

HPLC 法测定短柄五加根和茎中刺五加苷 E 含量

崔蕾^{1,2}, 舒泉湧^{1,2}, 赵新礼^{1,2}, 杜文娟¹, 朱爱华^{1,2}

(1. 陕西中药研究所(陕西医药信息中心), 陕西咸阳 712000; 2. 陕西省中药与天然药物研发重点实验室, 陕西西安 710075)

摘要 [目的] 建立测定不同产地短柄五加根、茎中刺五加苷 E 含量的 HPLC 方法。[方法] 采用 Agilent TC-C₁₈(2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 以乙腈-0.1% 磷酸 (16:84) 为流动相; 流速 1 mL/min; 检测波长 220 nm, 进样体积为 10 μL, 柱温 30 °C。[结果] 刺五加苷 E 在 8.0~160.6 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.9996$), 平均加样回收率为 98.62%, RSD 为 0.50%。[结论] 该方法操作简便、稳定可靠, 适用于短柄五加根、茎中刺五加苷 E 含量的测定, 可作为倒卵叶五加药材的质量控制指标。

关键词 短柄五加; 倒卵叶五加; 刺五加苷 E; HPLC; 含量测定

中图分类号 R284 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)19-0180-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2021.19.047

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Determination of Eleutheroside E Content in Roots and Stems of *Acanthopanax brachypus* Harms by HPLC

CUI Lei^{1,2}, SHU Quan-yong^{1,2}, ZHAO Xin-li^{1,2} et al (1. Shaanxi Institute of Traditional Chinese Medicine (Shaanxi Medical Information Center), Xianyang, Shaanxi 712000; 2. Shaanxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine Research and Development, Xi'an, Shaanxi 710075)

Abstract [Objective] To establish an HPLC method for the simultaneous determination of eleutheroside E content in the roots and stems of *Acanthopanax brachypus* from different habitats. [Method] Separation was carried out on Agilent TC-C₁₈(2) column (250 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile -0.1% phosphoric acid water (16:84) with a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths was 220 nm, volume of injection was 10 μL, and the temperature of column was set at 30 °C. [Result] Eleutheroside E showed a good linear relationship between 8.0-160.6 μg/mL and the peak area ($r=0.9996$), the average recovery rate was 98.62%, and the RSD was 0.50%. [Conclusion] The method is convenient, stable and reliable, which is suitable for the determination of the content of eleutheroside E in the roots and stems of *Acanthopanax brachypus* Harms, and can be used as the quality control index of *Acanthopanax brachypus* radix et rhizoma seu caulis.

Key words *Acanthopanax brachypus* Harms; *Acanthopanax brachypus* radix et rhizoma seu caulis; Eleutheroside E; HPLC; Content determination

倒卵叶五加 (*Acanthopanax brachypus* radix et rhizoma seu caulis) 为五加科植物短柄五加 *Acanthopanax brachypus* Harms [Eleutherococcus brachypus (Harms) Nakai] 的干燥根和根茎或茎, 分布于我国西北地区的陕西、甘肃、宁夏, 主治体虚乏力、腰膝酸软、脾肾阳虚、失眠多梦、食欲不振等病症^[1-2]。倒卵叶五加是陕西的特色植物药, 有很高的药用及研究价值^[3]。现代药理学研究表明, 倒卵叶五加具有增强免疫力、抗疲劳、保护缺血心肌、抑制血小板聚集、抗血栓形成和抗氧化等药理作用^[4-10]。目前, 对倒卵叶五加的研究主要集中在苷类和黄酮类化合物方面, 对其具体化学成分的研究以及质量控制的文献比较少。倒卵叶五加药材的质量控制指标单一, 主要以紫丁香苷的含量测定为标准^[11-12]。近年来, 采用 HPLC 法对刺五加、糙叶五加中刺五加苷 E 含量的测定均有研究报道^[13-15], 而倒卵叶五加中刺五加苷 E 的含量测定鲜见报道。通过该试验的前期研究发现, 短柄五加根、茎中刺五加苷 E 的含量高于紫丁香苷。为了进一步有效控制倒卵叶五加的质量, 该研究选择以刺五加苷 E 为检测指标, 试图建立稳定、高效的倒卵叶五加药材中刺五加苷 E 的测定方法, 并比较不同产地、不同部位的短柄五加中刺五加苷 E 含量的高低, 以期为其资源的开发利用与药材质量控制

提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器 UltiMate 3000 高效液相色谱仪 (赛默飞世尔科技有限公司); METTLER AG-135 电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); KQ-300 VDE 型双频数控超声波清洗器 (江苏昆山超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 刺五加苷 E 对照品 (中国食品药品检定所, 批号 111713-201804); 乙腈为色谱纯 (美国霍尼韦尔公司); 甲醇、磷酸为分析纯 (成都市科隆化学品有限公司); 水为娃哈哈纯净水。

