

[15] Chun M H, Kim E K, Lee K R, et al. Quality control of *Schizonepeta tenuifolia* Briq by solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry and principal component analysis

[J]. *Microchem J*, 2010, 95: 25-31.

[16] 周玉新. 中药指纹图谱研究技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.

红毛五加皮的 HPLC 指纹图谱研究

钟世红¹, 卫莹芳², 古 锐^{2*}, 熊玲娟¹

(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 建立红毛五加皮的 HPLC 指纹图谱。方法 Welchrom C₁₈ 色谱柱, 乙腈-0.3% 磷酸二氢钠水溶液梯度洗脱系统(加磷酸调节 pH 值约为 3.5) 检测波长 207 nm; 柱温 35 °C。结果 对 47 批红毛五加皮指纹图谱进行评价, 确定了 17 个共有峰, 指认了第 8、9、13 号色谱峰分别对应为绿原酸、刺五加苷 B 和刺五加苷 E, 其中刺五加苷 E 为第一大色谱峰。从峰面积比较, 林窗样品总峰面积大于林下样品; 两年生茎皮中刺五加苷 E 峰面积远大于一年生样品。结论 本研究可为红毛五加皮质量控制提供参考。日照有利于红毛五加皮中成分的积累, 刺五加苷 E 在茎皮生长的第二年积累迅速。

关键词:红毛五加皮; 指纹图谱; HPLC; 刺五加苷 E; 绿原酸

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-4528(2011)05-0737-05

HPLC fingerprint of *Acanthopanax giraldii* Cortex

ZHONG Shi-hong¹, WEI Ying-fang², GU Rui^{2*}, XIONG Ling-juan¹

(1. Pharmaceutical School, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China; 2. Chengdu University of TCM, Chengdu 611131, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC fingerprint of *Acanthopanax giraldii* Cortex. **METHODS** Separation was performed on Welchrom-C₁₈ chromatographic column, acetonitrile-0.3% sodium dihydrogen phosphate as mobile phase with gradient elution. The detection wavelength was set at 207 nm, the column temperature was 35 °C. **RESULTS** Seventeen common chromatographic peaks were set up among forty-seven batches of *Acanthopanax giraldii* Cortex. The identified peaks No. 8, 9, 13 were chlorogenic acid, eleutheroside B and eleutheroside E, respectively. The peak of eleutheroside E was the greatest one in the fingerprint chromatogram. The total peaks area of the samples from the forest gap were larger than those from the wood land, and the peak area of eleutheroside E of biennial samples was far away larger than those of annual samples. **CONCLUSION** The study can provide reference material for the quality control of *Acanthopanax giraldii* Cortex. Sunshine is good for its component accumulation, the amount of eleutheroside E accumulates quickly in stem bark during the growth of the second year.

KEY WORDS: *Acanthopanax giraldii* Cortex; fingerprint; HPLC; eleutheroside E; chlorogenic acid

红毛五加皮为五加科红毛五加 *Acanthopanax giraldii* Harms 密生刺毛的茎皮, 收载于《四川省中药材标准》^[1], 具有祛风湿、强筋骨、利关节之功效, 现代研究证实具有抗炎、抗肿瘤、增强免疫、抗辐射等作用。本品为四川地区的习用药材和岷江上游羌

民族特色药材^[2], 亦大量出口日韩, 极具开发价值。

红毛五加皮中主要含有苷类和多糖等, 其中苷类成分为红毛五加皮抗炎的主要活性成分^[3]。目前, 红毛五加皮的质量控制方法多为测定其中某种或某类成分^[4-6]。中药材的指纹图谱具有整体性与

