

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 和异嗪皮啶

尚海花^{1,2}, 王淼², 刘颖³, 郑雅楠², 白润³, 廖茂梁^{1,2*}

1. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: 目的 建立 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 和异嗪皮啶。方法 采用 Welch Materials C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水, 梯度洗脱; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 214 nm; 进样体积 10 μL。测定结果采用主成分分析法进行分析。结果 5 种成分在测定质量浓度范围内线性关系良好, *r* 均大于 0.999 9; 平均回收率为 99.66%~101.25%, RSD 值为 1.92%~3.03%; 不同产地的 11 批刺五加中原儿茶酸、紫丁香苷、绿原酸、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的质量分数范围分别为 0.004%~0.016%、0.080%~0.152%、0.372%~0.806%、0.057%~0.103%、0.002%~0.010%。主成分分析结果显示, 黑龙江产刺五加药材质量较佳。结论 该方法快速、简便、准确, 多成分测定的质量评价模式可用于刺五加药材的质量控制。

关键词: 刺五加; 原儿茶酸; 紫丁香苷; 绿原酸; 刺五加苷 E; 异嗪皮啶; 高效液相色谱; 主成分分析

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2018)06-1324-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2018.06.007

Determination of protocatechuic acid, syringing, chlorogenic acid, eleutheroside E, and isofraxidin in *Acanthopanax senticosus* from various of habitats by RP-HPLC

SHANG Hai-hua^{1,2}, WANG Miao², LIU Ying³, ZHEN Ya-nan², BAI Run³, LIAO Mao-liang^{1,2}

1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China;

3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of protocatechuic acid, syringing, chlorogenic acid, eleutheroside E and isofraxidin in *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms from different habitats. **Methods** Separation was carried out on Welch Materials C₁₈ column (250 mm × 4.6 μm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile - 0.1% phosphoric acid water with gradient elution. The detection wavelengths were set at 214 nm. The flow rate was 1.0 mL/min, temperature of column was set at 30 ℃, and volume of injection was 10 μL. The result was analyzed by PCA. **Results** The linear relations of five active components in the range of mass concentration was good with perfect precision with *r* all more than 0.999 9. The average recovery rates were 99.66% — 101.25%, and RSD was 1.92% — 3.03%. The contents in 11 batch of the *A. senticosus* from different habitats were calculated, and the results were as following: protocatechuic acid was about 0.004% — 0.016%, syringing was 0.080% — 0.152%, chlorogenic acid was 0.372% — 0.806%, eleutheroside E was 0.057% — 0.103%, and isofraxidin was 0.002% — 0.010%. **Conclusion** The method is rapid, convenient, and with precision and accuracy, and the multi-component determination method is suitable for the quality control of *A. senticosus*.

Key words: *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms; protocatechuic acid; syringing; chlorogenic acid; eleutheroside E; isofraxidin; HPLC; PCA

收稿日期: 2018-05-16

基金项目: 天津市科技计划项目 (12ZCDZSY11600; 14ZCZDSY00005); 天津市科技支撑计划项目 (15ZCZDSY00470); 天津市应用基础与前沿技术研究计划 (14JCQNJC13800; 15JCYBJC29500)

