

DOI:10.11937/bfyy.201701024

# 黑刺菝葜中 6-酮型甾体皂苷含量测定方法

祁雅雯<sup>1</sup>, 王 荣<sup>1</sup>, 赵秋琳<sup>2</sup>, 张存莉<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学 生命科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 沂南县检验检测中心, 山东 临沂 276300)

**摘 要:**以黑刺菝葜为试材,应用紫外可见分光光度法,研究测定其 6-酮型甾体皂苷类化合物含量的方法;以 LG-C 为标准品,依据显色剂对 LG-C 反应的专属性和灵敏度,确定紫外可见分光光度法的显色体系和最大吸收波长;在单因素试验的基础上,通过星点设计-响应面法,确定最适显色反应条件。结果表明:紫外可见分光光度法的显色体系为茴香醛-硫酸法Ⅱ,最大吸收波长为 429 nm;最佳显色温度 82.4 ℃,反应时间 24 min,显色剂用量 1.2 mL。优化反应条件后,在 7.51~50.90 μg 范围内,LG-C 与吸光度值呈良好线性关系, $r=0.996\ 9$ ;平均加样回收率为 103.37%,RSD 2.2%。该方法灵敏度高、专属性强,重复性好,可以作为黑刺菝葜中 6-酮型甾体皂苷含量的测定方法。

**关键词:**黑刺菝葜;6-酮型甾体皂苷;紫外可见分光光度法;星点设计-响应面法

**中图分类号:**R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)01-0107-07

黑刺菝葜(*Smilax scobinicaulis* C. H. Wright)属百合科菝葜属药用植物,通常以其根茎入药,具有除湿、活血、解毒、镇惊息风、抗癌等功效<sup>[1]</sup>,其主要

**第一作者简介:**祁雅雯(1991-),女,硕士研究生,研究方向为天然产物化学及其资源利用。E-mail: yawen\_qi@nwsuaf.edu.cn.

**责任作者:**张存莉(1967-),女,博士,教授,博士生导师,现主要从事天然产物化学和植物资源利用的教学与科研工作。E-mail: cunli\_zhang@nwsuaf.edu.cn.

**基金项目:**国家 863 项目子课题资助项目(2013AA102902-8)。

**收稿日期:**2016-08-05

的化学成分是拉肖皂苷元((25R)-3 $\beta$ -羟基-5 $\alpha$ -螺甾-6-酮,La)及其糖苷 A(拉肖皂苷元-3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基, LG-A)、B(拉肖皂苷元-3-O- $[\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\alpha$ -L-吡喃阿拉伯糖基, LG-B)和 C(拉肖皂苷元-3-O- $[\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $[\alpha$ -L-吡喃阿拉伯糖基-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基, LG-C)等甾体皂苷类化合物,其中 LG-C 含量最高<sup>[2-3]</sup>。这些皂苷具有强烈的抑制癌细胞<sup>[4]</sup>、磷酸二酯酶<sup>[5]</sup>和血小板聚集的活性<sup>[6]</sup>。La 和 LG-C 同时还表现出甾体酮型油菜甾醇类植物激素的生物活性,具有显著地促进种子萌发和幼苗生长等作用<sup>[7-9]</sup>。为了进一步研究

blueberry, cultivar 'Blomidon' of dwarf blueberry was selected as test material, and its young leave transcriptome was sequenced by the second sequencing technology and then was made bioinformatics analysis, the aim was to study the functional genomic information of lowbush blueberry. The results showed that, total about 1 G clean reads could be assembled into 41 929 Unigenes. Among them, Unigenes were involving 45 kinds metabolism and physiological function of biological process, cellular component and molecular function according to the annotation results of dataset GO; 19 149 Unigenes could be annotated by KOG dataset, which were involving in 25 metabolism pathways; 13 072 Unigenes could be annotated by KEGG dataset, which were involving in five major categories, 18 middle categories, and 129 metabolism pathways; 30 738 Unigenes could be annotated by dataset Nr, which were mapping into 32 949 code regions of protein. In the meanwhile, bioinformatics analysis showed that 884 Unigenes were the transcript factor candidate of 55 families, and 2 261 Unigenes were R gene candidate of 18 families, total of 6 591 SSR loci were detected, of which 2 base repeat SSR accounted for about 70%.

