

文章编号 :1009-038X(2002)05-0519-06

## 萝摩科植物 $C_{21}$ 甾甙含量的测定方法

宋俊梅<sup>1,2</sup>, 刘红蕾<sup>3</sup>, 丁霄霖<sup>1</sup>

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036; 2. 山东轻工业学院 食品与生物工程学院, 山东 济南 250000; 3. 山东大学 生命科学学院, 山东 济南 250100)

**摘要:**在确定了  $C_{21}$  甾甙提取方法定量测定官能团反应方法的基础上, 建立了  $C_{21}$  甾甙含量的测定方法, 主要包括标准物的选择、方法的建立及对方法的检验和评价。结果表明, 该方法符合分析要求, 可用于萝摩科植物  $C_{21}$  甾甙含量的定量测定。

**关键词:**萝摩科;  $C_{21}$  甾甙; 定量测定方法

中图分类号: Q 946.83

文献标识码: A

### A Method for Quantitative Determination of $C_{21}$ Steroidal Glycosides from Asclepiadeceae Plants

SONG Jun-mei<sup>1,2</sup>, LIU Hong-lei<sup>3</sup>, DING Xiao-lin<sup>1</sup>

(1. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. School of Food and Bioengineering, Shandong Institute of Light Industry, Jinan 250000, China; 3. College of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

**Abstract:** In order to determine the content of  $C_{21}$  steroidal glycosides in Asclepiadaceae plants and homologous health food, a method for quantitative determination was established based on their extraction technique and the functional group reactions. The choice of standard, the establishment of the method, and the evaluation of the method were studied. The results showed that this method accorded with the demands of analysis, and could be used to determine the content of  $C_{21}$  steroidal glycosides quantitatively.

**Key words:** Asclepiadaceae;  $C_{21}$  steroidal glycosides; quantitative determination method

$C_{21}$  甾甙是萝摩科植物中普遍存在的化学成分。在体外实验中,  $C_{21}$  甾甙具有清除超氧阴离子自由基<sup>[1]</sup>和羟自由基<sup>[2]</sup>的能力; 在动物实验中, 它能够调节免疫功能<sup>[3]</sup>、抵抗内源性自由基对机体的氧化损伤<sup>[4]</sup>。因此,  $C_{21}$  甾甙受到广泛的重视。但由于  $C_{21}$  甾甙相互之间在结构上有较大的差异性, 缺乏统一的定量方法。鉴于  $C_{21}$  甾甙具有明显的药理活性, 急

需建立一种常规的  $C_{21}$  甾甙含量测定方法。这一方法的建立, 有助于广泛地测定萝摩科植物中  $C_{21}$  甾甙的含量。通过比较和筛选, 寻找含有  $C_{21}$  甾甙的新药源; 同时还可用于以  $C_{21}$  甾甙为主要成分的药品和保健食品中  $C_{21}$  甾甙的定量测定, 从而对其进行质量监控。有关这方面的研究目前尚未见报道。作者在研究了  $C_{21}$  甾甙的提取方法和磺基醋酸汞试剂

收稿日期 2001-12-25; 修订日期 2002-03-20.

作者简介: 宋俊梅(1964-), 女, 山东临邑人, 工学博士, 副教授。

万方数据

法定量测定  $C_{21}$  甾甙的基础上,建立了  $C_{21}$  甾甙含量的测定方法。

## 1 分光光度法特点与标准物的选择

### 1.1 分光光度法特点

$C_{21}$  甾甙从结构上属于 3-羟基甾族化合物,而定量测定此类化合物的最成熟可靠的方法就是磺基醋酸汞试剂法。磺基醋酸汞试剂与  $C_{21}$  甾甙元的  $C_3-OH$  反应呈色,可用分光光度法定量测定  $C_3-OH$  来直接测定  $C_{21}$  甾甙元,从而间接测定  $C_{21}$  甾甙。

分光光度法是建立在各种官能团的特征化学反应基础上的,因此,所给的反应可用于具有相同基团的不同分子,但显出的颜色和反应的产率会随测试的化合物而异,因为这些因素主要取决于整个分子结构。所以,通常官能团分光光度法分析如同容量分析法一样,不能作绝对测定<sup>[5]</sup>。由未知物所得的结果,必须在相同条件下,与已知量的纯化合物所制得的标准曲线相比较才能得到准确结果。因此,首先要进行标准物的选择。

