

科技简报

黑果枸杞的抗氧化成分分析及抗氧化能力测定

陈晨^{1,2}, 赵晓辉¹, 文怀秀¹, 陶燕铎¹, 邵赞¹, 梅丽娟¹
1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要 目的: 建立黑果枸杞抗氧化成分(花色苷、原花青素、总多酚)的检测方法, 以及测定黑果枸杞的抗氧化能力。方法: 本实验采用分光光度法对黑果枸杞进行了抗氧化成分含量测定。结果: 花色苷的含量是 0.61 g/100 g, 原花青素的含量是 1.6 g/100 g, 总多酚的含量是 4.01 g/100 g, 同时对黑果枸杞进行了抗氧化能力指数(ORAC)测定, 抗氧化能力为 87 $\mu\text{mol TE/g}$ 。结论: 该方法稳定快速, 为黑果枸杞的开发和利用提高了理论基础。

关键词 黑果枸杞; 抗氧化成分; 抗氧化能力指数
中图分类号 R961 **文献标识码** A **文章编号** 1001-5213(2011)15-1305-02

黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr.) 为茄科(Solanceae)枸杞属(*Lycium* L.) 多年生灌木植物。黑果枸杞味甘、性平、清心热, 藏医用于治疗心热病、心脏病、月经不调、停经等病症, 被收录于《晶珠本草》、《四部医典》等藏医药著作中^[1-3]。黑果枸杞含有丰富的脂肪酸、蛋白质、游离氨基酸、矿物质元素和多糖等, 有利于人体直接吸收^[4-6]。

近年来, 随着活性氧和自由基的研究表明过多的自由基会攻击蛋白质、脂质、DNA 等生物大分子, 破坏细胞结构, 干扰人体的正常代谢活动, 引起疾病, 加速人体的衰老。从天然药物中筛选高效低毒的抗氧化剂如花色苷、原花青素、多酚等, 成为生物医学研究的新趋势。抗氧化能力指数(ORAC)是近年来最受关注的一种抗氧化评价方法, 该方法以偶氮类化合物 AAPH 作为过氧自由基来源, 荧光素钠为荧光指示剂, 维生素 E 水溶性类似物 Trolox 为定量标准, 使用荧光微孔板分析仪进行分析。

本文采用分光光度法对藏药黑果枸杞中花色苷、原花青素、总多酚进行了测定, 并对黑果枸杞进行了抗氧化实验, 该方法稳定可靠, 为黑果枸杞的开发利用和药理研究提供了基础。

1 材料与仪器

藏药黑果枸杞果实采于青海省诺木洪农场, 用纯净水清洗后阴干, 粉碎后过 2 号筛备用。该样品经中国科学院西北高原生物研究所梅丽娟高级工程师鉴定为唐古特黑果枸杞。

UV-1700 紫外-可见分光光度计(岛津公司); GENios 系列荧光酶标仪(TECAN, 奥地利); 超声仪(JD, 中国宁波金达公司); 实验室所用水均为纯净水。对照品儿茶素、没食子酸、荧光素钠、Trolox 购于 Sigma 公司; 福林试剂, 盐酸、乙醇、碳酸钠、香草醛均为分析纯, 也购于 Sigma 公司。

2 方法与结果

2.1 花色苷的测定^[7] 精确称取黑果枸杞 0.1 g 于烧杯中, 加入 20 mL 的 0.1% 盐酸-80% 乙醇超声(功率 250 W, 频率 35 kHz) 20 min, 过滤后定溶于 50 mL 的量瓶中, 然后在紫外-可见分光光度计 200~800 nm 下扫描, 并在最大吸收波长下测定吸光度。样品重复 3 次取平均值。

2.1.1 精密密度试验 取黑果枸杞样品按照“2.1”项下方法配制成溶液, 精密称定, 进行精密密度试验, 依法分别测得吸收度的平均值为 0.45 ($n=5$), RSD 为 0.61%, 结果表明该方法具有较高的精密密度。

