

橄榄果实提取物中没食子酸含量及 自由基清除能力的研究

张亮亮^{1,2}, 林益明²

(1. 中国林业科学研究院林产化学工业研究所; 生物质化学利用国家工程实验室;
国家林业局林产化学工程重点开放性实验室, 江苏南京 210042
2. 厦门大学生命科学学院生物系, 福建厦门 361005)

摘要: 采用高效液相色谱法测定橄榄果实甲醇提取物中没食子酸的含量, 并用二苯基苦基苯

ZHANG Liang-liang 肼自由基(DPPH·)法研究了橄榄果实提取物的自由基清除能力。没食子酸质量浓度在 8~42 mg/L 范围内, 没食子酸峰面积与其进样量呈良好的线性关系 ($R=0.9993$), 没食子酸平均质量分数 4.03%, 相对标准偏差 (RSD) ($n=6$) 1.77%, 平均回收率 98.75%, RSD ($n=6$) 1.21%。该方法简单灵敏, 准确可靠, 重复性好。橄榄果实甲醇提取物具有较高的自由基清除能力, DPPH· 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 40.14 mg/L。

关键词: 橄榄; 没食子酸; 高效液相色谱法; 自由基清除能力

中图分类号: TQ351.0

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2009)S0-0192-03

Determination of Gallic Acid Content in Extract of *Canarium album* (Lour.) Raeusch Fruit and Its Radical Scavenging Activity

ZHANG Liang-liang^{1,2}, LIN Yiming²

(1. Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF, National Engineering Lab For Biomass Chemical Utilization, Key and Open Lab on Forest Chemical Engineering SFA, Nanjing 210042, China
2. Department of Biology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract The content of gallic acid in extract of white canary tree (*Canarium album* (Lour.) Raeusch) fruit was determined by HPLC. The radical scavenging activity of extract was determined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay. The linearity of gallic acid content was over the range of 8~42 mg/L with good linear correlation ($R=0.9993$). The mean value of gallic acid content was 4.03%, with relative standard deviation (RSD) ($n=6$) 1.77%. The average recovery was 98.75% with RSD ($n=6$) 1.21%. The determination method is simple, sensitive, accurate, reliable and with good reproducibility. *C. album* fruit extract showed a very good DPPH radical scavenging activity (IC_{50}) 40.14 mg/L.

Key words *Canarium album* (Lour.) Raeusch; gallic acid; HPLC; radical scavenging activity

橄榄 (*Canarium album* (Lour.) Raeusch) 为橄榄科橄榄属常绿乔木, 其果实又名青果, 为我国传统中药材, 具有清热、利咽、祛痰、生津、健脾、解毒等功效, 用于咽喉肿痛、咳嗽、烦渴、鱼鳖中毒等治疗^[1-2]。橄榄果实中所含有效成分没食子酸具有抗 HBsAg/HBeAg 的作用^[3-4]。本研究采用高效液相色谱法测定橄榄果实提取物中没食子酸的含量并用二苯基苦基苯肼 (DPPH) 法研究了其抗氧化活性。

1 实验

1.1 材料、试剂与仪器

材料: 新鲜橄榄果实购于福建厦门农贸市场去核切片后备用。试剂: 没食子酸对照品, 中国药品生

收稿日期: 2009-05-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30671646); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-07-0725)

作者简介: 张亮亮 (1981-), 男, 江苏沐阳人, 博士, 主要从事植物单宁化学研究工作

* 通讯作者: 林益明, 博士生导师, 研究领域: 植物生态学; E-mail: linyim@xmu.edu.cn

物制品检定所;乙腈,色谱纯;其它试剂均为分析纯;实验用水为去离子水。仪器:美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪, DAD 检测器, Agilent Chemstation 工作站; TU-1800 型紫外可见分光光度计,北京普析。

1.2 溶液的制备

1.2.1 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸对照品 20 mg 置于 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,精密量取 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL 置于 50 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,混匀,得不同浓度梯度没食子酸对照品溶液。

1.2.2 供试品溶液的制备 称取新鲜橄榄果实样品 66 g 然后加入 600 mL 60% 甲醇溶液后用组织捣碎机捣碎,浸提 30 min,重复提取 3 次。收集提取液在 35 °C 减压旋转蒸发除去溶剂,将水相冷冻干燥后得提取物,称质量。准确称取冷冻干燥后提取物干粉 40 mg 溶于 50 mL 量瓶中,加水至刻度。用 0.22 μm 滤膜过滤,作为供试品溶液。

1.3 方法

1.3.1 检测波长的选择及其它色谱条件 检测波长的选择:称取没食子酸约 1.68 mg 置 100 mL 量瓶中,加流动相溶解至刻度,摇匀后用紫外可见分光光度计在 200~500 nm 波长范围内扫描,选择测定波长为 271 nm。

色谱条件:色谱柱为依利特 Hypersil ODS 柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.1% 的三氟乙酸水溶液 (体积比 5:95),流速 0.8 mL/min,柱温为室温。

1.3.2 回归方程的确定 取 1.2.1 节各浓度梯度的对照品溶液,各进样 10 μL,测定峰面积,以没食子酸质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行回归处理,得没食子酸的回归方程为: $Y = 3378.1X + 1209.5$ $R = 0.9993$ 。没食子酸质量浓度在 8.4~42 mg/L 范围内,与峰面积之间呈很好的线性关系。

