

## HPLC-ELSD 法测定白头翁总皂苷碱水解产物中 8 种皂苷

季秀美, 舒展, 许琼明, 刘艳丽\*, 杨世林  
苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123

**摘要:** 目的 建立同时测定白头翁总皂苷碱水解产物中 8 种皂苷成分的 HPLC-ELSD 方法。方法 采用 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.2%甲酸水溶液; 柱温 35 °C; 梯度洗脱条件: 0~30 min, 70%~100%甲醇; 体积流量 1.0 mL/min; ELSD 气化室温度 40 °C; 气体压力 350 kPa。结果 白头翁皂苷 D、常春藤皂苷元 3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-α-L-吡喃阿拉伯糖、白头翁皂苷 A、黑海常春藤苷 A1、白头翁皂苷 F、齐墩果酸 3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→3)-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷、齐墩果酸 3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→3)-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷、齐墩果酸 3-O-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷进样量分别在 0.799~4.568、0.563~6.756、0.431~2.683、0.894~7.826、0.643~7.504、1.351~7.822、0.629~2.515、0.698~2.794 μg, 峰面积 (*A*) 的对数值 lg*A* 与相应质量 (*M*, μg) 的对数值 lg*M* 呈良好的线性关系 (*n*=5), 8 种成分的平均回收率在 99.0%~101.0%, 且 RSD 值均小于 1.5%。**结论** 本检测方法简便、准确, 为白头翁总皂苷碱水解产物的质量控制提供了依据。

**关键词:** 白头翁总皂苷碱水解产物; HPLC-ELSD; 白头翁皂苷 D; 白头翁皂苷 A; 黑海常春藤苷 A1; 白头翁皂苷 F

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)11-1416-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.11.011

## Simultaneous determination of eight saponins in alkali hydrolysate of total saponins from *Pulsatilla chinensis* by HPLC-ELSD

Ji Xiu-mei, Shu Zhan, Xu Qiong-ming, Liu Yan-li, Yang Shi-lin  
Medical College, Soochow University, Suzhou 215123, China

**Abstract: Objective** To develop an HPLC method for the simultaneous determination of eight saponins in alkali hydrolysate of total saponins from *Pulsatilla chinensis*. **Methods** HPLC was performed on a Kromasil C<sub>18</sub> analytical column (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm) at 35 °C with MeOH-0.2% HCOOH solution as the mobile phase by gradient elution and the step gradients were as follows: 0—30 min, 70%—100% MeOH; The flow rate was 1.0 mL/min; ELSD gasification chamber temperature was 40 °C; Gas pressure of carrier gas N<sub>2</sub> was 350 kPa. **Results** The linear response (the log values of peak areas with corresponding log values of sample introducing amounts) ranges were 0.799—4.568 μg for pulsatilla saponin D, 0.563—6.756 μg for hederagenin 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-α-L-arabinopyranoside, 0.431—2.683 μg for pulsatilla saponin A, 0.894—7.826 μg for hederacolchiside A1, 0.643—7.504 μg for pulsatilla saponin F, 1.351—7.822 μg for oleanolic acid 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside, 0.629—2.515 μg for oleanolic acid 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside, and 0.698—2.794 μg for oleanolic acid 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside, respectively (*n* = 5). The average recoveries of the eight saponins were between 99.0% and 101.0%, and RSD values were less than 1.5%. **Conclusion** The results demonstrate that the established method has the adequate accuracy and selectivity for the quality control of alkali hydrolysate of total saponins from *P. chinensis*.

