

东北山梅花根总皂苷的含量测定及镇痛活性研究

刘冬梅¹, 盛继文^{1*}, 韩慧蓉¹, 李少霞¹, 吴学²

(1. 潍坊医学院, 山东 潍坊 261053; 2. 延边大学理工学院, 吉林 延吉 133002)

[摘要] 目的: 测定东北山梅花根总皂苷的含量, 并初步研究总皂苷镇痛活性。方法: 以人参皂苷 Rb₁ 为标准品, 采用分光光度法测定东北山梅花根总皂苷含量。采用醋酸致小鼠扭体法, 研究东北山梅花根总皂苷镇痛活性。结果: 东北山梅花根总皂苷含量为 1.54%; 回归方程 $Y=1.8914 X-0.0039$, $r=0.9989$; 平均加样回收率为 97.17% ($n=5$), RSD 为 1.78%。东北山梅花根总皂苷能显著降低醋酸致小鼠扭体次数 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论: 东北山梅花根总皂苷具有显著的镇痛活性, 值得深入研究。

[关键词] 东北山梅花; 虎耳草科; 山梅花属; 分光光度法; 总皂苷; 镇痛活性

[中图分类号] R284.1, R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)04-0030-03

东北山梅花属于虎耳草科山梅花属植物, 具有解热、镇痛等作用, 用于治疗疟疾、痔疮、挫伤、腰肋疼痛、胃痛、头痛等病症^[1], 是民间广为应用的一种中草药。

研究表明东北山梅花根含有豆甾醇^[1]、7-羟基-

8-甲氧基香豆素、3-甲氧基-4-羟基苯甲醛^[2]及皂苷等化学成分。定性研究表明东北山梅花根总皂苷主要为三萜皂苷。本实验以人参皂苷 Rb₁ 为对照品, 采用分光光度法测定东北山梅花根总皂苷的含量, 采用醋酸致小鼠扭体法, 对其总皂苷的镇痛活性进行初步研究。

1 材料

1.1 试药 东北山梅花根采自吉林省抚松县, 由延边大学农学院张君仪高级农艺师鉴定为虎耳草科植

[收稿日期] 2009-08-18

[通讯作者] * 盛继文, Tel: (0536) 8468065; E-mail: sjwchy@wfmc.edu.cn

表 3 AS-I, AS- 加样回收率实验 ($n=5$)

ASI				AS			
样品中皂苷含量 /mg	加入皂苷对照品量 /mg	实测值 /mg	回收率 /%	样品中皂苷含量 /mg	加入皂苷对照品量 /mg	实测值 /mg	回收率 /%
0.1203	0.0625	0.1817	98.24	0.1609	0.0625	0.2230	99.36
0.1210	0.0625	0.1818	97.28	0.1619	0.0625	0.2248	100.64
0.1205	0.0625	0.1843	102.1	0.1611	0.0625	0.2234	99.68
0.1211	0.0625	0.1822	97.8	0.1603	0.0625	0.2225	99.52
0.1201	0.0625	0.1816	98.4	0.1600	0.0625	0.2218	98.88
平均 98.76% RSD=1.94%				平均 99.62% RSD=0.57%			

不同比例的展开剂三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2、12:8:2), 三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-水(13:7:2:2、12:8:2:2、11:9:2:2、6:3:1:1等), 结果表明采用经 NaH₂PO₄ 处理的高效 G 板, 以三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-水(6:3:1:1) 的下层溶液作展开剂效果较好。展开剂中加入乙酸乙酯, 可使背景颜色更浅, 斑点显色更清晰, 避免了其它成分的干扰。适当延长展距, 可使 Rf 值适中, 分离度较好。

黄芪皂苷的含量测定曾尝试采用高效液相-紫外检测器检测, 但由于黄芪皂苷在紫外区仅有微弱的吸收, 溶剂噪音对结果有较大影响, 测定误差大, 所以放弃了此法。采用示差检测器检测, 取得了较好的结果。色谱条件中比较了不同比例的流动相, 结果以乙腈-水(34:66) 效果较好, 可以在不影响分离度的前提下缩短出峰时间, 溶剂峰干扰小。

薄层色谱图上其它的皂苷组分有待鉴别。从 HPLC 图上也检测到了其它未知成分。分离的未知化合物将在以后的研究中作进一步鉴别及药理作用研究。

[参考文献]

- [1] 杨云, 张晶, 陈玉婷. 天然药物化学成分提取分离手册 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 669.
- [2] 潘细贵, 汪洋, 雷湘, 等. 大孔吸附树脂纯化黄芪总皂苷的提取工艺研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25 (11): 1029.

