

陈燕霞, 陈 康, 黎 珊, 等. 小驳骨中总黄酮、总酚酸含量测定及其抗氧化活性研究[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(4): 258–259.

小驳骨中总黄酮、总酚酸含量测定及其抗氧化活性研究

陈燕霞, 陈 康, 黎 珊, 张林杰

(广州中医药大学中药学院, 广东广州 510006)

摘要:采用紫外-可见分光光度法测定小驳骨不同提取溶剂、不同部位总黄酮和总酚酸含量及其抗氧化性。结果表明, 小驳骨茎总黄酮含量高于叶, 茎水提取液总黄酮含量最高, 为 4.26%; 小驳骨叶总酚酸含量高于茎, 叶醇提取液总酚酸含量最高, 为 11.90%; 在抗氧化性方面, 茎水提液 > 茎醇提液 > 叶水提液 > 叶醇提液; 小驳骨不同部位总黄酮、总有机酸含量、抗氧化性存在差异; 总黄酮含量和抗氧化性具有相关性, 表明抗氧化活性可能与黄酮类物质有关。

关键词:小驳骨; 总黄酮; 总酚酸; 抗氧化性

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0258-02

小驳骨(*Gendarussa vulgaris* Nees.) 别名驳骨丹、接骨草、四季花、小还魂、百节芒、小叶金不换、小接骨草、裹篱樵、长生木、细骨风等, 为双子叶植物爵床科小驳骨属植物小驳骨的干燥地上部分, 全年均可采收, 广泛分布于我国的广东、广西、海南等地。小驳骨性味辛、温, 归肝、肾经; 功能为祛瘀止痛, 续筋接骨; 主用于跌打损伤, 筋骨折折, 风湿骨痛, 血瘀经闭, 产后腹痛^[1]。民间常取小驳骨鲜品捣烂, 或用酒调后热敷患处。据报道, 小驳骨含有挥发油、无机元素、生物碱、黄酮苷、有机酸、糖类、氨基酸等^[2-4]; 卢胜明研究了小驳骨地上部分的 95% 乙醇提取物的化学成分, 从中分离并鉴定了 19 个化合物^[5]; 江秀娟等对小驳骨药材进行了性状鉴别、显微鉴别、薄层鉴别, 对水分、总灰分、水溶性浸出物含量等进行了测定^[6]。但目前关于小驳骨药材的研究较少。本研究测定了小驳骨中总黄酮、总酚酸含量, 并体外测定其抗氧化活性, 以期为制定小驳骨的质量标准及其全面开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

小驳骨饮片购于广东康美药业股份有限公司康美中药饮片厂, 经广州中医药大学炮制教研室陈康教授鉴定为爵床科小驳骨属植物小驳骨。

芸香苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100080-200707); 咖啡酸对照品(四川省维克奇生物科技有限公司, 批号: 110807); 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH, 梯希爱化成工业发展有限公司, 批号: D0909); 无水乙醇为分析纯; 水为蒸馏水。

主要仪器: 电子天平(上海精科天平有限公司, 型号为 MP200B)、8453E 紫外-可见分光光度计(美国 Agilent 科技公司)、超声波清洗器(东莞市科桥超声波设备有限公司, 型

号为 KQ-300)。

1.2 方法

1.2.1 样品溶液制备 (1) 醇提液: 分别称取小驳骨茎、叶粉末样品约 2 g, 置于 100 mL 锥形瓶中, 加 60% 乙醇溶液 60 mL, 超声提取 40 min, 冷却后补足重量差异, 过滤即得。(2) 水提液: 分别称取小驳骨茎、叶粉末样品约 2 g, 置于 150 mL 圆底烧瓶中, 加 60 mL 蒸馏水, 回流提取 1 h, 冷却后补足重量差异, 过滤即得。

1.2.2 水分含量测定 按照《中国药典》(2010 年版) 相关要求测定小驳骨药材含水量。

1.2.3 总黄酮含量测定

1.2.3.1 芸香苷标准曲线绘制 采用 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 显色体系进行显色分析^[7]。称取干燥至恒重的芸香苷对照品 2.07 mg, 用乙醇溶解置于 10 mL 容量瓶, 定容, 即得芸香苷对照品溶液(0.207 mg/mL)。分别移取 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0 mL 芸香苷对照品溶液于 10 mL 容量瓶中, 加 5% NaNO_2 溶液 0.3 mL, 混匀, 放置 6 min; 加 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min; 加 1% NaOH 溶液 4 mL, 用乙醇定容至刻度线, 摇匀, 放置 15 min。以相应试剂为空白, 在 510 nm 波长处测定吸光度, 每个处理重复 3 次。以芸香苷对照品溶液浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.2.3.2 总黄酮含量测定 分别移取样品溶液 5 mL 于 10 mL 容量瓶中, 按上述 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 显色体系方法进行操作, 在 510 nm 波长处测定吸光度, 每个处理重复 3 次, 根据芸香苷标准曲线计算样品的总黄酮含量。

