

HPLC法测定红毛五加中刺五加苷E

钟世红^{1,2}, 卫莹芳², 古锐^{2*}

(1 成都医学院药学院, 四川 成都 610083; 2 成都中医药大学, 四川 成都 611131)

摘要:目的 建立红毛五加药材中刺五加苷E的测定方法。方法 采用Hypersil ODS2色谱柱; 流动相: 乙腈-0.3%磷酸二氢钠水溶液梯度洗脱系统(磷酸调节pH值为3.5); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 35℃; 检测波长为207 nm。结果 刺五加苷E的线性范围为0.142~1.133 μg, 平均回收率为101.73%, RSD小于2%。结论 该方法简便、准确、重现性好, 可为红毛五加的质量控制提供参考。

关键词: 红毛五加; 刺五加苷E; 高效液相色谱

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)06-0979-03

红毛五加是五加科五加属植物红毛五加 *Acanthopanax giraldii* Harms 的干燥茎皮, 收载于《四川省中药材标准》1987年版, 具有祛风湿、强筋骨、利关节之功效^[1]。本品主产于川西高原地区, 为四川地区五加皮的习用品种和羌民族特色药材, 大量出口日韩, 极具开发价值。关于红毛五加的药理药效作用及化学成分已有较多报道, 但与其药效相关成分的质量控制方法研究较少。苷类为红毛五加的主要活性成分^[2,3], 本实验以刺五加苷E为指标成分, 建立红毛五加的定量测定方法, 以期为该药材的质量控制提供科学依据。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(Waters 2695, 美国), 高效液相色谱仪(Dionex P680 美国戴安), 超纯水器(美国 Millipore)。AS5150A型超声清洗器(天津, 功率: 180 W, 频率: 40 kHz), 雷磁 PHS-3C型 pH计(上海)。

刺五加苷E(成都曼思特生物科技有限公司, 供测定用, 质量分数≥98%), 乙腈(色谱纯, Fisher), 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

样品自采及市售, 经成都中医药大学卫莹芳教授鉴定为红毛五加 *A. giraldii* Harms 的干燥茎皮和部分药材的木心。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Hypersil ODS2 C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(大连伊利特)。流动相组成: A 乙腈-B 0.3%磷酸二氢钠水溶液(用磷酸调节pH值为3.5); 梯度条件: 0~7~15~26 min; V_A-V_B 为2:98~18:82~12:88~17:83, 二元梯度洗脱。

检测波长: 207 nm, 柱温: 35℃, 体积流量: 1.0 mL/min, 进样量: 10 μL。色谱柱理论塔板数以刺五加苷E峰计, 不得低于3 000。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取干燥至恒重的刺五加苷E对照品1.78 mg, 置于25 mL量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 配制成质量浓度为0.071 mg/mL的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 取样品粉末(过四号筛)约1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入50%甲醇25 mL, 称定质量, 超声提取30 min, 放冷, 再称定质量, 用50%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 标准曲线的绘制: 精密吸取0.071 mg/mL刺五加苷E对照品溶液2、4、8、10、16 μL进样, 测定刺五加苷E的峰面积。以进样量为横坐标, 峰面积积分为纵坐标, 绘制标准曲线, 得刺五加苷E的回归方程 $Y = 99.525X - 1.745$, ($r = 0.9999$), 其进样量在0.142~1.133 μg与峰面积呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验: 精密吸取6号样品粉末(过四号筛)制得的供试品溶液, 重复进样5次, 计算得刺五加苷E峰面积的RSD为0.25%。

2.7 重现性试验: 取6号样品粉末(过四号筛)约1.0 g, 共6份, 精密称取, 制备各供试品溶液, 进样分析, 测得刺五加苷E的峰面积, 计算得到其质量分数的平均值为0.873 mg/g, RSD为0.09%。

2.8 稳定性试验: 取6号样品粉末(过四号筛)制得的供试品溶液, 室温放置, 于0、2、4、8、12、24 h 分别

* 收稿日期: 2008-08-26

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(30701087)

