

分光光度法测定宁神颗粒中总皂苷含量

董宇*, 姜鑫, 刘静, 王震红

(辽宁省药品检验检测院, 沈阳 110036)

摘要: **目的** 建立分光光度法测定宁神颗粒中总皂苷含量。**方法** 采用 Amberlite-XAD-2 大孔树脂层析柱富集法纯化总皂苷, 以香草醛-高氯酸溶液为显色剂使显色, 采用分光光度法($\lambda = 560 \text{ nm}$)对宁神颗粒中总皂苷的含量进行测定。**结果** 宁神颗粒中总皂苷浓度在 $31.76 \sim 190.6 \text{ }\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好线性关系($r=0.9996$); 低、中、高 3 个浓度的平均回收率分别为 97.7%、98.9%和 99.2%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)小于 2.2%。本方法的检出限为 $3.4 \text{ }\mu\text{g/g}$, 定量限为 $11.2 \text{ }\mu\text{g/g}$ 。**结论** 本方法简便、准确、成本低, 可用于宁神颗粒中总皂苷的含量测定, 对产品进行质量控制。

关键词: 总皂苷; 宁神颗粒; 分光光度法

Determination of total saponins in Ningshen granules by spectrophotometry

DONG Yu*, JIANG Xin, LIU Jing, WANG Zhen-Hong

(Liaoning Institute for Drug Control, Shenyang 110036, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of total saponins in the Ningshen granules by spectrophotometry. **Methods** Total saponins was purified by Amberlite-XAD-2 macroporous resin column enrichment method, color development with vanillin-perchloric acid solution as color developer. The content of total saponins in Ningshen granules was determined by spectrophotometry ($\lambda=560 \text{ nm}$). **Results** The linear range of total saponins in Ningshen granules was $31.76 \sim 190.6 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9996$). The average recoveries of low, medium and high concentrations were 97.7%, 98.9% and 99.2%, respectively. The relative standard deviation (RSD) was less than 2.2%. The limit of detection was $3.4 \text{ }\mu\text{g/g}$ and the limit of quantitation was $11.2 \text{ }\mu\text{g/g}$. **Conclusion** This method is simple, accurate and has low cost, which can be used for determining the content of total saponins in Ningshen granules and controlling the quality of products.

KEY WORDS: total saponins; Ningshen granules; spectrophotometry

1 引言

宁神颗粒是以酸枣仁、远志、刺五加、茯苓等为主要原料制成的具有改善睡眠功能的保健食品。酸枣仁, 性甘平, 具有宁心安神、养肝、敛汗的功能, 其活性成分酸枣仁总皂苷属于达玛烷型三萜皂苷, 其中以酸枣仁皂苷 A、

酸枣仁皂苷 B 为主。远志, 性苦辛温, 具有安神益智、解郁的功能, 其活性远志总皂苷属于齐墩果酸型三萜皂苷^[1]。此外, 本方中的刺五加、茯苓也均含有皂苷成分。因此, 在建立产品质量标准时, 选取总皂苷作为标志性成分。

现有国家标准及文献报道的皂苷的定量分析方法有高效液相色谱法^[2-8]、液相色谱-串联质谱法^[9-12]、薄层扫描

*通讯作者: 董宇, 硕士, 副主任药师, 主要研究方向为保健食品安全检测。E-mail: cutedongyu@163.com

*Corresponding author: DONG Yu, Master, Associate Chief Pharmacist, Liaoning Institute for Drug Control, Shenyang 110036, China. E-mail: cutedongyu@163.com

法^[13,14]、分光光度法^[15]等。高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法和薄层扫描法对实验条件要求较高,且只能测定特定的皂苷含量。分光光度法仪器成本低,操作简单,方法容易掌握,分析速度快。宁神颗粒由于含有多种类型的皂苷,分别测定耗时耗力,因此采用分光光度法,以人参皂苷 Re 为对照品,对总皂苷含量进行测定,用以进行产品质量控制。《保健食品检验与评价技术规范》(2003 版)^[7]总皂苷测定方法操作步骤多,结果重复性差,本研究拟对该方法进行优化和改进,为保健食品中总皂苷含量测定提供思路和参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与设备

