

苗药黑骨藤中总皂苷含量的测定

申海艳^{1,2}, 龚小见^{1,2}, 李文敏^{1,2}, 赵杨^{1,2}, 赵超^{1,2}, 周欣^{1,2*}

- (1. 贵州师范大学 天然药物质量控制研究中心, 贵阳 550001;
2. 贵州师范大学 贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵阳 550001)

[摘要] 目的:建立苗药黑骨藤中总皂苷含量测定的方法,并对不同来源药材中总皂苷的含量进行测定。方法:以熊果酸为对照,用 5% 的香草醛-冰醋酸及高氯酸进行显色,在 550 nm 波长下运用紫外分光光度法对总皂苷含量进行测定。结果:熊果酸在 9~55 mg·L⁻¹ 线性关系良好,回归方程 $Y = 0.0119X + 0.0972$ ($r = 0.9992$),方法的平均回收率为 98.74%,RSD 1.2%;不同来源黑骨藤中总皂苷的含量存在差异。结论:该方法快速、简便,精密度和稳定性良好,可用于黑骨藤中总皂苷含量的测定。

[关键词] 黑骨藤;紫外分光光度法;总皂苷;熊果酸

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)11-0094-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120327.2700.004 [网络出版时间] 2012-03-27 14:41

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120327.1441.004.html>

Determination of Total Saponins in *Periploca forrestii*

SHEN Hai-yan^{1,2}, GONG Xiao-jian^{1,2}, LI Wen-min^{1,2}, ZHAO Yang^{1,2}, ZHAO Chao^{1,2}, ZHOU Xin^{1,2*}

- (1. The Research Center for Quality Control of Natural Medicine, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 2. Key Laboratory for Information System of Mountainous Areas and Protection of Ecological Environment, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

[Abstract] Objective: The quantitative method was established of total saponins in *Periploca forrestii* and the content of the general saponins of *Periploca forrestii* from different places was determined. Method: Ursolic acid was selected as control article. Coloration was used with 5% vanillin and perchloric acid. The content of total saponins in *P. forrestii* was determined at 550 nm by UV. Result: The calibration curve was linear over the range of 9-55 mg·L⁻¹ with the correlation of 0.9992, and the linear regression equation was $A = 0.0119C + 0.0972$. The average recovery of ursolic acid was 97.16% with RSD of 1.3% ($n = 6$). The contents of the total saponins in *P. forrestii* from various habitats was quite different. Conclusion: The method is accurate, simple, sensitive and reliable. So it can be used to determine the content of total saponins in *P. forrestii*.

[Key words] *Periploca forrestii*; UV; total saponins; ursolic acid

黑骨藤为萝藦科杠柳属植物黑龙骨的干燥根或全株,全株入药,具有通经、活血、解毒、祛风的功效,主治风湿关节痛、跌打损伤、月经不调等症,是民间

广泛应用于治疗闭合性软组织损伤、风湿与类风湿等疾病的民族药。主要分布于我国西南、青海及西藏等地^[1]。近年来,有文献表明,黑骨藤能通过调

[收稿日期] 20111103(003)

[基金项目] 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目(黔科合社字[2009]5012号);贵州省科技创新人才团队建设项目(黔科合人才团队[2011]4008);贵阳市科学技术计划项目([2010]筑科计合同字第3-重-1号);贵阳市科技计划项目([2009]筑科农合同字第8-003号);贵州省中药材现代产业技术体系建设专项(GZCYTX-02);贵州省平台建设项目(黔科ZY[2011]3013号);贵阳市大学生科技创业计划项目([2011]08号)

[第一作者] 申海艳,在读硕士研究生,从事天然产物纯化与分析

[通讯作者] *周欣,博士,教授,从事中药、民族药质量控制,中药指纹图谱以及中药新药研发,E-mail: alice9800@sina.com

节机体免疫器官的功能,降低促炎细胞因子的产生,从而减轻 AA 大鼠足肿胀炎症反应来发挥抗类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的作用^[2];也有文献表明,黑骨藤乙酸乙酯部位对白血病 K562 有明显的抑制作用^[3]。

