

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.01.026

王彦超,孙昊,周菲菲,等. 流动注射化学发光法检测剑麻皂苷元[J]. 广西植物,2014,34(1):135-138

Wang YC,Sun H,Zhou FF,*et al.* Determination of tigogenin by the flow-injection chemiluminescence[J]. *Guihaia*,2014,34(1):135-138

流动注射化学发光法检测剑麻皂苷元

王彦超¹, 孙昊², 周菲菲², 郝再彬^{1,2*}

(1. 东北农业大学 生命科学学院, 哈尔滨 150030; 2. 桂林理工大学 化学与生物工程学院, 广西 桂林 541004)

摘要: 采用 Luminol-K₃Fe(CN)₆ 化学发光体系, 建立流动注射化学发光法检测从剑麻残渣和麻膏中分离得到的皂苷元。当用 0.1 mol · L⁻¹ NaOH 作为溶剂配制鲁米诺浓度为 1.0 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹, 用去离子水作为溶剂配制 K₃Fe(CN)₆ 浓度为 1.6 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹, 主副蠕动泵转数均在 50 ~ 80 r · min⁻¹ 时, 用无水乙醇溶解的皂苷元流入体系具有最强的化学发光。在该条件下, 剑麻皂苷元最低检出限为 3.0 × 10⁻³ mg · mL⁻¹, 标准曲线相关系数为 0.999 6, 平均回收率为 98.5%, 相对标准偏差在 2.9% ~ 4.2% 之间。同时与 HPLC 检测方法对样品检测结果进行了比较。

关键词: 流动注射; 化学发光; 剑麻皂苷元

中图分类号: Q946.83 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)01-0135-04

Determination of tigogenin by the flow-injection chemiluminescence

WANG Yan-Chao¹, SUN Hao², ZHOU Fei-Fei², HAO Zai-Bin^{1,2*}

(1. College of Life Sciences, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China; 2. College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China)

Abstract: Luminol-K₃Fe(CN)₆ was used to detect content of tigogenin separated from sisal residue and sisal cream by the flow-injection chemiluminescence. When Luminol (1.0 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹) was dissolved in NaOH (0.1 mol · L⁻¹), K₃Fe(CN)₆ (1.6 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹) was dissolved in deionized water and RPM of peristaltic pump was from 50 to 80. This system showed the best character of chemiluminescence for tigogenin dissolved in ethanol. Under this condition, the LOD was 3.0 × 10⁻³ mg · mL⁻¹. The correlation coefficient of standard curve was 0.9996, the average recovery was 98.5% and the RSD was 2.9% to 4.2%. Determination of tigogenin by HPLC was used for comparative trial.

Key words: flow-injection; chemiluminescence; tigogenin

剑麻 (*Agave sisaiana*), 又名菠萝麻、西纱尔麻、龙舌兰麻, 是龙舌兰科龙舌兰属植物。剑麻皂苷元 (tigogenin) 是螺甾烷醇的衍生物 (5 α , 25D-螺甾烷-3 β 羟基, 图 1), 它与薯蓣皂苷元 (diosgenin) 和番麻皂苷元 (hecogenin) 均为合成甾体激素类药物的医药中间体和重要原料, 广泛应用于肾上腺皮质激素、性激素及蛋白同化激素, 三大类激素可以制造

200 多种药物 (吴立军等, 2011)。药理研究表明, 这些皂苷元成分具有较明显的抗炎、抗菌、止血、抗衰老和降血糖的生物活性 (宣伟东等, 2005)。剑麻皂苷元来自于剑麻纤维传统产品之后废弃的麻汁和麻渣。

检测植物体内提取的天然甾体皂苷元方法虽然较多, 薄层色谱法 (万建波等, 2004)、气相色谱法 (Cui

收稿日期: 2013-08-19 修回日期: 2013-09-09

基金项目: 国家自然科学基金 (31060193); 国家麻类产业技术体系建设专项 (CARS-19)。

作者简介: 王彦超 (1978-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 博士研究生, 从事植物化学等研究, (E-mail) yanchao_wang@163.com。