UV-2450 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司,配有 UVProbe 数据处理系统); CP-225D 电子天平(德国赛多利斯公司); AS10200ADT 超声波清洗仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); TTL-DCII 型氮吹仪(北京同泰联科技发展有限公司); DT5-2 型低速台式离心机(北京时代北利离心机有限公司)。

2.2 试剂与材料

宁神颗粒(批号: 16701、16702、16703, 辽宁大石药业有限公司); 人参皂苷 Re 对照品(批号: 110754-201626, 纯度 97.4%, 中国食品药品检定研究院); Amberlite-XAD-2 大孔树脂(美国 Supelco 公司); 中性氧化铝(层析用, 100~200 目, 国药集团化学试剂有限公司); 香草醛、无水乙醇、高氯酸、冰乙酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 溶液制备

对照品溶液的制备: 精密称取人参皂苷 Re 对照品, 用甲醇制成每 1 mL 约含人参皂苷 Re 1.5 mg 的对照品储备溶液。精密量取对照品储备溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 于 10 mL 容量瓶中, 水浴挥干甲醇, 加水溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为系列标准溶液。

供试品溶液的制备: 取供试品研细混匀, 称取约 2.5 g, 置于 50 mL 容量瓶中, 加水约 30 mL, 超声 30 min, 冷却后用水定容至刻度, 摇匀。取 10 mL 溶液于离心管中, 离心力 2100 g 离心 5 min, 取上清液备用。

2.3.2 样品测定

1) 净化

用 10 mL 注射器作为层析管, 内装 3 cmAmberlite-XAD-2 大孔树脂, 上加 1 cm 中性氧化铝, 层析柱上下均加挡板。先用 25 mL 70%乙醇洗柱, 弃去洗脱液, 再用 25 mL 水洗柱, 弃去洗脱液。精密量取系列标准溶液及已处理好的供试品溶液 1.0 mL 上样, 先用 25 mL 水洗柱, 弃去洗脱液, 再用 25 mL 70%乙醇洗脱, 收集洗脱液于 50 mL 离心

管中, 置于氮吹仪中, 于 60 °C 水浴吹干, 待显色。

2) 显色

在上述已吹干的离心管中准确加入 5%香草醛冰乙酸溶液 0.2 mL, 振摇, 使残渣溶解, 加入 0.8 mL 高氯酸, 涡旋混匀后置于 60 °C 的水浴中加热 10 min, 取出, 冰浴冷却后加入冰乙酸 5.0 mL, 摇匀, 即得。另取空白管, 同法操作, 作为空白溶剂。

3) 测定

取显色后的系列标准溶液及供试品溶液, 置 1 cm 比色池中, 以空白溶剂校正零点后, 于 560 nm 波长处分别测定吸光度值, 记录数据。

3 结果与分析

3.1 线性关系考察

以系列标准溶液浓度(X)为横坐标, 以吸光度值(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线。结果表明, 人参皂苷 Re 浓度在 31.76~190.6 µg/mL 范围内线性关系良好。回归方程为 $Y=0.00325X-0.000351$, $r=0.9996$ 。标准曲线见图 1。

