

邓志勇,潘百明,陈兴田,等. 比色法测定木荷树皮总皂苷的含量[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):281-283.

比色法测定木荷树皮总皂苷的含量

邓志勇,潘百明,陈兴田,梁昌祥,黄宇

(贺州学院化学与生物工程学院,广西贺州 542800)

摘要:建立了比色法测定木荷树皮提取物总皂苷含量的方法。研究香草醛-冰醋酸溶液浓度、高氯酸用量、反应温度和加热时间对显色反应的影响,确定最佳比色条件为以 7% 香草醛-冰醋酸溶液和 0.8 mL 高氯酸溶液作为显色剂,显色温度为 70 ℃,显色时间为 25 min,在 550 nm 处测定吸光度。回归方程为 $y = 4.915x + 0.0832$ ($r^2 = 0.9996$),线性可靠,曲线显著,精密性试验的 RSD 为 0.42%。该比色条件下测得木荷树皮提取物总皂苷含量为 2.25%。该方法操作简单、准确、稳定性较好,可用于测定木荷树皮提取物总皂苷含量。

关键词:木荷;皂苷;比色法;测定

中图分类号:O657.32 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)02-0281-03

木荷(*Schima superba* Gardn. et Champ.)别称“荷木”,属山茶科常绿乔木。目前国内外报道木荷的化学成分主要有水解鞣质类、三萜及皂苷类、挥发油类、表儿茶素、 α -蒎烯醇等。木荷皂苷具有抑制肿瘤细胞生长、驱虫作用^[1-3];同时木荷提取物对小菜蛾和菜粉蝶有较高的生长发育抑制作用、拒食作用等^[4-6]。但是目前还没有关于木荷皂苷提取工艺研究的报道。皂苷的定量是皂苷研究利用的最大难题,皂苷本身没有紫外吸收,也无专一性显色剂,直接测定难度很大。因此本试验对木荷树皮提取物中总皂苷含量的比色法测定工艺进行了研究,为木荷树皮中总皂苷的含量测定提供了快速、简便、准确的参考方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验材料与试剂 木荷树皮:采自广西壮族自治区桂林市临桂县宛田乡,自然晾干后,用高速多功能粉碎机粉碎,粉末于鼓风干燥箱内 60 ℃ 恒温烘干至恒重,过 40 目标准筛备用。

无水乙醇、石油醚、正丁醇、香草醛、高氯酸、冰醋酸、皂苷标准品(纯度 $\geq 98\%$)均为国产分析纯(广东光华化学厂有限公司)。

1.1.2 仪器设备 JP-350A-8 型高速多功能粉碎机(浙江省永康市久品工贸有限公司);FA1004 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);40 目标准筛(江苏省无锡市锡仪建材仪器厂);SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵(河南省巩义市予华仪器有限责任公司);TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);101-1 型电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂)。

收稿日期:2013-10-11

基金项目:广西壮族自治区自然科学基金青年项目(编号:2011GXNSFB018055)。

作者简介:邓志勇(1978—),男,广西临桂人,硕士,讲师,主要从事植物源农药研究及天然药物的开发与利用。E-mail: dengzhiyong05@163.com。

1.2 试验方法

1.2.1 检测波长的确定 精确吸取对照品溶液(准确称取 12 mg 皂苷标准品,加无水乙醇定容到 50 mL,配成 0.24 mg/mL 对照品溶液)0.5 mL 和供试品溶液(称取 20 g 木荷树皮,粉碎,称重,置于索氏提取器中,用 100 mL 无水乙醇回流 10 h;提取结束后趁热抽滤,并将提取液用旋转蒸发仪减压浓缩近干,得到流浸膏,将流浸膏用无水乙醇定容至 200 mL,取用时再稀释 10 倍)0.5 mL 分别加入试管中,于 70 ℃ 水浴挥干溶剂。然后,依次加入 7% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL,70 ℃ 水浴 15 min,水浴后立即用冷水冷却 5 min,停止反应,再加入 1.25 mL 冰醋酸,充分振荡,静置 10 min。在波长 400~700 nm 范围内扫描,分别得到皂苷标准品和木荷树皮提取液的可见光谱扫描图。