1.3 试材 该研究所用倒卵叶五加药材分别采集于甘肃正宁县、陕西宜君县、陕西黄龙县、陕西旬邑县 4 个产地, 经陕西中药研究所赵新礼主任药师鉴定为短柄五加 (*Acanthopanax brachypus* Harms) 的干燥根、茎。

1.4 试验方法

1.4.1 色谱条件。 采用 Agilent TC-C₁₈(2) 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸 (16:84) 为流动相, 流速 1 mL/min, 检测波长 220 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

1.4.2 对照品溶液的制备及标准曲线的绘制 取刺五加苷 E 对照品适量, 精密称定, 加入 50% 甲醇溶解定容, 摇匀, 制成含 802.78 μg/mL 的对照品溶液。精密吸取对照品溶液 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00 mL, 分别置于 5 mL 容量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别吸取 10 μL 注入液相色谱仪中, 在“1.4.1”色谱条件下测定峰面积。以进样浓度为横坐

基金项目 陕西省科技统筹创新工程项目 (2016KTTSSF 01-01-02); 咸阳市重大科技专项计划 (2014K01-17)。

作者简介 崔蕾 (1989—), 女, 甘肃天水人, 药师, 硕士, 从事中药资源开发与质量控制研究。

收稿日期 2021-05-10

标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线,计算线性回归方程。

1.4.3 供试品溶液的制备。精密称取干燥的短柄五加样品粗粉 2.0 g,置 50 mL 具塞锥形瓶中,加入 50% 甲醇溶液 20 mL,称定质量,超声提取 30 min (功率 300 W,频率 45 kHz),放置室温,再称定质量,用 50% 甲醇补足损失重量,摇匀,滤过取续滤液,以 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

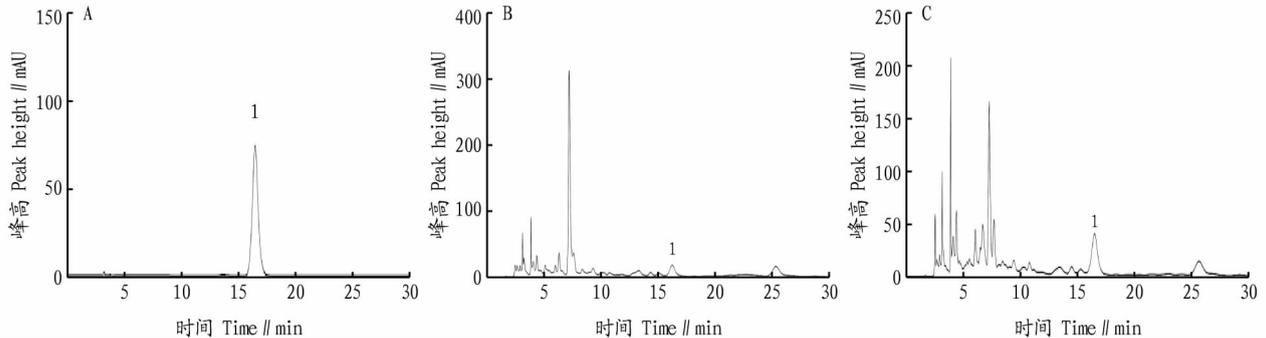


图 1 对照品(A)及根(B)、茎(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A), roots (B) and stems (C)

2.2 线性关系考察 以进样浓度为横坐标、峰面积为纵坐标进行线性回归,得刺五加苷 E 的回归方程为 $Y=0.2976X+0.1879$ ($r=0.9996$)。结果表明,刺五加苷 E 浓度在 8.0~160.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.3 精密度试验 吸取刺五加苷 E 对照品储备液,重复进样 6 次,每次进样 10 μL ,测定对照品的峰面积分别为 24.2043、24.0435、24.1257、24.2114、24.0582、23.8475,计算得刺五加苷 E 峰面积的 RSD 为 0.56% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.4 重复性试验 取同一短柄五加茎粗粉 2.0 g,共 6 份,精密称定,按照“1.4.3”方法制备供试品溶液,在“1.4.1”色谱条件下进行测定,计算得样品中刺五加苷 E 的平均含量为 0.8128 mg/g, RSD 为 0.44% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2 结果与分析

2.1 对照品与样品的高效液相色谱图 从图 1 可以看出,在“1.4.1”色谱条件下,对照品及供试品溶液中刺五加苷 E 的保留时间均为 16.1 min,刺五加苷 E 的色谱峰达到了比较理想的分离效果,样品所测主峰旁边无明显杂峰,经计算样品与其相邻峰的分离度大于 1.5,说明此条件适合该样品测定刺五加苷 E。

