

裂果薯总皂苷制备工艺优化及其质量控制方法研究

李昊¹, 李锦华¹, 莫宇雪¹, 吕美娴¹, 郭心怡¹, 梁梓樱¹, 王燕雪¹, 刘布鸣², 梁钢^{1,2,3*}, 袁建童^{2*} (1. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2. 广西中药质量标准研究重点实验室, 南宁 530015; 3. 广西医科大学, 靶向肿瘤学国家重点实验室, 南宁 530021; 4. 广西生物活性分子研究与评价重点实验室, 南宁 530021)

摘要:目的 建立从裂果薯药材中制备总皂苷的方法,并建立总皂苷的质量控制方法。方法 采用水浴回流的方法从裂果薯块茎粉末中提取总皂苷粗提取物,用溶剂萃取和大孔树脂对粗提物进行富集纯化,制成裂果薯总皂苷(SSPHs),分别建立薄层色谱法、紫外可见分光光度法和超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS)联用对SSPHs进行质量评价。结果 所建立的制备方法从裂果薯块茎中制备总皂苷制品得率0.29%~2.81%,总皂苷纯度57.30%~77.02%,经检测其中含有裂果薯皂苷I(SSPH I)和裂果薯皂苷II(SSPH II)等皂苷类物质,SSPH I含量为10.77~85.60 mg·g⁻¹,SSPH II含量为0.19~4.75 mg·g⁻¹。结论 所建立的制备方法简单、高效、环保,产品品质高,所建立的定性、定量检测方法能有效反映SSPHs的质量情况,可为裂果薯总皂苷的质量控制提供方法参考。

关键词:裂果薯;总皂苷;超高效液相-串联质谱;质量控制

doi:10.11669/cpj.2024.23.010 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)23-2278-10

Optimization of Preparing Technology of Total Saponins from *Schizocapsa plantaginea* Hance and its Quality Control Method

LI Hao¹, LI Jinhua¹, MO Yuxue¹, LV Meixian¹, GUO Xinyi¹, LIANG Ziyang¹, WANG Yanxue¹, LIU Buming², LIANG Gang^{1,2,3*}, YUAN Jiantong^{2*} (1. College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning 530015, China; 3. State Key Laboratory of Targeted Oncology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 4. Guangxi Key Laboratory of Bioactive Molecules Research and Evaluation, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for preparing total saponins from *Schizocapsa plantaginea* Hance and establish a corresponding quality control method. **METHODS** The total saponins were extracted from the *Schizocapsa plantaginea* Hance tubers using a water bath reflux method, followed by purification of the crude extract through solvent extraction and macroporous resin. Subsequently, the purified product of total saponins of *Schizocapsa plantaginea* Hance (SSPHs) was prepared, and its quality was assessed using thin-layer chromatography, UV-visible spectrophotometry, and ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-MS) combined method. **RESULTS** The developed preparation method resulted in a yield of total saponin products from the *Schizocapsa plantaginea* Hance tuber ranging from 0.29% to 2.81%, with a purity from 57.30% to 77.02%. After detection, saponin substances such as *Schizocapsa Plantaginea* Hance I (SSPH I) and *Schizocapsa plantaginea* Hance II (SSPH II) were found in the total saponin products. The content of SSPH I was 10.77–85.60 mg·g⁻¹ and the content of SSPH II was 0.19–4.75 mg·g⁻¹. **CONCLUSION** The established preparation method is simple, efficient, and environmentally friendly, with high product quality. The established qualitative and quantitative detection method can effectively reflect the quality of SSPHs and provide method reference for the quality control of SSPHs.

KEY WORDS: *Schizocapsa plantaginea* Hance; total saponin; UHPLC-MS/MS; quality control

裂果薯属于广西特色中草药,拉丁学名 *Schizocapsa plantaginea* Hance,属于百合目,蒟蒻属科,裂果薯属植物,别名水田七、水萝卜、屈头鸡等,多生

长在水沟边和田埂上,主要分布于广西、广东、云南、贵州以及湖南等地,在东南亚地区也有分布。药材资源丰富,民间常用于清热解毒、止咳化痰、

基金项目:国家自然科学基金项目资助(81960737);广西中药质量标准研究重点实验室建设项目资助(17-259-52)

作者简介:李昊,男,硕士研究生 研究方向:民族药质量控制及相关标准研究 * **通讯作者:**梁钢,男,博士,教授,博士生导师 研究方向:天然产物及其结构修饰物抗肿瘤药理活性、机制研究及新药研发;袁建童,男,博士,助理研究员 研究方向:药物分析及中药质量标准研究 Tel:(0771)5883405

凉血散瘀等,也可外用治疗跌打损伤,疮疡中毒。裂果薯属广西民族药中草药和区域性特色中药材,已有一定种植规模,《广西壮族自治区壮药材质量标准》^[1]已建立了裂果薯药材的质量标准,但总皂苷的质量标准未见报道。本课题组研究中发现,裂果薯中皂苷类化合物具有明显抑制肝癌细胞增殖的作用^[2-3]。其中,裂果薯皂苷 I (SSPH I) 和裂果薯皂苷 II (SSPH II) 抑制肝癌细胞增殖的作用强于总皂苷,说明 SSPH I 和 SSPH II 可能是裂果薯皂苷抗肿瘤的有效成分^[4-5]。Sun 等^[6]研究发现,裂果薯总皂苷(SSPHs)通过丝裂原活化蛋白激酶信号传导从而抑制人肝癌细胞生长。Zhou 等^[7]研究发现,SSPH I 通过诱导肝癌细胞的活性氧(ROS)积累和 ERK1/2 信号通路抑制自噬并诱导细胞凋亡。Zhou 等^[8]研究发现,SSPH I 还通过抑制 MAPK/ERK1/2 和 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制上皮细胞-间充质转化以及非小细胞肺癌的侵袭和迁移。目前研究表明,SSPH I 还可通过调节铁代谢诱导 HepG2 细胞的铁死亡,这对肝癌的治疗具有重要意义^[9]。大孔树脂性质稳定,不溶于酸、碱及有机溶剂,用于分离纯化皂苷化合物已有较多报道^[10]。SSPHs 纯化目前多用大孔树脂,总皂苷成分复杂,纯化过程易受到大孔树脂种类、上样和洗脱工艺的影响,导致产物质量差异较大。本研究对 SSPHs 的大孔树脂纯化工艺进行研究,并以 SSPH I 和 SSPH II 作为检测指标建立相应的质量评价方法,为深入研究裂果薯的药用价值提供科学依据。

