

不同显色剂对牛膝总皂苷含量测定的影响

张小鸿,吴杨峥,徐先祥*

(华侨大学生物医学学院,福建泉州 362021)

[摘要] 目的:考察不同显色方法对紫外-可见分光光度法测定牛膝总皂苷含量的影响。方法:采用紫外-可见分光光度法测定牛膝总皂苷含量,分别用 5 种方法进行显色,显色剂方法 A 为 5% 香草醛-冰乙酸:高氯酸:冰乙酸(2:8:50),方法 B 为 5% 香草醛-冰乙酸:高氯酸:乙酸乙酯(2:8:50),方法 C 为高氯酸,方法 D 为浓硫酸-甲醇(7:3),方法 E 为香草醛-浓硫酸(2:58)。以吸光度为指标,通过单因素试验考察显色时间和显色温度。结果:方法 C 和 D 在 400~800 nm 处无最大吸收;方法 E 最大吸收波长 544 nm,但吸光度数值太小,不适合标准曲线测定;方法 A 和 B 均适合牛膝总皂苷含量的测定,最大吸收波长分别为(548±1),(554±1) nm,方法 A 峰型、加样回收率均优于方法 B。显色时间 15 min,显色温度 60℃。结论:方法 A 为牛膝总皂苷的最佳显色方法。

[关键词] 牛膝;总皂苷;显色剂;紫外-可见分光光度法;单因素试验

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0113-04

[doi] 10.11653/syjf2013210113

[收稿日期] 20130416(026)

[基金项目] 福建省科技计划重点项目(2012Y0049);华侨大学中央高校基本业务费“福建省杰出青年基金培育计划”专项(JB-SJ1012);泉州市科技计划项目(2011Z8);华侨大学科研基金项目(10HZR28)

[第一作者] 张小鸿,在读硕士,从事中药药理学研究,Tel/Fax:0595-22692300,E-mail:573736884@qq.com

[通讯作者] *徐先祥,博士,副研究员,从事中药药理学研究,Tel/Fax:0595-22692300,E-mail:xuxianxiang@163.com

3 讨论

本研究首次对河南产区的盾叶薯蓣质量进行系统研究,初步制定了质量标准,但盾叶薯蓣种植产地较多,由于时间有限,本研究仅仅采集了河南产地的盾叶薯蓣样品,研究结果不能对盾叶薯蓣药材做出系统、全面的质量评价,在今后的研究工作中,还要继续采集其他省份的盾叶薯蓣样品,以建立完善的盾叶薯蓣质量控制标准。

[参考文献]

[1] 王银红. 盾叶薯蓣化学成分研究[D]. 西安:西北大学,2009.

[2] 王胜勇,张勉,王峥涛. 白头翁同名异物类药材的数码显微鉴别[J]. 药学学报,2004,39(10):797.

[3] 姜艳艳,张勉,王峥涛. 菖蒲类药材的数码显微鉴定[J]. 中药材,2005,28(5):375.

[4] 李克明,陈玉武,张永文. 地奥心血康中薯蓣皂苷及伪原薯蓣皂苷的分离与鉴定[J]. 中国药房,2007,18

(30):2339.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:90.

[6] 王哲,赵丽茹,王永生,等. 金樱根质量标准的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):109.

[7] 谢彩侠,董诚明,高山林,等. 盾叶薯蓣四倍体株系生化指标及有效成分分析[J]. 中药材,2009,32(6):840.

[8] 腾井通,高翔,薛建平,等. 怀山药零余子薯蓣皂苷元成分的含量测定[J]. 安徽农业科学,2012(21):10817.

[9] 邹节明,周艳林,雷肖琳,等.《中国药典》菝葜中薯蓣皂苷元测定的前处理方法的改进[J]. 中成药,2008,3(1):154.

[10] 白雁,左春芳,谢彩侠,等. HPLC-ELSD 法测定盾叶薯蓣中伪原薯蓣皂苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(16):84.

[责任编辑 顾雪竹]

Effects of Different Chromogenic Agents on Determination of Content of Total Saponins From *Achyranthis Bidentatae Radix*

ZHANG Xiao-hong, WU Yang-zheng, XU Xian-xiang*

(School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

[Abstract] Objective: To investigate effects of different chromogenic agents on determining the content of total saponins from *Achyranthis Bidentatae Radix* by UV spectrophotometry. **Method:** Total saponins were determined by UV with five different chromogenic agents namely method A as 5% vanillin-glacial acetic acid: perchloric acid: glacial acetic acid (2:8:50), method B as 5% vanillin-glacial acetic acid: perchloric acid: ethyl acetate (2:8:50), method C as perchloric acid, method D as sulfuric acid: methanol (7:3), method E as vanillin-sulfuric acid (2:58). With absorbance as index, chromogenic time and temperature was investigated by single factor tests. **Result:** Method C and D had not the maximum absorption at 400-800 nm; The maximum absorption wavelength of method E was at 544 nm, but absorbance value was too small which was not suitable for determination of standard curve; The maximum absorption wavelengths of method A and B were at (548 ± 1), (554 ± 1) nm, respectively, these two methods were suitable for determination of total saponins from *Achyranthis Bidentatae Radix*, whereas peak pattern and sample recovery of method A were better than method B. **Conclusion:** Method A was optimal chromogenic method of total saponins from *Achyranthis Bidentatae Radix*.