收稿日期: 2010-04-01

作者简介: 钟世红(1980—), 女, 讲师, 研究方向: 中药品种、质量与资源。

* 通信作者: 古 锐(1979—), 男, 副研究员, 研究方向: 民族药可持续开发与利用。Tel: 15108237310

模糊性的特点,可避免单一成分测试的不足,能提供更全面的信息。本实验采用 HPLC 法建立了红毛五加皮的指纹图谱,以期完善其质量评价体系,为进一步开发利用提供技术支撑。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 高效液相色谱仪(Waters2695,美国),高效液相色谱仪(DionexP680 美国戴安),超声清洗器(AS5150A 天津,功率:180 W,频率:40 kHz),电子天平(Sartorius BS224S 北京),雷磁 PHS-3C 型 pH

计(上海)。

1.2 样品与试剂 样品采自阿坝州或购买,经成都中医药大学卫莹芳教授鉴定为红毛五加 *Acanthopanax giraldii* Harms 的干燥茎皮,见表 1。刺五加苷 E 购自成都曼思特生物科技有限公司(纯度 ≥ 98%);绿原酸(中国药品生物制品检定所,批号 110753-200413)。乙腈(色谱纯, Fisher),水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

表 1

红毛五加皮样品来源

Tab. 1

Sources of *Acanthopanax giraldii* Cortex

茎皮样品 编号	样品来源、产地及生长状态	采集/购买 年月	茎皮样品 编号	样品来源、产地及生长状态	采集/购买 年月
1	购自成都荷花池药材市场	2006	25	采自茂县石大关乡阳雀寨 老枝	2008-10
2	购自成都荷花池药材市场	2007	26	采自茂县石大关乡阳雀寨 极老枝	2008-10
3	购自成都荷花池药材市场	2007	27	采自茂县三龙乡勒依村若窝组贝母山	2008-11
4	购自成都荷花池药材市场	2007	28	采自茂县三龙乡勒依村若窝组贝母山	2008-11
5	购自成都荷花池药材市场	2007	29	采自小金县达维乡红军坪	2008-08
6	购自成都荷花池药材市场	2007	30	采自小金县达维乡木尔寨沟	2008-08
7	购自成都荷花池药材市场	2007	31	采自小金县科牛村香路堂沟	2008-08
8	购自成都荷花池药材市场	2007	32	采自小金县科牛村小太子坡 老枝	2008-08
9	购自成都荷花池药材市场	2007	33	采自小金县科牛村小太子坡 新枝	2008-08
10	购自成都荷花池药材市场	2008	34	采自小金县科牛村小太子坡 老枝	2008-08
11	购自成都荷花池药材市场	2008	35	采自小金县科牛村小太子坡 老枝	2008-08
12	购自惠康饮片厂饮片	2008	36	采自小金县日隆镇双桥沟 老枝	2008-09
13	购自茂县民族医院	2006-08	37	采自小金县日隆镇双桥沟 新枝	2008-09
14	购自茂县	2007-05	38	采自马尔康县梭磨乡砍竹村 林窗 老枝	2008-08
15	购自茂县三龙乡勒依村	2007-07	39	采自马尔康县梭磨乡砍竹村 林窗 新枝	2008-08
16	购自小金县达维乡石鼓村	2007-05	40	采自马尔康县梭磨乡砍竹村 林下 老枝	2008-08
17	购自小金县达维乡石鼓村	2008-06	41	采自马尔康县梭磨乡砍竹村 林下 新枝	2008-08
18	购自小金县达维乡滴水村	2007-06	42	采自红原县刷经寺镇 329 沟 老枝	2008-08
19	购自小金县达维乡滴水村	2007-06	43	采自红原县刷经寺镇 329 沟 新枝	2008-08
20	购自小金县达维乡继英村	2008-06	44	采自红原县刷经寺镇 2 队 林窗 老枝	2008-08
21	采自茂县三龙乡勒依村若窝组余独活沟	2008-05	45	采自红原县刷经寺镇 2 队 林窗 新枝	2008-08
22	采自茂县石大关乡阳雀寨	2008-07	46	采自红原县刷经寺镇 2 队 林下 老枝	2008-08
23	采自茂县石大关乡小牛寨	2008-10	47	采自红原县刷经寺镇 2 队 林下 新枝	2008-08
24	采自茂县石大关乡阳雀寨 新枝	2008-10			