**Keywords:** bioinformatics; lowbush blueberry; transcriptome; high-throughout sequencing

并充分开发利用黑刺蒺藜植物资源,亟需建立对这些6-酮型甾体皂苷类化合物定量检测的方法。

目前总皂苷类化合物含量测定主要采用比色法,根据显色体系不同,分为浓硫酸法<sup>[10]</sup>、香草醛-高氯酸法<sup>[11]</sup>、高氯酸法<sup>[12]</sup>、香草醛-硫酸法<sup>[13]</sup>、茴香醛-硫酸法I<sup>[14]</sup>、茴香醛-硫酸法II<sup>[15-16]</sup>等6种。但是高氯酸和浓硫酸不是专属性皂苷显色剂,会对样品中非皂苷类物质产生一定的氧化作用,从而干扰测定<sup>[17]</sup>;香草醛极易被氧化,稳定性较差,且显色不完全,故香草醛-硫酸法不经常使用<sup>[14]</sup>。因此现以LG-C为对照品,选用茴香醛-硫酸法I、茴香醛-硫酸法II和香草醛-高氯酸法3种显色体系进行比较分析,筛选最适合的显色体系,并采用星点设计-响应面法对最佳显色条件进行优化,以期建立精确测定黑刺蒺藜中6-酮型甾体皂苷含量的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试黑刺蒺藜根茎,于2012年10月采自秦岭太白山,由西北农林科技大学生命科学院吴振海副研究员鉴定。

供试试剂:甲醇、无水乙醇、正丁醇、石油醚、乙酸乙酯、浓硫酸、冰醋酸和茴香醛均为国产分析纯;拉肖皂苷C为西北农林科技大学生命科学院生物工程实验室自制<sup>[3]</sup>。

供试仪器:UV-1801型紫外/可见分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司);HH-6型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);FA1004型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);KQ3200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 对照品溶液的制备 精密称取LG-C标准品5 mg,置于25 mL容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀即可(1 mL中含LG-C 0.2 mg)。

1.2.2 供试样品溶液的制备 将黑刺蒺藜的根洗净后阴干,粉碎过筛,取黑刺蒺藜根粉50 g,用65%乙醇回流提取3次,时间分别为90、60、30 min,料液比为1:8 g·mL<sup>-1</sup>,浓缩除乙醇,浸膏用水悬浮后用石油醚萃取,将萃取后的水相过D101大孔树脂,用蒸馏水洗脱除去糖类( $\alpha$ -萘酚浓硫酸显色检测),再用95%乙醇将皂苷完全洗脱(A试剂检测),浓缩除乙醇,残渣用甲醇定容至250 mL。

1.2.3 显色体系与测定波长 1)茴香醛-硫酸法I 精确吸取适量无水乙醇于10 mL棕色容量瓶中,加入1 mL 98%浓硫酸,摇匀后冷却,再精确加入5 mL的

茴香醛混匀,用无水乙醇定容至10 mL,即为5%的茴香醛硫酸乙醇显色剂<sup>[14]</sup>。精确吸取标准溶液和供试溶液各1 mL于具塞试管中,水浴挥干溶剂。加入0.5%茴香醛-硫酸溶液0.5 mL,摇匀,于100℃水浴15 min,取出置冰水浴中10 min,加入无水乙醇定容至5 mL,以茴香醛-硫酸溶液为参比,于400~800 nm波长进行扫描<sup>[14]</sup>,得到扫描图谱。2)茴香醛-硫酸法II 试剂A:精确吸取0.5 mL茴香醛于100 mL棕色容量瓶中,再用乙酸乙酯定容;试剂B:吸取适量乙酸乙酯于100 mL容量瓶中,再加入50 mL浓硫酸,摇匀后冷却,用乙酸乙酯定容<sup>[15-16]</sup>。精确吸取0.2 mL标准溶液和1 mL供试溶液于具塞试管中,水浴挥干溶剂。加入2 mL乙酸乙酯溶解,然后加入1 mL试剂A和1 mL试剂B。混合均匀后,在60℃水浴20 min,冰水浴冷却10 min。以不加标准品的溶液为参比,于400~800 nm波长进行扫描<sup>[15-16]</sup>,得到扫描图谱。3)香草醛-高氯酸法 准确称取香草醛0.2 g于棕色瓶中,加冰醋酸4.0 mL,即为5%香草醛冰乙酸溶液,冷藏;用时现加入高氯酸16.0 mL,摇匀<sup>[11]</sup>。精确吸取标准溶液1 mL于具塞试管中,水浴挥干溶剂。加入5%香草醛-高氯酸溶液1 mL,摇匀,于60℃水浴15 min,冰水浴冷却10 min后用冰醋酸定容至5 mL,以不加标准品的溶液为参比,于400~800 nm波长进行扫描<sup>[11]</sup>,得到扫描图谱。依据显色体系对标准品和供试样品反应的专属性和灵敏度,确定紫外可见分光光度法的显色体系和最大吸收波长。

1.2.4 反应条件优化 单因素试验:经预试验确定显色体系与最大吸收波长,显色条件优化试验均在此条件下进行。以反应温度、反应时间和显色剂用量为影响因素,以吸光值为指标进行单因素试验,确定星点设计-响应面法试验各因素的合理取值范围。星点设计-响应面法试验设计:取标准品溶液,在单因素试验的基础上,以吸光度值(Y)为因变量,选取反应温度( $X_1$ )、反应时间( $X_2$ )和显色剂用量( $X_3$ )3个因素为自变量,优化测定的显色条件。