作者简介: 钟世红(1980-), 女, 四川省隆昌人, 讲师, 硕士, 主要研究方向为中药品种、质量及资源研究

Tel: (028)68289198 E-mail: zhongshihong@cmc.edu.cn

* 通讯作者 古锐 Tel: (028)61800160 E-mail: Raingu_80413@sina.com

进样分析, 计算得刺五加苷 E 的峰面积 RSD 为 0.85%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 回收率试验: 取 6 号样品粉末(过四号筛)约 0.5 g, 共 6 份, 精密称取。另重新称取刺五加苷 E 对照品适量, 配制成 0.212 mg/mL 溶液, 分别精密移取该对照溶液 2.1 mL, 加入样品中, 制备供试品溶液, 依法测定, 计算得刺五加苷 E 的平均回收率为 101.73%, RSD 为 1.69%。

2.10 样品测定: 按上述方法对不同来源样品进行测定, 外标法计算刺五加苷 E, 色谱图见图 1, 结果见表 1(样品情况中的“去年枝条”示 2007 年萌发枝条, “当年枝条”示 2008 年新萌发枝条)。

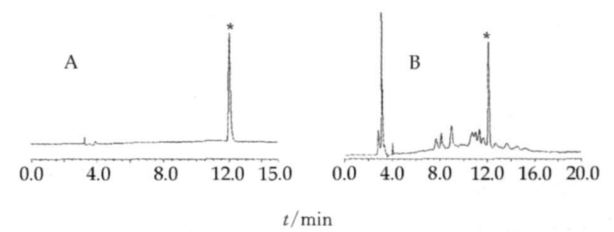


图 1 刺五加苷 E(A)和红毛五加茎皮(B)的 HPLC 色谱图
Fig 1 HPLC Chromatogram of eleutheroside E (A) and stem bark of *A. giraldii* (B)

3 讨论

3.1 测定指标的选择: 刺五加苷 E 具有显著的缓解压力作用, 刺五加苷 B(紫丁香酚苷)能增强机体非特异性抵抗力^[4,5], 原计划建立同时测定这两种成分的方法。但预实验结果表明, 红毛五加中刺五加苷 E 的量较高, 刺五加苷 B 的量普遍较低, 且分离效果不佳, 因此选择刺五加苷 E 为指标成分。另采用外标法对刺五加苷 B 量进行了估算(测定波长 220 nm, 由刺五加苷 B 对照品溶液 200~400 nm 扫描得到的最大吸收波长)。18 批商品样品中刺五加苷 B 的量均低于 0.10 mg/g, 最高量 0.36 mg/g。

3.2 色谱条件的选择: 吸取刺五加苷 E 对照品溶液注入 Waters 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 207 nm。曾考察了 Phenomenex 和 Welchrom C₁₈反相色谱柱, 在该色谱条件下刺五加苷 E 均分离良好, 使用大连伊利特 Hypersil ODS2 C₁₈柱峰形较好。

3.3 本实验对 30 余批不同来源红毛五加药材进行了刺五加苷 E 的定量测定, 其中 18 批商品药材的刺五加苷 E 量为 0.417~1.833 mg/g, 平均为 0.940 mg/g, 为保证红毛五加药材质量, 建议红毛五加茎皮中刺五加苷 E 不得低于 0.75 mg/g。

表 1 红毛五加中刺五加苷 E 的测定结果(n=2)
Table 1 Determination of eleutheroside E in *A. giraldii* (n=2)

