

# 半制备型高效液相色谱联用蒸发光散射检测器 分离制备地榆皂苷 I 和 II 单体

李程婕<sup>1</sup>, 徐雪萍<sup>2</sup>, 陈国华<sup>2</sup>, 王彦<sup>1\*</sup>, 闫超<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>上海交通大学药学院, 上海 200240; <sup>2</sup>上海通微分析技术有限公司, 上海 201203

**摘要:**地榆经乙醇溶液提取、碱沉、石油醚纯化后,以半制备型高效液相色谱联用蒸发光散射检测器分离得到高纯度的地榆皂苷 I 和 II。实验先以 Globalsil<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 分析柱模拟,计算获得半制备色谱柱 Globalsil<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 柱 (10 mm × 250 mm, 5 μm) 的初始色谱条件。将该条件应用在半制备型 HPLC 上,调整优化,最终的最佳制备条件为甲醇 (A)-0.1% 甲酸溶液 (B) 流动相梯度洗脱、流速 4 mL/min、进样量 0.75 mL。经 HPLC-QQQ-MS 鉴定,制备产物确为地榆皂苷 I 和 II;经分析型 HPLC-ELSD 检测,产物纯度达到 98%;产率分别为 88.4%、90.2%。该方法具有简单易行、经济快速、产品纯度高、易于放大、重复性好等优点,适用于地榆皂苷 I 和 II 标准品的分离制备。

**关键词:**地榆;地榆皂苷;半制备液相色谱;蒸发光散射检测器

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)Suppl-0144-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.S.021

## Preparation of ziyuglycosides I and II from *Sanguisorba officinalis* L. via SP-HPLC-ELSD

LI Cheng-jie<sup>1</sup>, XU Xue-ping<sup>2</sup>, CHEN Guo-hua<sup>2</sup>, WANG Yan<sup>1\*</sup>, YAN Chao<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China;

<sup>2</sup>Unimicro (Shanghai) Technologies Co., Ltd., Shanghai 201203, China

**Abstract:** A method for the preparation of pure ziyuglycoside I and II from the crude extracts of the roots of *Sanguisorba officinalis* L. has been developed using semi-preparative high performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector (SP-HPLC-ELSD). Ziyuglycoside I and II were extracted from the raw material with 80% ethanol solution, then purified with precipitation method and petroleum ether. Since the semi-preparative HPLC consumes large quantities of solvents and samples, analytical HPLC was first used to investigate the effects of the mobile phase composition, gradient elution conditions and injection volume on the separation efficiency of ziyuglycoside I and II. Then the flow rate and injection volume were scaled up to semi-preparative HPLC according to the magnification formula with the same gradient elution conditions. For a better separation, the flow rate was reduced from 4.7 to 4 mL/min. The final optimal chromatographic conditions were as follows: mobile phase: a mixture of methanol (A) and 0.1% formic acid in water (B) for gradient elution; flow rate: 4 mL/min; and injection volume: 0.75 mL; the isolation and preparation of the two major monomers was achieved within 45 min. The two compounds were identified by HPLC-QQQ-MS as ziyuglycoside I and II, their purity was over 98%, determined by HPLC-ELSD, and their yields were 88.4% and 90.2%, respectively. The preparative method was simple, effective, and economical and could yield to products with high purity, therefore, it is suitable for the preparation of ziyuglycoside I and II standards on a laboratory scale. For industrial production, further scaling up with the magnification formula to a preparative method could be quickly established using a preparative column with larger inner diameter.

**Key words:** *Sanguisorba officinalis* L.; ziyuglycosides; semi-preparative high performance liquid chromatography (SP-HPLC); evaporative light scattering detector (ELSD)

收稿日期:2020-02-13 接受日期:2020-04-15

基金项目:国家自然科学基金(21874088);国家自然科学基金(81874307);上海市科委“科技创新行动计划”(17142201000);上海市科委“科技创新行动计划”(18142200700);上海市科委“科技创新行动计划”(19142203100);上海市标准化推进专项(17DZ2201500)

\*通信作者 Tel:86-21-34205673; E-mail: chaoyan@sjtu.edu.cn, wangyan11@sjtu.edu.cn

地榆 (*Sanguisorba officinalis* L.) 是蔷薇科植物地榆或长叶地榆的干燥根,是一种常用药材,被广泛应用于各种制剂中,如中药地榆制剂可治疗包括溃疡性结肠炎在内的多种炎症,地榆烧烫伤药膏可治愈Ⅲ度烧伤,地榆升白片可以用于白细胞减少症<sup>[1]</sup>。地榆中的主要成分有鞣质、黄酮和皂苷,地榆皂苷在地榆根部的含量约为 2.4% ~ 4.0%<sup>[2]</sup>,其中地榆皂苷 I、II 为主要成分。近年来,多项现代药