1 实验材料

1.1 药材与试剂

SSPH I 对照品(自制,纯度 97.5%);SSPH II 对照品(自制,纯度 98.0%);无水乙醇(成都市科隆化学品有限公司,分析纯);体积分数 95% 乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、高氯酸、冰乙酸、氨水、香草醛均为分析纯;薄层层析硅胶板(青岛海洋化工厂分厂,50 mm × 100 mm);甲醇、乙腈均为色谱纯;超纯水;大孔树脂(型号: AB-8、D101、HPD100、HPD400、ADS7,东鸿化工有限公司)。

裂果薯药材信息见表 1,经广西中医药研究院中药研究所黄云峰教授鉴定为蒟蒻薯科裂果薯属植物裂果薯(*Schizocapsa plantaginea* Hance)的干燥块茎。

表 1 裂果薯药材样品信息表

Tab. 1 Sample information of *Schizocapsa plantaginea* Hance

Sample No.	Origin (in Chinese)	Growth years	Collection time
S1	Guilin, Guangxi (广西桂林)	4	22. 8. 18
S2	Qingyuan, Guangdong (广东清远)	4	22. 7. 20
S3	Wenshan, Yunnan (云南文山)	4	22. 8. 17
S4	Bijie, Guizhou (贵州毕节)	4	22. 9. 10

1.2 仪器

岛津 UV2700 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);Waters ACQUITYH-Class 超高效液相色谱仪(美国沃特世科技有限公司);Qda 质谱检测器(美国沃特世科技有限公司);TNF-50 型多功能提取浓缩回收机组(青州市精诚医药装备制造有限公司);HH-S 型数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂);AR-224CN 型万分之一电子天平(美国奥豪斯仪器有限公司);KQ500VDE 型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2 方法

2.1 SSPHs 的制备方法

称取裂果薯药材,粉碎,过 2 号筛,据文献报道的提取和萃取工艺条件^[4],按药材质量(g)-溶液体积(mL) = 1:10 加入体积分数 80% 乙醇溶液,80 °C 回流提取 4 次,每次 2 h,合并提取液、浓缩蒸干,即得醇提物。用适量纯化水将醇提物制成混悬液,石油醚、乙酸乙酯、水饱和正丁醇依次萃取醇提物,将正丁醇部位萃取液浓缩蒸干,即得 SSPHs 粗品,备用。SSPHs 粗品用适量水溶解后上样到大孔树脂吸附后,用不同浓度乙醇洗脱,洗脱液浓缩蒸干,即得 SSPHs,制备流程图见图 1。

2.2 制备过程中紫外-可见分光光度法测定 SSPHs 含量方法

2.2.1 对照品溶液的制备 取 SSPH I 对照品适量,精密称定,用甲醇溶解,制成 0.102 mg · mL⁻¹ 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取 SSPHs 粗提物约 10 mg,精密称定,用甲醇溶解,制成 1 mg · mL⁻¹ 的供试品溶液。

2.2.3 测定方法 精密吸取上述对照品溶液 0.1、0.2、0.4、1、3 mL,挥尽乙醇,精密加入 5% 香草醛-冰乙酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL,摇匀,60 °C 水浴加热 20 min,取出,冰水浴冷却 10 min,精密加入 5 mL 冰乙酸,摇匀。在 452 nm 波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标绘制标准曲线,外标法测定 SSPHs 含量。

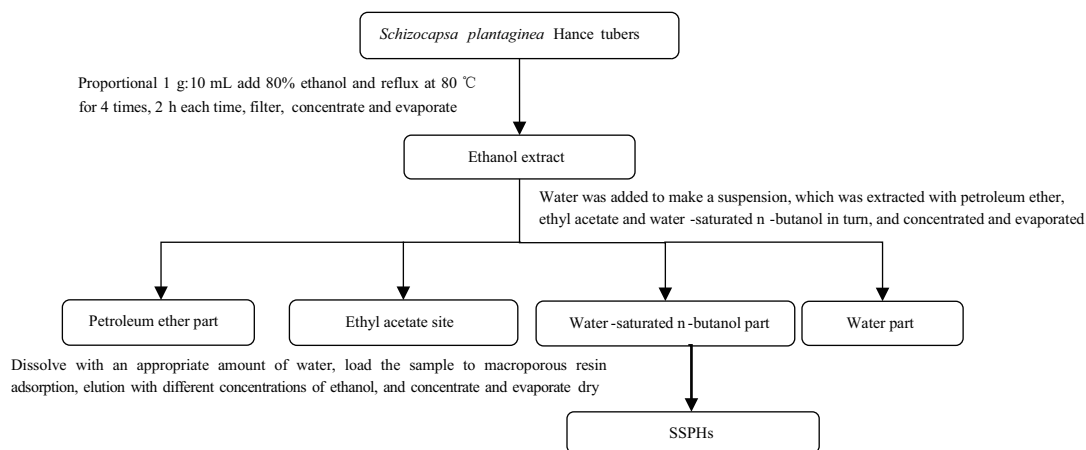


图1 裂果薯总皂苷(SSPHs)制备流程图

Fig. 1 SSPHs preparation flowchart

2.3 大孔树脂纯化工艺的考察方法

2.3.1 大孔树脂型号筛选^[11] 静态吸附实验:分别称取预处理过的5种型号的大孔树脂:AB-8、D101、HPD100、HPD400、ADS7型树脂各1g置于50 mL具塞三角瓶中,分别加入1g总皂苷粗提物,用水溶解后,密封,摇床上震荡12h,转速 $80\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,抽滤,将抽滤后的树脂用适量蒸馏水洗去残留药液,洗涤液与滤液合并,按“2.2”项下方法测定合并液中总皂苷的含量,按公式1计算吸附率。

吸附率(%) = (上样量 - 洗涤液和滤液中总皂苷量) / 上样量 $\times 100\%$ 公式(1)