[Key words] *Achyranthis Bidentatae Radix*; total saponins; chromogenic agents; UV spectrophotometry; single factor test

牛膝又名怀牛膝,具有补肝肾、强筋骨、逐瘀通经、引血下行等功效^[1]。齐墩果烷型三萜皂苷是牛膝保护血管内皮细胞^[2]、防治大鼠急性痛风性关节炎^[3]、改善骨质疏松大鼠骨代谢^[4]、抑制破骨细胞分化、防治骨质疏松^[5]等药理作用的活性成分。皂苷类成分极性大,同一药材中有结构相似、性质相近的皂苷类成分,不易分离测定,因此常采用比色测定总皂苷含量。但皂苷的显色方法可选择不同显色剂^[6],无统一标准。为明确测定牛膝总皂苷含量的显色方法,本实验比较了 5% 香草醛与冰乙酸混合液-高氯酸-冰乙酸(2:8:50)、5% 香草醛与冰乙酸混合液-高氯酸-乙酸乙酯(2:8:50)、高氯酸-浓硫酸-甲醇(7:3)、香草醛-浓硫酸(2:58)等显色剂,并通过单因素试验优选显色方法,以便加强牛膝皂苷类成分的质量控制。

1 材料

UV-2450 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),XS105DU 型 1/10 万电子天平(梅特勒-托利多公司)。牛膝饮片(购于泉州国大药房,产地河南,经华侨大学生物医学学院副教授徐先祥老师鉴定为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根),齐墩果酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号

110709),D101 型大孔吸附树脂(国药集团化学试剂有限公司),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 牛膝总皂苷的提取与纯化^[7-8] 取牛膝饮片,加 5 倍量 75% 乙醇回流提取 2 次,提取时间分别为 4,2 h,合并提取液,减压浓缩至无醇味得浸膏,浸膏加水溶解,分别用等量石油醚、正丁醇萃取,分别弃去石油醚相和水相,正丁醇相减压浓缩至无醇味,得棕黑色浸膏,以生药质量浓度 2 mg·L⁻¹上 D101 型大孔吸附树脂柱,分别用体积分数为 30%,40%,50%,60%,70% 的乙醇梯度洗脱,收集 50% 乙醇洗脱液,减压浓缩至无醇味,即得棕色牛膝总皂苷。

2.2 溶液的配制 精密称取齐墩果酸对照品 11.5 mg,置 5 mL 量瓶中,加甲醇使溶解并定容至刻度,精密吸取 1 mL 至 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得对照品溶液,备用。精密称取棕色牛膝总皂苷 10 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得供试品溶液,备用。

2.3 显色工艺考察 分别精密吸取对照品溶液,供试品溶液各 3 份,每份 300 μL,于 60 °C 水浴挥干,用 5 种不同方法显色,5 种显色方法均以随行试剂做空白对照。

2.3.1 方法 A^[6] 精密加入新配置的 5% 香草醛-冰乙酸 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL, 密塞, 摇匀, 置 60 °C 恒温水浴中加热 15 min, 取出放入冰水浴中冷却 10 min, 加冰乙酸 5 mL, 摇匀。