物东北山梅花 *Philadelphus schrenkii* Rupr.; 人参皂苷 Rb_1 (购自中国药品生物制品检定所, 批号: 1107042-200419); 阿司匹林肠溶片 (山西云鹏制药有限公司, 批号: 070402); 实验试剂均为国产分析纯; 薄层层析硅胶 GF254、柱层析硅胶 100 ~200 目 (购自青岛海洋化工厂)。

1.2 仪器 超声波清洗器 (KQ-250B 型); 旋转蒸发器 (RE-52 型, 上海亚荣生化仪器厂); UV-3010 型紫外可见分光光度计 (日本岛津)。

1.3 动物 昆明种小鼠 (购自潍坊医学院动物实验中心), 雌雄各半, 体重 (20 ±2) g, 标准恒温横湿条件下饲养。

1.4 数据处理 数据用 SPSS13.0 软件进行处理。

2 实验方法与结果

2.1 供试液制备 标准品溶液: 精密称取干燥至恒重的人参皂苷标准品 0.01 g 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇 6 mL 溶解完全并定容至刻度, 摇匀, 得浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准品溶液。

样品溶液: 精密称取东北山梅花根干燥粉末 3 份, 各 2 g, 分别加入 95% 乙醇, 加热回流提取 3 次, 每次 6 h, 过滤, 合并滤液, 减压浓缩, 得淡黄色固体膏状物。将固体膏状物用蒸馏水超声溶解, 依次用石油醚、乙醚、正丁醇萃取。将正丁醇萃取物减压浓缩, 分别加入甲醇溶解, 在硅胶柱层析色谱上精制, 薄层色谱跟踪检测。石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱 (1:10 ~1:1), 至无流份, 改用 80% 乙醇洗脱。合并醋酐-硫酸反应呈阳性的组分, 减压浓缩至干, 得东北山梅花根总皂苷。分别以甲醇溶解并定容至 10 mL, 密封备用。

样品溶液: 取东北山梅花根干燥粉末 3 kg, 按样品溶液方法处理, 得总皂苷。取总皂苷 1.0, 2.5, 3.0 g, 分别用蒸馏水超声溶解并定容至 250 mL, 备用。另取总皂苷 0.5 g, 为样品, 放置备用。

2.2 总皂苷鉴别

2.2.1 泡沫实验 取少量样品放入试管中, 加入 10 mL 水, 放入沸水浴中加热 10 min 后取出, 振摇, 产生大量泡沫, 25 min 未见消失。

2.2.2 酸碱实验 皂苷水溶液振摇后产生的持久性泡沫, 与 pH 有关^[3], 利用此性质鉴定东北山梅花根总皂苷的类型: 取两支试管, 一管加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液 5 mL, 另一管加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液 5 mL, 再各加入少量样品, 使酸管 pH 为 1, 碱

管 pH 为 13, 强烈振摇, 结果两管所形成的泡沫高度相同。

2.2.3 醋酐-硫酸反应 取少量样品放入试管中, 加入醋酐-浓硫酸试剂, 试管中先呈现橘黄色, 最后变为紫色。

2.2.4 甾体皂苷检查 取少量样品, 甲醇溶解, 在紫外可见分光光度计上扫描, 波长范围 265 ~280 nm。结果在 265 ~280 nm 波长范围内无吸收峰, 表明东北山梅花根总皂苷中无甾体皂苷。

上述实验结果表明东北山梅花根中含有皂苷, 皂苷类型为三萜皂苷。

2.3 总皂苷含量测定

2.3.1 测定波长选择 吸取人参皂苷 Rb_1 标准品和样品溶液各 0.02 mL, 分别置 10 mL 比色管中, 挥干溶剂, 各加入新鲜配制的 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL, 高氯酸 0.8 mL, 加盖, 摇匀, 于 60 °C 水浴中加热 15 min, 取出, 冰水中放置 5 min, 室温放置 10 min, 然后加入冰醋酸 5 mL, 摇匀, 室温静置 30 min, 在 400 ~600 nm 波长下扫描, 结果显示人参皂苷 Rb_1 和样品溶液在 548 nm 波长处均有最大吸收, 空白样品溶液在此波长处无吸收, 因此选择 548 nm 波长作为测定波长。

2.3.2 标准曲线制作 吸取人参皂苷 Rb_1 溶液 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12 mL, 分别置 10 mL 比色管中, 按样品含量测定项下方法测定吸光度, 以溶剂为空白, 548 nm 波长处测定吸光度值。以吸光度为纵坐标, 人参皂苷 Rb_1 含量 (mg) 为横坐标, 绘制标准曲线。得回归方程: $Y=1.8914 X-0.0039$, $r=0.9989$ 。结果表明皂苷测定量在 0.02 ~0.12 mg (浓度为 $3 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 与吸光度之间线性关系良好。

2.3.3 稳定性试验 准确吸取样品液 1 mL, 按样品含量测定项下方法于 548 nm 波长每隔 5 min 测定吸光度。结果表明样品液在 45 min 内吸光度没有明显变化, 因此在 45 min 内完成测定稳定性良好。