理学研究表明,地榆皂苷 I、II 具有抗衰老<sup>[3]</sup>、止血<sup>[4]</sup>、上调白细胞<sup>[5]</sup>、保护骨髓<sup>[6,7]</sup>、抗炎<sup>[8]</sup>、抗癌<sup>[9-11]</sup> 等重要作用。地榆皂苷 I (1)、II (2) 具有重要的药用价值(其结构见图 1),多项研究将其添加入药物组合中或制备成药剂<sup>[6,12,13]</sup>,因此研究开发出简单快速地制备高纯度地榆皂苷 I 和 II 的方法具有重要意义。

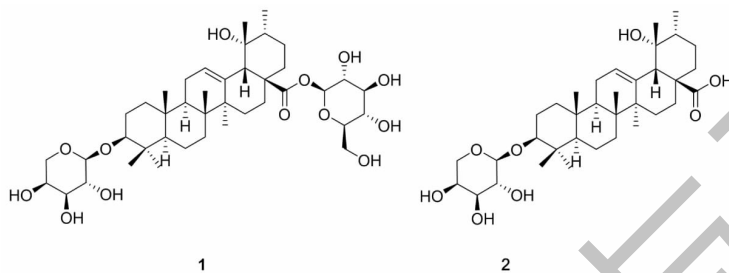


图 1 地榆皂苷 I 和 II 的化学式

Fig. 1 Structure of ziyuglycoside I and II

地榆皂苷和鞣质理化性质相似,不容易精确分离,有研究人员利用柱色谱法<sup>[14,15]</sup>、碱沉法<sup>[16]</sup>获得了地榆总皂苷。在单体的制备中, Ji 等<sup>[17]</sup>用大孔树脂吸附、碱沉法、重结晶等一系列操作获得了地榆皂苷 I; Liu 等<sup>[18]</sup>用高速逆流色谱分离出了地榆皂苷 I; Zheng 等<sup>[19]</sup>通过多次结晶、有机溶剂萃取获得了地榆皂苷 II。这些方法均存在步骤复杂、耗时较长且耗费溶剂的问题。

半制备型高效液相色谱法 (semi-preparative high performance liquid chromatography, SP-HPLC) 是制备天然产物的重要手段,具有简单易行、经济快速、产品纯度高、易于放大、重复性好等优点<sup>[20]</sup>; ELSD 是一种通用型检测器,具有对温度变化不敏感,基线稳定等优点。地榆皂苷是一类无紫外/弱紫外吸收类中药成分,适用 ELSD 检测。本文利用节流阀将其与收集器并联,实现了同时检测和收集,有效解决了 ELSD 是消耗性仪器的问题;并采用半制备液相色谱分离制备地榆中的地榆皂苷,方法简便易行,产物纯度高,可作为高纯度地榆皂苷 I 和 II 的制备方法。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与材料

KQ5200DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); EasySep-1050 半制备高效液相色谱、UNIEX-7700 蒸发光散射检测器、自动收集器

(上海通微分析技术有限公司); Globalsil<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 25 cm, 5 μm; 10 mm × 25 cm, 5 μm) (上海通微分析技术有限公司); QFN-DGJ-10T 真空冷冻干燥机 (上海乔枫实业有限公司); Agilent 6495 HPLC-QQQ-MS (美国 Agilent 公司)。

95% 乙醇、石油醚、氢氧化钠、无水乙醇、甲酸 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 甲醇 (色谱纯, 上海 Adamas 公司)、乙酸铵 (色谱纯, 上海易恩化学技术有限公司); 乙腈 (质谱纯, 上海柯灵斯公司)。

地榆 (安国市旭芳中药材经营有限公司), 实验前将其磨成粉末, 备用。地榆皂苷 I 标准品、地榆皂苷 II (纯度: HPLC ≥ 98%, 四川省维克奇生物科技有限公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 半制备型 HPLC-ELSD 的参数测试

##### 1.2.1.1 考察仪器收集和检测的比例

完全打开节流阀, 排出收集管路中的气泡, 打开高压输液泵, 让流动相以 1 mL/min 的速度流出, 测量一定时间内收集管路中的液体体积。测量 3 次。

##### 1.2.1.2 考察收集较检测的延时时间

计算收集管路和检测管路的内体积, 延时时间 = 管路体积差 / 流速。

##### 1.2.2 地榆皂苷的提取和纯化

地榆以 1:10 (g/mL) 的料液比加入 80% 乙醇,

超声(频率 40 kHz、功率 200 W)提取 20 min,提取 3 次。合并提取液,加入 NaOH 溶液调至 pH 约为 12,静置 24 h 待鞣质缩合沉淀。真空浓缩至提取液中乙醇比例约为 20%,加入 NaOH 溶液调至 pH 约为 13,静置 24 h 待地榆皂苷析出,过滤后用石油醚除酯,再次过滤,烘干得地榆总皂苷样品。用分析型 HPLC-ELSD 检测,测得样品中地榆皂苷 I 的含量为 77.0%,地榆皂苷 II 的含量为 6.1%。用乙醇溶解样品,配置成 40 mg/mL 的乙醇溶液。经溶解度测定,该浓度接近饱和和溶解度。