1.2.4 总酚酸含量测定

1.2.4.1 咖啡酸标准曲线绘制 采用铁氰化钾-三氯化铁显色体系进行显色分析^[8]。称取干燥至恒重的咖啡酸对照品 1.45 mg, 用乙醇溶解置于 10 mL 容量瓶, 定容, 即得咖啡酸对照品溶液(0.145 g/L)。分别移取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 于 25 mL 容量瓶中, 加乙醇至 5 mL, 加 0.3% 十二烷基硫酸钠 2 mL 及 0.6% 三氯化铁-0.9% 铁氰化钾混合溶液($V:V=1:1$) 1 mL, 混匀, 在暗处放置 5 min, 用 0.1 mol/L 盐酸溶液定容, 避光放置 20 min。以相应试剂为空白, 在 736 nm 波长处测定吸光度, 每个处理重复 3 次。以咖啡酸浓度为横坐标、吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。

收稿日期: 2013-10-14

作者简介: 陈燕霞(1988—), 女, 广东汕头人, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制现代化、中药饮片质量标准化。E-mail: 973414396@qq.com。

通信作者: 陈 康, 男, 广东阳江人, 教授, 研究方向为中药炮制现代化、中药饮片质量标准化及中药新药研究。E-mail: chen kang@zjucm.edu.cn。

1.2.4.2 总酚酸含量测定 移取样品溶液 0.2 mL 于 25 mL 容量瓶中,按上述铁氰化钾-三氯化铁显色体系方法进行操作,在 736 nm 波长处测定吸光度,每个处理重复 3 次,根据咖啡酸标准曲线计算样品总酚酸含量。

1.2.5 对 DPPH 清除活性的测定 参照文献中方法^[9-11]并作改进,测定样品对 DPPH 清除活性。称取 DPPH 对照品 8 mg,用无水乙醇定容至 100 mL 的容量瓶中,配制成浓度为 0.08 g/L 的 DPPH 溶液,避光保存,现用现配。分别吸取样品溶液 4 mL 至 25 mL 容量瓶中,定容,摇匀。取稀释后的样品溶液 3 mL,加入 2 mL DPPH 溶液,摇匀,室温、避光放置 30 min。以无水乙醇代替 DPPH 溶液为对照,以无水乙醇代替样品提取液作空白。在 521 nm 波长处测吸光度,每个处理重复 3 次,计算样品对 DPPH 自由基的清除率。

$$\text{DPPH 清除率} = \left(1 - \frac{(D_1 - D_2)}{D_0}\right) \times 100\%$$
式中: D_0 为 3 mL 无水乙醇 + 2 mL DPPH 溶液处理的吸光度; D_1 为 3 mL 样品溶液 + 2 mL DPPH 溶液处理的吸光度; D_2 为 3 mL 样品溶液 + 2 mL 无水乙醇处理的吸光度。

2 结果与分析

2.1 小驳骨药材水分含量

试验结果显示,小驳骨药材茎、叶的含水量均值分别为 11.39%、11.91% (表 1),均在《中国药典》(2010 年版)小驳骨水分规定范围内。

表 1 小驳骨药材不同部位含水量

部位	含水量 (%)			
	重复 1	重复 2	重复 3	均值
茎	11.34	11.49	11.33	11.39
叶	12.02	12.01	11.69	11.91

2.2 总黄酮和总酚酸含量的测定结果

芸香苷对照品溶液浓度为 0.020 7~0.082 8 mg/mL 时,其与吸光度呈良好线性关系,线性回归方程为: $y = 12.200 0x - 0.007 5 (r^2 = 0.999 7)$ 。咖啡酸对照品溶液浓度为 0.58~2.90 μg/mL 时,其与吸光度呈良好线性关系,线性回归方程为: $y = 383.620x + 0.034 5 (r^2 = 0.999 1)$ 。考察了该方法测定总黄酮、总酚酸含量的精密性、稳定性、重复性、加样回收率,其精密性、稳定性、重复性、加样回收率 RSD 均小于 5%。