注“新枝”表示当年萌发枝,茎皮绿色,密被红色皮刺。“老枝”表示去年萌发枝,茎皮红褐色至黄褐色,被红色皮刺。“极老枝”表示前年及其之前萌发枝,茎皮灰白,几无刺。“林窗”:又作林隙或林冠空隙,是指森林群落中老龄树死亡或因偶然性因素(如砍伐,火灾等)导致成熟阶段优势树种死亡,从而在林冠层造成空隙的现象。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Welchrom C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm);流动相为 A 乙腈-B 0.02 mol/L 磷酸二氢钠水溶液(加磷酸调节 pH 值约为 3.5),梯度洗脱程序见表 2;检测波长:207 nm;柱温:35 °C;记录色谱图 70 min;进样量:10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 取刺五加苷 E 及绿原酸适量,精密称定,加 75% 甲醇配制成含刺五加苷 E 0.070 8 mg/mL 和绿原酸 0.135 2 mg/mL 的混合对照品溶液。

表 2 梯度洗脱程序

Tab. 2

Gradient elution program

	时间/min						
	0	15	25	35	45	60	70
A/%	2	6	9	13	17	25	25
体积流量/ (mL/min)	0.8	0.8	1.2	1.0	0.8	1.0	1.0

2.3 供试品溶液的制备 取红毛五加皮(中粉) 1.0 g,精密称定,加入 75% 甲醇 30 mL,称定质量,超声提取 30 min,放冷,再称定质量,用溶剂补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 重复性试验 取11号样品1.0g,共6份,按2.3项下方法制备各供试品溶液,进样测定,各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积RSD值均小于3%,经相似度软件处理,6批样品相似度均大于0.999,表明方法的重复性良好。

2.4.2 精密度试验 取11号样品制备的同一供试品溶液,连续进样5次,各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积RSD值均小于3%,经相似度软件处理,相似度均大于0.999,表明方法的精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取11号样品制备的同一供试品溶液,分别在0、2、4、8、12、24h进样测定,各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积RSD值均小于3%,经相似度软件处理,相似度均大于0.999,表明供试品溶液在24h内稳定。

2.5 红毛五加皮指纹图谱的建立及分析

2.5.1 红毛五加皮指纹图谱及共有峰的标定 按上述确定的条件,分别制备供试品溶液,各进样分析,采用“matlab 6.5.1 计算机辅助相似度评价系统”软件,对47批红毛五加皮茎皮的指纹图谱进行评价,生成对照指纹图谱(图1)。

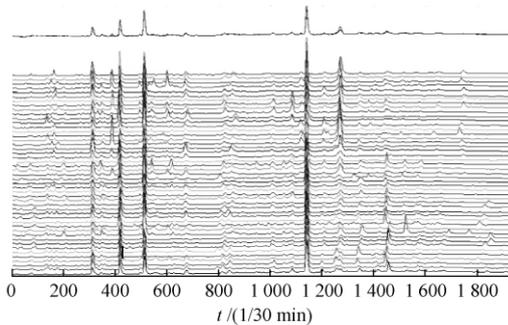


图1 红毛五加皮的指纹图谱

Fig.1 HPLC chromatogram of *Acanthopanax giraldii* Cortex

共确定了17个共有色谱峰,7、8、13号色谱峰为3个主要色谱峰。经与对照品色谱图相对照,结合二级管阵列检测器对色谱峰的光谱图进行分析,指认了红毛五加皮指纹图谱中的第8、9、13号色谱峰分别对应为绿原酸、刺五加苷B和刺五加苷E。7号色谱峰的波谱特征显示其为一种咖啡酰类化合物,见图2。