**Key words:** alkali hydrolysate of total saponins from *Pulsatilla chinensis*; HPLC-ELSD; pulsatilla saponin D; pulsatilla saponin A; hederacolchiside A1; pulsatilla saponin F

收稿日期: 2012-12-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81273402); 重大新药创制国家科技重大专项资助 (2011ZX111102); 江苏省自然科学基金 (BK2012620)

作者简介: 季秀美, 女, 硕士研究生, 研究方向为天然药物活性成分及其作用机制研究。Tel: 18862196812 E-mail: jixiumeixn@163.com

\*通信作者 刘艳丽, 女, 副教授。Tel: (0512)69561421 E-mail: liuyanli@suda.edu.cn

网络出版时间: 2013-04-22 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130422.0920.007.html>

白头翁 *Pulsatillae Radix* 为毛茛科植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel 的干燥根, 是常用的传统中药, 始载于《神农本草经》, 列为下品, 性寒、味苦, 具有清热解毒、凉血止痢、燥湿杀虫的功效, 临床上常用于治疗热毒血痢、细菌性痢疾、阿米巴痢疾、妇科阴道炎等<sup>[1]</sup>。蔡鹰等<sup>[2]</sup>研究发现白头翁水溶性成分具有良好的抗肿瘤效果; Ye 等<sup>[3]</sup>经细胞实验证明白头翁酸在体外具有白血病细胞 P<sub>388</sub>、Lewis 肺癌和人肺癌细胞 A549 的作用; 白头翁皂苷 A<sub>3</sub> 在体外对 P<sub>388</sub> 细胞亦有生长抑制作用<sup>[4]</sup>。另有研究发现白头翁皂苷 C-28 位的游离羧基对于皂苷的抗肿瘤活性至关重要<sup>[5]</sup>, 同时本课题组的前期研究表明白头翁总皂苷在体外能抑制肝癌 7402 细胞的增殖, 并且呈现一定的剂量依赖性, 给药 12 h 后的 IC<sub>50</sub> 值为 150.35 μg/mL<sup>[6]</sup>; 将碱水解后总皂苷同样作用于 7402 细胞后计算得其 IC<sub>50</sub> 值为 5.67 μg/mL。实验结果提示白头翁总皂苷碱水解产物抗肿瘤作用显著提高。在本实验室和浙江大东吴制药有限公司分别进行了 3 批中试生产, 获得了 3 批中试产品 (批号分别为 100108、100824、120615)。为进一步研究开发中药 5 类新药, 本实验采用 HPLC-ELSD 法检测白头翁总皂苷碱水解产物中 8 种皂苷单体成分的量, 结果表明本方法简便、准确, 可为白头翁总皂苷碱水解产物的质量控制提供研究基础。

## 1 仪器与材料

岛津高效液相色谱仪 (LC-20AB、SPD-20A, 日本岛津公司); 蒸发光散射检测器 (Shimadzu ELSD-LT II, 日本岛津公司); C<sub>18</sub> 分析色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 Kromasil 公司); D-101 大孔树脂 (天津南开大学化工厂); 化学试剂 (分析纯及色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

白头翁药材购于辽宁绥中, 经苏州大学药学院生药教研室李笑然教授鉴定为毛茛科白头翁属植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel 的干燥根, 标本 (编号 08-02-15-18) 存放于苏州大学药学院。

对照品白头翁皂苷 D<sup>[7]</sup> (1)、常春藤皂苷元 3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷<sup>[8]</sup> (2)、白头翁皂苷 A<sup>[7]</sup> (3)、黑海常春藤苷 A1<sup>[7]</sup> (4)、白头翁皂苷 F<sup>[5]</sup>, 经 HR-ESI-MS 及 1D、2D NMR 鉴定为齐墩果酸 3-O-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→6)-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→3)-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷, 为新化合物, 相关数据将另文发表、齐墩果酸 3-O-β-

D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→3)-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷<sup>[9]</sup> (6)、齐墩果酸 3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→3)-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖<sup>[10]</sup> (7)、齐墩果酸 3-O-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖<sup>[8]</sup> (8) 均为自制, 经 MS 和 <sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR 确定结构, HPLC 峰面积归一化法分析质量分数均达到 98% 以上。

