

ASE - HPLC 法测定黄姜中薯蓣皂甙元的含量

贾 林 张 翱 刘红妮 胡 玲 张翠娥 刘 敏

(西安近代化学研究所, 西安 710065)

摘要 采用 ASE 200 快速溶剂萃取机提取技术和高效液相色谱法, 测定黄姜中薯蓣皂甙元的含量。确定了 ASE 200 提取条件以及 HPLC 测定条件, 以甲醇作为流动相, 流速 1 mL/min, UV 检测器, 测定波长 210 nm, 采用 YWG C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm i. d., 10 μm)。测定皂甙元的线性范围为 0.01 ~ 2.93 g/L, $r = 0.9996$, 样品检出限为 0.2 mg/L, 加标回收率为 97.1% ~ 99.8%, RSD = 1.1% ($n = 7$)。

关键词 黄姜 薯蓣皂甙元 快速溶剂萃取机 HPLC

从黄姜根状茎中提取的薯蓣皂甙元(俗称皂素)是合成甾体激素药物的基础原料和起始中间体, 每吨出厂价格最高时达到近 60 万元。黄姜提取皂甙元工艺近 50 年来一直采用发酵法生产, 由于该生产工艺落后, 技术含量低, 不但浪费严重, 而且产生了大量的废渣和废水, 黄姜酸解液污染治理成了世界性的难题。为了从根本上减少污染和浪费, 在课题组协同陕西旬阳某工厂一起改进生产工艺时, 需要首先确立一个准确、直观、不受其它物质干扰的皂素定值方法。黄姜中皂素的定值过程包括皂甙酸解为皂素、皂素提取和皂素检测 3 部分。目前薯蓣皂甙元的提取方法有回流提取^[1-3]、索式提取^[4]、微量浸提法^[1]等, 测定方法有重量法^[1]、薄层扫描法^[2]、旋光法^[5]、分光光度法^[1,4,6,7]、HPLC 法^[3]等。提取方法中, 回流提取和索式提取时间较长(7 ~ 20 h), 微量浸提法要求浸取液中薯蓣皂甙元浓度要远小于薯蓣皂甙元的溶解浓度; 测量法中重量法误差较大, 分光光度法要先对提取物脱色, 这样会带来一定的误差, 旋光法不适合粗提物检测^[8]。笔者经研究比较, 采用 ASE 200 法提取薯蓣皂甙元, 用 HPLC 外标法测定, 该方法快速、所需溶剂较少, 可以较直观地测定生产中各环节产物中皂素的含量。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

高效液相色谱仪: Varian ProStar 型, 美国 Varian 公司;

电子天平: AL 204 型, 中国梅特勒 - 托利多仪器(上海)有限公司;

加速溶剂萃取机: ASE 200 型, 美国戴安公司;

电热鼓风干燥箱: 101A - 1B 型, 上海实验仪器厂有限公司;

电热恒温水浴锅: HH · SY21 - Ni 型, 北京长风

仪器仪表公司;

薯蓣皂甙元对照品: 将生产中提取的薯蓣皂甙元经过 5 次重结晶, 用流动相溶解, 在 HPLC 上检测, 用面积归一化法计算含量为 96.03%, 熔点为 200.2°C;

甲醇: 色谱纯;

浓硫酸: 分析纯;

黄姜样品: 产自陕西旬阳;

实验用水为蒸馏水。

1.2 ASE 200 和 HPLC 实验条件

(1) ASE 200 条件 提取溶剂: 甲醇; 萃取池: 11 mL; 萃取温度: 100°C; 静态萃取时间: 10 min; 冲洗溶剂体积比例: 30%; 氮气吹扫: 60 s; 萃取循环 2 次。

(2) HPLC 条件 UV 检测器(波长为 210 nm); 色谱柱: 汉邦科学仪器有限公司的 YWG C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm i. d., 10 μm); 流动相: 甲醇, 流速为 1 mL/min; 进样量: 10 μL。

1.3 实验方法

准确称取已粉碎的黄姜样品, 加 2 mol/L 的硫酸溶液 80 mL 在沸水浴上酸解 4 h, 中和反应液, 抽滤, 残渣于 100°C 烘干。将残渣连同滤纸一起放入 ASE 200 的萃取池中进行萃取。萃取完后, 将 ASE 200 收集瓶中的液体转移至 50 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 即得样品溶液。准确称取薯蓣皂甙元对照品用甲醇配制成薯蓣皂甙元标准溶液。待 HPLC 仪器稳定后用外标法进行标准溶液和样品溶液的测定。

