

实验技术与方法

测定参类保健食品中总皂苷的新方法

张连龙,周华生,成恒嵩

(无锡健特药业有限公司,江苏 无锡 214091)

摘要:目的 建立参类保健食品人参总皂苷比色测定新方法。方法 采用大孔吸附树脂纯化样品,人参皂苷 Re 为标准品,通过蒽酮与人参皂苷分子中的糖基反应进行比色法测定。结果 人参皂苷 5~200 $\mu\text{g/ml}$ 范围内呈线性关系, $y=0.369+0.994x$, 相关系数 $r=0.9995$, 回收率 90.7%~104.2%, 相对标准差 3.50%~6.42%。结论 该方法简便、快速、准确,能满足参类保健食品中总皂苷的测定。

关键词:参类保健食品;糖基;人参苷元;蒽酮比色法;测定

中图分类号:S567.51 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)05-0442-04

New colorimetric method to test the total ginsenoside in Ginseng function foods

Zhang Lianlong, Zhou Huasheng, Cheng Hengsong

(Wuxi Giant Pharmaceutical Co., Ltd., Jiangsu Wuxi 214091, China)

Abstract: Objective To establish a new colorimetric assay method for the determination of total ginsenoside in Ginseng health foods. **Methods** Samples were purified by macroporous adsorption resin, the reaction of anthrone with glycon in ginsenosides was assayed by colorimetric method. Ginsenoside Re was used as a reference material. **Results** There was a good linearity in the range of 5-200 $\mu\text{g/ml}$ of ginsenoside, the regression equation was $y=0.369+0.994x$, the correlation coefficient $r=0.9995$. The recovery rate was 90.7%-104.2%. The relatively standard deviation was 3.50%-6.42%.

Conclusion The method was simple, fast, accurate and precise, which could meet the requirement for the determination of total ginsenoside in health foods.

Key words: Ginseng health foods; glycon; ginseng aglycon; anthrone colorimetric method; determination

参类保健食品主要是指以干燥的人参和西洋参根及其提取物为原料加工成的保健食品。这类产品剂型多样,有切片、含片、茶剂、胶囊、口服液、酒类等,其成分十分复杂,有单一原料加工的产品,也有以参类为主要原料添加其他中药材、食品添加剂及营养强化剂等复配成的产品。这类产品的总皂苷是必测的指标。目前国内外大多采用人参皂苷 Re,部分用 Rg₁ 为标准品,用香草醛比色法测定总皂苷^[1-3]。其显色体系主要是:香草醛-冰醋酸-高氯酸^[4],还有香草醛-乙醇-硫酸^[5],香草醛-冰醋酸-硫酸^[6]等,这些传统的测定方法已沿用至今。但在实际操作中和据相关文献报道,结果差异较大,尤其是不同实验室间测定结果差异更大。卫生部食品卫生监督所2000年组织全国22个省、市、自治区省级疾病预防控制中心保健食品功效成分检验实验室对这一方法进行比对试验,结果显示:离散

度较大,有的浓度水平还出现离群值,各实验室间的 RSD 达 80%^[7],因此需要对测定方法加以改进。人参皂苷的结构由两部分组成,即苷元和糖基,中间通过糖苷键连接^[8]。上述方法测定原理是以人参皂苷 Re 计,在强酸条件下,苷元与香草醛反应生成紫红色化合物;新方法同样以人参皂苷 Re 计,在强酸条件下,糖基与蒽酮或苯酚反应生成蓝绿色或黄色化合物,其含量与颜色的深度成正比。本文利用皂苷的糖基与蒽酮的显色反应来测定总皂苷。

1 材料与方法

1.1 仪器

UV-2450 紫外可见分光光度计, AE240 分析天平, KQ-50DB 型数控超声波清洗器, SH-S 数显恒温水浴锅, 层析柱:玻璃柱 15 mm × 120 mm, 底层有砂芯隔板, 参照文献[4]湿法装柱, 内装 Amberlite XAD-2 3 cm(约 5 g)大孔树脂(Sigma 公司), 上加 1 cm(约 1.5 g)的中性氧化铝(层析用 100~200 目)(国药集团化学试剂有限公司), 先用 25 ml 70% 乙醇(V/V)洗柱, 再用 25 ml 水洗柱, 平衡。