表 1 分析型 HPLC 梯度程序优化

Table 1 Optimization of mobile phase gradient elution conditions in analytical HPLC

序号 No.	流动相梯度洗脱条件 Mobile phase gradient elution conditions
1	0~180 min;60% A
2	0~30 min;63% A;30~31 min;63%→90% A;31~60 min;90% A
3	0~25 min;63% A;25~26 min;63%→93% A;26~60 min;93% A
4	0~30 min;61% A;30~32 min;61%→95% A;32~60 min;95% A

### 1.2.3.3 进样量优化

控制梯度程序为程序 4,考察进样量 30、40、50、60  $\mu\text{L}$  对地榆皂苷分离的影响。

### 1.2.4 制备高效液相色谱对地榆皂苷 I 和 II 的分离制备

采用 Globalsil<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 半制备色谱柱(10 mm  $\times$  25 cm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:甲醇(A)-0.1%甲酸(B);检测器:ELSD;载气流速:2.5 L/min;蒸发温度:80  $^{\circ}\text{C}$ 。

#### 1.2.4.1 分析型 HPLC 的条件放大

依据制备色谱放大公式,半制备柱的分离条件为:梯度程序 4,流速 4.7 mL/min,进样量 235  $\mu\text{L}$ 。

#### 1.2.4.2 流速的调整

由于出峰时间提前,影响分离度,将原流速 4.7 mL/min 调至 4 mL/min,使出峰时间与分析柱相近。

#### 1.2.4.3 进样量的优化

控制梯度程序为程序 4,流速为 4 mL/min,增加进样量,考察进样量 0.25、0.5、0.75、1.0、1.25 mL 对地榆皂苷分离的影响。

### 1.2.5 地榆皂苷制备产物的检测与鉴定

#### 1.2.5.1 使用分析型 HPLC-ELSD 检测纯度

采用 Globalsil<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 分析型色谱柱(4.6 mm  $\times$  25 cm, 5  $\mu\text{m}$ );检测器:ELSD;载气流速:2.5 L/min;蒸发温度:80  $^{\circ}\text{C}$ 。

### 1.2.3 地榆皂苷提取液的分析型 HPLC 的分离条件优化

#### 1.2.3.1 色谱条件

采用 Globalsil<sup>®</sup> C18 分析型色谱柱(4.6 mm  $\times$  25 cm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:甲醇(A)-0.1%甲酸(B);流速:1 mL/min;检测器:ELSD;载气流速:2.5 L/min;蒸发温度:80  $^{\circ}\text{C}$ 。

#### 1.2.3.2 梯度程序优化

控制进样量为 20  $\mu\text{L}$ ,考察梯度程序 1、2、3、4(见表 1)对地榆皂苷分离的影响。

分析地榆皂苷 I 时,流动相:甲醇-0.1%甲酸(62:38, V/V);流速:1 mL/min。

分析地榆皂苷 II 时,流动相:甲醇-0.1%甲酸(67:33, V/V);流速:1 mL/min。

#### 1.2.5.2 使用 HPLC-QQQ-MS 鉴定产物

将收集液适当浓缩,Infusion 模式,进样 10  $\mu\text{L}$ 。流动相:乙腈:10 mM 乙酸铵溶液(50:50, V/V),流速:0.25 mL/min;

MS 条件:电喷雾电离离子源,扫描质量范围 500~800  $m/z$ ,负离子模式。

## 2 结果与讨论

### 2.1 半制备型 HPLC-ELSD 平台的搭建及参数测试

ELSD 在地榆皂苷这类无/弱紫外吸收类中药成分的检测中具有重要的应用价值,但是由于 ELSD 是一种消耗性检测器,样品经检测后无法收集。因此,本研究利用一个节流阀将 ELSD 和自动收集器并联,搭建了半制备型 HPLC-ELSD 平台(如图 2 所示),实现了同步检测和收集,方法简单方便,为目前中药有效成分制备提供了一个新的方法参考。

参数测试结果表明,当节流阀完全打开时,有 92.5% 的馏分被收集;通过调节节流阀,收集比例可以继续提高。由于仪器中收集管路和检测管路的长度和内径差别较大,因此馏分到达检测器和收集装

