

### 3 小结与讨论

3.1 通过上述 HPLC-ESI/MS 联用技术,对金银花指纹图谱中与抗流感病毒活性密切相关的几个色谱峰的成分归属进行了研究。结果表明本方法先进、简便,易于操作,较传统的通过分离纯化、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、IR、X-ray、MS 等多重光谱数据分析进行结构鉴定大大节约了时间与物力。

3.2 通过对 UV 扫描曲线及 ESI/MS 及 MS<sup>2</sup> 检测得到的一级及二级质谱数据进行分析,并参考已有文献<sup>[11-43]</sup>,对质谱进行了图谱解析,确定了1号、2号、4号、7号、8号色谱峰成分归属,质谱中各主要离子峰的来源、裂解方式均得到了科学合理的解释,因此认为各色谱峰的成分归属结果是准确可靠的。图谱解析结果表明:1号峰为5-咖啡酰奎尼酸、2号峰为4-咖啡酰奎尼酸、7号峰为3-咖啡酰奎尼酸甲酯、8号峰为 Secoxyloganin 应为环烯醚萜苷类化合物 vogeloside 或其构象异构体 7-epi-vogeloside (有可能是其中的1个成分,也可能是2个成分的混合物,空间构型的鉴定,还有待进一步 NMR 的数据支持,为叙述方便统称为 vogeloside) 加上已知的绿原酸、咖啡酸,通过本研究,金银花指纹图谱中与抗流感病毒活性有关的效应指纹峰,其成分归属均得到了确认。

3.3 综上所述,金银花药材中,与抗流感病毒密切相关的几个主要成分已确认,除已知的绿原酸、咖啡酸外,还有绿原酸的同分异构体4-咖啡酰奎尼酸、5-咖啡酰奎尼酸,及3-咖啡酰奎尼酸甲酯、Secoxyloganin、Vogeloside。涉及到4个咖啡酰奎尼酸类化合物、2个环烯醚萜苷类化合物及咖啡酸。这些成分结构的确认,为金银花抗病毒物质基础的阐明提供了坚实的实验基础,为下一步进行成分药理试验提

供了实验依据与数据支持。

#### 参考文献:

- [1] 潘翌翌,王雪峰,闫丽娟,等. 金银花提取物体处抗甲型流感病毒 FMI 株的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(6): 37-39.
- [2] 何显忠,兰荣德. 金银花的药理作用与临床应用[J]. 时珍国医国药, 2004, 14(12): 865-867.
- [3] 胡克杰,王跃红,王栋. 金银花中氯原酸在体外抗病毒作用的实验研究[J]. 中医药信息, 2010, 27(3): 27-28.
- [4] 胡克杰,孙考祥,王璠璐,等. 绿原酸体外抗病毒作用研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2001, 35(6): 430-432.
- [5] 郭承军,石俊英. 金银花抗小鼠流感作用的谱效关系研究[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(4): 50-52.
- [6] 石俊英,郭承军. 金银花体外抗流感病毒有效部位研究[J]. 山东中医药大学学报, 2010, 34(2): 178-180.
- [7] 郭承军,石俊英. 金银花小鼠血清移行成分指纹图谱研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(12): 2968-2970.
- [8] Clifford M N, Johnston K L, Knight S, et al. Hierarchical scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of chlorogenic acids [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(10): 2900-2911.
- [9] Suryawanshi S, Mehrotra N, Asthana RK, et al. Liquid chromatography/tandem mass spectrometric study and analysis of xanthone and secoiridoid glycoside composition of *Swertia chirata*, a potent antidiabetic [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20(24): 3761-3768.
- [10] Li Xiaoqin, Sun Xiaohong, Cai Shuang et al. Investigation on the chemical constituents and variation of the flower buds of *Lonicera* species by UPLC-ESI-MS/MS and principle component analysis [J]. *Acta Pharm Sin*, 2009, 44(8): 895-904.
- [11] 陈秋竹,林瑞超,王钢力,等. 金银花提取物化学成分研究[J]. 中药材, 2010, 33(6): 920-922.
- [12] 张培芬,李冲. 白花泡桐花黄酮类化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(22): 2629-2632.
- [13] 孙燕荣,董俊兴,吴曙光. 杜仲化学成分研究[J]. 中药材, 2004, 27(5): 341-343.

