

天冬中呋甾皂苷含量测定方法的建立

沈 阳, 陈海生*, 徐从立, 徐红利

(第二军医大学药学院天然药物化学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 采用 E 试剂比色法建立了天冬总皂苷含量测定方法。**方法:** 用对二甲氨基苯甲醛-HCl 乙醇液的发色体系, 以天冬皂苷 AC-9 作为指标, 在波长 510 nm 测定天冬总皂苷含量。**结果:** 标准曲线在 0.08~0.40 mg 范围内线性关系良好, 平均回收率为 99.79% (RSD=1.05%)。**结论:** 此法可作为评价天冬总皂苷的质量标准。

[关键词] 天冬; 呋甾皂苷; E 试剂; 分光光度法

[中图分类号] R 282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)05-0548-02

A method for determination of furostanol saponins in saponins extract from *Radix Asparagi*

SHEN Yang, CHEN Hai-sheng*, XU Cong-li, XU Hong-li (Department of Natural Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish an Ehrlich reaction-colorimetry method for determining furostanol saponins in saponins extract from *Radix Asparagi*. **Methods:** Based on the coloration reaction between furostanol saponins and *p*-dimethylamino-benzaldehyde, a colorimetry method was established to determine the content of furostanol saponins in saponins extract from *Radix Asparagi* at 510 nm. Saponins AC-9 was measured as reference in the determination. **Results:** The standard curve of saponins AC-9 showed good linearity in the range of 0.08-0.40 mg and the average recovery was 99.79% (RSD=1.05%). **Conclusion:** This method is rapid, accurate and easy to be carried out, and it can be used to control the quality of *Radix Asparagi*.

[KEY WORDS] *Radix Asparagi*; furostanol saponins; Ehrlich; spectrophotometry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(5): 548-549]

天冬(*Radix asparagi*)为百合科植物天门冬[*Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr.]的块根, 养阴润燥, 清肺生津, 其味甘、苦, 性寒, 归肺肾经, 为传统中药。临床主要用于治疗肺燥干咳, 顿咳痰粘, 咽干口渴, 肠燥便秘等症^[1]。近年来, 国内外对天冬的化学成分、药理作用与应用进行了系统的研究, 取得了重要进展。天冬主要含有皂苷类、糖类、氨基酸等成分, 药理研究表明天冬具有抗氧化与抗衰老、抗肿瘤、抗菌等作用。甾体皂苷是天冬所含的一类重要活性成分, 为天冬皂苷的主要有效成分, 本文以天冬皂苷 AC-9 为指标化合物, 采用 E 试剂比色法测定其含量, 并进行方法学考察, 建立了天冬总皂苷中呋甾皂苷的含量测定方法, 并对采自湖北黄石 3 批天冬药材进行了含量测定。

1 仪器和试剂

UV-250 紫外分光光度计(日本 Shimadzu 公司); BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。对二甲氨基苯甲醛、浓盐酸、无水乙醇三氯化铁(均为 AR 级, 上海化学试剂公司), ZTC-1(天津正天澄清剂有限公司), 其他试剂均为分析纯。天冬皂苷 AC-9 对照品(自制, 经 HPLC/ELSD 分析纯度>98.0%)。

2 方法和结果

2.1 样品制备

2.1.1 E 试剂的配制 密称取对二甲氨基苯甲醛 2.508 g, 加入 65% 硫酸溶液溶解, 加入三氯化铁试液 0.05 ml, 摇匀,

即得, 临用前配制。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取天冬皂苷 AC-9 对照品 8.0 mg, 置 10 ml 量瓶中, 加入 60% 乙醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取天冬药材 100 g, 适度烘干后经小型粉碎机得粗粉, 加入 10 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 合并提取液, 滤过, 回收溶剂, 得天冬提取物。取天冬提取物, 上大孔吸附树脂 ZTC-1 柱, 用蒸馏水和 20% 乙醇洗脱至洗脱液无色, 弃去; 再用 70% 乙醇洗脱至 10% 硫酸乙醇溶液皂苷显色阴性为止, 回收洗脱液至干, 得天冬总皂苷样品。

精密称取天冬总皂苷样品 9.0 mg, 置 10 ml 量瓶中, 加入 60% 乙醇水溶液至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2 系统适应性实验

2.2.1 测定波长的选择 精密量取天冬皂苷 AC-9 对照品溶液及供试品溶液各 0.3 ml 分别置于具塞磨口试管中, 再分别加入对二甲氨基苯甲醛试剂 4 ml, 盐酸乙醇溶液 2 ml, 密塞摇匀, 以随行试剂(60% 乙醇)做为空白, 于 70℃ 水浴中加热 2 h, 取出后立即用冰浴冷却, 对照品及供试品均作

[基金项目] 国家自然科学基金(20472113), Supported by National Natural Science Foundation of China(20472113).

