·基础研究·

朝鲜白头翁的 HPLC 特征图谱研究

任乔森[1]，王海洋[1]，翟宏宇[1]，赵琳琳[1]，李秀芬[1*]，唐秋竹[1]，赵琪钟[2]
（1. 吉林省药品检验所，吉林　长春　130033；2. 普洱市食品药品检验检测中心，云南　普洱　665000）

［摘要］ **目的**：建立朝鲜白头翁的特征图谱，为科学有效评价和控制其质量提供可靠依据。**方法**：采用高效液相色谱法，Thermo Hypersil BDS C_{18} 色谱柱（4.6 × 250 mm，5 μm），以乙腈-水作为流动相进行梯度洗脱，流速 0.8 mL·min^{-1}，柱温 35 ℃，检测波长 201 nm。**结果**：初步建立了朝鲜白头翁的特征图谱，标定了 20 个共有峰，并指认出 2 个。**结论**：采用 HPLC 法建立朝鲜白头翁的特征图谱，操作简单，选择性高，分离效果好，可用于朝鲜白头翁及其混淆品的鉴别和质量控制。

［关键词］ 朝鲜白头翁；高效液相色谱；特征图谱；质量控制

Study on HPLC Characteristic Chromatogram of *Pulsatilla cernua*

REN Qiao-sen[1], WANG Hai-yang[1], ZHAI Hong-yu[1], ZHAO Lin-lin[1], LI Xiu-fen[1*], TANG Qiu-zhu[1], ZHAO Qi-zhong[2]
（1. *Jilin Institute for Drug Control*, *Changchun* 130033, *China*; 2. *Puer Institute for food and Drug Control*, *Puer* 665000, *China*）

［**Abstract**］ **Objective**: To establish HPLC characteristic chromatograms of *Pulsatilla cernua*, so as to provide a reliable method for scientific evaluation and effective quality control of medicinal material. **Methods**: The effective components were separated by HPLC with Thermo Hypersil BDS C_{18} (4.6 × 250 mm, 5 μm) in a gradient elution of acetonitrile and water as the mobile phase at the flow rate of 0.8 mL·min^{-1} and temperature of 35 ℃ and detection wavelength of 201 nm. **Results**: The specific chromatogram of *Pulsatilla cernua* was established and 20 common peaks were indicated and 2 peaks were indicated. **Conclusion**: The HPLC method was precise, stable and reproducible. These established methods are practical and suitable for the identify and quality control of *Pulsatilla cernua*.

［**Keywords**］ *Pulsatilla cernua*; HPLC; characteristic chromatograms; quality control
doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180112002

朝鲜白头翁为毛茛科植物 *Pulsatilla cernua*（Thunb.）Bercht et Opiz. 的干燥根[1]，分布于中国辽宁南部、吉林东部，在朝鲜、日本、俄罗斯远东地区也有分布。多生于山坡草地、灌丛间。其性寒，味苦，归肝、胃经，具泻火解毒、止痛、利尿消肿、凉血等功效[2]。是朝鲜民族的民间用药，其用药历史可追溯到 14 世纪，在朝鲜药典（1982 版）和韩国药典（2016 版）均有收载，仅有常规检查项和重金属等安全指标。朝鲜白头翁在朝鲜族一直做白头翁药用，主治风火牙痛、四肢关节疼痛、秃疮、浮肿、细菌性痢疾、阿米巴痢疾之发热、腹痛、下痢脓血、里急后重等证，近年来的研究表明，朝鲜白头翁不仅具有以上传统的功效，而且还具有抑菌抗炎、抗微生物、抗生物酶、抗肿瘤等作用[3-6]，还有文献报道朝鲜白头翁所含的某些活性成分对于阿尔茨海默症也具有治疗作用[7]。白头翁属植物化学成分主要为五环三萜皂苷类，朝鲜白头翁以常春藤皂苷元型和齐墩果酸型皂苷为主，而白头翁以羽扇豆烷型皂苷为主[8-9]。

特征图谱是一种综合的、可量化的鉴别模式，能有效地检测和控制中药产品的真实性、质量的一致性及稳定性[10]。本文采用高效液相色谱（HPLC）法建立不同产地朝鲜白头翁的特征图谱，能够较全面地反映出其整体特征，也为进一步控制朝鲜白头翁药材的质量提供了一定的实验依据。

