维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)06 - 0854 - 03

茅莓总皂苷的含量测定

任凌燕,李惠芝,王继生,邱宗荫

(重庆医科大学药学系,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立茅莓总皂苷的含量测定方法。方法:通过对样品采用不同溶剂及不同提取方法所得的提取液显色后,以分光光度法测定总皂苷的含量。结果:本法测定的线性范围为 22 ~ 176μg (r = 0.9997);平均回收率为 102.1%,RSD = 2.82% (n = 6);样品以 70% 乙醇回流提取所得的总皂苷含量最高。结论:该方法灵敏、可靠,显色后的样品比较稳定,可用于茅莓药材的质量控制及品质评价。

【关键词】茅莓;总皂苷;含量测定;分光光度法

【中国图书分类法分类号】R927.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2005 - 04 - 11

Content determination of Total Saponins from Rubus parvifolius L

REN Lingyan, et al

(*Medcine Department, Chongqing Medical University*)

【Abstract】Objective: To establish a method for content determination of total saponins in *Rubus parvifolius L.*. Methods: Total saponins was determined by UV - VIS spectrophotometry after different extracts of the sample had been coloured. Results: The method was linear in the range of 22 ~ 176μg (r = 0.9997), and the average recovery was 102.1%, RSDwas 2.82% (n = 6). The content of total saponins was highest by the method of 70% ethanol reflux. Conclusion: The sample is stable after coloured. The method is sensitive and reliable, which may be used for the quality control of *Rubus parvifolius L.*.

【Key words】*Rubus parvifolius L.*; Total saponins; Content determination; UV - VIS spectrophotometry

茅莓为蔷薇科悬钩子属植物茅莓(*Rubus parvifolius L.*)的干燥全草,具有清热凉血、止血、散结止痛、利尿消肿等功效。本品含有皂苷、糖、酚性物质、鞣质、挥发油、微量元素等多种成分[1]。而近代药理研究表明,茅莓水提物对于局灶性脑缺血具有预防治疗作用[2];我们进一步研究发现其中总皂苷类成分为治疗脑缺血作用的主要活性成分。目前已从茅莓中分离出 2 种三萜类皂苷化合物,鉴定为 niga - ichigoside F_1 和 sauvissimoside R_1[3],但对其总皂苷的含量测定还没有相关方法的研究。鉴于目前尚无茅莓皂苷类成分的法定对照品,我们选用了与茅莓皂苷类成分基本母核结构接近的齐墩果酸为对照品,采用分光光度法测定总皂苷含量,从而为茅莓品质评价及其新药开发奠定基础。

作者介绍:任凌燕(1978 -),女,硕士研究生,
主要研究方向:药物分析及新药开发。

基金项目:重庆市科技攻关重大专项(2004 - 06)。

1 仪器、材料和试剂

1.1 仪器

UV - 2501(PC)S 紫外分光光度计(日本岛津公司)。Sartorius analytic A200s 电子天平(万分之一)、旋涡混合器 Vortex (XW - 80A)(江苏海门市麒麟医用仪器厂)、ZX98 - 1 旋转薄膜蒸发仪(上海惠工有限公司)、CS501 型超级恒温水浴锅(重庆市实验设备厂)。

1.2 材料

茅莓全草药材样品由重庆市中药研究院生药室采集并鉴定,齐墩果酸对照品(中国药品生物制品鉴定所,批号:110709 - 200304,供含量测定用)。

1.3 试剂

香草醛、冰醋酸、高氯酸、醋酸乙酯、甲醇、乙醇,均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 茅莓总皂苷的提取

2.1.1 乙醇回流提取 精密称取干燥的茅莓全草

维普资讯 http://www.cqvip.com

粗粉 4.0g,置 250ml 圆底烧瓶中,加 100ml70% 乙醇,水浴加热回流提取 4h,滤过,残渣加入 80ml70% 乙醇继续回流 2h,滤过,合并两次滤液,减压浓缩至无醇味,转移至分液漏斗中,用石油醚(60 ~ 90℃)萃取脱脂(40、30、20ml)3 次,将下层浓缩定容至 50ml。精密吸取 10ml 于分液漏斗中,用水饱和的正丁醇萃取 3 次,每次 10ml,静置,弃去水层,合并正丁醇液,加 10ml 正丁醇饱和的水洗涤,弃去水洗液,将正丁醇溶液水浴减压蒸干,残渣用甲醇溶解,定量转移至 10ml 容量瓶中,定容,摇匀;再精密吸取此溶液 2ml 于 25ml 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,即得 6.4mg/ml 茅莓乙醇回流提取液。