1.2.5 线性关系考察 分别精密量取1.2.1项下LG-C对照品溶液0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mL,按照1.2.3项筛选的显色体系和优化后的显色条件,在最大吸收波长下进行测定。以吸光度为纵坐标,LG-C含量(mg)为横坐标,绘制标准曲线,得到相应的回归方程。

1.2.6 方法学考察 1)精密度:取同一显色后的标准品溶液连续测定5次,通过计算其RSD值来考察。2)稳定性:取显色后的标准品溶液,在5、10、15、20、

25、30、35、45、60 min 测定吸光度、通过计算其上升率来考察。3) 加样回收率: 精确量取 6 份供试样品溶液, 每份 0.25 mL, 分别加入 0.15 mL 和 0.25 mL 的 LG-C 标准品溶液, 按照优化条件进行显色反应, 进行加样回收率试验。

1.2.7 含量测定 精确量取 4 组供试样品溶液, 每份 0.25 mL, 按照优化后的最佳试验条件, 进行含量测定。以测得的吸光度值  $Y$  通过线性回归方程, 计算供试溶液中 6-酮型甾体皂苷的含量  $X$  值。根据回归方程和式(1)计算黑刺莢蕈根粉中 6-酮型甾体皂苷的含量。  $X = x / (V_0 / V) \cdots \cdots (1)$ 。式中:  $X$  为试样中 6-酮型甾体皂苷的含量, 单位为 mg;  $x$  为从标准曲线上计算的供试溶液中 6-酮型甾体皂苷的含量, 单位为 mg;  $V$  为供试溶液定容的体积, 单位为 mL;  $V_0$  为取测定液的体积, 单位为 mL。

## 2 结果与分析

### 2.1 显色体系与测定波长的选择

由图 1-A 可知, 茴香醛-硫酸法 I 显色法中, 标品与样品的吸收光谱有较大差距, 样品的吸收光谱在 507 nm 处有最大吸收峰, 而标品在 426 nm 和 512 nm 处均有吸收峰, 二者的最大吸收峰不一致, 差距也较大; 由图 1-C 可知, 在香草醛-高氯酸法中, 标品的吸收光谱在 404 nm 处有最大吸收峰, 吸光值为 0.376 6, 在 453 nm 处也有较大吸收峰, 吸光值为 0.371 7, 且在 400 nm 吸光值为正值, 在 401~402 nm 吸光值为负值, 数值变动较大, 不宜采用。由图 1-B 可知, 茴香醛-硫酸法 II 标品与样品的吸收光谱相似, 均在  $(429 \pm 1)$  nm 处有最大吸收峰; 因此, 选择茴香醛-硫酸法 II 为显色方法, 429 nm 为最大吸收波长。

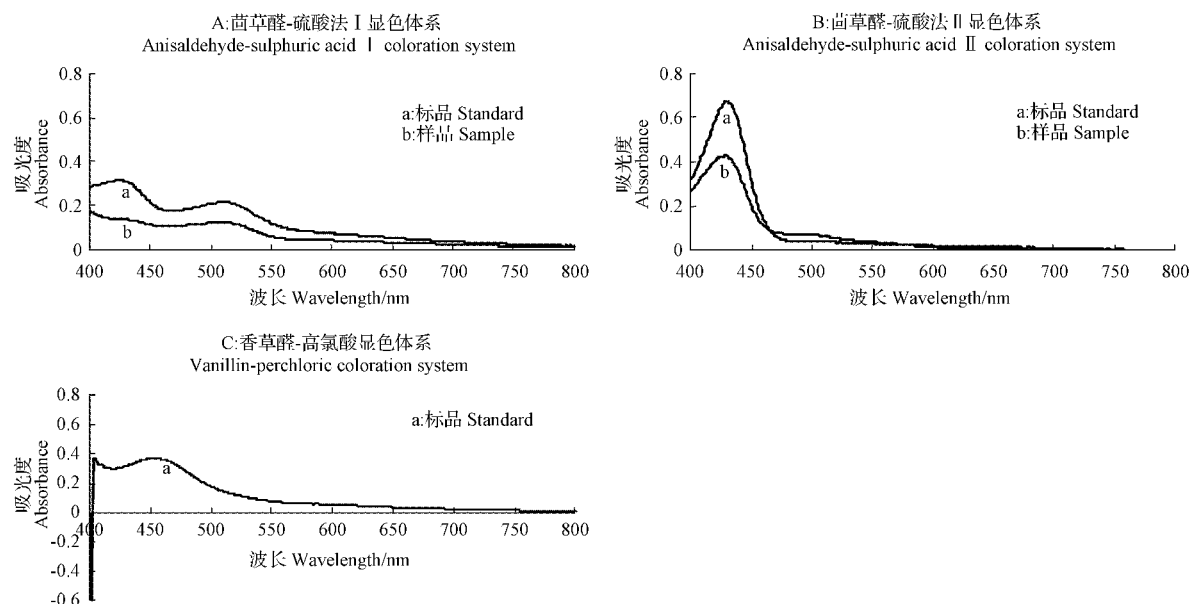


图 1 标准品与样品在 3 种不同显色体系显色后的扫描图谱

Fig. 1 The absorption spectrum of standard and sample treated with three different coloration systems

