

## 南北五味子中木脂素类成分含量的比较

柯华香<sup>1,2,3</sup>, 李化<sup>2,3</sup>, 苏建春<sup>2,4</sup>, 罗世兰<sup>2,4</sup>, 李玲<sup>1</sup>, 何宇新<sup>1\*</sup>, 杨滨<sup>2,3\*</sup>

- (1. 西华大学 食品与生物工程学院, 成都 610039; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;  
3. 中国中医科学院 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700;  
4. 成都中医药大学 药学院, 成都 611137)

**[摘要]** 目的:建立同时测定南、北五味子中5种木脂素成分(五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素)含量的超高效液相色谱法,并比较不同产地五味子类药材中木脂素类成分含量。方法:Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm),流动相乙腈-水,梯度洗脱,流速0.4 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长235 nm,柱温45℃,进样量1 μL。以5种成分含量为评价指标,采用聚类分析法对南北五味子进行种类识别。结果:分析时间内,上述5种木脂素成分在10 min内分离度良好,在0.001~0.222 μg线性关系良好,相关系数均>0.999 8,平均加样回收率在97.7%~105.1%,RSD均<3.0%。南北五味子中5种木脂素类成分含量差异显著,聚类分析结果也表明,南北五味子能完全被区分为两大类。结论:该方法重复性好,准确可靠,灵敏度高,可为五味子类药材的分类和质量控制提供参考。

**[关键词]** 超高效液相色谱; 南五味子; 北五味子; 木脂素; 聚类分析

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)17-0040-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015170040

### Comparason for Lignan Content in Schisandrae Sphenantherae Fructus and Schisandrae Chinensis Fructus

KE Hua-xiang<sup>1,2,3</sup>, LI Hua<sup>2,3</sup>, SU Jian-chun<sup>2,4</sup>, LUO Shi-lan<sup>2,4</sup>, LI Ling<sup>1</sup>, HE Yu-xin<sup>1\*</sup>, YANG Bin<sup>2,3\*</sup>  
(1. Food and Bio-engineering College of Xihua University, Chengdu 610039, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. State Key Laboratory Breeding Base of Authentic Medical Herbs, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 4. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish an ultra performance liquid chromatography (UPLC) method for the simultaneous determination of five lignans (schisandrin, schizandrol B, schisantherin A, deoxyschizandrin and schisandrin B) in Schisandrae Sphenantherae Fructus and Schisandrae Chinensis Fructus, and compare the contents of lignans in Schisandrae Sphenantherae Fructus and Schisandrae Chinensis Fructus from different origins.

**Method:** The chromatographic separation was performed on Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) with the mobile phase of acetonitrile and water at a flow rate of 0.4 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was 235 nm, the column temperature was 45℃, and the injection volume was 1 μL. With the contents of the five lignans as the evaluation index, the clustering analysis was used to identify the species of Schisandrae Sphenantherae Fructus and Schisandrae Chinensis Fructus. **Result:** Within the analytical time of 10 minutes, the five lignans showed a good separation and linear relationship at a range of 0.001-0.222 μg, with correlation coefficients of more than 0.999 8. Their average recoveries ranged between 97.7% and 105.1% (RSD <3.0%). The contents of five lignans were significantly different in Schisandrae Sphenantherae Fructus and Schisandrae

**[收稿日期]** 20141126(002)

**[基金项目]** 国家中医药行业科研专项(201407003);国家自然科学基金项目(81202903)

**[第一作者]** 柯华香,在读硕士,从事天然药物活性成分质量研究,Tel:13141259253,E-mail:kehuaxiang@126.com

**[通讯作者]** \*何宇新,博士,教授,从事药物新制剂、新剂型研究与开发,Tel:028-87725898,E-mail:heyuxin66@126.com;

\*杨滨,博士,研究员,从事中药质量评价与控制,抗氧化活性研究,Tel:010-64014411-2848,E-mail:ybinmm@126.com

Chinensis Fructus. Moreover, the cluster analysis results also indicated that they could be classified into two groups. **Conclusion:** The method is highly reproducible, accurate and sensitive and so can provide reference for the classification and quality control of Schisandrae Sphenantherae Fructus and Schisandrae Chinensis Fructus.