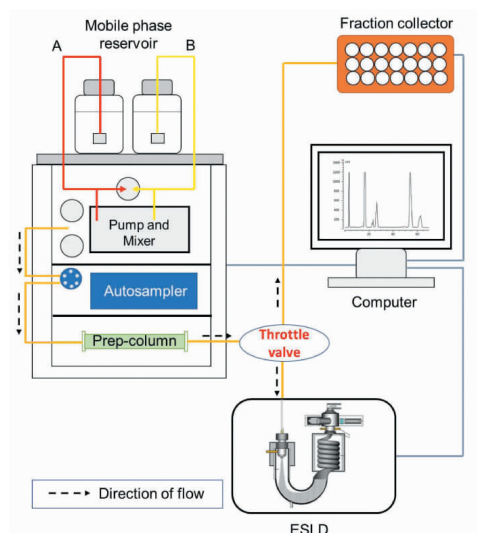


图 2 半制备型 HPLC-ELSD 平台示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the SP-HPLC-ELSD system

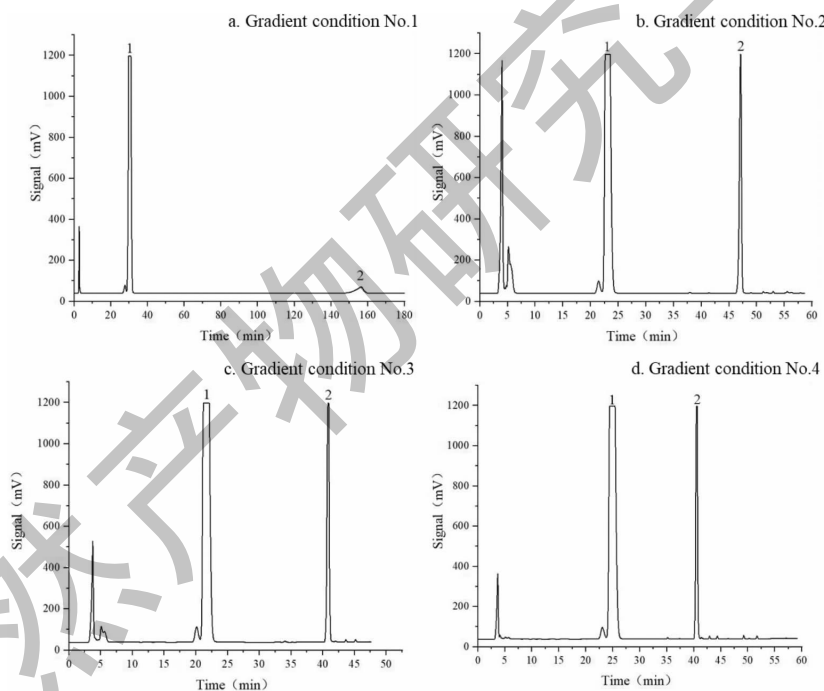


图 3 不同梯度条件下地榆皂苷 I 和 II 的分析色谱图

Fig. 3 Analytical HPLC chromatogram of ziyuglycoside I and II in different mobile phase gradient elution conditions

注:1. 地榆皂苷 I ;2. 地榆皂苷 II ,下同。Note:1. Ziyuglycoside I ;2. Ziyuglycoside II ,the same as below.

置的时间不同,在制备时需要考虑延时收集的因素。通过计算得出,本平台的管路内体积差为 0.39 mL;使用半制备柱制备时,流速通常为 3 ~ 5 mL/min,因此延迟收集的时间约 5 ~ 8 s。

制备型高效液相色谱的效能取决于分离度、分离速度和进样量。由于半制备型色谱的流速和进样

量较大,在分离条件没有探索清楚的情况下使用半制备柱,对于样品和流动相都是极大的浪费。因此本实验先在分析型 HPLC 上考察最佳分离条件和进样量,再将分离条件和进样量放大到半制备型 HPLC 上,最终实现半制备型 HPLC 上分离条件、流速和进样量的优化。为了保证放大实验的有效性,

本实验选用同系列的分析柱和半制备柱,填料颗粒直径均为 5  $\mu\text{m}$ 。

## 2.2 分析型 HPLC 的梯度程序和进样量优化

首先在分析型 HPLC 上考察地榆皂苷的梯度程序和进样量。如图 3 所示,当实验采用梯度程序 1 时,从图中可以确认样品的主要成分为地榆皂苷 I 和地榆皂苷 II,杂质极少,地榆皂苷 I 前有一杂质峰,主要成分峰和杂质有很少量的重叠,但是洗脱时间过长。以缩短分离时间和优化分离度为目的,最终确定梯度程序 4 是最优的梯度程序。与梯度程序 2 和 3 相比,在梯度程序 4 时,地榆皂苷 I 的出峰时间延迟,当进样量较大时,不易与前面的杂质峰重

叠,且整个分析过程控制在 40 min 左右。

确定梯度程序为程序 4 之后,对进样量进行考察。进样量是影响制备效能的重要因素,在不影响分离度的情况下,单次进样量越高越好。为了准确定位地榆皂苷提取液在半制备型 HPLC 上的进样量范围,先在分析柱上进行考察进样量。实验分别考察了进样量为 30、40、50、60  $\mu\text{L}$  时对地榆皂苷分离的影响。从图 4 中可知,随着进样量的增加,地榆皂苷 I 和前面的杂质峰的分度减小,当进样量为 60  $\mu\text{L}$  时,色谱峰 1 的峰形明显变化,说明样品过载。因此,可以确定 50  $\mu\text{L}$  是该样品在分析柱中的最佳进样量。