### 2.2 显色条件的优化

2.2.1 单因素试验结果分析 选定的显色体系为茴香醛-硫酸法 II, 则在单因素试验中, 分析显色温度对吸光度的影响时, 显色温度选取 25、50、60、70、80、90 °C, 显色时间为 20 min, 试剂 A 与试剂 B 用量均为 1.0 mL; 分析显色时间对吸光度影响时, 显色时间选取 0、10、15、20、25、30 min, 显色温度为 80 °C, 试剂 A 与试剂 B 用量均为 1.0 mL; 分析显色剂用量对吸光度的影响时, 显色剂用量的选择中试剂 A 与试剂 B 用量均选取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL, 显色时间为 20 min, 显色温度为 80 °C。显色温度、显色时间和显

色剂用量与吸光度值关系见图 2。由图 2-A 可以看出, 固定显色时间和显色剂用量后, 吸光值随着显色温度的升高而升高, 80 °C 时吸光值达到最大, 大于 80 °C 吸光值开始下降, 因此显色温度为 80 °C 较为适宜。固定显色温度和显色剂用量, 由图 2-B 可以看出, 显色时间低于 20 min 时, 吸光值随着显色时间的增加而升高, 在 20 min 时达到最大值, 随着显色时间继续增加, 吸光值不断减小, 因此显色时间为 20 min 较为适宜。由图 2-C 可以看出, 固定显色温度和显色时间后, 显色剂用量低于 1.0 mL 时, 吸光值随着显色剂用量的加大而升高, 进一步加大显色剂用量,

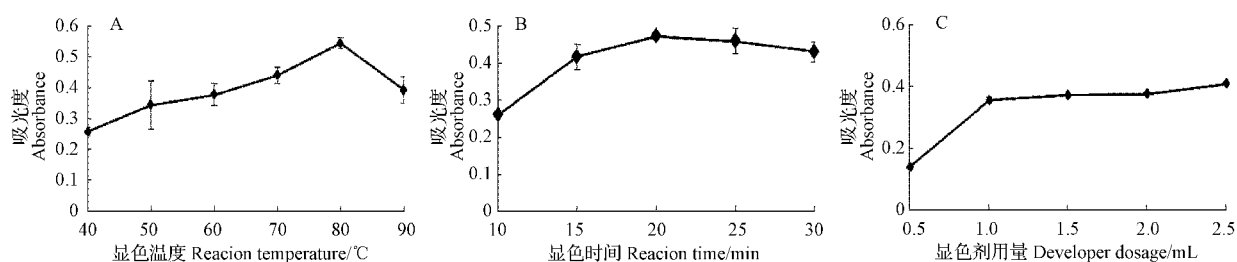


图2 不同显色条件对吸光值的影响

Fig. 2 The influence of different conditions on absorbance

吸光值变化不明显,综合考虑,显色剂用量为1.0 mL较为适宜。

2.2.2 星点设计-响应面法试验结果分析 根据单因素试验的结果,采用星点设计-响应面法进行进一步显色条件的优化。星点设计-响应面法因素水平如表1所示,试验安排与结果如表2所示<sup>[18-20]</sup>。以反应后测定的吸光值(Y)为因变量,选取显色温度( $X_1$ )、显色时间( $X_2$ )和显色剂用量( $X_3$ )3个因素为自变量,用SAS 8.0软件对结果进行多元线性回归和二项式拟合,多元线性拟合模型: $Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3$ ,二项式拟合模型: $Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_4X_1^2+b_5X_2^2+b_6X_3^2+b_7X_1X_2+b_8X_1X_3+b_9X_2X_3$ 。以拟合方程的 $r$ 和 $P$ 值做指标,进行多次拟合,选择 $P$ 和 $r$ 较佳的方程为模型,以指标值为纵坐标,固定3个自变量之一为中值,其它2个自变量为横坐标,绘制效应面和等高线图,从效应面上选取最佳反应条件。吸光值对显色温度、显色时间和显色剂用量分别进行多元线性回归和二次多项式拟合。其多元线性方程为 $Y=-0.578\ 63+0.011\ 92X_1+0.006\ 90X_2+0.025\ 61X_3$ ( $r=0.295\ 3$ , $P=0.132\ 5>0.05$ )。 $P$ 值大于0.05,模型没通过检验,并且该方程的复相关系数均较低,表示自变量与因变量之间的线性相关性较差,不宜采用线性模型。二项式方程为: $Y_1=-24.205\ 87+0.602\ 53X_1+0.130\ 26X_2-1.987\ 85X_3-0.003\ 85X_1^2+0.001\ 55X_2^2-0.713\ 45X_3^2-0.000\ 81X_1X_2+0.042\ 09X_1X_3+0.003\ 64X_2X_3$ ,二项式拟合结果见表3。二项式拟合模型的复相关系数 $r=0.942\ 1$ 根据表中的 $P$ 值,删除最不可信的 $b_3$ 、 $b_7$ 和 $b_9$ 项,重新拟合,结果见表4。重新拟合后的数学模型为: $Y_2=-27.122\ 36+0.663\ 21X_1+0.083\ 62X_2-0.004\ 22X_1^2-0.001\ 92X_2^2-0.941\ 60X_3^2+0.023\ 91X_1X_3$ ,复相关系数 $r=0.904\ 8$ , $P<0.05$ ,相对于线性拟合有大幅提高,方程删除 $b_3$ 、 $b_7$ 和 $b_9$ 项简化后 $r$ 值降幅很小,表明该方程有较大可信度。

