

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110524. 1345. 011

比色法测定大蒜提取物中大蒜总皂苷含量

王瑞海, 柏冬, 刘丽梅*

(中国中医科学院 基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:建立一种大蒜提取物中总皂苷含量的测定方法。方法:以知母皂苷 A-Ⅲ为对照品,香草醛-高氯酸比色法测定大蒜提取物中总皂苷含量。结果:知母皂苷 A-Ⅲ 在 20.16 ~ 181.44 μg 与吸光度呈良好线性关系,回归方程为 $Y = 4.839X + 0.066$, $r = 0.9995$ ($n = 9$), 平均回收率 100.6%, RSD 1.5%。结论:该方法简单,准确性、重复性良好,可作为大蒜提取物中总皂苷质量控制方法。

[关键词] 大蒜提取物;大蒜总皂苷;知母皂苷 A-Ⅲ;比色法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0053-04

Content Determination of Total Saponins in Garlic Extract by Colorimetry

WANG Rui-hai, BAI Dong, LIU Li-mei*

(Institute of Basic Theory, China Academic of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method for content determination of total saponins in garlic extract.

Method: Timosaponin A Ⅲ was used as a reference substance, and vanillin-perchloric acid was applied as coloring reagent to determine the content of total saponins. **Result:** The calibration curve of timosaponin A Ⅲ showed good linearity in the range of 20.16-181.44 μg, and the regression equation was $Y = 4.8396X + 0.0666$, $r = 0.9995$. The average recovery rate was 100.6%, and RSD was 1.5%. **Conclusion:** The determination method is simple, sensitive and accurate, which can be used for evaluating the quality of total saponins in the garlic extract

[Key words] garlic extract; total saponins; timosaponin A Ⅲ; colorimetry

大蒜是药食同源植物,在人们日常膳食中具有重要地位。2010年版《中国药典》规定大蒜为百合科植物大蒜 *Allium sativum* L. 的鳞茎。目前,大蒜中研究和应用较多的是挥发油类成分。研究发现,大蒜中的皂苷类成分具有抗真菌、抗肿瘤、抗血栓、降低胆固醇的作用^[1]。由于缺少合适的对照品,国内外对大蒜中总皂苷含量测定的报道较少,这使大蒜皂苷的开发利用受到一定的限制。大蒜中皂苷主要为螺甾烷醇型皂苷,本实验通过筛选,选择知母皂

苷 A-Ⅲ作为对照品,采用香草醛-高氯酸比色法测定大蒜总皂苷相对含量,以建立一种测定大蒜提取物中大蒜总皂苷含量的方法,为大蒜提取物中总皂苷的质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器 8453型紫外-可见分光光度计(美国,安捷伦);HW·SY11-K型数显恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司);CX-250型超声波清洗机(天海双龙医疗设备有限公司)。CP2202S型电子天平(瑞

[收稿日期] 2011-02-25

[基金项目] 国家重大科技专项(2009ZX09301-005-11)

[第一作者] 王瑞海,副主任技师,研究方向:中药学

[通讯作者] *刘丽梅,研究员, Tel:010-64014411-2502, E-mail: liulimeih@ sina. com

[网络出版时间] 2011-05-24 13:45

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110524.1345.011.html>

士梅特勒-托利多)。

1.2 试药 甲醇、乙醇、冰醋酸、高氯酸、浓硫酸、香草醛和茴香醛(均为分析纯,北京化工厂);知母皂苷 A-III、薯蓣皂苷元对照品(供含量测定用,购至天津一方科技公司,批号 20080321);大蒜提取物(中医基础理论研究所质量分析室自制)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制 精密称取薯蓣皂苷元、知母皂苷 A-III 对照品 1 mg, 分别置 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

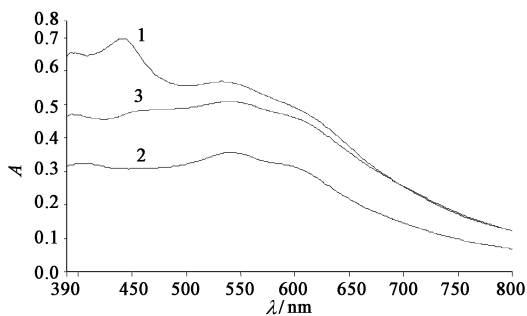
2.2 供试品溶液的配制 取大蒜提取物 10 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇约 20 mL, 超声处理(功率 250 W, 频率 200 Hz) 30 min。取出, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

