

柱前衍生化-HPLC法测定大蒜中甾体皂苷的含量^Δ

宋兴良*, 梁恕坤, 赵翊萌, 王 鹏(临沂大学化学化工学院, 山东 临沂 276005)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0361-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.25

摘要 目的:建立测定大蒜中甾体皂苷含量的方法。方法:以对硝基苯甲酰氯为衍生化剂对大蒜中甾体皂苷进行柱前衍生化,采用高效液相色谱法测定其含量。色谱柱为Shimadzu VP-ODS,流动相为乙腈-水(80:20, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为254 nm,柱温为25 ℃,进样量为20 μl。结果:菝葜皂苷检测质量浓度线性范围为0~1.25 mg/ml($r=0.999\ 0$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率为93.1%~96.8%(RSD=1.56%, $n=6$)。结论:该方法操作简便、稳定、重复性好,可用于大蒜中甾体皂苷含量的测定。

关键词 大蒜;柱前衍生化;高效液相色谱法;甾体皂苷;菝葜皂苷

Content Determination of Garlic Saponin in *Allium sativum* by Pre-column Derivatization-HPLC

SONG Xingliang, LIANG Shukun, ZHAO Yimeng, WANG Peng (School of Chemistry & Chemical Engineering, Linyi University, Shandong Linyi 276005, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for content determination of steroidal saponin in *Allium sativum*. METHODS: Pre-column derivatization of steroidal saponin was performed by using the derivatization agent of nitro-benzoic acid-chlorine. And HPLC was conducted to determine the content of steroidal saponin. The column was Shimadzu VP-ODS with mobile phase of acetonitrile - water mixed solution (80:20, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 25 ℃, and the injection volume of 20 μl. RESULTS: The linear rang of sarsasapogenin was 0-1.25 mg/ml($r=0.999\ 0$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recovery was 93.1%-96.8% (RSD=1.56%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, stable with good separation, and can be use for the content determination of steroidal saponin in *A. sativum*.

KEYWORDS *Allium sativum*; Pre-column derivatization; HPLC; Steroidal saponins; Sarsasapogenin

abetologia, 2013, 56(12): 2 582.

- [9] Inagaki N, Kondo K, Yoshinari T, *et al.* Efficacy and safety of canagliflozin in Japanese patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, 12-week study[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2013, 15(12): 1 136.
- [10] Yale JF, Bakris G, Cariou B, *et al.* Efficacy and safety of canagliflozin in subjects with type 2 diabetes and chronic kidney disease[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2013, 15(5): 463.
- [11] Stenlof K, Cefalu WT, Kim KA, *et al.* Efficacy and safety of canagliflozin monotherapy in subjects with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled with diet and exercise[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2013, 15(4): 372.
- [12] Forst T, Guthrie R, Goldenberg R, *et al.* Efficacy and safety of canagliflozin over 52 weeks in patients with type 2 diabetes on background metformin and pioglitazone[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2014, 16(5): 467.
- [13] Bode B, Stenlof K, Harris S, *et al.* Long-term efficacy and safety of canagliflozin over 104 weeks in patients
- aged 55-80 years with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2015, 17(3): 294.
- [14] Neal B, Perkovic V, de Zeeuw D, *et al.* Efficacy and safety of canagliflozin, an inhibitor of sodium-glucose cotransporter 2, when used in conjunction with insulin therapy in patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2015, 38(3): 403.
- [15] Leiter LA, Yoon KH, Arias P, *et al.* Canagliflozin provides durable glycemic improvements and body weight reduction over 104 weeks versus glimepiride in patients with type 2 diabetes on metformin: a randomized, double-blind, phase 3 study[J]. *Diabetes Care*, 2015, 38(3): 355.
- [16] Ji L, Han P, Liu Y, *et al.* Canagliflozin in Asian patients with type 2 diabetes on metformin alone or metformin in combination with sulphonylurea[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2015, 17(1): 23.
- [17] Cuypers J, Mathieu C, Benhalima K. SGLT2-inhibitors: a novel class for the treatment of type 2 diabetes introduction of SGLT2-inhibitors in clinical practice[J]. *Acta Clin Belg*, 2013, 68(4): 287.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.21275068);临沂市科学技术发展计划项目(No.2010GSF10222)