黑骨藤中主要含有强心苷类、C₂₁甾类、黄酮类和三萜皂苷类等成分,熊果酸(ursolic acid)就是其中之一,且含量很高^[4]。三萜皂苷类广泛地存在于自然界,具有广泛的生物活性,如抗炎、抗肿瘤、抗菌和抗病毒,以及降低胆固醇、降血糖、调节免疫、杀软体动物活性等^[5]。黑骨藤药材是 2003 年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》收载的药材^[6],但在该标准中仅有黑骨藤的性状、显微以及部分理化鉴别试验,缺乏控制黑骨藤质量的有效方法。目前国内对黑骨藤质量控制方面研究也较少,本试验首次以熊果酸为对照,运用紫外分光光度法,对该药材中总皂苷含量进行了测定,为其质量控制以及进一步开发利用提供了理论依据。

1 仪器与试药

Varian Cary 100 Bio UV-VIS 型分光光度计,1/10 万天平(梅特勒 托利多),KQ-250B 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。熊果酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110742-20051),11 批不同来源黑骨藤药材经贵州师范大学天然药物质量控制研究中心陈华国副研究员鉴定为黑骨藤 *Periploca forrestii* Schltr,所用试剂为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取熊果酸对照品适量,用甲醇溶解配置成质量浓度为 $0.55 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取该药材粗粉 2.0 g,置具塞锥形瓶中,加 40 mL 70% 乙醇,80 ℃ 水浴中回流提取 2 次,每次 1.5 h,滤过,合并滤液,将滤液减压浓缩至干,加 25 mL 水溶解,分别用 25 mL 石油醚萃取 3 次,弃去石油醚液,水层继续用水饱和的正丁醇萃取 3 次,每次 25 mL,合并正丁醇液,水浴挥干溶剂,用甲醇定容至 10 mL 量瓶中,作为供试品溶液。

2.3 测定方法及测定波长的选择 精密吸取适量对照品溶液和供试品溶液于具塞试管中,水浴挥干溶剂,分别加入 0.2 mL 5% 香草醛-冰醋酸溶液和 0.8 mL 70% 的高氯酸溶液,60 ℃ 水浴中加热 15 min,取出后立即用冰水冷却 5 min,再加入 5 mL

冰醋酸,摇匀。以甲醇同法制备空白参比。在 400 ~ 800 nm 波长进行扫描,选取最大吸收波长为 550 nm。对照品与供试品的扫描图谱见图 1。

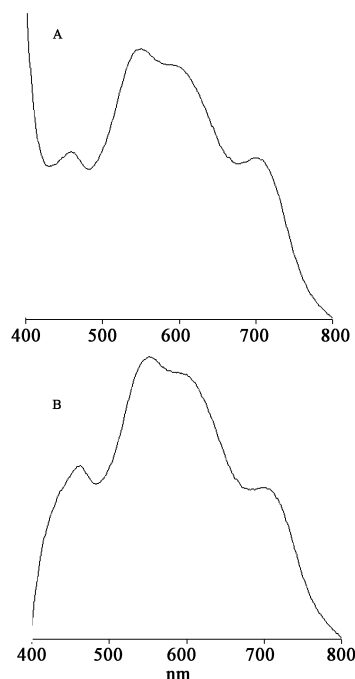


图1 熊果酸对照品(A)和供试品(B)溶液的吸收

2.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mL 于具塞试管中,按 2.3 项下自“水浴挥干溶剂”起依法操作,以试剂空白为参比,在 550 nm 波长下测定吸光度,以吸光度(Y)为纵坐标、浓度(X)为横坐标,进行线性回归,回归方程为 $Y = 0.0119X + 0.0972$ ($r = 0.9992$),结果表明熊果酸质量浓度在 $9 \sim 55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.5 稳定性试验 分别取对照品溶液和供试品溶液适量,按 2.3 项下方法操作,在 30 min 内从起始时间开始,每隔 5 min 测定一次吸光度。熊果酸对照品吸光度的 RSD 0.6%。供试品溶液吸光度的 RSD 0.9%。说明对照品溶液和供试品溶液显色后的吸光度在 30 min 内基本稳定。

