

比色法测定桔梗中桔梗总皂苷的含量

杨壮,田景奎,张琳(浙江大学药学院现代中药研究所,杭州 310058)

摘要:目的 建立桔梗中桔梗总皂苷的含量测定方法。方法 以香草醛-高氯酸为显色剂,桔梗皂苷 D为对照品,采用比色法测定。结果 比色法测定的线性范围为 0.096~0.672 mg,相关系数为 0.999 97,平均加样回收率为 96.8% (RSD=3.87%, $n=9$)。结论 本法测定准确,重复性好,可用于桔梗药材中桔梗总皂苷的含量测定。

关键词:桔梗;桔梗皂苷 D;桔梗总皂苷;比色法;含量测定

作者简介:杨壮,女,硕士

Tel: (0571) 88208454

E-mail: tj@zju.edu.cn

Determination of Total Saponins Content in Radix Platycodonis by Colorimetric Method

YANG Zhuang, TIAN Jing-kui, ZHANG Lin (Institution of Modern Traditional Chinese Medicine, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determination of total saponin content in Radix platycodonis. **METHODS** Colorimetric method analysis was employed. Vanillin-HClO₄ worked as color developing reagent, and platycodin D was used as the control sample. **RESULTS** The method was linear in the range of 0.096 ~ 0.672 mg, $r=0.999\ 97$, and the average recovery was 96.8% (RSD was 3.87%, $n=9$). **CONCLUSION** The method is accurate, and reproducible that enables the method to be used for the quantitative determination of total saponins in Radix platycodonis.

KEY WORDS: Radix platycodonis; platycodin D; total saponins; colorimetric method; content determination

桔梗 (*Radix platycodonis*) 为桔梗科植物桔梗 (*Platycodon ggrandiflorum* Jacq. A. DC) 的干燥根^[1], 性味苦、辛、平, 归肺经, 有开宣肺气、祛痰排脓之功效, 为常用的祛痰止咳中药^[2]。桔梗中含有大量的三萜皂苷, 已经分离鉴别出近 40 种单体^[3], 如桔梗皂苷 D (platycodin D)、桔梗皂苷 A、桔梗皂苷 B、桔梗皂苷 D₃ 等。现代药理学研究表明, 桔梗皂苷为桔梗主要的药理活性成分^[4]。中国药典 (2005 年版) 采用了重量法测定桔梗总皂苷含量, 该法操作繁琐, 杂质对结果干扰较大。笔者采用香草醛-高氯酸为显色剂, platycodin D 为对照品, 建立用比色法测定桔梗总皂苷含量的方法。

1 仪器与试剂

752PC 型紫外分光光度计 (上海光谱仪器有限公司); DSK-11 型电热恒温水浴锅 (嘉兴中新医疗仪器有限公司); CP225D 型电子分析天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); KQ3200 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); EYELA 旋转蒸发器 (上海爱朗仪器有限公司); 大孔树脂柱 (内径 0.8 cm, 长 20 cm); 对照品 platycodin D (自制, 纯度用归一化法计算在 98% 以上); AB-8 型大孔吸附树脂 (南开大学化工厂); 其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

精密称取经 70 °C 减压干燥至恒重的 platycodin D 8.00 mg, 加 70% 甲醇适量溶解, 置 50 mL 量瓶中, 用 70% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 供试品溶液的制备

取桔梗药材粉末 (过 4 号筛) 约 0.2 g, 准确称定, 置于 150 mL 具塞锥形瓶中。精密加入 50 mL 甲醇后, 准确称重。浸泡 60 min, 超声提取 30 min, 再次称重, 补加甲醇至超声前重量。过滤, 精密移取续滤液 25 mL 于蒸发皿中, 水浴蒸发至干, 用 5 mL 水溶解残留物, 所得溶液缓缓通过已处理好的 AB-8 型大孔吸附树脂柱 (径高比 1:5), 反复上样 5 次后, 以水 50 mL 洗脱, 弃去水液, 之后再以 50 mL 95% 乙醇洗脱, 收集乙醇洗脱液, 蒸干。用 20 mL 水分次将残留物溶解转移至 60 mL 分液漏斗中, 用水饱和的正丁醇萃取 (4 × 20 mL),

合并正丁醇层, 减压蒸干。残留物用 70% 甲醇溶解转移至 10 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 即得。