### 1.2 标准物的选择

由于  $C_{21}$  甾甙是一类化合物,各种甾甙间既有糖基的区别,又有甙元的差异,进行统一的定量非常困难,只有通过其共同具有的  $C_{21}$  甾甙元的  $C_3-OH$  的定量来间接定量  $C_{21}$  甾甙。各种  $C_{21}$  甾甙元之间的差异比各种  $C_{21}$  甾甙间的差异小得多,甙元的

$C_{21}$  甾甙体母核相同,均有  $C_3-OH$  和  $C_{12}$  位酯基,各甙元之间的区别主要是母核上 2~3 个取代羟基的数目或位置不同,以及  $C_{12}$  位的酯基不同。由于  $C_{21}$  甾甙具有共同的  $C_{21}$  甾甙体母核和  $C_3-OH$ ,用定量 3-羟基甾族化合物的磺基醋酸汞试剂法对其进行统一的近似定量是可能的。

对单一化合物的定量,其标准物的选择也就是选择纯品的待测物本身;而作为一类化合物的定量,标准物的选择却是最困难但又是最关键的因素。对于  $C_{21}$  甾甙定量测定的标准物的选择,应基于它既能代表所有各种  $C_{21}$  甾甙元最典型的基本结构,又有标准品可得的原则。在对大量类似化合物进行筛选后,决定使用 Sigma 公司产品孕甾烯醇酮 (pregnenolone)。孕甾烯醇酮具有与  $C_{21}$  甾甙元共同的  $C_{21}$  甾甙体母核和  $C_3-OH$ ,从结构上分析适合作为  $C_{21}$  甾甙元的标准物,而且也曾从天然植物中分离到以孕甾烯醇酮为甙元、 $C_3-OH$  与糖基结合的  $C_{21}$  甾甙。也就是说,孕甾烯醇酮本身也是一种  $C_{21}$  甾甙元<sup>[6]</sup>。孕甾烯醇酮和白首乌  $C_{21}$  甾甙元的结构比较可见图 1。

尽管理论上孕甾烯醇酮作为  $C_{21}$  甾甙元的标准物是很好的选择,然而实际情况仍需实验验证。关于用孕甾烯醇酮作为  $C_{21}$  甾甙元标准物的可靠性,从孕甾烯醇酮和白首乌  $C_{21}$  甾甙元两者与磺基醋酸汞试剂反应的吸收曲线的近似性和反应曲线的近似性得到进一步验证。

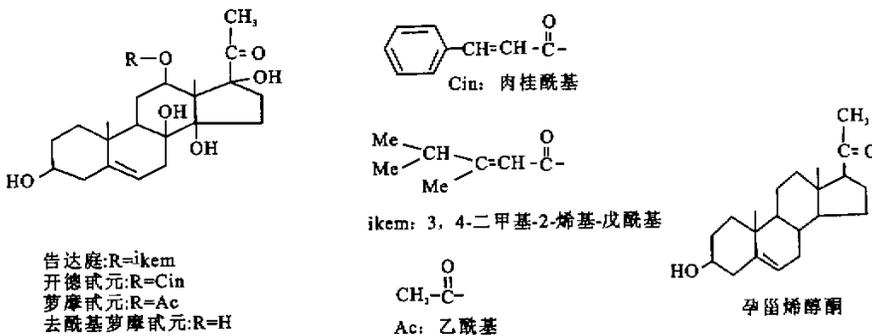


图 1 几种  $C_{21}$  甾甙元和孕甾烯醇酮的结构示意图

Fig. 1 Sketch map of the structure of some kinds of  $C_{21}$  steroidal glycosides and pregnenolone

## 2 孕甾烯醇酮与磺基醋酸汞试剂反应的吸收曲线和反应曲线

### 2.1 孕甾烯醇酮与磺基醋酸汞试剂反应的吸收曲线

取 0.06 mg/mL 的孕甾烯醇酮冰乙酸溶液

1 mL,加磺基醋酸汞试剂 5 mL,混匀,25 °C 静置 40 min,反应液呈红棕色,与  $C_{21}$  甾甙元和磺基醋酸汞试剂的颜色相同。以 1 mL 冰乙酸代替标准液,同样处理作为对照,于紫外可见分光光度计(753BI 微型,上海光学仪器厂制造)上进行可见光区的吸光度测定,结果如图 2、图 3 所示。