作者简介: 尚海花, 博士研究生。E-mail: shanghaihua2006@163.com

*通信作者 廖茂梁, 副研究员。Tel: (022)23006323 E-mail: liaomaoliang@163.com

刺五加为五加科植物刺五加 *Acanthopanax seuticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 的干燥根和根茎或茎, 主要分布于黑龙江、吉林、辽宁、河北和山西, 具有益气健脾、补肾安神功效^[1]。现代药理学研究表明, 刺五加具有免疫调节、抗肿瘤、抗疲劳、抗辐射等作用, 其中枢神经系统、心血管方面的活性较为显著^[2], 临床广泛用于治疗风湿痹痛、冠心病、心绞痛和脑梗死等^[3]。刺五加药材质量控制水平较低, 《中国药典》2015年版一部仅以紫丁香苷为测定指标进行质量控制, 而刺五加浸膏及其中成药中对紫丁香苷、刺五加苷E和异嗪皮啶进行了限定^[1]。近年来, 虽有刺五加药材质量控制的文献报道, 但多对刺五加中刺五加苷B、刺五加苷E进行了测定^[4-7]。本研究拟采用RP-HPLC方法对刺五加中的主要活性成分紫丁香苷、刺五加苷E、异嗪皮啶、绿原酸和原儿茶酸同时进行测定, 以期通过多指标成分控制的方法全面反映刺五加药材的内在质量, 为刺五加药材质量控制提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 具有在线脱气机、输液泵、自动进样器、柱温箱和 DAD 检测器; AB204-N 电子分析天平 (上海梅特勒-托利多仪器有限公司); BT-25S 电子分析天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司); SB-3200 DTDN 超声波清洗仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试剂

原儿茶酸对照品 (上海试剂三厂, 质量分数 $\geq 99\%$, 批号 760825); 绿原酸 (质量分数 $\geq 99\%$, 批号 110753-200413)、紫丁香苷 (质量分数 $\geq 95.0\%$, 批号 111574-200603)、刺五加苷 E (质量分数 $\geq 98.0\%$, 批号 111713-200502)、异嗪皮啶 (质量分数 $\geq 99.9\%$, 批号 0837-200203) 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈 [HPLC 级, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]; 屈臣氏蒸馏水 (广州屈臣氏食品饮料有限公司); 甲醇 (分析纯和色谱纯, 天津市康科德科技发展有限公司)。

刺五加药材经天津药物研究院中药与健康产品研究中心张铁军研究员鉴定为刺五加 *Acanthopanax seuticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 的根或根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[8]

Welch Materials C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm,

5 μ m); 流动相为乙腈 (A) - 0.1% 磷酸水 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 9% A; 10~20 min, 9%~10% A; 20~30 min, 10%~15% A; 30~40 min, 15% A; 40~60 min, 15%~30% A; 60~70 min, 30% A); 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 检测波长 214 nm; 进样体积 10 μ L。见图 1。

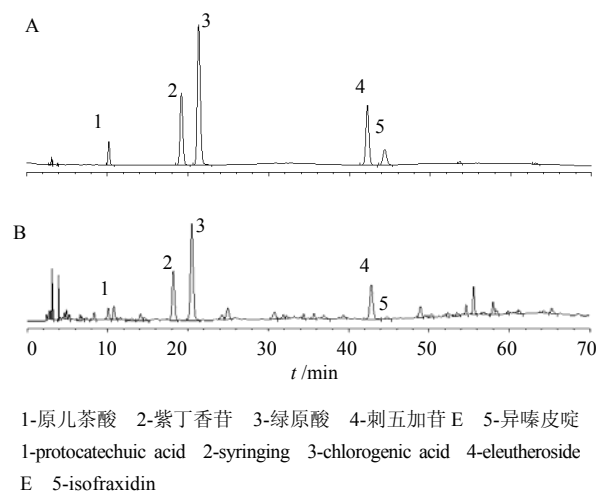


图1 混合对照品 (A) 和刺五加 (B) 的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and *Acanthopanax seuticosus* samples (B)

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 取刺五加药材粗粉 1.0 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 称定质量, 超声 (180 W, 40 kHz) 处理 40 min, 室温放凉, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取原儿茶酸、绿原酸、紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶对照品适量, 加入 50% 甲醇溶解, 制成含原儿茶酸 4.82 μ g/mL、紫丁香苷 25.65 μ g/mL、绿原酸 175 μ g/mL、刺五加苷 E 45.8 μ g/mL 和异嗪皮啶 5.8 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.3 方法学考察试验

