

# 白头翁总皂苷提取物的基本理化性质考察

管咏梅, 孙振, 张文秀, 吴德智\*, 马正, 刘红宁, 朱卫丰

(江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

**[摘要]** 目的: 检测白头翁总皂苷提取物的表观溶解度、表观油水分配系数及其在体外胃肠液中的稳定性。方法: 以白头翁皂苷类成分( $B_3$ ,  $B_D$ ,  $B_7$ )为指标, 采用饱和法测定表观溶解度, 摇瓶法测定油水分配系数, 考察白头翁总皂苷提取物在体外胃肠液中的稳定性。采用 ELSD-HPLC 测定指标成分含量, 流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱(0~28 min, 25%~10% B)。结果: 3种白头翁皂苷类成分中  $B_7$  的溶解能力最强。白头翁总皂苷提取物在不同 pH 缓冲液中油水分配系数均很小。指标成分在胃蛋白酶、胰蛋白酶环境较稳定, RSD 均 < 5%。结论: 白头翁总皂苷提取物在弱碱性环境中溶解能力最强。白头翁皂苷类成分的亲脂性较弱, 较难通过肠壁的脂质膜与水性层吸收进入体内。白头翁总皂苷在体外胃肠液环境中较稳定。

**[关键词]** 白头翁总皂苷; 表观溶解度; 表观油水分配系数; 稳定性; 白头翁皂苷  $B_3$ ; 白头翁皂苷  $B_D$ ; 白头翁皂苷  $B_7$

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0041-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140041

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140528.1345.024.html>

**[网络出版时间]** 2014-05-28 13:45

**[收稿日期]** 20131017(005)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09103002-001); 江西省重大科技专项(2010AZD00301); 江西省落地计划项目(赣财教[2011]243); 江西省卫生厅中医药科研课题(2009A062, 2012A152); 江西省青年科学基金项目(20132BAB215029); 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ14621); 江西省研究生创新专项(YC2013-S235)

**[第一作者]** 管咏梅, 博士, 从事中药新制剂与新技术研究, Tel: 0791-87118614, E-mail: guanym2008@163.com

**[通讯作者]** \* 吴德智, 博士, 讲师, 从事中药新制剂与新技术的研究, Tel: 0791-87118614, E-mail: 18970080479@163.com

- [4] 李登国, 柳风祥. 黄芪免疫调节作用研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2010(2): 71.
- [5] 张蕾, 高文远, 满淑丽. 黄芪中有效成分药理活性的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3203.
- [6] 潘智鸣, 张修武, 陆洁, 等. 银杏、黄芪及其复方制剂增强机体特异免疫功能的比较研究[J]. 衡阳医学院学报: 医学版, 1997, 34(1): 19.
- [7] 陈鸿, 潘宁玲, 王国林. 等辐射分析法的原理及应用[J]. 国外医学: 麻醉学与复苏分册, 2004, 25(5): 267.
- [8] Ningappa M B, Ramadas D, Leela S. Antioxidant and free radical scavenging activities of polyphenol-enriched curry leaf (*Murraya koenigii* L.) extracts [J]. Food Chem, 2008, 106(2): 720.
- [9] Yang J, Liu R H. Synergistic effect of apple extracts and quercetin 3- $\beta$ -D-glucoside combination on antiproliferative activity in MCF-7 human breast cancer cells *in vitro* [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(18): 8581.
- [10] Qiu H X, Liu J, Kong H, et al. Isobolographic analysis of the antinociceptive interactions between ketoprofen and paracetamol [J]. Eur J Pharmacol, 2007, 557 (2/3): 141.
- [11] Borowicz K K, Luszczki J J, Czuczwar S J, et al. Interactions between two enantiomers of losigamone and conventional antiepileptic drugs in the mouse maximal electroshock model—an isobolographic analysis [J]. Eur J Pharmacol, 2007, 567(1/2): 110.
- [12] 贾长英, 唐丽华, 张晓娟, 等. 银杏叶黄酮的乙醇提取工艺优化及动力学研究 [J]. 农业机械, 2012, 12(36): 90.
- [13] 肖卫华, 韩鲁佳, 杨增玲, 等. 响应面法优化黄芪黄酮提取工艺的研究 [J]. 中国农业大学学报, 2007, 12(5): 52.

