

文章编号:1673-0062(2011)04-105-04

枸骨根中三萜类物质含量的测定

王 慧^{1,2}, 沈鹏飞², 曾荣今^{1,2*}

(1. 湖南科技大学 理论化学与分子模拟教育部部省共建重点实验室, 湖南 湘潭 411201;
2. 湖南科技大学 化学化工学院, 湖南 湘潭 411201)

摘 要:本文以采集于湘潭县的枸骨根为材料, 选用熊果酸为对照品, 5% 香草醛—冰乙酸和高氯酸为显色剂, 以分光光度法测定枸骨根中总三萜的含量. 实验结果表明: 在 549 nm 波长下, 标准品在 4.4 ~ 26.4 mg/L 范围内, 吸光度与含量呈良好的线性关系, 其回归方程为: $y = 0.0357x - 0.0809$, $R^2 = 0.9984$. 样品吸光度在 5 ~ 40 min 内相对比较稳定, 其三萜含量为 3.20%, RSD 值为 0.31%. 该方法操作简便, 快速, 灵敏度高, 重复性好.

关键词:枸骨根; 总三萜; 分光光度法; 熊果酸

中图分类号: O657.32; O629.9; R284.1 **文献标识码:** B

Determination of Triterpenes from the Root of *Ilex Cornuta*

WANG Hui^{1,2}, SHEN Peng-fei², ZENG Rong-jin^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Theoretical Chemistry and Molecular Simulation of Ministry of Education, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan, Hunan 411201, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan, Hunan 411201, China)

Abstract: The total triterpenoids in the root of *Ilex cornuta* was quantified by spectrometry method using ursolic acid as standard and 5% vanillin-glacial acetic acid and perchloric acid as color-developing agents. The results showed that the content of the standard was well correlated to its optical density at 549 nm, the calibration curve was linear ($R^2 = 0.9984$) in the range of 4.4 ~ 26.4 mg/L within 5 ~ 40 min and the curve was $y = 0.0357x - 0.0809$. The above method for the quantification was proved to have the advantages of simple operation, rapidity, high sensitivity and fine repetition.

key words: the root of *Ilex cornuta*; total triterpenes; spectrophotometry; ursolic acid

枸骨 (*Ilex cornuta* Lindl. et Paxt) 冬青科冬青属植物, 主要分布于长江中下游地区各省, 其叶是

苦丁茶的主要来源之一, 据《全国中草药汇编》记载, 枸骨根有祛风止痛的功效, 用于风湿关节痛,

收稿日期: 2011-10-19

作者简介: 王 慧 (1987-), 女, 湖南益阳人, 湖南科技大学化学化工学院硕士研究生. 主要研究方向: 天然产物的分离提取与纯化. * 通讯作者.

腰肌劳损,头痛,牙痛,黄疸型肝炎等病症,是一种具有重大药用价值的中药材,民间有多种关于枸骨根的治病偏方,疗效显著^[1]. 该植物主要含有三萜、黄酮及其苷类化合物,实验研究表明枸骨根中含有黄酮类物质槲皮素,三萜类化合物熊果酸、乌苏酸及其衍生物等多种^[2-4]. 近年来,熊果酸及三萜同类物不断地被报道具有抗肿瘤、抗 HIV、抗糖尿病、抗菌、抗病毒、增强免疫功能和降血脂等效果^[5],1990年,日本将熊果酸列为最有希望的癌化学预防药物之一^[6]. 基于此,本文采用分光光度法对枸骨根中三萜类化合物的含量进行了测定.

1 材料与仪器

1.1 材料

枸骨根采集于湖南省湘潭市湘潭县,经湖南科技大学曾荣今教授鉴定为冬青科冬青属植物枸骨 *Ilex cornuta* Lindl. et Paxt 的根,鲜品干燥粉碎保存;熊果酸标样(阿拉丁);乙醇、冰醋酸、香草醛、高氯酸等,均为分析纯试剂.

1.2 仪器

756 MC 紫外—可见分光光度计;密封式化验制样粉碎机(南昌通用化验制样机厂);DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);AR2140 电子天平(奥豪斯国际贸易有限公司);RE-52A 型旋转蒸发仪(上海雅荣生化设备仪器有限公司);

2 试验方法

2.1 溶液的配制

2.1.1 标准品溶液的制备

精密称取熊果酸标准品 5.5 mg,用无水乙醇定容于 50 mL 容量瓶中,即得 110 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 熊果酸标准品溶液.

