

苦石莲中总二萜的含量测定

韩瑞亭^{1,2}, 万国盛¹, 孙博航¹, 霍晓灵¹, 高慧媛^{1*}

- (1. 沈阳药科大学, 教育部基于靶点的药物设计与研究重点实验室, 沈阳 110016;
2. 黑龙江农业经济职业学院 制药工程系, 黑龙江 牡丹江 157041)

[摘要] **目的:**建立苦石莲中总二萜的含量测定方法,优化总二萜的提取工艺,并进行含量测定。**方法:**采用可见分光光度法,以5%香草醛/冰乙酸-高氯酸为显色剂,化合物 caesalpinins K 为对照品,在530 nm处测定其吸光度值,利用回归方程计算苦石莲中总二萜含量。**结果:**Caesalpinins K 对照品溶液质量浓度在2.0~6.1 mg·L⁻¹,线性关系良好, $r=0.9995$ ($n=5$),平均回收率为101.8% (RSD 2.3%)。**结论:**该方法简便、准确、重复性好,可以为苦石莲的质量控制提供依据。

[关键词] 苦石莲; 二萜; 可见分光光度法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0084-03

Determination of Total Diterpenes of *Caesalpinia minax*

HAN Rui-ting^{1,2}, WAN Guo-sheng¹, SUN Bo-hang¹, HUO Xiao-ling¹, GAO Hui-yuan^{1*}

- (1. Key Laboratory of Structure-Based Drug Design & Discovery, Ministry of Education, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;
2. Heilongjiang Agricultural Economy Vocational College, Mudanjiang 157041, China)

[Abstract] **Objective:** To establish quantitative methods of total diterpene in *Caesalpinia minax* and optimization of extraction process. **Method:** The content of total diterpene was determined at 530 nm by vis-spectrophotometry using caesalpinins K as standard and using the color reaction with 5% vanillina-glacial acetic acid and perchloric acid. **Result:** Linear relationship of caesalpinins K reference solution was good in the range of 2.0-6.1 mg·L⁻¹ ($r=0.9995$), the average recovery was 101.8% (RSD 2.3%). **Conclusion:** The present methods are simple, accurate with good reproducibility, and could be used to control the quality of *Caesalpinia minax*.

[Key words] *Caesalpinia minax*; diterpene; vis-spectrophotometry; quantitative determination

苦石莲为豆科云实属植物喙荚云实的种子,性凉、味苦,有清热解毒、化湿、散瘀止痛功效,主治风热感冒、痢疾、淋浊、痈肿、跌打损伤等^[1]。化学及药理研究表明其中所含的二萜类化合物为具有抗肿瘤、抗病毒等多种生物活性,是其发挥药效的重要物

质基础^[2]。本文前期对苦石莲的化学成分做了大量的研究,发现其种仁富含卡萨烷型二萜,结构多具有呋喃环或呋喃内酯结构,并表现出显著的生物活性^[3-6]。为对苦石莲种仁中的二萜成分进行深入探讨,本文采用紫外-可见分光光度法对总二萜的提取工艺以及含量测定方法进行了研究,确立了简便、可行的含量测定方法,旨在为苦石莲质量的综合评价及质量标准研究提供依据。

1 材料

苦石莲(购自安国市昌达中药材饮片有限公司)经沈阳药科大学路金才教授鉴定为豆科云实属 *Caesalpinia* 植物喙荚云实 *Caesalpinia minax* Hance 的干燥种子;caesalpinins K 对照品(本研究室自制,经 NMR, HPLC 测定,纯度 > 98%);其余试剂(分析纯,市售)。

[收稿日期] 20120903(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274189);辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划项目(LJQ2011103)

[第一作者] 韩瑞亭, 硕士研究生, E-mail: 7171713_cn@sina.com

[通讯作者] *高慧媛, 博士, 副教授, 从事中药、天然药物活性成分研究, Tel: 024-23986482, E-mail: gaohuiyuan1997@yahoo.com.cn