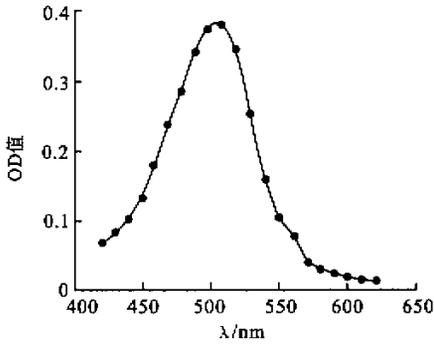


图 2 孕甾烯醇酮的吸收曲线

Fig.2 Absorbing curve of pregnenolone

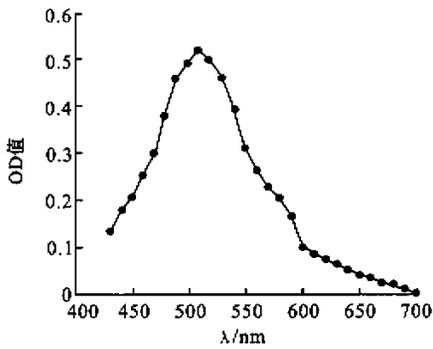


图 3  $C_{21}$  甾甙的吸收曲线

Fig.3 Absorbing curve of  $C_{21}$  steroidal glycosides

将图 2 中的孕甾烯醇酮的吸收曲线与图 3 中的  $C_{21}$  甾甙的吸收曲线<sup>[6]</sup>比较可见, 两条吸收曲线的峰形非常接近, 最大吸收波长均为 510 nm, 说明孕甾烯醇酮和  $C_{21}$  甾甙元两者与磺基醋酸汞试剂反应的产物呈色性质类似, 即孕甾烯醇酮在与磺基醋酸汞试剂的反应方面可以代表  $C_{21}$  甾甙元的性质. 因此可以说, 用孕甾烯醇酮作为  $C_{21}$  甾甙元的标准物是可行的.

### 2.2 孕甾烯醇酮与磺基醋酸汞试剂反应的曲线

取 0.06 mg/mL 的孕甾烯醇酮冰乙酸溶液 1 mL, 加磺基醋酸汞试剂 5 mL, 混匀, 25 °C 静置, 于 510 nm 处每隔 10 min 测定 1 次吸光值, 得孕甾烯醇酮的反应曲线(见图 4). 由图 4 与图 5 比较可见, 孕甾烯醇酮的反应曲线与  $C_{21}$  甾甙元的反应曲线也极相似, 均在反应 30 min 时达到峰值, 能稳定 1 h 以上. 这说明, 孕甾烯醇酮和  $C_{21}$  甾甙元两者与磺基醋酸汞试剂反应的速度以及呈色产物的稳定性也是一致的. 结果进一步表明, 用孕甾烯醇酮作为  $C_{21}$  甾甙元的标准物是可行的, 孕甾烯醇酮能够代表  $C_{21}$  甾甙元的基本结构和性质.

