

刺五加有效成分提取工艺考察及不同产地刺五加中有效成分量的比较

樊如强^{1,2}, 傅宏征², 金学英¹, 王建斌², 高纯², 盖春燕², 胡荣^{1*}

1. 扬州大学医学院 药理学系, 江苏 扬州 225009

2. 北京大学医学部 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191

摘要: **目的** 研究刺五加有效成分的提取工艺及比较不同产地刺五加中有效成分的量。**方法** 采用 HPLC 法测定刺五加中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶。确定提取溶剂, 采用正交试验法考察加溶媒量、提取时间和提取次数对提取工艺的影响, 确定最佳提取工艺。根据最佳提取工艺, 比较不同产地刺五加中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的量。**结果** 正交试验所得的最佳提取条件为加 10 倍量的 50%乙醇, 提取 3 次, 每次 2 h。黑龙江产的刺五加所含紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶量较高。**结论** 该提取工艺合理、稳定、可行; 不同产地刺五加药材中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的量存在一定的差异。

关键词: 刺五加; 紫丁香苷; 刺五加苷 E; 异嗪皮啶; 正交试验

中图分类号: R282.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)02-0260-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.02.020

Extraction technology for active constituents in *Acanthopanax senticosus* and comparison on its contents of *A. senticosus* from various habitats

FAN Ru-qiang^{1,2}, FU Hong-zheng¹, JIN Xue-ying¹, WANG Jian-bin^{1,2}, GAO Chun¹, GAI Chun-yan¹, HU Rong²

1. Department of Pharmaceutics, School of Medical Academy, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

2. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China

Abstract: **Objective** To study the extraction technology for the active constituents from *Acanthopanax senticosus* and to compare their contents from various habitats. **Methods** The contents of syringin, eleutheroside E, and isofraxidin in *A. senticosus* were measured using HPLC method. The extracting menstrua were selected, and the influence of the menstruum dosage, extracting times, and extracting time were investigated using orthogonal design method. Based on the optimal technology, the contents of syringin, eleutheroside E, and isofraxidin in *A. senticosus* from various habitats were compared. **Results** The optimal conditions for the extraction technology were as follows: extracting for three times, each time for 2 h with 10 times the amount of 50% ethanol. *A. senticosus* produced in Heilongjiang province had higher contents of syringin, eleutheroside E, and isofraxidin. **Conclusion** This extraction technology is reasonable, stable, and feasible. The contents of syringin, eleutheroside E, and isofraxidin in *A. senticosus* from different habitats have some differences. The multi-index contents of syringin, eleutheroside E, and isofraxidin could reflect the quality of *A. senticosus* more comprehensively.

Key words: *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms; syringin; eleutheroside E; isofraxidin; orthogonal test

刺五加为五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 的干燥根和根茎或茎^[1], 商品名为五加参, 味辛、微苦, 性温, 无毒。其主要分布在中国东北、华北, 俄罗斯远东地区及日本北海道、朝鲜等地^[2]。刺五加有促性腺、

抗疲劳和防止记忆衰退等活性, 医学上被称之为“适应原”样药物^[3-7]。目前刺五加作为药物和保健食品在很多国家被广泛使用^[8-9]。

根据文献报道, 紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶是刺五加中主要的活性成分^[10-14]。世界卫生组织

收稿日期: 2013-07-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81172943)

作者简介: 樊如强 (1987—), 男, 江苏人, 硕士, 研究方向为中草药有效成分及剂型开发。E-mail: 542879140@qq.com

*通信作者 胡荣, 女, 硕士生导师。E-mail: 398563432@qq.com

织规定紫丁香苷和刺五加苷E作为刺五加质控的指标^[15],在《中国药典》2010年版中规定了紫丁香苷、刺五加苷E和异嗪皮啶在刺五加浸膏中的量^[1]。目前市场上的刺五加药材产地很多,有效成分量差异很大,所以有必要建立一个多指标的测定方法。为了提高刺五加药材的利用率和判断药材的优劣,本实验以多指标(紫丁香苷、刺五加苷E和异嗪皮啶)来考察刺五加提取工艺,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法对刺五加有效成分的提取工艺进行探讨研究,确定最佳提取工艺条件。根据最佳提取工艺,对6个不同产地的刺五加中紫丁香苷、刺五加苷E和异嗪皮啶的量进行比较分析。