**[Key words]** UPLC; Schisandrae Sphenantherae Fructus; Schisandrae Chinensis Fructus; lignan; cluster analysis

南五味子和北五味子分别为木兰科植物华中五味子和五味子的干燥成熟果实<sup>[1]</sup>,二者均具有收敛固涩,益气生津,补肾宁心功效。从地域分布来看,南五味子主要分布于华中、西南等地,北五味子主要集中于东北、内蒙古等地。南北五味子主要成分是木脂素类,包括五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素等的化学成分。2000 年版之前的《中国药典》记载南北五味子为同一中药,自 2000 年版《中国药典》起开始分别记载南、北五味子。2010 年版《中国药典》分别以五味子酯甲和五味子醇甲作为南五味子、北五味子质量评价指标。文献中常采用 HPLC 进行五味子药材的质量评价<sup>[2-6]</sup>,但 HPLC 耗时较长,一次分析至少需要 45 min。UPLC 法是近年来迅速发展的一种新的检测技术。相对 HPLC 而言,它具有灵敏度高、分离度好、分析时间短、溶剂消耗少等优点,已广泛应用于食品工业、药物分析等领域<sup>[7]</sup>。至今尚未有人报道 UPLC 对五味子药材中木脂素类成分含量同步的分析。本实验建立了五味子中五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素 5 种木脂素的含量测定方法,并以 5 种主要化合物的含量为指标,对 20 个不同产地的五味子进行聚类分析,本研究结果可为五味子类药材的分类和质量控制提供参考。

### 1 仪器与试剂

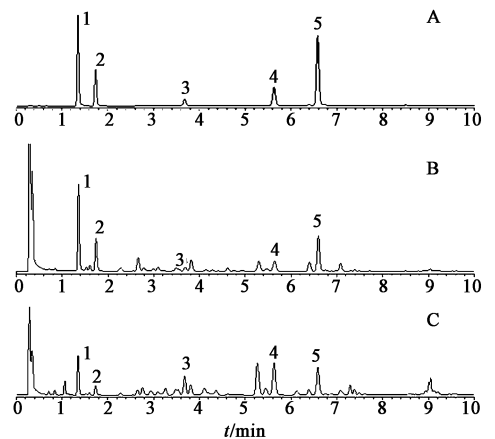
ACQUITY H-Class 型 UPLC<sup>TM</sup>(包括四元高压梯度泵,真空脱气机,自动进样器,柱温箱,二极管阵列检测器,Empower II 色谱工作站,美国 Waters),2004 MP6 型半微量电子显示天平(德国 Sartorius 公司),SPS 600F 型电子天平(美国 Ohaus 公司),KQ-100DE 型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Milli-Q 型超纯水制备仪(法国 Millipore 公司)。

五味子醇甲(MUST-13061206),五味子醇乙(MUST-14010312),五味子酯甲(MUST-13110606),五味子甲素(MUST-13080205),五味子乙素(MUST-13091606)对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司;乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司),其他试剂均为分析纯,超纯水由 Mili-Q 纯水机制备。

五味子药材采自重庆、湖南、安徽、甘肃等省区,其中市售样品 8 批,实地采集样品 12 批,经西华大学食品与生物工程学院何宇新教授鉴定为木兰科植物华中五味子 *Schisandra sphenanthera* 和五味子 *S. chinensis* 的干燥成熟果实。药材粉碎过 40 目筛。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 采用 Aquity BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm),以水(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱(0 ~ 1 min, 45% B, 1 ~ 5 min, 45% ~ 57% B, 5 ~ 7 min, 57% ~ 70% B, 7 ~ 7.5 min, 70% ~ 90% B, 7.5 ~ 10 min, 90% ~ 100% B),流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 235 nm,柱温 45 °C,进样量 1 μL。色谱图见图 1。



A. 混合对照品; B. 北五味子; C. 南五味子; 1. 五味子醇甲; 2. 五味子醇乙; 3. 五味子酯甲; 4. 五味子甲素; 5. 五味子乙素

图 1 南北五味子样品溶液的 UPLC

Fig. 1 UPLC chromatograms of Schisandra chinensis and Schisandra sphenanthera

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素适量,加甲醇溶解,配制各对照品储备液。精密吸取各储备液适量,配制成质量浓度依次为 0.221 6, 0.101 2, 0.020 2, 0.084 9, 0.165 6 g·L<sup>-1</sup>的混合对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 取五味子样品粉末约 0.25 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加

入甲醇 20 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 20 kHz)20 min,取出,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液过 0.2 μm 微孔滤膜,即得。