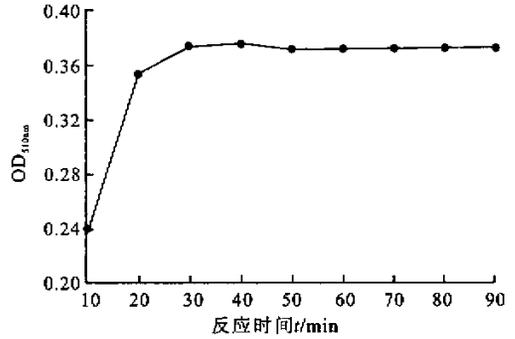


图 4 孕甾烯醇酮的反应曲线

Fig.4 Reaction curve of pregnenolone

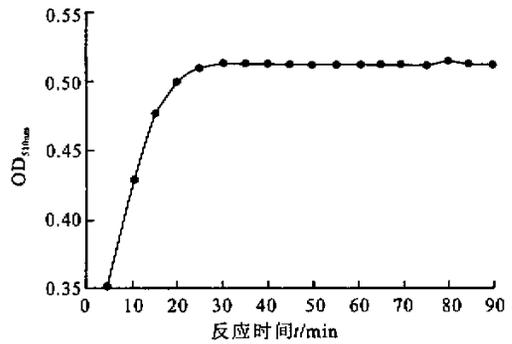


图 5  $C_{21}$  甾甙的反应曲线

Fig.5 Reaction curve of  $C_{21}$  steroidal glycosides

## 3 $C_{21}$ 甾甙测定方法的确定

### 3.1 测定条件的确定

综合孕甾烯醇酮及白首乌  $C_{21}$  甾甙与磺基醋酸汞试剂反应的吸收曲线和反应曲线, 发现最大吸收波长均为 510 nm, 反应开始后 30 min 吸光度值达到峰值, 30~90 min 内呈色稳定. 因此, 磺基醋酸汞试剂法测定  $C_{21}$  甾甙含量的反应条件和测定条件设定为: 含样品的冰乙酸溶液 1 mL, 加磺基醋酸汞试剂 5 mL, 混匀, 室温静置 40 min, 于 510 nm 处测定吸光度值.

### 3.2 标准曲线的制备

精确吸取 0.15 mg/mL 的孕甾烯醇酮冰乙酸溶液 1 2 3 4 5 6 7 8 9 mL, 用冰乙酸溶液分别定容于 10 mL 的容量瓶中, 混匀, 然后分别精确吸取上述各溶液 1 mL 于具塞试管中, 各准确注入磺基醋酸汞试剂 5 mL, 混匀, 室温静置 40 min, 在 510 nm 下测定其吸光度值. 以吸光度值对标样的质量浓度作图, 经线性回归即得标准曲线, 如图 6 所示. 回归方程为  $Y = 0.008491 + 5.953X$  (方程中 X 的单位为 mg/mL), 线性相关系数为 0.9997.

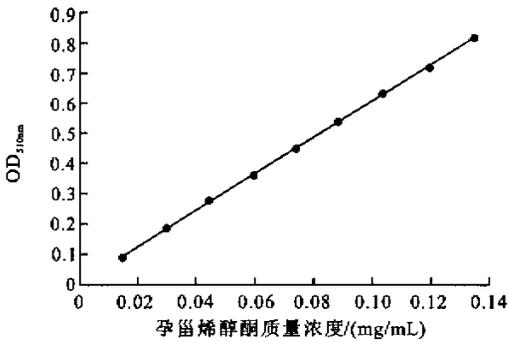


图6 孕甾烯醇酮与磺基醋酸汞试剂反应的标准曲线

Fig. 6 Standard curve of the reaction of pregnenolone and reagent

### 3.3 萝藦科植物中 $C_{21}$ 甾甙测定方法的最后确立

综合  $C_{21}$  甾甙的提取方法和作者的测定方法, 萝藦科植物中的  $C_{21}$  甾甙含量测定方法确立为: 2 g 粉碎度为 40 目的样品, 用 95% 的乙醇 50 mL 进行索氏抽提 4 h; 用冰乙酸冲洗抽提瓶, 并定容至 100 mL, 混匀, 再准确吸取 5 mL, 用冰乙酸定容至 100 mL, 精确吸取 1 mL 样品液于具塞试管中, 准确加入磺基醋酸汞试剂 5 mL, 混匀, 室温静置 40 min, 于 510 nm 波长处测定其吸光度值. 以此吸光度值作为孕甾烯醇酮标准曲线回归方程中的  $Y$ , 求出方程中  $X$ , 然后按下式计算原料中的  $C_{21}$  甾甙含量. 也可以从标准曲线上直接求出原料中  $C_{21}$  甾甙的含量. 然而需要指出的是, 由于通过  $C_3$ -OH 的定量实际上是分子定量, 而孕甾烯醇酮的相对分子质量比一般的  $C_{21}$  甾甙元的相对分子质量小, 比  $C_{21}$  甾甙的相对分子质量小得多, 用此方法所得结果比实际含量偏低. 因此, 测定结果上必须注明“按孕甾烯醇酮计”的字样.

