

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2010.06.003

## 山东肿足蕨总三萜化合物含量测定\*

张华丽 朱 军 高桂花

(济宁医学院药学院, 山东 日照 276826)

**摘要 目的** 建立山东肿足蕨药材总三萜化合物的含量测定方法。**方法** 以齐墩果酸为对照品,以5%香草醛-冰醋酸溶液,浓硫酸为显色系统,采用紫外分光光度法测定总三萜化合物含量。**结果** 齐墩果酸在4.6~73.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  范围呈良好的线性关系( $r=0.9984$ ),测定样品回收率为100.6%,RSD为1.1%。**结论** 该法简便、快速、灵敏,可作为测定山东肿足蕨药材三萜化合物的含量测定方法。

**关键词** 山东肿足蕨;总三萜化合物;含量测定;紫外分光光度法

**中图分类号**:R927.2 **文献标志码**:A **文章编号**:1000-9760(2011)03-160-04

### Determination of total triterpenes in *Hypodematium sinense* Iwatsuri

ZHANG Hua-li, ZHU Jun, GAO Gui-hua

(College of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

**Abstract: Objective** To establish a simple and accurate method for determination of total triterpenes in *Hypodematium sinense* Iwatsuri. **Methods** With oleanolic acid as the standard the content of total triterpenes was measured by spectrophotometry with 5% vanillin-glacial acetic acid solution and sulfuric acid as developing agent and detected in *Hypodematium sinense* Iwatsuri. **Results** The calibration curve of oleanolic acid had good linear relationship in the range of 4.6~73.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $r=0.9984$ ), and the average recovery was 100.6% with RSD 1.1%. **Conclusion** The method is simple, easy and reproducible that could be used as determination of total triterpenes in *Hypodematium sinense* Iwatsuri.

**Key words:** *Hypodematium sinense* Iwatsuri; Total triterpenes; Content determination; UV

山东肿足蕨(*Hypodematium sinense* Iwatsuri),为金星蕨科肿足蕨属植物,生长于鲁西南的山坡石缝中,民间俗称“治晕草”,仅此一味药(全药)水煎服,能治疗头晕、恶心、呕吐等症,为济宁医学院于20世纪70年代发现的新药用植物。经实验证明,该药具有抑制肠平滑肌收缩,降低血压,抑制中枢神经和抗乙酰胆碱等作用<sup>[1]</sup>。进一步研究发现,山东肿足蕨有明显的抗生育作用,对豚鼠离体妊娠子宫平滑肌有明显的兴奋作用,对妊娠豚鼠终止妊娠率为94%<sup>[2]</sup>。经初步临床实验,口服该药的水煎剂,对美尼尔氏综合征有效率为95.11%,对胃神经官能症也有较高的疗效,对叶片与叶柄分别测定,此种植物的叶片和叶柄所含化学成分一致,皆含有黄酮甙、植物甾醇、三萜成分、酚性成分以及糖类、鞣质、油脂和中性树脂等<sup>[3,4]</sup>。药理研究证明,三萜类化合物具有广泛的生理活性,

有保肝、抗肿瘤、抗HIV21及HIV21蛋白酶活性、抗带状疱疹病毒、增加免疫力、抗生育等诸多功效<sup>[5-6]</sup>;而对于山东肿足蕨中三萜成分的研究,未见报道,因此有必要对山东肿足蕨的三萜化合物进行研究。本文采用紫外分光光度法对山东肿足蕨药材中的总三萜化合物含量测定方法进行研究。

### 1 材料与仪器

#### 1.1 材料

**1.1.1 药材** 山东肿足蕨,采集于山东曲阜尼山,经济宁医学院中药学教研室王建安老师鉴定为山东肿足蕨(*Hypodematium sinense* Iwatsuri),去根后干燥,将叶子和全草分别粉碎,留粗粉备用。

**1.1.2 所用试剂** 齐墩果酸标准品(中国药品生物制品检定所),氯仿,硫酸,冰乙酸,乙酸乙酯,95%乙醇,香兰素等均为分析纯;蒸馏水。BS110S型电子分析天平(北京塞多利斯天平有限公司),KQ-500DB型超声仪(昆山市超声仪器有限公司),

\* 济宁医学院2008年青年科研基金资助项目

FW135 型中药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),RE-52 AA 型旋转蒸发器(上海嘉鹏科技有限公司),电动吸器(上海医疗器械工业集团公司医用吸器厂),电热恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司),TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),Q-4110 石英狭缝比色皿(无锡本色环保科技有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 标准溶液的制备

精确称取烘至恒重的齐墩果酸对照品 0.0046g 于 10ml 容量瓶中,用乙酸乙酯定容。

### 2.2 显色方法

本实验采用的显色方案为 5% 香草醛-冰醋酸 0.5ml,72% 硫酸 5ml,65℃ 恒温水浴加热 20min,冰水中静置 5min。硫酸溶液(V/V)的配置:取水 28ml,加硫酸至 100ml,香草醛溶液的配置为 0.5g 香草醛用 10ml 冰醋酸进行溶解。