* 教授,博士。研究方向:天然产物的提取及其资源利用。
E-mail:xlssong@126.com

(收稿日期:2015-08-17 修回日期:2015-11-04)
(编辑:刘明伟)

大蒜 *Allium sativum* L. 为百合科葱属植物的鳞茎,具有很强的防病治病功能^[1],历来被视为药食兼用佳品,目前国际市场对大蒜产品的需求主要是大蒜油、大蒜素等制品。大蒜皂苷类成分也是其主要活性成分之一,具有抗真菌、抗肿瘤、抗血栓、降低胆固醇的作用^[2]。大蒜中的皂苷类成分主要为甾体皂苷成分,其测定方法主要有分光光度法^[3]、薄层色谱法^[4]、高效液相色谱(HPLC)法^[5-6]、HPLC-质谱联用法^[7]等。HPLC-质谱联用仪器设备昂贵;分光光度法虽然仪器简单,但由于缺少合适的甾体皂苷对照品,在定量的准确性方面尚存问题;HPLC法常用紫外检测器,因甾体皂苷分子中没有共轭结构,无特征性紫外吸收,对样品的检测同样存在困难^[8-9]。以上因素致使大蒜中甾体皂苷的开发利用受到一定限制。为了分析大蒜中甾体皂苷的含量,从而为大蒜甾体皂苷的质量评价提供依据,本试验以菝葜皂苷为对照品,以对硝基苯甲酰氯(PNBC)为衍生化剂,结合柱前衍生化和HPLC法,建立了一种测定大蒜中甾体皂苷含量的方法。

1 材料

1.1 仪器

EasySep-1050 型 HPLC 仪,包括紫外检测器(上海通微技术有限公司);HW.SY11-K 型数显恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司);KQ2200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DHG-9140A 型电热鼓风干燥箱、DZF-6051 型真空干燥箱(上海一恒科技有限公司)。

1.2 试剂

菝葜皂苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:744-9904,纯度 $\geq 98\%$);吡啶(莱阳经济技术开发区精细化工厂,用前以无水氢氧化钾干燥至少 48 h);PNBC(国药集团化学试剂有限公司);4-二甲氨基吡啶(DMAP,成都格雷西亚化学技术有限公司);乙腈、乙酸乙酯为色谱纯,其余试剂均为分析,纯水为蒸馏水。

1.3 药材

发芽蒜片(A)、4~6 瓣蒜陈片(B)、烤蒜片(C)、杂交新蒜片(D)和苍山新蒜片(E)均由临沂园源食品有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Shimadzu VP-ODS(150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-水(80:20, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:254 nm;柱温:25 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ l。在上述色谱条件下,未衍生化的菝葜皂苷和甾体皂苷均未显示紫外吸收,而衍生化的菝葜皂苷和甾体皂苷均具有对称性良好的色谱峰;理论板数以菝葜皂苷峰计不低于 3 000,分离度 > 1.5 ;按信噪比为 3:1 计算,以菝葜皂苷计,其检测限为 5.8 μ g。色谱见图 1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 准确称取菝葜皂苷对照品 5.0 mg,置于 5 ml 量瓶中,用无水吡啶溶解并定容,摇匀,即得。

