

三七叶甙含量测定方法比较

梁小燕 陈海珊 陈秀珍 成桂仁

(广西植物研究所, 桂林 541006)

摘 要 本文报道了采用(1)溴加成法, (2)分光光度比色法测定三七叶甙含量的方法并对其进行比较。结果(1)法所测结果比(2)法高 7.1%~19.7%, 其标准偏差分别为 3.26 (%) 和 0.90 (%)。认为分光光度比色法测定三七叶甙含量较佳。

关键词 溴加成法; 分光光度比色法; 三七叶甙; 方法

COMPARITIVE STUDIES ON THE DETERMINATION OF SAPONINS IN PANAX NOTOGINSENG LEAVES

Liang Xiaoyan Chen Haishan Chen Xiuzhen Cheng Guiren

(Guangxi Institute of Botany, Guilin 541006)

Abstract This paper reports the comparison between the two methods of quantitative determination of the total saponins in *Panax notoginseng* leaves, (1) Addition of bromine process, (2) spectrophotometry-colorimetry. according to the experimental results, the data of (2) are more stable, accurate and available than those of (1).

Key words addition of bromine process; spectrophotometry-colorimetry; *Panax notoginseng* saponin; method

三七叶甙为从五加科人参属植物三七 [*Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen] 的茎叶提取的总甙, 经化学分析证明主要含人参皂甙 Rb_3 、 Re 、 Rb_1 、七叶胆甙 IX、三七皂甙 Fc、Fa、Fe 等成分, 它们都是以原人参二醇为甙元的系列皂甙⁽¹⁾。对于三七叶甙的含量测定, 前人已做了不少工作, 目前采用较多的有比色法^(2~3)和溴加成法⁽⁴⁾两种。为了三七叶资源的开发利用, 作者对此两种三七叶甙的含量测定方法进行了比较研究, 现分述如下:

1 仪器与药品

三七叶甙 本所自制

人参皂甙 Rb_1 对照品 购自中国药品生物制品检定所。编号 703—8802。

盐酸 AR, 广东省廉江安铺化工厂。

氯仿 AR, 广东西陇化工厂。

甲醇 AR, 广州化学试剂厂。

香荚兰醛 CR, 广州化学试剂厂。

高氯酸 AR, 上海桃浦化工厂。

冰醋酸 AR, 南宁第二化工厂。

大孔树脂 1100DA-201 型, 上海医药工业研究院南汇树脂厂。

硫代硫酸钠 AR, 广州化学试剂厂。

无水碳酸钠 AR, 上海虹光化工厂。

溴酸钾 CR, 广州化学试剂厂。

碘化钾 AR, 广州化学试剂厂。

仪器 岛津 UV-210A 紫外分光光度计。

2 溴加成法

2.1 溶液配制

硫代硫酸钠液: 称取硫代硫酸钠 26 g 和无水碳酸钠 0.2 g, 加新沸过的蒸馏水适量溶解, 然后配成 1 000 mL 溶液, 摇匀, 放置半个月备用(滤过), 标定。

溴液: 取溴酸钾 3.0 g 与溴化钾 15 g, 加水适量使溶解成 1 000 mL, 摇匀, 标定。

碘化钾试液: 取碘化钾 16.5 g, 加水使溶解成 1 000 mL, 即得。

淀粉指示液: 取可溶性淀粉 0.5 g, 加水 5 mL 搅匀后, 缓缓倾入 100 mL 沸水中, 随加随搅拌, 继续煮沸 2 min, 放冷, 倾取上层清液, 即得。

2.2 样品测定

取三七叶甙样品 0.1 g, 精密称定, 置 250 mL 碘量瓶中, 加 25 mL 水溶解, 精密加入溴液 (0.1 mol/L) 5 mL, 加盐酸 5 mL, 立即避光超声振荡 30 min (超声时水温保持在 15~20℃), 取出, 立即加碘化钾试液 5 mL, 放置暗处 15 min, 加氯仿 2 mL, 用硫代硫酸钠液 (0.1 mol/L) 滴定至近终点时, 加入淀粉指示液 2 mL, 继续滴定至蓝色消失, 并将滴定的结果用空白试验校正, 每 1 mL 的硫代硫酸钠液 (0.1 mol/L) 相当于 26.98 mg 的人参皂甙 Rb_3 ($C_{53}H_{90}O_{22}$)⁽⁴⁾。

3 分光光度比色法

三七叶所含皂甙主要为人参皂甙, 故可采用树脂吸附加分光光度法, 以人参皂甙 Rb_1 为对照进行含量测定。

3.1 标准溶液的配制

精密称取人参皂甙 Rb_1 对照品 10 mg, 置于 10 mL 容量瓶, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 吸 4 mL 至 25 mL 容量瓶, 用甲醇稀释至刻度, 浓度为 0.16 mg/L。