### 2.3 最佳检测波长的确定

精密量取齐墩果酸对照品溶液 1ml 于 10ml 容量瓶中,按显色方法项下显色,在 450~600 nm 波长范围内进行紫外全波长扫描,发现最大吸收波长在 532 nm 处,故选择 532 nm 处作为检测波长。

### 2.4 标准曲线的绘制

分别精密量取齐墩果酸标准溶液 0.0ml(空白)、0.1ml、0.4 ml、0.8 ml、1.2 ml、1.6 ml 置于 10ml 具塞容量瓶中,即配成的溶液浓度为 0.0000mg/ml、0.0046mg/ml、0.0184 mg/ml、0.0368 mg/ml、0.0552 mg/ml、0.0736 mg/ml,用乙酸乙酯定容,按显色方法项下方法显色,以空白为参比,于 532nm 波长处测定各溶液的吸光度(A)。以浓度为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线(图 1),其回归方程为: $A = 6.6575C + 0.2925$ , $R = 0.9984$ ,齐墩果酸在 4.6~73.6  $\mu\text{g/ml}$  范围呈良好的线性关系。

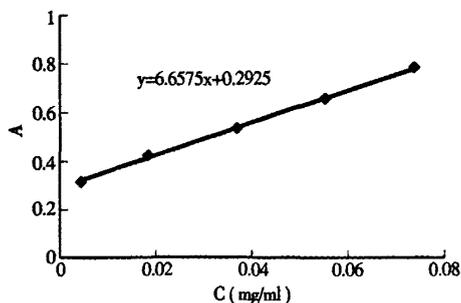


图 1 标准曲线

### 2.5 供试品溶液的制备

精密称取山东肿足蕨药材 5g 于 250ml 锥形瓶中,按料液比 1:12 加入 70% 的乙醇 60ml,设定超声条件(温度 40℃,频率 80%),进行超声振荡提取 60min,对超声后的样品进行抽滤,利用旋转蒸发器将滤液中的乙醇蒸出,温度在 57℃ 左右,后加入 10ml 石油醚,转移至分液漏斗进行分液,取下层液体,用旋转蒸发器旋出水分,再分别向其中加入氯仿和 0.1mol/L 的盐酸各 20ml 后,于 65℃ 水浴中回流 1.5h,回流后的液体转移至分液漏斗中,静置分液,取下层液体,用氯仿洗涤两次,每次用量 10ml,然后合并滤液,用旋转蒸发器旋蒸出氯仿,用乙酸乙酯 10ml 溶解储存,既得。

### 2.6 精密度试验

分别精确称取山东肿足蕨药材 5g 于 5 个 250ml 的锥形瓶中,按供试品制备项下方法处理,由所得样品溶液中移取 2ml 溶液于 25ml 容量瓶中,按显色方法项下方法显色,于 532 nm 波长处测定其吸光度(A),结果见表 1。 $RSD\% = 0.91\%$  ( $n=5$ ),表明本法精密度良好,仪器稳定性较好。

表 1 精密度试验结果

| A     | 三萜化合物含量(mg/g) | RSD(%) |
|-------|---------------|--------|
| 0.711 | 1.5715        |        |
| 0.705 | 1.5490        |        |
| 0.709 | 1.5640        | 0.91%  |
| 0.695 | 1.5115        |        |
| 0.701 | 1.5340        |        |

### 2.7 稳定性试验

精密移取供试品溶液 2ml 溶液于 25ml 容量瓶中,用乙酸乙酯定容,按显色方法项下方法进行显色,于 532 nm 波长处测定其吸光度(A),结果见表 2。计算结果得  $RSD\% = 0.75\%$  ( $n=6$ ), $RSD\% = 1.46\%$  ( $n=7$ ),因为当  $n=7$  时, $RSD > 1$ ,以其稳定性不好,因此供试品液显色后在 60min 内稳定性良好,也可说明三萜显色后在 60min 测定效果较好。

表 2 稳定性试验结果

| 试验时间(min) | A     | RSD(%) |
|-----------|-------|--------|
| 0min      | 0.711 |        |
| 20min     | 0.711 |        |
| 30min     | 0.709 |        |
| 40min     | 0.705 | 0.75%  |
| 50min     | 0.702 |        |
| 60min     | 0.698 |        |
| 70min     | 0.682 |        |

- 74(6):613-634.
- [2] Ray WA, Murray KT, Meredith S, et al. Oral erythromycin and the risk of sudden death from cardiac causes[J]. N Engl J Med. 2004, 351(11):1089-1096.
- [3] Beier MT. Pharmacokinetic interaction and erythromycin-induced sudden cardiac death, implications for practice[J]. J Am Med Dir Assoc. 2005, 6(2):154.
- [4] Milberg P, Eckardt L, Bruns HJ, et al. Divergent proarrhythmic potential of macrolide antibiotics despite similar QT prolongation, fast phase 3 repolarization prevents early afterdepolarizations and torsade de pointes[J]. J Pharmacol Exp T-

her, 2002, 303(1):218-225.

