

热带海洋红藻中总酚类化合物含量研究

安婷婷, 李玲娜, 王鹤 (海南省药物研究所, 海南海口 570311)

摘要 [目的] 开发一种筛选高酚类化合物含量的海洋红藻方法。[方法] 对 Folin-Denis 法测定的红藻中总酚类化合物含量进行了研究, 通过 Na_2CO_3 溶液和 Folin-Denis 试剂用量以及显色时间等因素的研究, 得出最佳反应体系, 同时验证最佳检测条件。[结果] 最优试验方法为 1.0 ml 的样品提取液中依次加入 20 ml 水、3.0 ml 饱和 Na_2CO_3 溶液、5.0 ml Folin-Denis 试剂, 摇匀, 显色 70 min, 在 713 nm 波长处测定吸光度; 红藻的总酚类含量在 0.04~0.80 mg/ml 范围内吸光度和总酚类含量具有良好的线性关系, 符合回归方程 $y = 1.4705x - 0.0038$ ($R^2 = 0.999$), 平均加标回收率为 99.93%, RSD 为 0.62%。[结论] Folin-Denis 法经济、省时、简单、快捷, 可用于大量筛选高酚类含量的海洋红藻。

关键词 酚类化合物; 筛选方法; 红藻

中图分类号 S986.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)34-148-02

Study on the Content of Total Polyphenol from Tropical Marine Red Alga

AN Ting-ting, LI Ling-na, WANG He (Pharmaceutical Institute of Hainan Province, Haikou, Hainan 570311)

Abstract [Objective] The research aimed to develop a method for screening high Polyphenols isolated from marine red alga. [Method] The Total polyphenol content in red alga by Folin-Denis method determination were studied, Through investigating such as consumption of sodium carbonate solution and Folin-Denis reagent, chromogenic time the factors of affecting the experimental results were analyzed, the best reaction system was concluded, at the same time, the best testing conditions were proved. [Result] After a series of optimization experiments, the best determination procedure of method was put forward, that was 20 ml water, 3.0 ml sodium carbonate solution and 5.0 ml Folin-Denis reagent, then blended it, and measure its optical density at 713 nm after coloration for 70 min. There was a linear relationship between absorbance and total polyphenols in red alga, when the concentration of tannic acid was in the range of 0.04-0.80 mg/ml. The regression equation was $y = 1.4705x - 0.0038$ ($R^2 = 0.999$), and that the average recovery rate was 99.93%, with an average RSD was 0.62%. [Conclusion] The method of Folin-Denis was economical, time-saving, simple, quick, and it can be used for large scale screening high Polyphenols isolated from marine red alga.

Key words Polyphenols; Screening method; Red alga

海藻溴酚化合物为海洋生物特有的卤代化合物, 因其大多具有新颖的化学结构及独特的生物活性, 为获得全新结构的新药提供了宝贵的化合物来源, 近年来逐步引起了海洋药物研究者的注意。该类化合物在抗炎^[1]、抗菌、抗氧化、抗肿瘤^[2-3]、 α -葡萄糖苷酶抑制、蛋白酪氨酸磷脂抑制^[4]等方面表现出独特的生物活性。目前, 国内外学者已将海藻溴酚化合物作为治疗糖尿病、动脉粥样硬化、恶性肿瘤等重大疾病的药物, 并已获得了发明专利或新药批件^[5-6]。

常用的体外降血糖模型 α -葡萄糖苷酶法所需要的对硝基苯- α -D 葡萄糖吡喃苷、 α -葡萄糖苷酶价格昂贵且保存方法特殊, 并不适用于筛选大量的海洋红藻资源。该研究对 Folin-Denis 法测定的红藻中总酚类化合物含量进行了研究, 通过 Na_2CO_3 溶液和 Folin-Denis 试剂用量以及显色时间等因素的研究, 得出最佳反应体系, 同时验证最佳检测条件, 旨在建立红藻中总酚类化合物含量的筛选方法, 为后期筛选高酚类含量的红藻奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 仪器 紫外分光光度计 (UV-2401PC); 轨道式振荡仪 (OS-100); 超声微波清洗仪 (SK450HP); 台式高速冷冻离心机 (TGL-16MC)。