2.3 显色剂溶液的配制

2.3.1 香草醛-冰醋酸的制备 称取香草醛 2.5 g, 加冰醋酸 50 mL 使溶解, 即得。

2.3.2 茴香醛-硫酸的制备 量取茴香醛 0.2 mL, 加乙醇 36.7 mL 使溶解, 加硫酸 2 mL, 摇匀, 即得。

2.4 对照品的选择 分别精密量取 2.1、2.2 项下对照品溶液和供试品溶液各 0.5 mL, 分别置具塞试管中, 水浴挥干溶剂。均加入 5% 香草醛-高氯酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 1.0 mL, 摇匀, 于 100 °C 水浴中保温 30 min, 取出置冰水浴中 10 min, 取出, 精密加入冰醋酸至 10 mL, 摇匀。以相应的试剂为空白, 照分光光度法, 扫描 390 ~ 800 nm 的吸收光谱, 结果如图 1 所示。



1. 薯蓣皂苷元; 2. 大蒜提取物; 3. 知母皂苷 A-III

图 1 对照品、供试品溶液显色后的吸收光谱(香草醛-高氯酸)

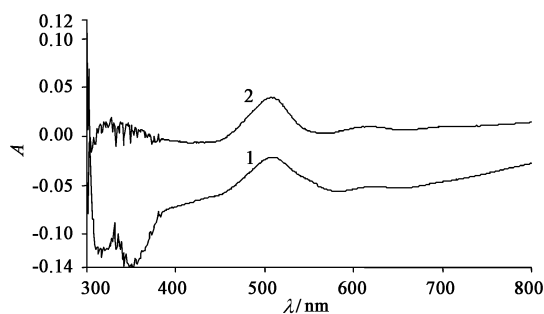
实验结果表明, 知母皂苷 A-III 与大蒜提取物溶液显色后的吸收光谱相似, 均在 540 nm 具有最大吸收。而薯蓣皂苷元与大蒜提取物溶液显色后虽然均在 540 nm 具有吸收峰, 但薯蓣皂苷元在 420 nm 处还有一吸收峰, 与供试品溶液吸收光谱具有一定差

异。两者相比, 知母皂苷 A-III 更适于作为对照品测定大蒜提取物中总皂苷的含量。

2.5 显色剂及测定波长的选择

2.5.1 香草醛-高氯酸显色法 分别精密量取 2.1、2.2 项下知母皂苷 A-III、大蒜提取物溶液各 0.5 mL, 按照 2.4 项下方法进行测定。

2.5.2 茴香醛-硫酸显色法 分别精密量取 2.1、2.2 项下知母皂苷 A-III、大蒜提取物溶液各 0.5 mL, 分别置具塞试管中, 水浴挥干溶剂。均加入 0.5% 茴香醛-硫酸溶液 0.5 mL, 摇匀, 于 100 °C 水浴中保温 30 min, 取出置冰水浴中 10 min, 取出, 精密加入甲醇至 10 mL, 摇匀。以相应的试剂为空白, 照分光光度法, 扫描 300 ~ 800 nm 的吸收光谱, 结果如图 2 所示。



1. 知母皂苷 A-III; 2. 大蒜提取物

图 2 对照品、供试品溶液显色后的吸收光谱(茴香醛-硫酸法)

由实验结果可见, 香草醛-高氯酸法具有较好的峰形及较高的灵敏度, 而茴香醛-硫酸法虽具有较好的峰形, 但灵敏度较低, 因此本实验选用香草醛-高氯酸法测定大蒜提取物中的大蒜总皂苷含量。由图 1 可见, 知母皂苷 A-III 对照品、大蒜提取物溶液显色后均在 540 nm 有最大吸收, 故选取 540 nm 为测定波长。

2.6 香草醛-高氯酸法显色条件的优化

2.6.1 反应温度的筛选 精密量取 2.2 项下供试品溶液 0.5 mL 6 份, 分置于具塞试管中, 水浴挥干溶剂。均加入 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 1.0 mL, 摇匀, 分别于 60, 70, 80, 90, 100 °C 水浴中保温 30 min, 取出置冰水浴中 10 min, 取出, 精密加入冰醋酸至 10 mL, 摇匀。以相应的试剂为空白, 照分光光度法, 在 540 nm 的波长处测定吸收度, 分别为 0.050, 0.102, 0.179, 0.247, 0.322, 0.355。实验结果表明吸光度随反应温度增加而变大, 至 90 °C 后增加不明显, 故选用 90 °C 作为反应温度。