1.2 试剂

收稿日期:2010-11-19

作者简介:张连龙 男 研究员 研究方向为药品、保健食品研制和质量分析 E-mail:zhlianlong@sina.com

通信作者:周华生 男 主管药师

硫酸、无水乙醇和蒽酮均为分析纯;蒽酮试剂, 0.2 g 蒽酮溶于 100 ml 浓硫酸;标准品:人参皂苷 Re (100%)、拟人参皂苷 F₁₁ (100%)、芦丁 (100%)、异鼠李素 (100%)、山萘素 (100%)、槲皮素 (100%)、大豆苷 (100%)、芦荟苷 (100%)、红景天苷 (99.9%)、均由中国药品生物制品检定所提供;诱惑红 (99.0%)、柠檬黄 (99.5%)、日落黄 (99.5%)、靛蓝 (99.8%)、均购自 Sigma 公司;玫瑰红、玉米黄、栀子蓝、木糖醇、白砂糖、低聚异麦芽糖、淀粉、山梨酸钾、苯甲酸钠 (国产食品添加剂);水为去离子水。

1.3 供试品

固体剂型:片剂、颗粒剂、茶剂、胶囊;液体剂型:口服液、酒类。

1.4 方法

1.4.1 标准溶液配置

精确称取 10 mg 人参皂苷 Re 于 100 ml 容量瓶中,加 50 ml 水,超声至溶液透明,为便于保存,加 3 滴浓盐酸,用水定容至刻度,浓度 100 μg/ml。

1.4.2 标准曲线制备

精密吸取标准溶液 0、0.25、0.50、1.00、1.25、1.50、2.00 ml 于 100 ml 瓷蒸发皿中,加水补足至 2.0 ml,分别加 6 ml 蒽酮试剂,摇匀,盖上表面皿,置沸水浴加热 10 min,显色液呈蓝绿色,取出放至室温,590 nm 处,以空白为零,测定各浓度的吸光度。

1.4.3 样品溶液制备

酒类样品:精密吸取一定量酒样 (约相当于人参皂苷 5 mg) 于瓷蒸发皿中,沸水浴蒸干,挥去乙醇,用水转移至 50 ml 容量瓶中,用水定容至刻度,过滤。

非酒类液体样品:摇匀过滤后,精密吸取一定量样品 (约相当于人参皂苷 100 μg),直接上样测定。

固体样品:精确称取一定量样品 (约相当于人参皂苷 5 mg) 至 50 ml 容量瓶中,加水 40 ml,超声 20 min,放至室温,用水定容至刻度,过滤。

1.4.4 样品测定

精密吸取 1.00 ml 样品至层析柱上,先用 50 ml 水,继用 25 ml 20% 乙醇,洗涤弃去,再用 25 ml 70% 乙醇洗脱,瓷蒸发皿收集洗脱液,沸水浴挥干,冷却至室温,加水 2.0 ml,将蒸干的人参皂苷荡涤至底部,以下显色同 1.4.2。

1.4.5 含量计算

$$X = \frac{C \times V_2}{m \times V_1 \times 1000} \times 100$$

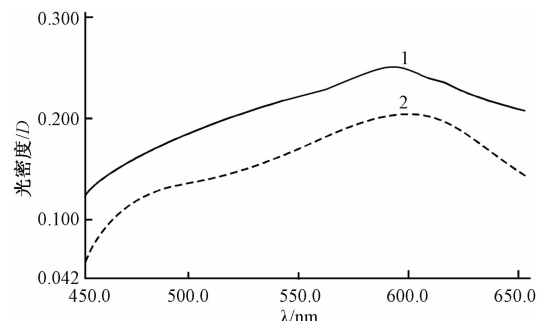
其中, X——样品中总皂苷的含量, mg/100 g; C——由回归方程求出样品中皂苷含量, μg; V₂——

