

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.07.007

比色法测定巴西人参中齐墩果酸型皂苷含量*

韦贵云^{1,2}, 李芳², 黄程², 许崇瑶^{2Δ}

(1. 广西壮族自治区妇幼保健院, 广西南宁 530003; 2. 广西医科大学药学院, 广西南宁 530021)

摘要:目的 建立测定巴西人参中齐墩果酸型皂苷含量的比色法。方法 以人参皂苷 Ro 和齐墩果酸作为对照品, 以 5% 香草醛-冰醋酸-高氯酸作为显色体系, 通过比色法测定皂苷的含量。结果 皂苷比色法与苷元比色法均可用于巴西人参中皂苷含量的测定, 齐墩果酸型皂苷含量分别为 9.956% 和 3.232% ($n=5$)。结论 苷元比色法简便、快速, 重复性好, 测定结果较皂苷比色法更合理、准确。

关键词: 巴西人参; 齐墩果酸型皂苷; 紫外-可见分光光度法; 比色法

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)07-0023-03

Content Determination of Oleanolic Acid-Type Saponins in *Pfaffia paniculata* by Colorimetry

WEI Guiyun^{1,2}, LI Fang², HUANG Cheng², XU Chongyao²

(1. The Maternal and Child Health Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi, China 530003; 2. Pharmaceutical College of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, China 530021)

Abstract: Objective To establish a colorimetry for the content determination of oleanolic acid-type saponins in *Pfaffia paniculata*.

Methods With ginsenoside Ro and oleanolic acid as the reference substance, and 5% vanillin-glacial acetic acid-perchloric acid as the chromogenic system, the content of saponins was determined by colorimetry. **Results** Saponin colorimetry and aglycone colorimetry were both suitable for the content determination of saponins in *Pfaffia paniculata*. The content of oleanolic acid-type saponins obtained by the two methods were 9.956% and 3.232% ($n=5$), respectively. **Conclusion** The aglycone colorimetry is simple, rapid and reproducible, and the results of determination are more reasonable and accurate than those of saponin colorimetry.

Key words: *Pfaffia paniculata*; oleanolic acid-type saponin; UV-vis spectrophotometry; colorimetry

巴西人参 *Pfaffia paniculata* Pedersen 为苋科巴西人参属植物, 原产于中美洲和南美洲, 主要分布于巴西等热带雨林气候带的原生态地区^[1], 具有抗肿瘤^[2]、抗缺血缺氧、抗炎镇痛、保护胃黏膜、降血糖等药理作用。其化学成分主要有珐菲亚酸及其苷类、三萜苷类、脱皮甾醇类激素(如脱皮甾酮)及苷类等^[3], 其中三萜类的齐墩果酸型皂苷是主要有效成分, 含量较高, 具有抗肿瘤、降血糖血脂、保肝、抑制胰脂肪酶和抗肥胖^[4]等作用。有学者认为, 可以单体皂苷(人参皂苷 Ro)或以皂苷元作为对照品测定总皂苷含量^[5], 由于使用不同的对照品, 皂苷含量测定结果也有不同。本研究中拟提取皂苷与皂苷元, 分别采用人参皂苷 Ro 和齐墩果酸作为对照品, 测定巴西人参中齐墩果酸型皂苷含量, 比较 2 种方法的差异, 为药材质量控制与评价提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器: TV-1901 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); ATY224 型电子分析天平(日本岛津公司); ZRD-5210 型电热恒温鼓风干燥箱(上海智城分析仪器制造有限公司); R1001N 型旋转蒸发仪

(郑州长城科工贸有限公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

试剂: 巴西人参采集于广西隆安县广西宝塔工业园小林基地, 由广西医科大学朱丹副教授鉴定为苋科植物巴西人参 *Pfaffia paniculata* pedersen 的干燥根, 粉碎过筛干燥后, 密封保存, 备用; 齐墩果酸标准品(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号为 0110088, 纯度为 98%); 人参皂苷 Ro 标准品(上海源叶生物科技有限公司, 批号为 B21068, 纯度为 98%); 石油醚、正丁醇、香草醛、冰醋酸、高氯酸均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

皂苷提取液^[6]: 取药材粗粉 1 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加入 25 mL 80% 乙醇回流提取 2 次, 每次 90 min, 合并 2 次提取液, 回收乙醇得到浸膏, 加 20 mL 水溶解, 用石油醚萃取 3 次, 每次 10 mL, 弃石油醚层, 水层用水饱和的正丁醇萃取 4 次, 每次 10 mL, 合并正丁醇液, 减压回收正丁醇至干, 用甲醇溶解并定容至 100 mL。