[责任编辑 刘德文]

## Investigation of Physicochemical Properties of Total Saponins from Pulsatillae Radix

GUAN Yong-mei, SUN Zhen, ZHANG Wen-xiu, WU De-zhi\*, MA Zheng, LIU Hong-ning, ZHU Wei-feng  
(Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM),  
Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To determine apparent solubility and oil-water partition coefficients of total saponins from Pulsatillae Radix, then investigate its stability *in vitro* gastrointestinal fluid. **Method:** Taking saponins ( $B_3$ ,  $B_D$ ,  $B_7$ ) from Pulsatillae Radix as index, apparent solubilities of three kinds of components were determined by saturation method and a shake flask method was established to determine oil-water partition coefficients, stability of total saponins *in vitro* gastrointestinal fluid was investigated. ELSD-HPLC was adopted to determine contents of index components with mobile phase of methanol (A) -water (B) for gradient elution (0-28 min, 25% -10% B). **Result:**  $B_7$  had the best apparent solubility in these three kinds of components. Oil-water apparent partition coefficients of three kinds of component in different pH were very low. RSD of stability of index components *in vitro* gastrointestinal fluid was less than 5%. **Conclusion:** Dissolving ability of total saponins from Pulsatillae Radix in weak alkaline environment was the highest. Lipophilicity of total saponins was weak, so it was difficult to absorb into body through intestinal wall of lipid membrane and water layer. Total saponins from Pulsatillae Radix *in vitro* gastrointestinal fluid was stable.

**[Key words]** total saponins from Pulsatillae Radix; apparent solubility; oil-water partition coefficient; stability; pulsatilla saponin  $B_3$ ; pulsatilla saponin  $B_D$ ; pulsatilla saponin  $B_7$

白头翁始载于《神农本草经》，列为下品，性寒，味苦，功效清热解毒、凉血止痢、燥湿杀虫，具有抗肿瘤、抗溃疡和抗日本血吸虫等作用<sup>[1-3]</sup>。其主要活性成分为三萜皂苷类，近年已从白头翁中分离鉴定了十几种三萜皂苷类成分，其中 3-O- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-吡喃阿拉伯糖常春藤皂苷( $B_3$ )，3-O- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖(1 $\rightarrow$ 2)[ $\beta$ -D-吡喃葡萄糖(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-吡喃阿拉伯糖常春藤皂苷( $B_D$ )，3-O- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖(1 $\rightarrow$ 2)[ $\beta$ -D-吡喃葡萄糖(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-吡喃阿拉伯糖齐墩果酸皂苷( $B_7$ )为主要活性物质<sup>[4-5]</sup>。本实验拟通过测定白头翁总皂苷在不同条件下的平衡溶解度、油水分配系数及其在胃肠液中稳定性等理化性质<sup>[6-7]</sup>，为其制剂开发及口服吸收研究提供参考。

### 1 材料

1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)，AB204-N 型精密分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)，PHS 2C 型精密 pH 计(上海虹益仪器仪表有限公司)，THD-2006 型低温恒温水浴锅(宁波天恒仪器厂)，HJ-2 型多头磁力搅拌器(国华仪器有限公司)。

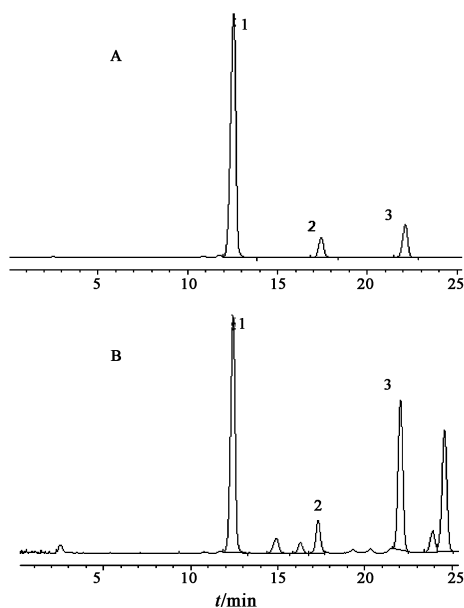
白头翁总皂苷提取物(苏州大学药学院提供，批号 20110804)，白头翁皂苷  $B_3$ ,  $B_D$ ,  $B_7$  对照品(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心植化室提供，批号均为 20111108)，胃蛋白酶(山东青岛生物化学制药厂，批号 20111004082)，胰酶(重庆奥力生物制药有限公司，批号 20121107012)，水为自制纯化水，其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 活性物质的含量测定