2.6 精密度试验 精密吸取对照品和供试品溶液适量,按 2.3 项下方法显色,在 30 min 内测定吸光度。结果表明,熊果酸对照品溶液吸光度 RSD 为 0.6%;供试品溶液吸光度 RSD 为 0.8%,说明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一批次药材 6 份,按 2.2 项下方法操作制备供试品溶液,按 2.3 项下方法显色在 550 nm 波长处测其吸光度,结果总皂苷含量 RSD 1.4%。

2.8 回收率试验 精密称取已知总皂苷含量的样品 6 份,分别加入等量熊果酸对照品适量,按以上供试品溶液制备方法和显色方法操作,在 550 nm 处测定吸光度,并计算回收率(表 1)。

表 1 熊果酸的加样回收率试验($n=6$)

No.	称样量 /g	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	1.002	22.934	21	43.926	99.96	98.74	1.2
2	1.002	22.953	21	43.472	97.71		
3	1.002	22.939	21	43.676	98.75		
4	1.004	22.994	21	43.540	97.84		
5	1.001	22.927	21	43.858	99.67		
6	1.002	22.939	21	44.289	96.90		

2.9 药材提取条件的考察 以溶剂用量(A)、溶剂浓度(B)、提取时间(C)以及提取次数(D)为考察因素,每个因素取 3 个水平,以总皂苷含量为考察指标,设计了正交试验,见表 2,3。

表 2 正交试验的因素与水平

水平	A 溶剂用量 /mL	B 溶剂浓度 /%	C 提取时间	D 提取次数
1	30	70	1	1
2	40	80	1.5	2
3	50	90	2	3

表 3 $L_9(3^4)$ 的试验设计与结果

No.	因素				熊果酸/% ($n=3$)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.64
2	1	2	2	2	2.14
3	1	3	3	3	1.79
4	2	1	2	3	2.26
5	2	2	3	1	1.77
6	2	3	1	2	2.15
7	3	1	3	2	2.44
8	3	2	1	3	1.88
9	3	3	2	1	1.39
k_1	1.857	2.113	1.890	1.600	
k_2	2.060	1.930	1.930	2.243	
k_3	1.903	1.777	2.000	1.977	
极差(R)	0.203	0.336	0.110	0.643	

通过直观分析,影响因素的主次顺序为:提取次数>溶剂浓度>溶剂用量>提取时间。最佳提取条件为 $A_2B_1C_3D_2$,即用 40 mL 70% 乙醇回流提取 2

次,每次 1.5 h。

2.10 方差分析 为验证直观分析结果,对正交试验结果进行了方差分析(见表 4)。结果表明,提取次数对实验结果有显著性影响,与直观分析结果相符。

表 4 方差分析

因素	SS	f	MS	F^a	P
A	0.068	2	0.034	3.579	<0.05
B	0.170	2	0.085	8.947	
D	0.627	2	0.314	33.000	
C	0.019	2	0.010	1.000	
误差总计	0.884	8			

注:^a $F_{0.05}(2,2)=19.16$ 。

2.11 样品含量的测定 分别称取不同来源黑骨藤药材粗粉适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下方法显色,以试剂空白为参比,在 550 nm 波长处测其吸光度,根据标准曲线回归方程计算样品中总皂苷含量。结果表明,不同来源黑骨藤药材中总皂苷含量存在差异,这可能与药材的产地、气候、光照等因素有关(见表 5)。

表 5 不同来源黑骨藤药材中总皂苷含量测定

No.	药材来源	总皂苷 %
1	黔桃河边	3.17
2	黔桃向阳	4.17
3	未知 1	2.00
4	安徽药市	1.75
5	贵阳药市	2.13
6	渔洞峡左岸	2.61
7	黔桃背阴	2.82
8	香纸沟	2.29
9	情人谷	2.66
10	四川崇州	0.35
11	高坡	3.62