编号	样品来源	样品情况	购买或采集时间	刺五加苷 E/ (mg·g ⁻¹)
1		统货	2007-04	1.052
2		统货	2007-05	0.864
3		统货	2008-02	1.833
4		统货	2008-03	0.761
5		统货	2008-03	0.873
6	西南药都购买	统货	2008-03	0.708
7		统货	2008-05	1.211
8		统货	2008-05	1.004
9		统货	2008-06	0.597
10		统货	2008-06	1.013
11		统货	2008-07	1.628
12	茂县民族医院	统货	2006-08	0.518
13	产 茂县	统货	2007-05	0.932
14	地 茂县三龙乡勒依村	统货	2007-07	0.512
15	购 小金县达维乡石鼓村	统货	2007-05	0.793
16	买 小金县达维乡石鼓村	统货	2008-06	0.758
17	小金县达维乡滴水村	统货	2007-06	1.442
18	小金县达维乡继英村	统货	2008-06	0.417
19	对 茂县石大关乡阳雀寨	去年枝条	2008-07	0.488
20	口 茂县石大关乡阳雀寨	木心	2008-07	0.231
21	药 小金县达维乡红军坪	当年新枝	2008-08	0.293
22	材 小金县达维乡红军坪	木心	2008-08	0.506
23	小金县达维乡木尔寨沟	当年新枝	2008-08	0.116
24	小金县达维乡木尔寨沟	木心	2008-08	0.402
25	小金县科牛村小太子坡	去年枝条	2008-08	0.197
26	小金县科牛村小太子坡	当年新枝	2008-08	0.055
27	马尔康县梭磨乡坎竹村	去年枝条(林窗)	2008-08	1.254
28	马尔康县梭磨乡坎竹村	当年枝条(林窗)	2008-08	0.301
29	马尔康县梭磨乡坎竹村	去年枝条(林下)	2008-08	1.063
30	马尔康县梭磨乡坎竹村	当年枝条(林下)	2008-08	0.286
31	红原县刷经寺镇 2 队	去年枝条(林窗)	2008-08	1.043
32	红原县刷经寺镇 2 队	当年枝条(林窗)	2008-08	0.145
33	红原县刷经寺镇 2 队	去年枝条(林下)	2008-08	0.271
34	红原县刷经寺镇 2 队	当年枝条(林下)	2008-08	0.034

3.4 红毛五加 5 月新枝萌发, 传统采收方法为每年 5 月采收去年萌发的红色枝条(即生长 1 年的枝条), 剥取茎皮, 8 月后当年新萌发枝茎皮基本变红。因受地震影响未能在传统最佳采收期(5 月)收集样品, 收集了 8 月份的去去年枝条和当年新枝。结果显示当年新枝茎皮的刺五加苷 E 量远低于老枝, 说明刺五加苷 E 在茎皮中的积累随时间而增长, 其积累规律有待进一步研究。

红毛五加种群主要生长在南偏东 100°左右的半阴半阳坡地上, 对 4 组林窗和林下样品的茎皮测定结果表明, 相同采收期林窗中茎皮的刺五加苷 E 量均高于林下样品, 说明日照有利于刺五加苷 E 的积累。

3.5 对 3 组茎皮和木心的测定结果显示, 木心中刺五加苷 E 的量在当年新枝中可达茎皮的两倍以上, 而在老枝中约为茎皮的一半。推测刺五加苷 E 在嫩枝中木质部的积累速度高于皮部, 随着枝条的生长, 刺五加苷持续积累, 但木质部的细胞增长速率高于韧皮部, 因此老枝中茎皮的刺五加苷 E 的量高于木心。木心一直被认为是非药用部位而弃去, 本实验结果显示木心中的刺五加苷 E 量较高, 应加以利用, 对于扩大药源、保护资源有积极意义。

3.6 本实验另对 15 批不同来源的红毛五加叶进行

了定量测定, 其中仅有 7 批样品中含有刺五加苷 E, 其量在 0.025 ~ 0.503 mg/g。

参考文献:

- [1] 四川省中药材标准[S], 1987
- [2] 党月兰, 龚经纬. 红毛五加总苷的镇痛作用[J]. 中国药物依赖性杂志, 1998, 7(2): 88-92
- [3] 党月兰, 骆勤, 李淑玉. 红毛五加总苷的抗炎作用[J]. 中药药理与临床, 2000, 16(1): 14-18
- [4] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上册. 上海: 上海科学技术出版社, 1995
- [5] 楼之岑, 秦波. 常用中药材品种整理和质量研究[M]. 北方编. 第 2 册. 北京: 北京大学医学出版社, 1995