1.2 试剂与药材 麒麟菜 (琼海), 于 2011~2013 年期间采集, 由海南省药物研究所李玲娜主任鉴定; 所用试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 溴酚化合物的提取。 称取麒麟菜粉末 10 g 于 250 ml 锥形瓶中, 加入 100 ml 50% 的乙醇, 超声 30 min, 提取 2 次, 将提取液抽滤, 滤液转移至 500 ml 圆底烧瓶中, 减压浓缩至干, 向烧瓶中加入 25 ml 纯化水, 超声 30 min 溶解, 转移至 50 ml 棕色容量瓶中, 定容, 备用。

1.3.2 Folin-Denis 分光光度法测定麒麟菜中酚类物质含量最佳试验条件的摸索。

1.3.2.1 对照品的选择。 称取间苯三酚 1.22955 g 于 250 ml 容量瓶中, 加入纯化水溶解, 加入 0.5 ml F. D 试剂, 于轨道式振荡仪上 130 rpm 振摇 30 min, 加入 1.0 ml 饱和 Na_2CO_3 溶液, 用纯化水定容, 避光显色 80 min, 在 800~400 nm 波长处进行图谱扫描, 麒麟菜样品扫描方法同对照品。

1.3.2.2 饱和碳酸钠溶液的用量。 取数支 50 ml 容量瓶, 各加入 20 ml 纯化水、1.0 ml 0.2 mg/ml 间苯三酚溶液、2.0 ml F. D 试剂, 摇匀, 静置 6 min, 分别加入 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 ml 饱和 Na_2CO_3 溶液, 用纯化水定容, 摇匀, 静置避光显色 80 min, 以空白试剂为参比, 于 713 nm 波长处测定吸光度。

1.3.2.3 Folin-Denis 试剂的用量。 取数支 50 ml 容量瓶, 分别加入 20 ml 纯化水、1.0 ml 0.2 mg/ml 间苯三酚标准液, 容量瓶中依次加入 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 ml F. D 试剂, 摇匀, 静置 6 min, 分别加入 3.0 ml 饱和 Na_2CO_3 溶液, 用纯化水定容, 摇匀, 静置避光显色 80 min, 以空白试剂为参比, 于 713 nm 波长处测定吸光度。

1.3.2.4 最佳显色时间。 取数支 50 ml 容量瓶, 各加入 20 ml 纯化水、1.0 ml 0.2 mg/ml 间苯三酚标准液、5.0 ml F. D

基金项目 海南省自然科学基金(211014)。

作者简介 安婷婷 (1982-), 女, 海南海口人, 助理研究员, 硕士, 从事新药研发、海洋药物方面工作。

收稿日期 2015-11-06

试剂,摇匀,静置 6 min,分别加入 3.0 ml 饱和 Na_2CO_3 溶液,用纯化水定容,摇匀,静置避光显色 5、15、20、30、40、60、80、90、100、120 min,于 713 nm 波长处测定吸光度。

1.3.2.5 标准曲线的绘制。取数支 50 ml 容量瓶,分别加入 20 ml 纯化水,再分别加入 0、0.04、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.8 mg/ml 的间苯三酚标准液 1.0 ml,按最佳试验条件,于 713 nm 波长处测定吸光度。

1.3.2.6 精密度试验。取数支 50 ml 容量瓶,分别加入 20 ml 纯化水,再加入 0.2 mg/ml 间苯三酚标准液 1.0 ml,按最佳试验条件,于 713 nm 波长处测定吸光度,做 6 份平行试验,计算 *RSD*。

1.3.2.7 样品中酚类化合物的测定。取数支 50 ml 容量瓶,分别加入 20 ml 纯化水,再分别加入 1 ml 麒麟菜样品 3 份,按最佳试验条件,于 713 nm 波长处测定吸光度。

1.3.2.8 回收率试验。取数支 50 ml 容量瓶,分别加入 1 ml 麒麟菜样品,再依次加入 0.25、0.50 mg 各 3 份,摇匀,按最佳试验条件,于 713 nm 波长处测定吸光度。

2 结果与分析

2.1 图谱扫描 因间苯三酚与酚类化合物均具有苯环的相似结构,筛选模型选用间苯三酚作为对照品,样品光谱扫描图谱与间苯三酚基本相同(图 1),且均在波长为 713 nm 处有最大吸收峰,故此模型选择 713 nm 为检测波长。