根据简化的二项式方程,应用SAS 8.0统计软件绘制响应面和等高线图,由图3~5可以看出,显色条件的范围为:显色温度78.50~89.58℃、显色剂用量为0.75~1.60 mL及反应时间为17.25~29.20 min。综合考虑图中吸光度的最高值所对应的各个显色条件,以及实际操作情况,确定最佳的显色条件为:显色反应温度82.4℃,显色反应时间24 min,显色剂用量1.2 mL。取0.5 mL标准品溶液,用优化所得的显色条件显色,测得吸光值与预测吸光值比较,计算偏差率,以验证比色条件是否准确。试验表明,标准品溶液吸光度实测值为0.966 3,预测值为0.959 9,偏差率为0.667%,偏差较小,表明优化的显色条件可用于LG-C含量的定量检测。

表1 因素水平

Table 1 Levels of independent variables

因素 Factor	水平 Level				
	-1.732	-1	0	1	1.732
反应温度 Reaction temperature/°C	70.00	74.23	80.00	85.77	90.00
反应时间 Reaction time/min	10.00	14.23	20.00	25.77	30.00
显色剂用量 Developer dosage/mL	0.50	0.71	1.00	1.29	1.50

表2 星点试验设计及结果

Table 2 Design and results of the central composite design

序号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	试验值	预测值
Test No.				Experimental value	Predictive value
1	74.23	14.23	0.71	0.453 9	0.456 1
2	85.77	14.23	0.71	0.533 3	0.506 9
3	74.23	25.77	0.71	0.571 8	0.577 6
4	85.77	25.77	0.71	0.561 1	0.520 2
5	74.23	14.23	1.29	0.294 7	0.317 9
6	85.77	14.23	1.29	0.673 9	0.650 4
7	74.23	25.77	1.29	0.455 0	0.463 7
8	85.77	25.77	1.29	0.708 0	0.688 1
9	70.00	20.00	1.00	0.289 7	0.258 0
10	90.00	20.00	1.00	0.441 3	0.496 5
11	80.00	10.00	1.00	0.533 0	0.538 5
12	80.00	30.00	1.00	0.658 4	0.676 4
13	80.00	20.00	0.50	0.545 6	0.571 4
14	80.00	20.00	1.50	0.599 0	0.597 0
15~20	80.00	20.00	1.00	0.762 7	0.762 5

表 3

二次多项式非线性估计结果

Table 3

Quadratic polynomial nonlinear estimation results

	$b_0$	$b_1$	$b_2$	$b_3$	$b_4$	$b_5$	$b_6$	$b_7$	$b_8$	$b_9$
估计值 Estimated value	-24.205 87	0.602 53	0.130 26	-1.987 85	-0.003 85	-0.001 55	-0.713 45	-0.000 81	0.042 09	0.003 64
标准误差 Standard error	3.609 32	0.081 59	0.042 36	0.843 95	0.000 50	0.000 50	0.201 26	0.000 45	0.008 98	0.008 98
$t$	-6.71	7.39	3.07	-2.36	-7.65	-3.08	-3.54	-1.80	4.69	0.41
$P$	0.001 1	0.000 7	0.027 6	0.065 1	0.000 6	0.027 5	0.016 5	0.132 0	0.005 4	0.702 2

表 4

简化后二次多项式非线性估计结果

Table 4

Simplified quadratic polynomial nonlinear estimation results

	$b_0$	$b_1$	$b_2$	$b_4$	$b_5$	$b_6$	$b_8$
估计值 Estimated value	-27.122 36	0.663 21	0.083 62	-0.004 22	-0.001 92	-0.941 60	0.023 91
标准误差 Standard error	4.002 34	0.097 18	0.025 24	0.000 63	0.000 63	0.230 64	0.005 78
$t$	-6.78	6.82	3.31	-6.72	-3.06	-4.08	4.13
$P$	0.000 1	0.000 1	0.010 7	0.000 1	0.015 7	0.003 5	0.003 3