1.2.2 标准曲线的测定 准确称取 5 mg 皂苷标准品,放入 50 mL 容量瓶中,再加入乙醇溶解,定容至刻度。准确吸取 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 皂苷标准液置于试管中 70 ℃ 水浴挥干溶剂;然后依次加入 7% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL 和 0.8 mL 高氯酸,70 ℃ 水浴 15 min,水浴后立即用冷水冷却 5 min,停止反应;再加入 1.25 mL 冰醋酸,充分振荡,静置 10 min,在 550 nm 处测定吸光度。平行测定每一个浓度 3 次,并以 3 次的平均吸光度为纵坐标,皂苷标准品的质量为横坐标作图,建立回归线方程。

1.2.3 最佳测定条件的确定

1.2.3.1 香草醛-冰醋酸溶液浓度 精确吸取 0.5 mL 供试品溶液,70 ℃ 水浴挥干溶剂,依次配置 1%、3%、5%、7%、9% 的香草醛-冰醋酸溶液,分别加入香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL,70 ℃ 水浴 15 min,水浴后立即用冷水冷却 5 min,停止反应,再加入 1.25 mL 冰醋酸,充分振荡,测定吸光度。

1.2.3.2 高氯酸用量 准确量取供试样品 0.5 mL 于试管中,并放入 70 ℃ 水浴挥发溶剂,准确量取 7% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL 加入,再分别依次加入高氯酸 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL,充分振荡后于 70 ℃ 水浴静置加热 15 min,取出用冷水冷却,加入 1.25 mL 冰醋酸,以不加供试样品的平行样为空白,测定吸光度。

1.2.3.3 反应温度 准确量取供试样品 0.5 mL, 70 ℃ 水浴挥干溶剂, 然后依次加入 7% 香草醛 - 冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL, 70 ℃ 水浴 15 min, 水浴后立即用冷水冷却 5 min, 停止反应, 再加入 1.25 mL 冰醋酸, 充分振荡, 依次改变水浴温度为 40、50、60、70、80 ℃, 再测定其吸光度。

1.2.3.4 加热时间 准确量取供试样品 0.5 mL, 70 ℃ 水浴挥干溶剂, 然后依次加入 7% 香草醛 - 冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL, 70 ℃ 水浴 15 min, 水浴后立即用冷水冷却 5 min, 停止反应, 再加入 1.25 mL 冰醋酸, 充分振荡, 于 70 ℃ 水浴中分别加热 10、15、20、25、30 min, 测定吸光度。

1.2.4 稳定性试验 精确吸取 0.5 mL 供试品溶液, 70 ℃ 水浴挥干溶剂, 然后依次加入 7% 香草醛 - 冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL, 70 ℃ 水浴 15 min, 水浴后立即用冷水冷却 5 min, 停止反应, 再加入 1.25 mL 冰醋酸, 充分振荡, 分别在 10、20、30、40、50、60、70、80、90 min 时在最大吸收波长处测定吸光度。

1.2.5 精密度试验 取 7 份供试品溶液, 每份 0.5 mL, 70 ℃ 水浴挥干溶剂, 然后依次加入 7% 香草醛 - 冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL, 70 ℃ 水浴 15 min, 水浴后立即用冷水冷却 5 min, 停止反应, 再加入 1.25 mL 冰醋酸, 充分振荡, 测定吸光度。

1.2.6 木荷树皮提取物样品总皂苷含量的测定 称取 20 g 木荷树皮, 粉碎, 称重, 置于索氏提取器中, 用 100 mL 无水乙醇回流 10 h, 提取结束后趁热抽滤, 并将提取液用旋转蒸发仪减压浓缩近干, 得到流浸膏, 将流浸膏用无水乙醇定容至 200 mL, 取用时再稀释 10 倍。取供试品溶液 3 份, 每份精确吸取 0.5 mL, 70 ℃ 水浴挥干溶剂, 然后依次加入 7% 香草醛 - 冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL, 70 ℃ 水浴 15 min, 水浴后立即用冷水冷却 5 min, 停止反应, 再加入 1.25 mL 冰醋酸, 充分振荡, 测定吸光度, 计算样品含量。

2 结果与分析

2.1 检测波长的确定

由图 1、图 2 可以看出, 在 400 ~ 700 nm 波长范围内, 皂苷标准品在 550 nm 附近有最大吸收峰, 木荷树皮提取物在 460 nm 处有最大吸收波长, 综合分析后选择 550 nm 作为木荷树皮提取物总皂苷吸光度的检测波长。

