

# 五味子酸性组分的主要物质基础与生物活性研究

李丽,肖永庆\*,刘颖,顾雪竹,于定荣,李文,朱明贵,殷小杰  
(中国中医科学院中药研究所,北京 100700)

**[摘要]** **目的:**揭示五味子酸性组分的组成及其生物活性。**方法:**采用有机溶剂提取、大孔树脂分离和溶剂处理的方法制备五味子酸性组分,以 HPLC 对其进行定性定量分析,并根据五味子的功能主治观察酸味物质对小鼠负重游泳时间、耐常压缺氧、免疫器官质量及免疫吞噬等作用的影响。**结果:**本文所制备的五味子酸性组分主要由柠檬酸、奎尼酸等有机酸类成分组成,2个酸性成分总量达 55.08%;低剂量(5 g·kg<sup>-1</sup>)能显著延长小鼠负重游泳时间( $P < 0.001$ );酸味物质低剂量组小鼠胸腺指数、脾脏指数与正常对照组比较增加明显( $P < 0.05, P < 0.01$ );高、低剂量酸味物质均可显著提高正常小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能提高吞噬指数 K 值和吞噬系数 a 值,特别是低剂量组与正常对照组比较有显著性差异( $P < 0.001, P < 0.01$ )。**结论:**五味子酸性组分具有较好的抗疲劳和免疫增强作用,是五味子药效物质基础的重要组成。

**[关键词]** 五味子;酸性组分;抗疲劳;免疫增强

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0070-04

**[doi]** 10.11653/syjf2014050070

## Main Substance and Biological Activity of Acidic Components of *Schisandra chinensis*

LI Li, XIAO Yong-qing\*, LIU Ying, GU Xue-zhu, YU Ding-rong, LI Wen, ZHU Ming-gui, YIN Xiao-jie  
(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** Reveal the composition of acidic components and its biological activity of *Schisandra chinensis*. **Method:** Using organic solvent extraction, macroporous resin separation and solvent treatment to prepare acidic components from *S. chinensis*, HPLC were applied for qualitative and quantitative analysis. Meanwhile, the influence of acidic components in swimming time, resistance to atmospheric oxygen, weight of immune organs and influence of immune phagocytosis in mice were observed. **Result:** The acidic components were mainly consisted of citric acid, quinic acid and other organic acids, the total amount of two acids were reached 55.8%. Low dose (5 g·kg<sup>-1</sup>) sour substance could significantly prolong the swimming time of mice ( $P < 0.001$ ) and the thymus index, spleen index compared with the control group enhance significantly in mice ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); high and low dose sour substance can be notably increase the mouse peritoneal macrophage phagocytic function to improve the phagocytic index and phagocytic coefficient K value of a value; especially, there was a significant difference between the low dose group and normal control group ( $P < 0.001, P < 0.01$ ). **Conclusion:** Acidic components of *S. chinensis* with anti-fatigue and immune enhancement effect better, is an important component of *S. chinensis* pharmacodynamic material bases.

**[Key words]** *Schisandra chinensis*; acidic components; anti-fatigue; immune enhancement

五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz) Baill. 的干燥成熟果实,习称“北五

**[收稿日期]** 20130729(012)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(30973874);中医药行业专项(201007012-1)

**[第一作者]** 李丽,博士,副研究员,从事中药炮制及质量评价标准研究,Tel:010-84040221,E-mail:lili7755@163.com

**[通讯作者]** \*肖永庆,博士,首席研究员,从事中药化学、中药炮制及质量标准研究,Tel:010-64014919,E-mail:x.heqi@163.com

味子”<sup>[1]</sup>。五味子味酸、性温,具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心的功效,用于久嗽虚喘、梦遗滑精、久泻不止,内热消渴、心悸失眠等症,是常用的收涩药<sup>[2]</sup>。“五味子皮肉甘酸”,酸乃五味之一,能收能涩,具有收敛固涩的作用,也是收涩药的性味特征。由此提示,五味子中酸性组分可能是其收敛固涩作用的物质基础。因此,本文以北五味子为原料,分离、制备了五味子酸性组分,并对其进行了主要组成成分的定性定量分析和与其功能相关的生物活性研究,以期揭示五味子酸性组分的组成及其生物活性,为分析五味子味、能相关性提供科学依据。

## 1 材料

**1.1 仪器** Waters 高效液相色谱仪(Waters 2695 Separations Module, Waters 2996 PAD 检测器, Empower 2 数据处理软件), KQ-500DB 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司), GF-D800 型半自动生化分析仪(山东高密彩虹分析仪器有限公司)。

**1.2 试剂** 乙腈为色谱纯,水为纯净水,使用前均经 0.45 μm 滤膜滤过;其他试剂均为分析纯。印度墨汁(北京西中化工厂生产,批号 8205011),二硝基氯苯(DACB),10%的脱毛剂,伊文思蓝,丙酮。对照品柠檬酸(111679-200401)购自中国食品药品检定研究院。奎尼酸为实验室分离制备,经核磁共振鉴定,纯度达到 98% 以上,可供含量测定用。

**1.3 动物** 雄性昆明种小鼠,体重 18~20 g;昆明种小鼠,(幼鼠体重 11~15 g),北京大学医学部实验动物科学部提供,许可证编号 SCXK(京)2006-0008(0167112)。BALB/C 小鼠,雄性,体重 19~21 g,中国药品生物制品检定所实验动物资源中心提供,许可证号 SIXK(京)2009-0017。