皂苷元提取液: 取巴西人参粗粉 1 g, 精密称定, 置

*基金项目: 广西医科大学青年科学基金项目[GXMUYSF201605]; 广西医科大学大学生创新创业计划项目[201610598183, 201710598150]。

第一作者: 韦贵云, 女, 侗族, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为医院药学, (电子信箱)569915574@qq.com。

Δ通信作者: 许崇瑶, 男, 壮族, 硕士研究生, 实验师, 研究方向为新药开发, (电子信箱)chongyao.xu@qq.com。

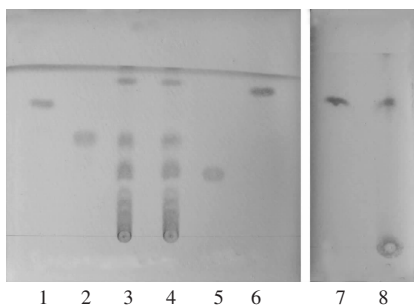
圆底烧瓶中,加入 25 mL 80% 乙醇回流提取 2 次,每次 90 min,过滤,取滤液,滤液合并减压浓缩至约 12 mL,加 20% 硫酸和水配成含质量体积比为 2% H_2SO_4 的溶液 25 mL,加热回流 60 min,冷却析晶,过滤,滤纸及不溶物用纯水洗至中性,产物用甲醇溶解,并定容至 50 mL。

对照品溶液:取人参皂苷 Ro 对照品 10 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解后定容,备用。取齐墩果酸对照品 7.5 mg,精密称定,置 25 mL 容量瓶中,用甲醇溶解后定容,备用。

2.2 薄层色谱鉴别

皂苷提取液:以皂苷对照品和皂苷提取液点板,以三氯甲烷-甲醇-水(12:7:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷 10% 硫酸乙醇,于 105 ℃ 下加热至斑点显色清晰。结果显示,虽然皂苷提取液中出现了与皂苷对照品 R_{B_1} 和人参皂苷 Ro 对照品比移值(R_{f})相近的斑点,但是两者在 10% 硫酸乙醇显色出来的斑点颜色与皂苷提取液中的斑点颜色均有差异,结合文献[7]报道的化学成分,并未见有分离到这 2 个化合物的报道,故该两处显现的斑点可能不是人参皂苷 R_{B_1} 和 Ro(见图 1)。

皂苷元提取液^[8]:以皂苷元齐墩果酸对照品和皂苷元提取液点板,以三氯甲烷-乙酸乙酯-乙酸(10:4:0.2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷 10% 硫酸乙醇,于 105 ℃ 加热至斑点显色清晰。结果显示,皂苷提取液经过水解成皂苷元后,明显看出齐墩果酸的斑点(见图 1)。



1. 人参皂苷 Re 对照品溶液 2,6. 人参皂苷 R_{B_1} 对照品溶液
3-4. 巴西人参皂苷提取液 5. 人参皂苷 Ro 对照品溶液
7. 齐墩果酸对照品溶液 8. 皂苷元提取液

图 1 巴西人参皂苷提取液薄层色谱图

2.3 最大吸收波长选择

精密吸取皂苷和皂苷元提取液各 0.2 mL,稀释为 0.4 g/L 人参皂苷 Ro 和齐墩果酸对照品溶液各 0.2 mL,分别置干燥试管中,挥干,加入 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL,高氯酸 0.8 mL,置 60 ℃ 水浴上加热 15 min,流水冷却后加入 5 mL 冰醋酸,摇匀,在 400~700 nm 波长范围内扫描^[7];另取未加入显色剂的提取液和对照品溶液在同样波长范围内扫描,确保无吸收、干扰,以确定检测波长^[8-9]。显色后,各提取液和对照品溶液在 548 nm

波长处均有最大吸收,而未加入显色剂的提取液和对照品溶液在此处无吸收,故选择 548 nm 作为测定波长。

2.4 方法学考察

显色后溶液稳定性试验^[10]:分别取皂苷样品溶液和皂苷元样品溶液适量,挥干,按 2.3 项下方法操作显色后,分别在 0,15,30,60,90,120 min 时测定吸光度。结果皂苷和皂苷元提取液吸光度的 RSD 分别为 1.12% 和 1.61% ($n=6$),表明样品溶液显色后在 2 h 内较稳定。