* ［通信作者］ 李秀芬，主任药师；研究方向：药品质量标准研究；Tel：（0431）892831011，E-mail：lixiufen-2008@163.com

1　仪器与试药

1.1 主要仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪，美国 Agilent；BT-125D 型分析天平，德国 Sartorius；DK-98 Ⅱ A 电热恒温水浴锅，天津市泰斯特仪器有限公司；6202 高速粉碎机，北京银捷玉诚机械设备有限公司。

1.2 试剂与材料

白头翁皂苷 H（批号：Must-16032808，含量 98.00%）、常春藤皂苷 C（批号：Must-16032507，含量 98.53%）等对照品，购自成都曼斯特生物科技有限公司；甲醇、乙腈，色谱纯，美国 Fisher；其他试剂均为分析纯，水为超纯水。

实验中所用的 18 批朝鲜白头翁均由朴明杰采集，由吉林省药品检验所中药专家鉴定为基原正确药材，烘干，备用。朝鲜白头翁药材样本的采集信息分别见表 1。

表 1　朝鲜白头翁药材采集信息表

编号	采集日期	产地	植物生长期
S1	2015.5.7	汪清县大兴沟镇	花期
S2	2015.5.31	通化县东昌区佐安村	花、果期
S3	2015.6.2	延吉市依兰镇台岩村	花、果期
S4	2015.6.18	和龙县土山镇庙岭村	果期
S5	2015.6.25	珲春县哈达门乡河北村	无花、果
S6	2015.7.1	敦化县沙河桥乡一号山村	无花、果
S7	2015.7.2	安图县月镇丰产村	无花、果
S8	2015.7.3	龙井县三合镇北兴村	无花、果
S9	2016.5.7	柳河县柳河镇	花期
S10	2016.5.7	东丰县三合乡	花期
S11	2016.5.8	长春市莲花山	花期
S12	2016.5.13	通化县大泉源镇	花期
S13	2016.5.13	通化县都岭村	花期
S14	2016.5.17	二道江区鸭园镇	花期
S15	2016.5.17	通化县东来乡	花期
S16	2016.5.20	白山市浑江区六道江镇	花期
S17	2016.5.28	集安县清河镇	花期
S18	2016.5.28	通化县西江镇	花期

2　方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent 1200 高效液相色谱仪；Thermo Hypersil BDS C_{18}（4.6×250 mm，5 μm）色谱柱；以乙腈-水作为流动相进行梯度洗脱，梯度洗脱时间及比例见下表；流速 0.8 mL·min^{-1}，柱温 35 ℃，检测波长 201 nm。

表 2　梯度洗脱时间表

时间/min	乙腈（%）	水（%）
0～20	2→20	98→80
20～35	20→29	80→71
35～50	29→40	71→60
50～100	40→90	60→10

2.2 对照品溶液的制备

分别取白头翁皂苷 H、常春藤皂苷 C 对照品适量，加 50% 乙醇制成每 1 mL 各含 0.1 mg 的混合溶液，作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取适量朝鲜白头翁药材，粉碎，过 3 号筛，精密称定，称取 1 g 于具塞锥形瓶中，向其加入 50% 乙醇溶液 50 mL，称定重量，加热回流 1 h，放冷，再称定重量，用 50% 乙醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验　取同一份“**2.3**”项下供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件，连续进样 6 次，记录各共有峰的保留时间和峰面积，计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积。结果显示，各共有峰的相对保留时间的 RSD 在 0.1%～0.3% 之间；相对峰面积比值的 RSD 在 0.3%～0.6% 之间，结果表明：仪器的精密度良好。

2.4.2 稳定性试验　取“2.3”项下的供试品溶液分别于制备后 0、4、8、12、18、24、48 h 进样，记录各共有峰的保留时间和峰面积，计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积。结果显示，各共有峰的相对保留时间的 RSD 在 0.2%～0.3% 之间；相对峰面积比值的 RSD 在 0.3%～0.9% 之间。结果表明，供试品溶液 48 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验　取同一批样品分别制备 6 份供试品溶液，照“**2.1**”项下方法测定，记录各共有峰的保留时间和峰面积，计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积。结果显示，各共有峰的相对保留时间的 RSD 在 0.2%～0.3% 之间；相对峰面积比值的