3 讨论

3.1 药材提取方式考察 分别对热回流、超声以及冷浸 3 种提取方式进行了比较,结果表明,热回流提取法测得的总皂苷含量高于其他两种方式。故选用热回流提取。

3.2 药材提取溶剂考察 结合皂苷的溶解性,实验对不同提取溶剂(甲醇、乙醇和正丁醇)进行了考察,结果表明乙醇提取时所得总皂苷含量最大,因此实验中采用乙醇为提取溶剂。

3.3 显色方法考察 考虑到吸光度随显色时间和显色温度的变化而变化,实验对不同显色时间进行了考察。结果表明,显色时间在 15~20 min 时吸光

气相法同时测定不同产地藏茴香中葛缕酮和柠檬烯含量

阎卉^{1,2}, 靳文仙², 王成港^{2*}

(1. 天津医科大学 药学院,天津 300071;
2. 天津药物研究院 释药技术及药代动力学国家重点实验室,天津 300193)

〔摘要〕 目的:建立方法同时测定藏茴香中葛缕酮和柠檬烯的含量,研究不同产地的藏茴香中葛缕酮和柠檬烯的含量差异。方法:采用气相法,色谱柱为 HP-FFAP (聚乙二醇 20000,柱长 25 m,内径 0.20 mm,膜厚度 0.33 μm),柱温 65~115℃;载气 N₂,流速 1.0 mL·min⁻¹,氢火焰离子化检测器(FID),进样口及检测器温度均为 250℃。结果:5批不同产地藏茴香药材中葛缕酮和柠檬烯质量分数在 50%~60%及 35%~42%。结论:本方法简便,准确,重复性好,可用于藏茴香中葛缕酮和柠檬烯含量的测定。不同产地藏茴香中葛缕酮和柠檬烯含量差异不大。

〔关键词〕 藏茴香;葛缕酮;柠檬烯;含量;气相
〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)11-0097-03

GC Method for Simultaneous Determination of Carvone and Limonene Contents in Caraway from Different Origin

YAN Hui^{1,2}, JIN Wen-xian², WANG Cheng-gang^{2*}

(1. Tianjin Medical University, Tianjin 300071, China; 2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin 300193, China)

〔Abstract〕 Objective: To establish a method for simultaneous determination of carvone and limonene contents in caraway, research difference areas of carvone and limonene contents in caraway from different origin. Method: The analysis was carried out on a chromatographic column for HP-FFAP (PEG 20000, 0.20 mm×25 m, 0.33 μm); the column temperature 65-115℃, the carrier gas was N₂, flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, detector FID, the inlet and the temperature detector were all set at 250℃. Result: The quality scores of carvone and limonene content in 5 batches of caraway from different origin were 50%-60% and 35%-42%. Conclusion: The

〔收稿日期〕 20111124(007)
〔基金项目〕 天津科委新药专项(033187411)
〔第一作者〕 阎卉,硕士,从事药物制剂研究,Tel:13642169945, E-mail:yanh@tjipr.com
〔通讯作者〕 *王成港,硕士,副研究员,从事药物制剂研究,Tel:022-23006879, E-mail:wcg666@gmail.com

度较稳定,因此实验选用显色时间为 15 min;对不同显色温度考察表明,在温度为 60℃时,吸光度达到最大值,因此实验选取 60℃为显色温度。

〔参考文献〕

[1] 包骏,冉懋雄. 贵州苗族医药研究与开发[M]. 贵阳:贵州科技出版社,1998:26.

[2] 黄明进,罗春丽,郭刚,等. 黑骨藤抗类风湿性关节炎作用及其分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):174.

[3] 梁勇,廖颖,张宏,等. 黑骨藤的抗肿瘤活性成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):119.

[4] 甘秀海. 黑骨藤化学成分研究[D]. 贵阳:贵州大学,2009:20.

[5] 姚新生,吴立军. 天然药物化学. 4版[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:306.

[6] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:381.

〔责任编辑 蔡仲德〕