* 通讯作者: 郝再彬, 教授, 博士生导师, 研究方向为天然活性物质的开发与利用, (E-mail) haozaibin2010@126.com。

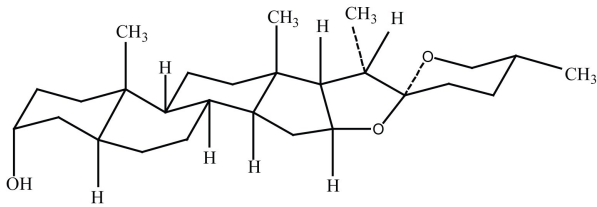


图 1 剑麻皂苷元 (tigogenin) 的结构式

Fig. 1 Constitutional formula of tigogenin

et al., 1997)、HPLC-UV (Lau *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Wan *et al.*, 2006)、荧光分光光度法 (Shangguan *et al.*, 2001)。色谱法可以检测皂苷元的单体种类和含量;分光光度法不能做皂苷元的单体分析,可以检测皂苷元的总含量。但是这些方法有耗时长、设备昂贵等不足。流动注射化学发光法是一种对皂苷元的总含量检测,使用该方法对剑麻皂苷元进行检测鲜见报道,该方法容易操作、检测时间短,为剑麻皂苷元的工业化生产在线检测提供新技术和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与设备

剑麻皂苷元标准品(98%, HPLC 纯,上海研生生物技术有限公司);剑麻残渣和麻膏(广西剑麻集团);无水乙醇、石油醚、盐酸、氢氧化钠、鲁米诺和铁氰化钾等生化试剂均为国产分析纯;高效液相色谱所用试剂均为 Fisher 色谱纯。

IFFM-E 型流动注射化学发光分析仪(西安瑞迈电子有限公司);EL104 万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);DHG-9097 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);KQ-400KDE 型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);RE-52A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);HH-S 数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂);SIGMA 3K30 离心机(德国希格玛离心机有限公司);岛津 LC-20AB 高效液相色谱仪,ELSD 检测器;氮气(99.9%,广西桂林海湾恒日化气体有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 皂苷元的提取与分离 取一定量的剑麻残渣,干燥后粉碎过 100 目筛,用 60%乙醇超声提取 3 次后合并上清液干燥成粉。称取该粉末 100 mg 加入

到 25 mL 具塞玻璃试管中,再加入 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 9 mL,置于 $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中水解 50 min,冷却后用 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 调节 pH 为中性,4 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,弃上清液。分别向沉淀中加入沸程 $60 \sim 90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的石油醚 30 mL,分三步进行萃取,合并石油醚相,置于 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发浓缩干燥。

取一定量的麻膏,干燥后粉碎过 100 目筛,称取该粉末 100 mg 加水充分搅拌后置于 $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中恒温 2 h,4 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,弃上清液,沉淀部分重复以上操作 2 次。分别向沉淀中加入沸程 $60 \sim 90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的石油醚 30 mL,分三步进行萃取,合并石油醚相,置于 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发浓缩干燥。

1.2.2 试剂的配制 取一定质量的剑麻皂苷元标准品和自制样品,用无水乙醇配制成浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液和待测样溶液;取一定质量的鲁米诺固体,用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 作为溶剂配制鲁米诺浓度为 $1.0 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;再取一定质量的 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 固体,用去离子水作为溶剂配制 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 浓度为 $1.6 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,以上均作为储备液备用。

取一定质量的剑麻皂苷元标准品和自制样品,分别用甲醇配制成浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液和待测样溶液,以供 HPLC 使用。

1.2.3 检测皂苷元条件的优化 乙醇浓度:用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 作为溶剂稀释鲁米诺储备液至浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,用去离子水作为溶剂稀释 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 储备液至浓度为 $1.6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,去离子水配置不同浓度的无水乙醇溶液进样,以去离子水为空白,将发光体系溶液以 $50 \sim 80 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速通过六通注射阀,注样时间 $10 \sim 25 \text{ s}$,各液混合,流入流通池检测其化学发光强度,记录数据。空白发光强度记录为 I_0 ,乙醇发光强度记为 I_s ,抑光强度记为 $\Delta I (\Delta I = I_0 - I_s)$ 。上述测试过程均保持在 $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温下进行。

