



不同比色法测定植物源总三萜皂苷含量的对比

陈钰泉,刘玉婷,邱 杰,吴东美,谢文佩,谭 强

(广西中医药大学 药学院,广西南宁 530001)

摘要:为建立多种植物混合提取液总三萜皂苷含量的测定方法,通过比较无患子、艾草、皂荚及茶籽粕 4 种植物源三萜皂苷与人参皂苷 Rh_2 在 4 种显色体系(高氯酸、浓硫酸-甲醇、香草醛乙醇-浓硫酸、香草醛冰醋酸-高氯酸-冰醋酸)中最大吸收波长的差异,选择差异最小的体系作为最佳显色体系测定这 4 种植物源总三萜皂苷。结果表明:高氯酸作为显色体系测得的 4 种植物源三萜皂苷与人参皂苷最大吸收波长的差异最小,作为最佳的检测系统。当无患子、艾草、皂荚及茶籽粕以重量比为 2.0:2.0:1.0:1.5,测得混合提取液总三萜皂苷含量为 $(166.2012 \pm 2.2615) \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。说明高氯酸法简便、可靠且重复性好,可作为无患子、艾草、皂荚及茶籽粕等混合提取液总三萜皂苷含量的测定方法。

关键词:比色法;三萜皂苷;高氯酸;最大吸收波长

植物来源的皂苷包括三萜皂苷和甾体皂苷,因其水溶液振摇后可产生持久性似肥皂溶液的泡沫而得名。在自然界中,三萜皂苷主要分布于无患子科、豆科、茶科、菊科、五加科、桔梗科、远志科、伞形科、葫芦科等植物;而甾体皂苷主要分布于百合科、薯蓣科、玄参科、姜科、豆科等植物中^[1]。无患子(*Sapindus mukurossi*)、皂荚、茶饼和艾草都含有丰富的三萜皂苷,这类皂苷属于一种优良的非离子表面活性剂,具有较好的去污洗涤能力及体外抗菌杀虫、抗氧化活性^[2-4],易于生物降解,在临床上主要应用于各类杀虫止痒、出血症、内科、妇科等疾病。

目前总三萜皂苷的含量测定方法主要是比色法,有关文献报道通过比色法对无患子、茶子粕的皂苷含量进行测定,但由于不同植物来源的皂苷结构有所不同,在不同的比色体系中有不同的最大吸收波长。因此,目前还没有建立一个对多种植物来源的混合提取液总三萜皂苷的检测方法^[5-6]。本文拟以人参皂苷作为标品,通过比较不同植物来源的三萜皂苷与人参皂苷在不同的显色体系中最大吸收波长的差异大小,确定最佳的显色系统,建立一个简便、可靠多种植物混提液总三

萜皂苷含量测定的比色方法,为植物皂苷的综合开发利用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试植物材料为无患子、艾草、皂荚及茶籽粕。试验所用仪器有 TDZS-WS 型离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)、HH-4 型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司)、759S 型紫外分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司)、G48661F 型移液枪(德国艾本德股份公司)、BSA224S 型分析天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司)、HZB-50/A 型流水式商用制冰机(宁波惠康国际工业有限公司);所需试剂有人参皂苷 Rh_2 (上海源叶生物科技有限公司)、壳聚糖(北京索莱宝科技有限公司)、香草醛(天津市大茂化学试剂厂)、高氯酸(天津郑成化学制品有限公司)、冰醋酸(天津市光复科技发展有限公司)、浓硫酸(廉江市爱廉化试剂有限公司)、甲醇(成都市科龙化工试剂厂)。

1.2 方 法

1.2.1 对照品的制备 精密称取 2.1 mg 人参皂苷 Rh_2 ,置于 5 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,摇匀,备用。

1.2.2 供试品溶液的制备 无患子、艾草、皂荚及茶籽粕以重量比为 2.0:2.0:1.0:1.5,添加 8 倍重量的水量,pH7,70℃下提取 3 h,离心,弃去滤渣,在上清液中加入乙醇至其最终浓度 80%以上,静置 1~2 h,离心去沉淀,取上清液,在上清液中加入 1 mL 壳聚糖醋酸溶液(1%)过夜絮