样品提取液总体积, ml; V₁——样品上柱体积, ml; m——样品质量, g。

2 结果与分析

2.1 显色溶液的最大吸收波长

将标准品和样品在波长 450 ~ 650 nm 处连续扫描 (图 1), 标准品和样品的吸收图谱基本一致, 最大吸收波长为 590 nm, 故以此作为光密度测定波长。



1: 标准品; 2: 样品

图 1 标准品和样品扫描图

Figure 1 Scan spectrum of standard and sample

2.2 线性范围及相关系数

在 590 nm 处, 通过测定不同浓度的标准品对应吸光度, 在 5 ~ 200 μg/ml 范围内其回归方程 $y = 0.369 + 0.994x$, 相关系数 $r = 0.9995$, 呈直线回归, 可以进行定量测定。

2.3 超声时间的确定

试验设定超声时间 10、20、30、40 min; 水为提取液, 超声 20 min 时, 样品中的人参皂苷已溶出, 测定值趋于稳定。

2.4 大孔树脂的洗脱条件

试验选择 100 μg/ml 人参皂苷 Re 和拟人参皂苷 F₁₁ 为上样液, 上样 1 ml, 分别用 50 ml 水和 25 ml 20%、30%、40%、50%、60%、70% 乙醇溶液洗脱, 流速 3 ml/min, 分别收集洗脱液进行皂苷含量测定, 水和 20% 乙醇没有皂苷流出, 30% 乙醇洗脱量为上样量的 2%, 依次类推: 40% 乙醇为 28%, 50% 乙醇为 92%, 60% 乙醇为 95%, 70% 乙醇可以完全洗脱。

2.5 稳定性试验

将显色后的标准品和样品分别放置 10、20、30、40、50、60、70、80 min, 测定光密度。结果见表 1, 该显色体系在 60 min 内吸光度基本不变, 70 min 后吸光度有所降低, 故在显色后 60 min 内测定。

2.6 精密度试验

分别称取 6 份样品, 按实验方法测定光密度, 其光密度值分别为 0.424、0.401、0.437、0.393、0.448、0.419。精密度较高, 重复性好, 误差小, RSD 为 4.99%。

表1 显色体系的稳定性
Table 1 Stability of chromogenic system

| 样品 | 光密度 | | | | | | | | |
|---------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 0 min | 10 min | 20 min | 30 min | 40 min | 50 min | 60 min | 70 min | 80 min |
| 标准品 Re | 0.375 | 0.376 | 0.375 | 0.374 | 0.375 | 0.374 | 0.375 | 0.352 | 0.341 |
| 标准品 F ₁₁ | 0.267 | 0.253 | 0.262 | 0.259 | 0.271 | 0.262 | 0.271 | 0.261 | 0.249 |
| 样品 | 0.427 | 0.426 | 0.426 | 0.424 | 0.425 | 0.425 | 0.425 | 0.397 | 0.376 |

2.7 回收率试验

按照测定方法制备3种不同浓度样品本底皂苷,再分别加入3种不同浓度的人参皂苷 Re 标准品,每种浓度重复3次,共9个样本,分别测定回收率(表2)。其回收率为90.7%~104.2%,RSD为3.50%~6.42%。

表2 回收率试验

Table 2 Recovery rates of adding standards (n=3)

| 样品本底皂苷含量(μg/ml) | 标准品加入量(μg/ml) | 实测值(μg/ml) | 回收率(%) | RSD(%) |
|-----------------|---------------|------------|--------|--------|
| 5 | 5 | 10.12 | 102.4 | |
| 5 | 5 | 9.62 | 92.4 | 5.14 |
| 5 | 5 | 9.85 | 97.0 | |
| 15 | 12 | 26.9 | 99.2 | |
| 15 | 12 | 26.1 | 92.5 | 3.50 |
| 15 | 12 | 26.5 | 95.8 | |
| 40 | 45 | 82.93 | 95.4 | |
| 40 | 45 | 86.89 | 104.2 | 6.42 |
| 40 | 45 | 80.82 | 90.7 | |