UV-1700 型紫外分光光度计(日本岛津公司), AB135-S 型电子天平(上海梅特勒—托利多仪器有限公司), FW177 型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司), KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称定经五氧化二磷减压真空干燥 24 h 的 caesalpinins K 对照品 6.20 mg 置 50 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得 124 mg·L⁻¹ 的 caesalpinins K 对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取本品的干燥粉末(粉碎过 60 目筛)约 0.5 g, 置索氏提取器中石油醚脱脂 4 h, 挥干石油醚, 干燥至恒重, 置 50 mL 具塞三角瓶中, 精密加入乙酸乙酯 25.0 mL, 称重, 25 °C 下 100 Hz 超声提取 40 min, 补足失重, 滤过, 残渣再加乙酸乙酯 25.0 mL, 称重, 25 °C 下 100 Hz 超声提取 40 min, 补足失重, 滤过, 合并 2 次滤液, 混匀, 精密量取续滤液 2.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.3 测定波长的选择 取上述对照品溶液 0.2 mL 供试品溶液 2 mL, 分别置于 10 mL 具塞磨口试管中水浴挥干溶剂; 各加新鲜配制的 5% 香草醛-冰乙酸溶液 0.2 mL、高氯酸 0.8 mL, 摇匀, 闭塞, 80 °C 水浴中加热 20 min; 取出, 流水冷却, 分别加冰乙酸 5.0 mL, 摇匀, 30 min 后用分光光度计于 400 ~ 800 nm 处进行光谱扫描, 以不加对照品的随行试剂为空白。结果表明, caesalpinins K 对照品溶液和供试品溶液均在 530 nm 波长处有最大吸收, 故选取 530 nm 为测定波长。

2.4 测定方法 精密量取上述供试品溶液 2.0 mL 置 10 mL 具塞磨口试管中水浴挥干溶剂; 加新鲜配制的 5% 香草醛-冰乙酸溶液 0.2 mL、高氯酸 0.8 mL, 摇匀, 闭塞, 80 °C 水浴中加热 20 min; 取出, 流水冷却, 加冰乙酸 5.0 mL, 摇匀, 静置 30 min 后用分光光度计在 530 nm 波长处测定吸光度, 以 caesalpinins K 为对照品, 按回归方程计算总二萜的含量。

2.5 标准曲线的绘制 精密量取 2.1 项下对照品溶液 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 mL, 分别置于 10 mL 具塞试管中, 水浴挥尽溶剂, 按 2.4 项下的方法显色并测定吸光度, 以 caesalpinins K 浓度(ρ , mg·L⁻¹)为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标绘制标准曲线, 算得回归方程为: $Y = 0.108X + 0.053$ ($r = 0.9995$), 表明质量浓度在 2.0 ~ 6.1 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.6 提取方法的选择 称取干燥的苦石莲种仁粉末(粉碎过 60 目筛)约 0.5 g, 精密称定, 经石油醚脱脂后, 分别按下述 3 种方法提取: ①加热回流提取法: 加乙酸乙酯 25 mL, 称重, 95 °C 水浴加热回流提取 2 h; ②超声提取法: 加乙酸乙酯 25 mL, 称重, 25 °C 下 100 Hz 超声提取 1 h; ③索氏提取法: 加乙酸乙酯 25 mL, 称重, 用索氏提取器于 95 °C 水浴回流提取 2 h(每小时抽提次数不少于 4 次)。

分别补足失重, 滤过, 按 2.4 项下的方法测定吸光度, 计算含量, 结果加热回流法提取测得总二萜含量与超声提取法相当, 索氏提取法效率最低, 经综合考虑选择较为简便的超声提取法。

2.7 正交试验法优化总二萜的超声提取工艺 本实验选取提取次数(次)、乙酸乙酯体积(mL)、提取时间(min)作为考察因素, 每个因素各取 3 个水平, 见表 1。应用 L₉(3⁴) 正交表安排试验, 实验数据见表 2。通过正交试验和数据处理发现, 影响苦石莲总二萜提取率的因素主次顺序为 A > B > C, 综合考虑最终确定条件为 A₂B₂C₃ 即乙酸乙酯体积为 25 mL, 25 °C 下 100 Hz 超声提取 2 次, 每次 40 min。

表 1 提取的因素和水平

水平	因素		
	A/times	B/mL	C/min
1	1	10	20
2	2	25	30
3	3	40	40

表 2 苦石莲中总二萜提取率正交试验

No.	A	B	C	空列	含量/%
1	1	1	1	1	0.481
2	1	2	2	2	0.546
3	1	3	3	3	0.526
4	2	1	2	3	0.576
5	2	2	3	1	0.599
6	2	3	1	2	0.598
7	3	1	3	2	0.577
8	3	2	1	3	0.600
9	3	3	2	1	0.580
K ₁	0.518	0.545	0.560		
K ₂	0.591	0.581	0.567		
K ₃	0.586	0.568	0.567		
R	0.073	0.037	0.007		