标准曲线制备:分别精密吸取人参皂苷 Ro 对照品贮备液 0.1,0.2,0.3,0.4,0.6 mL,分别置 5 支试管中,按 2.3 项下操作显色后,以未加样品的试剂作空白,在 548 nm 波长处测定,以吸光度(Y)为纵坐标、对照品质量浓度(X)为横坐标绘制标准曲线,得标准曲线方程 $Y=0.0089X+0.0042$, $R^2=0.9995$ ($n=5$)。分别精密吸取齐墩果酸对照品贮备液 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mL,按上述方法操作,得标准曲线方程 $Y=0.0234X-0.0014$, $R^2=0.9995$ ($n=5$)。结果表明,人参皂苷 Ro 与齐墩果酸质量浓度分别在 16.83~100.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 5.07~30.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与吸光度线性关系良好。

精密度试验:精确吸取对照品溶液各 0.2 mL,按 2.3 项下操作显色后,于确定的波长下连续测定 6 次吸光度。结果的 RSD 均为 0 ($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品 1 g,精密称定,共 10 份,分别按皂苷提取液和皂苷元提取液制备方法制备供试品溶液,各 5 份。按 2.3 项下方法显色后,测定吸光度,计算皂苷含量。结果皂苷比色法测得平均含量为 9.86%, RSD 为 2.03% ($n=5$);皂苷元比色法测得平均含量为 3.31%, RSD 为 1.81% ($n=5$)。表明方法重复性良好。

加样回收试验^[11]:取 6 份药材粗粉各 1 g,依法制备皂苷提取液,按 2.3 项下方法显色后,于 548 nm 波长处测定吸光度,计算齐墩果酸型皂苷含量,另取 5 mL,分别加入提取液含量的 80%,100%,120% 的人参皂苷 Ro 对照品溶液,用甲醇定容于 100 mL,每组平行 2 份。显色后,测定,计算回收率。取 6 份药材粗粉各 1 g,提取,按 2.3 项下方法操作显色后,于 548 nm 波长处测定吸光度,计算 1 g 巴西人参中齐墩果酸的含量。另取 15 mL,分别加入提取液含量的 80%,100%,120% 的齐墩果酸对照品溶液,用甲醇定容于 50 mL,每组平行 2 份,显色后测定吸光度,计算回收率。结果见表 1。

2.5 样品含量测定

皂苷法及皂苷元法:取巴西人参样品 1 g,精密称定,共取 5 份,依法提取,按 2.3 项下方法操作显色后,于 548 nm 波长处测定吸光度,计算齐墩果酸型皂苷及齐墩果酸含量^[12-13]。齐墩果酸型皂苷含量 = 齐墩果酸含量 $\times$ 齐墩果酸型皂苷平均分子量 / 齐墩果酸分子量。

表1 加样回收试验结果($n=6$)

样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
5.71	12.23	4.50	10.10	10.32	22.47	102.44	101.39				
5.19	12.56	4.20	10.10	9.48	22.63	102.14	99.70				
5.25	11.67	5.20	11.72	10.35	23.08	98.08	97.35	100.94	100.11	2.14	1.98
5.55	12.05	5.20	12.12	10.82	24.54	101.35	103.05				
4.89	11.59	5.80	14.14	10.60	25.78	98.45	100.35				
4.15	12.14	5.00	14.75	9.31	26.72	103.20	98.85				

注:A为人参皂苷Ro,B为齐墩果酸。

巴西人参中齐墩果酸型皂苷主要有3种^[7],即齐墩果酸-3-O- β -D-葡萄糖醛酸甲酯苷、齐墩果酸-3-O- β -D-葡萄糖醛酸苷、齐墩果酸-28-O- β -D-吡喃葡萄糖酯苷,相对分子质量分别为648,632,618,相差不大,液相峰强度相近,可认为药材中齐墩果酸型皂苷的平均相对分子质量为三者平均值^[13],即632.67。齐墩果酸的相对分子质量为456,齐墩果酸换算成齐墩果酸型皂苷的换算系数为1.39。结果见表2。

表2 皂苷比色法与苷元比色法测定齐墩果酸型皂苷含量结果($n=5$)

样品质量(mg)		齐墩果酸型皂苷(mg)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B
1 000.5	1 000.6	101.081	32.380				
1 000.3	1 001.2	99.730	33.093				
1 000.3	1 000.4	97.029	32.023	9.956	3.232	1.58	1.64
1 000.4	1 000.6	100.630	31.667				
1 000.4	1 000.4	99.510	32.558				