静态解析实验:将上述吸附饱和的树脂分别转移至50 mL锥形瓶中,加入体积分数95%乙醇35 mL,密封,摇床上震荡12h,转速 $80\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,抽滤,按“2.2”项下方法测定滤液中总皂苷的含量,按公式2计算解析率。

解析率(%) = 乙醇洗脱液中总皂苷量 / (上样量 - 洗涤液和滤液中总皂苷量) $\times 100\%$ 公式(2)

2.3.2 上样浓度的考察 取处理好的AB-8型号大孔树脂装柱4根,每根装量15g,分别取质量浓度为0.2、0.1、0.05、0.01 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的总皂苷粗提物水溶液21、42、84、420 mL,以 $48\text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速上样,收集流出液,再用120 mL纯净水洗脱,合并流出液和水洗液,分别测定合并液中总皂苷含量,计算吸附率。

2.3.3 上样流速的考察 取处理好的AB-8型号大孔树脂装柱4根,每根装量15g,取0.2 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的总皂苷粗提物水溶液20 mL上样,上样流速分别为24、48、72、96、120 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$,收集流出液,再用120 mL水洗脱,合并流出液和水洗液,分别测定合

并液中总皂苷含量,计算吸附率。

2.3.4 大孔树脂最大载样量的考察^[12] 取处理好的AB-8型号大孔树脂15g,装柱,取质量浓度为0.2 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的总皂苷粗提物水溶液,以 $72\text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速上样,分段收集流出液,每10 mL为1份,分别测定流出液中总皂苷含量,以未吸附的总皂苷浓度为纵坐标,份数为横坐标绘制泄露曲线。

2.3.5 洗脱液浓度的考察^[11] 取处理好的AB-8型号大孔树脂15g,装柱,取0.2 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的总皂苷粗提物水溶液21 mL,以 $72\text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速上样,待吸附完全后,用纯净水120 mL洗脱后,再依次用体积分数10%、20%、30%、50%、60%、70%、95%的乙醇以 $48\text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速洗脱120 mL,收集洗脱液,分别测定洗脱液中总皂苷的含量并计算总皂苷纯度。

2.3.6 洗脱液用量的考察^[13] 取处理好的AB-8型号大孔树脂15g,装柱,取0.2 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的总皂苷水溶液21 mL,以 $72\text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速上样,待吸附完全后,用纯净水120 mL洗脱,再依次用体积分数30%乙醇溶液240 mL、70%乙醇溶液192 mL洗脱,洗脱流速 $48\text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$,分段收集各浓度乙醇洗脱液,每24 mL收集1份,分别测定洗脱液中总皂苷含量并计算总皂苷纯度。

2.3.7 工艺验证试验 按考察的最佳工艺制备裂果薯总皂苷,平行3份,分别收集洗脱液,测定总皂苷含量并计算纯化前后总皂苷纯度。

2.4 薄层色谱鉴别方法

2.4.1 对照品溶液的制备 取SSPH I对照品适量,精密称定,用甲醇溶解,制成1.02 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的SSPH I对照品溶液;取SSPH II对照品适量,精密

称定,用甲醇溶解,制成 $1.36\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的SSPH II对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备 取SSPHs适量,精密称定,用甲醇溶解,制成 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的SSPHs供试品溶液。

2.4.3 检测方法 取上述供试品溶液和SSPH I、SSPH II对照品溶液各 $5\text{ }\mu\text{L}$,点于同一硅胶G薄层板上,以正丁醇-乙酸乙酯-水=4:1:5(上层)为展开剂,展开,喷以体积分数10%硫酸乙醇溶液,105℃加热至斑点显色清晰,在可见光和365 nm紫外光下检视。

2.4.4 耐用性考察 不同品牌薄层板的考察:按“2.4.3”项下方法,在其他条件相同的情况下分别对MERCK和青岛海洋的薄层色谱板进行层析考察。

不同展开温度的考察:按“2.4.3”项下方法,分别在4和25℃条件下进行层析考察。

不同展开湿度的考察 按“2.4.3”项下方法,分别对相对湿度在55%和83%条件下进行层析考察。

不同点样量的考察:按“2.4.3”项下方法,取供试品溶液分别点样 $5\text{ }\mu\text{L}$ 和 $2\text{ }\mu\text{L}$,对照品溶液点样 $5\text{ }\mu\text{L}$,进行层析考察。

2.5 超高效液相色谱-串联质谱法(UHPLC-MS)含量测定方法

2.5.1 对照品储备液的制备 分别取SSPH I和SSPH II对照品适量,精密称定,用甲醇溶解,制成含SSPH I $2.3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、SSPH II $1.22\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备溶液。精密移取SSPH I标准储备溶液7 mL,SSPH II标准储备溶液0.5 mL置于同一25 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,制成含SSPH I $644\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,SSPH II $24.4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品储备溶液。

2.5.2 供试品溶液的制备 取SSPHs 10 mg,精密称定,置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,制成 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,使用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.5.3 SSPH I、SSPH II离子精确质量数的确定 取“2.3.1”项下SSPH I、SSPH II对照品储备溶液,分别注入高分辨率质谱仪中,测定SSPH I、SSPH II离子的精确质量数。

2.5.4 检测方法 色谱条件 色谱柱:Waters BEH C_{18} 色谱柱($2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}, 1.7\text{ }\mu\text{m}$);流动相:乙腈(A)-0.1%氨水(B);梯度洗脱程序(A:0~1 min, 50%~50%;1~2 min, 50%~85%;2~4.5 min,

85%~60%;4.5~6 min, 60%~60%;6~6.5 min, 60%~50%;6.5~10 min, 50%~50%);流速 $0.35\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;进样体积 $5\text{ }\mu\text{L}$;柱温40℃;

质谱条件:ESI离子源;负离子模式检测;毛细管电压为800 V;锥孔电压为15 V;采用选择性离子检测(SIM)模式:0~10 min, 1 029.52 监测SSPH I;0~10 min, 867.47 监测SSPH II;探头温度为600℃;采样速率每秒10点;载气 N_2 ;载气流速 $10\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.5.5 系统适应性考察 线性关系考察 精密吸取“2.5.1”项下混合对照品储备溶液5,4,3,2,1 mL,0.5 mL置于25 mL量瓶中,分别加入甲醇至刻度,摇匀。使用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液作为混合对照品溶液。按“2.5.4”项下检测方法分别进样分析,以各成分的浓度 $\rho(\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 为横坐标,峰面积 y 为纵坐标进行线性回归。