2.2.2 甾体皂苷供试品溶液 参考文献[1]方法,取干燥样品粉末 100 g,用 6 倍体积的 70% 乙醇在 60 $^{\circ}$ C 水浴条件下浸提 2 次,每次 24 h,合并 2 次浸提液,滤过,滤液蒸去乙醇,水溶液过 D101 大孔树脂柱,先用水洗,再用 70% 乙醇洗脱。收集乙醇洗脱液,蒸去乙醇并浓缩水溶液,冷冻干燥得大蒜甾体皂苷粗提物。取部分大蒜甾体皂苷粗提物水溶后,参考文献[10]方法进行纯化,得大蒜甾体皂苷精提物。准确称取大蒜甾体皂苷精提物适量,置于 10 ml 量瓶中,加入无水吡啶溶解并定容,摇匀,即得供试品溶液。

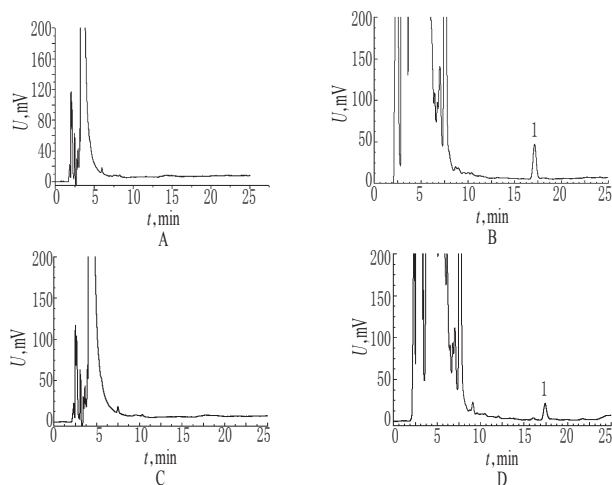


图 1 高效液相色谱图

A.未衍生化对照品;B.衍生化对照品;C.未衍生化供试品;D.衍生化供试品

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance reference without derivatization; B. substance reference with derivatization; C. test sample without derivatization; D. test sample with derivatization

2.2.3 衍生化对照品、供试品溶液 参考文献[11-12]方法,量取“2.2.1”或“2.2.2”项下 50 μ l 对照品或供试品溶液适量,置于 10 ml 具磨口的浓缩管中,加入 0.3 ml 0.10 g/ml 的 PNBC 吡啶溶液(1 ml 温热的无水吡啶溶解 100.0 mg PNBC, 现用现配),封口,保持温度在 50 $^{\circ}$ C 下反应 30 min。待反应完成后减压抽干,以去除吡啶。用 2 ml 0.25 g/L 的 DMAP 溶液冲洗容器中的残余物后,常温下超声(功率:100 W, 频率:40 kHz)处理 15 min,以水解过量的 PNBC 试剂。由于衍生物难溶于水,溶液会变浑浊。衍生化后的溶液转移至 60 ml 分液漏斗中,加入 4 ml 乙酸乙酯萃取,去掉下层液体保留乙酸乙酯层,用 2 ml 10% 碳酸氢钠溶液洗涤,再以 3 ml 0.05 mol/L 盐酸溶液洗涤 2 次,将下层水相溶液放掉,同时将乙酸乙酯层从分液漏斗上口转移到浓缩瓶中,70 $^{\circ}$ C 油浴条件下减压挥干,加入 2 ml 乙腈充分溶解,即得单一衍生化对照品、供试品溶液。

2.2.4 衍生化空白对照溶液 量取无水吡啶 50 μ l,置于 10 ml 具磨口的浓缩管中,按“2.2.3”项下方法制备衍生化空白对照溶液。

2.3 线性关系考察

分别精密称取菝葜皂苷对照品适量,用无水吡啶制成质量浓度分别为 0.025、0.50、0.75、1.0、1.25 mg/ml 的系列对照品溶液,按“2.2.3”项下方法衍生化,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以菝葜皂苷质量浓度(x , mg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y = 748\ 855.5x + 9\ 648.3$ ($r = 0.999\ 0$)。结果表明,菝葜皂苷检测质量浓度线性范围为 0~1.25 mg/ml。