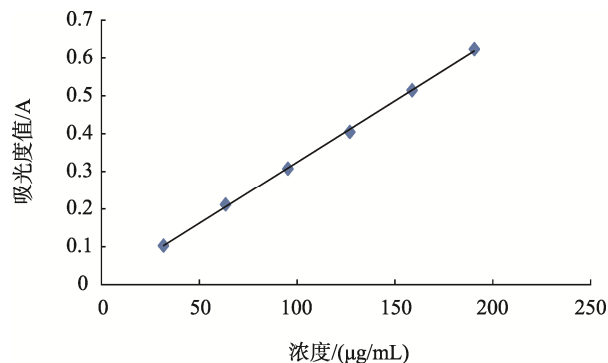


图 1 人参皂苷 Re 标准曲线图

Fig. 1 Standard curve of ginsenoside Re

3.2 检出限和定量限

取显色后的空白溶剂, 置 1 cm 比色池中, 于 560 nm 波长处测定吸光度值, 连续测定 20 次, 记录数据, 计算标准偏差 δ 值。以 $3\delta/S$ 为检出限, $10\delta/S$ 为定量限(S 为标准曲线斜率)。结果表明, 本方法中人参皂苷 Re 的最低检测浓度和最低定量浓度分别 0.168 µg/mL 和 0.561 µg/mL, 检测限和定量限分别为 3.4 µg/g 和 11.2 µg/g(取样量为 2.5 g, 定容体积为 50 mL)。

3.3 重复性实验

取研细混匀的供试品(样品批号为 16701), 称取 6 份, 按照 2.3.1 供试品溶液的制备及 2.3.2 样品测定项下操作, 依法测定, 测得总皂苷含量均值为 3.14 mg/g, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.7%。结果表明重复性良好。结果见表 1。

表 1 重复性实验结果
Table 1 Results of repeatability experiment

序号	总皂苷含量 /(mg/g)	含量均值 /(mg/g)	RSD/%
1	3.23	3.14	1.7
2	3.10		
3	3.15		
4	3.09		
5	3.09		
6	3.15		

3.4 回收率实验

取研细混匀的供试品(样品批号为 16701), 分别称取约 1.25 g, 共称取 9 份, 置于 50 mL 容量瓶中, 分别精密加入人参皂苷 Re 对照品储备溶液 1、2、3 mL, 每个浓度平行配制 3 份, 按照 2.3.1 供试品溶液的制备及 2.3.2 样品测定项下操作, 依法测定并计算回收率。低、中、高 3 个浓度的回收率分别为: 97.7%、98.9%和 99.2%, RSD 小于 2.2%, 满足实验要求, 结果见表 2。

3.5 稳定性实验

取同一份供试品溶液(样品批号为 16701), 置 1 cm 比色池中, 分别在 0、5、10、15、20 min, 于 560 nm 波长处测定样品吸光度值, 以考察供试品溶液在室温下放置的稳定性。结果表明, 供试品溶液在 20 min 内稳定, RSD 为 0.56%。数据见表 3。

3.6 样品含量测定

取安神颗粒 3 批, 按照 2.3.1 供试品溶液的制备及 2.3.2 样品测定项下操作, 按本方法测定, 计算总皂苷含量, 结果见表 4。

4 讨 论

大孔吸附树脂是一类不含交换基团且有大孔结构的高分子吸附树脂。以大孔吸附树脂为吸附剂, 通过适宜的吸附和解吸从而达到分离、提纯某一类或某一种化合物的目的。目前, 大孔吸附树脂常用于皂苷类化合物、黄酮类化合物、生物碱类化合物、酚酸类化合物等植物活性成分的分离纯化。中性氧化铝通过其物理吸附特性对不同极性的物质进行分离, 可用于醛、酮、醌、苷类等化合物的分离和纯化。故本方法采用大孔吸附树脂和中性氧化铝层析小柱对样品进行净化和富集。

香草醛-高氯酸法是苷类化合物测定时最广泛采用的显色法。显色反应过程中溶液颜色随香草醛的浓度、高氯酸的用量、时间和温度的变化而改变。因此在实验过程中要严格控制反应条件。香草醛冰醋酸溶液应临用现配, 加入样品管后充分混匀。样品管自 60 ℃水浴中取出后, 需迅速置冰浴中冷却, 再加入冰醋酸, 并在 20 min 内完成测定。

