

白头翁提取物中总皂苷及皂苷类成分的测定

俞冰荟¹, 饶毅^{2*}, 杨世林², 魏惠珍², 冯育林², 金浩鑫¹, 刘圆¹

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006;

2. 江西中医药大学, 南昌 330006)

[摘要] **目的:**建立白头翁提取物中总皂苷及主要皂苷类成分的含量测定方法。**方法:**采用紫外分光光度法,以白头翁皂苷 B3 为对照品,5% 香草醛-冰醋酸和高氯酸为显色剂,在 530 nm 处测定白头翁提取物中总皂苷的含量;采用 HPLC-ELSD 测定其主要皂苷类成分的含量。**结果:**白头翁提取物中总皂苷、白头翁皂苷 B3、白头翁皂苷 BD、白头翁皂苷 B7、白头翁皂苷 B9、白头翁皂苷 B10、白头翁皂苷 B11 分别在 10.1 ~ 70.4, 1.31 ~ 17.52, 0.32 ~ 4.25, 1.63 ~ 21.75, 0.75 ~ 9.98, 0.30 ~ 4.06, 1.20 ~ 15.94 μg 呈良好的线性关系;6 种成分的平均回收率在 98.85% ~ 101.42%,且 RSD 均 < 1.2%。**结论:**实验采用的方法简便,可操作性强,重复性好,可用于白头翁提取物中皂苷类成分的质量控制。

[关键词] 白头翁提取物; 总皂苷; 紫外-可见分光光度法; 高效液相色谱-蒸发光检测

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0065-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150065

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140609.1545.017.html>

[网络出版时间] 2014-06-09 15:45

Determination of Total Saponins and Saponin Compounds in Radix Pulsatillae Extracts

YU Bing-hui¹, RAO Yi^{2*}, YANG Shi-lin², WEI Hui-zhen², FENG Yu-lin², JIN Hao-xin¹, LIU Yuan¹

(1. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China; 2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quantification method for total saponins and main saponin compounds in Radix Pulsatillae extracts. **Method:** Using UV spectrophotometry, according to pulsatilla saponin B3 for reference substance, a mixture of 5% vanillin-glacial acetic acid and perchloric acid solution as the chromogenic agent, at 530 nm for determining the content of total saponins in radix Pulsatillae extracts. HPLC-ELSD was employed for the determination of main saponin compounds in radix Pulsatillae extracts. **Result:** The linear ranges were 10.1-70.4 μg for total saponins, 1.31-17.52 μg for pulsatilla saponins B3, 0.32-4.25 μg for pulsatilla saponins BD, 1.63-21.75 μg for pulsatilla saponins B7, 0.75-9.98 μg for pulsatilla saponins B9, 0.30-4.06 μg for pulsatilla saponins B10, 1.20-15.94 μg for pulsatilla saponins B11, The average recoveries of the six saponins were between 98.85% and 101.42%, and RSD values were less than 1.2%. **Conclusion:** The results demonstrate that the adopts method is simple and the maneuverability is strong, reproducible for the quality control of saponin compounds in Radix Pulsatillae extracts.

[Key words] Radix Pulsatillae extracts; total saponins; UV; HPLC-ELSD

[收稿日期] 20140124(011)

[第一作者] 俞冰荟, 硕士, 从事中药复方质量控制研究, Tel: 15170045786, E-mail: yubinghui56@126.com

[通讯作者] * 饶毅, 博士, 教授, 从事中药复方质量控制研究, Tel: 0791-7119609, E-mail: fxs_ry021228@126.com

白头翁为毛茛科植物白头翁的干燥根,具有清热解毒、凉血止痢之功效^[1]。主要含有木脂素类、黄酮类、三萜及其苷类和甾醇类成分^[2-4]。白头翁经乙醇提取得到的有效部位具有较好的抑菌作用,现代药理研究显示,白头翁单体化合物及提取液均具有明显的体内外抗肿瘤作用,此外在抗炎方面也呈现出显著的药理活性^[5-7],具有较大的药用价值。因此,本文以白头翁提取物为研究对象,探讨白头翁提取物中总皂苷的含量测定方法,并采用 HPLC-ELSD 对白头翁提取物进行多指标成分的含量测定,以实现多组分控制提取物的质量。