RSD 在 0.8% ~1.6% 之间，结果表明：此方法的重复性良好。

2.4.4 耐用性试验

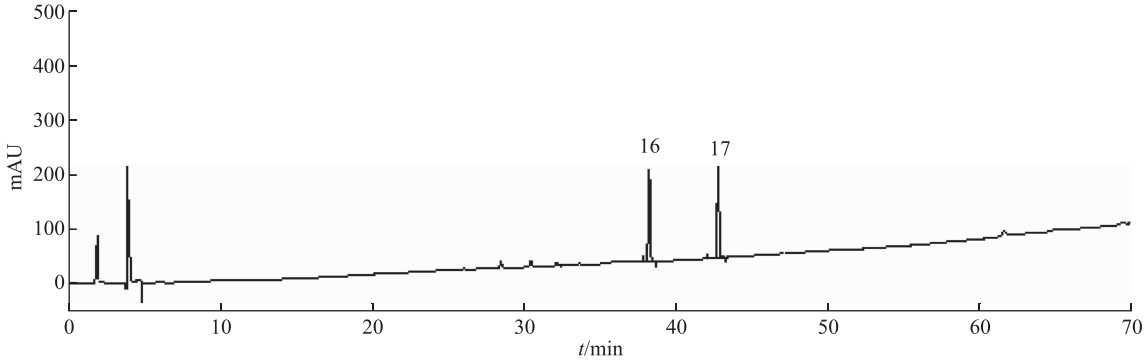
2.4.4.1 不同色谱柱对测定的影响　分别取“**2.3**”项下的供试品溶液，选用 Apollo C_{18}（4.6 ×250 mm，5 μm）色谱柱、Diamonsil C_{18}（4.6 × 250 mm，5 μm）、Venusil XDP C_{18}（4.6 ×250 mm，5 μm）3 根不同品牌的色谱柱，按“**2.1**”项下色谱条件进样，均能达到系统适用性要求。

2.4.4.2 不同仪器对测定的影响　实验选择 Agilent 1260 高效液相色谱仪、岛津 LC-20A 液相色谱仪和 Waters E2695 液相色谱仪，取“**2.3**”项下的供试品溶液分别进样，进行比对分析，结果三种仪器所得图谱均符合检验要求。表明，不同仪器对供试品色谱峰的影响不大。

2.5 特征图谱的建立及检验结果的判断

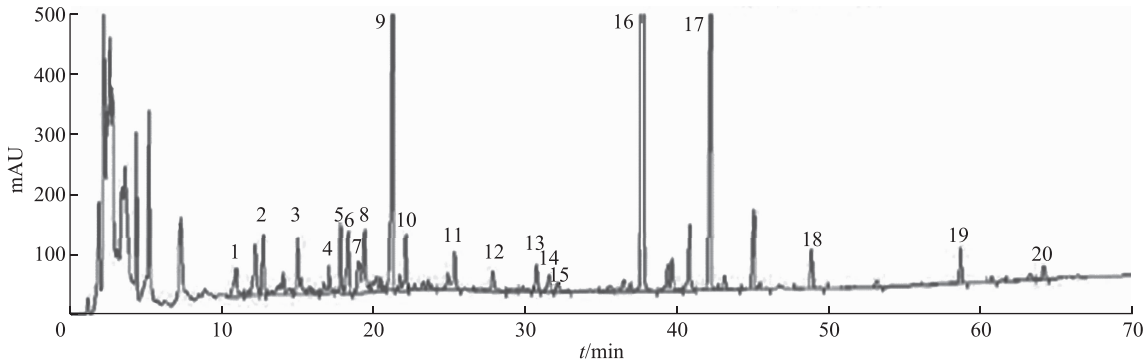
2.5.1 共有峰及参照峰的选择　取上述 18 批次样品，按照“**2.3**”项下方法制备供试品溶液，按“**2.1**”项下条件进样，记录色谱图。混合对照品色谱图见图 1，供试品色谱图见图 2。通过对 18 批次朝鲜白头翁样品进行分析，确定其共有特征峰有 20 个，其中有 2 个色谱峰分别与相应的参照物峰保留时间相同，选取含量最高的常春藤皂苷 C 峰（16 号峰）为 S 峰，分别计算各特征峰的相对保留时间，结果见表 3。