## 2 方法与结果

### 2.1 样品制备

取干燥的白头翁药材, 10 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h, 得白头翁总皂苷。将白头翁总皂苷用 1.0% NaOH 水溶液碱水解反应 6 h 后放冷过夜, 用盐酸调节 pH 值至 7.0, 上 D-101 大孔树脂柱, 依次用水, 40%、75%、95% 乙醇洗脱; 收集 75% 乙醇洗脱液, 减压浓缩, 真空干燥即得白头翁总皂苷碱水解产物<sup>[11]</sup>。

批号为 100824 的中试样品, 本实验室自制, 药材投料量为 25 kg, 经上述工艺制备得白头翁总皂苷碱水解产物为 0.95 kg。批号为 120615 的中试样品, 浙江大东吴制药有限公司中试放大, 药材投料量为 100 kg, 经上述工艺制备得白头翁总皂苷碱水解产物为 4.20 kg。批号为 100108 的中试样品, 浙江大东吴制药有限公司中试放大, 药材投料量为 250 kg, 经上述工艺制备得白头翁总皂苷碱水解产物为 12.4 kg。

### 2.2 色谱条件

色谱柱为 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.2% 甲酸水溶液; 梯度洗脱: 0~30 min, 70%~100% 甲醇; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 °C。载气为高纯氮气, ELSD 气化室温度 40 °C; 载气压力 350 kPa。

### 2.3 系统适用性试验

依据上述色谱条件测定, 各对照品峰理论塔板数均 ≥ 5 000, 拖尾因子在 0.95~1.05, 相邻两峰的分度度  $R \geq 1.5$ , 系统适用性良好, 色谱图见图 1。

### 2.4 系统重现性试验

选择批号为 100824 的白头翁总皂苷碱水解产物为参照物考察 HPLC 系统的重现性。连续进样 5 次, 结果化合物 1~8 保留时间的平均值分别为 14.562、16.479、18.287、21.417、22.305、22.748、22.776、24.579 min, RSD 分别为 0.11%、0.02%、0.06%、0.06%、0.02%、0.05%、0.02%、0.07%; 经

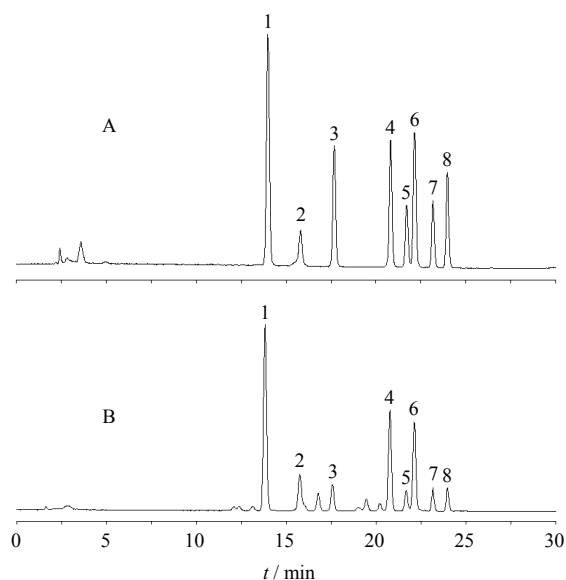


图1 混合对照品(A)和白头翁总皂苷碱水解产物(B)的HPLC图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and alkali hydrolysate of total saponins from *P. chinensis* (B)

计算化合物1~8色谱峰面积的RSD分别为1.72%、1.84%、1.92%、1.58%、1.45%、1.68%、1.32%、1.36%。以上结果表明系统重现性良好。

## 2.5 对照品溶液的制备

分别精密称取各对照品适量(精确到0.01 mg),分别置5 mL量瓶中,甲醇定容,得到各对照品母液:1(1.142 mg/mL)、2(1.126 mg/mL)、3(1.078 mg/mL)、4(1.118 mg/mL)、5(1.072 mg/mL)、6(1.126 mg/mL)、7(1.048 mg/mL)、8(1.164 mg/mL)。根据所需质量浓度按照一定比例量取各对照品母液置5 mL量瓶中,甲醇定容后得到2种质量浓度的混合对照品溶液。混合对照品溶液1:化合物1~8质量浓度分别为228.40、112.60、129.36、134.16、85.76、135.12、83.84、93.12  $\mu\text{g/mL}$ ;混合对照品溶液2:化合物1~8质量浓度分别为159.88、112.60、86.24、178.88、128.64、180.16、125.76、139.68  $\mu\text{g/mL}$ 。