2.5.2 红毛五加皮样品指纹图谱分析 计算47批不同来源样品的相似度、各样品17个共有峰总面积占总峰面积的百分比,并统计各样品的色谱峰数目,见表3。

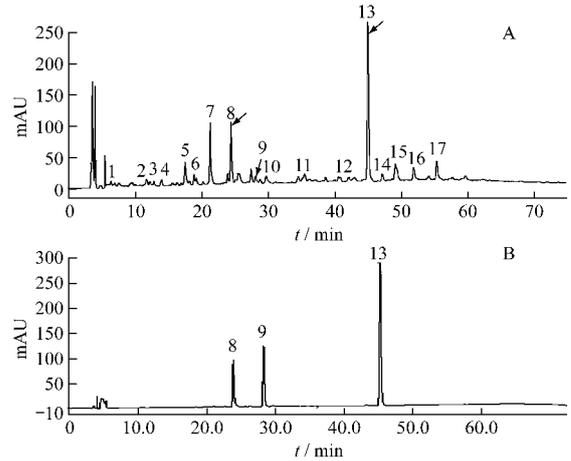


图2 红毛五加皮 HPLC 指纹图谱(A)及对照品色谱图(B)
Fig.2 HPLC chromatogram of *Acanthopanax giraldii* Cortex and reference substance(B)

8. 绿原酸 9. 刺五加苷 B 13. 刺五加苷 E
8. chlorogenic acid 9. eleutheroside B 13. eleutheroside E

由相似度计算结果结合样品来源(表1)可知,绝大部分商品药材的相似度较高;同一产地自采样品中老枝茎皮的相似度普遍高于新枝茎皮;不同产地样品中小金县样品之间(样31、32、33、35、36、37)、红原县样品之间(样42、45、46、47)的相似度较接近。统计17个共有峰总面积与总峰面积的比值,其中32个样品的共有峰总面积百分比大于80%,最高达89.15%。样品色谱峰数为30~44。

2.5.3 红毛五加皮的内、外层指纹图谱分析 红毛五加皮可剥离为内外两层,外层包括表皮、下皮层、木栓层和皮层外侧;内层包括皮层内侧和韧皮部。对红毛五加的完整茎皮(22号样)及其内、外层分别进行了指纹图谱比较分析(图3)。

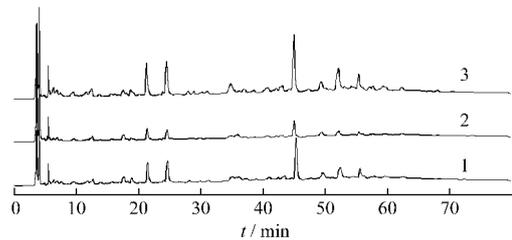


图3 红毛五加皮及其内、外层指纹图谱比较
Fig.3 HPLC chromatogram of *Acanthopanax giraldii* Cortex and its inner and outer layer

1. 完整茎皮 2. 茎皮外层 3. 茎皮内层
1. whole bark 2. outer layer 3. inner layer

分析可知,茎皮内外层的成分种类基本一致,但内层成分质量分数远高于外层。

表 3 样品相似度、共有峰总面积百分比及色谱峰数目

Tab. 3 Similarity, total area percentage of common peak and peaks number of all samples