2.3.4 回收率试验 精密称取已知含量的东北山梅花根干燥粉末 5 份, 各加入人参皂苷标准品溶液 0.02 mL, 处理方法同样品溶液, 按样品含量测定项下方法测定吸光度值, 计算回收率。见表 1。结果表明在提取、精制过程中东北山梅花根总皂苷没有较大损失, 提取方法可行, 测定结果可靠。

表 1 加样回收率试验结果

原样品 皂苷量 /mg	加入标 准品量 /mg	实测 皂苷量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
0.031 6	0.02	0.050 6	98.06		
0.041 2	0.02	0.061 0	99.67		
0.034 5	0.02	0.051 9	95.23	97.17	1.78
0.036 6	0.02	0.054 7	96.64		
0.035 8	0.02	0.053 7	96.24		

2.3.5 样品含量测定 准确吸取样品溶液 各 0.01 mL, 分别置 10 mL 比色管中, 挥干溶剂, 各加入新鲜配制的 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL, 高氯酸 0.8 mL, 加盖, 摇匀, 于 60 °C 水浴中加热 15 min, 取出, 冰水中放置 5 min, 室温放置 10 min, 然后加入冰醋酸 5 mL, 摇匀, 室温静置 10 min, 548 nm 波长处比色, 测定样品吸光度值, 根据回归方程求总皂苷的质量分数。由回归方程得 3 份样品总皂苷质量分数分别为 1.51%, 1.56%, 1.54%, 平均质量分数 1.54%, RSD 为 1.63% ($n=3$)。结果表明该方法重复性良好。

2.3.6 精密度试验 取 6 份人参皂苷标准品溶液各 0.02 mL, 按上述方法分别测定吸光度值, 计算 RSD 为 1.07% ($n=6$)。表明本方法精密度良好。

2.3.7 重复性试验 精密称取东北山梅花根干燥粉末 5 份, 各 2 g, 处理方法同样品溶液, 按样品含量测定项下方法测定吸光度值, 得 RSD 为 1.12% ($n=5$)。实验结果表明本方法的重复性满足要求。

2.4 小鼠醋酸扭体试验 选取昆明种小鼠雌雄各 25 只, 随机分成 5 组, 每组 10 只。分别按表 2 剂量 ig 样品溶液, 对照组 ig 等量 0.9% 生理盐水, 1 次/d, 连续 3 d, 末次药后 1 h 每只小鼠 ip 新鲜配制 0.7% 醋酸溶液 0.2 mL。观察并记录注射醋酸 2 ~ 3 min 至 15 min 内扭体次数, 利用 SPSS13.0 软件进行数据处理, 作组间配对 t 检验(见表 2)。

表 2 东北山梅花根总皂苷镇痛试验结果($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量 /g · kg ⁻¹	扭体次数 /次	镇痛率 /%
对照	—	36.20 ± 4.16	—
阿司匹林	0.08	13.70 ± 2.21 ²⁾	62.15
山梅花根总皂苷	0.02	24.56 ± 3.13 ²⁾	32.15
	0.05	21.29 ± 3.54 ²⁾	41.19
	0.06	15.18 ± 1.27 ²⁾	58.07

注: 对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

由表 2 可知, 东北山梅花根总皂苷在高、中、低 3 个剂量下均有显著的镇痛活性, 呈剂量依赖关系; 高剂量组与阿斯匹林组作用强度相似。

3 结论

本实验通过分光光度法测定了东北山梅花根总皂苷的质量分数为 1.54%, 含量较高; 通过定性实验确定了东北山梅花根总皂苷的主要类型, 为三萜皂苷。同时对其镇痛活性进行了初步研究。镇痛实验表明东北山梅花根总皂苷具有显著的镇痛活性, 能降低醋酸致小鼠扭体次数 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

三萜皂苷是一类重要的活性物质, 具有降血脂、抗菌、抗炎、抗氧化、抗癌及提高机体免疫力等多种作用^[4]。在自然界的分布比甾体皂苷广泛, 种类也较多, 如人参皂苷、甘草皂苷、远志皂苷、柴胡皂苷等, 在临床均有广泛的应用。东北山梅花根含有三萜皂苷, 含量较高, 具有重要的药用价值和广阔的应用前景, 值得深入研究。本实验结果为东北山梅花根的进一步研究、活性成分的分离、山梅花属植物的开发提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] 盛继文, 刘冬梅, 李翠花, 等. 东北山梅花根化学成分的研究[J]. 齐鲁药事, 2007, 26 (6): 365.
- [2] 张庆镐, 韩荣弼, 刘冬梅, 等. 东北山梅花根化学成分的研究[J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34 (11): 1616.
- [3] 北京医学院, 北京中医学院. 中草药成分化学[M]. 北京: 人民卫生出版, 1985: 444.
- [4] 鲁科明, 袁丁, 张长城. 皂苷抗炎活性研究进展[J]. 时珍国医国药, 2008, 19 (7): 1658.