2.5.2 特征图谱结果分析　经数据统计，朝鲜白头翁特征图谱的共有特征峰应为 20 个。将分析得到的 18 个样品的色谱图分别导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》，计算相似度。经统计，在花期和果期的样品相似度均较高，在 95% 以上；而于 2015 年 7 月份在安图和龙井采的样品，无花、无果的样品，相似度较低，不到 85%。由此可知，在花期和果期，朝鲜白头翁中三萜皂苷类成分是稳定的，非花、果期化学成分复杂，质量难以保证，侧面证明了采收的最佳时间应为果未落之前。其 18 批供试品的叠加图谱见图 3。



注：16. 常春藤皂苷 C；17. 白头翁皂苷 H

图 1　对照品色谱图



注：16. 常春藤皂苷 C；17. 白头翁皂苷 H

图 2　朝鲜白头翁色谱图

表 3　18 批朝鲜白头翁样品共有峰的相对保留时间

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18
1	0. 284	0. 284	0. 283	0. 285	0. 284	0. 283	0. 283	0. 284	0. 284	0. 285	0. 283	0. 286	0. 285	0. 282	0. 284	0. 283	0. 285	0. 284
2	0. 331	0. 333	0. 332	0. 331	0. 332	0. 330	0. 334	0. 334	0. 332	0. 331	0. 330	0. 330	0. 331	0. 330	0. 331	0. 330	0. 332	0. 330
3	0. 395	0. 395	0. 394	0. 395	0. 395	0. 396	0. 396	0. 396	0. 395	0. 394	0. 396	0. 394	0. 394	0. 395	0. 395	0. 394	0. 394	0. 395
4	0. 449	0. 448	0. 448	0. 449	0. 450	0. 450	0. 449	0. 448	0. 449	0. 450	0. 449	0. 448	0. 450	0. 449	0. 448	0. 449	0. 448	0. 449
5	0. 469	0. 469	0. 468	0. 468	0. 470	0. 470	0. 469	0. 469	0. 468	0. 470	0. 470	0. 469	0. 468	0. 468	0. 470	0. 469	0. 469	0. 470
6	0. 481	0. 480	0. 481	0. 480	0. 481	0. 479	0. 479	0. 481	0. 479	0. 480	0. 480	0. 480	0. 479	0. 479	0. 478	0. 478	0. 480	0. 481
7	0. 502	0. 502	0. 501	0. 501	0. 502	0. 503	0. 504	0. 503	0. 500	0. 501	0. 502	0. 501	0. 503	0. 502	0. 502	0. 503	0. 501	0. 501
8	0. 510	0. 509	0. 509	0. 511	0. 512	0. 511	0. 510	0. 510	0. 510	0. 511	0. 509	0. 509	0. 508	0. 509	0. 510	0. 511	0. 511	0. 510
9	0. 558	0. 558	0. 559	0. 557	0. 556	0. 558	0. 557	0. 556	0. 557	0. 559	0. 558	0. 558	0. 557	0. 557	0. 556	0. 555	0. 557	0. 558
10	0. 582	0. 580	0. 580	0. 581	0. 581	0. 582	0. 580	0. 581	0. 583	0. 583	0. 582	0. 583	0. 582	0. 581	0. 582	0. 582	0. 582	0. 583
11	0. 667	0. 666	0. 666	0. 667	0. 668	0. 667	0. 664	0. 665	0. 666	0. 664	0. 667	0. 667	0. 665	0. 664	0. 664	0. 667	0. 667	0. 666
12	0. 733	0. 730	0. 731	0. 732	0. 731	0. 730	0. 733	0. 734	0. 734	0. 735	0. 7331	0. 731	0. 732	0. 733	0. 735	0. 731	0. 732	0. 732
13	0. 808	0. 805	0. 806	0. 808	0. 809	0. 809	0. 808	0. 809	0. 809	0. 810	0. 806	0. 807	0. 807	0. 809	0. 809	0. 810	0. 810	0. 808
14	0. 829	0. 829	0. 827	0. 827	0. 831	0. 831	0. 829	0. 828	0. 830	0. 831	0. 831	0. 829	0. 829	0. 828	0. 828	0. 830	0. 830	0. 828
15	0. 845	0. 845	0. 847	0. 846	0. 845	0. 844	0. 844	0. 844	0. 845	0. 845	0. 846	0. 845	0. 842	0. 847	0. 846	0. 845	0. 847	0. 845
16	1. 000	1. 000	1. 000	1. 000	1. 000	1. 000	1. 000	1. 000	1. 000	1. 000	1. 000	1. 000	1. 000	1. 000	1. 000	1. 000	1. 000	1. 000
17	1. 119	1. 118	1. 118	1. 119	1. 119	1. 120	1. 120	1. 120	1. 121	1. 121	1. 117	1. 118	1. 119	1. 119	1. 117	1. 120	1. 121	1. 120
18	1. 295	1. 295	1. 293	1. 293	1. 296	1. 295	1. 296	1. 295	1. 295	1. 296	1. 297	1. 293	1. 293	1. 294	1. 295	1. 295	1. 294	1. 296
19	1. 549	1. 550	1. 550	1. 551	1. 551	1. 549	1. 548	1. 548	1. 548	1. 549	1. 551	1. 550	1. 551	1. 549	1. 549	1. 550	1. 551	1. 549
20	1. 692	1. 690	1. 690	1. 689	1. 687	1. 695	1. 695	1. 692	1. 693	1. 693	1. 687	1. 688	1. 688	1. 689	1. 691	1. 691	1. 692	1. 693