2.6.2 反应时间的筛选 精密量取 2.2 项下供试品溶液 0.5 mL 6 份,分置于具塞试管中,水浴挥干溶剂。均加入 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 1.0 mL,摇匀,分别于 90 ℃ 水浴中保温 20,30,40,50,60,70 min,取出置冰水浴中 10 min,取出,精密加入冰醋酸至 10 mL,摇匀。以相应的试剂为空白,照分光光度法,在 540 nm 的波长处测定吸收度,分别为 0.314,0.358,0.391,0.410,0.419,0.423。实验结果表明吸光度随反应时间延长增加而变大,至 60 min 后增加不明显,故选用 60 min 作为反应时间。

2.6.3 香草醛-冰醋酸用量的筛选 精密量取 2.2 项下供试品溶液 0.5 mL 6 份,分置于具塞试管中,水浴挥干溶剂。分别加入 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.1,0.2,0.3,0.4 mL 和高氯酸 1.0 mL,摇匀,于 90 ℃ 水浴中保温 60 min,取出置冰水浴中 10 min,取出,精密加入冰醋酸至 10 mL,摇匀。以相应的试剂为空白,照分光光度法,在 540 nm 的波长处测定吸收度,分别为 0.243,0.444,0.635,0.743。实验结果表明虽然吸光度随香草醛-高氯酸用量的增加而变大,但对实验结果有一定干扰,故选择加入 0.2 mL 香草醛-冰醋酸。

2.6.4 高氯酸用量的筛选 精密量取 2.2 项下供试品溶液 0.5 mL 6 份,分置于具塞试管中,水浴挥干溶剂。分别加入 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 mL,摇匀,分别于 90 ℃ 水浴中保温 60 min,取出置冰水浴中 10 min,取出,精密加入冰醋酸至 10 mL,摇匀。以相应的试剂为空白,照分光光度法,在 540 nm 的波长处测定吸收度,分别为 0.566,0.467,0.403,0.355,0.308。实验结果表明吸光度随高氯酸用量的增加而减少,为了保证一定的反应体积,故选择加入 0.6 mL 高氯酸。

根据以上实验结果,确定香草醛-高氯酸法测定大蒜提取物中总皂苷含量的最优显色条件为:对照品、供试品溶液,水浴挥干溶剂后,加入 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.6 mL,摇匀,分别于 90 ℃ 水浴中保温 60 min,取出置冰水浴中 10 min,取出,精密加入冰醋酸至 10 mL,摇匀。以相应的试剂为空白,照分光光度法,在 540 nm 的波长处测定吸收度。

2.7 方法学考察

2.7.1 标准曲线的制备 分别精密量取 2.1 项下

知母皂苷 A-III 对照品溶液 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8,0.9 mL,按 2.6 项下方法测定,所得结果如下 0.157,0.257,0.371,0.465,0.551,0.656,0.736,0.856,0.941。以吸光度为纵坐标,知母皂苷 A-III 含量(mg)为横坐标,绘制标准曲线,其回归方程为 $Y = 4.839X + 0.066$ ($r = 0.9995, n = 9$)。结果表明知母皂苷 A-III 在 20.16 ~ 181.44 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.7.2 精密度考察 精密量取 2.2 项下供试品溶液 0.5 mL,按 2.7 项下方法连续测定 6 次,供试品溶液吸光度的 RSD 为 0.2% ($n = 6$),说明本方法精密度良好。

2.7.3 稳定性考察 精密量取 2.2 项下供试品溶液 0.5 mL,按 2.7 项下方法显色后,分别于 0,10,20,30,40,50,60 min 测量吸光度值。供试品溶液在 540 nm 处吸光度的 RSD 0.3% ($n = 7$),说明供试品溶液在显色后 1 h 内稳定性良好。

2.7.4 重复性考察 取同一批次的样品约 10 mg,共 6 份,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.6 项下方法测定。样品中总皂苷的平均质量分数为 56.82%,RSD 1.2% ($n = 6$),说明本方法重复性良好。

2.7.5 加样回收率试验 精密称取同一批号已知含量样品 6 份(总皂苷含量为 56.82%)各 5.0 mg,分别加入 2.5 mg 知母皂苷 A-III,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.6 项下方法测定,计算总皂苷回收率,结果见表 1。本方法平均回收率为 100.6%,RSD 1.5% ($n = 6$),说明本方法准确性良好。

表 1 大蒜提取物中的母总皂苷 A-III 回收率试验

称样量	样品中	加入量	测得量	回收率	平均值	RSD
/mg	含量/mg	/mg	/mg	/%	/%	/%
5.02	2.85	2.52	5.39	100.6		
5.09	2.89	2.48	5.33	98.3		
4.97	2.82	2.54	5.35	99.5		
4.92	2.80	2.48	5.34	102.6	100.6	1.5
5.06	2.88	2.47	5.38	101.4		
4.94	2.81	2.53	5.37	101.2		