**2.1.1 色谱条件** Welchrom-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m)，流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱(0~28 min, 25%~10% B)，ELSD2000 蒸发光散射检测，流速 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>，进样量 20  $\mu$ L，柱温 30  $^{\circ}$ C。

**2.1.2 标准曲线的制备** 精密称取白头翁皂苷  $B_3$ ,  $B_D$ ,  $B_7$  对照品适量，置于同一 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，得 3.180, 0.410, 0.490 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 混合对照品储备液，于 4  $^{\circ}$ C 冷藏保存。精密量取该储备液适量，置 10 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，重复上述稀释过程，配成系列混合对照品溶液，按 2.1.1 项下色谱条件测定，以峰面积为横坐



A. 对照品; B. 供试品; 1. 白头翁皂苷  $B_3$ ;  
2. 白头翁皂苷  $B_D$ ; 3. 白头翁皂苷  $B_7$

图1 白头翁总皂苷提取物 HPLC

标,质量浓度为纵坐标,得回归方程分别为  $Y = 2.44X - 1124.33$  ( $r = 0.9901$ ),  $Y = 2.29X - 14.75$  ( $r = 0.9959$ ),  $Y = 3.24X - 224.10$  ( $r = 0.9933$ ),线性范围分别为  $0.980 \sim 3.180$ ,  $0.130 \sim 0.410$ ,

$0.150 \sim 0.490 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.1.3 回收率试验** 精密量取白头翁皂苷混合对照品贮备液适量,分别配制高、中、低质量浓度的混合对照品溶液 ( $n = 3$ ),按 2.1.1 项下色谱条件测定,记录峰面积,比较实测值与理论值,计算白头翁皂苷  $B_3$ ,  $B_D$ ,  $B_7$  的回收率 RSD 均  $< 2\%$ ,符合方法回收率要求。

**2.1.4 精密度试验** 取高、中、低 3 个质量浓度的混合对照品溶液,以 1 d 内同一样品的 5 次测定结果计算日内精密度,以同一样品连续 5 d 的测定结果计算日间精密度,结果白头翁皂苷  $B_3$ ,  $B_D$ ,  $B_7$  的日内和日间精密度 RSD 均  $< 2\%$ ,符合含量测定要求。

**2.2 溶解性考察** 取过量白头翁总皂苷提取物置于具塞锥形瓶中,加不同溶剂 (pH 5.6, 8.0, 9.0 的磷酸缓冲液, 70% 乙醇、95% 乙醇、丙二醇、四氢呋喃) 溶解,放入  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  恒温振荡器中,于规定时间取样,经  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算总皂苷提取物在不同溶媒中的表观溶解度,见表 1,结果显示白头翁总皂苷提取物中 3 种白头翁皂苷在弱碱性环境中溶解能力最强,其中  $B_7$  在各溶媒中的溶解能力均最强。