1 仪器与试剂

Waters e2695 Separations Module HPLC (美国Waters公司), Waters 2998 PAD 紫外检测器 (美国Waters公司,含真空脱气、高压二元梯度泵、恒温自动进样器、柱温箱), Empower 2 色谱管理系统; 旋转蒸发器 (巩义市英峪高科仪器厂); DZTW 型调温电热套 (北京市永光明医疗仪器厂); 分析天平 (Sartorius CPA225D); 超声清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

刺五加来源于河南、山西、安徽、黑龙江、湖北蕲春和武穴6个产地,经北京大学药学院天然药物及仿生药物国家重点实验室傅宏征教授鉴定为五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms, 标本存放于北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室; 紫丁香苷 (批号111574-200603)、刺五加苷E (批号111713-200502)、异嗪皮啶 (批号110837-201005) 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈 (色谱纯); 甲醇 (色谱级); 双蒸水; 其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 紫丁香苷、刺五加苷E和异嗪皮啶的测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C_{18} 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 0.05%三氟乙酸水溶液-乙腈 (0→20 min, 90:10→80:20; 20→30 min, 80:20→75:25; 30→40 min, 75:25→90:10; 40→50 min, 90:10); 检测波长: 265 nm (紫丁香苷), 210 nm (刺五加苷E), 344 nm (异嗪皮啶); 体积流量 1 mL/min; 柱温 25 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取紫丁香苷 23.60 mg、刺五加苷E 11.20 mg 和异嗪皮啶 13.20

mg, 分别加 50%甲醇溶解于 100 mL 量瓶中, 超声, 溶解后以 50%甲醇定容, 得质量浓度为 236 μ g/mL 的紫丁香苷、112 μ g/mL 的刺五加苷E 和 132 μ g/mL 的异嗪皮啶对照品储备液。

2.1.3 供试品溶液制备 取适量的提取液蒸去溶剂, 置于 100 mL 量瓶中, 加 50%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.4 标准曲线制备 分别吸取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 已配置好的 3 种对照品储备液, 置 10 mL 量瓶中, 用 50%甲醇定容至刻度, 摇匀, 分别吸取 10 μ L, 注入液相色谱仪, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图, 以每个对照品的质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线。紫丁香苷的回归方程为 $Y=23\ 270 X+2\ 432.9$, $r=0.999\ 9$; 刺五加苷E的回归方程为 $Y=78\ 974 X-15\ 878$, $r=0.999\ 9$; 异嗪皮啶的回归方程为 $Y=30\ 330 X+287.6$, $r=0.999\ 7$ 。结果表明, 紫丁香苷在 4.72~23.6 μ g/mL, 刺五加苷E 在 2.24~11.2 μ g/mL, 异嗪皮啶在 2.64~13.2 μ g/mL, 其质量浓度与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 取 23.6 μ g/mL 紫丁香苷、11.2 μ g/mL 刺五加苷E 和 13.2 μ g/mL 异嗪皮啶对照品溶液, 重复进样 6 次, 结果紫丁香苷、刺五加苷E 和异嗪皮啶的平均峰面积 RSD 分别为 0.6%、0.8% 和 0.5%。

2.1.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 于 0、2、4、6、8、10、12 h 分别进样, 每次进样 10 μ L, 按上述色谱条件测定峰面积, 结果紫丁香苷、刺五加苷E 和异嗪皮啶峰面积的 RSD 分别为 1.2%、0.9% 和 1.3%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一供试品溶液 6 份, 分别进样, 结果紫丁香苷、刺五加苷E 和异嗪皮啶的平均质量浓度分别为 30.29、19.15、3.85 μ g/mL, RSD 分别为 0.9%、0.8%、1.2%。

