1 mL 及对照品溶液 1.2 mL,按照上述最佳的显色条件显色后,在 770 nm 处测定吸光度,连续测定 6

表 2 显色条件考察结果

No.	A	B	C	平均吸光度
1	1	1	1	0.360 3
2	1	2	2	0.719 3
3	1	3	3	0.615 0
4	2	1	2	0.387 7
5	2	2	3	0.593 7
6	2	3	1	0.845 3
7	3	1	3	0.281 3
8	3	2	1	0.459 0
9	3	3	2	0.826 3
<i>I = I_j/3</i>	0.564 9	0.343 1	0.554 9	
<i>II = II_j/3</i>	0.608 9	0.590 7	0.644 4	
<i>III = III_j/3</i>	0.522 2	0.762 2	0.496 7	
<i>R</i>	0.042 7	0.4191	0.089 6	

次,结果 RSD 须根 0.19%,块茎为 0.15%,没食子酸为 0.106%。该结果表明供试品溶液和对照品溶液精密度较好。

3.3.2 稳定性考察 取已配置好的供试品溶液 0.1 mL 及对照品溶液 1.2 mL,按照上述最佳的显色条件显色后,在 0,60,90 min 分别在 770 nm 处测定吸光度值。结果 RSD 须根 2.33%,块茎 4.24%,没食子酸 1.42%。该结果表明供试品溶液和对照品溶液在 1.5 h 内较好。

3.3.3 准确度考察 以白及块茎为材料,制备供试品溶液,在供试品溶液中加入适量的对照品溶液,用 folin-酚试剂显色后,测定吸光度,计算加样回收率。结果发现平均回收率为 101.61%,RSD 2.09% ($n = 6$),见表 3。结果表明本实验采用的测定方法准确度符合要求,可以用来准确测定白及中总酚的含量。

表 3 白及中总酚加样回收率

No.	已知 样品量 /μg	加入 样品量 /μg	实测值 /μg	回收率/ %	平均 回收率	RSD
1	5.01	3.01	8.17	105.15		
2	5.01	3.01	7.99	98.97		
3	5.01	3.01	8.05	101.06		
4	5.01	3.76	8.93	104.34		
5	5.01	3.76	8.78	100.32	101.61	2.09
6	5.01	3.76	8.88	102.96		
7	5.01	4.51	9.50	99.46		
8	5.01	4.51	9.58	101.39		
9	5.01	4.51	9.56	100.92		

3.4 白及块茎和须根样品中总酚含量测定 白及须根中的总酚含量为 0.895% ($n = 3$, RSD 2.97%),

块茎中的总酚含量为 0.394% ($n=3$, RSD 1.66%)。表明白及须根中的总酚含量要高于块茎中的总酚含量。

3.5 白及须根和块茎 TLC 比较 对白及须根和块茎进行薄层展开,发现白及须根在紫外灯下比块茎多两个斑点,其中 $R_f = 0.75$ 处的斑点紫色, $R_f = 0.96$ 处的斑点有较强的荧光。用硫酸乙醇显色后,发现 $R_f = 0.75$ 处须根多出一个紫色的斑点。此外,白及须根在紫外灯下观察和硫酸乙醇显色后斑点的颜色明显比块茎深,这有可能是须根中成分的含量大于块茎导致的。比较白及块茎和须根的斑点,发现无论是紫外灯下观察,还是硫酸乙醇显色后,白及块茎所拥有的斑点,须根都有,这可以初步确定白及须根含有块茎中所含的成分,但这还需要进一步的研究。

4 讨论

白及的主要化学成分是联苄类(bibenzyls)、多糖、菲类(phenanthrenes)及其衍生物,此外,还含有少量挥发油,黏液质等^[7]。《中国药典》2010 年版一部对白及的质量控制仅有性状和薄层色谱鉴别,没有对白及中具有药理活性相关指标成分进行质量控制。目前国内外研究大多通过测定白及中多糖的含量来控制白及的质量^[8-9],有关白及药材中其他有关成分的含量测定较少报道,本文对白及中总酚的含量进行了测定,结果表明白及块茎中总酚含量为 0.394%,该测定方法准确,简便,可为作为白及药材质量评价的依据之一。酚类物质是植物中广泛存在的活性物质^[10],故通过测定白及中的总酚含量,可以为正确保护和开发白及药源,为白及药材生产和质量标准提供科学依据。

结果表明,白及须根中的总酚含量要远远高于块茎中的总酚含量。这与人参、西洋参等很多药用植物须根中的药效成分含量高于药用部位主根的现象比较相似^[11-12]。目前《中国药典》只收载白及块茎,其须根则弃之不用,为了更充分利用白及根系资源,本研究对白及块茎、须根中总酚含量进行了测定,为白及须根的合理利用提供理论依据。白及

须根中总酚的含量高于块茎,而且从 TLC 结果可以初步确定白及须根包含块茎所含的成分。可见,以总酚等物质为主要药效成分时,适当调整处方量,白及须根可以部分替代块茎使用,在白及资源供不应求的今天,对合理利用白及资源,具有现实意义。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010:95.
- [2] 韩广轩,王立新,王麦莉,等. 中药白及化学成分的研究[J]. 药学实践杂志,2001,19(6):360.
- [3] Romero I, Paez A, Ferruelo A, et al. Polyphenols in red wine inhibit the proliferation and induce apoptosis of NLCaP cells[J]. BJU Inter, 2002, 89(9): 950.
- [4] Stoclet J C, Chataigneau T, Ndiaye M, et al. Vascular protection by dietary Polyphenols [J]. Eur J Pharm, 2004, 500(1/3):299.
- [5] Hakimuddin F, Paliyath G, Meckling K. Selective cytotoxicity of a red wine flavonoid fraction against MCF-7 cells [J]. Breast Cancer Res Treatment, 2004, 85(1):65.
- [6] 杨毅,艾萍,杨丽萍,等. 白及薄层色谱条件的改进和主要色谱斑点化学成分的鉴定[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(9):23.
- [7] 任华忠,何毓敏,杨丽. 白及化学成分其药理活性研究进展[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(2):134.
- [8] 王爱民,王永林,郑林,等. 白及药材中多糖的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22):2963.
- [9] 王爱民,王永林,郑林,等. 白及药材中多糖的含量测定研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21):22.
- [10] 王燕,王儒彬,孙磊,等. 不同采摘期连翘叶中总黄酮、总酚酸含量与 DPPH 自由基清除能力的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16):109.
- [11] 刘春莹,宋建国,李鹏飞,等. 3 种人参中的皂苷的组成[J]. 大连工业大学学报, 2011, 30(2):79.
- [12] 乔卫,周晶,符敬伟. 西洋参须根及须根的总皂苷含量比较[J]. 天津化工, 2000, 12(4):83.

[责任编辑 蔡仲德]