2.3 测定波长的选择

精密移取 1.5 mL 的对照品及 1 mL 供试品溶液, 于 70 °C 水浴蒸发至干, 加入 5% 香草醛-冰醋酸 (临用新配) 0.2 mL, 高氯酸 0.8 mL, 于 60 °C 水浴显色 15 min 后流水冷却 10 min。加冰醋酸 5 mL, 摇匀。立即在紫外分光光度计于 400 ~ 800 nm 波长下扫描, 同时空白溶液作参比。对照品及供试品的最大吸收波长均在 475 nm, 故选取 475 nm 为检测波长。

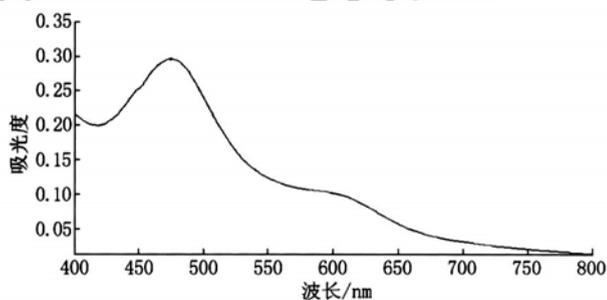


图 1 对照品桔梗皂苷 D 显色后的紫外全波长扫描图

Fig 1 UV Spectrum of Platycodin D after Color Developing

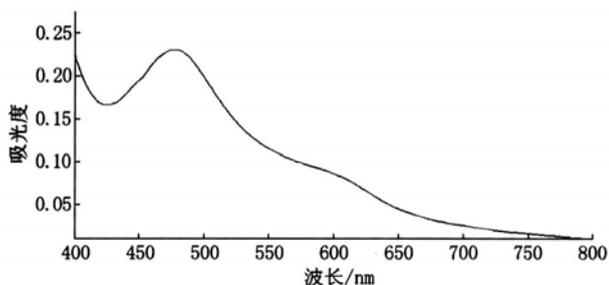


图 2 供试品显色后的紫外全波长扫描图

Fig 2 UV Spectrum of Total Platycosides after Color Developing

2.4 线性关系考察

精密量取对照品溶液 0.60, 1.50, 2.40, 3.30, 4.20 mL, 置具塞试管中, 于 70 °C 水浴蒸发至干, 加入 5% 香草醛-冰醋酸 (临用新配) 0.2 mL, 高氯酸 0.8 mL, 于 60 °C 水浴显色 15 min 后流水冷却 10 min。各加冰醋酸 5 mL, 摇匀, 以同法平

行处理的空白溶剂为空白,在 475 nm 处测定吸光度。以对照品质量 c (mg) 为横坐标,吸光度 A 为纵坐标,使用软件 OriginPro 7.0 进行回归分析,得到回归方程为: $A = 0.0074 + 1.12083c$, $r = 0.99997$,在 0.096 ~ 0.672 mg 内线性关系良好。

2.5 精密度试验

精密吸取对照品溶液 1.5 mL,依“2.4”项下方法显色测定吸收度,连续测定 5 次,结果 RSD 为 0.254%,说明仪器的测试性能良好。

2.6 稳定性试验

取对照品和样品溶液,依“2.4”项下方法操作,按不同时间测定吸光度,结果见表 1。

表 1 稳定性试验结果

Tab 1 Stability data of the method

时间 /min	$A_{\text{对照品}}$	$A_{\text{供试品}}$
1	0.278	0.224
3	0.278	0.225
5	0.277	0.225
10	0.276	0.225
15	0.276	0.224
25	0.276	0.224
40	0.274	0.220
60	0.273	0.215
80	0.269	0.210
100	0.265	0.206

本法在 25 min 内,吸收度值是比较稳定的。测定最好在 25 min 内完成。

2.7 重复性试验

在桔梗药材粉末(过 4 号筛)中称取 6 份样品,0.2 g/份,准确称定,按照 2.2 项下操作,制备 6 份供试品,各准确移取 1 mL,依“2.4”项下方法操作,测定吸收度 A ,计算总皂苷含量。结果平均含量为 1.86%,RSD 为 2.47%。

2.8 加样回收率试验

准确称取已知含量的桔梗药材粉末(过 4 号筛)约 0.1 g/份,共 9 份,加入 platycodin D 适量,按照“2.2”项下方法制备样品液,各取 1.0 mL 样品液,依“2.4”项下方法显色后测定吸收度,计算回收率。结果见表 2。平均加样回收率为 96.8%,RSD 为 3.87% ($n = 9$)。