表 1 白头翁皂苷类成分在不同溶剂中的表观溶解度 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

溶媒	皂苷类成分	表观溶解度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	溶媒	皂苷类成分	表观溶解度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
pH 5.6 缓冲液	$B_D$	$0.2240 \pm 0.0012$	95% 乙醇	$B_D$	$0.4904 \pm 0.0016$
	$B_3$	$0.8877 \pm 0.0031$		$B_3$	$0.3134 \pm 0.0410$
	$B_7$	$1.2802 \pm 0.1325$		$B_7$	$1.5301 \pm 0.5238$
pH 8.0 缓冲液	$B_D$	$0.4214 \pm 0.0167$	四氢呋喃	$B_D$	$1.1372 \pm 0.0196$
	$B_3$	$1.9807 \pm 0.2358$		$B_3$	$0.6025 \pm 0.0573$
	$B_7$	$2.9772 \pm 0.4295$		$B_7$	$2.7562 \pm 0.3841$
pH 9.0 缓冲液	$B_D$	$0.7705 \pm 0.0056$	丙二醇	$B_D$	$0.8961 \pm 0.0471$
	$B_3$	$2.9768 \pm 0.1683$		$B_3$	$0.6728 \pm 0.0791$
	$B_7$	$4.6752 \pm 0.4216$		$B_7$	$3.7164 \pm 0.7531$
75% 乙醇	$B_D$	$0.3236 \pm 0.0016$			
	$B_3$	$0.2508 \pm 0.0078$			
	$B_7$	$0.8984 \pm 0.0092$			

**2.3 油水分配系数的测定** 在  $37^\circ\text{C}$  条件下,将溶有一定量总皂苷提取物的 pH 5.50, 6.66, 7.68 的磷酸缓冲液分别与正辛醇的水饱和溶液按 1:1 装入分液漏斗中,振摇后放置 72 h,水相于  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,稀释上清液,按 2.1.1 项下色谱条件测定白头翁皂苷  $B_3$ ,  $B_D$ ,  $B_7$  含量,计算白头翁总皂苷提取物的表观油水分配系数 ( $P_{\text{app}}$ ),见表 2。

$$P_{\text{app}} = (C_0 V_0 - C_w V_w) / C_w V_w$$

式中  $C_0$  为水相中原来的药物质量浓度,  $C_w$  为分配平衡后水相中药物质量浓度,  $V_0$  为初始水相的体积,  $V_w$  为分配平衡后水相的体积。由于皂苷类成分带有糖链,结果白头翁总皂苷提取物的油水分配系数很小,表明其亲脂性较弱,亲水性强。

**2.4 体外胃肠道稳定性考察**

**2.4.1 胃蛋白酶环境** 取少量白头翁总皂苷提取物至人工胃液 (含胃蛋白酶, 100 mL) 中,置于锥形

表 2 白头翁皂苷类成分在不同溶剂中的油水分配系数 ( $n=3$ )

磷酸缓冲液	白头翁皂苷成分	初始质量浓度 ( $C_0$ )	平衡后质量浓度 ( $C_w$ )	表观油水分配系数 ( $P_{app}$ )	油水分配系数 ( $lgP_{app}$ )
pH 5.50	B <sub>D</sub>	0.071 8	0.028 9	2.485 2	0.395 4
	B <sub>3</sub>	0.293 1	0.118 6	2.470 2	0.392 7
	B <sub>7</sub>	0.215 3	0.153 0	1.406 8	0.148 2
pH 6.66	B <sub>D</sub>	0.069 2	0.064 3	1.077 0	0.032 2
	B <sub>3</sub>	0.283 6	0.229 6	1.235 1	0.091 7
	B <sub>7</sub>	0.325 8	0.341 8	0.953 1	-0.020 8
pH 7.68	B <sub>D</sub>	0.070 4	0.063 0	1.117 2	0.048 1
	B <sub>3</sub>	0.292 5	0.220 7	1.325 3	0.122 3
	B <sub>7</sub>	0.325 8	0.237 9	1.369 4	0.136 5

表 3 白头翁皂苷类成分在体外胃肠液中稳定性考察 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

环境	白头翁皂苷 B <sub>3</sub>		白头翁皂苷 B <sub>D</sub>		白头翁皂苷 B <sub>7</sub>	
	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	RSD/%	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	RSD/%	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	RSD/%
胃蛋白酶	119.22 ± 5.73	4.80	191.21 ± 5.69	2.98	230.72 ± 5.29	2.29
胰蛋白酶	708.66 ± 5.52	0.78	219.83 ± 4.60	2.09	286.93 ± 6.57	2.29