HPLC 法测定赶黄草中槲皮苷、槲皮素和乔松素-7-O-葡萄糖苷

贺晓华^{1,2}, 王小淞¹, 曾建国^{1,2,*}, 罗丽娟¹, 铃木万荣³

(1 湖南省中药提取工程研究中心, 湖南 长沙 410331; 2 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410007;

3 日本丸荣贸易株式会社, 日本 东京 1010032)

摘要:目的 建立测定赶黄草中槲皮苷、槲皮素、乔松素-7-O-葡萄糖苷等黄酮类成分的分析方法。方法 用 HPLC 法; 色谱柱为 Luna-C₁₈ 柱; 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水, 梯度洗脱; 检测波长 267 nm; 体积流量 0.8 mL/min。结果 槲皮苷、槲皮素、乔松素-7-O-葡萄糖苷获得良好分离, 在 10.8 ~ 216.0, 10.4 ~ 208.0, 10.4 ~ 207.0 μ g/mL 与峰面积积分值线性关系良好; 重现性试验 RSD 分别为 0.19%、0.19%、0.12%; 加样回收率分别为 100.17%、100.06%、99.87%。结论 本方法简便快速, 精密度、分离度良好, 为赶黄草及其制剂质量标准的制定提供了可供借鉴的方法。

关键词: 赶黄草; 槲皮苷; 槲皮素; 乔松素-7-O-葡萄糖苷; 高效液相色谱

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)06-0981-03

赶黄草是虎耳草科扯根菜属植物扯根菜 *Penthorum chinense* Pursh 的干燥地上部分^[1], 为苗族民间的草药, 具有清热解毒、退黄利湿、活血散瘀、利水消肿之功效^[2], 广泛用于治疗各型肝炎、胆囊炎、脂肪肝等^[3]。赶黄草中含有黄酮类、有机酸类等成分, 其中已知并且稳定存在的为没食子酸、槲皮素^[4], 另外还有槲皮苷(槲皮素-3-O-鼠李糖苷)、乔松素-7-O-葡萄糖苷等其他黄酮成分^[5]。已有文献报道采用 HPLC 法测定赶黄草中槲皮素。本研究采用 RP-HPLC 法对赶黄草中槲皮苷、槲皮素和乔松素-7-O-葡萄糖苷 3 种黄酮成分进行了测定。实验结果表明, 该方法分离度好, 具有良好的精密度和重现性, 可为赶黄草质量标准建立提供定量测定指标。

1 仪器与试药

1.1 仪器: 高效液相色谱仪(岛津 20A); 色谱工作站(岛津 LC-Solution 系统); 超声清洗仪(昆明市超声仪器有限公司); 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 试药: 槲皮素(中国药品生物制品检定所, 质量分数为 98%, 批号 100081-200406); 槲皮苷(中国药品生物制品检定所, 质量分数为 98%, 批号 111538-200403); 乔松素-7-O-葡萄糖苷(自制, 经核磁共振、质谱等技术分析鉴定, 峰面积归一化法计算质量分数大于 98%)。实验用甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯, 试验用水为自制二次重蒸水。

1.3 药材: 赶黄草药材采于四川古蔺(药材原产地)和湖南浏阳(由四川古蔺引种, 浏阳自种), 经湖南中医药大学周日宝教授鉴定为扯根菜 *P. chinense*

* 收稿日期: 2008-10-19

基金项目: 湖南省科技厅重点项目(2007WK2003)

作者简介: 贺晓华(1983-), 女, 湖南省长沙市人, 硕士生, 研究方向为中药及其复方化学成分研究。

Tel: 013574875497 E-mail: hexiaohualuck@163.com

* 通讯作者 曾建国 Tel: (0731)4686478 E-mail: ginkgo@world-way.net