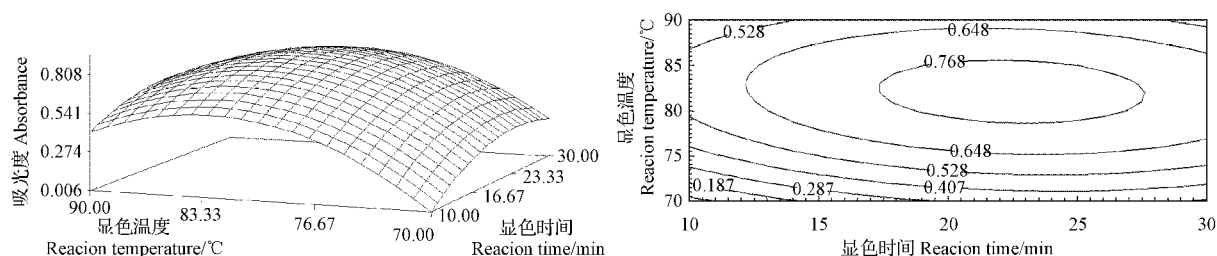


图 3 显色时间和显色温度对吸光度影响的等高线图和三维响应面图

Fig. 3 Reaction time and reaction temperature effects of surface (left) and contour (right)

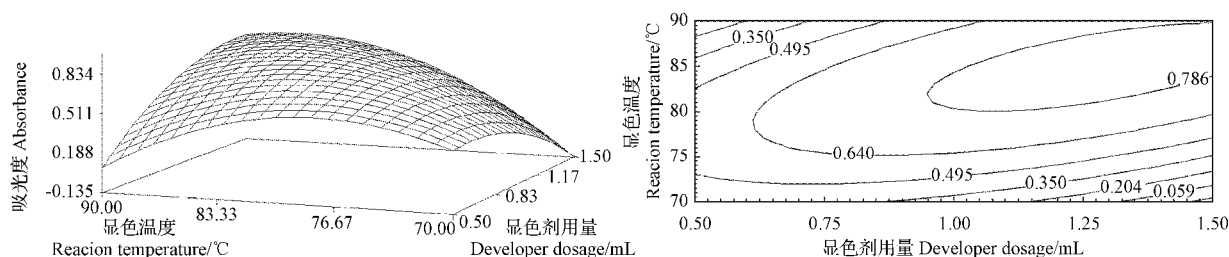


图 4 显色剂用量和显色温度对吸光度影响的等高线图和三维响应面图

Fig. 4 Developer dosage and reaction temperature effects of surface (left) and contour (right)

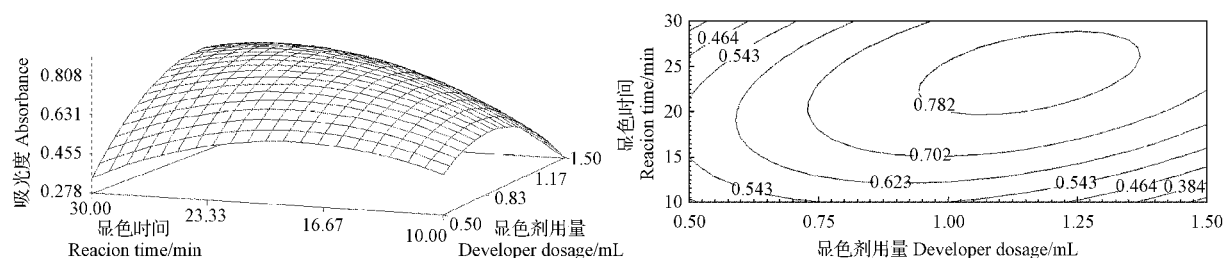


图 5 显色剂用量和显色时间对吸光度影响的等高线图和三维响应面图

Fig. 5 Developer dosage and reaction time effects of surface (left) and contour (right)

### 2.3 线性关系考察

根据 1.2.5 方法,所得结果为 0.060 6、0.177 5、0.268 7、0.330 8、0.445 5。以吸光度为纵坐标, LG-C

含量(mg)为横坐标,绘制标准曲线。得到回归方程: $Y=1.744X-0.006$ ,  $r=0.996\ 9$ 。结果表明, LG-C 在 7.51~50.90  $\mu\text{g}$  与吸光度呈良好线性关系。

## 2.4 方法学考察

2.4.1 精密度 根据 1.2.6 方法,所得吸光度结果见表 5。可以看出,样品溶液吸光度的相对标准偏差(RSD)1.38%,说明该法精密度良好。

表 5 精密度试验

Table 5 Precision data of the method					
序号 Test No.	1	2	3	4	5
吸光度 Absorbance	0.324 3	0.327 1	0.333 6	0.324 7	0.321 8
RSD/ %	1.38				