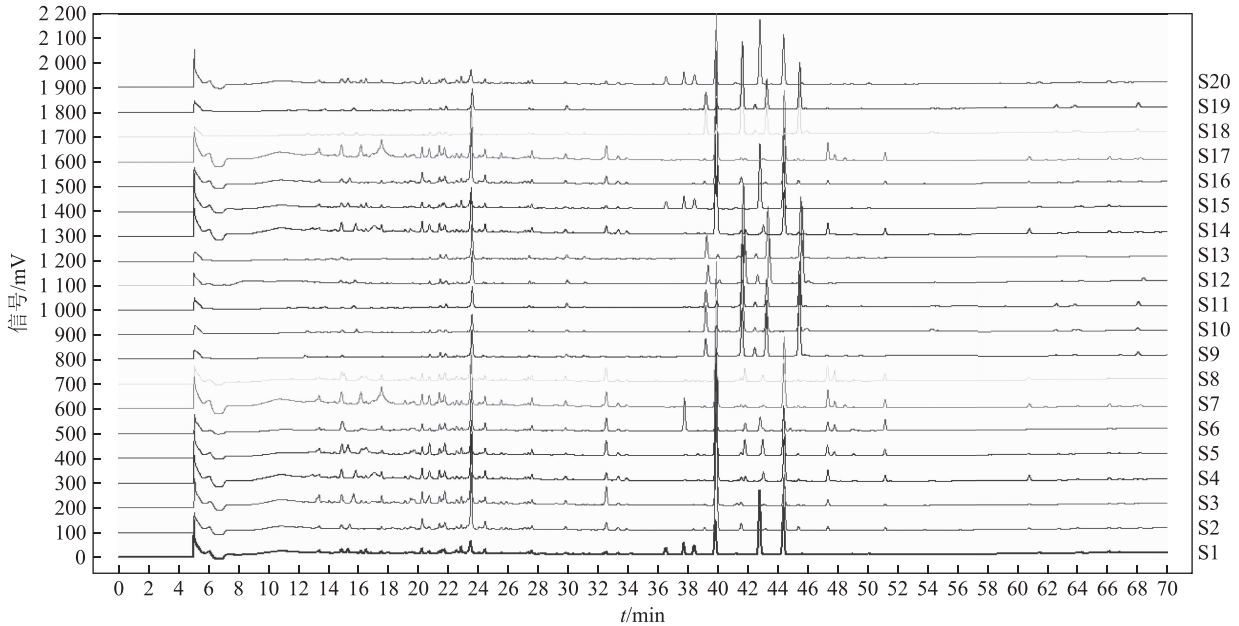


图 3　18 批朝鲜白头翁色谱图共有模式

3　讨论

3. 1 提取溶剂和方法的考察

本实验考察 50% 乙醇、80% 乙醇、乙醇和甲醇等提取溶剂对朝鲜白头翁进行提取，结果显示，50% 乙醇和甲醇提取所得到的色谱峰信息较多，而且，50% 乙醇提取所得到的色谱峰较甲醇提取所得到的色谱峰分离度好，所以，最终选取 50% 乙醇作为朝鲜白头翁的提取溶剂。