2.1.8 加样回收率试验 精密量取 6 份已测定的同一供试品溶液 1 mL, 分别加入到 10 mL 的量瓶中, 分别精密加入等体积的紫丁香苷、刺五加苷E 和异嗪皮啶适量, 用 50%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 依法测定各供试品溶液中紫丁香苷、刺五加苷E 和异嗪皮啶的量, 计算紫丁香苷、刺五加苷E 和异嗪皮啶的平均回收率分别为 99.5%、99.4%、99.2%, RSD 分别为 0.9%、1.3%、1.1%。

2.1.9 样品测定 分别吸取对照品与供试品溶液,

按上述色谱条件测定, 计算紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的量。

2.2 提取溶剂的选择

分别称取黑龙江产刺五加 4 份, 每份 100 g, 每份分别用水、50%、75%、95%乙醇回流提取 1 h, 溶媒量均为药材的 10 倍, 取适量的上述提取液浓缩成一定体积, 根据“2.1”项下 3 个指标成分测定方法, 比较 4 种提取液中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的量, 结果见表 1。

表 1 不同溶媒提取物中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的量 ($n = 3$)

Table 1 Contents of syringin, eleutheroside E, and isofraxidin in different menstruum extracts ($n = 3$)

溶 媒	紫丁香苷 / %	刺五加苷 E / %	异嗪皮啶 / %
水	0.401	0.271	0.031
50%乙醇	0.612	0.383	0.082
75%乙醇	0.582	0.332	0.073
95%乙醇	0.473	0.221	0.062

2.3 提取条件的选择

根据上述单因素试验, 确定了药材提取所需的溶媒。根据一般中药的提取条件, 采用正交试验法, 选取溶媒量 (A)、提取时间 (B)、提取次数 (C) 3 个因素, 设计每个因素 3 个水平的试验方案, 因素水平表见表 2。分别取刺五加 100 g, 以紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的质量分数为评价指标, 综合评分, 选用 $L_9(3^4)$ 正交试验表安排实验, 计算 K 值与 R 值, 并进行方差分析。

表 2 因素与水平

Table 2 Factors and levels

水平	因素		
	A / 倍	B / h	C / 次
1	8	1	1
2	10	1.5	2
3	12	2	3

2.4 正交试验分析

正交试验结果见表 3, 由直观分析可知, 紫丁香苷的提取率最优工艺为 $A_2B_3C_2$, 刺五加苷 E 的提取率最优工艺为 $A_2B_3C_3$, 异嗪皮啶的提取率最优工艺为 $A_2B_3C_2$ 。从方差分析结果 (表 4) 可知, 本实验的 3 个因素都对紫丁香苷的得率有显著性影响, 对异嗪皮啶的提取率无显著性影响, 提取次数对刺

五加苷 E 有显著性影响, 为了使 3 个指标成分的提取率尽可能大, 选择提取次数为 3 次。综上所述, 确定最佳工艺为 $A_2B_3C_3$, 即加入 10 倍量的 50%乙醇, 提取次数 3 次, 每次 2 h。

2.5 验证试验

为验证上述结果的准确性, 保证提取工艺的合理可行, 按上述已确定最佳工艺条件, 分别取 3 个批次的刺五加药材各 100 g, 进行结果验证试验, 结果显示, 紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的量分别为 0.874 4、0.498 8、0.120 3 mg/g, 结果表明, 该工艺稳定、合理、可靠, 可为工业生产提供理论依据。

2.6 不同产地有效成分的测定

分别称取湖北武穴、安徽、湖北蕪春、黑龙江、河南和山西的刺五加根皮各 50 g, 按照“2.4”项确定的提取工艺, 对各个产地的刺五加提取液进行测定, 结果见表 5 和图 1。

由表 5 的测定结果可以看出, 不同产地的刺五加中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的质量分数差异较大。黑龙江的刺五加 3 种指标成分质量分数最高, 山西产的刺五加所含紫丁香苷最低, 安徽产的刺五加所含刺五加苷 E 最低, 湖北产的刺五加所含异嗪皮啶最低。