2.1.2 样品溶液的制备

准确称取烘干的枸骨根粉末 2.0 g 于 250 mL 三颈烧瓶中,加入 40 mL 90% 乙醇于 80 $^{\circ}\text{C}$ 回流提取 3 h,过滤提取液,滤渣重复提取 2 次,合并滤液,浓缩至 50 mL,并将滤液离心(3 000 r/min, 10 min);上清液定容至 100 mL 容量瓶中,即得样品溶液.

2.2 最大吸收波长的确定

分别吸取适量 2.1 中配置好的熊果酸标准液

和 2.2 中配置好的样品溶液,水浴蒸干,加入 5% 香草醛—冰醋酸 0.2 mL,高氯酸 0.8 mL,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热反应 15 min,冰水冷却,加 4 mL 冰醋酸,以不加样的试剂为空白对照,在紫外可见光区进行扫描,确定最大吸收波长^[7].

2.3 标准曲线的测定

精密吸取熊果酸对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL,按 2.2 中的方法进行显色,并于确定的最大吸收波长下测定其吸光度.

2.4 样品含量测定

吸取样品液 0.2 mL,按标准曲线方法一式三份进行测定.

2.5 稳定性考察

取 0.2 mL 样品液,按标准曲线方法,分别在 5 ~ 120 min 内进行测定.

2.6 回收率试验

精密量取样品液 0.1 mL,并按上述方法处理样品;之后准确加入定量的熊果酸对照品,按样品含量项下进行测定,然后用差减法求出齐墩果酸的回收率.

3 结果与分析

3.1 最大吸收波长的确定

将熊果酸标准样品的显色溶液在 400 ~ 800 nm 范围进行波长扫描,溶液的质量浓度为 11.0 mg/L,样品溶液同法操作,同时以试剂空白作参比,得吸收光谱图. 结果(见图 1、图 2)表明,熊果酸标准品和样品溶液均在 549 nm 处有最大吸光度,且空白对照干扰小.

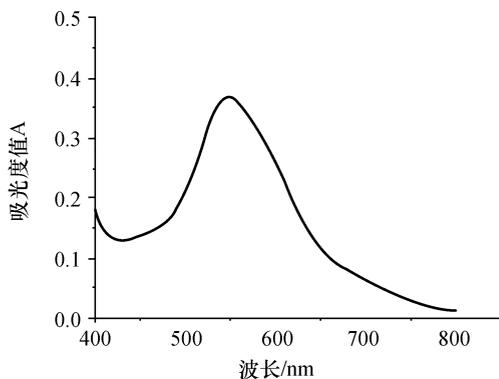


图 1 熊果酸标准品光谱图

Fig. 1 Spectrogram of Ursolic acid standard

3.2 标准曲线的绘制

根据实验的结果,以吸光度 x 为横坐标,熊果酸含量 y 为纵坐标,作标准曲线.分光光度法测定总三萜的标准曲线见图 3.

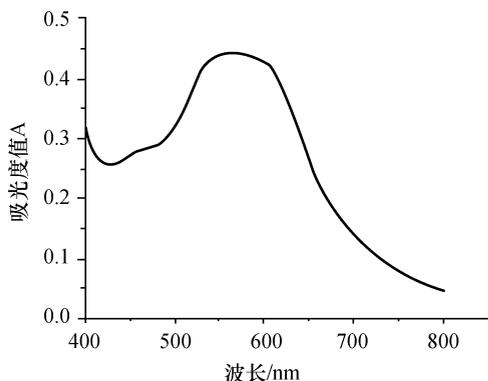


图2 枸骨根中总三萜物质的光谱图

Fig.2 Spectrogram of total triterpenes from the root of *Ilex cornut*

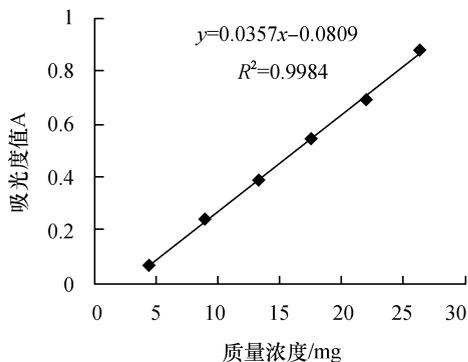


图3 熊果酸的标准曲线与回归方程

Fig.3 Standard curve and regression equation of Ursolic acid

以吸光度对齐墩果酸含量的回归得方程为:

$$y = 0.0357x - 0.0809, R^2 = 0.9984$$

式中: y ——吸光度,线性范围为:4.4~26.4 mg/L

x ——三萜化合物的含量,mg/L;