## 2.6 供试品溶液的制备

精密称取批号100824样品6.42 mg、批号120615样品5.60 mg、批号100108样品5.51 mg分别置5 mL量瓶中,甲醇溶解定容,过0.45  $\mu\text{m}$ 滤膜,即得。

## 2.7 线性关系考察

分别精密移取上述对照品混合溶液1及2各5、10、20  $\mu\text{L}$ ,按照上述色谱条件注入液相色谱仪,因

峰面积( $A$ )与进样量( $M$ )不呈线性关系,因此以峰面积对数 $\lg A$ 为纵坐标( $Y$ )、进样量对数 $\lg M$ 为横坐标( $X$ )进行线性回归,得回归方程:1  $Y=1.2687X+9.587$ ,  $r=0.9996$ ;2  $Y=1.402X+9.7573$ ,  $r=0.9995$ ;3  $Y=1.1175X+9.2374$ ,  $r=0.9994$ ;4  $Y=1.2337X+9.5203$ ,  $r=0.9995$ ;5  $Y=1.2842X+9.6148$ ,  $r=0.9998$ ;6  $Y=1.2633X+9.6655$ ,  $r=0.9993$ ;7  $Y=1.3608X+9.8331$ ,  $r=0.9996$ ;8  $Y=1.1961X+9.4472$ ,  $r=0.9998$ ;结果表明化合物1~8分别在0.799~4.568、0.563~6.756、0.431~2.683、0.894~7.826、0.643~7.504、1.351~7.822、0.629~2.515、0.698~2.794  $\mu\text{g}$ 线性关系良好。

## 2.8 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液(化合物1~8质量浓度分别为159.88、112.60、86.24、178.88、128.64、180.16、125.76、139.68  $\mu\text{g/mL}$ ),按照“2.2”项下色谱条件,重复进样5次,记录峰面积,计算各对照品峰面积的RSD分别为1.80%、1.90%、1.85%、1.97%、1.63%、1.40%、1.72%、1.30%,表明仪器精密度良好。

## 2.9 重复性试验

取白头翁总皂苷碱水解产物(批号100824),按“2.6”项下方法平行制备供试品溶液5份,分别进样分析,得化合物1~8的RSD分别为1.69%、0.79%、1.55%、1.60%、1.46%、1.06%、1.17%、0.92%,结果表明该试验方法重复性良好。

## 2.10 稳定性试验

取同一份白头翁总皂苷碱水解产物(批号100824)供试品溶液,分别在0、2、4、12、24、48 h进样分析,记录各成分色谱峰峰面积,测得化合物1~8峰面积的RSD分别为1.63%、1.83%、1.78%、1.71%、1.49%、1.88%、1.85%、1.80%,结果表明供试品溶液在48 h内稳定性良好。

## 2.11 回收率试验

精密称取一定量的白头翁总皂苷碱水解产物(批号100824)置10 mL量瓶中,按照样品中每种待测成分量的80%、100%、120%定量加入8种对照品,甲醇定容并过0.45  $\mu\text{m}$ 滤膜,精密吸取20  $\mu\text{L}$ 进样分析,记录各成分的峰面积,计算回收率。结果测得各成分的加样回收率分别为100.2%、99.5%、100.8%、100.1%、100.6%、100.0%、99.9%、99.9%,RSD分别为1.19%、0.74%、0.60%、1.24%、1.23%、1.00%、1.43%、1.43%。