收稿日期:2017-11-24

基金项目:广西自然科学基金资助项目(2014GX NS-FAA118176、2012GXNSFAA276037);南宁市科技计划资助项目(KJT13088);广西中医药大学硕士研究生科研创新资助项目(YJS201608)。

第一作者简介:陈钰泉(1991-),男,在读硕士,从事药物新剂型、新制剂的研制与开发研究。E-mail:912497554@qq.com。

通讯作者:谭强(1977-),男,博士,教授,从事药物新剂型、新制剂的研制与开发研究。E-mail:tan20111102@163.com。

凝^[7-8],离心弃掉沉淀,取上清液加至50 mL量瓶中,至刻度,摇匀,即得混提液供试品。同法制备单种植物的供试品溶液。

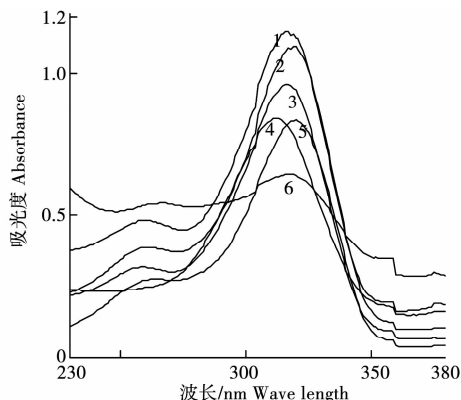
1.2.3 显色方法的选择 总皂苷的含量测定方法多是利用皂苷与浓酸或者强酸的显色反应比色来定量。目前较常用的方法有4种,即高氯酸法^[9]、浓硫酸-甲醇法^[10]、香草醛乙醇-浓硫酸法^[11]和香草醛冰醋酸-高氯酸-冰醋酸法^[12-13]。(1)高氯酸法:取对照品溶液、供试品适量,挥干,精密加入5 mL高氯酸,65℃水浴15 min,取出,冰水冷却2~3 min,以高氯酸为空白对照,在连续波段紫外分光光度计以200~800 nm扫描测定最大吸收波长(Abs)。(2)浓硫酸-甲醇法:取对照品溶液、供试品适量挥干,加新配制的浓硫酸-甲醇(6:1)5 mL后于60℃中水浴20 min,冰水冷却10~15 min,同时摇匀。以浓硫酸-甲醇(6:1)为空白对照,在连续波段紫外分光光度计以200~800 nm扫描测定最大吸收波长(Abs)。(3)香草醛乙醇-硫酸法:取对照品溶液、供试品适量挥干,依次加入0.5 mL香草醛乙醇溶液(8%)和5.0 mL硫酸溶液(72%),摇匀后置60℃恒温水浴1 h,随后取出,冰浴中冷却15 min,制成系列梯度溶液,以0.5 mL香草醛乙醇溶液(8%)和5.0 mL硫酸溶液(72%)为空白对照,在连续波段紫外分光光度计以200~800 nm扫描测定最大吸收波长(Abs)。(4)香草醛冰醋酸-高氯酸-冰醋酸法:取对照品溶液、供试品适量,置15 mL具塞试管中,挥干,精密加入新配制的5%香草醛冰醋酸溶液0.2 mL,高氯酸0.8 mL,60℃水浴加热5 min,取出,冰水冷却后精密加入冰醋酸5 mL,随行空白,在连续波段紫外分光光度计以200~800 nm扫描测定最大吸收波长(Abs)。

2 结果与分析

2.1 高氯酸法结果

由图1可知,人参皂苷Rh₂在312.0 nm有最大吸收,茶籽粕在316.5 nm有最大吸收,皂角在316.5 nm处有最大吸收,无患子在320 nm处有最大吸收,艾草在316 nm处有最大吸收,混提液在319 nm处有最大吸收。从图1中还可看出,无患子、艾草、皂荚及茶籽粕的紫外吸收图谱的最大吸收波长集中在310~320 nm,与人参皂苷的紫外吸收图谱的最大吸收波长312 nm差异较小,这