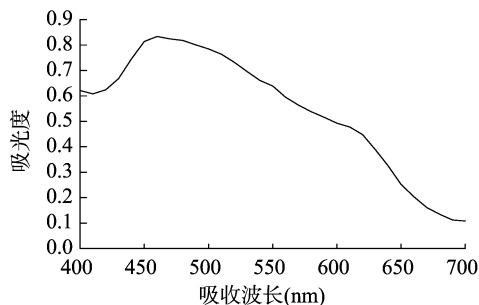


图1 样品的光谱扫描图

2.2 皂苷标准曲线结果与分析

由图 3 可知, $r^2 > 0.999$, 说明线性关系良好, 设计合理, 准确度高。

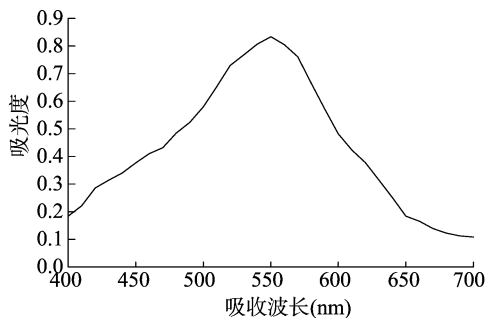


图2 皂苷标准品的光谱扫描图

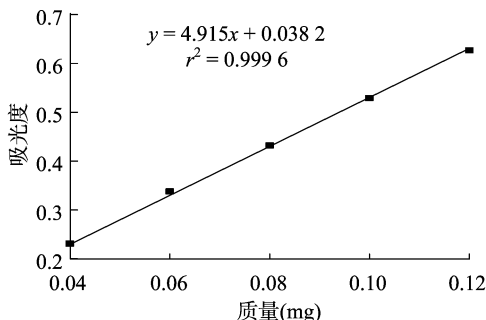


图3 皂苷标准曲线

2.3 最佳测定条件的确定

2.3.1 香草醛 - 冰醋酸溶液浓度 由图 4 可知, 1% ~ 7% 的香草醛 - 冰醋酸溶液吸光度随浓度的升高而增大, 浓度为 7% 时吸光度最高, 浓度大于 7% 时吸光度开始降低, 因此显色反应中香草醛 - 冰醋酸溶液的最佳浓度为 7%。

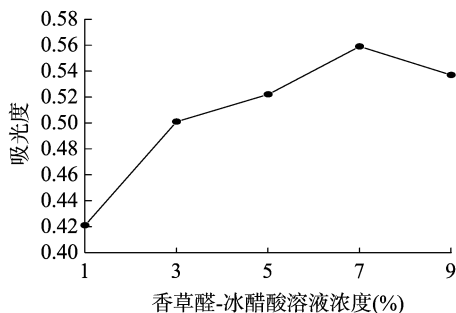


图4 香草醛-冰醋酸溶液的浓度对吸光度的影响

2.3.2 高氯酸用量 由图 5 可知, 在本试验范围内, 高氯酸用量小于 0.8 mL 时, 吸光度逐渐增大, 在 0.8 mL 时有最大吸光度, 大于 0.8 mL 后吸光度又逐渐减小, 因此高氯酸最佳用量为 0.8 mL。

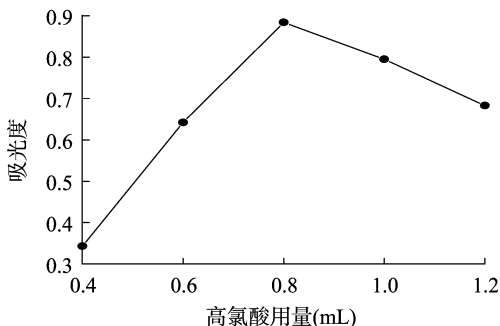


图5 高氯酸用量对吸光度的影响

2.3.3 反应温度 由图 6 可知,在本试验范围内,温度为 70 ℃ 时,吸光度最大,当温度超过 70 ℃ 以后,吸光度开始下降,因此最佳水浴温度为 70 ℃。

