

结晶紫共振瑞利散射法测定七叶皂苷钠^{*}

周 娟,王祥洪

(长江师范学院 化学及环境科学系,重庆 408100)

摘 要 在 pH5.0 的 BR 缓冲溶液中,七叶皂苷钠(SA)阴离子与结晶紫(CV)阳离子反应,形成离子缔合物,此时将引起共振瑞利散射光谱 RRS 急剧增强并产生新的 RRS 光谱,结合产物的最大散射波长位于 342 nm,七叶皂苷钠浓度在 0~20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时与散射强度呈直线关系,研究了适宜的反应条件和影响因素,考察了共存物质的影响,测得七叶皂苷钠的检出限为 19 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,实验表明结晶紫共振瑞利散射法选择性好,可用于片剂中七叶皂苷钠的测定。

关键词 七叶皂苷钠;结晶紫;共振瑞利散射

中图分类号:O657.3

文献标识码:A

文章编号:1672-6693(2008)02-0071-03

七叶皂苷钠(Sodium Aescinate,这里缩写为 SA),在国外由德国药典收载的生药欧马栗(*Aesculus Hippocastanum* L,英文名 horse chestnut)的成熟果实提取,而国内则由中国一部药典收载的中药娑罗子的干燥成熟果实中提取。它已载入德国药典(DAC)1997 年版^[1]和中国国家药品标准^[2]。七叶皂苷钠具有抗炎、消肿和抗渗出的药物活性,并可用于抗水肿、创伤或手术后引起的肿胀,以及血液循环障碍和风湿病的治疗等^[3]。七叶皂苷钠是白色或类白色结晶性粉末,味苦而辛,在水和甲醇中易溶,在乙醇和丁醇中溶解,医疗上常用冻干法制成七叶皂苷钠粉针剂供静脉注射用。目前国内外对七叶皂苷钠的测定方法研究很少,主要有薄层色谱法^[4-6]、滴定法^[2,7]、紫外分光光度法^[8]和高效液相色谱 HPLC 法^[9-10]等。对于药物中的含量测定,目前使用最多的是滴定法、分光光度法和 HPLC 法。酸碱滴定法,需预先加热回流 4 h,费时颇长,方法不够简便,紫外分光光度法虽简便,但灵敏度和选择性均欠佳, HPLC 法可分别测定七叶皂苷钠 A、B 等,但用紫外检测器灵敏度也不高,因此进一步发展灵敏度高、选择性好又简便快速的新分析方法是一件有重要意义的工作。共振瑞利散射(RRS)是近年来发展起来的新分析技术,它因高灵敏度和简易性引起了人们的

关注,已用于核酸、蛋白质、肝素、硫酸软骨素等生物大分子的测定,也在无机离子、表面活性剂和药物分析中得到越来越多的应用。七叶皂苷钠在水溶液中由于钠盐离解,而以一价阴离子型体存在,结晶紫(CV)在水溶液中以一价阳离子型体存在,利用染料与被测物质之间相互作用产生的分子光谱变化来进行测定的研究已有报道^[11],但对皂苷类药物采用分子光谱测定方法研究的例子还不多^[12],本文以七叶皂苷钠为代表研究其与结晶紫染料之间的相互作用,利用结晶紫染料共振瑞利散射法测定阴离子的研究^[13-14]在国内已有报道,目前还未见用于七叶皂苷钠的测定。笔者在荧光分光光度计上试验了结晶紫与七叶皂苷钠反应体系的 RRS 光谱特征,筛选了适宜的反应条件和影响因素,并考察了共存物质的影响,方法用于含七叶皂苷钠片剂的测定,试验结果满意。

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

七叶皂苷钠(中国药品生物制品检定所)标准溶液 配制 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的工作溶液,冰箱保存;染料溶液 结晶紫(Crystal Violet, CV,成都科龙化工试剂厂) $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水溶液;BR 缓冲溶

* 收稿日期 2007-10-11 修回日期 2008-01-15

资助项目 重庆市教委科研项目(No. KJ051305)