《保健食品检验与评价技术规范》(2003 版)^[7]中, 采用蒸发皿挥干样品洗脱液, 但由于蒸发皿表面积较大, 而用于复溶样品的溶剂体积小, 极易造成样品溶解和转移不完全, 导致测定结果偏低, 且结果重复性较差。本方法将洗脱液置于离心管中, 于氮吹仪上吹干溶剂后, 在同一离心管中进行下一步的显色反应, 不仅避免了二次转移造成的实验误差, 还缩短了样品前处理的时间, 样品含量测定结果的重复性也有了较大的提高。

5 结 论

本研究建立的总皂苷含量测定方法仪器成本低、操作简单、分析速度快, 重现性及准确度良好, 为安神颗粒及其他含有皂苷类成分的保健食品的质量控制提供了参考依据。

表 2 回收率实验结果
Table 2 Results of recovery experiment

样品 序号	称样量 /g	本底值/ μ g	加标体积 /mL	加标量 / μ g	测得值 / μ g	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	1.2541	3938	1	1588	5515	99.32	97.7	2.2
2	1.2503	3926	1	1588	5440	95.32		
3	1.2531	3935	1	1588	5498	98.45		
4	1.2544	3939	2	3176	7070	98.60	98.9	1.3
5	1.2538	3937	2	3176	7121	100.26		
6	1.2507	3927	2	3176	7032	97.75		
7	1.2522	3932	3	4764	8587	97.72	99.2	1.3
8	1.2497	3924	3	4764	8697	100.18		
9	1.2503	3926	3	4764	8678	99.75		

表 3 稳定性实验结果
Table 3 Results of stability experiment

时间/min	吸光度值	吸光度值均值	RSD/%
0	0.5249		
5	0.5253		
10	0.5269	0.5277	0.56
15	0.5298		
20	0.5318		

表 4 样品含量测定结果(n=2)
Tab 4 Results of sample content determination (n=2)

样品批号	总皂苷含量 (mg/g)	相对平均偏差 /%
16701	3.14	1.3
16702	3.10	0.8
16703	3.13	1.0

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中国药典 2015 年版一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. 2015 Vol I [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.

[2] 张高菊, 沈勇, 孟珍贵, 等. HPLC 法测定姜状三七 5 种皂苷含量[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(3): 500–504.
Zhang GJ, Shen Y, Meng ZG, *et al.* Determination of 5 saponins in *Panaxzingiberensis* by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(3): 500–504.

[3] 黄晓燕, 罗时, 李瑞莲, 等. HPLC 法测定血络通胶囊中人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb₁ 的含量[J]. 中国药师, 2017, 20(12): 2248–2250.
Huang XY, Luo S, Li RL, *et al.* Determination of *Ginsenoside* Rg₁, *Ginsenoside* Re and *Ginsenoside* Rb₁ in Xueluotongcapsules by HPLC [J]. Chin Pharm, 2017, 20(12): 2248–2250.

[4] 郭冲, 郜玉钢, 臧埔, 等. HPLC 法同时测定人参及其制剂中 16 种人参皂苷[J]. 中草药, 2014, 45(14): 2009–2013.
Guo C, Gao YG, Zang P, *et al.* Simultaneous determination of sixteen ginsenosides in *Panax ginseng* and its preparation by HPLC [J]. Chin Trad Herb Drug, 2014, 45(14): 2009–2013.

[5] 祝洪艳, 张力娜, 唐珊, 等. HPLC 法测定 3 个产地酸枣仁中斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A、B 的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(12): 2099–2104.
Zhu HY, Zhang LN, Tang S, *et al.* Determination of spinosin, jujubosides A and B in *Ziziphi Spinosae Semen* from three different origins by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(12): 2099–2104.