## 白头翁药材中白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 的测定

吴凤英, 游本刚, 唐丽华\*, 王业东, 毛娇娇, 夏程  
(苏州大学医学部药学院, 江苏 苏州 215123)

摘要:目的 建立测定白头翁药材中白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 的方法。方法 比较回流法和药典超声提取法对白头翁药材中的白

收稿日期:2010-11-07

基金项目:2010年苏州大学大学生创新性实验计划项目(5731512910)

作者简介:吴凤英(1985—)女,硕士生,研究方向:中药新技术与新剂型。Tel:13771936245, E-mail:wufy\_suda@163.com

\* 通信作者:唐丽华(1952—)女,硕士生导师,研究方向:中药新技术与新剂型。Tel:(0512)65882081, E-mail:tanglihua@suda.edu.cn

白头翁皂苷  $B_4$  的提取效果 筛选白头翁的最佳回流提取工艺。结果 白头翁的最佳提取工艺为 90% 甲醇 8 倍量 回流提取 3 次 1.0 h/次。在选定色谱条件下,白头翁皂苷  $B_4$  在 15.31 ~ 459.36  $\mu\text{g/mL}$  范围内线性关系良好,平均回收率为 99.46% ,RSD 为 0.98% ( $n=6$ )。结论 该方法简便易行,可用于白头翁药材中白头翁皂苷  $B_4$  的测定。

关键词:白头翁;白头翁皂苷  $B_4$ ; HPLC

中图分类号:R284.1

文献标志码:A

文章编号:1001-1528(2011)06-1021-04

## Determination of pulchinenoside $B_4$ from *Pulsatillae Radix*

WU Feng-ying, YOU Ben-gang, TANG Li-hua\*, WANG Ye-dong, MAO Jiao-jiao, XIA Cheng  
(School of Pharmacy, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China)

KEY WORDS: *Pulsatillae Radix*; pulchinenoside  $B_4$ ; HPLC

白头翁为毛茛科植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bge1) Regel 的干燥根,始载于《神农本草经》,具有清热解毒、凉血止痢之功效,可用于热毒血痢、阴痒带下、阿米巴痢疾等<sup>[1-3]</sup>。其主要有效成分为皂苷类成分,其中白头翁皂苷  $B_4$  为其主要代表<sup>[4-5]</sup>。在新药研发过程中,我们发现按 2010 版《中国药典》方法对白头翁药材中白头翁皂苷  $B_4$  进行定量,导致白头翁皂苷  $B_4$  的转移率异常偏高。因此,本研究首先比较了药典中的超声提取法和回流提取法对白头翁皂苷  $B_4$  的提取效果,在此基础上对回流提取工艺进行了优化,以期对白头翁药材中白头翁皂苷  $B_4$  进行准确定量。

### 1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(配备 SPD-M20A 型二极管阵列检测器,LC-20AT 型泵,CTO-10AS vp 型温控柱温箱,LC solution 型色谱工作站,日本岛津仪器公司);KQ-100DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);电子分析天平(starorous);高速中药粉碎机(上海天谊仪器有限公司)。

白头翁皂苷  $B_4$  对照品(中国药品生物制品检定所,批号:111766-200601);白头翁药材均购于各中药饮片公司;乙腈(色谱纯,TEDIA 公司),其余试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 溶液的制备

对照品溶液:精密称取白头翁皂苷  $B_4$  对照品 19.14 mg,置于 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,制成质量浓度为 765.60  $\mu\text{g/mL}$  的对照品溶液。