1.3.3 样品含量测定 取 1.2.2 节供试品溶液 3 份,按 1.3.1 节色谱条件重复测定 6 次。用外标法计算没食子酸的含量。

1.3.4 精密度实验 取 1.2.2 节供试品溶液按 1.3.1 节色谱条件重复进样 5 次,测定峰面积。

1.3.5 稳定性实验 取 1.2.2 节供试品溶液,在 0~6 h 内 (放置时避光) 每隔 1 h 测定 1 次,共测定 6 次,测定峰面积。

1.3.6 重复性实验 取 1.2.2 节供试品溶液,按 1.3.1 节色谱条件重复进样 5 次进行含量测定。

1.3.7 加样回收实验 精密称取已测含量的样品粉末 40 mg (共 5 份),各精密加入没食子酸对照品适量,分别按 1.2.2 节方法处理后,重复测定 6 次并计算回收率。

1.3.8 二苯基苦基苯肼 (DPPH) 法测定自由基清除能力^[5]

配制质量分数为 0.004% DPPH 甲醇溶液,避光保存。不同质量分数的样品溶液 0.1 mL 加 3 mL 的 0.004% DPPH 甲醇溶液于 10 mL 试管中,设 3 个重复。摇匀后室温放置 30 min,测定其在 517 nm 处的吸光度 (A_s)。另以甲醇溶剂做空白对照测定 3 mL DPPH 溶液与 0.1 mL 甲醇溶剂混合后在 517 nm 处的吸光度 (A_c)。橄榄果实甲醇提取物对二苯基苦基苯肼自由基 (DPPH·) 的清除率用抑制率 ($I\%$) 来表示。

$$I = (A_c - A_s) / A_c \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 样品的液相色谱测定结果

橄榄果实甲醇提取物与没食子酸对照品色谱图见图 1。

由图 1 可知,橄榄果实甲醇提取物中没食子酸的保留时间与对照品一致。

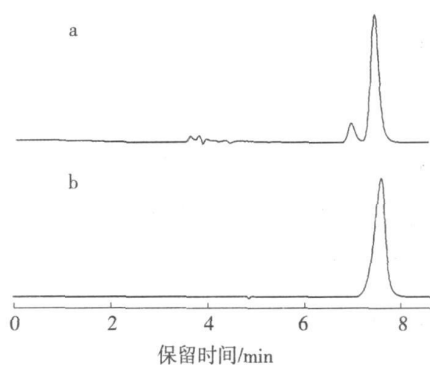


图 1 橄榄果实甲醇提取物 (a) 与没食子酸对照品 (b) 液相色谱图

Fig 1 HPLC spectra of methanol extract from *C. album* fruits (a) and gallic acid (b)

2.2 没食子酸的含量测定结果

橄榄果实提取物中没食子酸的含量测定结果见表 1。

表 1 橄榄果实中没食子酸的质量分数

Table 1 Content of gallic acid in *C. abun* fruits

样品编号 No	没食子酸质量分数 /% mass fraction of gallic acid	RSD (n=6) /%
1	3.91	1.57
2	4.10	1.81
3	4.08	1.93
平均值 mean values	4.03	1.77

精密实验结果测得平均质量分数为 3.99%，RSD 为 1.37%；稳定性实验结果测得平均质量分数为 3.30%，RSD 为 1.64%，说明样品溶液在室温条件下 6 h 内稳定；重复性实验结果测得平均质量分数为 3.99%，RSD 为 1.78%；加样回收实验结果见表 2。

表 2 加样回收实验

Table 2 Results of recovery test

样品质量 /mg mass of samples	对照品加入量 /mg addition amount of control substance	测定量 /mg determined amount	回收率 /% recovery rate	平均回收率 /% average recovery rate	RSD (n=6) /%
1.603	2	3.484	96.69		
1.623	2	3.614	99.76		
1.671	2	3.643	99.25	98.75	1.21
1.668	2	3.626	98.85		
1.649	2	3.619	99.18		

2.3 橄榄果实提取物的自由基清除能力

DPPH· 是性质较为稳定的自由基，通常以此体系进行相关化合物与混合物的抗氧化能力的评价^[6]。较低的半数抑制浓度 (IC₅₀) 值表示具有更高的自由基清除能力，橄榄果实甲醇提取物的自由基的 IC₅₀ 为 40.14 mg/L，优于人工合成抗氧化剂 BHA 的 IC₅₀ 57.46 mg/L 和抗坏血酸的 IC₅₀ 78.25 mg/L。表明橄榄果实甲醇提取物具有较高的自由基清除能力。

3 结论

3.1 采用高效液相色谱法测定橄榄果实甲醇提取物中没食子酸平均质量分数为 4.03%，相对标准偏差 (RSD) (n=6) 1.77%。本法用于测定橄榄果实甲醇提取物中的没食子酸的含量，也可为测定橄榄果实复方制剂中没食子酸的含量提供初步的数据。

3.2 橄榄果实甲醇提取物具有较高的自由基清除能力，其二苯基苦基苯肼自由基 (DPPH·) 的半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 40.14 mg/L，自由基清除能力高于抗氧化剂 BHA 和抗坏血酸，可进一步研究开发为抗氧化功能性食品。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典 第一部 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 168
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 1595
- [3] 郑民实, 孔庚星, 张鑫, 等. 没食子酸抗 H₂O₂/H₂O₂ 的实验研究 [J]. 实用中医药杂志, 1998, 14(1): 5-7
- [4] 郑民实. ELISA 技术检测中草药抗 H₂O₂ 的实验研究 [J]. 中国医院药学杂志, 1991, 11(2): 53-54
- [5] BRACA A, TOMMASIN D, BARIL D, et al. Antioxidant principles from *Bauhinia variegata* [J]. Journal of Natural Products 2001, 64(7): 892-895.
- [6] BRAND-WILLIAM S W, CUVELIER M E, BERSET C. Use of a free radical to evaluate antioxidant activity [J]. LWT-Food Science and Technology 1995, 28(1): 25-30