样品 编号	相似度	共有峰总面积 百分比/%	色谱 峰数	样品 编号	相似度	共有峰总面积 百分比/%	色谱 峰数
1	0.941	81.82	40	25	0.946	86.02	35
2	0.899	86.50	39	26	0.911	83.79	33
3	0.941	82.36	40	27	0.831	80.68	37
4	0.917	79.87	40	28	0.812	82.92	36
5	0.921	80.02	38	29	0.718	81.83	39
6	0.848	85.84	41	30	0.691	84.48	36
7	0.945	74.29	42	31	0.587	83.13	36
8	0.935	48.82	41	32	0.704	81.96	37
9	0.873	69.55	36	33	0.639	70.12	40
10	0.910	75.90	36	34	0.882	87.23	36
11	0.935	84.20	37	35	0.609	84.24	33
12	0.894	68.91	44	36	0.711	86.82	37
13	0.901	77.66	40	37	0.642	81.09	37
14	0.962	77.07	42	38	0.927	81.77	39
15	0.876	88.77	34	39	0.695	68.58	43
16	0.940	78.67	41	40	0.942	85.05	38
17	0.910	82.01	37	41	0.765	69.44	35
18	0.940	84.18	37	42	0.726	82.83	39
19	0.942	89.15	34	43	0.478	82.40	40
20	0.910	85.11	39	44	0.919	71.11	39
21	0.930	82.34	37	45	0.704	49.41	33
22	0.912	83.46	31	46	0.744	88.30	35
23	0.907	85.28	30	47	0.699	77.30	32
24	0.803	81.42	35				

3 讨论

3.1 色谱条件的选择 分别比较了磷酸水溶液、醋酸水溶液、磷酸盐缓冲液与乙腈或甲醇的二元梯度洗脱系统,最终确定以乙腈-0.02 mol/L 磷酸二氢钠水溶液(加磷酸调节 pH 值约为 3.5)作为流动相的效果最好,色谱峰数目较多且峰形较好。分别比较了迪马钻石 C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、Hyper-sil ODS2 C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 大连伊利特)、Welchrom C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),三种色谱柱均能分离样品,其中以 Welchrom C₁₈柱色谱峰较多,分离度好,遂选择该柱用作红毛五加皮指纹图谱分析。使用 DAD 检测器进行 200 ~ 400 nm 波段扫描,综合考虑色谱峰的数目、高度,及紫外吸收效应,选择 207 nm 为最佳测定波长。

3.2 红毛五加皮指纹图谱分析 对 27 批采自阿坝州 4 县 7 乡镇的对口药材、11 批市场购买药材、8 批产地购买药材,1 批饮片,共计 47 批红毛五加皮样品进行了 HPLC 指纹图谱分析。确定了 17 个共有色谱峰。根据各色谱峰的波谱特征,结合文献报道可知,该指纹图谱中主要成分为以刺五加苷 E 为代表的苷类成分和以绿原酸为代表的咖啡酰类成分。苷类成分为红毛五加皮的主要活性成分,具有抗

炎^[3]、镇痛^[7]、抗疲劳、抗辐射等作用^[8];咖啡酰类成分具有抗氧化^[9]、抗炎^[10]、保肝^[11]等作用。

指认了第 8、9、13 号色谱峰分别对应为绿原酸、刺五加苷 B 和刺五加苷 E。其中刺五加苷 E 为第 1 大色谱峰,其峰面积与总峰面积比值为 0.84% ~ 27.27%,平均为 14.46% (15 个样品该比值小于 10%,其中 7 个样品为新枝茎皮,3 个样品为老枝茎皮;14 个样品该比值大于 20%,其中 1 个样品为新枝茎皮,7 个样品为老枝茎皮;商品药材的该比值均大于 10%);绿原酸为第 2 大色谱峰,其峰面积与总峰面积比值为 5.21% ~ 20.77%,平均为 11.68%;刺五加苷 B 的峰面积与总峰面积比值为 0.13% ~ 2.31%,平均比值 0.61% (其中 7 个样品无此色谱峰;7 个样品该比值大于 1%,仅 1 个样品该比值大于 2%)。

对不同来源样品的相似度进行计算,结果表明绝大部分商品药材的相似度较高;同一产地自采样品中老枝茎皮的相似度普遍高于新枝茎皮。这是由于商品药材多为传统采收方法获得,即每年 5 月采收上一年萌发的枝条茎皮,为两年生茎皮^[12],老枝茎皮亦为两年生茎皮,因此两年生茎皮在 47 批样品中占主要比例,相似度较高。新枝茎皮(1 年生茎