**2.4 线性关系考察** 将混合对照品溶液进一步稀释成 7 个不同质量浓度的对照品溶液,按照 2.3 项

表 1 标准曲线、最低检测限和最低定量限

Table 1 Test results of the standard curve, LOD and LOQ

成分	回归方程	r	线性范围/μg	LOD/ng	LOQ/ng
五味子醇甲	$Y = 7.72 \times 10^6 X + 9.82 \times 10^2$	0.999 9	0.006 ~ 0.222	0.04	0.13
五味子醇乙	$Y = 7.72 \times 10^6 X - 1.83 \times 10^2$	0.999 9	0.003 ~ 0.101	0.05	0.20
五味子酯甲	$Y = 9.37 \times 10^6 X - 2.1 \times 10$	0.999 9	0.001 ~ 0.02	0.07	0.20
五味子甲素	$Y = 6.83 \times 10^6 X + 1.2 \times 10^3$	0.999 8	0.002 ~ 0.042	0.08	0.42
五味子乙素	$Y = 9.04 \times 10^6 X - 1.11 \times 10^3$	0.999 9	0.004 ~ 0.166	0.07	0.27

**2.5 精密度试验** 将同一样品溶液,按照上述液相色谱条件连续进样 6 次。结果显示,五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素峰面积的 RSD 分别为 0.2%, 0.2%, 0.4%, 0.2%, 0.2%, 表明仪器精密度良好。

**2.6 重复性试验** 取同一批次样品,按照 2.2 项下方法制备 6 份供试品溶液,测定 5 种木脂素成分的含量。结果五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素的平均质量分数分别为 5.179, 1.436, 0.277, 1.499, 2.145 mg·g<sup>-1</sup>, 相应的 RSD 分别为 1.4%, 1.4%, 1.7%, 1.5%, 1.4%, 表明本法重复性较好。

**2.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液,按照 2.2 项下方法制备,分别在 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24 h 进样分析,五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素峰面积的 RSD 分别为 0.6%, 0.5%, 2.5%, 2.3%, 0.2%。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.8 加样回收试验** 取已知含量的同一批次样品约 0.125 g,精密称定,共 45 份,每 3 份为 1 组,按低、中、高 3 个水平分别加入适量的对照品溶液,按 2.2 项下方法制备,进样分析,分别计算平均回收率。结果见表 2。

**2.9 样品测定** 取 20 个不同来源的南、北五味子粉末,分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进样测定,计算各批样品中五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素的含量,结果见表 3。

下色谱条件测定峰面积。以对照品溶液的进样量为横坐标,峰面积为纵坐标进行回归,计算五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素的回归方程和线性范围。以信噪比 S/N = 3 和 S/N = 10 为原则,分别计算 5 种木脂素的检测限(LOD)和定量限(LOQ),见表 1。

表 2 五味子中 5 种成分的加样回收率试验(n = 2)

Table 2 Recoveries of the five lignans (n = 2)

成分	样品 中量 /mg	加入量 /mg	测定量 /mg	回收率 /%	RSD /%
五味子醇甲	0.648	0.416	1.054	97.7	2.17
	0.648	0.720	1.387	102.7	0.72
	0.647	1.008	1.685	103.0	0.61
五味子醇乙	0.180	0.114	0.296	102.5	0.30
	0.180	0.205	0.396	105.1	0.41
	0.180	0.285	0.463	98.8	0.58
五味子酯甲	0.035	0.019	0.053	98.5	3.07
	0.035	0.034	0.068	98.7	0.94
	0.035	0.047	0.083	102.1	1.57
五味子甲素	0.188	0.109	0.294	98.0	2.66
	0.188	0.163	0.346	96.9	0.32
	0.188	0.245	0.431	97.8	0.93
五味子乙素	0.302	0.186	0.495	103.7	2.83
	0.302	0.308	0.625	104.9	0.54
	0.302	0.462	0.775	101.6	0.82

**2.10 聚类分析** 采用 SPSS Statistics19.0 统计软件对 20 个不同产地南北五味子药材进行聚类分析。在方法上采用组间平均数联接法(average linkage between groups)及欧氏距离,聚类分析图见图 2。南、北五味子各聚为一类。比较分析表 3 结果,可发现北五味子中五味子醇甲含量显著高于南五味子。

### 3 讨论

分别考察了甲醇-水和乙腈-水体系,后者的分

表 3 不同来源南北五味子中木脂素的平均含量 ( $n=2$ )

Table 3 Average contents of lignans in Fructus schisandrae sphenantherae and Fructus schisandrae shinensis from different sources ( $n=2$ ) %