2.3.1 线性范围考察 精密吸取原儿茶酸、紫丁香苷、绿原酸、刺五加苷 E 和异嗪皮啶混合对照品溶液 1、2、5、10、15 μ L, 在上述色谱条件下进样测定, 记录色谱图。以进样量为横坐标, 原儿茶酸、紫丁香苷、绿原酸、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的响应值峰面积为纵坐标进行线性回归, 计算回归方程, 见表 1。

表 1 各成分的线性关系和线性范围
Table 1 Linear relationship and range of major components

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ng
原儿茶酸	$Y=5\,914.111\,8\,X+0.581\,4$	1.000 0	6.5~96.9
紫丁香苷	$Y=3\,835.963\,0\,X+1.808\,4$	1.000 0	49.0~735.0
绿原酸	$Y=1\,842.677\,0\,X+1.527\,4$	1.000 0	223.8~3357.0
刺五加苷 E	$Y=4\,374.193\,9\,X+6.465\,1$	1.000 0	39.8~597.0
异嗪皮啶	$Y=6\,149.051\,1\,X+0.442\,6$	1.000 0	9.4~141.0

2.3.2 精密度试验 取刺五加药材(批号 201401-1)粗粉 1.0 g, 精密称定, 制备供试品溶液; 在上述色谱条件下, 连续进样测定 6 次, 记录色谱图和 5 种目标成分的色谱峰峰面积值, 结果显示原儿茶酸、紫丁香苷、绿原酸、刺五加苷 E 和异嗪皮啶峰面积的 RSD 值分别为 0.68%、0.55%、0.24%、0.78%、1.43%。

2.3.3 重复性试验 取刺五加药材(批号 201401-1)粗粉 1.0 g, 共 6 份, 精密称定, 制备供试品溶液; 在上述色谱条件下, 分别进样测定, 记录色谱图并计算各目标成分平均质量分数。结果显示原儿茶酸、紫丁香苷、绿原酸、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的平均质量分数分别为 0.0114%、0.0705%、0.4694%、0.0790%、0.0041%, RSD 值分别为 0.71%、0.74%、1.06%、0.83%、1.54%。

2.3.4 稳定性试验 取刺五加药材(批号 201401-1)粗粉 1.0 g, 精密称定, 制备供试品溶液, 照上述色谱条件分别于 0、2、4、6、8、10、12、24、48 h 进样测定, 记录 5 种目标成分的色谱峰峰面积值, 计算各目标成分 RSD 值。结果原儿茶酸、紫丁香苷、绿原酸、刺五加苷 E 和异嗪皮啶峰面积的 RSD 值分别为 1.51%、0.73%、0.56%、1.31%、1.92%, 表明样品在室温下 48 h 内稳定。

2.3.5 回收率试验 取刺五加药材(批号 201401-1)粗粉 0.5 g, 共 6 份, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 分别精密加入含原儿茶酸 57.02 μg/mL、紫丁香苷 352.63 μg/mL、绿原酸 2 346.7 μg/mL、刺五加苷 E 395.1 μg/mL 和异嗪皮啶 20.21 μg/mL 混合对照品溶液 1 mL, 制备供试品溶液, 照上述色谱条件进行分析测定, 记录色谱图, 计算回收率, 结果原儿茶酸、紫丁香苷、绿原酸、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的平均回收率分别为 99.66%、101.25%、99.71%、100.22%、100.82%, RSD 值分别为 1.92%、2.13%、2.24%、

2.05%、3.03%。

2.4 不同产地药材中各成分测定

取 11 批次刺五加药材粗粉, 各 3 份, 每份 1.0 g, 精密称定, 制备供试品溶液; 在上述色谱条件下, 分别进样测定, 记录色谱图, 计算各目标成分的平均质量分数, 结果见表 2。结果显示, 不同产地刺五加中 5 种成分的含量差异较大, 其中含量最大的绿原酸差异可达 1~2 倍, 含量最小的异嗪皮啶甚至可达 8 倍。因此, 单一控制紫丁香苷不能全面地反映刺五加药材的质量差异。