2.3.2 方法 B^[9] 在冰浴后加入乙酸乙酯 5 mL, 其余操作同方法 A。

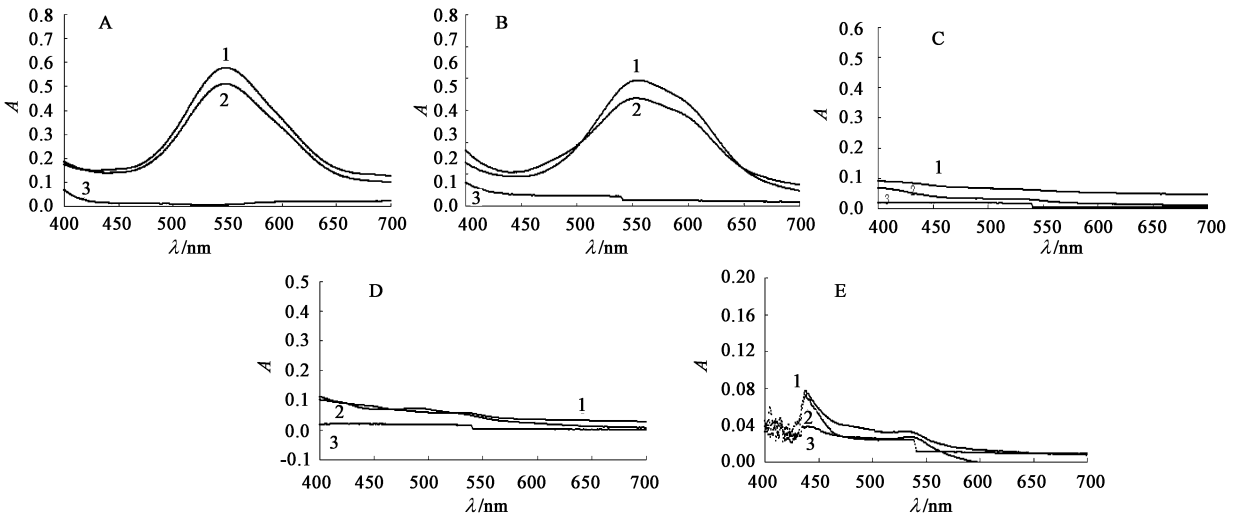
2.3.3 方法 C^[9] 精密加入高氯酸 5 mL, 密塞, 摇匀, 置 60 °C 恒温水浴中加热 15 min, 取出放入冰水浴中冷却 10 min。

2.3.4 方法 D^[10] 精密加入浓硫酸 4.2 mL 和甲醇 1.8 mL, 密塞, 摇匀, 置 60 °C 恒温水浴中加热 15 min, 取出放入冰水浴中冷却 10 min。

2.3.5 方法 E^[11] 精密加入 5% 香草醛-冰乙酸 0.2 mL 和浓硫酸 5.8 mL, 密塞, 摇匀, 置 60 °C 恒温水浴中加热 15 min, 取出放入冰水浴中冷却 10 min。

2.4 显色工艺优化

2.4.1 检测波长的选择 取对照品溶液和供试品溶液各 5 份, 依次按 2.3 项下各方法显色, 采用紫外-可见分光光度法在 400 ~ 800 nm 测定吸收度 (A), 见图 1, 结果表明采用方法 A 显色时, 对照品溶液和供试品溶液在 (548 ± 1) nm 处有最大吸收, 此处空白显色剂无最大吸收; 采用方法 B 显色时对照品溶液和供试品溶液在 (554 ± 1) nm 处有最大吸收, 此处空白显色剂无最大吸收; 采用方法 C, D 显色时, 在 400 ~ 800 nm 处无最大吸收; 采用方法 E 显色时, 在 438, 544 nm 处有最大吸收, 但 A 太小, 不适合标准曲线的测定, 空白显色剂在 437 nm 处亦有最大吸收, 且糖类在该方法中干扰较大; 故推测方法 C, D, E 不适合牛膝皂苷含量的测定, 选择方法 A, B 进行比较和优化。



A, B, C, D, E. 不同显色方法; 1. 齐墩果酸对照品; 2. 供试品; 3. 空白溶剂

图 1 牛膝不同方法显色后的吸收光谱

2.4.2 显色时间考察 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 5 份, 每份 300 μL, 挥干溶剂, 精密加入新配置的 5% 香草醛-冰乙酸 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL, 密塞, 摇匀, 置 60 °C 恒温水浴中加热 5, 10, 15, 20, 25 min, 取出放入冰水浴中冷却 10 min, 随行试剂作空白, 于 400 ~ 800 nm 测定 A。采用方法 B 同样操作。结果方法 A 在 (548 ± 1) nm 处加热不同时间的 A 分别为 0.444, 0.525, 0.576, 0.605, 0.771; 方法 B 在 (554 ± 1) nm 处测得 A 分别为 0.289, 0.344, 0.389, 0.403, 0.581; 表明 15 min 和 20 min 测得数据相差较小, 故显色时间选择 15 min。

2.4.3 显色温度考察 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 3 份, 每份 300 μL, 挥干溶剂, 精密

加入新配置的 5% 香草醛-冰乙酸 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL, 密塞, 摇匀, 分别置于 55, 60, 65 °C 恒温水浴中加热 15 min, 其余操作同 2.4.2 项。结果方法 A 测得 A 分别为 0.353, 0.568, 0.594; 采用方法 B 测得 A 分别为 0.203, 0.389, 0.403; 表明 60 和 65 °C 测得数据相差较小, 故显色温度选择 60 °C。