2 结果与讨论

2.1 色谱图

将按 1.3 实验方法处理的黄姜样品以及薯蓣

皂甙元对照品进样分析, 色谱图如图 1、图 2 所示。

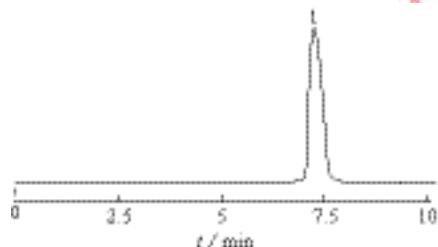
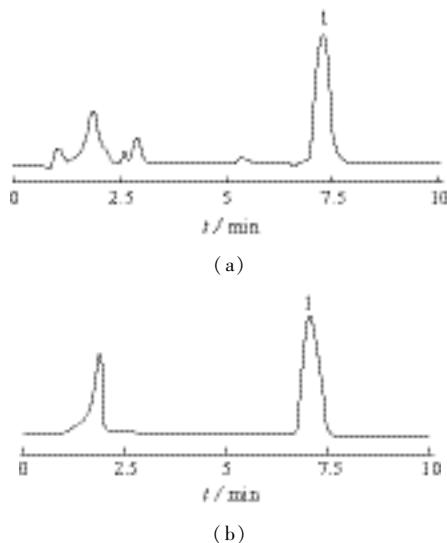


图 1 薯蓣皂甙元对照品液相色谱图



a—除去纤维素和淀粉的黄姜样品; b—酸解过黄姜样品

图 2 黄姜样品色谱图

2.2 黄姜酸解时的酸浓度

本实验采用循环法生产皂素, 将所得薯蓣皂甙元累计称量, 每批均用本方法检测残渣中薯蓣皂甙元含量, 直到检测不出薯蓣皂甙元时才停止该批生产, 得到该批收率(所得薯蓣皂甙元总量除以该批原料质量)。理论上黄姜中薯蓣皂甙元检测含量应大于等于该批薯蓣皂甙元收率。根据文献报道, 检测样品时用 1 mol/L 硫酸溶液^[1]或 1.25 mol/L 硫酸溶液^[3]和 2 mol/L 盐酸溶液^[2,6]进行酸解, 但实验中发现黄姜中薯蓣皂甙元含量远小于实际生产收率, 因此参考原生产工艺将硫酸的浓度提高为 2.0 mol/L。表 1 为硫酸溶液浓度不同时, 6 批样品酸解后, 薯蓣皂甙元含量的检测结果和生产中该批原料的收率。从表 1 中数据可知, 当用 2 mol/L 硫酸溶液酸解黄姜样品时, 样品中绝大部分黄姜已经变成薯蓣皂甙元。考虑到过浓的硫酸溶液可能会破坏薯蓣皂甙元, 故最终选择 2 mol/L 硫酸溶液酸解黄姜样品。

2.3 ASE 200 提取条件

将适量薯蓣皂甙元对照品放入 ASE 200 一个萃

表 1 硫酸溶液的浓度对酸解效果的影响

样品	薯蓣皂甙元检出量/%		薯蓣皂甙元收率/%
	1 mol/L H ₂ SO ₄	2 mol/L H ₂ SO ₄	
1#	10.80	13.82	13.64
2#	19.07	21.25	20.80
3#	2.02	2.24	2.23
4#	8.64	9.84	9.71
5#	10.86	12.66	12.58
6#	9.11	10.30	10.21

取池中, 分别萃取至两个收集瓶中, 用 HPLC 法检测第二个收集瓶中是否含有薯蓣皂甙元。逐步改变 ASE 200 的操作参数, 直至第二个收集瓶中无薯蓣皂甙元被检出。用此方法确定了 1.2 中 ASE 200 的提取条件。

2.4 标准工作曲线

准确称量不同质量薯蓣皂甙元对照品分别置于 7 个 50 mL 容量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 振摇使其溶解完全, 配制成质量浓度分别为 0.01、0.25、0.63、1.19、1.65、2.15、2.93 g/L 的标准溶液, 然后分别用 HPLC 法检测, 以色谱峰面积(Y)对标准溶液浓度 X(g/L)进行线性回归, 得到工作曲线方程为 $Y = 1.85215 \times 10^7 X + 674267.16, r = 0.9996$, 线性范围为 0.01 ~ 2.93 g/L。

2.5 检出限

将生产中提取皂甙元后的黄姜残渣样品按 1.3 实验方法操作, 当信噪比为 3 时, 对检出限进行测定, 结果表明薯蓣皂甙元的检出限为 0.2 mg/L。

2.6 精密度试验

取某两批生产中已经除去淀粉和纤维素的黄姜样品, 称取适量按 1.3 实验方法测定, 薯蓣皂甙元的测定结果列于表 2。

表 2 精密度试验结果($n=10$)

黄姜样品	称样量/g	薯蓣皂甙元含量/%	平均值/%	RSD/%
1#	0.0157	9.9	10.1	2.2
	0.0431	10.0		
	0.0731	10.4		
	0.1308	10.0		
	0.1812	10.3		
2#	0.1368	11.5	11.4	0.8
	0.1372	11.4		
	0.1275	11.5		
	0.1265	11.4		
	0.1345	11.3		