- [5] 郑燕倩, 陈曙霞, 李慈珍, 等. 槐果碱的心脏电生理效应[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2008, 28(4):380-384.
- [6] Wang HW, Zhen YQ, Yang ZF, et al. Effect of mexiletine on long QT syndrome[J]. Acta Pharmacol cSin, 2003, 24(4):316-320.
- [7] 王俊杰, 朱宝亮, 朱苏红, 等. 红霉素的心脏电生理效应[J]. 医学综述, 2009, 15(09):1407-1409.

(收稿日期 2011-04-15)

(上接第 161 页)

## 2.8 加标回收率试验

分别精确称取山东肿足蕨药材 5g 于 5 个 250ml 的锥形瓶中,按供试品制备项下方法处理,由所得样品溶液中移取 2.00ml 溶液于 25ml 容量瓶中,精密量取对照品溶液 2.00ml,用乙酸乙酯定容,按显色方法项下方法进行显色,于 532 nm 波长处测定其吸光度。计算回收率。实验结果见表 3。平均回收率为 100.6%,RSD 为 1.1%。

表 3 回收率试验结果

| 样品含量<br>(mg/ml) | 加入标准量<br>(mg) | 测得含量<br>(mg) | 回收率<br>(%) | 平均值<br>(%) | RSD<br>(%) |
|-----------------|---------------|--------------|------------|------------|------------|
| 0.7858          | 9.2           | 9.2276       | 100.3      |            |            |
| 0.7745          | 9.2           | 9.2460       | 100.5      |            |            |
| 0.7820          | 9.2           | 9.1900       | 99.89      | 100.6      | 1.1        |
| 0.7558          | 9.2           | 9.4300       | 102.5      |            |            |
| 0.7670          | 9.2           | 9.1632       | 99.60      |            |            |

## 2.9 样品的测定试验

分别精密称取 8 月份与 11 月份山东肿足蕨全草与叶子粉末 5g 各 3 份于 250ml 锥形瓶中,依次编号 1、2、3,按供试品制备项下方法处理,然后由提取分离所得的样品中分别移取 2ml 转移至 25ml 容量瓶中,按显色方法项下显色,以空白试剂为参比,于 532nm 处测吸光度。以标准曲线法计算含量,结果见表 4。

表 4 样品含量测定结果

| 药材      | 1 含量<br>(mg/g) | 2 含量<br>(mg/g) | 3 含量<br>(mg/g) | 平均含量<br>(mg/g) |
|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 8 月份全草  | 1.5715         | 1.5227         | 1.6053         | 1.5678         |
| 8 月份叶子  | 1.7330         | 1.7105         | 1.7405         | 1.7293         |
| 11 月份全草 | 1.5227         | 1.4814         | 1.5002         | 1.5002         |
| 11 月份叶子 | 1.6729         | 1.6804         | 1.7067         | 1.6879         |

## 3 讨论

本文采用单因素试验及正交试验法考察了山

东肿足蕨中总三萜化合物的提取的最佳方案。确定料液比为 1:12,乙醇浓度为 70%,超声时间为 60min 为最佳提取条件。

试验中以 5% 香草醛-冰醋酸溶液,浓硫酸为显色系统,采用紫外分光光度法测定山东肿足蕨中总三萜化合物含量,显色剂为 5% 香草醛-冰醋酸和浓硫酸,此显色剂必须现配现用,而且在进行紫外测量时,全过程最好控制在 1h 之内,否则显色效果不好,会影响实验结果。

结果显示 8 月份山东肿足蕨中总三萜化合物含量要比 11 月份含量高,而且相同质量的叶中三萜化合物含量比全草的含量高,所以 8 月份采集山东肿足蕨要比 11 月份采集合适。

本试验为山东肿足蕨中总三萜化合物首次含量测定,为该植物的科学合理开发提供了理论依据。但是三萜化合物种类繁多,仅测定总三萜含量远远不够,有必要对其三萜化合物成分进行进一步的研究和开发。

## 参考文献:

- [1] 凌秀珍,张鸿祺,刘善庭,等. 山东肿足蕨药理作用初步研究[J]. 济宁医学学报,1978,1(1):31.
- [2] 凌秀珍,张鸿祺,刘善庭,等. 山东肿足蕨抗生育作用实验研究[J]. 济宁医学学报,1980,1(1):23.
- [3] 王家英,张其楨. 山东肿足蕨对美尼尔氏综合征与胃神经官能症的治疗研究[J]. 济宁医学学报,1978,1(1):24.
- [4] 山东肿足蕨抗生育作用研究协作组. 山东肿足蕨抗生育作用实验研究[J]. 济宁医学学报,1981,4(1):1.
- [5] 刘梁,韩定献,周军,等. 三叶委陵菜根中三萜类化合物抗病毒作用研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(8):1484-1485.
- [6] 罗俊,林志彬. 灵芝三萜类化合物药理作用研究进展[J]. 药学报,2002,37(7):574-578.

(收稿日期 2011-05-24)