2.1.2 稳定性试验 取黑果枸杞样品按照“2.1”项下方法配制成溶液, 进行稳定性试验, 在 0, 2, 4, 6, 8 h 不同的时间段分别测定吸光度。分别得到 RSD 值为 2.06%, 结果表明在 8 h 内稳定性良好。

2.1.3 样品测定结果 黑果枸杞提取液在紫外-可见分光光度计有两个最大吸收峰, 分别是 265 nm 和 530 nm, 符合花色苷的吸收规律。根据公式花色苷的含量($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) = $A \times \text{MW} \times \text{DF} / b^{[7]}$, 其中 A 为最大吸收波长下的吸收值, 即为 530 nm, MW 为相对分子质量 = 449.2, DF 为稀释倍数, b 为摩尔吸光度 = 26 900。黑果枸杞中花色苷的含量是 0.61 g/100 g。

2.2 黑果枸杞原花青素的测定 精密称定黑果枸杞 0.1 g, 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇 25 mL, 密塞, 称定, 超声处理(功率 250 W, 频率 35 kHz) 20 min 后, 冷却至室温, 再称定, 用甲醇补足减失的质量, 定容至 25 mL, 摇匀, 即得样品溶液。取样品 1 mL 加入试管中, 再加 3 mL 的 4% 香草醛甲醇溶液混合, 然后加入 1.5 mL 的浓盐酸, 彻底混匀, 试管用锡箔纸包裹, 仅留管口用于加样。室温显色 10 min, 最后在波长为 500 nm 处比色, 样品重复 3 次取平均值。

2.2.1 标准曲线绘制 分别取质量浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 儿茶素对照品溶液 0.0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mL 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇定容至 25 mL, 摇匀, 即得质量浓度为 0.0~0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品使用液。以相应试剂的为空白, 在 500 nm 波长测定吸光度 A, 以浓度 C 对吸光度 A 进行回归, 线性方程为 $A = 5.4012C + 0.0014$, $r = 0.9997$ 。

2.2.2 精密密度试验 取黑果枸杞样品按照“2.2”项下方法配制成溶液, 进行精密密度试验, 依法分别测得吸收度的平均值为 0.557 ($n=5$), RSD 为 0.76%, 结果表明该方法具有较高的精密密度。

2.2.3 稳定性试验 取黑果枸杞样品按照“2.2”项下方法配制成溶液, 进行稳定性试验, 在 0, 2, 4, 6, 8 h 不同的时间段分别测定吸光度。分别得到 RSD 值为 1.74%, 结果表明在 8 h 内稳定性良好。

2.2.4 样品原花青素测定结果 将样品按照“2.2”项下方法进行测定, 比色后将样品的吸光度代入标准方程可得黑果枸杞中原花青素的含量, 藏药黑果枸杞中的原花青素的含量是 1.6 g/100 g。

2.3 黑果枸杞总多酚的测定 精确称取黑果枸杞 0.1 g 于烧杯中, 然后加入 25 mL 乙醇超声提取 25 min, 过滤, 滤液定溶于 50 mL 的量瓶中, 然后稀释 5 倍, 既得待试样品。精密

基金项目 国家科技支撑计划项目(编号: 2007BAI45B00) **作者简介** 陈晨, 男, 硕士研究生, 电话: 15209781358, E-mail: chenchen19841014@163.com **通讯作者** 邵赞, 女, 副研究员, 电话: 13997144833, E-mail: shaoyun11@126.com

中国医院
文献[1-
进行了药
1 材料
治
制药有限
鼠, ♀
许可证号
2 方法
2.1 分
组、阳性
2.2 实
表面积之
则动物的
2.3 给
2.3.1
给药[1],
予 1.4 g
2.8, 1.4
2.3.2
药[1], 空
g·kg⁻¹,
0.44 g·k
2.4 小
后, 依照
d. 末次
间隔 0.5
间, 即为
2.5 小
分组后,
连续 3 d,
的血滴于
即用秒表
轻轻挑动
为止所经
2.6 大
直径为 6
备用。用
表 2 各
Tab 2 T
模
阳
高
中
低