[6] 许勇, 诸艳蓉, 王柯, 等. HPLC 测定复方丹参胶囊中三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁ 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 148–151.
Xu Y, Zhu YR, Wang K, *et al.* HPLC determination of *Notoginsenoside* R₁ and *Ginsenoside* Rg₁, Re and Rb₁ in compound *Salvia miltiorrhiza* capsule [J]. Chin J Exp Trad Med Form, 2013, 19(6): 148–151.

[7] 保健食品检验与评价技术规范 2003 年版[M]. 北京: 中华人民共和国

卫生部, 2003.
Technical standards for testing and assessment of health food 2003 [M]. Beijing: Ministry of Health of the People's Republic of China, 2003.

[8] GB/T 22996-2008 人参中多种人参皂甙含量的测定液相色谱-紫外检测法[S].
GB/T 22996-2008 Determination of ginsenosides in ginseng-LC-UV method [S].

[9] 吴茵, 魏欣, 张黎媛, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定参麦注射液 7 种主要有效成分[J]. 中草药, 2014, 45(18): 2625–2630.
Wu Y, Wei X, Zhang LY, *et al.* Simultaneous determination of seven components in *Shenmai* injection by HPLC-MS/MS [J]. Chin Trad Herb Drug, 2014, 45(18): 2625–2630.

[10] 马慧, 宋少江, 刘菲菲, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定辽东槲木不同部位中 5 种皂苷类成分的含量[J]. 色谱, 2014, 32(7): 762–766.
Ma H, Song SJ, Liu FF, *et al.* Simultaneous determination of five triterpenoidsaponins in different parts of *Aralia elata* by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2014, 32(7): 762–766.

[11] 秦枫, 于生兰, 高彦慧, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定三七须根总皂苷中人参皂苷 Rg₁ 和 Re 的含量[J]. 中国药房, 2010, 21(31): 2922–2924.
Qin F, Yu SL, Gao YH, *et al.* Simultaneous determination of *Ginsenoside* Rg₁ and *Ginsenoside* Re in total *Saponins* of fibrous roots of *panaxnotoginseng* by HPLC-MS/MS [J]. Chin Pharm, 2010, 21(31): 2922–2924.

[12] 张旭, 王丽娜, 宋凤瑞, 等. 液质联用测定人参与五灵脂、莱菔子配伍的人参皂苷[J]. 分析化学, 2007, (4): 559–563.
Zhang X, Wang LN, Song FR, *et al.* Study on the variation of chemical constituents during combination of *Ginseng* with *Trogopteroumfeces* and *Semenraphani* by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2007, (4): 559–563.

[13] 王隶书, 程东岩, 朱杰. 薄层扫描法测定仙灵双保心胶囊中人参皂苷 Rg₁ 及人参皂苷 Rb₁ 之和的含量[J]. 中国药师, 2003, (3): 155–156.
Wang LS, Cheng DY, Zhu J. Content determination of sum of *Ginsenosides* Rg₁ and Rb₁ of *Xianlingshuangbaoxin* capsule by TLCS [J]. Chin Pharm, 2003, (3): 155–156.

[14] 张中苏, 杨艳, 罗晋萍, 等. 薄层扫描法测定龟龄集中人参皂苷 Rg₁ 的含量[J]. 药物分析杂志, 1999, (1): 13–15.
Zhang ZS, Yang Y, Luo JP. Thin-layer chromatographic scanning determination of *Ginsenoside* Rg₁ in *Guilingji* (longevity powder) [J]. Chin J Pharm Anal, 1999, (1): 13–15.

[15] 陈雄, 方宣启, 汪霞丽, 等. 分光光度法测定洋参软胶囊中人参总皂甙[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(12): 3107–3110.
Chen X, Fang XQ, Wang XL, *et al.* Determination of total saponins in *ginseng* soft capsules by spectrophotometry [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(12): 3107–3110.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



董 宇, 硕士, 副主任药师, 主要研究方向为保健食品安全检测。
E-mail: cutedongyu@163.com