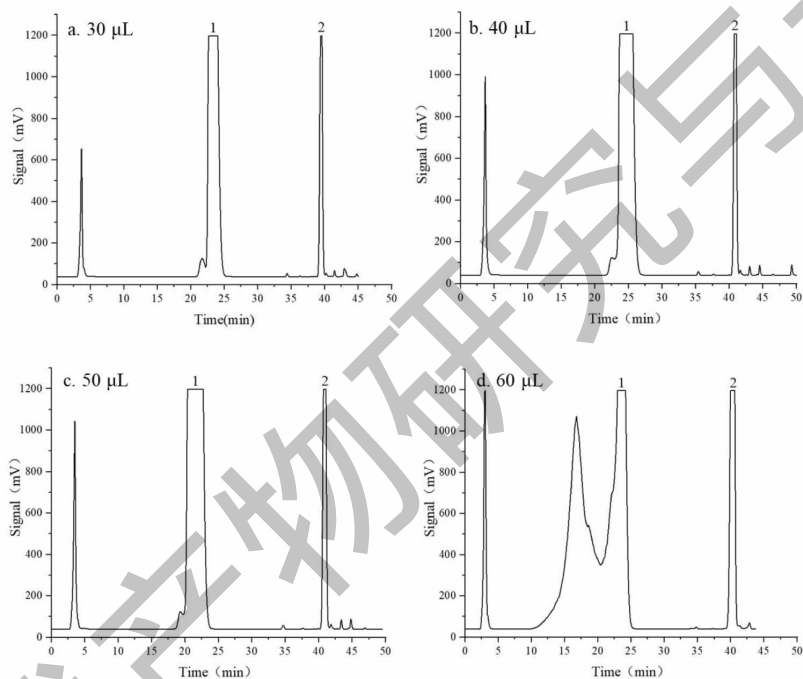


图 4 不同进样量时地榆皂苷 I 和 II 的分析色谱图

Fig. 4 Analytical HPLC chromatogram of ziyuglycoside I and II with different injection volumes

经上述实验优化,确定当流速为 1 mL/min 时,在分析型 HPLC 上的最佳分离条件为梯度程序 4,最佳进样量为 50  $\mu\text{L}$ 。

## 2.3 半制备型 HPLC 分离条件和进样量的优化

制备色谱放大公式如下所示:

$$\text{制备柱进样量} = \text{分析柱进样量} \times \left(\frac{d_2}{d_1}\right)^2 \times \left(\frac{L_2}{L_1}\right)$$

$$\text{制备柱流速} = \text{分析柱流速} \times \left(\frac{d_2}{d_1}\right)^2$$

式中, $d_2$ :制备柱直径; $d_1$ :分析柱直径; $L_2$ :制备柱长度; $L_1$ :分析柱长度。

根据放大公式,初步确定在半制备型 HPLC 上

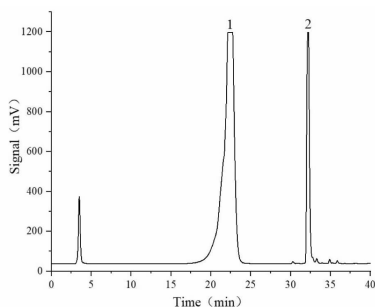


图 5 根据放大公式确定的地榆皂苷 I 和 II 的制备色谱图

Fig. 5 Preparative HPLC chromatogram of ziyuglycoside I and II in the conditions determined by magnification formula

的分离条件为:流速为 4.7 mL/min, 梯度程序 4, 进样量为 235  $\mu$ L, 分离结果如图 5 所示, 在放大公式的条件下各峰出峰时间提前, 杂质与地榆皂苷 I 的分离度降低, 因此需要延迟出峰时间, 提高分离度。方法有两种, 一是增加流动相中水相比比例, 二是降低流动相流速。本实验通过降低流速的方法实现, 研究发现, 将流速降低为 4 mL/min 时, 各峰出峰时间与在分析型 HPLC 中的结果相近, 地榆皂苷 I 和 II 的保留时间分别为 28 和 41 min。

在确定了半制备型 HPLC 的分离条件为梯度程序 4、流速为 4 mL/min 后, 对进样量进行优化, 将进

样量提高至 0.25、0.5、0.75、1.0、1.25, 观察峰形, 考察该半制备柱上的最佳进样量。结果如图 6 所示, 当进样量为 1.25 mL 时, 样品无法保留; 进样量为 1 mL 时, 在色谱峰 2 后可以看到大量杂峰相接, 难以收集获得高纯度的地榆皂苷 II; 最终确定 0.75 mL 为最佳进样量。与分析柱相比, 半制备柱内径的增加引起了色谱的纵向扩散增加, 分离效果下降, 因此地榆皂苷 I 和杂质峰的分离不明显。该缺陷不影响制备, 因为制备型 HPLC 不以分离程度为第一目标, 而是在分离程度和制备效率中寻求平衡。