实验中也考察了回流提取、超声提取、索氏提

取等提取方法，结果显示，索氏提取和回流提取所得色谱峰的峰面积相差不大，超声提取含量较低，且相差较大。因此，综合考虑，最终选取回流提取作为提取方法。

3.2 检测波长的选择

在文献报道中，白头翁属三萜皂苷研究资料中的检测波长均为在 201 ~ 210 nm 之间[11-14]。为确定朝鲜白头翁中三萜皂苷类的最佳检测波长，按“**2.3**”项下确定的实验方法，选用二极管阵列检测器在201 ~ 210 nm 进行扫描。实验结果，在 201 nm 处朝鲜白头翁特征图谱显示的色谱峰最多，色谱峰的峰高最高，确定为最佳检测波长。

3.3 流动相的选择

在中国药典白头翁的含量测定项中，提取三萜皂苷类成分的溶剂和流动相均采用了甲醇[15]，而甲醇在 201 nm 有末端吸收，必然会对特征图谱的色谱行为有干扰。经试验，流动相由“甲醇-水”更改为“乙腈-水”，得到的色谱峰信息最多，且各成分分离情况相对较好，故最终选定乙腈-水系统作为流动相。

4　小结

中药特征图谱是一种多指标的质量控制模式，虽然不能代替含量测定，但是能够较全面的反映出药材的整体特征。HPLC 法由于具有分离效能高、分析速度快等优点，近年来已广泛地应用于中药的定量分析中，在中药的定性鉴别中也发挥着很好的作用。本文采用高效液相色谱法对不同采收期朝鲜白头翁中所含的三萜皂苷类成分进行整体分析，不仅能够反映出其所含单体皂苷的种类多少或有无，而且对于朝鲜白头翁的鉴别、质量标准的建立、资源开发及其临床正确用药提供了一定的实验依据，具有重要意义。

参考文献

[1] Flora of China 编委会. Flora of China:第 6 卷[M]. 北京:科学出版社密苏里植物出版社联合出版. 2001:329-333.

[2] 徐志远,郭彩云. 长白山植物药志[M]. 长春:吉林人民出版社. 1982,399.

[3] 张秋华,王丹,王维宁,等. 不同品种白头翁抑菌、抗炎、抗腹泻作用和对兔离体十二指肠运动的影响[J]. 中国中医药科技,2011,18(6):496-498.

[4] Lee H S. Tyrosinase inhibitors of Pulsatilla cernua root-derived materials [J]. Agriculture Food Chemistry,2002,50(6):1400-1403.

[5] Kim J M,Kim K S,Lee Y W,等. 朝鲜白头翁、人参和甘草的复合水提物的抗血管生成作用[J]. 中西医结合学报,2011,9(9):1005-1013.

[6] 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.

[7] Han C K,Park Y H,Jin D Q,*et al*. SK-PC-B70M from Pulsatilla koreana improves scopolamine-induced impairments of memory consolidation and spatial working memory [J]. *Brain Research*,2007,1184(12):254.

[8] 张庆文,叶文才,车镇涛,等. 朝鲜白头翁的三萜皂苷成分研究[J]. 药学学报,2000,35(10):756-759.

[9] 付云明,陈虹,刘岱琳,等. 朝鲜白头翁的化学成分研究[J]. 中草药,2008,39(1):26-29.

[10] 王晴,王英姿,李友林,等. 红鹤方制剂 HPLC 指纹图谱研究[J]. 北京中医药大学学报,2016,39(1):40-45.

[11] 唐博雅,杨义芳,黄春跃,等. 白头翁及其疑似品的 HPLC 指纹图谱法鉴别[J]. 中国医药工业杂志,2013,44(3):281-285.

[12] 王建舫. 白头翁水提液中白头翁皂苷 B4 含量检测方法的建立[J]. 农业科学与技术,2015,16(8):1600-1602.

[13] 李海燕,李宏博,郝宁,等. 白头翁属药用植物的 HPLC 的指纹特征与化学分类研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(11):1478-1482.

[14] 吴凤英,游本刚,唐丽华,等. 白头翁药材中白头翁皂苷 B4 的测定[J]. 中成药,2011,33(6):1021-1024.

[15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:104.

（收稿日期　2018-01-12）