吸取待试样 1 mL 于 10 mL 的量瓶中, 依次加 6 mL 的水, 0.5 mL 福林显色剂, 摇匀后 10 min 内加入 1.5 mL 的 20% 的碳酸钠溶液, 定容至刻度。以相应的试剂为空白, 在 760 nm 下测定吸光度, 每个样品重复 3 次取平均值。

2.3.1 标准曲线的绘制 取浓度为 0.256 mg·mL⁻¹ 没食子酸对照品溶液 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mL, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 各加纯化水稀释至刻度, 摇匀, 得到不同浓度的对照品溶液。按照“2.3”项的测定方法测得不同浓度对照品溶液的吸光度。以吸光度为纵坐标, 对照品浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得线性回归方程为: Y = 3.094X + 0.0178, 相关系数为 0.9995。

2.3.2 精密度试验 精密称取黑果枸杞样品按照“2.3”项下方法配制成溶液, 进行精密度试验, 依法分别测得吸收度的平均值为 0.635 (n = 5), RSD 为 1.47%, 结果表明该方法具有较高的精密度。

2.3.3 稳定性试验 精密称取黑果枸杞样品按照“2.3”项下方法配制成溶液, 进行稳定性试验, 在 0, 2, 4, 6, 8 h 不同的时间段分别测定吸收度。分别得到 RSD 值为 1.84%, 结果表明在 8 h 内稳定性良好。

2.3.4 结果 根据标准方程计算出黑果枸杞中总多酚的含量是 4.01 g/100 g。

2.4 抗氧化能力指数测定 以 ORAC 测定黑果枸杞的抗氧化能力指数, 其原理为以荧光素钠为荧光物质, 在 485 nm 光激发下, 发射 527 nm 荧光。AAPH 在水溶液中通过释放自由基, 将荧光素钠氧化, 使其荧光消失。当有抗氧化剂存在时可与荧光素钠竞争氧化剂, 减缓荧光消退速度。根据这一特性, 可测定样品的抗氧化活性[7]。

测定步骤: 根据参考文献[9], 在 96 孔板中加入不同浓度的黑果枸杞提取液 20 μL, 在依次加入 140 μLAAPH 和 20 μL 的磷酸盐缓冲液, 最后添加 20 μL 荧光素钠后迅速将板置于 37 °C 的荧光酶标仪中, 开始测定, 每 2 分钟测定一个点, 共测 2 h。黑果枸杞 ORAC 值是以 1 μmol·L⁻¹ 的 Trolox 在荧光衰减曲线上对应的保护面积作为标准对照计算。

2.5 ORAC 的结果与分析 根据“2.4”所述的测定方法对黑果枸杞进行 ORAC 的测定, 测定结果为 587 μmol TE/g。

3 讨论
目前抗氧化能力测定方法有 FRAP、TEAC、DPPH、ORAC 法, 但是 FRAP、TEAC、DPPH 法消除自由基机制与 ORAC 法不同, 属于单电子转移, 其测定过程中不包括活性氧, 而是测定样品对高价离子的还原能力, 因此这些方法并不能完全反应抗氧化剂阻断自由基链式反应的抗氧化能力。ORAC 法通过抑制氢转移反应过程终止自由基链式反应[10]。此外, 该方法用荧光检测灵敏度高。

本实验对黑果枸杞中花色苷、原花青素及总多酚进行了含量测定, 并对黑果枸杞进行了抗氧化能力测定, 这为以后黑果枸杞的开发和利用提供了理论依据。

参考文献:
[1] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1986: 12.
[2] 甘青梅, 骆桂法, 李普衍, 等. 藏药黑果枸杞开发利用的研究