回流供试品溶液:准确称取白头翁药材粉末(过 50 目筛)60 g,置圆底烧瓶中,加 90% 甲醇 8 倍量,浸泡 1.0 h 后,回流提取 3 次,1.0 h/次,提取液合并,滤过,准确记录提取液体积。精密吸取提取液

1.0 mL 置 25 mL 量瓶中,90% 甲醇定容于刻度,滤过,即得。

超声供试品溶液:准确称取白头翁药材粉末(过 50 目筛)0.2 g,精密称定,加甲醇 50 mL,密塞,超声处理(功率 300 W,频率 40 KHz)1.0 h,放冷至室温,过滤,取续滤液即得。

#### 2.2 白头翁皂苷 $B_4$ 的测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱 Diamonsil  $C_{18}$  柱(15 mm  $\times$  4.6 mm 5  $\mu\text{m}$ );流动相 乙腈-水(26 : 74);柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ ;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 201 nm;进样量 20  $\mu\text{L}$ 。

2.2.2 系统适用性试验 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液 20  $\mu\text{L}$  进样测定。在选定色谱条件下,白头翁皂苷  $B_4$  与样品中其它组分色谱峰可基线分离,分离度大于 1.5,按白头翁皂苷  $B_4$  峰计算,理论塔板数(N)在 3 000 以上,拖尾因子(T)在 0.95 ~ 1.05 之间,符合 2010 年版《中国药典》一部附录 VID 对液相色谱法的要求,色谱图见图 1。

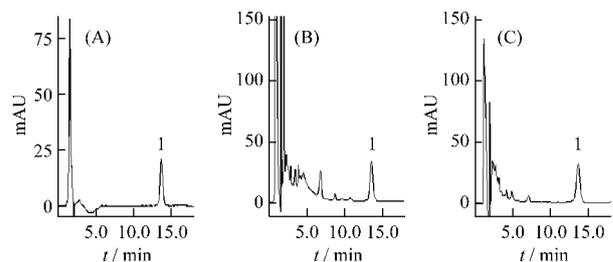


图 1 白头翁皂苷  $B_4$  对照品(A)、回流供试品(B)、超声供试品溶液(C)的色谱图

1. 白头翁皂苷  $B_4$

2.2.3 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 mL 置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容于刻度,摇匀,即得系列标准溶液。分别精密吸取上述溶液 20  $\mu\text{L}$  注入高效液相色谱仪,记

录其峰面积,以峰面积(A)为纵坐标,质量浓度(C, μg/mL)为横坐标,进行线性回归,得白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 的回归方程为:  $A = 5\,901.8C + 16\,327$   $r = 0.999\,9$  ( $n = 5$ ) 线性范围为 15.31 ~ 459.36 μg/mL 线性关系良好。

2.2.4 精密度试验 精密吸取高、中、低3个质量浓度的白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 标准溶液 20 μL 在 1 d 内连续进样测定 5 次,以及连续 5 d 进样测定,计算得白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 日内、日间精密度 RSD 分别为 0.64%、1.62%。

2.2.5 稳定性试验 分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 精密吸取同一供试品溶液 20 μL,记录峰面积,根据峰面积变化情况考察样品溶液 12 h 内稳定性。结果表明,供试品溶液 12 h 稳定性良好,RSD 为 0.99%。

2.3 提取方法比较 白头翁药材(090211 批号)分别采用甲醇回流和甲醇超声工艺提取,并制备供试品溶液,精密吸取各供试品溶液 20 μL,进样分析,结果见表 1,可以看出回流工艺显著优于超声工艺。

表 1 不同提取方法对白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 的影响 (n=3)

提取方法	白头翁皂苷 B <sub>4</sub> /%	RSD /%
回流提取	8.73 ± 0.11	1.21
超声提取	4.86 ± 0.09	1.87

2.4 提取溶媒考察 在固定回流提取工艺的基础上,对提取溶媒进行考察,分别采用甲醇和乙醇进行回流提取,结果见表 2,试验表明,甲醇的提取效果优于乙醇,故确定甲醇为提取溶媒。