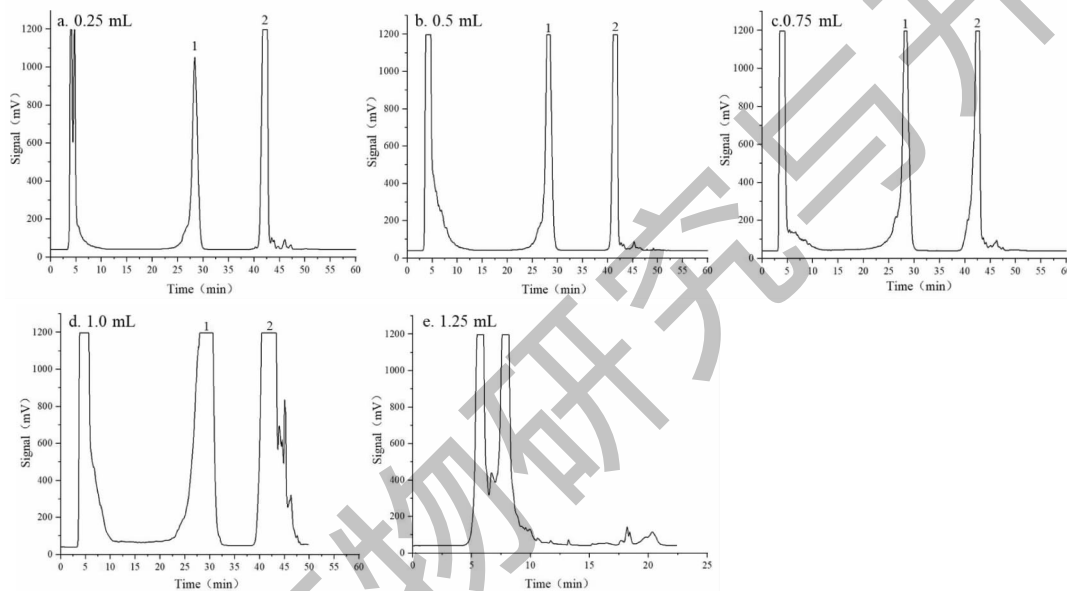


图 6 不同进样量时地榆皂苷 I 和 II 的制备色谱图

Fig. 6 Preparative HPLC chromatogram of ziyuglycoside I and II with different injection volumes

当梯度程序为程序 4, 流动相流速为 4 mL/min, 进样量为 0.75 mL 时, 使用半制备柱分离制备并收集产物, 在收集地榆皂苷 I 时避开杂质峰, 收集图如

图 7 所示。平台配有自动收集系统, 确定收集条件后, 可根据出峰信号收集, 方法可重复。

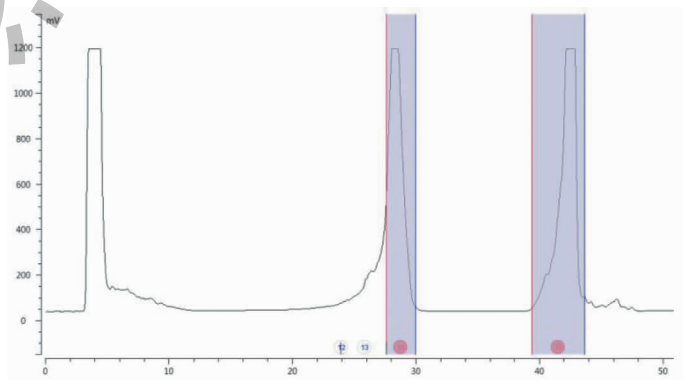


图 7 地榆皂苷 I 和 II 的收集图

Fig. 7 Collection of ziyuglycoside I and II from *Sanguisorba officinalis* L.

将馏分减压浓缩、冷冻干燥,可获得2种白色粉末,单次制备量为地榆皂苷 I(收集管 14)可达 20.42 mg、地榆皂苷 II(收集管 15) 1.65 mg,收率分别达 88.4% 和 90.2%。单次制备耗时约 45 min,耗费甲醇约 128 mL。

#### 2.4 地榆皂苷制备产物的检测与鉴定

实验中用分析型 HPLC 检测半制备型 HPLC 分离获得的地榆皂苷 I 和 II 的纯度,结果如图 8a 和 8b 所示。可看出,收集到的两个样品的保留时间均与其标准品一致,以归一化面积法计算含量<sup>[21,22]</sup>,地榆皂苷 I 和 II 和纯度分别为 98.33% 和 98.01%。