作者简介 周娟(1985-),女,2004 级本科学生,研究方向为分子光谱研究。通讯作者 王祥洪,Email: wangxhgg@163.com

液 :用 $0.04\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_3\text{PO}_4$, H_3BO_3 和 CH_3COOH 与 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 溶液按一定比例混合 ,配成不同 pH 值的缓冲溶液 ,并用酸度计校正其 pH 值。以上药品均为分析纯 ,实验用水为二次蒸馏水。

日立 F-4500 型荧光分光光度计 ,测定时采用狭缝 10 nm ,PHS-25C 酸度计(上海宇隆分析仪器厂)。

1.2 实验方法

于 10 mL 比色管中加入结晶紫染料溶液 3.0 mL ,一定量的七叶皂苷钠溶液 ,继续加入 3.5 mL BR 缓冲溶液 摇匀 ,放置 10 min 后 ,用二次蒸馏水稀释至刻度 摇匀 , 15 min 后 ,在荧光分光光度计上 ,以 $\lambda_{\text{em}}=\lambda_{\text{ex}}$ 对溶液进行同步扫描 ,可得共振瑞利散射光谱 ,然后于最佳共振散射峰(λ_{max}) 342 nm 处测定结合产物的散射强度 I 和试剂空白散射强度 I_0 , $\Delta I=I-I_0$ 。

2 结果与讨论

2.1 共振瑞利散射光谱

用 $\Delta\lambda=0$ 对染料溶液 ,七叶皂苷钠溶液和反应产物溶液分别进行同步扫描 ,记录 RRS 光谱图。结晶紫及七叶皂苷钠的 RRS 均十分微弱 ,但当两者结合后 RRS 显著增强 图 1 为 CV 与七叶皂苷钠(SA)反应体系的 RRS 光谱(1~6 内线中的 SA 浓度分别为 : $2.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $5.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $10.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $15.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $20.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;CV $7.5\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$;pH 5.0)。结合产物形成 2 个较大的 RRS 峰 ,分别位于 342 nm 和 386 nm 处 ,而一个波长 ,其线性关系比前一个波长稍差 ,故以前一个波长 342 nm 处作分析研究。实验还发现在 271 nm 附近有 1 个较小的 RRS 峰 ,线性关系较差。

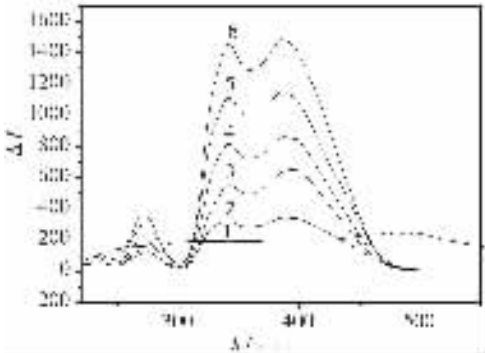


图 1 RRS 光谱

2.2 适宜的反应条件

2.2.1 缓冲溶液酸度及用量的影响 试验了缓冲溶

液 PH 值对强度 ΔI 的影响 ,结果表明 CV 体系在 pH5.0 时 ,散射强度达到最大 ,而 pH 值高于或低于此值时 均会导致 ΔI 值的下降 见图 2(SA 为 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。实验中 CV 体系选用 pH 值 5.0 的 BR 缓冲溶液作为反应介质 ,而从实验结果得出 BR 缓冲溶液的最佳用量为 $2.0\sim 3.5\text{ mL}$,实验中加入缓冲溶液 3.5 mL 。

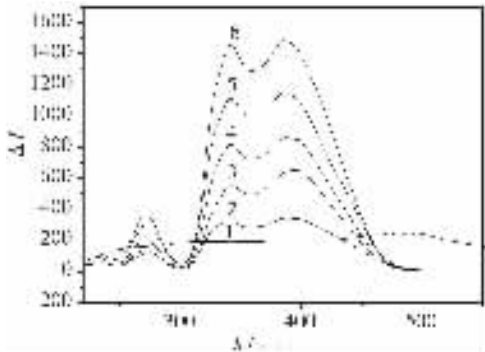


图 2 溶液 pH 值的影响

2.2.2 染料浓度的影响 试验了染料浓度对于 ΔI 的影响 ,结果表明 CV 溶液的适宜用量为 $2.5\sim 3.5\text{ mL}$,此时 ΔI 达到最大 ,如果染料不足和过量均会导致 RRS 强度降低。因此 ,实验选用加入 CV 溶液为 3.0 mL 。