2.4.2 稳定性 根据 1.2.6 方法,所得吸光度结果见表 6。可以看出,反应结束后 1 h 内,吸光值的稳定性较好。

表 7

加样回收率测定结果

Table 7 Results of recovery of added standard Laxogenin						
样品编号 Sample No.	加入标样体积 Standard sample added/mL	标样中皂苷质量 Saponins content/mg	测得样品总皂苷质量 Total saponins determined/mg	供试样品中皂苷质量 Sample saponins/mg	回收率 Recovery yield/ %	平均值 Mean value/ %
1	0.15	0.03	0.084 9	0.052 0	109.76	103.37
2	0.15	0.03	0.078 7	0.050 5	93.86	
3	0.15	0.03	0.081 3	0.049 5	105.95	
4	0.25	0.05	0.101 1	0.050 2	101.88	
5	0.25	0.05	0.101 6	0.049 6	104.08	
6	0.25	0.05	0.101 2	0.048 9	104.68	

表 8 样品测定结果

Table 8 Quantitative determination of sample							
样品编号 Sample No.	吸光度 Absorbance(A)				皂苷含量 Saponins content /mg	质量分数 Mass fraction/ %	
	A1	A2	A3	A 平均值 A mean value			
1	0.433 6	0.438 9	0.455 0	0.442 5	0.050 5	0.17	
2	0.427 4	0.442 3	0.428 3	0.432 7	0.049 5	0.16	
3	0.418 1	0.413 8	0.433 2	0.421 7	0.048 2	0.16	
4	0.424 1	0.416 0	0.415 2	0.418 4	0.047 9	0.16	
$\bar{X}$				0.428 8	0.047 7	0.16	
S.D				0.011 0	0.001 6	0.000 05	
RSD/ %				2.6	2.5	2.9	

## 3 结论与讨论

通过单因素试验和星点设计-响应面法试验,建立了黑刺蒺藜中 6-酮型甾体皂苷的定量检测方法,其工艺参数如下:选用茴香醛-硫酸Ⅱ为显色体系;最佳显色条件为显色反应温度 82.4 °C,24 min,显色剂用量 1.2 mL;最佳测定波长为 429 nm。该方法专属性强,准确度高,重现性好。

比色法是测定药用植物中总皂苷含量最常见最简便的方法,其显色机理是甾体皂苷分子与浓硫酸、高氯酸等强酸反应后,分子内发生脱水、脱羧、氧化、双键位移以及形成多烯碳正离子等,使皂苷分子在

表 6

稳定性试验

Table 6 Stability data of the method										
时间 Time/min	5	10	15	20	25	30	35	45	60	上升率 / %
吸光值 Absorbance	0.334 0	0.335 0	0.337 0	0.339 0	0.340 0	0.341 0	0.342 0	0.345 0	0.348	4.19

2.4.3 加样回收率试验 根据 1.2.6 和 1.2.7 方法,所得回收率结果见表 7。表明加样回收率控制在 93.86%~109.76%范围内,平均回收率为 103.37%,说明此方法准确可靠,能满足一般分析要求。

## 2.5 6-酮型甾体皂苷的含量测定

从表 8 可以看出,6-酮型甾体皂苷的平均质量分数为 0.16%,RSD 2.9%,说明该方法重复性良好,可以用于测定黑刺蒺藜根中 6-酮型甾体皂苷的含量。

200~600 nm 范围内出现一定程度的吸收<sup>[12]</sup>,以此来定量分析。但是,由于糖等物质与浓硫酸或高氯酸反应后在 200~600 nm 范围内也有吸收,对总皂苷测定造成一定影响。而该研究采用的茴香醛-浓硫酸Ⅱ显色体系,糖类、固醇以及脂肪酸等对其均无影响<sup>[15]</sup>,并且 LG-C 标准品和黑刺蒺藜的粗提取物只在 429 nm 呈现一个明确的吸收峰,响应灵敏,数次重复试验证明此吸收峰非常稳定,说明该显色体系受其它物质干扰小,测定结果准确性高。

该试验考察了茴香醛-浓硫酸的 2 种显色体系对显色的影响。这 2 种显色体系的主要区别是显色剂配制方法不同,茴香醛-硫酸Ⅰ显色体系为 1 mL 浓硫酸、5 mL 茴香醛、4 mL 无水乙醇,茴香醛-硫酸Ⅱ显色体系由 A 液和 B 液组成,A 液为 0.5 mL 茴香醛、99.5 mL 乙酸乙酯,B 液为 50 mL 浓硫酸、50 mL 乙酸乙酯。研究发现,茴香醛被浓硫酸氧化后生成粉红色物质,影响显色效果<sup>[10]</sup>,而茴香醛-硫酸Ⅱ显色体系将茴香醛和浓硫酸在反应前分开,有效解决了这一问题,这可能是茴香醛-硫酸Ⅱ显色体系优于茴香醛-硫酸Ⅰ显色体系的原因之一。该试验首次采用茴香醛-硫酸Ⅱ显色体系建立了定量测定黑刺蒺藜根茎提取物中 6-酮型甾体皂苷总含量的方法,并采用星