我们研究中继续用 LC-MS 对制备液相收集得到的地榆皂苷 I 和 II 进行了确认。图 8a 为收集管 14 的样品的质谱图,可以看到, $m/z$  为 765.5。地榆皂苷 I 的分子量为 766.95,在 ESI 负离子模式下,图 8a 中  $m/z$  为 765.5 的离子峰为其  $[M-H]^-$  峰,所以可以确定收集管 14 中的物质为地榆皂苷 I。图 8b 为收集管 15 的样品的质谱图,可以看到, $m/z$  为 603.5。地榆皂苷 II 的分子量为 604.8,在 ESI 负离子模式下,图 8b 中  $m/z$  为 603.5 的离子峰为其  $[M-H]^-$  峰, $m/z$  为 649.5 的离子峰为其  $[M+HCOOH-H]^-$  峰,所以可以确定收集管 15 中的物质为地榆皂苷 II。

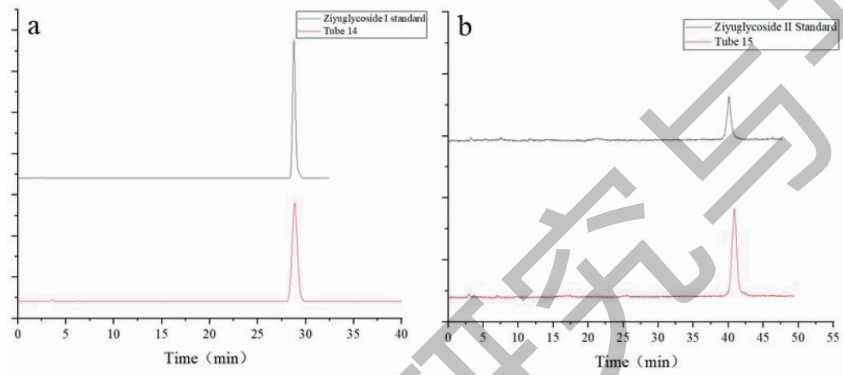


图 8 地榆皂苷对照品及收集管 14 和 15 的 HPLC 谱图

Fig. 8 HPLC chromatogram of ziyuglycoside standards and test tube 14 and 15

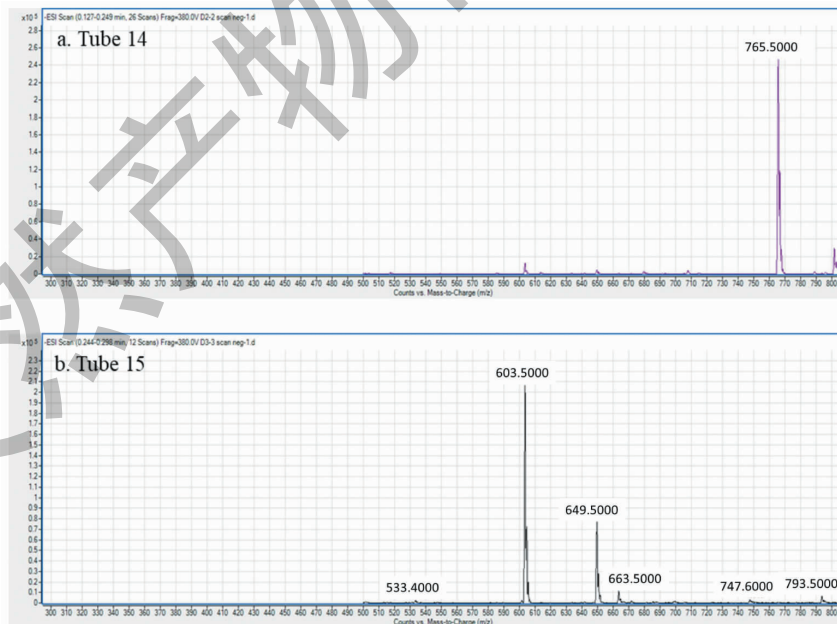


图 9 收集管 14 和 15 的质谱图

Fig. 9 MS spectra of test tube 14 and 15

### 3 结论

制备型 HPLC-ELSD 系统具有自动化程度高、能

实现在线检测、产物纯度高、收率高的优点,在中药中无/弱紫外吸收类成分的制备中具有很好的的应



用价值。在本研究中,地榆乙醇粗提取物经两次碱沉和石油醚除杂后,使用反相半制备色谱柱可完成地榆皂苷 I 和 II 毫克级别的制备,纯度达 98%,收率较高。地榆皂苷的分离纯化方法已有一些报导,相较于大孔树脂吸附、有机溶剂萃取、多次结晶等传统的分离纯化方法,本研究能够同时制备地榆皂苷 I 和 II,且步骤简便、对有机溶剂的耗费较少,对地榆皂苷的开发利用有重要的参考和应用价值。