### 2.12 定量测定

按照“2.6”项下制备方法制得供试品溶液，按照“2.2”项所述色谱条件进行测定，计算3批白头翁总皂苷碱水解产物中各成分的量，结果见表1。

### 3 讨论

本课题组曾对白头翁的化学成分进行了系统研究<sup>[12]</sup>。本实验利用从白头翁药材中分离得到的化合物为对照品，对白头翁总皂苷碱水解产物进行了定

表1 白头翁总皂苷碱水解产物中各成分测定结果

Table 1 Determination of each compound in alkali hydrolysate of total saponins from *P. chinensis*

样品	质量分数 / %								总量 / %
	1	2	3	4	5	6	7	8	
100824	26.85	11.64	4.99	15.53	4.69	12.86	4.43	4.12	85.14
120615	27.44	11.81	5.02	15.77	4.66	12.66	4.29	3.99	85.08
100108	30.72	12.61	5.57	15.71	4.60	11.75	3.46	2.30	86.75

量测定；同时由于皂苷类成分的紫外吸收较弱，本实验选择了蒸发光散射检测器，建立了同时测定这8种皂苷单体的HPLC方法。由于白头翁总皂苷水解产物中含有多个游离羧基，容易造成拖尾峰，所以在流动相中加入0.2%甲酸并采用了梯度洗脱的方式，有效消除了峰拖尾现象。较大的体积流量影响各峰的分度，体积流量较小又造成保留时间延长，峰形展宽，综合考虑最终确定体积流量为1.0 mL/min。柱温对一些色谱峰的分度有一定影响，在柱温为35℃时各色谱峰得到了满意的分离，故以35℃为分析柱温。

本实验所建立的HPLC-ELSD法测定白头翁总皂苷碱水解产物中8种单体皂苷的方法，方法学考察结果表明该方法灵敏度高、日间变异小、回收率高、稳定性好，可作为白头翁总皂苷碱水解产物定量测定的方法。采用此方法同时测定了3批不同批次的总皂苷碱水解产物，结果表明3批总皂苷碱水解产物中8种单体皂苷的总量相近，提示本研究所采用的提取方法较为稳定，同时为白头翁总皂苷碱水解产物的质量控制提供了研究基础。

#### 参考文献

[1] 国家中医药管理局. 中华本草 (上册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998.  
 [2] 蔡鹰, 唐永明. 白头翁体外抗肿瘤实验研究 [J]. 中草药, 1999, 30(6): 441-444.

[3] Ye W C, Ji N N, Zhao S X, et al. Triterpenoids from *Pulsatilla chinensis* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 42(3): 799-802.  
 [4] 钟长斌, 李祥. 白头翁的化学成分及药理作用研究述要 [J]. 中医药学刊, 2003, 21(8): 1338-1339.  
 [5] Bang S C, Kim Y, Lee J H, et al. Triterpenoid saponins from the roots of *Pulsatilla koreana* [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68(2): 268-272.  
 [6] Xu Q M, Shu Z, He W J, et al. Antitumor activity of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel saponins in human liver tumor 7402 cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(3/4): 293-300.  
 [7] 张庆文. 毛茛科四种药用植物的化学成分研究 [D]. 南京: 中国药科大学, 2000.  
 [8] 徐国均, 袁昌齐, 秦慧贞, 等. 中药白头翁的生药学鉴定研究 (续) [J]. 药学学报, 1958, 6(5): 256-257.  
 [9] Mimaki Y, Kuroda M, Asano T, et al. Triterpene saponins and lignans from the roots of *Pulsatilla chinensis* and their cytotoxic activity against HL-60 cells [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(9): 1279-1283.  
 [10] Saito S, Sumita S, Tamura N, et al. Saponins from the leaves of *Aralia elata* Seem. (Araliaceae) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38(2): 411-414.  
 [11] 杨世林, 李孝贤, 许琼明, 等. 一种白头翁提取物及其制备方法和应用: 中国, CN201210306141 [P]. 2012-11-28.  
 [12] 丁秀娟, 陈重, 李夏, 等. 白头翁化学成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 1953-1954.