鲁米诺浓度:用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 作为溶剂稀释鲁米诺储备液至不同浓度,用无水乙醇稀释标准剑麻皂苷元溶液浓度至 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为待测样,以无水乙醇为空白,其它操作方法同上。

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 浓度:用去离子水作为溶剂稀释 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 储备液至不同浓度,用无水乙醇稀释标准剑麻皂苷元溶液浓度至 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为待测样,以无水乙醇为空白,其它操作方法同上。

1.2.4 制备皂苷元标准曲线 制备皂苷元标准曲线(FI-CL法):准确吸取 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 皂苷元标准

液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 和 1.0 mL 分别置于 10 支 10 mL 容量瓶中,无水乙醇定容至刻度,充分摇匀,静置 10 min。取上述溶液分别与 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 鲁米诺溶液、 $1.6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液在流动注射化学发光仪上测试(无水乙醇为空白)。以浓度为横坐标,发光强度为纵坐标作图,绘制标准曲线。

制备皂苷元的标准曲线(HPLC法)(Zhou *et al.*, 2012; 方惠娟等, 2012); Shim-pack VP-ODS C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), ELSD-LT II 检测器, 漂移管温度 40 $^\circ\text{C}$, 载气压力 350 kPa, 柱温 35 $^\circ\text{C}$, 流动相为甲醇:水=90:10(V/V), 流速 1.0 mL \cdot min $^{-1}$, 进样量 10 μL , 时间 35 min。用甲醇作为溶剂稀释剑麻皂苷元标准溶液定容于容量瓶中,制成 50、100、200、300、500、1 000 和 2 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的不同溶液,分别进样,以浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.5 检测皂苷元的回收率实验 用无水乙醇为溶剂稀释自剑麻残渣中提取的皂苷元样品溶液浓度至 0.1 mg \cdot mL $^{-1}$, 作为加标试样。取浓度为 0.1 mg \cdot mL $^{-1}$ 的标准剑麻皂苷元溶液 0.5、1.0 和 1.5 mL, 70 $^\circ\text{C}$ 烘干, 分别加入加标试样溶液 1 mL, 进行流动注射化学发光检测(根据需要按相同比例增加体积)。

2 结果与分析

2.1 检测皂苷元条件的优化

10%~40%的乙醇对发光体系的抑光强度是逐渐增强的,40%~100%的乙醇对发光体系的抑光强度是趋于平稳的,所以选择无水乙醇作为皂苷元的溶剂(图 2)。由图 3 和 4 可知,该发光体系检测皂苷元的最佳条件鲁米诺和 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的浓度分别为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 检测剑麻皂苷元的标准曲线

流动注射化学发光法测得剑麻皂苷元标准曲线方程为 $y = 721.41x + 25.242$, 其中 x 以 mg \cdot mL $^{-1}$ 计, 浓度在 0.1~1.0 mg \cdot mL $^{-1}$ 范围内具有良好的线性关系, $R^2 = 0.9996$ (图 5)。

HPLC 法检测剑麻皂苷元的标准曲线方程为 $y = 6311x - 73389$, 其中 x 以 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 计, 浓度在 50~2 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围, $R^2 = 0.9998$ 。