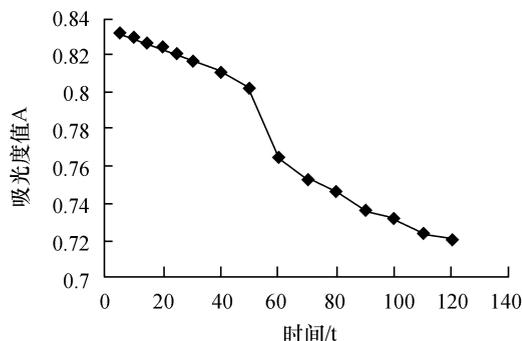


图4 样品稳定性曲线

Fig.4 Stability curve in sample

3.3 样品含量测定

样品分析结果(表1)表明,三个平行测定中总三萜含量较接近,质量分数约为3.20%,RSD值为0.31%,样品检出限为10~5 mg.

3.4 稳定性考察

5~120 min内枸骨根显色液吸光度的变化如图4.结果表明:吸光度在5~50 min内比较稳定,50 min以后稳定性开始明显下降.因此,显色液适合在5~50min内测定吸光度.

3.5 加样回收率

回收率实验结果见表2,加样平均回收率为98.63%,RSD=0.81%,表明加样回收可以满足测定要求.

表1 样品总三萜分析结果

Table 1 Determination of total triterpenoids in sample

样品	吸光度/A	质量浓度/ (mg · L ⁻¹)	质量 分数/%	平均值	RSD/%
1	0.836 1	25.69	3.21%		
2	0.830 5	25.53	3.19%	3.20%	0.31
3	0.832 4	25.58	3.20%		

表2 回收率试验结果

Table 2 The results of recovery test

样品相当于熊果酸含量/ μg	加入熊果酸量/ μg	测得熊果酸量/ μg			平均值/ μg	回收率/%	RSD/%
64.00	11.00	73.10	74.70	74.10	73.97	98.63	0.81

4 结 论

目前尚未见到枸骨根中三萜类化合物含量的研究报道. 本课题组前期已经从枸骨根中分离得到多种三萜类化学成分, 其中已经鉴定出来的有两种, 为熊果酸和 11-羰基- α -香树醇-3 β -棕榈酸酯, 其余两种经初步鉴定其母核结构与熊果酸一致, 故选择熊果酸为标准品. 采用分光光度法, 通过常用的 5% 香草醛—冰醋酸、高氯酸显色法进行三萜的含量测定. 本试验是枸骨根中三萜类成分的首次含量测定, 其测定值为 3.20%, 为其以后的开发使用提供理论参考.

参考文献:

[1] 梅陇. 枸骨根药用 15 款[J]. 家庭中医药, 2008(1):57.

- [2] 曾海波, 曾荣今, 姚飞. 中药枸骨根中槲皮素的提取分离与鉴定[J]. 湖南工程学院学报, 2010, 20(2): 60-62.
- [3] 章剑扬. 中药枸骨根化学成分的研究[D]. 湘潭: 湖南科技大学, 2008.
- [4] 范琳琳, 陈重, 冯育林, 等. 枸骨根的化学成分研究[J]. 中草药, 2011, 42(2): 234-236.
- [5] 李宏杨, 刘国民, 刘飞, 等. 熊果酸及五环三萜同类物的研究进展[J]. 湖南工业大学学报, 2009, 23(5): 18-21.
- [6] Muto Y, Ninomya M, Fuiki H. Present status of research on cancer chemoprevention in Japan[J]. Jpn. J. Clin Oncol, 1990, 20(3): 219-223.
- [7] 李宏杨, 刘飞, 张凤琴, 等. 6 种冬青科苦丁茶总三萜类物质含量的比较研究[J]. 热带生物学报, 2010, 1(1): 17-20.