2.5 稳定性试验 取同一短柄五加茎粗粉 2.0 g,精密称定,按照“1.4.3”方法制备供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样 10 μL ,测定峰面积并计算 RSD。结果发现,在 0、2、4、6、8、10、12 h 进样测得同一样品中刺五加苷 E 峰面积分别为 22.8892、22.9245、23.2613、23.2856、22.9837、23.3212、23.1057,其 RSD 为 0.79%,试验结果表明供试溶液在室温下 12 h 内稳定。

2.6 加样回收率试验 取同一短柄五加茎粗粉 1.0 g,精密称定,共 6 份,分别置于 25 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 802.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 刺五加苷 E 的标准溶液 1 mL,按“1.4.3”方法制备供试品溶液,在“1.4.1”色谱条件下进行测定。计算得刺五加苷 E 的平均回收率为 98.62%, RSD 为 0.50%,结果见表 1。

表 1 回收率试验结果

Table 1 Results of recovery test

编号 No.	称样量 Sample amount//g	样品中含量 Content in sample//mg	加入量 Addition amount//mg	测定量 Measured amount//mg	回收率 Recovery rate//%	平均回收率 Average recovery rate//%	RSD %
1	1.0019	0.8063	0.8028	1.5903	97.67	98.62	0.50
2	1.0026	0.8145	0.8028	1.6071	98.73		
3	1.0035	0.8171	0.8028	1.6132	99.17		
4	1.0021	0.8105	0.8028	1.6024	98.65		
5	1.0024	0.8132	0.8028	1.6035	98.44		
6	1.0032	0.8153	0.8028	1.6107	99.08		

2.7 样品含量测定 精密称取 8 批不同采收时间及产地的短柄五加根、茎样品各 3 份,按“1.4.3”方法制备供试品,按照“1.4.1”色谱条件进样 3 次,测定峰面积,由线性回归方程计算样品中刺五加苷 E 的含量,结果见表 2。从表 2 可以看出,4 个产地短柄五加茎中的刺五加苷 E 含量均高于根;产

地不同、采收时间不同,刺五加苷 E 含量也存在一定的差异;茎中刺五加苷 E 的含量以 2018 年采收自陕西黄龙县产地最高,甘肃正宁县产地次之;而根中刺五加苷 E 的含量以 2018 年采收自陕西黄龙县产区的最高,其中陕西旬邑县产地药材根中刺五加苷 E 的含量显著低于其他产区。同一产地的短

柄五加茎中目标成分含量显著高于根中,差异达到1~2倍,差异最大的是陕西旬邑县,其茎中刺五加苷E含量是根中的2.7倍。

表2 刺五加苷E含量测定结果

Table 2 Results of content determination of eleutheroside E (n=3)

批次 Batch	产地 Producing area	采集时间 Acquisition time	含量 Content//mg/g	
			根 Root	茎 Stem
1	甘肃正宁县	2018-11-26	0.438	1.149
2	甘肃正宁县	2019-11-05	0.539	0.813
3	陕西黄龙县	2018-11-10	0.755	1.209
4	陕西黄龙县	2019-11-30	0.706	0.831
5	陕西旬邑县	2018-11-25	0.402	0.974
6	陕西旬邑县	2019-11-15	0.287	0.781
7	陕西宜君县	2018-12-15	0.742	1.133
8	陕西宜君县	2019-12-09	0.529	1.105

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的选择 该研究分别考察了超声提取和回流提取对短柄五加根、茎中刺五加苷E提取效率的影响,发现这2种提取方法效果相差不大。考虑到回流提取法操作繁琐、耗时长,而超声提取法快速简便,故该试验采用超声提取法。提取溶剂考察了甲醇和乙醇,结果表明以甲醇超声提取优于乙醇提取,同时又比较了甲醇、50%甲醇、75%甲醇提取效果和超声不同时间(30、40 min)的效果,最终结果显示以50%甲醇提取30 min的效果最佳。

3.2 测定波长的选择 分别吸取刺五加苷E对照品溶液、短柄五加根、茎粗粉制备的供试品溶液,注入UltiMate 3000高效液相色谱仪,200~400 nm波长扫描。根据扫描结果,确定刺五加苷E的最大吸收波长为220 nm。

3.3 流动相的选择 在流动相的选择中,比较了不同比例的乙腈-0.1%磷酸水溶液,还进行了梯度混合条件的摸索,最终确定为乙腈-0.1%磷酸水溶液(16:84)。在此条件下样品中刺五加苷E的色谱峰峰形对称,且与周围色谱峰分离度较好。