3 讨论

据现有文献表明^[16-18], 刺五加提取都是以刺五加中单个成分或 2 个成分作为考察指标, 本实验首次以刺五加药材中含有的 3 个主要成分作为考察指标, 考察刺五加的提取工艺, 为中药的质量标准提供参考。

比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-三氟乙酸水溶液和乙腈-三氟乙酸水溶液流动相系统的洗脱情况, 发现以甲醇-水或甲醇-三氟乙酸水溶液作为流动相时, 紫丁香苷都不能实现基线分离, 以乙腈-水作为流动相, 异嗪皮啶有拖尾现象, 故选择乙腈-三氟乙酸水作为流动相; 为了使 3 个指标成分在 30 min 内出峰, 选择乙腈-三氟乙酸水溶液梯度洗脱。

在《中国药典》2010 年版中, 刺五加中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的测定的检测波长都是 220 nm, 而本实验以三波长法, 分别以紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的最大吸收波长作为检测波长, 能够更好地测定刺五加药材中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的量。

表 3 正交试验设计与结果

Table 3 Design and results of orthogonal test

试验号	因素				质量分数 / %		
	A	B	C	D (空白)	紫丁香苷	刺五加苷 E	异嗪皮啶
1	1	1	1	1	0.431	0.311	0.102
2	1	2	2	2	0.772	0.462	0.184
3	1	3	3	3	0.851	0.471	0.224
4	2	1	2	3	0.733	0.455	0.204
5	2	2	3	1	0.862	0.483	0.242
6	2	3	1	2	0.681	0.402	0.186
7	3	1	3	2	0.602	0.476	0.170
8	3	2	1	3	0.463	0.371	0.122
9	3	3	2	1	0.825	0.482	0.246
紫丁香苷	K_1	2.055	1.767	1.575	2.118		
	K_2	2.277	2.097	2.331	2.046		
	K_3	0.189	2.358	2.316	2.046		
	k_1	0.685	0.589	0.525	0.706		
	k_2	0.759	0.699	0.777	0.685		
	k_3	0.630	0.786	0.772	0.682		
	R	0.129	0.197	0.252	0.024		
刺五加苷 E	K_1	1.245	1.242	1.083	1.275		
	K_2	1.341	1.317	1.398	1.341		
	K_3	1.329	1.356	1.431	1.296		
	k_1	0.415	0.414	0.361	0.425		
	k_2	0.447	0.439	0.466	0.447		
	k_3	0.443	0.452	0.477	0.432		
	R	0.032	0.038	0.116	0.022		
异嗪皮啶	K_1	0.510	0.456	0.411	0.591		
	K_2	0.633	0.549	0.633	0.519		
	K_3	0.519	0.657	0.615	0.549		
	k_1	0.170	0.152	0.137	0.197		
	k_2	0.211	0.183	0.211	0.173		
	k_3	0.173	0.219	0.205	0.183		
	R	0.041	0.067	0.074	0.024		

表 4 方差分析

Table 4 Analysis of variance

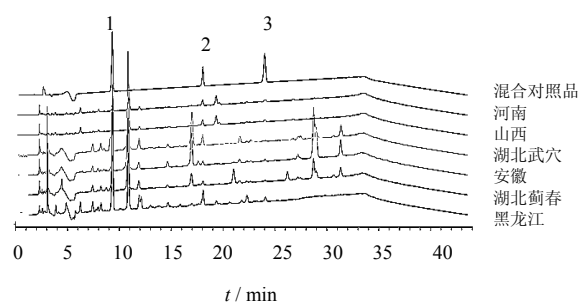
项目	方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F	显著性
紫丁香苷	A	0.025	2	0.013	25	$P < 0.05$
	B	0.058	2	0.029	58	$P < 0.05$
	C	0.124	2	0.062	124	$P < 0.01$
	误差	0.001	2	0.001		
	总和	0.208	8			
刺五加苷 E	A	0.002	2	0.001	2	
	B	0.002	2	0.001	2	
	C	0.024	2	0.012	24	$P < 0.05$
	误差	0.001	2	0.001		
	总和	0.029	8			
异嗪皮啶	A	0.003	2	0.002	3	
	B	0.007	2	0.004	7	
	C	0.010	2	0.005	10	
	误差	0.001	2	0.001		
	总和	0.021	8			