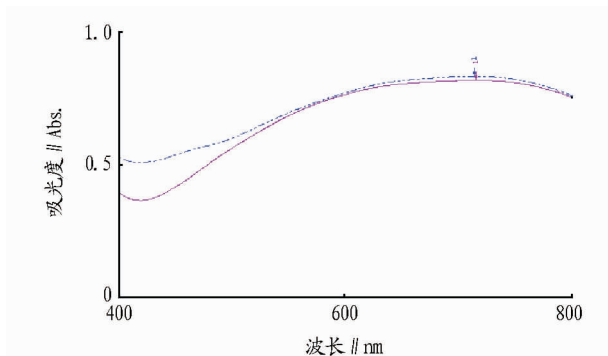


图 1 对照品(虚线)和样品(实线)光谱扫描图谱

2.2 饱和碳酸钠溶液的用量和 Folin-Denis 试剂的用量结果 通过对比不同体积的饱和碳酸钠结果(图 2)发现,吸光度随着饱和碳酸钠用量的增大而增大,当饱和碳酸钠的体积为 3.0 ml 时吸光度达最大值,显色最完全,而后,吸光度反而随着饱和碳酸钠体积的增大而减小,故此模型选择饱和碳酸钠的用量为 3.0 ml。同样,通过 Folin-Denis 试剂用量曲线结果(图 2)可知,Folin-Denis 试剂用量在 5.0 ml 时反应体系颜色较为清亮,反应体系最为稳定,对吸光度的影响比较小;当 Folin-Denis 试剂用量超过 5.0 ml 时,随用量的增加而出现白色沉淀,且吸光值不稳定,因此此模型选用 5.0 ml 的 Folin-Denis 试剂。