1 仪器与试剂

UV2550 型紫外分光光度计、AUW220D 型电子分析天平(日本,岛津),Waters 2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司 Empower 工作站),ELSD-2000 型蒸发光散射检测器(美国 Alltech 公司),Millipore-Q 型纯水器(美国 Millipore 公司),HH-4 型数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司)。

白头翁皂苷 B3(白头翁皂苷 D)、白头翁皂苷 BD(白头翁皂苷 A)、白头翁皂苷 B7(白头翁皂苷 F)、白头翁皂苷 B9(齐墩果酸 3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4)- β -*D*-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)- α -*L*-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- α -*L*-吡喃阿拉伯糖苷)、白头翁皂苷 B10(齐墩果酸 3-*O*- β -*D* 吡喃葡萄糖基(1 \rightarrow 3)- α -*L*-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- α -*L*-吡喃阿拉伯糖苷)、白头翁皂苷 B11(齐墩果酸 3-*O*- α -*L*-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- α -*L*-吡喃阿拉伯糖苷)对照品(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心自制,批号均为 20111108,纯度均 \geq 98%),其他试剂均为分析纯。白头翁提取物(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心自制,批号 20110701,20120301,20120302,20120401)。

白头翁提取物制备: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 7.0,上 D-101 大孔树脂柱,依次用水,40% 乙醇,75% 乙醇,95% 乙醇洗脱;收集 75% 乙醇洗脱液,减压浓缩,真空干燥即得棕褐色粉末状白头翁提取物。

2 方法与结果

2.1 白头翁提取物中总皂苷的测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取白头翁皂苷 B3 对照品 10 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀;精密量取上述对照品溶液 1 mL 置 25 mL

量瓶中,加甲醇稀释至刻度,得每 1 mL 中含 0.04 mg 的溶液,摇匀,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 取白头翁提取物 15 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取 1 mL 置 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 最大吸收波长的确定 精密吸取对照品溶液和样品溶液各 1.0 mL,分别置 10 mL 具塞试管中,置 80 °C 水浴挥干,冷却至室温,加新制的 5% 香草醛冰醋酸溶液 0.2 mL,高氯酸 0.8 mL,置 90 °C 水浴中加热 90 min,立即置冰水浴中冷却 2 min,加冰醋酸 5.0 mL,摇匀,以相应试剂为空白,在 200 ~ 800 nm 扫描,结果显示,两者分别在波长为 530 nm 处有最大吸收。

2.1.4 方法学考察

2.1.4.1 标准曲线的建立 精密量取白头翁皂苷 B3 对照品溶液 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2,1.4 mL,分别置 10 mL 具塞试管中,置 80 °C 水浴挥干,冷却至室温,加新制的 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL,高氯酸 0.8 mL,置 90 °C 水浴中加热 90 min,立即置冰水浴中冷却 2 min,加冰醋酸 5.0 mL,摇匀,在 530 nm 处测定吸光度。以白头翁皂苷 B3 质量浓度 X (μ g) 为横坐标,吸光度 Y 为纵坐标,绘制标准曲线。方程为 $Y = 0.0073X + 0.0401$ ($r = 0.9997$)。结果表明白头翁皂苷 B3 在 10.1 ~ 70.4 μ g 呈良好的线性关系。

2.1.4.2 精密度试验 精密量取白头翁皂苷 B3 对照品溶液 1 mL,置 10 mL 的具塞试管中,按标准曲线方法连续测定 6 次,结果白头翁皂苷 B3 吸光度的 RSD 0.38%,表明仪器精密度良好。

2.1.4.3 重复性试验 取同一批白头翁提取物样品 6 份,按 2.1.2 项下的方法制备供试品溶液,按标准曲线方法进行测定,结果样品溶液吸光度的 RSD 2.38%,表明该方法重复性较好。

2.1.4.4 稳定性试验 取白头翁提取物样品 1 份,按 2.1.2 项方法的方法制备供试品溶液,按标准曲线方法测定,分别在 0,5,10,15,20,30,60 min 后扫描,结果样品溶液吸光度的 RSD 1.08%,表明样品溶液显色后在 60 min 内较稳定。