$F_{0.05}(2, 2) = 19.0$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.0$

表5 不同产地刺五加指标成分的测定结果 (n = 3)

Table 5 Determination of index components in *A. senticosus* from different habitats (n = 3)

产地	质量分数 / %		
	紫丁香苷	刺五加苷 E	异嗪皮啶
河南	0.085	0.049	0.011
山西	0.073	0.045	0.009
湖北武穴	0.228	0.095	0.001
安徽	0.227	0.037	0.002
湖北蕪春	0.164	0.039	0.001
黑龙江	0.515	0.134	0.025



1-紫丁香苷 2-刺五加苷 E 3-异嗪皮啶
1-syringin 2-eleutheroside E 3-isofraxidin

图1 混合对照品与不同产地刺五加 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances and *A. senticosus* from different habitats

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 周以良. 黑龙江树木志 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1986.
- [3] Breakhman I I, Dardymov I V. New substances of plant origin which increase nonspecific resistance [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1969, 9: 419-430.
- [4] 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.
- [5] Davydov M, Krikorian A D. *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. (Araliaceae) as an adaptogen: A closer look [J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 72(3): 345-393.

- [6] Weng S, Tang J, Wang J, *et al.* Comparison of the addition of Siberian Ginseng (*Acanthopanax senticosus*) versus Fluoxetine to Lithium for the treatment of bipolar disorder in adolescents: A randomized, double-blind trial [J]. *Curr Ther Res*, 2007, 68(4): 280-290.
- [7] Panossian A, Wagner H. Stimulating effect of adaptogens: An overview with particular reference to their efficacy following single dose administration [J]. *Phytother Res*, 2005, 19(10): 819-838.
- [8] Liu K Y, Wu Y C, Liu I M, *et al.* Release of acetylcholine by syringin, an active principle of *Eleutherococcus senticosus*, to raise insulin secretion in Wistar rats [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 434(2): 195-199.
- [9] Niu H S, Hsu F L, Liu I M. Role of sympathetic tone in the loss of syringin-induced plasma glucose lowering action in conscious Wistar rats [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 445(1): 113-116.
- [10] Kimura Y, Sumiyoshi M. Effects of various *Eleutherococcus senticosus* cortex on swimming time, natural killer activity and corticosterone level in forced swimming stressed mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 95(2/3): 447-453.
- [11] Liu J, Tian J, Tian X, *et al.* Interaction of isofraxidin with human serum albumin [J]. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12(2): 469-474.
- [12] 龚婧如, 王书芳. 刺五加的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(12): 2337-2341.
- [13] Yamazaki T, Tokiwa T, Shimosaka S, *et al.* Anti-inflammatory effects of a major component of *Acanthopanax senticosus* Harms, isofraxidin [J]. *Jpn J Electro*, 2004, 48(2): 55-58.
- [14] 张 涛, 朴俊虹, 袁 蕾, 等. 刺五加化学成分及自由基清除活性研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(6): 1057-1060.
- [15] Doe J. *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants* [M]. Geneva: *World Health Organization*, 1999.
- [16] 邱建永, 许曼娇, 叶雁波. 正交试验优选刺五加有效成分微波提取工艺 [J]. *广东药学院学报*, 2012, 28(4): 403-405.
- [17] 陆兔林, 马新飞, 毛春芹, 等. 刺五加药材提取工艺的研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2006, 40(4): 59-61.
- [18] 邵佳锋, 刘树民, 牟 洪, 等. 刺五加根及根茎中紫丁香苷、刺五加苷 E 的提取工艺 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(4): 5-7.