2.4 精密度的试验

取“2.2.3”项下衍生化对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果,菝葜皂苷峰面积的 RSD = 1.42% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取“2.2.3”项下衍生化供试品溶液(编号:A)适量,分别于 25 $^{\circ}$ C 下放置 0、2、4、8、10、12、16、24 h 时进样测定,记录峰面积。结果,12 h 内甾体皂苷(以菝葜皂苷计)峰面积的 RSD = 1.50% ($n = 6$),而在 24 h 时测定,发现菝葜皂苷含量明显降低,

表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.6 重复性试验

精密称取同一编号样品(编号:A)适量,共7份,分别按“2.2.2”“2.2.3”项下方法制备衍生化供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,甾体皂苷(以菝葜皂苷计)峰面积的RSD=1.34%(n=7),表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取已知含量样品(编号:A)6份,每份4 mg,分别加入一定质量的菝葜皂苷对照品,按“2.2.2”“2.2.3”项下方法制备衍生化供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算甾体皂苷(以菝葜皂苷)含量并计算加样回收率,结果见表1(实测甾体皂苷含量以菝葜皂苷元计)。

表1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of the recovery test(n=6)

样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收 率,%	平均加样回 收率,%	RSD, %
12.5	6.3	17.9	95.2	95.1	1.56
12.5	6.3	18.1	96.3		
12.5	6.3	17.6	93.6		
12.5	6.3	18.2	96.8		
12.5	6.3	18.0	95.7		
12.5	6.3	17.5	93.1		

2.8 样品含量测定

取各编号样品粉末各100 g,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.3”项下方法对供试品进行衍生化,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算甾体皂苷(以菝葜皂苷计)含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of contents determination of samples(n=3)

编号	样品	甾体皂苷(以菝葜皂苷计),%
A	发芽蒜片	0.32
B	4~6瓣蒜陈片	0.21
C	烤蒜片	0.48
D	杂交新蒜片	0.75
E	苍山新蒜片	0.71

3 讨论

3.1 衍生化原理

紫外检测器为最常使用的检测器,但大蒜中甾体皂苷在通常测定波长下几乎无吸收,也没有合适的对照品。因此,需先对其进行衍生化处理。该衍生化反应通常是在无水碱性条件下,PNBC与大蒜中甾体皂苷上的羟基发生酯化反应,从而引入有紫外吸收的苯甲酰基。试验表明,虽然菝葜皂苷与大蒜中甾体皂苷在分子结构上存在差别,但是在使用PNBC进行衍生化反应时,其衍生化效率无明显差别,均按照相同的摩尔比进行反应。

本试验结果显示,采用HPLC法检测时衍生化后菝葜皂苷和大蒜中和甾体皂苷的色谱峰均在14 min处出峰,二者具有相同的保留时间,故本试验测定结果实为大蒜中甾体皂苷的含量。在目前市场上无甾体皂苷对照品作参照的情况下,采用菝葜皂苷作为参照物,通过摩尔浓度或者根据摩尔量统一换算为菝葜皂苷的质量进行计算,可以达到测定大蒜中甾体皂苷含量的目的,其计算方法为:

大蒜中甾体皂苷含量=菝葜皂苷含量(mg/ml)/大蒜样品质量(g)×100%

3.2 衍生化条件

以PNBC衍生化大蒜中甾体皂苷时,需在无水吡啶的碱性条件下进行,取样过程中要求在无水环境中进行操作,反应容器必须是干燥的,PNBC溶液必须现配现用,否则对试验结果的影响较大。此外,还需要考虑PNBC溶液的浓度及其用量、衍生化反应温度和时间等试验条件的影响,它们不仅对衍生化的完全程度有重要影响,还要考虑到在以上衍生化条件下不干扰衍生化产物的分离。因此,本试验以大蒜甾体皂苷为目标,经过反复试验确定的衍生化条件为:0.30 ml 0.10 g/ml PNBC吡啶溶液(适当过量),保持温度在50℃下反应30 min以确保衍生化完全。