## 4 方法评价

一个好的分析方法应具有良好的检测能力、可靠的测定结果及广泛的适用性<sup>[9]</sup>. 检测能力通常用检出限来表征. 测定结果的可靠性, 取决于测定过程中的随机误差和系统误差. 随机误差决定了结果的精密度, 而系统误差决定了测定结果的准确度. 分析方法的适用性是指它所适用的被测组分的含量(质量浓度)范围, 也指对不同组分试样的适用性. 对被测组分的含量(质量浓度)范围的适用性, 通常用工作曲线的线性范围来衡量; 对不同组分试样的适用性, 通常用分析方法的抗干扰能力来说明, 或者直接用不同组成试样检验. 因此, 为了全面地评价一个分析方法, 应该给出评价分析方法的基

本参数: 检出限、精密度、准确度、工作曲线的线性范围、抗干扰能力或者对不同组分试样的分析结果.

### 4.1 检出限的测定

检出限是指能产生一个确证在试样中存在被测组分的分析信号所需要的该组分的最小含量或最小质量浓度. 以孕甾烯醇酮为标样, 按测得吸光度 OD 值为 0.01 为准进行测定试验, 本方法的最低检出质量浓度为 0.23 mg/dL. 但有研究者指出<sup>[10]</sup>, 具有足够精密度的被测化合物的最小量取决于所用仪器的精密度, 因而认为 OD 值为 0.3 即相当于透射比为 50% 时的样品质量浓度更为科学. 因为在任何分光光度计上, 在这个 OD 值附近作精确的读数是有可能的. 本方法用孕甾烯醇酮的标准曲线计算得 OD 值为 0.3 时, 孕甾烯醇酮的质量浓度为 4.9 mg/dL 时就可进行准确定量. 从以上结果得知, 无论按检测限, 还是 OD 值为 0.3 的样品质量浓度, 两者的数值都较低. 因此可以说, 本方法的检出灵敏度是可靠的.

### 4.2 精密度、准确度和基体干扰情况的测定

为获得本方法测定  $C_{21}$  甾甙含量的准确度和精密度等用于评价方法可靠性的指标, 作者选用和测定了 4 种萝藦科植物原料, 进行了重复性测定和加标回收试验. 这 4 种植物原料分别为: (1) 白首乌 (*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight, 去皮块根); (2) 徐长卿 (*C. paniculatum* Kitag, 根); (3) 大理白前 (*C. forestii* Schltr, 根); (4) 白薇 (*C. atratum* Bunge, 根). 其中 (1) 由江苏滨海首乌制品厂提供; (2)(3)(4) 购于江苏省无锡市荣康药店.

**4.2.1 不同样品重复测定试验——精密度和适用性的测定** 选取不同含量  $C_{21}$  甾甙的上述 4 种原料, 按前述操作方法各重复 5 次, 进行提取、反应和测定, 计算测定结果的平均值、标准偏差和相对标准偏差. 结果如表 1 所示. 5 次重复测定的相对标准偏差均小于 5%, 说明方法的精密度较高, 具有广泛的适用性.

**4.2.2 加标回收试验——准确度的测定** 准确吸取一定体积已知  $C_{21}$  甾甙质量浓度的样品液, 准确添加等体积的已知质量浓度的孕甾烯醇酮标准液, 混匀, 用本实验方法测定混合液的  $C_{21}$  甾甙终质量浓度. 以混合液中  $C_{21}$  甾甙终质量浓度减去混合液中样品液所提供的  $C_{21}$  甾甙的终质量浓度, 除以混合液中标样终质量浓度, 计算出标样回收率. 选择以上 4 种样品, 每种重复测定 5 次. 由表 2 结果可见, 4 种样品加标测定的平均回收率在 (99.2 ±

2.7)% ~ (99.4 ± 1.8)% 之间,总平均回收率为 (99.3 ± 2.1)% ,说明方法的准确度较高.