2.5 不同产地刺五加主成分分析^[9-10]

对 11 批次刺五加药材中各成分的测定结果采用统计软件 SIMCA-P 14.1 (Umetrics Corporation) 进行主成分分析 (principal component analysis, PCA), 见图 2。结果显示, 黑龙江产不同批次 (批号 201309-2、201309-6、20120630、201401-1) 刺五加药材的质量较为稳定, 质量较佳; 吉林产不同批次 (批号 201309-1、20111220、20111019-2、20120527) 刺五加药材的质量差异较大。由于本研究中刺五加药材的样本批次有限, 难以对其他不同来源的药材质量差异进行全面评价, 应开展大样本继续研究。

3 讨论

3.1 色谱条件的确定

为了使刺五加样品中目标活性成分色谱峰实现基线分离, 本实验考察了流动相不同的梯度条件下目标成分色谱峰的分离情况。结果表明, 在本实验条件下, 目标成分色谱峰分离效果较好, 峰形较佳; 中药中化学成分复杂, 紫外吸收差异较大, 本实验采用 DAD 检测器考察了 200~400 nm 波长下各成分的光谱图, 结果发现在 214 nm 波长下, 各个目标成分的紫外吸收都较强, 且干扰较小, 故选择 214 nm 作为实验的测定波长; 实验考察了不同的柱温 (25、30、35 ℃) 对色谱图分离效果的影响, 结果

表 2 刺五加中原儿茶酸、紫丁香苷、绿原酸、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的测定结果 ($n=3$)

Table 2 Result of protocatechuic acid, syringing, chlorogenic acid, eleutheroside E, and isofraxidin in *Acanthopanax seuticosus* ($n=3$)

产地	批次	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)				
		原儿茶酸	紫丁香苷	绿原酸	刺五加苷 E	异嗪皮啶
吉林	20111019-2	0.016	0.080	0.413	0.057	0.002
吉林	201309-1	0.004	0.145	0.372	0.087	0.010
黑龙江	201309-2	0.005	0.097	0.599	0.082	0.004
黑龙江	201309-6	0.005	0.087	0.593	0.085	0.003
黑龙江	20120630	0.007	0.085	0.663	0.103	0.002
陕西	20120313	0.011	0.095	0.410	0.078	0.006
吉林	20111220	0.012	0.152	0.374	0.101	0.003
河北	20120118	0.009	0.102	0.398	0.095	0.004
吉林	20120527	0.006	0.097	0.806	0.092	0.003
河南	20111104	0.010	0.087	0.799	0.057	0.003
黑龙江	201401-1	0.011	0.071	0.469	0.079	0.004

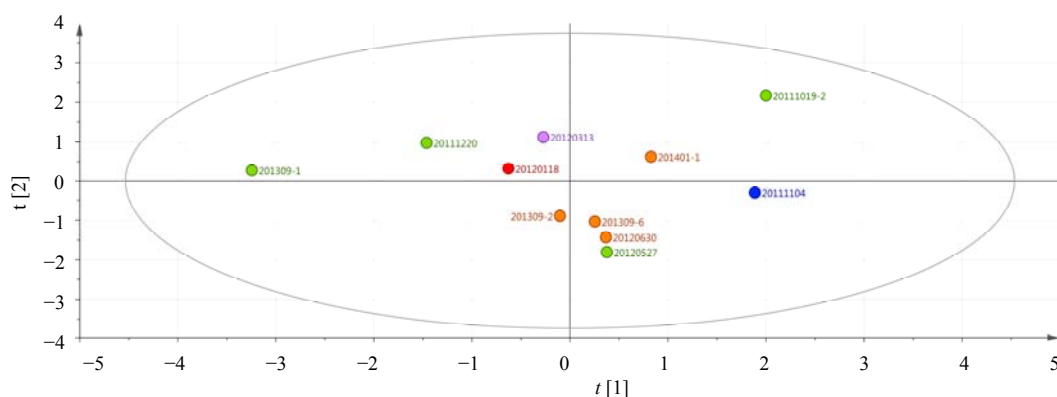


图 2 11 批刺五加药材的主成分分析结果

Fig. 2 PCA analysis results of the main components in 11 batches of *Acanthopanax seuticosus*