3.4 含量测定指标的选择 短柄五加根、茎中含有丰富的挥发油和油脂、黄酮及其苷类、萜醌及其苷类、香豆素、酚类或鞣质、氨基酸、甾体及三萜皂苷、有机酸及多糖等成分,所含的成分类型与同属其他植物基本相同,药理研究表明短柄五加和刺五加在主治及功能方面有很多相似之处,短柄五加茎在加大剂量使用时,可以替代刺五加使用^[16]。人们已从刺五加中分离出胡萝卜苷(刺五加苷A)、紫丁香苷(刺五加苷B)、紫丁香树脂酚二糖苷(刺五加苷D和刺五加苷E)等8种刺五加苷,其中刺五加苷E的生物活性最强^[17]。短柄五加含有多种皂苷、多糖、黄酮等药理成分活性成分。其中,刺五加苷E具有人参皂苷的相似生理活性,能增加机体非特异性抵抗力,具显著的缓解压力作用^[18],即“适应原样”的作用^[19]。该

研究原计划建立同时测定刺五加苷B和刺五加苷E这2种成分的方法,但预试验结果表明,短柄五加中刺五加苷E的量较高,刺五加苷B的量普遍较低,故该研究选择刺五加苷E作为倒卵叶五加药材质量标准中含量测定的指标。

4 结论

目前,倒卵叶五加药材一直未列入陕西省地方标准和国家标准药典,限制了其进一步开发和应用,致使倒卵叶五加产业的发展较慢。市面上倒卵叶五加药材品质参差不齐,急需建立倒卵叶五加药材的质量控制标准。该研究首次对倒卵叶五加药材中刺五加苷E进行含量测定,结果发现,4个产地短柄五加茎中的刺五加苷E含量均高于根;产地不同、采收时间不同,刺五加苷E含量也存在一定的差异;茎中刺五加苷E的含量以2018年采收自陕西黄龙县产地最高,甘肃正宁县产地次之;而根中刺五加苷E的含量以2018年采收自陕西黄龙县产区的最高,其中陕西旬邑县产地药材根中刺五加苷E的含量显著低于其他产区。该研究建立的HPLC测定方法简便快速、分离度好、结果稳定可靠,可以为倒卵叶五加药材质量控制提供科学依据。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第54卷[M]. 北京: 科学出版社,1978:103.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草:第15卷 第5册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:754.
- [3] 邢泽田. 陕西省倒卵叶五加[J]. 自然资源研究,1984(4):29-34.
- [4] 杨智锋,李改琴,郭五保,等. 倒卵叶五加的药学研究[J]. 西北药学杂志,2004,19(5):205-207.
- [5] 张艺芳,朱爱华. 倒卵叶五加茎的一般药理研究[J]. 陕西中医,2013,34(7):922-923.
- [6] 马世玉,吴基良,向继洲,等. 倒卵叶五加总皂甙对大鼠心肌顿抑的作用[J]. 中国心血管杂志,2002,7(5):307-310.
- [7] 何丽娅,王秋贵,吴基良,等. 倒卵叶五加总皂甙对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 中药药理与临床,1996,12(6):29-30.
- [8] 朱爱华,张艺芳,杨钧. 倒卵叶五加对免疫功能的影响[J]. 西北药学杂志,2013,28(4):383-385.
- [9] 杨钧,朱爱华,张艺芳,等. 倒卵叶五加对胃肠功能的实验研究[J]. 陕西中医,2013,34(9):1245-1247.
- [10] 马世玉,吴基良,陈金和,等. 倒卵叶五加总皂甙的抗氧化作用[J]. 咸宁医学院学报,2002,16(4):229-232.
- [11] 曹爱兰,张俏,史文静,等. HPLC测定倒卵叶五加冲剂中紫丁香苷含量研究[J]. 亚太传统医药,2013,9(5):33-34.
- [12] 刘军峰,高锦成,刘建峰,等. HPLC测定倒卵叶五加中紫丁香苷含量[J]. 西北药学杂志,2008,23(6):358-359.
- [13] 冯胜,刘向前,张伟兰,等. RP-HPLC法测定糙叶五加不同部位中刺五加苷B和E[J]. 中草药,2011,42(6):1144-1146.
- [14] 尚海花,王淼,刘颖,等. HPLC法测定不同产地刺五加中原儿茶酸、紫丁香苷、绿原酸、刺五加苷E和异腺皮甙[J]. 现代药物与临床,2018,33(6):1324-1328.
- [15] 王一涵,金英今,徐博,等. 刺五加化学成分研究[J]. 中国药学杂志,2014,49(19):1701-1703.
- [16] 简毓峰,胡浩斌. 短柄五加的化学成分与药理活性研究进展[J]. 中药材,2011,34(8):1302-1306.
- [17] 杨晓丹,井月娥,卢芳. 刺五加的化学成分研究进展[J]. 中华中医药学刊,2015,33(2):316-318.
- [18] 钟世红,卫莹芳,古锐. HPLC法测定红毛五加中刺五加苷E[J]. 中草药,2009,40(6):979-981.
- [19] 刘超华,朱礼,李文兰. 刺五加主要活性成分化学与药理研究[J]. 时珍国医国药,1999,10(4):305-306.