[作者简介] 沈 阳, 硕士生。

* Corresponding author. E-mail: haisheng@hotmail.com

400~600 nm 波段扫描,在 510 nm 处两者有最大吸收,故选择 510 nm 作为测定波长。

2.2.2 标准曲线的制备 分别精密吸取 0.8 mg/ml 对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 ml 于磨口试管中,分别加入 60%乙醇 0.4、0.3、0.2、0.1、0 ml,摇匀,再分别加入对二甲氨基苯甲醛试剂 4 ml,盐酸乙醇溶液 2 ml,密塞摇匀,于 70℃水浴中加热 2 h,取出后立即用冰浴冷却,以随行试剂(60%乙醇)做为空白,于 510 nm 处测定光密度;以光密度 D 为纵坐标,天冬皂苷 AC-9 量(X , mg)为横坐标得回归方程为: $D=1.1613X+0.0713$ ($r=0.9993$)。表明在 0.08~0.40 mg 范围内对照品光密度与样品量呈良好的线性关系。

2.2.3 精密度实验 精密量取天冬皂苷 AC-9 对照品溶液 6 份,每份 0.30 ml,按上述方法测定其光密度,得其平均值为 0.419,RSD 为 0.34%。由此结果可得出,精密度结果符合规定,可以满足天冬中呋甾皂苷含量测定的要求。

2.2.4 稳定性实验 精密量取天冬皂苷 AC-9 对照品溶液 0.30 ml,按上述方法显色,分别在显色后 0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 h 测定其光密度,得其 RSD 为 1.02%。天冬样品溶液显色后室温放置 4 h 内光密度无变化,说明其室温放置 4 h 内稳定,满足天冬呋甾皂苷含量测定的要求。

2.2.5 重现性实验 分别称取天冬总皂苷约 9.0 mg,共 6 份,按供试品溶液的制备项下制备 6 份供试品溶液(以 60%乙醇为空白),显色后测定光密度,代入标准曲线计算其天冬总皂苷含量为 91.61%,RSD 为 0.778%。由结果可知,样品的重复性结果符合含量测定的方法学要求。

2.2.6 回收率实验 称取已知含量的天冬总皂苷样品约 4.5 mg,加入天冬皂苷 AC-9 对照品约 4.0 mg,置于 10 ml 量瓶中,用 60%乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,按上述方法显色后测定光密度,计算其平均回收率为 99.79%,RSD 为 1.05%($n=6$)。样品的加样回收率试验结果符合含量测定方法学的要求。

2.3 药材有效部位皂苷的含量测定 取 3 批湖北黄石产天冬,每批 2 份,按照“供试品溶液的制备方法”制备供试品溶液,精密量取 0.40 ml,显色后测量光密度。用标准曲线计算供试品溶液中的天冬总皂苷中呋甾皂苷的含量。3 批样品的含量测定结果表明,呋甾皂苷的平均含量均>90.83%。

3 讨论

呋甾皂苷为 F 环裂解的双糖链皂苷,可与对二甲氨基苯甲醛的盐酸乙醇溶液(E 试剂)作用并显红色,为其定性鉴别的专属反应。

该法所测定的光密度随对二甲氨基苯甲醛和盐酸乙醇液的浓度,用量变化而改变。E 试剂最好在配制后 3 d 内使用,盐酸乙醇液易挥发,浓度易变,应及时配制使用并密封保存。另外,还与加热温度,加热时间和测定时间有关。水浴冷却后宜在 4 h 内测定,测定尽量迅速,因其显色后光密度随时间而变。

对该法进行了方法学研究,发现天冬皂苷 AC-9 标准曲线在 0.08~0.40 mg 范围内线性关系良好,平均回收率为 99.79%(RSD=1.05%)。此法简单、方便,有一定专属性,可以作为天冬中呋甾皂苷的测定方法,用于控制天冬及其制剂的质量。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海:上海人民出版社, 1977:318-320.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999: 64-65.
- [3] 杜旭华,郭允珍. 抗癌植物药的开发研究Ⅳ. 中药天冬的多糖类抗癌活性成分的提取与分离[J]. 沈阳药学院学报, 1990, 7: 197-200.

[收稿日期] 2006-03-14

[修回日期] 2006-04-19

[本文编辑] 尹 茶

Proteome analysis of hepatocellular carcinoma by laser capture microdissection

Ai J, Tan Y, Ying W, Hong Y, Liu S, Wu M, Qian X, Wang H (International Cooperation Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Institute, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[ABSTRACT] Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most frequent visceral neoplasia worldwide and is a multifactorial and multistage pathogenesis that finally leads to the deregulation of cell homeostasis. Laser capture microdissection (LCM) may allow a more ready identification of differences in protein expression in selected cell types or areas of tissue, and microscopic regions as small as 3-5 microm in diameter can be sampled. Here we applied the LCM to the proteomic study of hepatitis B-related HCC and surrounding non-tumor tissues. Proteome alterations were observed using 2-DE and ESI-MS/MS, and alterations in the proteome were examined. Twenty protein spots were selected, of which 11 proteins were significantly altered in the HCC compared with the surrounding non-tumor tissues. Of the proteins that were selected, peroxiredoxin 2, apolipoprotein A- I precursor, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II, and 14.5-kDa translational inhibitor protein appear to be novel candidates as useful hepatitis B-related HCC markers. This study indicates that LCM is a useful technological method in the proteomic study of cancer tissue. The proteins revealed in this experiment can be used in the future for studies pertaining to hepatocarcinogenesis, or as diagnostic markers and therapeutic targets for HCC associated with hepatitis B virus infection.

[Proteomics, 2006, 6: 538-546]