表明该法适合测定这4种植物源混合提取液总三萜皂苷的含量。



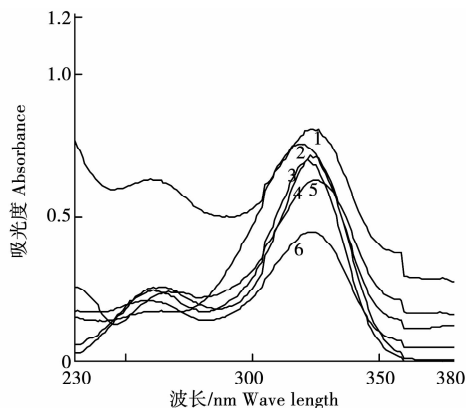
1:茶籽粕; 2:混提液; 3:皂角; 4:人参皂苷Rh₂; 5:无患子; 6:艾草。
1:Tea seed meal; 2: The mixed extracts; 3: *Gleditsia sinensis*;
4: Ginsenoside Rh₂; 5: *Sapindus mukurossi*; 6: *Argy wormwood leaf*.

图1 基于高氯酸法的紫外吸收图谱

Fig. 1 Ultraviolet absorption spectrum of perchloric acid method

2.2 浓硫酸-甲醇法结果

由图2可知,人参皂苷Rh₂在312 nm有最大吸收,茶籽粕在322.5 nm有最大吸收,皂角在322 nm处有最大吸收,无患子在323 nm处有最大吸收,艾草在322.5 nm处有最大吸收,混提液在322.5 nm处有最大吸收。从中可以看出,无患子、艾草、皂荚及茶籽粕的吸收图谱的最大吸收波长集中在310~320 nm,与人参皂苷的紫外吸收图谱的最大吸收波长312 nm差异较小,表明该法同样适合测定这4种植物源混合提取液总三萜皂苷的含量。



1:艾草; 2:人参皂苷Rh₂; 3:皂角; 4:无患子; 5:混提液; 6:茶籽粕。
1: *Argy wormwood leaf*; 2: Ginsenoside Rh₂; 3: *Gleditsia sinensis*;
4: *Sapindus mukurossi*; 5: The mixed extracts; 6: Tea seed meal.

图2 基于浓硫酸-甲醇法的紫外吸收图谱

Fig. 2 Ultraviolet absorption spectrum of concentrated sulfuric acid-methanol method

2.3 香草醛乙醇-硫酸法结果

由图3可知,人参皂苷Rh₂在516 nm有最大吸收,茶籽粕在507.5 nm有最大吸收,皂角在506 nm处有最大吸收,无患子在594 nm处有最大吸收,艾草在506.5 nm处有最大吸收,混提液在476 nm处有最大吸收。从中可看出,皂角、艾草、茶籽粕的紫外吸收扫描图谱的峰型较为相似,但洗手果及混提液的总皂苷在480~580 nm均无明显吸收,表明此法不利于对混提液中总三萜皂苷的测定。

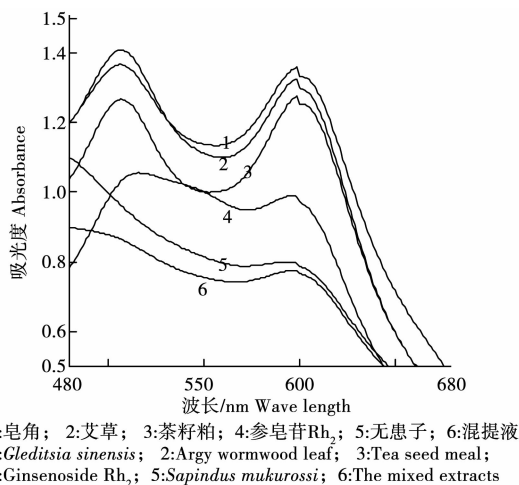


图3 基于香草醛乙醇-硫酸法的紫外吸收图谱
Fig. 3 UV absorption spectrum of vanillin ethanol-sulfuric acid method