2.8 相关共存干扰物质的影响

由于参类保健食品剂型多样,添加成分复杂,为此,试验设置了相关共存干扰物质影响的测定。该类保健食品主要共存物质有黄酮类、苷类、糖类、合成色素、天然色素、防腐剂等,各类择其代表者,黄酮类有芦丁、异鼠李素、山萘素、槲皮素;苷类有大豆苷、芦荟苷、红景天苷;糖类有单糖(木糖醇)、双糖(白砂糖)、低聚糖(低聚异麦芽糖)、多糖(淀粉);合成色素有诱惑红、柠檬黄、日落黄、靛蓝;天然色素有玫瑰红、玉米黄、栀子蓝;防腐剂有山梨酸钾、苯甲酸钠等。在单一干扰物质试验基础上,在上述6大类中分别加入人参皂苷 Re,按步骤上柱、洗涤、洗脱、显色,测定光密度,计算回收率。其中天然色素、合成色素和防腐剂按GB 2760食品添加剂使用卫生标准最高限量添加,而其他物质则按与Re 1:1添加,考察存在干扰的可能性,结果见表3。

表3 相关共存干扰物质的影响

Table 3 Influence of related coexistent materials

| 干扰物质 | 代表品种 | 每种物质添加量(μg/ml) | Re 添加量(μg/ml) | Re 回收率(%) |
|------|-------------------|----------------|---------------|-----------|
| 黄酮类 | 芦丁、异鼠李素、山萘素、槲皮素 | 100 | 100 | 98.5 |
| 苷类 | 大豆苷、芦荟苷、红景天苷 | 100 | 100 | 93.3 |
| 糖类 | 木糖醇、白砂糖、低聚异麦芽糖、淀粉 | 100 | 100 | 108.0 |
| 合成色素 | 诱惑红、柠檬黄、日落黄、靛蓝 | 100~200 | 100 | 106.0 |
| 天然色素 | 玫瑰红、玉米黄、栀子蓝 | 100~200 | 100 | 104.4 |
| 防腐剂 | 山梨酸钾、苯甲酸钠 | 200 | 100 | 102.0 |

试验结果说明,只要选择专一性强的无机、有机吸附材料,把握好洗涤、洗脱条件,严格操作,就可以排除这些相关共存干扰物质的影响,取得较好的测定结果。

2.9 不同参类产品的测定

试验收集7种不同类型参类保健食品,应用新方法和原香草醛比色法分别进行含量测定,结果见表4。两种方法的测定结果误差较小,相对误差为3.27%~8.89%,因此新方法可应用于不同参类保健食品中总皂苷含量的测定。

表4 不同参类产品总皂苷的测定

Table 4 Determination of total ginsenoside in Ginseng health foods

| 产品名称 | 剂型 | 主要原料 | 总皂苷标示量(以 Re 计,mg/100g) | 新方法测定值(以 Re 计,mg/100g) | 原香草醛法测定值(以 Re 计,mg/100g) | 两种方法的相对误差(%) |
|------|----|---------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|--------------|
| 样品1 | 胶囊 | 西洋参超微粉 | 3000 | 3791 | 3917 | 3.27 |
| 样品2 | 酒剂 | 鹿茸、龟甲、西洋参、杜仲、枸杞子、蜂蜜、白酒 | 83.5 | 136.3 | 124.7 | 8.89 |
| 样品3 | 片剂 | 人参、生地黄、茯苓、黄芪、天门冬、欧巴代、硬脂酸镁 | 410 | 732 | 682 | 7.07 |
| 样品4 | 片剂 | 西洋参、薄荷脑、白砂糖、淀粉 | 1000 | 1368 | 1437 | 4.92 |
| 样品5 | 胶囊 | 西洋参粉 | 5000~10000 | 8255 | 7831 | 5.27 |
| 样品6 | 胶囊 | 西洋参、三七、五味子、维生素 E | 7000 | 7234 | 7675 | 5.92 |
| 样品7 | 切片 | 加拿大洋参 | 4000 | 4826 | 4512 | 6.73 |