2.3 干扰试验

剑麻皂苷元来源于剑麻叶片, 在提取过程中共

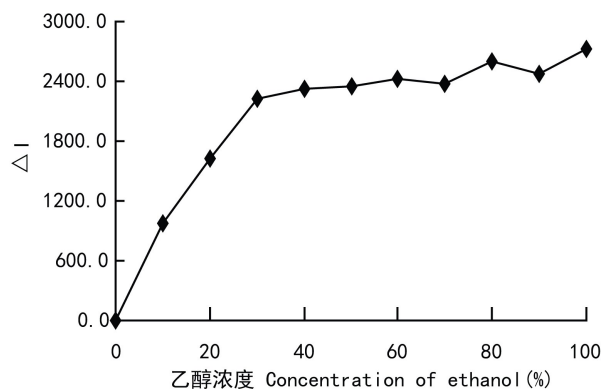


图 2 乙醇浓度对发光体系的影响

Fig. 2 Influence of ethanol concentration on the chemiluminescence system

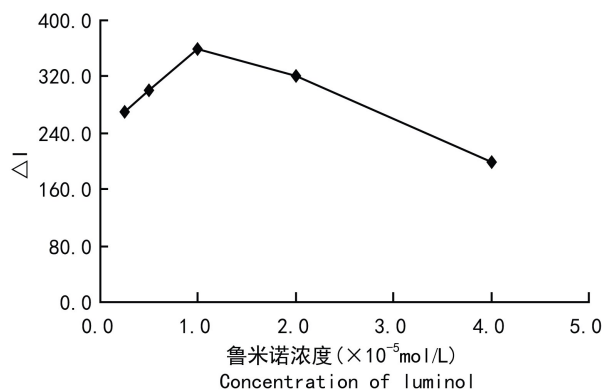


图 3 鲁米诺浓度对测定皂苷元的影响

Fig. 3 Influence of Luminol concentration on the determination of tigogenin

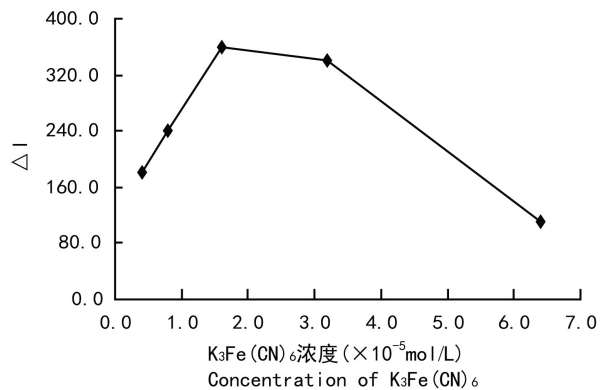


图 4 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 浓度对测定皂苷元的影响

Fig. 4 Influence of $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ concentration on the determination of tigogenin

存其他组分,它们可能对该化学发光体系测定皂苷元有一定的影响。为此,研究了 Na^+ 、 Cl^- 、 K^+ 、 Br^- 、 CO_3^{2-} 、 SO_4^{2-} 、 NO_3^- 、 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、

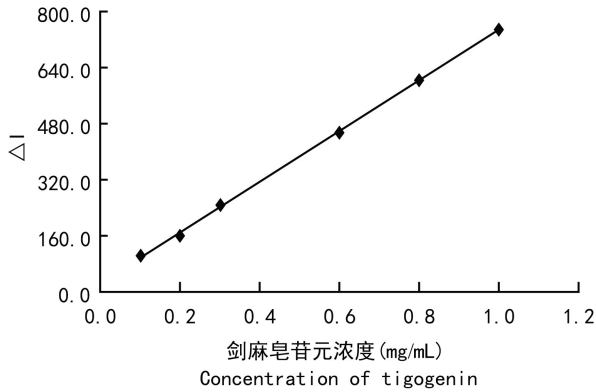


图5 检测剑麻皂苷元标准曲线

Fig. 5 Standard curve of tigogenin determination

Mn²⁺、和淀粉、糊精、麦芽糖、蔗糖以及葡萄糖等分别对 100 μg · mL⁻¹ 的皂苷元进行干扰测定实验。结果表明,它们不干扰测定。

2.4 剑麻皂苷元加标回收率实验

剑麻皂苷元样品溶液中不同的加标量所测得的回收率分别为 94.4%、96.8% 和 104.3%, 相对标准偏差在 2.9%~4.2%, 均在误差允许范围内(表 1)。