3.3 耐用性试验

3.3.1 流动相比例的考察 通过将流动相中乙腈比例分别调整为80%、90%、100%,测定同一样品,分别计算大蒜甾体皂苷(以菝葜皂苷计)衍生物的分离度和拖尾因子来进行考察,结果分离度分别为1.36、1.21、1.15,拖尾因子分别为1.02、0.89、1.15(低于0.95为前延峰,高于1.05为拖尾峰)。可以看出,以80%乙腈-20%水为流动相时,色谱峰峰形最好;以90%乙腈-10%水和100%乙腈为流动相的色谱图出现了严重的基线漂移,并伴有肩峰,影响了数据的准确性。因此,选择乙腈-水(80:20, V/V)为流动相。

3.3.2 柱温的考察 保持其他色谱条件不变,分别调节色谱柱柱温为20、25和28℃时,对同一份衍生化样品进行测定,比较不同柱温条件下各目标峰的峰形、出峰顺序和峰数量。结果显示,28℃时分离度太低,只有1.16,明显<1.5,不利于很好地分离;在20℃时,虽然分离度>1.5,但是谱图出现基线漂移现象。因此,25℃是最适合的柱分离温度。

3.3.3 检测波长的考察 分别采用254、256和260 nm波长对大蒜甾体皂苷衍生化样品进行测定,并计算衍生化后的峰面积。结果,RSD=1.5%(n=3),可见无明显差异,符合要求,但以254 nm波长峰形最好。故检测波长选择254 nm。

总之,本试验建立的柱前衍生化HPLC分析方法,使大蒜中甾体皂苷在254 nm紫外波长下具有良好的吸收,克服了大蒜中其他成分的干扰。本方法在大蒜甾体皂苷对照品缺乏的情况下,实现了对它的选择性分离和灵敏检测。总之,本方法操作简便、稳定、重复性好,可用于大蒜中甾体皂苷含量的测定。

参考文献

- [1] 宋兴良,李冰冰,高振坤.大蒜多糖及皂苷的多指标优化提取工艺研究[J].食品科技,2015,40(1):216.
- [2] 闫淼淼,许真,徐蝉.大蒜功能成分研究进展[J].食品科学,2010,31(5):312.
- [3] 王瑞海,柏冬,刘丽梅.比色法测定大蒜提取物中大蒜总皂苷含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(14):53.
- [4] 柏冬,王瑞海,李景远,等.大孔树脂纯化大蒜总皂苷的工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(12):4.
- [5] 傅春燕,刘永辉,李明娟,等.HPLC测定中药百合中2个甾体皂苷的含量[J].天然产物研究与开发,2012,24(9):1250.
- [6] 陈晓勇.HPLC法测定知柏地黄丸中菝葜皂苷元的含量[J].中国药房,2011,22(40):3826.
- [7] 王铁杰,李军,梁丽娟,等.高效液相-质谱联用法(LC-MS/MS)测定延龄草苷血药浓度及其药物动力学研究[J].药物分析杂志,2007,27(7):984.

败酱皂苷H₁平衡溶解度和表观油水分配系数的测定^Δ

房启龙*,刘宏尉,刘江云#,郝丽莉,杨世林(苏州大学医学部药学院,江苏苏州 215123)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0364-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.26

摘要 目的:测定败酱皂苷H₁平衡溶解度和表观油水分配系数(lg P),为败酱皂苷后续的剂型设计和成药性研究提供参考。方法:采用高效液相色谱-蒸发光散射检测(HPLC-ELSD)法测定败酱皂苷H₁在不同有机溶剂和不同pH缓冲液中的平衡溶解度;采用摇瓶法测定败酱皂苷H₁的lg P。结果:25℃下败酱皂苷H₁在水、甲醇和乙醇中的平衡溶解度依次为0.09175、96.51、46.89 g/L,在磷酸盐缓冲液pH 7.6~10.0范围内平衡溶解度随着pH升高而明显增大;败酱皂苷H₁在pH 6.0~8.0缓冲液中其lg P范围为0.695~0.773。结论:败酱皂苷H₁及该类齐墩果酸型皂苷属于低溶解度、低透过性的成分,因而不适宜作为常规口服制剂开发使用。