由表 2 可以看出,小驳骨不同部位总黄酮及总酚酸含量存在差异。在总黄酮含量方面,小驳骨茎的含量明显高于叶;茎的水提液含量最高,为 4.26%;叶的醇提液含量最低,为 1.88%。在总酚酸含量方面,醇提液高于水提液,且叶的含量高于茎;叶的醇提液含量最高,为 11.90%;而茎的水提液含量最低,仅为 2.66%。总黄酮含量由高到低依次为茎水提液>茎醇提液>叶水提液>叶醇提液;总酚酸含量由高到低依次为叶醇提液>茎醇提液>叶水提液>茎水提液。

表 2 小驳骨不同部位总黄酮和总酚酸含量

部位	提取类别	总黄酮含量 (%)	总酚酸含量 (%)
茎	醇提液	3.14 ± 0.03	6.15 ± 0.14
叶	醇提液	1.88 ± 0.04	11.90 ± 0.20
茎	水提液	4.26 ± 0.03	2.66 ± 0.03
叶	水提液	2.23 ± 0.03	5.12 ± 0.12

2.3 对 DPPH 自由基的清除作用

试验表明,小驳骨茎醇提液、叶醇提液、茎水提液、叶水提液对 DPPH 自由基的清除率分别为 67.8%、51.5%、82.6%、60.3%。小驳骨各样品溶液对 DPPH 均有一定的清除能力,且对 DPPH 自由基的清除能力有差异。清除能力由强到弱分别为茎水提液>茎醇提液>叶水提液>叶醇提液,其中茎水提液清除能力最强,为 82.6%。

3 结论与讨论

由于合成抗氧化剂对人类健康的潜在危害,近年来从天然植物中寻找天然抗氧化剂引起了人们极大的兴趣。以往的研究表明,传统中药材具有很强的抗氧化活性,并且目前已知的抗氧化物质多为黄酮类和酚酸类成分。因此本研究采用了经典的显色体系 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 和铁氰化钾-三氯化铁,检测了小驳骨药材中不同提取溶剂、不同部位的总黄酮、总酚酸含量。其中茎水提液总黄酮含量最高,为 4.26%,叶醇提液总酚酸含量最高,为 11.90%。

DPPH 法是常用的检测化合物清除自由基活性的方法。本研究显示,小驳骨各样品溶液对 DPPH 均有一定的清除能力,且对 DPPH 自由基的清除能力有差异。不同样品中总黄酮含量高低与不同样品对 DPPH 清除率强弱的规律是一致的,可以推测小驳骨中总黄酮在清除 DPPH 自由基中发挥主要的作用,这也与以往研究结果^[12]一致。此外,小驳骨是疗效确切、显著的民间常用药,同时被作为绿篱广泛种植,药材来源丰富。为了提高小驳骨的综合利用度,还应对小驳骨的抗氧化活性部位进行活性成分筛选,为今后开发利用奠定基础。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社, 2010:44.

[2] 陈青,苏玲,朱华,等. 驳骨丹的生药学研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(4):896-898.

[3] 苏玲,蔡毅,朱华,等. 小驳骨挥发油化学成分 GC-MS 分析[J]. 广西中医学院学报,2009,12(2):56-58.

[4] 刘文桢,黄爱东,顾熊飞. 小驳骨丹无机元素的含量测定[J]. 广东微量元素科学,2002,9(8):57-58.

[5] 卢胜明. 五枫藤、小驳骨和川西茶藨的化学成分研究[D]. 成都:中国科学院成都生物研究所,2008.

[6] 江秀娟,林惠蓉,陈新. 中药材小驳骨的质量标准研究[J]. 临床医学工程,2009,16(10):26-28.

[7] 马陶陶,张群林,李俊. 中药总黄酮的含量测定方法[J]. 安徽医药,2007,11(11):1030-1032.

[8] 马强,董玉,那生桑,等. 冬葵果中总酚酸的含量测定[J]. 时珍国医国药,2010,21(10):2583-2584.

[9] Chen W, Weng Y M, Tseng C Y. Antioxidative and antimutagenic activities of healthy herbal drinks from Chinese medicinal herbs[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2003, 31(4):523-532.

[10] 彭长连,陈少薇,林植芳,等. 用清除有机自由基 DPPH 法评价植物抗氧化能力[J]. 生物化学与生物物理进展,2000,27(6):658-661.

[11] 李忠红,胡浩彬,杜冠华. 天然虫草和人工虫草菌丝体的抗氧化活性比较研究[J]. 中国医药导报,2008,5(16):13-16.

[12] 乌兰格日乐,白海泉,翁慧. 黄酮的抗氧化活性研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报:自然科学版,2008,23(3):277-280.