## 参考文献

- Ye ZJ, Yan L, Li HJ, et al. Research progress in pharmacological effect and clinical application of *Sanguisorba officinalis* L. [J]. Pharm Care Res (药学服务与研究), 2015, 15 (1): 47-50.
- Xia HM, Sun LL, Sun JY, et al. Progress on chemical ingredient and pharmacological activity of *Sanguisorba officinalis* L. [J]. Food Drug (食品与药品), 2009, 11 (7): 67-69.
- Yun MY, Bae EY, Lee SW, et al. Anti-photoaging effect of skin cream manufactured with ziyuglycoside I isolated from *Sanguisorba officinalis* on ultraviolet B-induced hairless mice [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2019, 83: 1197-1204.
- Sun W, Zhang ZL, Liu X, et al. Terpene glycosides from the roots of *Sanguisorba officinalis* L. and their hemostatic activities [J]. Molecules, 2012, 17: 7629-7636.
- Xiong YA, Zou Y, Chen L, et al. Development and *in vivo* evaluation of ziyuglycoside I-loaded self-microemulsifying formulation for activity of increasing leukocyte [J]. AAPS PharmSciTech, 2019, 20 (3): 101.
- Dai LM, Xiong YA, Yang GY, et al. Protective effect of tannins from *Sanguisorba officinalis* on cyclophosphamide-induced myelosuppression in mice [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2016, 28: 852-859.
- Zhu LJ, Chen L, Huang FH, et al. Protective effects of peripheral blood of total saponins of *Sanguisorba officinalis* L. on myelosuppressive mice induced by 60 Co- $\gamma$  ray and its associated mechanism [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2017, 29: 934-940.
- Luo Y, Wang H, Yuan Z. Triterpenoid saponins of *Sanguisorba officinalis* and their anti-inflammatory activity [J]. Chinese J Chem (中国药物化学杂志), 2008, 18: 138-141.
- Zhu X, Wang K, Zhang K et al. Ziyuglycoside I inhibits the proliferation of MDA-MB-231 breast carcinoma cells through inducing p53-mediated G2/M cell cycle arrest and intrinsic/extrinsic apoptosis [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17 (11): 1903.
- Zhu X, Wang K, Yao Y, et al. Triggering p53 activation is essential in ziyuglycoside I-induced human retinoblastoma WERI-Rb-1 cell apoptosis [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2018, 32 (1): 22001.
- Wang K, Zou P, Zhu X. Ziyuglycoside II suppresses the aggressive phenotype of triple negative breast cancer cells through regulating Src/EGFR-dependent ITGB4/FAK signaling [J]. Toxicol In Vitro, 2019, 61: 104653.
- Lim SH, Choi H, Young BE, et al. Composition useful in medicament and cosmetics to prevent skin photo-aging and pigmented diseases caused by hyperpigmentation, and improve skin wrinkles and skin whitening, comprises *Sanguisorba officinalis* extract/ ziyuglycoside I; KR2019092800-A [P]. 2019-08-08.
- Yang S. Ziyuglycoside-II-liposome useful for preparing medicament for preventing and/or treating myelosuppression and increasing blood cells count and hemoglobin level, produced by adding ziyuglycoside-II and carrier material; WO2018133109-A1 [P]. 2018-06-26.
- Wang ML. Column separation and ultra violet analysis of saponins in *Sanguisorba* [J]. Sci Technol Food Ind (食品工业科技), 2003, 24 (5): 89-90.
- Gao H, Li BN, Zheng P, et al. Study on the extraction of saponins from *Sanguisorba officinalis* by microwave combined with resin [J]. Chin Med Mater (中药材), 2007, 30: 868-870.
- Dai LM, Xiong YA, Yang GY et al. Optimization of three-step alkali precipitation method for preparation of total saponins in *Sanguisorbae Radix* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2016, 22 (18): 9-12.
- Ji JX, Liu ZY, Li QF, et al. Preparation of total ziyuglycosides and ziyuglycoside I (地榆总皂苷及地榆皂苷 I 的制备方法): CN200910082470. 6 [P]. 2010-10-20.
- Liu DF, Yang CD. A method for purification of ziyuglycoside I (一种地榆皂苷 I 的提纯方法): CN201210115389. 5 [P]. 2012-08-22.
- Zheng ZG, Yang AP. A preparation method of ziyuglycoside II (一种地榆皂苷 II 的制备方法). CN201810268835. 3 [P]. 2018-09-07.
- Yang Y, Zhang YM, Zhu ZL, et al. Purification of syringin by preparative high performance liquid chromatography [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2016, 28: 1585-1589.
- Wu QB, Wang Y, Guo ML. A new method for separation of two saponins from *Celosiae Semen* [J]. Chin J Pharm Anal, 2011, 31 (7): 34-38.
- Lu H, Liu H W, Wang Z S, et al. Separation of reference compounds from total saponin of *Patrinia scabiosaeifolia* [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2015, 17: 583-586.