表 2 加样回收率试验结果

Tab 2 Recovery rate of platycodin D in recovery test

编号	样品量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	加样回收率 /%	平均加样回收率 /%	RSD /%
1	1.87	1.31	3.09	93.2	96.8	3.87
2	1.87	1.31	3.05	90.5		
3	1.86	1.31	3.09	93.9		
4	1.93	1.63	3.52	97.6		
5	1.90	1.63	3.48	97.1		
6	1.87	1.63	3.45	96.7		
7	1.92	1.97	3.91	101.3		
8	1.89	1.97	3.84	99.1		
9	1.87	1.97	3.88	101.8		

2.9 样品测定

十批药材,依“2.2”项下方法制备供试品,各精密移取 1 mL,依“2.4”项下方法测定总皂苷含量,其总皂苷平均含量为 2.08%。结果见表 3。

表 3 桔梗总皂苷含量测定结果 ($n = 3$)

Tab 3 Content Determination Data of Total Platycosides ($n = 3$)

样品批号	药材产地	总皂苷含量 /%	样品批号	药材产地	总皂苷含量 /%
20060825	安徽	1.89	20060905	安徽	2.31
20060827	山东	2.07	20060907	安徽	2.04
20060830	安徽	1.88	20060909	山东	2.26
20060901	安徽	2.22	20060911	安徽	1.96
20060903	山东	2.30	20060913	山东	1.86

3 讨论

3.1 本法采用大孔树脂和萃取相结合的方法纯化桔梗总皂苷,然后用比色法测定,可以减少杂质干扰。该方法精密度高,重复性、稳定性均较好。平均回收率为 95.2%。可用于控制桔梗药材质量。

3.2 Platycodin D 为有 5 个糖的三萜皂苷,其药理活性的报道较多。且目前已经报道的桔梗皂苷单体多为 4 至 7 个糖,Platycodin D 的分子量接近平均相对分子质量。因此选择其作为对照品较已经报道的以人参皂苷 Rb1 作为对照品^[5]测定桔梗总皂苷的方法要合理。

3.3 提取液直接用水饱和正丁醇萃取,萃取后回收正丁醇依 2.4 项下方法显色,进行全波长扫描,得到的全波长扫描图,其最大吸收波长与对照品有较大偏差,可见干扰较大。采用大孔树脂和萃取相结合的方法则可以有效的去除干扰。

3.4 文献中对桔梗总皂苷的纯化,多用非极性的 D101 型大孔吸附树脂^[6-7]。作者考察了包括 D101 在内的不同极性的 8 种大孔吸附树脂对桔梗总皂苷的吸附特性,结果表明弱极性的 AB-8 的吸附率和解吸率均比较理想,故在样品的纯化中选择了 AB-8 型大孔吸附树脂。

REFERENCES

- [1] Ch. P (2005) Vol I (中国药典 2005 年版.一部) [S]. 2005: 225.
- [2] SHU L, GAO S L. Research and development of Platycodon grandiflorum Jacq. A. DC [J]. Chin Wild Plant Resour (中国野生植物资源), 2001, 20(2): 4-6.
- [3] HE M L, CHENG X W, CHEN J K, et al. Saponins isolated from Platycodon grandiflorum Jacq. A. DC and qualitative analysis [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理), 2005, 11(16): 457-460.
- [4] GAO W Y, LI Z L, XIAO P G. Modern research progress of Platycodon grandiflorum [J]. Primary J Chin Mater Med (基层中药杂志), 1996, 10(2): 48-50.
- [5] WU J T, YANG G W, YANG G Y, et al. Extraction and isolation of Platycodin by Ultrasonic-water [J]. J Jinan Univ (Sci &

- Tech) [济南大学学报 (自然科学版)], 2006, 20(2): 135-137.
- [6] YANG X W, LIU M X, LIU G Y, *et al.* Preparing platycodins by water-extracting and macroreticular resin column chromatography-separating[J]. J Yangzhou Univ(Agric & Life Sci) [扬州

大学学报 (农业与生命科学版)], 2002, 23(1): 15-17.

- [7] Xu B J, Zheng Y N. Study on manufactual technology of total saponin from *Platycodon Grandiflorum*[J]. J Dalian Univ(大连大学学报) , 2000, 21(2): 77-79.

收稿日期: 2007-12-30