精密度试验:取同一份混合对照品溶液,按“2.5.4”项下检测方法连续进样6次,记录各成分的峰面积并计算相对标准偏差(RSD)值。

稳定性实验:取云南SSPHs,按“2.5.2”项下方法制成供试品溶液,每间隔2 h进样1次,记录各成分的峰面积并计算RSD值,观察样品在12 h内的稳定性。

重复性实验:取云南SSPHs,按“2.5.2”项下方法制成供试品溶液,平行操作6份,按“2.5.4”项下检测方法进样测定,记录峰面积,并计算含量和RSD值。

加样回收试验:取云南SSPHs约5 mg,分别加入SSPH I、SSPH II含量为 $39.77, 1.89\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品,按“2.5.2”项下方法制成供试品溶液,平行操作6份,按“2.5.4”项下检测方法进样,记录峰面积,并计算加样回收率和RSD值。

日间精密度实验:由不同实验人员分别在第一天及第二天取云南SSPHs样品各6份,按“2.5.2”项下方法制成供试品溶液,按“2.5.4”项下检测方法进样,记录峰面积,并计算含量和RSD值。

色谱柱耐用性考察:精密称定广东SSPHs 13.6 mg,按“2.5.2”项下方法制成供试品溶液,使用3根不同厂家的 C_{18} 色谱柱:色谱柱①:Waters BEH C_{18} ($2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}, 1.7\text{ }\mu\text{m}$) 色谱柱②:Agilent Eclipse Plus C_{18} RRHD($2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}, 1.8\text{ }\mu\text{m}$) 色谱柱③:Thermo Hypersil GOLD C_{18} ($2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}, 1.9\text{ }\mu\text{m}$),按“2.5.4”项下检测方法进样,记录峰面积,并计算含量和RSD值。

3 结果

3.1 不同产地 SSPHs 的得率及纯度

按“2.2.2”项下方法制备不同产地 SSPHs,按“2.2.3”项下方法测定含量,重复3次,计算总皂苷产率和纯度,结果见表2。不同产地样品中总皂苷纯度差异较大,广西、广东、云南产药材中 SSPHs 纯度在 70.00% ~ 77.02% 之间,纯度没有明显差异,贵州产药材总皂苷纯度 57.30%,与其他3个产地相比纯度差异较大。

表2 不同产地样品总皂苷产率及纯度

Tab.2 Total saponin yield and purity of samples from different origins

Sample No.	Yield/%	Purification/%
S1	2.28	77.02
S2	2.81	73.15
S3	2.63	70.00
S4	0.29	57.30

3.2 大孔树脂纯化工艺优化结果

3.2.1 静态吸附及解吸附结果 AB-8 型大孔树脂吸附率及解吸率均最高,见表3,因此选择 AB-8 型大孔树脂分离纯化 SSPHs。

表3 5种大孔树脂静态吸附和解吸附的考察结果

Tab.3 Investigation results of static adsorption and desorption of five macroporous resins

No.	Items	Adsorption rate/%	Desorption rate/%
1	AB-8	74.09	61.20
2	D101	70.91	60.58
3	HPD100	71.82	57.59
4	HPD400	72.25	41.83
5	ADS7	70.00	56.82

3.2.2 上样浓度考察结果 在相同上样量条件下,吸附率随着上样液质量浓度的增加而增加,表明在 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上样液质量浓度下,没有超过树脂的吸附容量,见图2。但上样质量浓度太高会变得较黏稠,不利于树脂柱上样,最终选择上样液质量浓度为 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.2.3 上样流速考察结果 吸附率随着上样流速的增加,呈现先升高后下降的趋势,在 $72 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ 时吸附率最高,见图3。可能是流速太慢造成大孔树脂堵塞,药液无法流过某些大孔树脂层表面就流出来,导致泄漏增加;流速过快时大孔树脂和样品

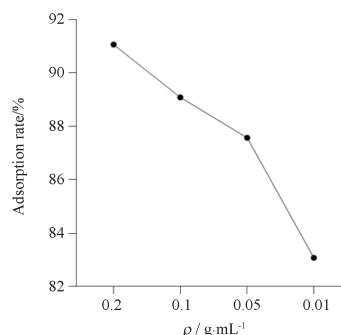


图2 上样浓度对 SSPHs 吸附率的影响

Fig.2 Effect of sample concentration on the adsorption rate of SSPHs

接触时间短,样品不能在大孔树脂上充分吸附导致泄漏增加,因此最终选择上样流速为 $72 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

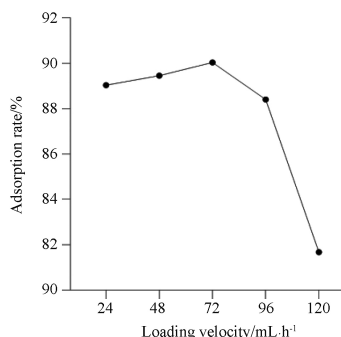


图3 上样流速对 SSPHs 吸附率的影响

Fig.3 Effect of sample loading rate on the adsorption rate of SSPHs

3.2.4 大孔树脂最大载样量考察结果^[9] 当累计上样量达到 40 mL 时,泄漏量开始明显增大,说明树脂柱吸附量达到饱和,见图4。实际生产中,一般取最大上样量的 70% 作为实际上样量,确定上样量为 21 mL。