2.3 最佳显色时间结果 由图 3 可知,吸光度在 60~120 min 范围内趋向于稳定,变化范围小于 1%,所以此模型选择 70 min 为显色时间。

2.4 标准曲线和回归方程 由图 4 可知,间苯三酚的线性方程为 $y = 1.4705x - 0.0038$ ($R^2 = 0.999$),线性范围为

0.04~0.80 mg/ml。

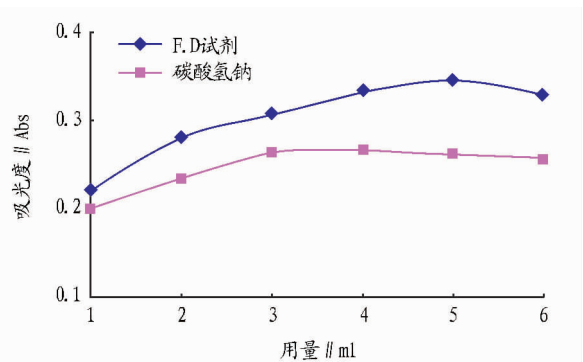


图 2 Folin-Denis 试剂和碳酸氢钠的用量结果

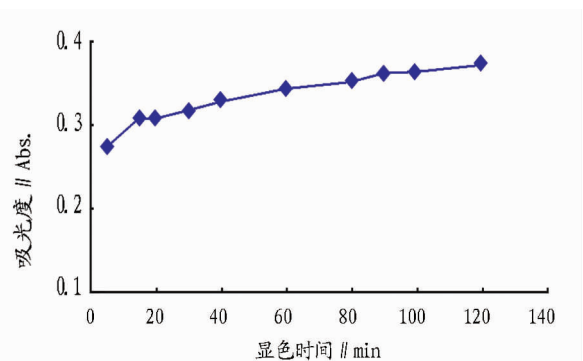


图 3 最佳显色时间结果

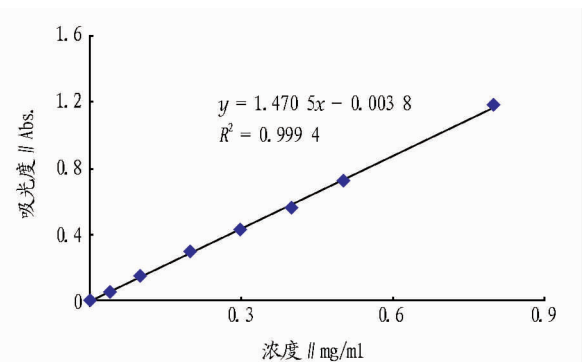


图 4 间苯三酚的标准曲线

2.5 精密度试验 按“1.3.2.6”操作,6 份平行试验的 *RSD* 为 0.25%,表明此方法的精密度较高。

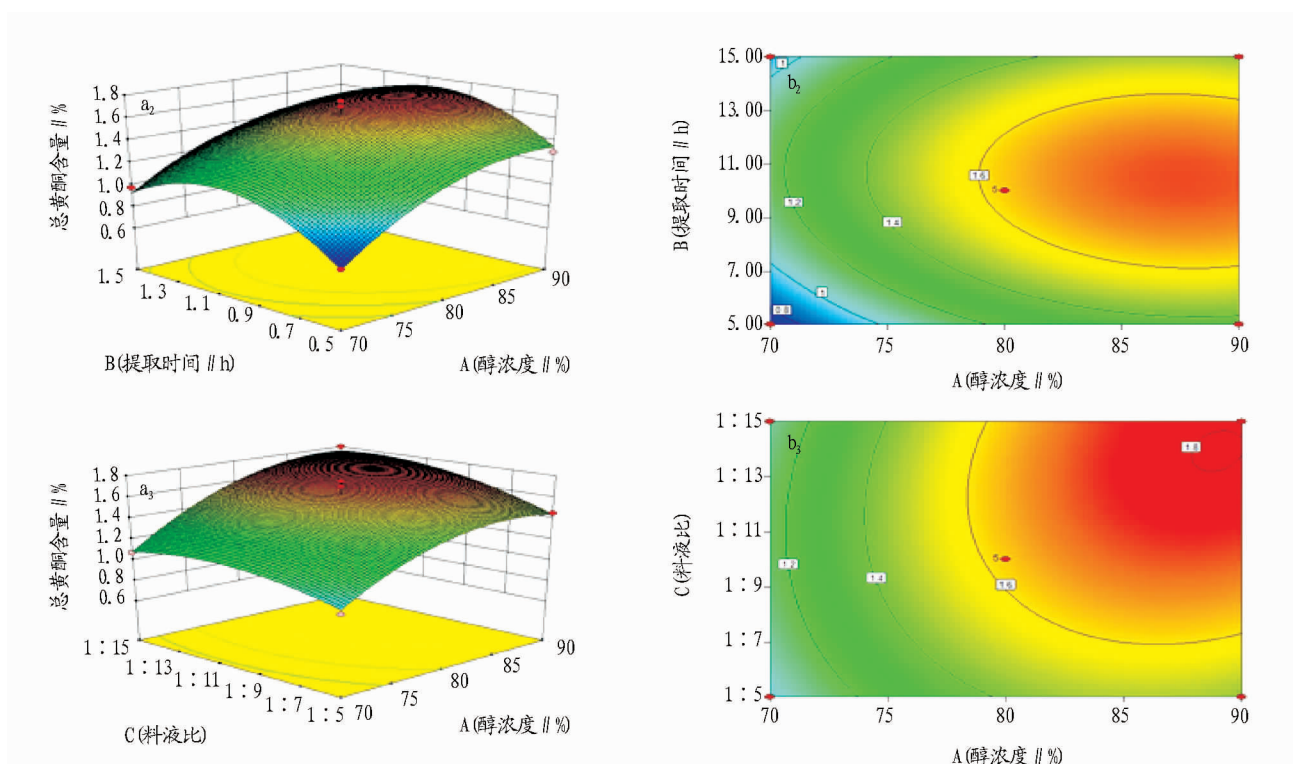
2.6 样品中酚类化合物的测定 按“1.3.2.7”操作,3 次样品平行测定的吸光值分别为 0.373、0.370、0.376,麒麟菜中总酚类化合物的含量为 1.28 mg/g,*RSD* 为 0.70%。

2.7 回收率 由表 1 可知,加标回收率为 99.12%~100.74%,平均加标回收率为 99.93%,平均 *RSD* 为 0.62%。

表 1 加标回收率试验结果

样品量 mg	加标量 mg	吸光值	回收率 %	平均回收 率//%	<i>RSD</i> %
0.256 3	0.25	0.743	99.12	99.93	0.62
0.256 3	0.25	0.749	100.74		
0.256 3	0.25	0.745	99.66		
0.256 3	0.50	1.117	99.93		
0.256 3	0.50	1.121	100.47		
0.256 3	0.50	1.115	99.66		