表 2 不同提取溶媒对白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 的影响 (n=3)

提取溶媒	白头翁皂苷 B <sub>4</sub> /%	RSD /%
甲醇	8.74 ± 0.10	1.16
乙醇	8.33 ± 0.13	1.54

2.5 正交试验优化回流提取工艺 准确称取白头翁药材粉末(090211 批号,过 50 目筛)60 g,加入相应的溶媒,浸泡 1.0 h 后,选用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表进行试验,因素与水平见表 3。药材提取后,合并每次实验的白头翁提取液,提取液稀释一定倍数后进样测定其中白头翁皂苷 B<sub>4</sub>,正交试验结果及方差分析见表 4、表 5。

表 3 正交试验因素水平表

水平	因素			
	A 甲醇 浓度 /%	B 溶媒 用量 /倍	C 提取 时间 /h	D 提取 次数 /次
1	70	6	1.0	1
2	80	8	1.5	2
3	90	10	2.0	3

表 4 正交试验结果 (n=3)

试验号	甲醇质量 分数 /%	溶媒 用量 /倍	提取 时间 /h	提取 次数 /次	白头翁皂苷 B <sub>4</sub> 质量分数 /%
1	70	6	1.0	1	4.23
2	70	8	1.5	2	6.74
3	70	10	2.0	3	7.33
4	80	6	1.5	3	7.99
5	80	8	2.0	1	6.18
6	80	10	1.0	2	8.60
7	90	6	2.0	2	8.05
8	90	8	1.0	3	9.04
9	90	10	1.5	1	5.71
K <sub>1</sub>	18.30	20.26	21.86	16.11	
K <sub>2</sub>	22.76	21.95	20.43	23.38	
K <sub>3</sub>	22.79	21.64	21.55	24.35	
R	1.50	0.56	0.48	2.75	

表 5 方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	4.46	2	2.23	11.73	> 0.05
B	0.54	2	0.27	1.41	> 0.05
D	13.51	2	6.76	35.56	< 0.05
C(误差项)	0.38	2	0.19		

注:  $F_{0.01}(2, 2) = 99.0$ ,  $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$ 。

由表 4 直观分析可知,影响因素顺序为 D > A > B > C,即提取次数 > 甲醇浓度 > 溶媒用量 > 提取时间;由表 5 方差分析结果可知,除 D 因素对白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 有显著性影响外,其他因素均无显著性影响,故最佳工艺为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>3</sub>,即 8 倍量 90% 甲醇回流提取 3 次,1.0 h/次。

2.6 加样回收率试验 精密称取已知白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 质量分数的白头翁药材粉末 0.5 g(090211 批号,过 50 目筛),加入与样品等量的白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 对照品,按 2.5 项下回流提取的最佳工艺进行提取,制备样品并进样分析,测定白头翁皂苷 B<sub>4</sub>,计算回收率,结果符合要求,见表 6。

表 6 加样回收率试验结果 (n=6)

序号	已知量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 %	平均回 收率 /%	RSD /%
1	45.10	51.87	51.20	98.72		
2	45.10	51.87	51.62	99.53		
3	45.10	49.61	49.40	99.58		
4	45.10	49.61	50.20	101.19	99.46	0.98
5	45.10	49.61	48.80	98.36		
6	45.10	49.61	49.31	99.40		

2.7 药材中白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 的测定 准确称取各个批号的白头翁药材粉末(过 50 目筛),按回流提取和超声提取的最佳工艺进行提取,制备样品并进行

HPLC 测定,白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 的测定结果见表 7。

表 7 测定结果 (n=3)