关键词 败酱皂苷H₁;高效液相色谱-蒸发光散射检测法;平衡溶解度;表观油水分配系数

Determination of Solubility and Apparent Oil and Water Partition Coefficient of Saponin H₁

FANG Qilong, LIU Hongwei, LIU Jiangyun, HAO Lili, YANG Shilin (School of Pharmacy, Medical College of Soochow University, Jiangsu Suzhou 215123, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine the solubility and apparent oil and water partition coefficient (lg P) of saponin H₁, and provide reference for dosage form design and druggability research of saponin. METHODS: HPLC-ELSD was conducted to determine the equilibrium solubility of saponin H₁ in different organic solvents and pH buffer solutions; shaking flask was applied to determine lg P value of saponin H₁. RESULTS: The equilibrium solubility of saponin H₁ in water, methanol and ethanol at 25℃ was 0.09175 g/L, 96.51 g/L and 46.89 g/L, respectively. The solubility increased apparently at high pH within pH range at 7.6-10.0; the lg P value was between 0.695-0.773 in buffers within pH range at 6.0-8.0. CONCLUSIONS: Saponin H₁ and the oleanolic acid type saponins belong to low solubility, low transmission components, so it is not suitable for use as a conventional oral formulation is developed.

KEYWORDS Saponin H₁; HPLC-ELSD; Equilibrium solubility; Apparent oil and water partition coefficient

败酱科植物黄花败酱 *Patrinia scabiosaeifolia* Fisch. 是我国传统中药,具有清热解毒、排脓破瘀的功效,其中成药制剂败酱片可用于治疗以失眠为主要症状的神经衰弱或精神疾病^[1]。为进一步研究开发该药材,本课题组对黄花败酱中的化学成分进行了系统分离,鉴定了其中主要的17种皂苷成分^[2]。药理学筛选实验发现,部分败酱皂苷对多种癌细胞株均有抗

肿瘤活性^[3]。本研究以败酱皂苷H₁为对象,首次对其平衡溶解度和表观油水分配系数(lg P)进行测定,以期对败酱皂苷后续的剂型设计和成药性研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱(HPLC)仪(日本Shimadzu公

- [8] 罗静,沈昱翔,周浓,等.HPLC法测定14个不同产地滇重楼中薯蓣皂苷元的含量[J].中国药房,2015,26(21):2965.
[9] 闫森森,许真,徐蝉,等.大蒜功能成分研究进展[J].食品科学,2010,31(5):312.
[10] 柏冬,王瑞海,刘丽梅.大蒜皂苷对照品制备及比色法测

定大蒜皂苷提取物中总皂苷含量[J].中国中医药信息杂志,2012,19(9):55.

- [11] Mochizuki E, Yamamoto T, Mimaki Y, et al. Ultraviolet derivatization of steroidal saponin in garlic and commercial garlic products as p-nitrobenzoate for liquid chromatographic determination[J]. *JAOAC Int*, 2004, 87(5):1063.
[12] 彭缨,骆昉,王淑君,等.柱前衍生高效液相色谱法测定知母中菝葜皂苷元的含量[J].沈阳药科大学学报,2008,25(5):372.

(收稿日期:2015-01-13 修回日期:2015-08-09)

(编辑:张静)

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81274190);江苏省重大科技支撑与资助创新专项项目(No.BE2012649)

* 硕士研究生。研究方向:中药新药研发。E-mail:yunlongfang@163.com

通信作者:副教授。研究方向:天然产物化学与新药研发。电话:0512-65884301。E-mail:liujiangyun@suda.edu.cn