由表 2 可知, 测定结果的相对标准偏差不大于 2.2%。由表 2 还可以看出, 当黄姜称样量合适时精

密度较好,原因可能跟酸解的酸量有关:相对于样品而言,酸过多可能会破坏薯蓣皂甙元,酸过少则酸解不完全;另外,由于黄姜本身含量不均匀,所测结果也有一定偶然性。一般可根据薯蓣皂甙元含量估计值称取样品,尽量保证用液相色谱检测薯蓣皂甙元含量时薯蓣皂甙元峰面积在线性范围中部即可,例如已经除去淀粉和纤维素的黄姜样品,估计薯蓣皂甙元含量在10%左右,可以称取样品0.10~0.14 g即可,然后按1.3实验方法酸解、提取和检测。

2.7 回收试验

准确称量0.05 g薯蓣皂甙元对照品加入到经检测不含有薯蓣皂甙元的黄姜生产废渣中,按1.3方法操作(不用酸解),检测薯蓣皂甙元的含量,检测结果列于表3。由表3可知,回收率为97.1%~99.8% ($n=7$),RSD为1.1%。

表3 回收试验结果($n=7$)

样品	加标量/mg	检出量/mg	回收率/%
1#	0.0505	0.0494	97.7
2#	0.0507	0.0496	98.5
3#	0.0498	0.0497	99.8
4#	0.0510	0.0498	97.7
5#	0.0515	0.0500	97.1
6#	0.0505	0.0502	99.3
7#	0.0500	0.0499	99.7

2.8 样品测定

用本方法对4批样品进行检测,1#为生产中烘干黄姜;2#为生产中已经除去淀粉和纤维素的黄姜;3#为生产中已经酸解完的黄姜;4#为生产中提取完皂甙元的废渣。按照1.3实验方法分别测定5

个平行样(3#样品不需要酸解),分别计算薯蓣皂甙元平均含量和RSD,测定结果列于表4。

表4 检测样品中薯蓣皂甙元含量结果($n=5$)

样品	薯蓣皂甙元含量平均值/%	RSD/%
1#	1.1	1.6
2#	9.5	1.2
3#	56.9	0.8
4#	0.01	1.8

3 结语

ASE-HPLC法直观、快速,测定结果准确,能较好地满足从黄姜提取薯蓣皂甙元生产中一系列样品(如原料、半成品、薯蓣皂甙元产品、生产废渣)中薯蓣皂甙元含量的检测。

参考文献

- [1] 易自力,董静洲,蒋建雄.快速测定黄姜中薯蓣皂甙元含量方法的研究[J].西北林业科学,2005,34(1):57~59.
- [2] 张容平,曾跃勤,和国元,等.薯蓣皂素含量的快速测定方法[J].中国医学报,1998,13(4):67~67.
- [3] 顾永明,袁丽红,李文谦,等.RP-HPLC法测定盾叶薯蓣细胞中薯蓣皂甙元的含量[J].天然产物研究与开发,2004,16(4):331~333.
- [4] 刘光东,李生德,胡军福,等.薯蓣皂甙元的分光光度法测定[J].郧阳师范高等专科学校学报,2001,21(3):60~62.
- [5] 江天生.旋光法测定薯蓣皂甙元含量[J].吉首大学学报(自然科学版),1997,18(2):63~64.
- [6] 费洪荣,朱玮,张檀.粉草薢中皂甙元含量测定方法的研究[J].西北林学院学报,2003,18(3):76~78.
- [7] 陈战国,耿征,刘谦光,等.薯蓣皂甙元的分光光度法测定[J].分析化学,1996,24(2):227~229.
- [8] 汤兴利,徐增来,夏冰,等.盾叶薯蓣皂素提取工艺及检测方法研究进展[J].中药材,2004,27(11):877~879.

RESEARCH ON DETERMINATION OF DIOSGENIN IN DIOSCOREA ZINGIBERENSIS BY ASE - HPLC

Jia Lin, Zhang Gao, Liu Hongni, Hu Ling, Zhang Cuie, Liu Min

(Xi'an Modern Chemistry Research Institute, Xi'an 710065, China)

ABSTRACT The method for determination of diosgenin in dioscorea zingiberensis was established. The dioscorea samples were extracted by ASE200 and determinated by HPLC. The analytical column was YWG C₁₈ (150 mm×4.6 mmi. d., 10 μm). The mobile phase was methanol with flow rate of 1.0 mL/min. The UV detector wavelength was 210 nm. There was a good linear relationship in the range of 0.01~2.93 g/L ($r=0.9996$). The sample detection limit was 0.2 mg/L. The sample recoveries were in the range of 97.1%~99.8% and RSD was 1.1% ($n=7$).

KEYWORDS dioscorea zingiberensis, diosgenin, ASE, HPLC

大连化物所为蛋白质组学研究提供新方法

美国化学会刊物——《蛋白质组学研究》(Journal of Proteome Research)近日发表了中科院大连化物所研究员邹汉法与上海国家组织工程中心专家崔磊合作的关于骨组织蛋白质提取方法和蛋白质组学分析的学术论文,论文被该刊选为

Research Profile Paper。邹汉法等人采用4种不同的溶剂提取骨组织中的蛋白质,通过Shotgun方法进行蛋白质组学分析,共鉴定了2479个蛋白质,为骨疾病诊断标记的发现和生物学过程的研究提供了有效的方法和技术。(宝)