2.8 样品中总皂苷含量的测定 取大蒜提取物样品约 10 mg,共 6 份,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.6 项下方法测定,计算样品中总皂苷含量,分别为 57.1%,57.2%,57.1%,57.6%,57.6%,55.9%。

4 讨论

目前大蒜皂苷没有对照品,大蒜皂苷苷元主要

护肝片 HPLC 特征指纹图谱的研究

朱翔¹, 韩立炜^{1*}, 马伟辰², 倪健¹, 吴清¹

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 山东省淄博职业学院药学系, 山东 淄博 255000)

[摘要] 目的: 建立护肝片 HPLC 指纹图谱, 为进一步提高护肝片的质量标准提供科学依据, 并以此比较不同厂家产品质量的差异。方法: 采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相乙腈-水溶液梯度洗脱, 检测波长 250 nm, 流速 1.0 mL·min, 柱温 30 °C。结果: 确认了 23 个共有特征指纹峰, 且方法学实验中相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均 < 5%; 不同来源的护肝片指纹图谱相似度均在 0.9 以上。结论: 该方法准确可靠, 可为护肝片的指纹图谱评价提供依据。

[关键词] 护肝片; 指纹图谱; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0056-04

Study on HPLC Fingerprint of Hupan Tablet

ZHU Xiang¹, HAN Li-wei^{1*}, MA Wei-chen², NI Jian¹, WU Qing¹

(1. Pharmacy College of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2. Department of Pharmaceutical Science, Zibo Vocational Institute of Shandong Province, Zibo 255000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC fingerprint of Hupan Tablet to improve its quality standard, and

[收稿日期] 20110316(015)

[基金项目] 国家中医药管理局公益性行业科研专项(200807038)

[第一作者] 朱翔, 研究生, 从事中药新剂型与新技术, Tel: 010-84738936, E-mail: nansixs@163.com

[通讯作者] * 韩立炜, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药新剂型与新技术, Tel: 010-84738616, E-mail: bjhlw@126.com

为 β -chlorogenin^[2], 其结构与薯蓣皂苷元和知母皂苷 A-III 具有相类似的结构。在 B 环无双键, C₂₅ 为 D 型; 知母皂苷 A-III 在 B 环无双键, C₂₅ 为 L 构型; 薯蓣皂苷元 B 环 C₅ 和 C₆ 为双键连接, C₂₅ 为 D 型。理论上推测, 知母皂苷 A-III 可能更适合作为大蒜总皂苷测定的对照品。本实验对两个对照品进行了筛选, 研究结果证实了该推测。

文献报道中总皂苷含量测定常用的显色剂有香草醛-高氯酸和茴香醛-硫酸^[3], 本实验对显色剂进行了筛选。研究表明茴香醛-硫酸法虽然具有较稳定的出峰位置以及良好的峰形, 但其吸光度较低, 灵敏度较差, 故选用香草醛-高氯酸作为显色剂。

显色反应过程中吸光度随显色的时间、温度、显色剂用量的改变而改变, 本实验对这些因素均进行了考察。实验时对这些因素应严格控制, 所用的香草醛-冰醋酸溶液应现用现配。

香草醛作为显色剂, 其与高氯酸的对实验

有一定干扰, 因此在保证灵敏度的前提下用量应越小越好。根据《中国药典》对于紫外分光光度法测定的相关规定^[4], 吸光度应在 0.3 ~ 0.7 之间, 故香草醛用量最终选用 0.2 mL。高氯酸作为发色体系的一部分, 筛选结果显示其用量越小, 吸光度值越高。本实验选用 0.6 mL 高氯酸, 既保证了分析的灵敏度, 也使反应能在足够的溶液体积内充分反应。

[参考文献]

- [1] 闫森森, 许真, 徐蝉, 等. 大蒜功能成分研究进展[J]. 食品科学, 2010, 3(5): 312.
- [2] Matsuura H. Saponins in garlic as modifiers of the risk of cardiovascular disease [J]. J Nutr, 2001, 131: 1000S-1005S.
- [3] 邱学艳, 林厚文, 沈利明, 等. 不同显色剂对玉竹总皂苷含量测定的影响[J]. 药学服务与研究, 2006, 6(2): 129.
- [4] 中国药典. 二部[S]. 2005: 附录 29.

[责任编辑 蔡仲德]