2.4 香草醛冰醋酸-高氯酸-冰醋酸法结果

由图4可知,人参皂苷Rh₂在547.5 nm有最大吸收,混提液在473 nm处有最大吸收,无患子在471 nm处有最大吸收,皂角、茶籽粕、艾草在450~620 nm均无最大吸收。从中看出,这4种植物源总三萜皂苷的紫外吸收图谱与人参皂苷的紫外吸收图谱的最大吸收并不在同一范围内,此法不适合作为测定4种植物源混合提取液总三萜皂苷的比色方法。

2.5 总皂苷测定方法的选择

由4个紫外吸收图谱可知,以高氯酸或浓硫酸-甲醇作为显色体系,在200~400 nm波长范围内,人参皂苷Rh₂、无患子、皂角、茶籽粕、艾草及混提液均在300~350 nm的峰型较为相似,且在310~326 nm附近的到最大吸收峰差异较小,但浓硫酸-甲醇需现配现用,显色过程操作繁琐,且

以浓硫酸配置显色体系,操作过程存在一定的危险。而因以香草醛乙醇-硫酸显色体系法或香草醛冰醋酸-高氯酸-冰醋酸显色体系法所得到的4种植物源混合提取液的总三萜皂苷及其各植物提取液的总三萜皂苷与人参皂苷的最大吸收波长的差异较大,因此本文直接选用高氯酸显色法测定4种植物源总皂苷的含量。

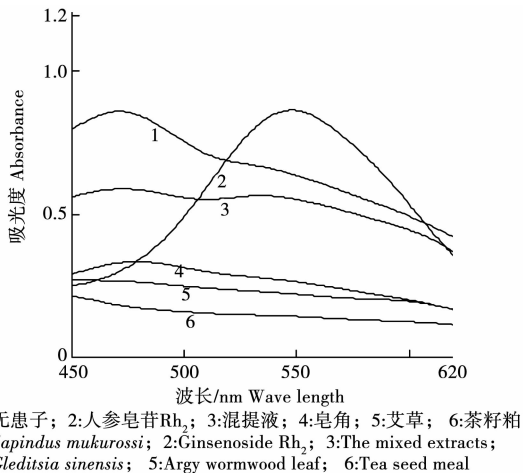


图4 基于香草醛冰醋酸-高氯酸-冰醋酸法的紫外吸收图谱
Fig. 4 UV absorption spectrum of vanillin- acetic acid-perchloric acid-acetic acid method

2.6 高氯酸比色法测定总皂苷的方法学验证

2.6.1 线性关系验证 取对照品适量,精密称取2.1 mg 人参皂苷Rh₂,分别置于5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。分别精密吸取0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL,置具塞试管中,挥干溶剂,按1.2.3(1)中方法,以质量为横坐标,吸光度为纵坐标,在312 nm处测定吸收值,得到回归方程为 $y=7.0381x+0.006$, $R^2=0.9891$,线性范围为0.042~0.21 mg(图5)。

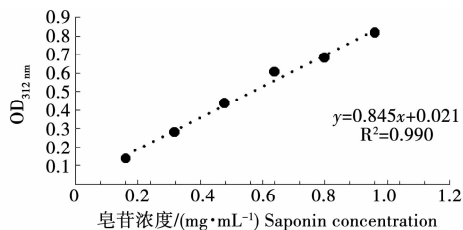


图5 皂苷标准曲线

Fig. 5 Stander curve of saponin

2.6.2 精密度试验 分别精密吸取1 mL 供试品溶液,共5份,按1.2.3(1)方法测定,各结果之间的RSD为1.33%,表明精密度良好(表1)。

表 1 精密度分析
Table 1 Analysis of precision

编号 No.	1	2	3	4	5	平均值 Average	RSD/%
吸光值 Abs.	0.565	0.600	0.588	0.623	0.570	0.589	1.33

2.6.3 重复性 精密称取四种植物粗粉约 6.5 g(无患子、艾草、皂荚及茶籽粕以重量比为 2.0∶2.0∶1.0∶1.5),共 5 份,按“1.2.2”方法制备供试品溶液,再按 1.2.3 中(1)方法测定,各结果之间的 RSD 为 1.04%,表明重复性良好(表 2)。