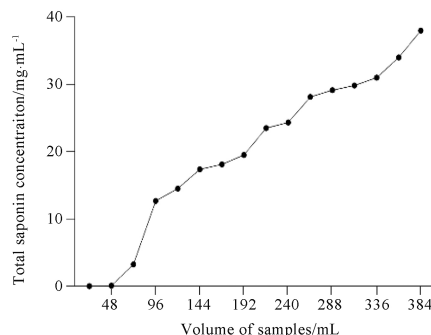


图4 SSPHs 泄漏曲线

Fig.4 Leakage curve of SSPHs

3.2.5 洗脱液浓度考察结果 采用体积分数10%、20%、30%乙醇洗脱,总皂苷含量较低,总皂苷纯度分别为54.30%、39.34%、48.19%,说明该洗脱液中含有许多非皂苷类物质;体积分数50%、60%、70%乙醇洗脱液中总皂苷含量较高,总皂苷纯度分别为71.21%、88.82%、70.74%,见图5,因此选择体积分数30%乙醇作为除杂溶剂,体积分数70%乙醇作为洗脱溶剂。

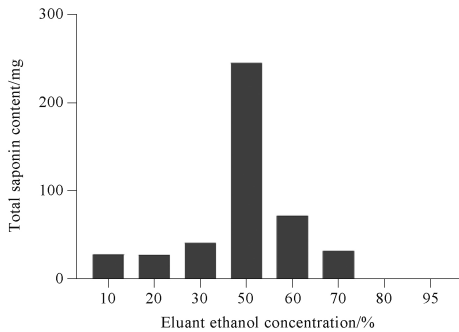


图5 洗脱剂浓度对 SSPHs 含量的影响

Fig. 5 Effect of eluting reagent on the content of SSPHs

3.2.6 洗脱液用量考察结果 体积分数30%乙醇洗脱条件下,第6个流份以后,总皂苷含量几乎没有变化,见图6,纯度均低于50%,继续洗脱除杂效率也不会有明显提升;体积分数70%乙醇洗脱条件下,第4个流分以后,总皂苷已基本洗脱完全,见图7,且前4个流分纯度均高于70%,为节约溶剂,提高效率,确定体积分数30%乙醇用量为144 mL,体积分数70%乙醇用量为96 mL。

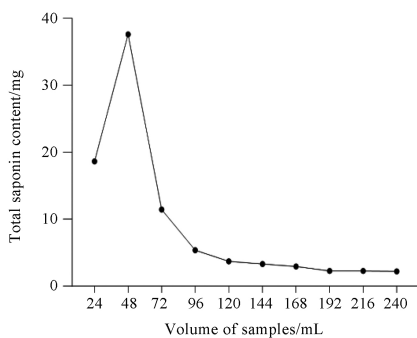


图6 体积分数30%乙醇动态洗脱对 SSPHs 的影响

Fig. 6 Effects of 30% ethanol dynamic elution on SSPHs content

3.2.7 工艺验证试验 AB-8 大孔树脂纯化后3批 SSPHs 的平均纯度为77.02%,纯化倍数1.78,见表4。

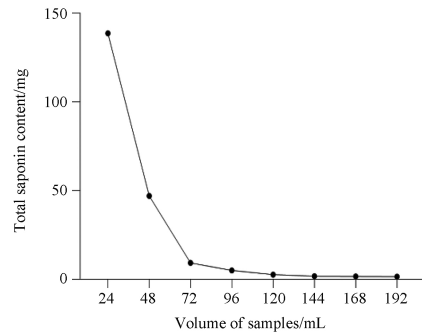


图7 体积分数70%乙醇动态洗脱对 SSPHs 的影响

Fig. 7 Effects of 70% ethanol dynamic elution on SSPHs content

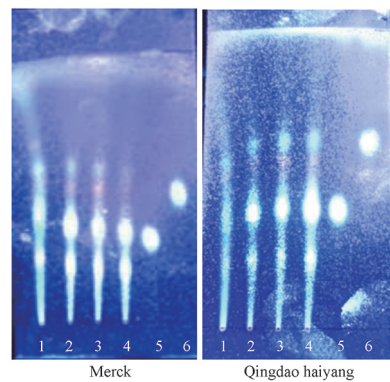
表4 SSPHs 纯化工工艺验证实验结果。n=3

Tab. 4 Process validation test results for purified SSPHs. n=3

No.	Purification/%		Purification factor
	Before purification	After purification	
1	44.00	77.22	1.76
2	42.77	77.67	1.82
3	42.87	76.16	1.78
Average value	43.21	77.02	1.78

3.3 薄层色谱法耐用性考察和鉴别结果

3.3.1 不同品牌薄层色谱板考察结果 两个厂家的硅胶G薄层色谱板分离效果均良好,见图8。



1 - 贵州;2 - 广东;3 - 广西;4 - 云南;5 - SSPH I 对照品;6 - SSPH II 对照品;图9~12中1~6同图8。

1 - Guizhou; 2 - Guangdong; 3 - Guangxi; 4 - Yunnan; 5 - SSPH I control; 6 - SSPH II control. 1 - 6 of Fig. 9 - 12 are the same as that of Fig. 8.

图8 不同品牌对 SSPHs 薄层色谱的影响

Fig. 8 Thin layer chromatograms of different brands for SSPHs

3.3.2 不同展开温度考察结果 4℃展开条件下拖尾变明显,但仍可见两个特征性斑点,不影响薄层色谱的鉴别,见图9。

3.3.3 不同展开相对湿度考察结果 在83%和55%相对湿度条件下薄层色谱板分离效果均良好,见图10。

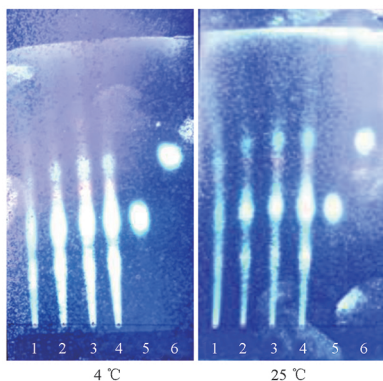


图9 不同温度下 SSPHs 薄层色谱图

Fig. 9 Thin layer chromatograms of SSPHs at different temperatures

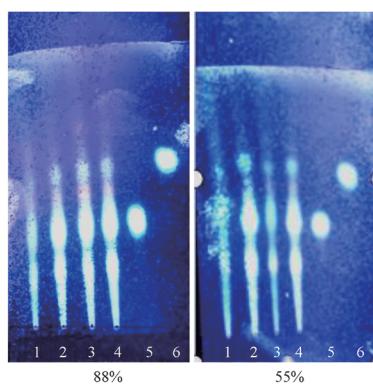


图10 不同展开相对湿度下的 SSPHs 薄层色谱图

Fig. 10 Thin layer chromatograms of SSPHs at different developed relative humidity