表 1 检测剑麻皂苷元加标回收率实验

Table 1 Recovery test of tigogenin determination

编号 No.	含量 Content (mg · mL ⁻¹)	加标量 Added value (mg · mL ⁻¹)	测得值 Measured value (μg · mL ⁻¹)	回收率 Recovery rate (%)	RSD (%)
1	0.10	0.05	0.147	94.4	3.7
2	0.10	0.10	0.197	96.8	2.9
3	0.10	0.15	0.256	104.3	4.2

表 2 HPLC 与 FI-CL 方法测定皂苷元含量比较

Table 2 Contrast content of tigogenin determination by HPLC and FI-CL

实验材料 Experiment material	测定方法 Determination method	百分含量 Percentage of composition (%)	RSD (%)
皂苷元标准品 Rutin standard	—	98.0	—
剑麻残渣 Sisal residue	HPLC	3.2	1.20
	FI-CL	3.0	2.14
麻膏 Sisal cream	HPLC	16.7	1.50
	FI-CL	16.3	2.21

3 结论与讨论

FI-CL 方法检测的样品大部分易溶于水, 极少部分微溶于水。如杨丹等(2006)、马艳等(2013)和 Jiang *et al.* (2013) 在用该方法分别检测大豆异黄酮、黄体酮和穿心莲内酯时都是先用少量乙醇溶解再用去离子水定容, 曾华金等(2013)在用该方法检

测芦丁时用二甲基亚砜溶液(V(DMSO) : V(H₂O) = 1 : 100)对芦丁片作预处理。本文选择了无水乙醇作为检测样品的溶剂, 溶解性较好。首先, 乙醇比水对 Luminol-K₃Fe(CN)₆ 化学发光体系有很强的光抑制作用(图 2); 其次, 当乙醇中溶解了一定质量的皂苷元时, 这种光抑制作用会减弱(即反抑光强度)(图 3, 图 4); 最后, 这种减弱的光强度与皂苷元的浓度在一定的范围内成正比(图 5)。

FI-CL 方法分别测定了剑麻残渣和麻膏中皂苷元的含量, 同时与 HPLC 方法对样品检测结果进行比较可知(表 2), 该方法检测两种材料中皂苷元的结果与 HPLC 方法比较接近, HPLC 方法的相对标准偏差较小更接近于实际值, 两种方法相对标准偏差均在误差允许的范围内。麻膏中皂苷元的含量比剑麻残渣中皂苷元的含量高近 5 倍, 是因为麻膏来源于剑麻叶片经抽丝加工过程中压榨出的汁液, 经长期自然发酵风干而成。FI-CL 方法的优点是容易操作且检测时间短, 可实现皂苷元工业化生产中的在线检测, 极大地降低生产成本(Jiang *et al.*, 2013); 缺点是检测样品结果的稳定性和重现性稍差一些, 稳定性和重现性由多种因素决定, 比如光电倍增管的灵敏度、反应池前进液管路的长短以及环境的温度等。在实际操作中要尽量熟练, 减小操作失误产生的误差。

本文建立了流动注射 Luminol-K₃Fe(CN)₆ 化学发光体系检测剑麻皂苷元的方法, 并对检测条件进行了优化; 无水乙醇作为皂苷元样品的溶剂可行, 该方法为检测剑麻皂苷元提供了新技术及其理论依据; 由于该方法检测一个样品可以在 3~5 min 内完成, 所以可以实现样品的批量检测, 缩短检测时间, 以 HPLC 作为末端样品检测相结合, 可应用于剑麻皂苷元的工业化生产在线检测和农业上的剑麻皂苷元高含量育种及栽培。

参考文献:

- 吴立军, 娄红祥, 周晶. 2011. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社: 350
- Cui JF, Bjorkhem I, Eneroth P. 1997. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of 20(S)-protopanaxadiol and 20(S)-protopanaxatriol for study on human urinary excretion of ginsenosides after ingestion of ginseng preparations[J]. *J Chromatogr B*, **689**(2): 349-355
- Fang HJ(方惠娟), Li Q(李清), Guan XY(关潇滢), *et al.* 2012. Determination of three steroid saponin in crude saponin of (下转第 142 页 Continue on page 142)