表 2 重复性分析
Table 2 Analysis of repetitive

编号 No.	1	2	3	4	5	平均值 Average	RSD/%
吸光值 Abs.	0.737	0.711	0.718	0.731	0.721	0.724	1.04

2.6.4 稳定性验证 精密称取 4 种植物的粗粉约 6.5 g(无患子、艾草、皂荚及茶籽粕以重量比为 2.0∶2.0∶1.0∶1.5),共 5 份,按 1.2.2 方法制备供试品溶液,再按 1.2.3(1)方法测定,分别于 0~80 min 内每隔 10 min 测定吸光度,结果表明,供试品溶液在 80 min 内基本稳定,吸光值的 RSD 为 2.35%(表 3)。

表 3 稳定性分析
Table 3 Analysis of stability

时间/min Time	吸光值 Abs.	时间/min Time	吸光值 Abs.
10	0.710	60	0.708
20	0.710	70	0.708
30	0.709	80	0.708
40	0.709	RSD/%	2.35
50	0.708		

2.6.5 加样回收率试验 精密吸取已知含量的总皂苷供试品 6 份,加入对照品溶液适量,按 1.2.2 方法制备供试品溶液,测定吸光度并计算回收率,结果样品的平均回收率为 79.40%,RSD 为 5.79%,表明测定结果具有可靠性(表 4)。

2.7 高氯酸比色法测定多种植物源总皂苷的验证

无患子、艾草、皂荚及茶籽粕以重量比为 2.0∶

2.0∶1.0∶1.5 共称量 6.5 g,按 1.2.2 方法制备供试品溶液,精密取样品溶液,挥干,精密加入高氯酸 5 mL,65 ℃ 水浴 15 min,取出,冰水冷却 2~3 min,312 nm 下测定吸光值,测得总皂苷含量(166.201 2±2.261 5)mg·g⁻¹(表 5)。

表 4 加样回收率分析
Table 4 Analysis of sample recovery

样品测 得量/ μg Content of sample	对照品加入量/ μg The added content of reference substance	测得量/ μg Content of measurement	回收率/% Sample recovery
57.80	21.00	74.03	77.30
53.14	21.00	71.62	87.96
51.72	21.00	69.63	85.26
51.58	21.00	66.79	72.40
50.73	21.00	66.50	75.11
48.90	21.00	65.36	78.40
RSD/%	5.48	平均回收率/%	79.40

表 5 四种植物源混合水提物总三萜皂苷含量分析

Table 5 Analysis of the total content of triterpenoid saponins in mixed water extract from four plant

编号 No.	总三萜皂苷含量/(mg·g ⁻¹) Total content of triterpenoid saponins
1	162.2954
2	167.5420
e	164.0443
4	168.5913
5	166.8425
6	167.8918
$\bar{X}\pm S$	166.2012±2.2615

3 结论

经过对皂苷类含量测定文献的统计与分析,选定 4 种显色体系:高氯酸-浓硫酸-甲醇、香草醛乙醇-硫酸和香草醛冰醋酸-高氯酸-冰醋酸对 4 种植物源总皂苷的含量进行测定分析。发现以香草醛乙醇-硫酸显色体系得到的扫描图中,皂角、艾草、茶籽粕的峰形基本一致,且有两个最大吸收峰,而无患子及混提液均无明显吸收峰,且均与前

三者相差较大。另外,在这一显色体系下得到的人参皂苷 Rh₂ 的峰型明显与其它峰型不一致,表明这一显色体系无法准确测定这 4 种植物源总三萜皂苷。以香草醛冰醋酸-高氯酸-冰醋酸显色体系只能检测到人参皂苷 Rh₂ 及洗手果的单峰,但这两者的峰型明显不一致。同时,这一显色体系无法检测到艾草、皂角、茶籽粕的最大吸收峰,表明这一显色体系无法同时测定这 4 种植物源总三萜皂苷。以高氯酸显色法、硫酸-甲醇显色法得到的扫描图基本一致,且每一种植物及混提液的总皂苷与人参皂苷 Rh₂ 的最大吸收波长均接近,表明这两个显色体系均可作为测定这 4 种植物源总三萜皂苷的方法,但由于甲醇具有低毒且硫酸-甲醇配置过程具有一定的危险性,因此,以高氯酸显色法测定 4 种植物源总三萜皂苷更加简便、安全。显色温度为 65 ℃ 显色体系稳定、重复性好。在 312 nm 下测定总皂苷所得的回归线方程为 $y = 7.0381x + 0.006$, $R^2 = 0.9891$, 线性范围为 0.042~0.21 mg,精密度试验 RSD 为 5.79%,测得混合提取液总三萜皂苷含量为 $(166.201 \pm 2.2615) \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