2.1.2 甲醇回流提取 精密称取干燥的茅莓全草粗粉 4.0g,置 250ml 圆底烧瓶中,加 100ml 甲醇,水浴加热回流提取 4h,滤过,残渣加入 80ml 甲醇继续回流 2h,滤过,合并两次滤液,滤液处理操作同 2.1.1 项下,即得 6.4mg/ml 茅莓甲醇回流提取液。

2.1.3 乙醇索氏提取 精密称取干燥的茅莓全草粗粉 4.0g,置索氏提取器中,加 180ml70% 乙醇,回流提取 6h,滤过,滤液处理操作同 2.1.1 项下,即得 6.4mg/ml 茅莓乙醇索氏提取液。

2.1.4 乙醇超声提取 精密称取干燥的茅莓全草粗粉 4.0g,置 250ml 具塞三角瓶中,加 100ml70% 乙醇,超声提取 1h,滤过,残渣加入 80ml70% 乙醇继续超声提取 1h,滤过,合并两次滤液,滤液处理操作同 2.1.1 项下,即得 6.4mg/ml 茅莓乙醇超声提取液。

2.2 总皂苷的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取齐墩果酸对照品 11.0mg,置 25ml 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀;即得浓度为 0.44mg/ml 的齐墩果酸对照品溶液。

2.2.2 测定波长的选择 分别精密吸取已知浓度的齐墩果酸对照品溶液 0.15ml 及样品乙醇回流提取液 0.5ml 于具塞试管中,水浴挥干溶剂,依次加入 0.2ml 新配制的 5% 香草醛冰醋酸溶液、0.8ml 高氯酸,摇匀,于 60℃水浴加热 15min,取出,流水冷却中止反应;加入 5ml 乙酸乙酯,摇匀,随行试剂作空白,于 400 ~ 800nm 波长范围内扫描,结果见图 1。齐墩果酸对照品溶液和样品溶液与香草醛 - 高氯酸反应生成的混合物的吸收光谱基本一致,齐墩果酸对照品 547nm 处有最大吸收,样品虽在 547nm 处不是最大吸收,但有强的吸收,故仍选择 547nm 为测定波长,测得的结果以齐墩果酸为基准计算总皂苷的含量。

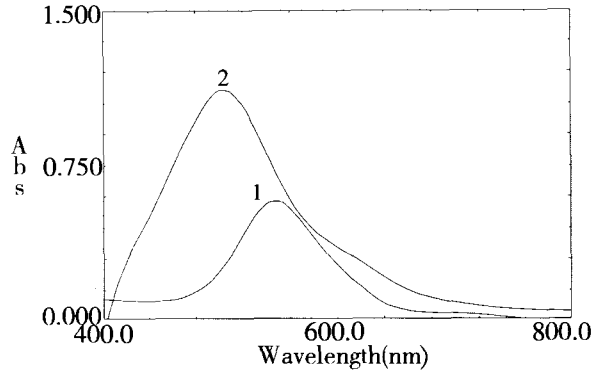


图 1 吸收光谱图 1. 齐墩果酸 2. 茅莓样品

2.2.3 标准曲线的制备 精密吸取齐墩果酸对照品溶液(0.44mg/ml)0.00、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4ml分别加入 6 支具塞试管中,即各试管中对照品的量分别为 0.00、0.022、0.044、0.088、0.132、0.176mg,水浴挥干溶剂后各依次加入 0.2ml 新配制的 5% 香草醛冰醋酸溶液、0.8ml 高氯酸,摇匀,于 60℃水浴加热 15min,取出,流水冷却中止反应;加入 5ml 乙酸乙酯,摇匀,随行试剂作空白,30min 后于 547nm 处测定吸光度。浓度与吸光度的线性方程为:$A = 40.53C - 0.01573$,$r = 0.9997$($n = 6$)。结果表明:在 22 ~ 176μg 范围内,齐墩果酸对照品显色后的吸光度与浓度呈良好线性关系。