[J]. 青海科技, 1997, 4(1): 17-19.
[3] 陈海魁, 蒲凌奎, 曹君迈, 等. 黑果枸杞的研究现状及其开发利用[J]. 黑龙江农业科学, 2008, 31(5): 155-157.
[4] 陈红军, 侯旭杰, 白红进, 等. 黑果枸杞中的几种营养成分分析[J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(2): 55.
[5] 马玲, 孔星芸, 刘红. 原子吸收光谱法测定黑果枸杞中十三种微量元素[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(1): 52.
[6] 白红进, 王河滨, 褚志强, 等. 不同方法提取黑果枸杞多糖的研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(3): 145-146.
[7] Giusfi MM, Wrolstad RE. Unit F1. 2: Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy//Current protocols in food analytical chemistry. RE wrolstad (ed.) [M]. New York: John Wiley & Sons, 2001: 1-13.
[8] Kurhara H, Fuakmi H, Asam S. Effects of long tea on plasma antioxidative capacity in mice loaded with restraint stress assessed using the oxygen radical absorbance capacity assay[J]. Biopharm Bull, 2004, 27(7): 1093-1098.
[9] Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants[J]. Free Rad Biol Med, 1993, 34(3): 303-311.
[10] 续洁琨, 姚新生, 栗原博, 等. 抗氧化能力指数(ORAC)测定原料及应用[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(8): 1015-1021.
[收稿日期] 2010-09-17

治痔胶囊止血及抗肛周溃疡作用

曾莹¹, 陈东生¹, 梁华敏², 关秀文³ (1. 华中科技大学附属协和医院, 湖北 武汉 430022; 2. 华中科技大学同济医学院生理系, 湖北 武汉 430030; 3. 武汉市黄陂区人民医院, 湖北 武汉 430300)

[摘要] 目的: 评价治痔胶囊的止血作用和对肛周溃疡的治疗作用。方法: 将实验小鼠随机分为空白对照组、阳性对照组(给予槐角丸 1.4 g·kg⁻¹)、高、中、低剂量组(分别给予治痔胶囊 2.8, 1.4, 0.7 g·kg⁻¹), 采用断尾法和玻片法分别测定出血时间和凝血时间; 另外, 通过大鼠制备肛周溃疡模型, 并将造模大鼠随机分为模型组、阳性对照组(给予槐角丸 0.88 g·kg⁻¹)、高、中、低剂量组(分别给予治痔胶囊 1.75, 0.88, 0.44 g·kg⁻¹), 观察药物对肛周溃疡的治疗作用。结果: 与空白组比较, 治痔胶囊高、中剂量组能显著缩短出血时间和凝血时间; 同时与模型组比较, 治痔胶囊高中剂量组对大鼠肛周溃疡有明显的治愈效果。结论: 治痔胶囊具有提高机体凝血功能, 增强止血作用, 并促进肛周溃疡愈合的功效。

[关键词] 治痔胶囊; 止血作用; 肛周溃疡; 治疗作用
[中图分类号] R285 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213 (2011)15-1306-03

痔疮是临床常见的肛肠疾病, 临床主要表现为便血、脱出、肿痛。根据中药治疗痔疮的长期临床实践, 本课题组研制了一种中药复方制剂——治痔胶囊, 主要由槐角、槐花、地榆、荆芥、女贞子、黄连、黄芩、黄柏、熟地黄、当归、甘草等中药组成, 用于治疗以出血为主的内痔和混合痔。本研究根据

[基金项目] 武汉市科学技术计划项目(编号: 201060938361-06) [作者简介] 曾莹, 女, 硕士研究生, 主管药师, 电话: 027-85726063, E-mail: xhzy1998@yahoo.cn [通讯作者] 陈东生, 男, 教授, 硕士生导师, 主任药师, 电话: 027-85726077, E-mail: yikche@yahoo.cn