皮)相似度相对较低,说明茎皮生长的第1、2年成分积累量差别较大。

3.3 光照对样品指纹图谱的影响分析 比较了4组分别采自同一样方的林窗和林下样品的指纹图谱(样38与40;39与41;44与46;45与47),林窗样品的绝大部分色谱峰面积均大于林下样品。前者与后者相比,总峰面积比分别为114%、180%、130%、118%;其中刺五加苷E峰面积比为113%、155%、124%、145%;绿原酸峰面积比为120%、141%、156%、345%。表明日照有利于红毛五加皮中成分的积累。

3.4 生长年龄对样品指纹图谱的影响分析 比较了8组分别采自相同样方的新、老枝样品的指纹图谱(样24与25;33与32;37与36;39与38;41与40;43与42;45与44;47与46),后者与前者相比,总峰面积比分别为139%、65%、94%、74%、117%、102%、109%、100%;其中刺五加苷E峰面积比为320%、361%、116%、330%、311%、135%、570%、535%;绿原酸峰面积比为151%、121%、80%、107%、117%、86%、234%、242%。比较了1组采自相同样方的新枝、老枝及极老枝样品的指纹图谱(样24、25与26),三者总峰面积比为66:94:100;刺五加苷E峰面积比为25:85:100;绿原酸峰面积比为81:123:100。综合分析可知,刺五加苷E在新枝茎皮中的质量分数远远低于老枝,提示该成分在茎皮生长的第二年有一个快速积累期;而绿原酸的积累趋势相对平稳。

3.5 产地加工方法的影响 红毛五加皮的产地加工方法为:采集密生刺毛的新鲜枝条,趁鲜砸破,抽去木心。这样剥离茎皮较完整且省力,枝条若放干后剥皮,茎皮内层(即皮层内侧部分及韧皮部)紧贴

木心不易剥下。而从分析测定可知,茎皮内层为成分质量分数较高的部分。因此,剥离完整茎皮,除了药材性状需要,对于保证药材质量具有重要意义。

参考文献:

- [1] 四川省卫生厅. 四川省中药材标准[S]. 1987:103-104.
- [2] 古锐,张艺,王战国,等. 羌族地区红毛五加药用民族植物学研究[J]. 中国民族医药杂志, 2006, 12(5):48-50.
- [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] 钟世红,卫莹芳,古锐. 红毛五加中刺五加苷E含量测定[J]. 中草药, 2009, 40(6):979-981.
- [5] 王祝伟,张庆海,张莅峡,等. 高效液相色谱法测定红毛五加中绿原酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(7):765-768.
- [6] 李厚聪,李莹,孟庆艳,等. 川产藏药材红毛五加不同采收期中多糖的含量测定[J]. 西南民族大学学报:自然科学版, 2009, 35(3):511-513.
- [7] 许国敏,郑加嘉,黄东亮,等. 红毛五加总苷对大鼠体内疼痛介质的影响[J]. 深圳中西医结合杂志, 2008, 18(6):329-333.
- [8] 楼之岑主编. 常用中药材品种整理与质量研究(北方编):第2册[M]. 北京大学医学出版社, 2003:671-760.
- [9] Maruta Y, Kawabata J, Niki R. Antioxidative caffeoylquinic acid derivatives in the roots of burdock (*Arctium lappa* L.) [J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43(10):2592.
- [10] Melzig M F, Loser B, Ciesielski S. Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants [J]. *Pharmazie*, 2001, 56(12):967.
- [11] Xiang T, Xiong Q B, A Ketut D I, et al. Studies on the hepatocyte protective activity and the structure-activity relationships of quinic acid and caffeic acid derivatives from the flower buds of *Lonicera bournei* [J]. *Planta Med* 2001, 67(4):322.
- [12] 古锐,钟世红,何彪,等. 川西高原红毛五加种群年龄结构及生物量积累研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(13):1666-1669.