表 1 用本法重复测定样品的重现性

Tab.1 Recurrence performance of the results determining samples with this method

测定序号	C <sub>21</sub> 甾甙质量浓度/(g/dL)			
	白首乌	徐长卿	白前	白薇
1	1.10	2.09	1.43	4.39
2	1.05	2.12	1.51	4.32
3	1.04	2.13	1.39	4.47
4	1.11	2.20	1.45	4.26
5	1.05	2.16	1.47	4.51
平均值	1.07	2.14	1.45	4.39
标准偏差	3.2	4.2	4.5	10.3
相对标准偏差	3.0	2.0	3.1	2.3

4.2.3 标准曲线法与标准加入法对比试验——基体干扰情况的测定 有些杂质干扰,虽可在扣除本底时予以扣除,但在测定反应过程中可能有一部分与 C<sub>21</sub>甾甙反应产生基体效应.因此,为进一步验证方法的可靠性,作者还进行了标准曲线法和标准加入法对比试验<sup>[11]</sup>.具体作法是 2 g 白首乌用体积分数为 95% 的乙醇 50 mL 进行索氏抽提 4 h,用冰乙酸冲洗抽提瓶,定容至 100 mL,再取 25 mL 定容至 50 mL 称此溶液为样液 A.质量浓度为 0.15 mg/mL 的孕甾烯醇酮冰乙酸溶液,称为标液 B. A 液和 B 液按表 3 混合配制,用冰乙酸定容后,精确吸取 1 mL 加 5 mL 磺基醋酸汞试剂,混匀,室温静置 40 min,于 510 nm 波长处,测定其各自的吸光度,为 OD<sub>510nm</sub>(总值).不加标液的测定值为 OD<sub>510nm</sub>(样液值).以 OD<sub>510nm</sub>(总值)减去 OD<sub>510nm</sub>(样液值),作为 OD<sub>510nm</sub>(标准加入值).具体配制方法和测定结果见表 3.

表 2 加标回收试验结果

Tab.2 Results of recovery experiments by adding

样品名称	混合液中样品液所提供的 C <sub>21</sub> 甾甙的终质量浓度/(mg/mL)	混合液中加标量终质量浓度/(mg/mL)	混合液中测得的 C <sub>21</sub> 甾甙终质量浓度/(mg/mL)	回收率/%	平均回收率/%
白首乌	0.0213	0.0200	0.0419	101.5	99.2 ± 2.7
		0.0200	0.0420	101.7	
		0.0200	0.0399	96.6	
		0.0200	0.0415	100.0	
		0.0200	0.0397	96.1	
徐长卿	0.0428	0.0400	0.0842	101.7	99.4 ± 1.8
		0.0400	0.0809	97.7	
		0.0400	0.0815	98.4	
		0.0400	0.0814	98.3	
		0.0400	0.0835	101.2	
白前	0.0296	0.0300	0.0582	97.7	99.3 ± 1.9
		0.0300	0.0581	97.4	
		0.0300	0.0591	99.2	
		0.0300	0.0599	100.5	
		0.0300	0.0607	101.8	
白薇	0.0872	0.0800	0.1638	98.0	99.3 ± 2.6
		0.0800	0.1604	95.9	
		0.0800	0.1711	102.3	
		0.0800	0.1653	98.9	
		0.0800	0.1695	101.4	

总平均回收率数据

99.3 ± 2.1

表3 标准加入法溶液配制方法和测定结果

Tab. 3 Solution preparation and test results of standard adding

管号	混合液配制方法		OD <sub>510nm</sub>	OD <sub>510nm</sub>
	A液	B液	(总值)	(标液加入值)
	混合液			
1	1 mL	0 mL→10 mL	0.077	0
2	1 mL	1 mL→10 mL	0.178	0.101
3	1 mL	2 mL→10 mL	0.258	0.181
4	1 mL	3 mL→10 mL	0.360	0.283
5	1 mL	4 mL→10 mL	0.436	0.359
6	1 mL	5 mL→10 mL	0.528	0.451
7	1 mL	6 mL→10 mL	0.613	0.536
8	1 mL	7 mL→10 mL	0.716	0.639