2.8 重复性试验 取同一批号的样品 6 份, 按 2.4 项下的方法测定并计算总二萜的平均含量为 0.57%, RSD 2.6%, 表明该方法重复性良好。

2.9 稳定性试验 取同一供试品溶液,按2.4项下的方法,分别于5,10,20,30,40,50,70,90 min测定吸光度,结果30 min内吸光度变化幅度较大,30 min至90 min吸光度变化幅度较小,RSD 1.8%,表明供试品溶液经显色后在30 min至90 min内稳定性良好,故宜在显色30 min后测定吸光度。

2.10 加样回收率试验 精密称定已知含量的样品粉末(过60目筛)约0.25 g,共6份,分别精密加入caesalpinins K对照品约1.5 mg,按2.2项下的方法制备加样回收率供试品溶液,依法测定,结果见表3。

表3 总二萜的加样回收率

称样量 /g	样品中 含量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
0.250 3	1.43	1.52	2.98	102.28		
0.250 7	1.43	1.50	2.93	100.10		
0.251 1	1.43	1.48	2.97	103.88		
0.250 2	1.43	1.51	2.91	97.95	101.8	2.3
0.251 8	1.44	1.47	2.94	102.59		
0.250 9	1.43	1.52	3.01	104.15		

2.11 样品含量测定 分别精密称取3个不同批次的苦石莲样品粉末各3份,每份约0.5 g,制备成供试品溶液,按2.4项下的方法测定,用回归方程计算苦石莲中总二萜的平均含量为0.57%,RSD 1.25%。

3 讨论与结论

目前尚无文献报道苦石莲中总二萜的含量测定方法,苦石莲中已鉴定结构的二萜类化合物多数为呋喃二萜类化合物^[2],该类化合物与三萜类化合物合成途径相似,同时也具有与香草醛/冰乙酸-高氯酸显色剂显色的相关基团,故参考三萜类化合物的显色方法进行显色和测定,经试验供试品和caesalpinins K对照品依法显色后均在530 nm处有最大吸收,基于此并参考相关文献^[7-10]本实验建立了苦石莲中总二萜的含量测定方法,并进行了方法

学考察。实验中先用石油醚脱脂再用溶剂提取后制成供试品溶液,可以基本消除脂溶性成分的干扰。

通过对提取方法进行考察,表明超声提取和热回流提取效率相近,考虑到热回流法比较费时,且提取得出总二萜量并不明显高于超声提取法,故选择相对简便、易行的超声提取法。另外,通过正交试验对超声提取工艺进行了优化,综合考虑,得出超声提取的最佳工艺为A₂B₂C₃组合,即乙酸乙酯体积为25 mL,25℃下100 Hz提取2次,每次提取时间为40 min。

[参考文献]

[1] 国家中医药管理局. 中华本草(第四分册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1998:374.

[2] 黄明培,陈燕丹,魏道智. 苦石莲化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国现代中药,2010,12(1):11.

[3] 张晓书,韩瑞亭,高慧媛,等. 苦石莲化学成分的分离与鉴定(IV)[J]. 沈阳药科大学学报. 2012,29(2):98.

[4] Wu Zhao-Hua, Huang Jian, Li Wei-Dong, et al. Three new cassane diterpenes from the seeds of *Caesalpinia minax* Hance[J]. J Asian Nat Prod Res,2010, 12(9): 781.

[5] 吴兆华,王立波,高慧媛,等. 喙萼云实中的一个新二萜类化合物[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(10):1145.

[6] 吴兆华,王立波,高慧媛,等. 喙萼云实种子中的新二萜[J]. 沈阳药科大学学报,2008, 25(12):964.

[7] 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.

[8] 李光勋,王力华,陈伟. 分光光度法测定文冠果壳总皂苷含量研究[J]. 安徽农业科学,2008, 36(8):3071.

[9] 张素军. 蒺藜果实、茎叶不同采收期总皂苷含量分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(13):80.

[10] 陈玉俊,许美娟,顾维. 不同产地香茶菜地下部分总二萜含量测定[J]. 时珍国医国药,2000,11(4):294.

[责任编辑 顾雪竹]