2.1.4.5 加样回收率试验 取已知白头翁提取物样品 7 mg(6 份),精密称定,置 10 mL 量瓶中,分别加入相当于样品中所含白头翁总皂苷量的 80%,100%,120% 的白头翁皂苷 B3 对照品,加甲醇稀释至刻度,摇匀,按 2.1.2 项下的方法制备供试品溶

液,照标准曲线方法测定吸光度,计算回收率。结果白头翁皂苷 B3 平均回收率为 99.56%, RSD 0.93%。表明该方法准确、可靠。

2.1.5 样品测定 取不同批次的白头翁提取物,按 2.1.2 项下的方法制备供试品溶液,照标准曲线下测定,计算白头翁提取物中总皂苷的含量,结果分别为 72.2%, 79.9%, 77.9%, 71.19%。

2.2 白头翁皂苷中主成分的测定

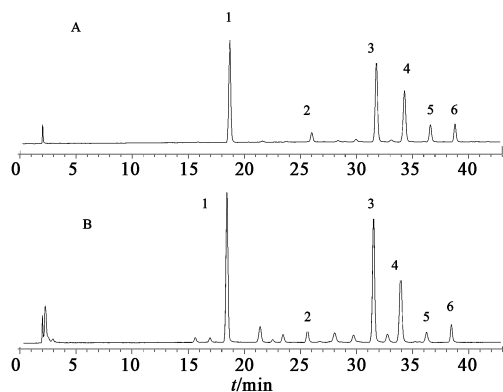
2.2.1 对照品溶液的制备 取 B3, BD, B7, B9, B10, B11 对照品,精密称定,分别加甲醇制成每 1 mL 含 B3 0.4 mg, BD 0.1 mg, B7 0.5 mg, B9 0.2 mg, B10 0.1 mg, B11 0.4 mg 的混合溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取白头翁总皂苷 0.1 g,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加甲醇超声处理溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 色谱条件 Kromasil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以甲醇-乙腈(1:1)混合溶液(A)-0.2% 甲酸水溶液(B)为流动相梯度洗脱(表 1),流速 1.0 mL·min⁻¹,进样体积 10 μL,蒸发光散射器的漂移管温度 90 °C,载气流速 2.3 L·min⁻¹。在该分析条件下,各组分的色谱峰分离良好。HPLC-ELSD 色谱见图 1。

表 1 流动相梯度时间表

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~5	60	40
5~15	60~70	40~30
15~30	70~80	30~20
30~50	80~100	20~0



A. 混合对照品; B. 样品

1. B3; 2. BD; 3. B7; 4. B9; 5. B10; 6. B11

图 1 白头翁提取物的 HPLC-ELSD

2.2.4 方法学考察

2.2.4.1 线性关系考察 取 B3, BD, B7, B9, B10, B11 的混合对照品溶液,分别进样 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 μL,注入液相色谱仪,测定峰面积,以进样量的自然对数 $X(\mu\text{g})$ 为横坐标,以峰面积的自然对数 Y 为纵坐标,进行线性回归,结果表明 B3, BD, B7, B9, B10, B11 在线性范围内与峰面积呈良好的线性关系。见表 2。

表 2 6 个皂苷类成分的线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
白头翁皂苷 B3	$Y = 1.44X + 10.39$	0.999 0	1.31 ~ 17.52
白头翁皂苷 BD	$Y = 1.59X + 10.17$	0.999 6	0.32 ~ 4.25
白头翁皂苷 B7	$Y = 1.71X + 9.57$	0.999 1	1.63 ~ 21.75
白头翁皂苷 B9	$Y = 1.65X + 10.63$	0.999 7	0.75 ~ 9.98
白头翁皂苷 B10	$Y = 1.57X + 10.96$	0.998 4	0.30 ~ 4.06
白头翁皂苷 B11	$Y = 1.65X + 8.61$	0.999 6	1.20 ~ 15.94

2.2.4.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液,按照 2.2.3 项下的色谱条件,重复进样 6 次,记录峰面积,计算 B3, BD, B7, B9, B10, B11 各对照品峰面积的 RSD 分别为 0.21%, 0.19%, 0.39%, 0.19%, 0.26%, 0.41%, 表明仪器精密度良好。

2.2.4.3 重复性试验 取同一批次的白头翁提取物各 15 mg,按照 2.2.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份,依法进样测定,得 B3, BD, B7, B9, B10, B11 的 RSD 分别为 2.53%, 2.50%, 2.75%, 2.12%, 1.90%, 3.77%, 结果表明该试验方法重复性良好。