No.	来源	五味子醇甲	五味子醇乙	五味子酯甲	五味子甲素	五味子乙素
1	亳州(购)	0.583	0.260	0.037	0.120	0.304
2	重庆(购)	0.575	0.193	0.027	0.118	0.277
3	广西(购)	0.515	0.200	0.031	0.107	0.269
4	广西(购)	0.589	0.219	0.023	0.110	0.321
5	广西(购)	0.518	0.144	0.028	0.150	0.242
6	湖北神农架	0.537	0.231	0.039	0.124	0.320
7	吉林安图	0.550	0.146	0.024	0.134	0.246
8	吉林	0.674	0.201	0.030	0.169	0.317
9	吉林长白	0.631	0.153	0.021	0.162	0.259
10	吉林新合乡	0.570	0.148	0.026	0.141	0.244
11	广西(购)	0.017	0.006	0.341	0.419	0.024
12	湖南(购)	0.023	0.010	0.409	0.525	0.042
13	成都(购)	0.016	0.007	0.464	0.492	0.023
14	湖南桂东县	0.006	0.022	0.009	0.024	0.022
15	湖南通道	0.350	0.006	0.010	0.050	0.015
16	安徽潜山	0.020	0.004	0.021	0.102	0.006
17	重庆黔江	0.024	0.007	0.018	0.555	0.007
18	甘肃舟曲	0.197	0.006	0.131	0.262	0.184
19	甘肃成县	0.017	-	0.019	0.015	0.007
20	甘肃徽县	0.022	-	0.020	0.013	0.006

注:1~10号为北五味子;11~20号为南五味子。

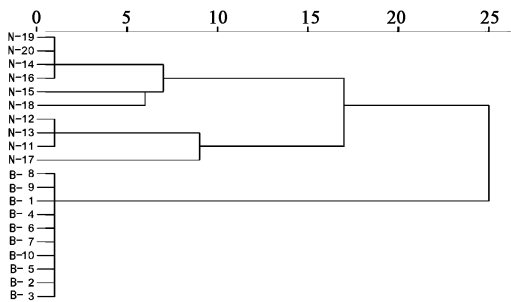


图 2 五味子样品聚类分析

Fig. 2 Clustering plot of schisandra samples

离效果优于前者,且乙腈黏度小,可以降低系统压力,故选择乙腈-水体系。进一步优化洗脱梯度,最佳条件为乙腈 45%~100% (0~10 min)。考察了不同柱温 (30, 45, 50 °C) 和不同流速 (0.3, 0.4, 0.5 mL·min<sup>-1</sup>), 结果表明柱温 45 °C, 流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>

时, 色谱峰能达到基线分离。分别考察 5 种木脂素类成分在不同波长下的紫外吸收, 结果表明在 235 nm 时, 5 种木脂素类成分的紫外吸收均较大, 故选择 235 nm 作为含量测定波长。

本研究发现, 不同来源南五味子 5 种木脂素类成分含量差异显著, 五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素含量变化范围依次是 0.01%~0.35%, 0.004%~0.02%, 0.01%~0.46%, 0.01%~0.56%, 0.01%~0.18%。19 号和 20 号的南五味子药材未检测出五味子醇乙。而不同来源的北五味子木脂素含量比较稳定, 五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素含量变化范围依次是 0.52%~0.67%, 0.14%~0.26%, 0.02%~0.04%, 0.11%~0.17%, 0.24%~0.32%, 10 个产地北五味子均符合药典规定(五味子醇甲含量不低于 0.4%)。从聚类分析结果来看, 木脂素含量特征可作为区分南北五味子的分类依据。

本研究采用 UPLC 建立五味子类药材中 5 种木脂素(五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素)含量测定方法, 准确可靠、分离效果和重复性好, 可用于南北五味子的分类和质量控制。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 61-62.  
 [2] 宋小妹, 考玉萍. 不同产区南五味子中木脂素含量测定[J]. 陕西中医, 2004, 25(7): 645-646.  
 [3] 程敏, 王露, 宋小妹. HPLC 法测定五味子品种中木脂素含量[J]. 中草药西北大学学报: 自然科学版, 2011, 41(3): 459-462.  
 [4] 周悌强, 冯素香, 李晓玉, 等. 不同产地五味子的木脂素类成分的含量测定[J]. 医药导报, 2013, 32(12): 1624-1627.  
 [5] 杨博, 陈彤, 李学龙, 等. 高效液相色谱法测定南、北五味子中木脂素含量[J]. 大连工业大学学报, 2009, 28(2): 102-106.  
 [6] 周艳, 祁英杰, 闫小玉, 等. 北五味子及其不同炮制品中 6 种木脂素类成分的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(24): 3449-3452.  
 [7] 陈佳, 王钢力, 姚令文, 等. 超高效液相色谱(UPLC)在药物领域中的应用[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(11): 1976-1981.

[责任编辑 顾雪竹]