(下转第 157 页)



注: a_1 、 b_1 为料液比与提取时间; a_2 、 b_2 为乙醇浓度与提取时间; a_3 、 b_3 为乙醇浓度与料液比。

图 6 各因素间的交互作用

3 结论与讨论

该试验在单因素试验的基础上,应用响应面分析法优化僵蚕总黄酮的提取工艺得出:僵蚕在体积分数 90% 乙醇溶液、料液比 1:15 (g/ml) 的条件下提取 1 h 的总黄酮得率最高,为 1.85%,与模型预测值相符。表明该法优选的总黄酮提取工艺稳定可行,建立的含量测定方法准确可靠。

僵蚕作为临床上常用的虫类药材,其总黄酮的药理活性及物质基础研究较为薄弱,该试验通过对总黄酮提取工艺的研究,对后续僵蚕中黄酮类化合物的分离制备及药理学研究具有一定的指导作用。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 北京: 化学工业出版社

(上接第 149 页)

3 结论与讨论

通过上述试验得出筛选模型最佳检测波长 713 nm、饱和 Na_2CO_3 溶液的用量 3.0 ml、Folin-Denis 试剂用量 5.0 ml、显色时间 70 min,适用于 50 ml 反应体系。除麒麟菜外,笔者还研究该方法在江蓠、紫菜、石花菜等红藻中的适用性,回收率均在 80%~120%,说明此方法可用于筛选高酚类化合物含量的红藻。此筛选方法脱离了酶和底物的限制,准确、简单、快速且成本低,可以与总溴化合物含量的方法相结合作为高溴酚含量的热带海洋红藻的初步筛选方法,为后期提取和发现新溴酚化合物及研究其降血糖活性打下了基础,为红藻的充分利用提供了广阔的天地,促进了人类对海洋药物的进一步开发和利用。

- 社,2010.
- [2] 金洁,刘淑梅,时连根. 家蚕幼虫体中黄酮类化合物含量的变化规律[J]. 蚕业科学,2005,31(2):141.
- [3] 刘利,潘一乐. 不同桑种桑叶总黄酮含量分析[J]. 中国农学通报,2008,24(1):488.
- [4] 潘云海,薛忠民,苏超. 家蚕幼虫体中黄酮类化合物的提取与测定[J]. 北方蚕业,2009,30(4):29.
- [5] 肖阳,吴福泉,王振江,等. 蚕体黄酮类化合物的提取及不同家蚕品种间的含量差异[J]. 蚕业科学,2011,37(2):358.
- [6] 藏楠,王学英,孙佳,等. 不同品种不同发育时期的柞蚕幼虫黄酮类化合物的提取及含量变化[J]. 食品研究与开发,2008,29(5):35.
- [7] KIKUCHI H, TAKAHASHI N, OSHIMA Y. Novel aromatics bearing 4-O-methylglucose unit isolated from the oriental crude drug *Bombyx Baryticatus*[J]. Tetrahedron lett,2004,45(2):367.
- [8] 蒋学. 白僵蚕活性成分分离纯化及其药理作用的研究[D]. 杭州:浙江大学,2013:22-34.

参考文献

- [1] 张宏利,朱钺达,骆天红,等. 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 基因多态性与 2 型糖尿病和肥胖的相关性研究[J]. 中华内分泌代谢杂志,2006,22(1):45-48.
- [2] 孙雪,徐年军,郭俊明,等. 2 种海藻溴酚类化合物的抗肿瘤作用及其机制研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(9):1173-1176.
- [3] ZHAO J, FAN X, WANG S, et al. Bromophenol derivatives from the red alga *Rhodomela confervoides*[J]. Journal of natural products,2004,67(6):1032-1035.
- [4] FAN X, XU N J, SHI J G. A new brominated phenylpropylaldehyde and its dimethyl acetal from red alga *Rhodomela confervoides*[J]. Chin Chem Lett,2003,14(10):1045-1047.
- [5] 史大永,韩丽君,范晓,等. 两种溴酚类在制备治疗恶性肿瘤药物中的应用:中国, CN101342158[P]. 2009.
- [6] 史大永,范晓,韩丽君,等. 溴酚类化合物在制备治疗恶性肿瘤药物中的应用:中国, CN101283998[P]. 2008.