2.3 散射强度与七叶皂苷钠的浓度关系

在确定的最佳反应条件下 ,试验了不同浓度七叶皂苷钠与结晶紫反应产物的 ΔI ,并以 ΔI 对应七叶皂苷钠浓度绘制标准曲线 ,方法的一元回归方程、相关系数、线性范围、检出限分别如表 1 所示。方法具有较高的分析灵敏度 ,检出限位于 $19\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,较目前常用紫外分光光度法和 HPLC 法低 3 个数量级左右 ,故本法具有很高的灵敏度 ,适于痕量七叶皂苷钠的测定。

表 1 标准曲线的有关参数和七叶皂苷钠的检测限

体系	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	线性回 归方程	相关 系数	检出限/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
CV-SA	$0.06\sim 20.0$	$\Delta I=282.2+56.8c$	0.9970	19

2.4 方法的选择性和分析应用

2.4.1 共存物质的影响 试验了共存物质如药物制剂中常使用的赋形剂滑石粉、乳糖、葡萄糖、淀粉、糊精、硬脂酸镁和蛋白质及一些常见金属离子对七叶

皂苷钠测定的影响 ,结果如表 2 所示。一定量的糖类、氨基酸、蛋白质和常见金属离子、无机酸根离子等不干扰测定 ,故方法有较好的选择性 ,可用于实际样品的测定。

表 2 共存物质的影响($C_{SA} = 2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

共存物质	允许浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	相对 误差/%	共存物质	允许浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	相对 误差/%
Na^+	450	-4.6	滑石粉	90	-4.5
K^+	410	-5.5	乳糖	150	3.7
NH_4^+	380	-2.9	葡萄糖	120	3.1
Al^{3+}	100	-3.3	果糖	100	3.4
Ca^{2+}	120	-5.2	淀粉	90	6.5
NO_3^-	220	-2.9	糊精	90	2.9
Cl^-	150	-3.6	硬酯酸镁	75	-4.2
SO_4^{2-}	150	-5.1	D. L-组氨酸	50	3.9
Cu^{2+}	50	-4.7	L-色氨酸	105	-2.7
Fe^{3+}	30	-6.2	D-色氨酸	100	-5.1
Pb^{2+}	20	-5.0	L-组氨酸	35	-5.3
Zn^{2+}	15	-5.3	L-亮氨酸	30	-6.1
Mg^{2+}	25	-5.1	甘氨酸	40	-5.4
BSA	10	-3.9	L-酪氨酸	85	3.2
HAS	10	-3.5	D. L-天冬氨酸	110	-5.1
尿素	110	5.3	L-半胱氨酸	150	-2.5

2.4.2 样品测定 取山东绿叶制药有限公司不同批号七叶皂苷钠片剂撵碎成粉末 ,混匀 ,称取适量药物 ,用水溶解过滤后 ,以水定容到 100 mL ,适当稀释 ,按实验方法测定七叶皂苷钠的含量 ,同时按国家标准^[2]所载滴定法测定七叶皂苷钠含量 ,见表 3 所示。结果表明平均含量本法为 29.41 mg ,滴定法为 29.47 mg ,两种方法结果吻合。

表 3 七叶皂苷钠片剂的测定结果

批号 Batch	标示量/mg	测定值/mg	RSD/%	滴定法
20060403	30.0	29.45	3.1	29.50
20060705	30.0	29.40	4.5	29.49
20060803	30.0	29.38	2.6	29.41

参考文献：

[1] A-030-1997 ,Deutsches-Arzneim-Codex(DAC) [S].

[2] WS1-XG-003-99-2000 ,中华人民共和国药品监督管理局国家药品标准 16 册 [S].