2.4.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL, 各 2 份, 分别置于 10 mL 量瓶中, 按 2.3 项下方法 A 和方法 B 分别显色, 于各自最大吸收波长处测定 A, 分别平行 3 份, 以 A 为纵坐标, 对照品质量浓度为横坐标, 结果方法 A, B 的回归方程分别为 $Y = 0.0543X - 0.0324$ ($R^2 = 0.9992$), $Y = 0.0356X - 0.0190$ ($R^2 = 0.9992$), 线性范围均为 23 ~ 115 μg。

2.4.5 精密度试验 精密吸取 6 份对照品溶液,每份 0.3 mL,分别按 2.3 项下方法 A 和 B 显色,于最大吸收波长处测定 A,结果 A 的 RSD 分别为 1.15%,1.2%,表明仪器精密度良好。

2.4.6 重复性试验 取同一批样品 6 份,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别按 2.3 项下方法 A 和 B 分别显色,结果 A 的 RSD 分别为 0.079%,0.12%。

2.4.7 稳定性试验 精密称取同一供试品溶液,分别于 0,15,30,45,60 min 按 2.3 项下方法 A 和 B 显色,于各自最大吸收波长处测定 A,结果发现 2 种显色方法在 30 min 内稳定。

2.4.8 加样回收率试验 精确称取已知含量的供试品溶液 6 份,每份 120 μ L,分别精密加入齐墩果酸对照品溶液 100 μ L,按 2.3 项下方法 A 和 B 分别显色,结果平均加样回收率分别为 98.15% (RSD 2.15%),97.51% (RSD 2.35%),表明方法 A 优于方法 B。

2.4.9 样品测定 取同一批样品 6 份,精密称定,分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下方法 A 和 B 分别显色,于各自最大吸收波长处测定 A,计算总皂苷质量分数分别为 52.45% (RSD 1.13%),51.54% (RSD 1.45%),表明 2 种方法测得的皂苷含量基本一致。

3 讨论

皂苷分子结构中无共轭双键,在紫外-可见光区无特征性吸收峰。利用浓硫酸、高氯酸、高氯酸-香草醛、浓硫酸-香草醛等显色手段使羧基脱水,增加双键结构,再经双键位移,双分子缩合等反应产生有色或有荧光物质的特征,在可见光范围产生特征性吸收峰^[9-10]。目前比色法测定牛膝总皂苷含量均未通过检测空白显色剂的吸收波谱来验证所选显色剂的专属性,故本试验参考文献报道的方法选择 5%

香草醛-冰乙酸:高氯酸:冰乙酸(2:8:50),5% 香草醛-冰乙酸:高氯酸:乙酸乙酯(2:8:50),高氯酸,浓硫酸-甲醇(7:3),香草醛-浓硫酸(2:58)5 种显色体系,依照对照品溶液、供试品溶液显色后特征性吸收峰的单一性和空白溶剂紫外吸收的干扰性,来全面比较牛膝总皂苷含量测定的不同显色方法。

[参考文献]

- [1] 修佳,张卫华,张振凌.牛膝的药理作用及临床应用研究概况[J].中国药房,2008,19(15):1192.
- [2] 杨研华,尹莲,朱晓勤,等.牛膝总皂苷的制备及其保护尿酸钠致血管内皮细胞损伤的作用[J].中医药信息,2010,27(2):15.
- [3] 陈光亮,吕红霞,王媛媛,等.萆薢牛膝总皂苷对尿酸钠诱导的大鼠急性痛风性关节炎的防治作用[J].中药药理与临床,2010,26(1):34.
- [4] 任心慈,徐先祥,许杜娟,等.牛膝总皂苷对维甲酸致骨质疏松大鼠骨代谢的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):128.
- [5] 于大永,吕晓超,史丽颖,等.牛膝中三萜皂苷抑制破骨细胞分化作用的研究[J].中国中医骨伤科杂志,2011,19(3):9.
- [6] 王瑞海,柏冬,刘丽梅.比色法测定大蒜提取物中大蒜总皂苷含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(14):53.
- [7] 张振凌,陈红,王一硕,等.正交设计法研究牛膝酒炙工艺[J].中成药,2010,32(2):247.
- [8] 徐先祥,孔树佳,何晓丽.大孔吸附树脂富集纯化牛膝总皂苷研究[J].中国药房,2006,17(5):396.
- [9] 邓雅婷,刘莉,刘美佑,等.不同显色剂对玉竹总皂苷含量测定的影响[J].药学服务与研究,2006,6(2):129.
- [10] 计红芳,张令文,杨铭铎,等.比色法测定柠檬蜡伞总皂苷含量的研究[J].农业机械,2012,55(21):116.

[责任编辑 仝燕]