3.2 测定波长的选择

精密吸取上述标准溶液 0.5 mL 及同样浓度的三七叶甙样品溶液 0.5 mL 分别置于具塞磨口试管, 沸水浴中蒸干甲醇, 加入 5% 香荚兰醛冰醋酸溶液 0.2 mL, 高氯酸 0.8 mL, 摇匀, 密塞, 于 60℃ 水浴加热 15 min, 取出后用流水冷却, 再加入冰醋酸 5 mL 摇匀, 用岛津 UV-210A

型紫外—可见分光光度计于 500~600 nm 波长处分别测定其吸收图谱, 结果在 550 nm 波长处均有最大吸收, 故选择 550 nm 为测定波长。

3.3 大孔吸附树脂的预处理

大孔吸附树脂使用前, 先用 80% 乙醇浸泡 6 次, 每次 12 h, 滤净乙醇后, 用热水漂洗, 检查, 取干树脂 0.5 g, 加 80% 乙醇 5 mL 振摇, 滤液蒸干不得有残留物。

3.4 装柱

取 4.5 g 经处理过的大孔树脂, 以水泡膨胀后倾入小层析柱内, 俟树脂沉降, 覆以脱脂棉少许, 加中性氧化铝 0.2 g, 再添加棉花少许轻压, 用蒸馏水冲洗, 并用水浸没备用。

3.5 样品测定

精密称取 100 mg 三七叶甙样品置 50 mL 容量瓶, 先加甲醇 25 mL, 密塞轻摇, 并置温水浴中浸泡 1 h, 使皂甙充分溶解, 冷却后用甲醇稀释至刻度, 摇匀静置。精确吸取 2 mL 上清液至小蒸发皿内, 于沸水浴上蒸干甲醇, 残渣用 2 mL 水溶解, 加入净化柱, 俟液面降至棉花层, 再取蒸馏水 18 mL 分次洗净上述小蒸发皿, 加入净化柱中洗柱, 洗柱水液弃去, 继用 70% 乙醇 30 mL 洗脱, 收集乙醇液于水浴上蒸干, 残渣用甲醇分次溶入 25 mL 容量瓶, 加甲醇稀释至刻度 (浓度约 0.16 mg/mL) 摇匀。精确吸取此溶液 0.5 mL 和人参皂甙 Rb_1 对照品的甲醇液 0.5 mL, 分别置于具塞磨口试管中, 同时吸 0.5 mL 甲醇置另一具塞磨口试管作空白, 沸水浴中蒸干甲醇溶液, 然后加入新配制的 5% 香荚兰醛冰醋酸溶液 0.2 mL, 高氯酸 0.8 mL, 摇匀后密塞, 于 60℃ 水浴加热 15 min, 取出后用流水冷却, 再加入冰醋酸 5 mL 摇匀, 用岛津 UV-210A 紫外分光光度计于 550 nm 波长处测定吸收值, 通过计算求出百分含量。

$$\text{皂甙含量(\%)} = \frac{\text{对照品量} \times \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{对}}}}{\text{样品量}} \times 100$$

其中: $A_{\text{样}}$ ——样品吸收值, $A_{\text{对}}$ ——对照品吸收值。

用此法与溴加成法对照对 10 个批号三七叶甙进行含量测定结果见表 1。

表 1 两种方法对三七叶甙含测结果比较 (%)

方 法	批 号									
	910425	910428	910504	910510	910520	921021	921022	921023	921115	921116
溴加成法	85.8	92.9	91.2	86.3	89.5	86.8	96.0	92.7	89.5	90.8
分光光度比色法	77.5	78.3	76.9	79.2	76.5	77.7	76.3	76.9	77.5	78.2

将上表数据用统计学方法进行处理, 求得标准偏差:

$$S_{\text{溴}} = \frac{\sum x^2 - (\sum x)^2 / n}{n - 1} = 3.26(\%)$$

$$S_{\text{分}} = \frac{\sum x^2 - (\sum x)^2 / n}{n - 1} = 0.90(\%)$$

精密度显著性检验(F 法):

$$n_{\text{溴}} = 10 \quad S_{\text{溴}} = 3.26(\%)$$

$$n_{\text{分}} = 10 \quad S_{\text{分}} = 0.90(\%)$$

$$F = S_{\text{大}}^2 / S_{\text{小}}^2 = S_{\text{溴}}^2 / S_{\text{分}}^2 = \frac{3.26^2}{0.90^2} = 13.1$$

查表: $f_{\text{溴}} = n_{\text{溴}} - 1 = 9$, $f_{\text{分}} = n_{\text{分}} - 1 = 9$, $F_{\text{表}} = 3.18$

因 $F > F_{\text{表}}$, 故两种方法精密度存在显著性差异。作出此判断的置信度为 90%。

两种含测方法显著性检验 (秩和法):

将两种方法的测定值混合按大小排列, 次序如下:

秩	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
分光光度法	76.3	76.5	76.9	76.9	77.5	77.5	77.7	78.2	78.3	79.2										
溴加成法											85.8	86.3	86.8	89.5	89.5	90.8	91.2	92.7	92.9	96.0

分光光度比色法的秩和为 (因 $n_{\text{溴}} = n_{\text{分}}$, 可任选一法的秩和):

$$T = 1+2+3+4+5+6+7+8+9+10 = 55$$

查表, 在 $\alpha = 0.05$, $n_1 = n_2 = 10$ 时,

$$T_1 = 83, T_2 = 127$$

$T < T_1$, 故两种方法之间存在显著性差异。

3.6 回收试验

精密称取 105℃ 干燥至恒重的人参皂甙 Rb_1 对照品 25 mg 于 25 mL 容量瓶, 甲醇定容, 精密吸取 4 mL 上清液于小蒸发皿; 挥去甲醇, 用水溶解后上大孔树脂净化柱, 先用 20 mL 水洗, 水液弃去, 继用 70% 乙醇 30 mL 洗脱, 收集乙醇洗脱液于水浴上蒸干, 残渣用甲醇分次溶入 25 mL 容量瓶并稀释至刻度。精密吸取此溶液 0.5 mL 及未过柱的人参皂甙 Rb_1 对照品的甲醇液 0.5 mL 按上法比色测定。根据测定结果计算回收率为 105.0%。

3.7 显色的稳定性

按前比色含量测定方法配制溶液, 显色完毕, 放置不同时间后测定吸收值。结果表明放置 20~50 min 之间, 对照品、三七叶甙的吸收度均基本稳定 (图 1)。

4 讨 论

(1) 溴加成法采用三七叶中含量较高的人参皂甙 $\text{Rb}_3^{[1]}$ 作皂甙含量计算标准, 符合实际。而 Rb_1 与 Rb_3 分子结构相近, 故分光光度比色法采用 Rb_1 作标准对照品测定皂甙含量也切实可行。

(2) 溴加成法是根据三七叶甙侧链上存在一个烯键, 通过溴加成反应来测定三七叶甙含量, 有较好的专属性。本样品经定性检查, 除三七叶甙外, 其他主要为糖和多糖类成分, 也还有少量黄酮类和叶绿素等含烯键成分的存在, 这些含烯键成分有可能参与反应, 因而导致测试结果提高。从表 1 可看出, 用溴加成法所测皂甙含量均比分光光度比色法所测数据高, 二者相差从

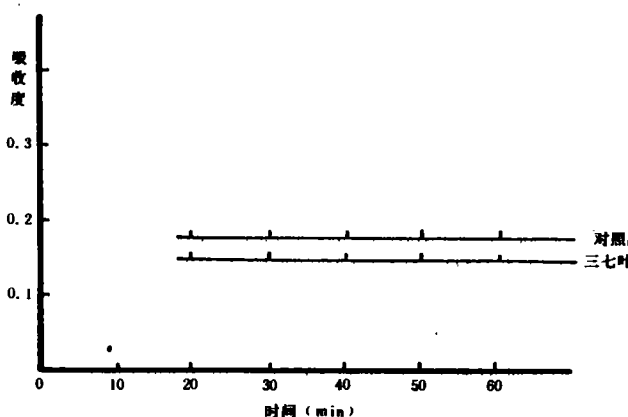


图 1 吸收度与时间关系

7.1%~19.7%不等。显著性检验表明,两种方法之间存在显著性差异,即存在明显的系统误差。根据测试结果研究证明,分光光度比色法所测结果比较切合实际。

(3) 分光光度比色法先用中性氧化铝吸附除去色素黄酮等杂质,用大孔树脂吸附总皂甙,水洗去糖和无机盐等水溶性成分,去除了杂质干扰,测定结果重现性好。用本法显色对皂甙类成分专属性好,用仪器测定,灵敏度高,能较客观测定含量,且操作比溴加成法简便。

(4) 根据对 10 批号样品测试数据的统计学计算结果看,分光光度比色法的标准偏差为 0.90(%),远远低于溴加成法的 3.26(%),两者之间存在显著性差异。说明分光光度比色法的测试结果精密度较高,而后者较差。

致谢 本所仪器组方宏同志代测部分样品,在此表示感谢。

参 考 文 献

- 1 Ysung-ren Yang *et al.* Dammarane saponins of leaves and seeds of *Panax notoginseng*. *Phytochem*, 1983, 22(6): 1473~1478
- 2 章观德. 人参的分析Ⅱ, 人参皂甙的测定. *药学学报*, 1980, 15(3): 175
- 3 章观德. 人参的化学成分和分析方法研究进展. *药学学报*, 1980, 15(6): 375
- 4 中华人民共和国卫生部颁标准. WS₃-B-1475-93
- 5 吴 明. 三七茎叶浸膏总皂甙的测定. *中成药研究*, 1988, (2): 10