3.3.4 不同点样量考察结果 由于 SSPHs 中 SSPH II 含量较低,在点样 $2 \mu\text{L}$ 时特征性斑点几乎不可见,故点样量在 $5 \mu\text{L}$ 为宜,见图 11。

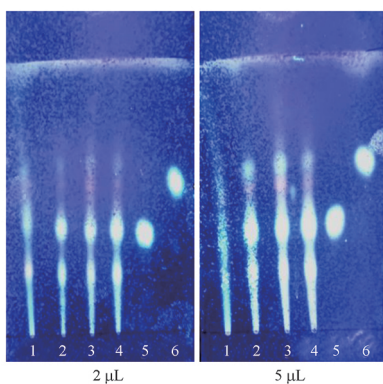


图11 不同点样量 SSPHs 的薄层色谱图

Fig. 11 Thin layer chromatograms with different spot volumes of SSPHs

3.3.5 鉴别结果 供试品色谱中,在对照品色谱相应的位置上显相同的荧光斑点。薄层色谱鉴别结果见图 12。

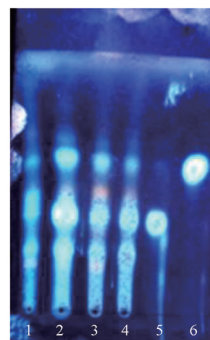


图12 不同产地 SSPHs 的薄层色谱鉴别结果

Fig. 12 Thin layer chromatograms identification results of SSPHs from different origins

3.4 UHPLC-MS 系统适用性考察和多批样品测定结果

3.4.1 质谱图、色谱图结果 混合对照品质谱图结果见图 13。样品和混合对照品结果见图 14。

3.4.2 线性关系考察结果 SSPH I 和 SSPH II 的线性关系良好,可用于含量测定,见表 5。

3.4.3 精密度实验结果 SSPH I 的峰面积 RSD 值为 2.26% ($n = 6$), SSPH II 的峰面积 RSD 值为 2.04% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

3.4.4 重复性实验结果 结果显示 SSPH I 和 SSPH II 的平均含量分别为 68.37 、 $2.02 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 值分别为 1.96% 、 2.90% ($n = 6$),表明方法的重复性良好。

3.4.5 稳定性实验结果 结果显示 SSPH I 和 SSPH II 的峰面积 RSD 值分别为 2.88% 、 2.38% ,表明样品在 12 h 内稳定性良好。

3.4.6 加样回收实验结果 6 批样品回收率范围在 $95\% \sim 105\%$ 之间, SSPH I 和 SSPH II 的平均回收率分别为 100.80% 及 102.42% , RSD 分别为 1.80% 、 2.17% ($n = 6$),见表 6,表明方法准确度良好。

3.4.7 日间精密度实验结果 SSPH I 和 SSPH II 含量均值分别为 70.17 和 $2.09 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.61% 和 2.66% ,表明日间精密度良好。

3.4.8 耐用性考察结果 云南样品中 SSPH I 和 SSPH II 含量均值分别为 85.73 和 $3.76 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.24% 和 1.49% ,证明该方法耐用性良好。

3.4.9 多批样品含量测定结果 取适量不同产地 SSPHs,精密称定,用甲醇溶解,按 2.3 项下检测方法测定不同产地裂果薯总皂苷中 SSPH I 和 SSPH II 的含量,结果见表 7。

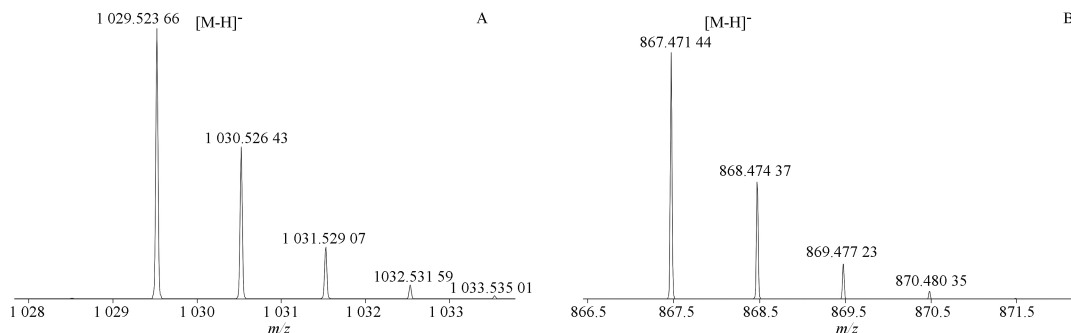


图 13 SSPH I (A) 及 SSPH II (B) 质谱图

Fig. 13 Mass spectra of SSPH I (A) and SSPH II (B)