2.2.4.4 稳定性试验 取同一份白头翁提取物供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样分析,记录各色谱峰峰面积,得 B3, BD, B7, B9, B10, B11 的 RSD 分别为 0.23%, 0.50%, 0.44%, 0.23%, 0.56%, 0.38%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.4.5 加样回收率试验 精密称取已知含量的白头翁总皂苷样品 80 mg 各 6 份,分别加入一定量的对照品 B3, BD, B7, B9, B10, B11,按照 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,依法进行测定,结果表明 B3, BD, B7, B9, B10, B11 的平均回收率为 101.42%, 99.83%, 100.12%, 98.85%, 99.22%, 100.13%, RSD 分别为 0.68%, 0.79%, 1.15%, 0.92%, 1.03%, 0.63%, 表明该方法的准确度良好。

2.2.5 白头翁提取物中 B3, BD, B7, B9, B10, B11 的含量测定 分别对不同批次的白头翁提取物进行

含量测定,每个样品平行测定 3 次,结果见表 3。

表 3 白头翁提取物中 6 种皂苷的测定 ($n=3$) %

批号	B3	BD	B7	B9	B10	B11	总含量
20110701	14.67	3.09	16.96	7.79	2.14	10.15	54.82
20120301	14.71	3.11	17.22	7.95	2.19	10.25	55.44
20120302	14.27	3.05	16.88	7.70	2.09	9.73	53.73
20120401	14.04	3.02	16.65	7.73	2.11	9.78	53.38

3 讨论

3.1 显色剂的选择 总皂苷测定的显色剂主要有香草醛-冰醋酸-浓硫酸^[8]和香草醛-冰醋酸-高氯酸^[9]这两种,经本实验考察,用后者显色稳定。该方法重复性、稳定性均较好。

3.2 温度考察 在紫外-分光光度法测定总皂苷时考察了对照品和供试品显色受温度的影响,结果表明对照品溶液在不同的温度下,最大吸收波长有所改变,而白头翁提取物的最大吸收波长始终保持不变。且分别考察不同温度下的最大吸收,实验显示在 90℃ 以上,两者均在 530 nm 处有最大吸收。可能由于对照品白头翁皂苷 B3 含有较多的糖支链,温度对其最大吸收波长影响较大。所以需严格控制温度对实验的影响。

3.3 显色条件中时间考察 总皂苷测定时,由于是显色反应,比较灵敏,故显色时间,冰水冷却时间,水浴加热时间都对实验结果产生较大的影响。经考察表明:白头翁提取物在 90℃ 加热 90 min,用冰水冷却 2 min,在 1 h 内显色稳定。

3.4 流动相的选择 在流动相选择时,分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.2% 甲酸水溶液、甲醇-

0.4% 甲酸水溶液、甲醇-乙腈-0.2% 甲酸水溶液。结果表明甲醇-乙腈-0.2% 甲酸水溶液为流动相时可以达到最佳分离效果,通过方法学考察,结果表明该法简便、灵敏度高、重复性好、回收率高,可为白头翁提取物的质量控制提供参考。

[参考文献]

- [1] 丁秀娟,陈重,李夏,等.白头翁化学成分研究[J].中草药,2010,41(12):1952.
- [2] 王伟,李红捷,鱼红闪白头翁皂苷及次生物的研究[J].安徽农业科学,2007,35(28):8779.
- [3] 丁秀娟,陈重,李夏,等.白头翁化学成分研究[J].中草药,2010,41(12):1952.
- [4] Yoshihiro Mimaki, Minpei Kuroda, Tomoki Asano, 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.
- [5] 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.
- [6] Mi Kwon Son, Kyung Hee Jung, Sang-Won Hong, 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 Chemistry, 2013, 136(1):26.
- [7] 季秀美.白头翁总皂苷碱水解产物的抗肿瘤[D].苏州:苏州大学,2013.
- [8] 徐新刚,闫雪生,张晶.柏子仁生品及霜品中总皂苷的含量测定[J].中国中药杂志,2009,34(7):833.
- [9] 姚志娟,徐健.三七药材中总皂苷的含量的测定[J].黑龙江医药,2005,18(5):319.

[责任编辑 顾雪竹]