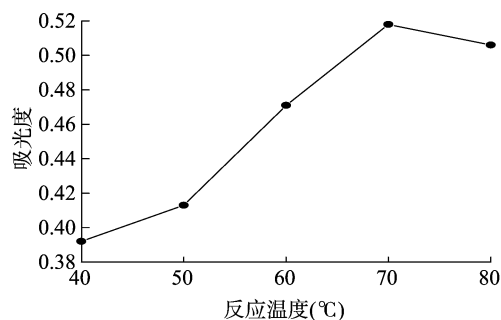


图6 反应温度对吸光度的影响

2.3.4 加热时间 由图 7 可知,在本试验范围内,反应时间在 25 min 时,吸光度最大,因此最适显色时间为 25 min。

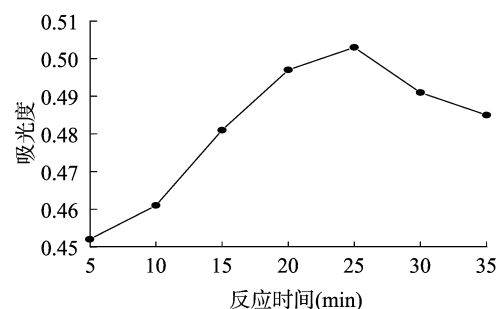


图7 加热时间对吸光度的影响

2.4 稳定性试验

由图 8 可以看出,经香草醛-高氯酸法显色后在 60 min 时数值基本稳定,可以达到测定的要求。

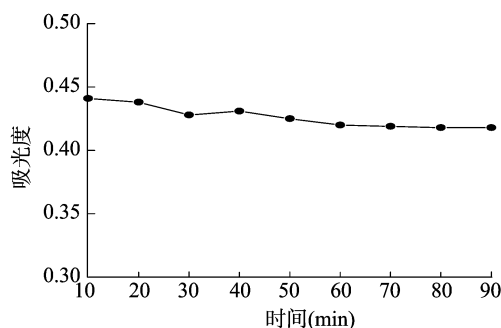


图8 样品显色稳定性试验

2.5 精密度试验

分别准确量取 7 份皂苷样品,每份 0.5 mL,根据香草醛-高氯酸显色用比色法在最佳条件测定供试样品的吸光度(表 1)。通过计算得出相对标准差 $RSD=0.42\%$ ($n=7$),表

表 1 木荷树皮总皂苷含量测定精密度试验结果

试验号	吸光度
1	0.601
2	0.599
3	0.594
4	0.590
5	0.592
6	0.593
7	0.591

明试验重复性好。

2.6 木荷树皮提取物样品总皂苷含量的测定

根据香草醛-高氯酸显色用比色法在最佳条件测定供试样品的吸光度,由标准曲线得到木荷试样品质量浓度,再计算出木荷树皮总皂苷的含量为 2.25%。

3 结论与讨论

通过香草醛-高氯酸比色法对木荷树皮提取物总皂苷含量进行了详细的条件试验,建立了木荷树皮提取物总皂苷含量的测定方法。由试验结果可以得出,以 0.8 mL 的高氯酸溶液和 7% 的香草醛-冰醋酸溶液作为显色剂,显色时间为 25 min,显色温度为 70 ℃ 时,比色体系最佳、最稳定。在 550 nm 下测定所得的回归线方程为 $y=4.915x+0.0832$ ($r^2=0.9996$),精密度试验相对标准差 $RSD=0.42\%$ 。该方法操作简单,准确,稳定性较好,失拟性小,在该条件下测得木荷树皮提取物总皂苷含量为 2.25%。

参考文献:

- [1] Ohtsuki T, Miyagawa T, Koyano T, et al. Acylated triterpenoid saponins from *Schima noronhai* and their cell growth inhibitory activity [J]. J Nat Prod, 2008, 71: 918-921.
- [2] Ohtsuki T, Sato M, Koyano T, et al. Steroidal saponins from *Calamus insignis*, and their cell growth and cell cycle inhibitory activities [J]. Bioorg Med Chem, 2006, 14(3): 659-665.
- [3] 陈维新, 吴大刚. 银木荷皂苷元研究 [J]. 化学学报, 1977, 36(3): 229-232.
- [4] 邓志勇, 邓业成, 刘艳华. 木荷提取物对小菜蛾和菜青虫的拒食活性 [J]. 农药, 2007, 46(12): 854-856.
- [5] 邓志勇. 木荷提取物对小菜蛾和菜粉蝶生长发育的抑制效果 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(4): 129-130.
- [6] 邓志勇, 邓业成, 周国永, 等. 木荷树皮杀虫活性成分追踪的初步试验 [J]. 农药, 2010, 49(8): 612-614.