药材批号	供货单位	产地	白头翁皂苷 B <sub>4</sub> /%	
			回流提取样品	超声提取样品
090211	吴江上海蔡同德堂 中药饮片公司	安徽	9.02 ± 0.15	5.06 ± 0.07
090611			8.42 ± 0.10	4.91 ± 0.09
100526	苏州天灵 中药饮片公司	安徽	8.63 ± 0.13	5.53 ± 0.07
080821			3.95 ± 0.08	2.24 ± 0.04
100318	安徽沪谦 中药饮片公司	江苏	2.27 ± 0.04	1.74 ± 0.04
090620			7.67 ± 0.01	5.52 ± 0.08
090523	河南	安徽	5.82 ± 0.04	3.79 ± 0.01
090810			9.31 ± 0.10	6.89 ± 0.06
090418	哈药集团世一堂	黑龙江	1.26 ± 0.02	0.75 ± 0.02
090808	中药饮片公司	辽宁	1.03 ± 0.01	0.70 ± 0.01

### 3 讨论

3.1 关于超声提取方法,我们曾对超声功率(150 W、250 W、300 W)和超声时间(25 min、1.0 h、1.5 h、2.0 h)进行了考察,结果表明超声功率和超声时间对白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 的测定并无显著性影响,其中以超声功率 300 W,超声时间 1.0 h 效果最好。

3.2 参考 2010 版《中国药典》白头翁项下测定条件,我们发现甲醇-水流动相在 201 nm 波长处基线极不平稳<sup>[6]</sup>,色谱峰分离度不佳。参考相关文献<sup>[7-8]</sup>经不同流动相的尝试,最终确定了以乙腈-水(26:74)作为流动相。结果表明,改进后的方法基线平稳,色谱峰间能达到良好分离,精密性、重复性、线性关系及回收率均良好。

3.3 地理环境和气候条件是有效成分积累的基础<sup>[9]</sup>,所以,来源于不同地区的白头翁药材,白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 质量分数有一定的差异。但是同一产地,白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 差别也较大。文献[10]表明,白头翁为多年生草本植物,不同的采收时间对其有影响;白头翁皂苷为水溶性物质,饮片切制过程中润洗不当

可导致其丧失,故饮片中其质量分数可能较低。

3.4 采用 2010 版《中国药典》白头翁项下测定方法可判定药材的合格与否,但是并不一定能反映出药材中白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 的真实质量分数;采用改进后的定量测定方法既可对药材的合格与否进行判定,又能对药材进行准确定量。改进后的回流提取工艺与超声提取工艺相比,可以更加完全的提取出白头翁药材中的白头翁皂苷 B<sub>4</sub>,为白头翁药材的质量评价提供更为合理的方法。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2010 年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:241-242.
- [2] 唐德才. 中药学[M]. 上海:上海中医药大学出版社,2003:111.
- [3] 江苏新中医学院. 中药大辞典:上册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1997:704.
- [4] 舒莹,韩广轩,刘文庸,等. 中药白头翁的药材、化学成分和药理作用的研究[J]. 药学实践杂志,2000,18(6):3871.
- [5] 李勇,林翠英. 白头翁属植物化学成分及活性研究概述[J]. 天津中医药,2005,22(6):526-528.
- [6] 王菁,鹿燕敏,薛小平,等. 反相高效液相色谱法测定白头翁药材中白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 的含量[J]. 时珍国医国药,2009,20(11):2758-2759.
- [7] 曲龙妹,赵春杰,李丹,等. RP-HPLC 法测定白头翁汤中白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2009,26(1):45-47.
- [8] 时维静,周其应,王海侠,等. 产地加工对白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 含量的影响[J]. 中药材,2008,31(8):1124-1125.
- [9] 盛明智. 中药饮片质量应从产地抓起[J]. 现代医药卫生,2006,22(19):3003-3004.
- [10] 时维静,胡跃进,王海侠,等. 不同来源白头翁药材的皂苷含量比较[J]. 中国中医药信息杂志,2008,15(8):45-46.