标准曲线法和标准加入法的对比试验结果如表4和图4所示。

表4 标准曲线法和标准加入法对比试验结果

Tab. 4 Comparison between the test results of standard curve and standard adding

C <sub>21</sub> 甾甙标液质量浓度/(mg/mL)	C <sub>21</sub> 甾甙质量浓度/(mg/mL)	
	标准曲线法	标准加入法
0	0	0
0.015	0.102	0.101
0.030	0.199	0.181
0.045	0.275	0.283
0.060	0.367	0.359
0.075	0.451	0.451
0.090	0.539	0.536
0.105	0.632	0.639
直线回归方程	$Y=0.00849+5.95 X$	$Y=0.00480+5.98 X$
相关系数	0.999 7	0.999 2

由表4可见,标准加入法曲线的斜率和截距与标准曲线均很接近,线性关系也较好,相关系数为0.999 2。从图7可看出,两条曲线非常接近,而两条

## 参考文献:

- [1] 宋俊梅,丁霄霖.白首乌对超氧阴离子自由基清除作用的研究[J].食品科学,1997,18(9):61-64.
- [2] 宋俊梅,丁霄霖.白首乌中C<sub>21</sub>甾甙及甾甙元清除羟自由基的功能[J].无锡轻工大学学报,1998,17(2):43-46.
- [3] 宋俊梅,王增兰,丁霄霖.白首乌总甙对小鼠免疫功能的影响[J].无锡轻工大学学报,2001,20(6):588-593.
- [4] 宋俊梅,王元秀,丁霄霖.白首乌C<sub>21</sub>甾甙抗氧化作用的研究[J].食品科学,2001,22(12):22-25.
- [5] M.佩塞兹.有机化合物及药物的比色法和荧光测定法[M].夏锦尧编译.北京:中国人民公安大学出版社,1989.7.
- [6] 林启寿.中草药成分化学[M].北京:科学出版社,1977.
- [7] 邓勃.分析测试数据的统计处理方法[M].北京:清华大学出版社,1995.
- [8] M.佩塞兹.有机化合物及药物的比色法和荧光测定法[M].夏锦尧编译.北京:中国人民公安大学出版社,1989.446.
- [9] 元晓梅,刘贵贤,胡正芝.比色法测定柑桔饮料及桔皮制剂中总黄酮含量[J].食品与发酵工业,1996(3):13-21.

万方数据

回归曲线则几乎重叠.用以上两条标准曲线分别计算样液A中的C<sub>21</sub>甾甙质量浓度,结果分别为0.011 51 mg/mL和0.012 07 mg/mL,两数据相对标准偏差为4.75%,小于5%.因此可认为,本法已经扣除本底,不存在基体干扰,可以直接使用标准曲线法,测定结果可靠。

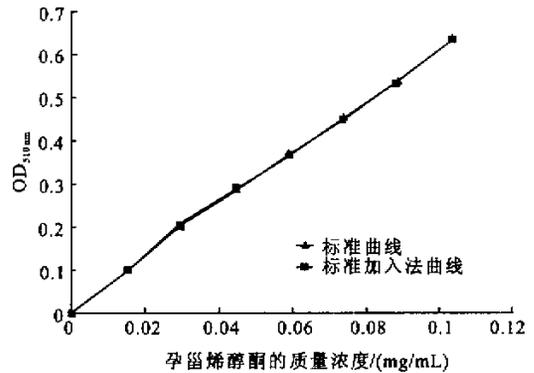


图7 标准曲线与标准加入法曲线的比较

Fig. 7 Comparison between the standard curves and standard adding

## 5 结 语

从C<sub>21</sub>甾甙元的结构特点出发,选择了用孕甾烯醇酮作为标准品,用磺基醋酸汞试剂法作为定量反应的分光光度法,通过孕甾烯醇酮与磺基醋酸汞试剂反应的吸收曲线及反应曲线和白首乌C<sub>21</sub>甾甙元的同类型曲线比较,验证了孕甾烯醇酮作为C<sub>21</sub>甾甙元标准品的可行性,然后制备了标准曲线.选择4种萝藦科植物原料进行样品的重复测定试验、加标回收试验,以及标准曲线法与标准加入法的对比试验,从而对该方法的准确度和精密度等进行了分析.结果表明,重复测定4种植物原料的相对标准偏差小于5%,加标测定的总平均回收率为(99.3±2.1)%,并且不存在基体干扰,可以直接使用标准曲线法。

(责任编辑 朱明)