点设计-响应面法对显色反应条件进行了优化,提高了检测方法的准确性和实用性。

### 参考文献

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006.
- [2] ZHANG C L,GAO J M,ZHU W. Steroidal saponins from the rhizomes and roots of *Smilax scobinicaulis* [J]. Phytochemistry Letters, 2012,5(1):49-52.
- [3] 张存莉,朱玮,李小明,等. 黑刺蒺藜根中甾体皂苷抗菌活性成分研究[J]. 林业科学,2006,42(9):69-73.
- [4] JIA Z J,JU Y. Steroidal saponins from *Smilax lebrunii* [J]. Phytochemistry,1992,31(9):3173-3175.
- [5] KURODA M,MIMAKI Y,KAMEYAMA A,et al. Steroidal saponins from *Allium chinense* and their inhibitory activities on cyclic AMP phosphodiesterase and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase[J]. Phytochemistry Oxford, 1995,40(4):1071-1076.
- [6] MIMAKI Y,KAWASHIMA K,KANMOTO T,et al. Steroidal glycosides from *Allium albopilosum* and *A. ostromianum* [J]. Phytochemistry,1993,34:799.
- [7] 马力,罗军勇,王维彦,等. 拉肖皂苷 C 对西瓜种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 北方园艺,2011(24):22-24.
- [8] 郭杰,管桦,张存莉,等. 拉肖皂苷元和拉肖皂苷 C 对油菜种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 北方园艺,2010(24):12-13.
- [9] 王维彦,张存莉. 拉肖皂苷元和拉肖皂苷 C 对玉米种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 种子,2011,30(12):15-17,20.
- [10] 薛晓娟,陈晓青,李珏. 紫外分光光度法测定知母中总皂苷的含

量[J]. 药物分析杂志,2006,26(11):1659-1662.

- [11] 王瑞海,柏冬,刘丽梅. 比色法测定大蒜提取物中大蒜总皂苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(14):53-56.
- [12] 吉宏武,丁霄霖. 百合总皂苷定量测定方法的研究[J]. 林产化学与工业,2003,23(4):54-58.
- [13] 张慧慧,刘明言,凌宁生. 香草醛-硫酸测定甘草浸膏中甘草酸含量[J]. 化工进展,2013,32(1):180-183,193.
- [14] 陈行愉,韩丽萍. 比色法测定知母总皂苷含量[J]. 时珍国医国药,2010,21(6):1412-1413.
- [15] BACCOU J C,LAMBERT F,SAUVAIRE Y. Spectrophotometric method for the determination of total steroidal saponin[J]. Journal of Analyt,1977,102:458-465.
- [16] UEMATSU Y,HIRATA K,SAITO K,et al. Spectrophotometric determination of saponin in yucca extract used as food additive[J]. Journal of AOAC International,2000,6(83):1451-1454.
- [17] 邓雅婷,刘莉,刘美佑,等. 不同显色剂对续断皂苷含量测定的影响[J]. 时珍国医国药,2011,22(11):22-23.
- [18] TANVEER A W,AJAZ A,SEEMA Z,et al. Use of response surface methodology for development of new microwell-based spectrophotometric method for determination of atorvastatin calcium in tablets[J]. Chemistry Central Journal,2012(6):134-143.
- [19] 王利民,肖志刚,刘宇欣,等. 响应面法优化板栗基营养剂挤压加工参数[J]. 吉林大学学报(工学版),2013,43(2):550-556.
- [20] 徐伟,凌伟坚,褚克丹,等. 响应面法优化车前子油的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(23):3253-3257.

## Study on Content Determination of 6-ketone Steroidal Saponins From *Smilax scobinicaulis*

QI Yawen<sup>1</sup>, WANG Rong<sup>1</sup>, ZHAO Qiulin<sup>2</sup>, ZHANG Cunli<sup>1</sup>

(1. College of Life Science, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100; 2. Inspection & Testing Center, Linyi, Shandong 276300)

**Abstract:** To develop a method for the determination the contents of 6-ketone steroidal saponins from *Smilax scobinicaulis* C. H. Wright, using LG-C as standard substance, different chromogenic agents, the optimal UV-VIS spectrophotometry and the optimize the chromogenic condition were studied. The results showed that the proposed method was anisaldehyde sulphuric acid II in the circumstances, and, the maximum absorption wavelength was 429 nm. The optimal temperature was 82.4 °C, the best reaction time was 24 min, and 1.2 mL chromogenic agent was fitted. The calibration curve of LG-C showed good linearity in the range of 7.51—50.90 μg, with  $r=0.996\ 9$ . The recovery was detected to be 103.37%, with RSD being 2.2%, respectively. The established colorimetric method provided sensitive, specific and accurate for determination of 6-ketone type steroidal saponins in *Smilax scobinicaulis* C. H. Wright.

**Keywords:** *Smilax scobinicaulis* C. H. Wright; 6-ketone type steroidal saponins; UV-VIS spectrophotometry; CCD-RSM