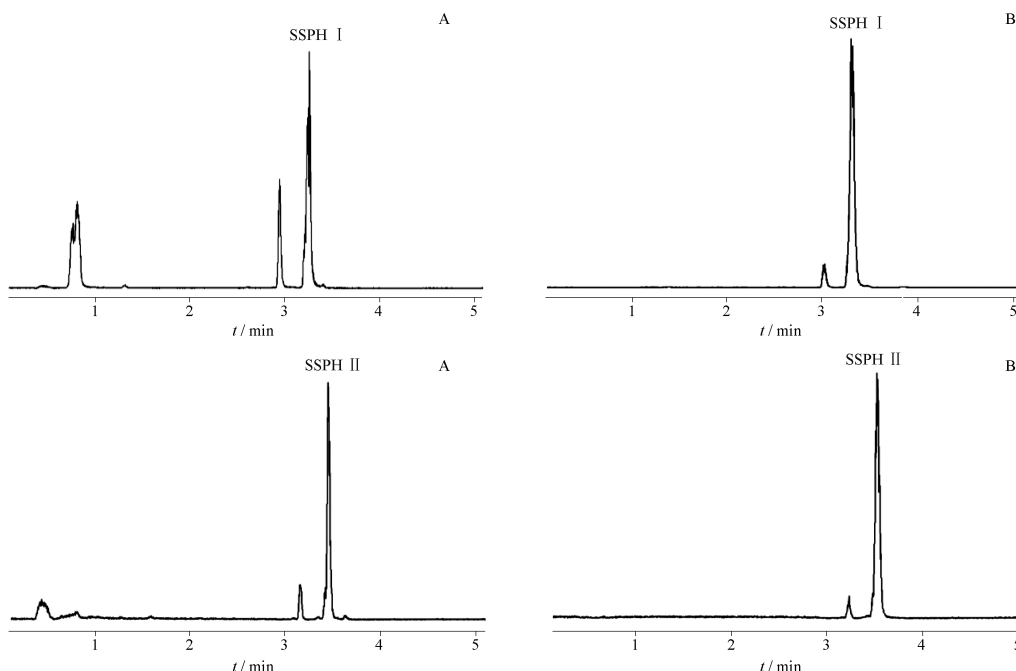


图 14 SSPHs 供试品(A)和混合对照品(B)的超高效液相色谱串联质谱(UHPLC-MS)色谱图

Fig. 14 UHPLC-MS chromatograms of SSPHs sample(A) and its reference substances(B)

表 5 SSPHs 中 2 种指标成分的标准曲线及线性范围

Tab. 5 Standard curves and linear ranges of two indicator components from SSPHs

Component	Regression equation	r^2	Linear range/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
SSPH I	$y = 10\ 071\rho + 183\ 327$	0.999 2	12.88 - 128.8
SSPH II	$y = 59\ 306\rho + 12\ 506$	0.999 1	0.488 - 4.88

4 讨论

4.1 总皂苷的含量测定-紫外可见分光光度法的建立

按“2.2.1”和“2.2.2”项下方法制备对照品溶液和 SSPHs 供试品溶液,按“2.2.3”项下方法显色后在 400 ~ 800 nm 波长下进行扫描,按紫外可见分光光度法下方法制备供试品和对照品,显色后在

400 ~ 800 nm 波长下进行扫描,结果对照品和供试品在 452 nm 处有最大吸收峰,故确定检测波长为 452 nm,见图 15。实验考察了方法的线性、精密性、重复性、加样回收率和稳定性,线性 $r^2 = 0.999\ 9$,平均加样回收率为 100.60%,RSD 为 1.34%,其余方法学考察 RSD 均小于 3%,符合含量测定的要求。

4.2 总皂苷薄层色谱鉴别中展开条件的考察

参照皂苷类成分常用展开系统,分别考察了 3 种展开剂系统,①正丁醇-乙酸乙酯-水 = 4:1:5(上层)、②三氯甲烷-甲醇-水 = 5:1.5:0.5(上层)、③三氯甲烷-甲醇-甲酸 = 4:1:0.25。结果②号展开剂中 SSPH I Rf 值太小,导致其未能与样品点完全分开;③号展开剂出现明显拖尾,导致 SSPH II 斑点不清晰;①号展开剂 SSPH I、SSPH II 明显分开,虽有

表6 SSPHs 中 2 种化学成分 的加样回收率试验结果

Tab. 6 Results of SSPHs recovery test for two chemical composition

Component	$m(\text{Sample})/\mu\text{g}$	$m(\text{Original})/\mu\text{g}$	$m(\text{Added})/\mu\text{g}$	$m(\text{Measured})/\mu\text{g}$	Recovery/%	Average recovery/%	RSD/%
SSPH I	5 300	362. 416 9	397. 7	751. 848 3	97. 92	100. 80	1. 80
	5 100	348. 740 8	397. 7	749. 910 2	100. 87		
	5 200	355. 578 9	397. 7	759. 899 0	101. 66		
	5 200	355. 578 9	397. 7	765. 501 7	103. 07		
	5 300	362. 416 9	397. 7	766. 881 6	101. 70		
	5 400	369. 255 0	397. 7	765. 337 5	99. 59		
SSPH II	5 300	10. 700 0	18. 9	29. 878 8	101. 48	102. 42	2. 17
	5 100	10. 296 2	18. 9	28. 910 2	98. 49		
	5 200	10. 498 1	18. 9	29. 883 7	102. 57		
	5 200	10. 498 1	18. 9	30. 080 5	103. 61		
	5 300	10. 700 0	18. 9	30. 504 8	104. 79		
	5 400	10. 901 8	18. 9	30. 481 2	103. 59		

表7 SSPHs 中 SSPH I 和 SSPH II 的含量测定结果。mg · g⁻¹

Tab. 7 Content determination results of SSPH I and SSPH II form SSPHs. mg · g⁻¹

Sample NO.	SSPH I	SSPH II
S1	69. 05	4. 75
S2	85. 60	3. 82
S3	68. 51	2. 13
S4	10. 77	0. 19

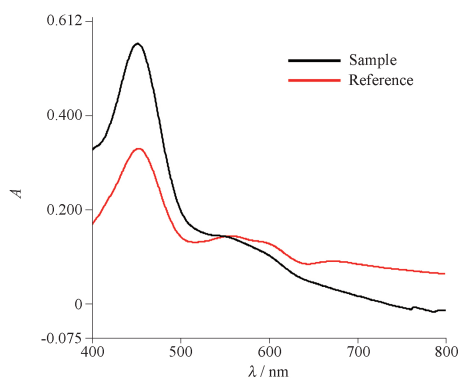


图15 SSPHs 供试品和对照品溶液吸收光谱

Fig. 15 Absorption spectra of SSPHs sample and reference substance

一些拖尾现象,但不影响 SSPH I 与 SSPH II 的鉴别,故采用正丁醇-乙酸乙酯-水 = 4: 1: 5(上层)作为展开溶剂。喷上显色剂后薄层色谱板加热超过 7 min 开始碳化,影响鉴别,加热时间短,供试品中 SSPH II 在可见光下斑点不清晰,但在 365 nm 紫外光下可观察到斑点,因此本实验薄层色谱板均在 365 nm 紫外光下检视。