发现温度的升高会加快各个成分的出峰时间，在 25、30 $^{\circ}\text{C}$ 时各成分的分离效果较好，而 35 $^{\circ}\text{C}$ 时刺五加苷 E 和异嗪皮啶的色谱峰未达到基线分离，故选择 30 $^{\circ}\text{C}$ 作为本实验的柱温条件。

3.2 提取条件的选择

本实验考察了超声提取和回流提取 2 种方法对提取效果的影响，结果发现二者提取效果差异不大。鉴于超声提取操作简单，最后选择了超声提取的方法；提取溶媒考察了甲醇、50% 甲醇、乙醇和 75% 乙醇，结果 50% 甲醇的提取效果最好，提取效果大小分别为：50% 甲醇 > 75% 乙醇 > 甲醇 > 乙醇；同时进一步考察了不同提取溶媒体积用量（25、50、100 mL）以及超声时间（30、40、50 min）对提取

效果的影响，结果表明 50 mL 50% 甲醇超声提取 40 min 即可达到最好的提取效果。

目前《中国药典》2015 年版一部仅对刺五加药材中紫丁香苷进行质量控制，对药材中其他活性成分未建立质控方法，为此，本研究采用多成分测定方法对刺五加药材中原儿茶酸等 5 种活性成分进行测定，11 批刺五加药材中原儿茶酸、紫丁香苷、绿原酸、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的结果分别为 0.004%~0.016%、0.080%~0.152%、0.372%~0.806%、0.057%~0.103%、0.002%~0.010%，结果发现，在刺五加药材中，绿原酸的含量最高，异嗪皮啶的含量较少。本实验所建立的多成分的测定方法经过方法学验证，可以同时测定出刺五加药材中

的5个活性成分,可以更加全面地评价刺五加药材的质量,为刺五加药材的质量控制提供有效的途径和试验依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 206, 1034-1036.
- [2] 涂正伟,周渭渭,单 淇,等. 刺五加的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 213-216.
- [3] 王林丽,张家碧. 刺五加药理作用及临床治疗进展 [J]. 中国药业, 2003, 12(4): 79-80.
- [4] 车 勇. 高效液相色谱法测定刺五加中紫丁香苷含量的研究 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(2): 115-116.
- [5] 彭新生,赵英日,崔红华. HPLC 法测定刺五加中刺五加苷 B 的含量 [J]. 实用中西医结合临床, 2006, 6(3): 79-80.
- [6] 胡广东,胡新海,宋铁兵. 刺五加中刺五加苷 E 的含量测定 [J]. 黑龙江医药科学, 2009, 32(5): 19-20.
- [7] 劳风云,李小娜,邢朝斌,等. HPLC 法测定刺五加中刺五加苷 B 和刺五加苷 E 的含量 [J]. 现代预防医学, 2008, 35(12): 2280-2281.
- [8] 徐绍娣,崔宝国,赵桂香,等. LC-MS/MS 同时测定刺五加中刺五加苷 E、异嗪皮啶、绿原酸、原儿茶酸和齐墩果酸的含量 [J]. 植物学研究, 2017, 6(4): 201-210.
- [9] 谭 鹏,张海珠,张 青,等. UPLC 法同时测定大黄中 10 个蒽醌衍生物的含量 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 928-934.
- [10] 戎晓娟,严 欢,韩 阳,等. 神香草水提物的主成分分析及含量测定 [J]. 中国药房, 2015(6): 808-810.