参考文献:

[1] 匡海学. 中药化学[M]. 北京:中国中医药出版社,2010:227,289-290.

- [2] 黄素梅,王敬文,杜孟浩,等. 无患子总皂苷的提取工艺研究[J]. 安徽农业科学,2010(1):354-356.
- [3] 陈道峰,张敏,邵宇,等. 皂荚总皂苷的纯化与含量测定[J]. 中草药,1995(8):401-402,447.
- [4] 陈为新,殷树梅,林炳旺,等. 皂荚素的提取工艺及其性能分析[J]. 山东化工,2009(4):1-3.
- [5] 周红宇,杨德. 茶皂素水酶法提取工艺及纯化方法[J]. 江苏农业科学,2016(5):362-364.
- [6] 周峰,秦路平,连佳芳,等. 艾叶的化学成分、生物活性和植物资源[J]. 药学实践杂志,2000(2):96-98,103.
- [7] R Li, ZL Wu, YJ Wang, et al. Separation of total saponins from the pericarp of *Sapindus mukorossi* Gaerten by foam fractionation[J]. Industrial Crops & Products,2013,51(6):163-170.
- [8] 刘铁平,薛仲华,杨晓东,等. 壳聚糖复合絮凝剂在茶皂素提取工艺中的应用[J]. 化学世界,1998(7):50-51.
- [9] 岳磊,朱丹妮,严永清,等. 生脉散制剂中总皂苷含量的测定[J]. 中成药,2004(11):39-42.
- [10] 方平美,何朋朋. 硫酸-甲醇法测定劲健胶囊中人参总皂苷含量[J]. 浙江中医药大学学报,2011(5):747-749,752.
- [11] 栾兰,任嘉鹏,王钢力. 注射用双黄连(冻干)总糖及总皂苷的含量测定[J]. 中国民族民间医药,2015(18):10-11.
- [12] 董相军,张彩霞,吕海金. 霞草中总皂苷含量的测定和去污能力的测试[J]. 安徽农业科学,2014(11):3367-3368.
- [13] 周从辉,熊义涛. 康欣胶囊中黄芪总皂苷的含量测定[J]. 中国医院药学杂志,2004(1):54.

Comparison of Different Colorimetry for Determination of the Total Herbal Triterpenoid Saponins

CHEN Yu-quan, LIU Yu-ting, QIU Jie, WU Dong-mei, XIE Wen-pei, TAN Qiang

(Institute of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

Abstract: In order to establish the colorimetric method for determination of total triterpenoid saponins from four herbs including *Sapindus mukorossi*, argy wormwood leaf, *Gleditsia sinensis* and tea seed meal. By analyzing the maximum absorption wavelength of the herbal extracts and ginsenoside Rh₂ in four chromogenic systems included perchloric acid, concentrated sulfuric acid-methanol, vanillin ethanol-sulfuric acid, vanillin-acetic acid-perchloric acid-acetic acid, the optimal system for the determination of total saponins was obtained. The results showed that the best chromogenic system was perchloric acid due to the minimum difference between the maximum absorption wavelength of herbal saponins and that of ginsenoside Rh₂. The total triterpenoid saponins from the mixed extracts from the four herbs with the mass ratio (w/w) of 2.0:2.0:1.0:1.5 were $(166.201 \pm 2.2615) \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$. The colorimetric method for determination of total herbal triterpenoid saponins was convenient, reliable and reproducible, and can be used as the quality control of total saponins from different herbs.

Keywords: colorimetry; triterpenoid saponins; perchloric acid; the maximum absorption wavelength