4.3 UHPLC-MS 含量测定方法检测器和流动相的选择

SSPH I、SSPH II 属于甾体皂苷类,结构中仅

含有一个孤立双键,在紫外波长下属于末端吸收,专属性和灵敏度较低,因此紫外检测器不太适合于 SSPHs 成分的含量测定。本实验采用单重四级杆质谱仪,相比于紫外检测器对待测物质具有更高的选择性和灵敏度,与其它质谱检测器相比使用方便、成本低廉,故本研究使用质谱测定裂果薯皂苷中 SSPH I、SSPH II 含量。

预实验中,最初使用乙腈-水作为流动相,但峰形较差,难以满足含量测定的要求,考察了乙腈-0.1% 甲酸、乙腈-5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵、乙腈-0.1% 氨水流动相系统对色谱峰的影响,乙腈-0.1% 氨水流动相系统色谱峰峰形良好,保留时间稳定,无干扰峰,没有拖尾现象,能够达到定量要求,因此选择乙腈-0.1% 氨水作为流动相。皂苷类成分复杂,使用 HPLC 进行分析需要耗费较长时间,如重楼皂苷采用 HPLC 分析需要 40 min 以上的时间^[14]。SSPH I 与 SSPH II 极性接近,普通高效液相色谱条件难以有效分离两种成分,超高效液相色谱采用了更微小颗粒的固定相,超高压输液泵,因此可以采用更短的色谱柱,在检测速度、灵敏度和分离度上都有了明显的提升,10 min 即可完成 SSPHs 的成分分析,大大提高了分析效率。

5 结论

本研究中,确定最佳工艺:取质量浓度为 0.2 g · mL⁻¹ 的总皂苷粗提物水溶液以 72 mL · h⁻¹ 流速通过 AB-8 型大孔树脂,完全吸附后依次用 120 mL 的水和 144 mL 的体积分数 30% 乙醇洗脱,再用 96 mL 的体积分数 70% 乙醇洗脱,洗脱流速 72 mL · h⁻¹,收集体积分数 70% 乙醇洗脱液,减压干燥,即得 SSPHs。紫外可见分光光度法测定不同产地

SSPHs 含量, 计算得到不同产地 SSPHs 纯度为 57.30% ~ 77.02%。使用 Waters BEH C₁₈ 色谱柱, 乙腈-0.1% 氨水溶液为流动相, 10 min 内梯度洗脱, 色谱峰峰形良好, 系统适用性考察均符合要求。不同产地 SSPHs 中 SSPH I 含量为 10.77 ~ 85.60 mg · g⁻¹, SSPH II 含量为 0.19 ~ 4.75 mg · g⁻¹。本研究测定了 SSPHs 及 SSPHs 中 SSPH I、SSPH II 的含量, 并进行了比较分析, 为裂果薯药材质量评价提供了科学依据。

REFERENCES

- [1] Guangxi Zhuang Autonomous Region Food and Drug Administration. *Guangxi Zhuang Autonomous Region Quality Standards For Strong Medicines* (广西壮族自治区壮药质量标准) [M]. Vol 2. Nanning: Guangxi Science and Technology Press, 2011: 67-68.
- [2] QIU H S, SUN Y W, LUO S R, *et al.* Effects of saponins from *Schizocapsa plantaginea* Hance on proliferation, migration and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells and its toxicity to normal hepatocytes [J]. *Shandong Med J* (山东医药), 2017, 57 (15): 1-4.
- [3] LIAO Z H, CHEN Y Y, HUANG X Y, *et al.* Effects of total saponins of *Schizocapsa plantaginea* Hance on hepatic fibrosis in rats and its mechanism [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2019, 35(5): 624-629.
- [4] LUO S R, QIU H S, CHEN Y Y, *et al.* The characteristic spectra of saponins of *Schizocapsa plantaginea* Hance and the antitumor activity of effective components in the total saponins [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30(2): 294-298, 245.
- [5] LV M X, LIAO Z H, ZHOU H, *et al.* Effect of saponin monomer I of *Schizocapsa plantaginea* Hance on invasion and migration of hepatocellular carcinoma cell SMMC-7721 by regulating epithelial-mesenchymal transition through TGF-β1 [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2020, 36(3): 408-413.
- [6] SUN Y W, QIU H C, OU M C, *et al.* Saponins isolated from *Schizocapsa plantaginea* inhibit human hepatocellular carcinoma cell growth *in vivo* and *in vitro* via mitogen-activated protein kinase signaling [J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16(1): 29-40.
- [7] ZHOU J L, HUANG X Y, QIU H C, *et al.* SSPH I, a novel anti-cancer saponin, inhibits autophagy and induces apoptosis via ROS accumulation and ERK1/2 signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Oncotargets Ther*, 2020, 13: 5979-5991.
- [8] ZHOU J, LUO J, GAN R, *et al.* SSPH I, A novel anti-cancer saponin, inhibits EMT and invasion and migration of NSCLC by suppressing MAPK/ERK1/2 and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2020, 43 (3): 395-407.
- [9] HUANG D, DONG X, LI J Z, *et al.* Steroidal saponin SSPH I induces ferroptosis in HepG2 cells via regulating iron metabolism [J]. *Med Oncol*, 2023, 40(5): 132.
- [10] LIU G, WU Y, LIU Y C, *et al.* Study on extraction and purification of total saponins from *Periploca forrestii* Schltr. by D101 macroporous resin [J]. *Asia Pac Tradit Med* (亚太传统医药), 2021, 17(9): 30-33.
- [11] LI H L, YU X Y, MA C M, *et al.* Extraction and purification process of the active ingredient *Eurycoma longifolia* Jack [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2016, 51(14): 1169-1175.
- [12] XU Q, WANG P X, CHENG F, *et al.* Study on the enrichment technology of total flavonoids in *Elaeagnus Angustifolia* Flower by microporous adsorption resin [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2012, 47(9): 673-678.
- [13] LUO Y, LIANG X L, ZHAO G W, *et al.* Separation and purification of total saponins from Paris Polyphylla by four types of microporous resins [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2014, 36 (10): 2078-2083.
- [14] FANG J, CHENG W L, ZHOU J M, *et al.* Study on the content determination and accumulation law of saponins in Paris Polyphylla Smith Var. *Chinensis* (Franch) Hara [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2024, 41(2): 236-241.

(收稿日期: 2024-06-19)