[3] 王川平 ,孙莉 ,谢红. β -七叶皂苷钠的临床应用 [J]. 医药导报 ,2001 ,20(3) :195-196.

[4] SANDRA A , TANIA N , LUC P , et al. Densitometric Thin-layer Chromatographic Determination of Aescin in a Herbal Medicinal Product Containing Aesculus and Vitis Dry Extracts [J]. Journal of Chromatography A ,2006 ,32(1112) : 165-167.

[5] VANHAELEN M , VANHAELEN R F. Quantitative Determination of Biologically Active Constituents in Medicinal Plant Crude Extracts by Thin-layer Chromatography Densitometry [J]. Journal of Chromatography A ,1983 ,9(211) : 263-271.

[6] LOSTATINI A. Estin in Pharmaceutical Oral Dosage Forms :Quantitative Densito Metric HPTLC Determination [J]. Far-maco ,1999 ,54(11) :728-732.

[7] 董元伟 ,李信炯 ,程汉梅. 七叶皂苷钠含量的测定 [J]. 中国医院药学杂志 ,2002 ,22(4) :218-219.

[8] 程正达 ,李信炯. 紫外分光光度法测定七叶皂苷钠含量 [J]. 中国医院药学杂志 ,2004 ,24(10) :646-647.

[9] 李菁 ,叶文才. HPLC-ELSD 法在注射用七叶皂苷钠质量控制中的应用 [J]. 中草药 ,2000 ,31(8) :582-584.

[10] 沈芊 ,曾艳 ,王淑洁. 反相高效液相色谱法测定注射用七叶皂苷钠含量 [J]. 中国医院药学杂志 ,2003 ,23(12) :731-732.

[11] 谢兵 ,李燕. 溴甲酚绿光度法测定水样中的阳离子表面活性剂 [J]. 重庆师范大学学报(自然科学版) ,2007 ,24(1) :66-68.

[12] 彭爱红 ,熊何健 ,颜宇航. 太子参总皂苷的含量测定方法研究 [J]. 四川师范大学学报(自然科学版) ,2006 ,29(6) :743-746.

[13] 刘绍璞 ,周光明 ,刘忠芳. 共振瑞利散射法测定硫氰酸盐-碱性三苯甲烷染料体系中的痕量钼 [J]. 高等学校化学学报 ,1998 ,19(7) :1040-1044.

[14] 南海军 ,刘忠芳 ,刘绍璞. 汞-碘化物-结晶紫体系的共振瑞利散射光谱分析及其应用研究 [J]. 西南师范大学学报 ,2005 ,30(6) :1074-1078.

(下转第 77 页)

Sodium Aescinate with Crystal Violet

ZHOU Juan , WANG Xiang-hong

(Department of Chemistry and Enviroment Science , Yangtze Normal University , Chongqing 408100 , China)

Abstract In pH 5.0 Britton-Robinson(BR) buffer solution , Sodium Aescinate(SA) can react with Crystal Violet(CV) cationic to form ion association complex , resulting in the great enhancement of resonance Rayleigh scattering(RRS) and the new RRS spectra appears. The maximum RRS peak locates at 342 nm . There is a linear relationship between the enhanced RRS intensity and the Sodium Aescinate concentration in the range of 0 ~ 20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, The method has higher sensitivity. The detection limit for SA is 19 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. The optimum conditions are investigated , The effect of the acidity on ΔI shows that the optimum pH is in 5.0 and the appropriate amount is 3.5 ml ; The effect of the dye amount on ΔI shows that the optimum amount is 3.0 ml. The effects of various foreign substances such as talc powder , lactose , glucose , starch , dextrin , protein and some metal ions on the determination of SA are investigated. The results show that the method has good selectivity , and it has been applied to the determination of trace SA in tablet samples with satisfactory result. The method has higher sensitivity than that of the reported HPLC. So the method can be used in the determination of trace amount of SA.

Key words sodium aescinate ; crystal violet ; resonance Rayleigh scattering

(责任编辑 欧红叶)