3 讨论

目前参类保健食品总皂苷的测定方法尚无国家标准,仅有卫生部制定的技术规范。该法与新方法均系在强酸条件下显色,原方法是皂苷的苷元与香草醛反应显紫红色,而新方法系皂苷的糖基与蒽酮显蓝绿色或与苯酚显黄色。无论选用蒽酮或苯酚反应,只要精心操作,均可以得到满意的效果。由于苯酚配制前需重新蒸馏,而蒽酮使用相对方便,故选用蒽酮。

根据“相似相溶”的原理^[9],极性较强的人参皂苷、单糖、低聚糖、多肽、氨基酸、矿物质、色素均溶于水,层析柱中的中性氧化铝和大孔吸附树脂分别属于非极性无机和有机吸附剂,大孔树脂选择性强,理化性质稳定,不溶于酸、碱及有机溶剂,吸附容量大,可吸附80~100 μg/g的人参皂苷^[10],对水溶性人参皂苷的吸附力强,而对于其他物质吸附力差,易被水洗涤,再用20%乙醇可进一步洗涤低脂溶性物质。相关文献报道,非极性的大孔树脂对人参皂苷类物质吸附力强,而黄酮类、苷类、糖类、色素类则一般选择中等极性、极性或强极性树脂吸附^[11]。

为了保证大孔树脂分离纯化效果和柱的使用寿命,样品一定要经过过滤,以除去水不溶性蛋白质、杂多糖、淀粉和纤维素等杂质。装柱、上柱、洗涤、洗脱都要防止气泡产生,柱面要平整,上样时,吸管中的样品要沿着柱内壁上方0.5 cm以内距离均匀加样,待样品布满柱面后,打开活塞。在操作过程中要始终保持一定的液面,70%乙醇保存,切忌干涸——可防止微生物污染,且可防降低柱效。一般每柱可净化30~40个样品,当树脂发黑或标准品上柱回收率降低,可弃去,重新装柱。

该方法所选用的吸附材料专一性强,排除了相关共存物质黄酮类、苷类、糖类、合成色素、天然色素、防腐剂等的干扰,达到了充分纯化样品的目的。

显色体系在60 min内均能保持稳定,重复性好,可操作性强,误差小,*RSD*为3.50%~6.42%,回收率为90.7%~104.2%,适合目前市场上多种参类保健食品总皂苷的测定。

该方法所选择的测定对象主要是以参类为单一成分,或以参类为主要组分复配的保健食品。由于参类保健食品剂型多样,成分复杂,因此对于吸附树脂类型的选择,吸附及解吸附条件,排除干扰物质的影响,还有待深入的研究。对于测定总皂苷,目前只能选择比色法,它是一个重要的质量指标,若测定人参皂苷的某些单一成分,可选择薄层扫描和高效液相色谱法。

参考文献

- [1] 王光亚. 保健食品功效成分检测方法[M]. 北京:中国轻工业出版社,2002:91-94.
- [2] WU Jianyong, LIN Lidong, CHAU Foo-Tim. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells[J]. *Ultrason Sonochem*,2001(8):347-352.
- [3] GLEBKOV L I, KRASOVSKAYA N P, POKUSHALOVA T V, et al. Standardization of ginseng root and tincture quality with respect to the total content of ginsenosides[J]. *Pharm Chem J*, 2004,38(4):191-194.
- [4] 卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[S]. 2003.
- [5] 丛登立,王广树. 人参皂苷口服液中人参皂苷含量的测定[J]. *人参研究*,2003,4:25-26.
- [6] 贾守宁. 比色法测定天伦养生酒中人参皂苷含量[J]. *时珍国药研究*,1994,5(3):16-17.
- [7] 韩宏伟,王竹天,杨祖英,等. 人参皂苷和褪黑素分析的质量控制[J]. *中国食品卫生杂志*,2001,13(3):11-15.
- [8] 郑建仙. 功能性食品[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999:616-628.
- [9] 倪沛州. 有机化学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:46-48.
- [10] 郑友兰,张崇禧,张春红,等. 大孔吸附树脂对人参皂苷吸附容量的影响[J]. *吉林农业大学学报*,2002,24(6):47-49.
- [11] 米靖宇,宋纯清. 大孔吸附树脂在中草药中的应用进展[J]. *中成药*,2001,23(12):914-917.