### 3 讨论

白头翁总皂苷提取物在含胃蛋白酶的人工胃液和含胰蛋白酶的人工肠液均能稳定存在,可避免胃肠道酶破坏。白头翁总皂苷提取物在不同介质和 pH 条件下溶解度普遍较小,应考虑加入增溶剂、助溶剂等<sup>[8]</sup>,其在弱碱性环境中溶解能力最强,可能是因为 3 种指标成分均为酸性三萜皂苷。生物膜相当于类脂屏障,当药物有一定脂溶性又具有一定水溶性时,较易通过肠壁的脂质膜与水性层而被吸收入体内。 $lgP_{app}$  较小的化合物吸收差,而  $lgP_{app} > 1$  的化合物吸收较好<sup>[9]</sup>,白头翁总皂苷提取物在不同 pH 溶液中  $lgP_{app} < 1$ ,说明其口服不易吸收、生物利用度低。影响药物口服吸收的因素很多,包括解离度、脂溶性、相对分子质量大小和胃肠道上皮细胞的转运载体等<sup>[10]</sup>,故本文测定的溶解度和  $lgP_{app}$  只能作为预测药物口服吸收的参考依据之一,应同时考虑其他因素的影响,才能全面阐明白头翁总皂苷提取物的吸收特性。

#### [参考文献]

[1] 钟邱,倪琼珠.白头翁中皂苷成分对肿瘤细胞的抑制作用[J].中药材,2004,27(8):604.  
[2] 殷刚峰,卜平,朱海航.白头翁加味汤调节溃疡性结肠炎大鼠血清白介素-4 和肠黏膜环氧合酶-2 的研究

瓶中于 37 ℃ 水浴加热,分别于 0,0.5,1,1.5,2,4,6,12 h 取样 1 mL,加入无水乙醇 5 mL,旋涡振荡 2 min,离心(4 000 r·min<sup>-1</sup>,5 min,下同),取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果见表 3。

**2.4.2 胰蛋白酶环境** 取少量白头翁总皂苷提取物至人工肠液(含胰酶,pH 6.8 磷酸盐缓冲液,100 mL)中,置于锥形瓶中于 37 ℃ 水浴加热,分别于 0,0.5,1,1.5,2,4,6,12 h 取样 1 mL,立即加入无水乙醇 5 mL,按 1 g·L<sup>-1</sup> 加入胰蛋白酶抑制剂,旋涡振荡 2 min,离心,取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果见表 3。结果表明白头翁皂苷类单体成分在胃蛋白酶、胰蛋白酶环境较稳定。

[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(12):84.

[3] 陈岩勤,诸葛洪祥,许琼明,等.白头翁总皂苷对日本血吸虫糖原、蛋白质及酶的作用[J].中国人兽共患病学报,2013,29(4):412  
[4] Son M K, Jung K H, Hong S W, et al. SB365, *Pulsatilla* saponin D suppresses the proliferation of human colon cancer cells and induces apoptosis by modulating the AKT/mTOR signalling pathway[J]. Food Chem, 2013, 136(1):26.  
[5] Kim Y, Bang S C, Lee J H, et al. *Pulsatilla* saponin D: the antitumor principle from *Pulsatilla koreana*[J]. Arch Pharm Res, 2004, 27(9):915.  
[6] 梁文权.生物药剂学与药物动力学[M].3 版.北京:人民卫生出版社,2007:106.  
[7] 高坤,孙进,何仲贵.口服药物吸收中的生物药剂学性质[J].沈阳药科大学学报,2007,24(3):289.  
[8] 管咏梅,张妮,陈振华,等.固体分散技术和包合技术对白头翁总皂苷增溶作用研究[J].中国中药杂志,2013,38(23):4061.  
[9] 王亚乐,贾晓斌,陈彦,等.淫羊藿苷平衡溶解度和表观油水分配系数的测定[J].中华中医药杂志,2008,23(9):777.  
[10] 谭晓斌,贾晓斌,陈彦,等.从肠吸收屏障网络进行中药基础研究的思路及探索[J].中草药,2009,40(10):1520.

[责任编辑 刘德文]