注:A为皂苷比色法,B为苷元比色法。

3 讨论

齐墩果酸型皂苷为具有明显药理活性的天然产物,目前认为甲戊二羟酸(MVA)途径为其主要的生物合成途径。巴西人参很可能也是通过MVA途径合成的皂苷,即以糖酵解产物乙酰辅酶A为起始物,经甲戊二羟酸中间体一系列反应生成皂苷元齐墩果酸,再经过糖基化等反应产生皂苷。合成过程中,反应底物的不同将能形成结构相似而又不完全相同的一系列具有相似活性的代谢产物。因此,天然产物中皂苷的成分较复杂,难以选用单一或多个对照品对总皂苷含量进行评价^[14]。皂苷的定量测定常用方法有高效液相色谱法、气相色谱法和比色法等,前两者可准确检测各单一成分皂苷的含量;采用构型相似的皂苷作为对照品时,因其在紫外特定波长下具有共同的吸收,采用显色法排除干扰后再用比色法检测可得到较为合理的评价结果。

在巴西人参齐墩果酸型皂苷的含量测定中,人参皂苷Rb₁属原人参二醇型皂苷,人参皂苷Ro属齐墩果酸型皂苷,选用人参皂苷Ro作为皂苷法测定的对照品比

用Rb₁更合理,但人参皂苷Ro的相对分子质量远高于巴西人参中齐墩果酸型皂苷,将使结果比真实值要高很多。齐墩果酸型皂苷的水解产物为齐墩果酸,在适宜的水解条件下,参照药材的化学成分分析^[7]选用齐墩果酸作为苷元法的对照品测定巴西人参中齐墩果酸型皂苷的含量,结果更合理。本研究中采用皂苷法测得巴西人参中齐墩果酸型皂苷含量为9.956%,苷元法测得含量为3.232%。凌征柱等^[15]研究发现,巴西人参中总皂苷含量为6.54%。可见,齐墩果酸型皂苷作为总皂苷的一部分,以苷元比色法测得的含量更准确,即巴西人参中齐墩果酸型皂苷的含量为3.232%。

参考文献:

- [1] PEDERSEN TM. Studies in south American Amaranthaceae[J]. Adansonia, 1997, 19(2): 217-251.
- [2] WATANABE T, WATANABE M, WATANABE Y, et al. Effects of Oral Administration of *Pfaffia paniculata* (Brazilian Ginseng) on Incidence of Spontaneous Leukemia in AKR/J Mice[J]. Cancer Detection and Prevention, 2000, 24(2): 173-178.
- [3] 高 辉, 马小军, 温学森, 等. 珙菲亚属植物化学成分和药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(21): 1749.
- [4] 曲正义, 刘宏群, 郑培和, 等. 齐墩果酸型皂苷药理活性研究[J]. 中成药, 2012, 34(6): 1143-1147.
- [5] 王 佳, 郑培和, 许世泉, 等. 人参、西洋参不同部位中齐墩果酸型皂苷含量的对比分析[J]. 特产研究, 2015, 37(2): 23-29.
- [6] 白吉庆, 王小平, 盛 艳, 等. 不同产地对九节菖蒲中总皂苷、齐墩果酸及腺苷含量的影响[J]. 中国药业, 2012, 21(11): 9-10.
- [7] 高 辉, 马小军, 温学森, 等. 巴西人参的化学成分研究[J]. 中草药, 2009, 40(4): 522-525.
- [8] 刘伟锐, 张 霞, 姜 蕊, 等. 紫外可见分光光度法测定苣荬菜根部总三萜皂苷的含量[J]. 西北药学杂志, 2014, 29(6): 554-557.
- [9] 桂双英, 周亚球. 比色法测定人参中人参总皂苷的含量[J]. 安徽中医学院学报, 2003, 22(4): 51-52.
- [10] 孙 乐, 李春梅, 郭莹莹, 等. 人参花中总皂苷的提取工艺优化[J]. 中国实验方剂学, 2015, 21(1): 21-23.
- [11] 袁 丁, 何毓敏, 鲁科明, 等. 中药竹节参中总皂苷和齐墩果酸的含量测定[J]. 西北药学杂志, 2008, 23(5): 278-280.
- [12] 李成刚, 张永忠, 迟玉节, 等. 齐墩果酸分光光度法测定大豆异黄酮粉中总皂苷的含量[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(7): 13-16.
- [13] 师文添, 于学雷, 袁 建, 等. 苷元比色法测定大豆总皂苷[J]. 食品科学, 2009, 30(2): 211-214.
- [14] 陈 旭, 党晓芳, 曹飒丽, 等. 三七中总皂苷含量测定的对照品筛选[J]. 中国实验方剂学, 2013, 19(7): 66-68.
- [15] 凌征柱, 蓝祖裁, 马小军, 等. 巴西人参的引种栽培研究[J]. 国外医药:植物药分册, 2007, 22(5): 204-205.

(收稿日期:2018-08-28)