2.2.4 方法学考察 精密吸取齐墩果酸对照品溶液(0.44mg/ml)0.2ml 于具塞试管中,按标准曲线法显色,随行试剂作空白,于 547nm 波长处计时测定,隔 5min 测定一次吸光度值,共测定 85min,结果见表 1,对照品显色后的吸光度值在 30 ~ 60min 内稳定,RSD = 0.18%($n = 7$)。精密吸取齐墩果酸对照品溶液(0.44mg/ml)各 0.2ml,共 5 份,按标准曲线法进行测定,精密度 RSD = 1.22%。精密称取同一产地药材粉末约 4.0g,共 3 份,按 2.1.1 项下乙醇回流提取方法试验,精密吸取茅莓样品溶液 0.5ml,按标准曲线法测定吸光度,重现性 RSD = 0.08%($n = 3$)。取已知含量的样品溶液 6 份,分别加入齐墩果酸对照品溶液适量,按标准曲线法测定,结果见表 2,其平均回收率为 102.1%,RSD = 2.82%($n = 6$)。

2.2.5 茅莓总皂苷的含量测定 精密吸取茅莓 4 种不同提取液 0.5ml 分别于 5 支具塞试管中,按标准曲线法测定吸光度,然后根据线性方程计算其总皂苷含量,结果见表 3,结果表明:用 70% 乙醇回流提

维普资讯 http://www.cqvip.com

取法的提取率明显高于其它 3 种提取法。

表 1 稳定性试验结果

时间(min)	吸收度	时间(min)	吸收度
0	0.553	45	0.604
5	0.560	50	0.604
10	0.568	55	0.602
15	0.579	60	0.600
20	0.590	65	0.594
25	0.598	70	0.585
30	0.602	75	0.573
35	0.604	80	0.560
40	0.604	85	0.557

表 2 回收率试验结果($n=6$)

编号	样品中总皂苷量/mg	加入量/mg	吸光度	测定的量/mg	回收率/%
1	0.0605	0.0132	0.484	0.0740	102.3
2	0.0605	0.0132	0.486	0.0743	104.5
3	0.0605	0.0264	0.568	0.0864	98.1
4	0.0605	0.0264	0.562	0.0867	99.2
5	0.0605	0.0396	0.673	0.1020	104.8
6	0.0605	0.0396	0.670	0.1015	103.6

表 3 不同提取方法茅莓总皂苷的含量

提取方法	茅莓总皂苷的含量
甲醇回流提取	1.37%
70% 乙醇回流提取	2.51%
70% 乙醇连续回流提取	1.85%
70% 乙醇超生提取	1.59%

3 讨 论

茅莓为小灌木植物,药理试验表明茅莓总皂苷是其抗脑缺血作用的主要有效部位,所以建立以总皂苷含量作为药材品质评价的一项指标。但目前国内尚无茅莓皂苷类成分的法定对照品,故选用了与茅莓皂苷类成分基本母核结构接近的齐墩果酸为对照品,采用分光光度法计算总皂苷含量。虽然测定结果有一定出入,但由于它们的显色原理一致,在暂无法定标准品的情况下,为了控制药材质量,仍然具有一定的可行性。

通过对茅莓采用不同溶剂及不同提取方法所得的提取液显色后,以分光光度法测定吸光度并计算总皂苷的含量,发现以 70% 乙醇回流提取所得的总皂苷含量最高。

总皂苷测定中,样品在显色后 30 ~ 60min 内稳定,线性范围为 22 ~ 176μg($r=0.9997$),精密度试验的 RSD = 1.22%,平均回收率为 102.1%,表明以上分光光度法精密度、重现性、稳定性均较好,可以用于该药材的质量控制。

参 考 文 献

[1] 江苏新医学院编. 中药大辞典下册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986;2652.

[2] 郑永玲,胡常林. 茅莓提取物治疗局灶性脑缺血的实验研究[J]. 中医药研究,2002;18(2):37 - 39.

[3] 王先荣,杜安全,王红萍. 中药茅莓化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,1994;19(8):486 - 487.