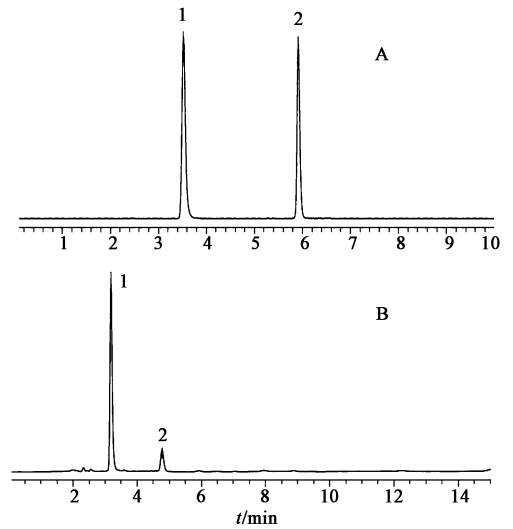
## 2 酸味基础物质的制备及分析

**2.1 酸味基础物质的制备** 五味子药材 20 kg,取其皮肉,以 70% 乙醇渗漉提取,提取液经大孔树脂 D101 柱色谱富集和溶剂分离,酸性组分 780 g。

### 2.2 酸味基础物质的含量测定

**2.2.1 色谱条件**<sup>[3]</sup> Spursil C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Phenomenex 保护柱(柱芯 3 mm × 4 mm),流动相为乙腈-15 mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾溶液(1:99)(pH 2.0),检测波长 210 nm,流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C。此条件下样品中奎尼酸和柠檬酸与其他成分可达到基线分离。见图 1。

**2.2.2 对照品溶液制备** 精密称取奎尼酸、柠檬酸适量至 5 mL 量瓶中,水溶解并定容至刻度,摇匀,制成 0.509, 2.378 g · L<sup>-1</sup> 的对照品溶液备用。



A. 对照品; B. 样品; 1. 奎尼酸; 2. 柠檬酸

图 1 “酸味”基础物质中有机酸类成分的含量

**2.2.3 供试品溶液的制备** 取五味子酸味物质 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 30% 甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声提取 40 min,放冷,密塞,再称定质量,用 30% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液 10 mL 回收溶剂至干,再以 10 mL 水溶解,以微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

**2.3 结果** 五味子“酸味”基础物质中仅含有柠檬酸和奎尼酸两种有机酸,其中柠檬酸含量为 48.14%,奎尼酸含量为 6.94%,二者总量达 55.08%。

## 3 酸味基础物质的生物活性研究

**3.1 对小鼠负重游泳时间的影响** 按体重选取 18~20 g 的雄性小鼠,设空白、溶剂对照组;酸味基础物质设 2 个剂量组(10, 5 g · kg<sup>-1</sup>);每组小鼠 10 只。灌胃给药后 30 min 将小鼠按体重的 8% 负重,放入 30 cm × 25 cm × 20 cm, 22~25 °C 的塑料水盒中进行负重游泳试验。同时记录时间,以小鼠鼻部没入水中 10 s 不能浮出水面者即为体力耗竭,即刻记时,即为小鼠游泳时间,见表 1。

表 1 对小鼠负重游泳和耐常压缺氧时间的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g · kg <sup>-1</sup>	小鼠游泳时间 /s	耐缺氧时间 /min
空白对照	-	3.76 ± 2.08	13.55 ± 2.67
溶剂对照	-	5.93 ± 1.72 <sup>1)</sup>	12.94 ± 1.92
高剂量	10.0	6.72 ± 3.39 <sup>1)</sup>	13.11 ± 2.25
低剂量	5.0	7.79 ± 2.85 <sup>2)</sup>	14.27 ± 2.32

注:与空白对照比较<sup>1)</sup> P < 0.05, <sup>2)</sup> P < 0.001。

**3.2 对小鼠耐常压缺氧作用的影响** 按体重选取 18~20 g 的雄性小鼠,设空白、溶剂对照组;酸味基

础物质设2个剂量组(10, 5 g·kg<sup>-1</sup>); 每组小鼠10只。灌胃给药后30 min将小鼠放入盛有15 g 钠石灰的广口瓶内(每瓶只放1只小鼠), 用凡士林涂抹瓶口盖严, 使之不漏气, 即刻计时。以呼吸停止为指标, 观察小鼠因缺氧而死亡的时间。与对照组比较进行统计学处理。结果见表1。

结果显示, 五味子酸味物质低剂量可以显著延长小鼠游泳时间, 与空白对照组比较有显著性差异( $P < 0.001$ ), 说明酸味物质具有较好的抗疲劳

作用。

**3.3** 对小鼠免疫细胞、胸腺、脾脏质量的影响 按体重选取11~15 g的雄性小鼠, 设空白、溶剂对照组; 酸味基础物质设高、低两个剂量组分别为10, 5 g·kg<sup>-1</sup>, 每组用小鼠10只。灌胃给药0.2 mL/10 g, 每日1次, 连续给药10 d。末次药后40 min将小鼠脱颈处死, 取胸腺、脾脏, 用滤纸吸干水分后即在分析天平上称质量, 计算脏器指数。(脾、胸腺指数 = 脾、胸腺质量(mg)/体重(10 g))。结果见表2。

表2 对小鼠免疫器官质量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	胸腺质量/mg	胸腺指数	脾脏质量/mg	脾脏指数
空白对照	108.7 ± 10.6	4.3 ± 0.4	129.7 ± 2.7	5.1 ± 1.0
溶剂	122.2 ± 20.6	4.8 ± 0.7	125.4 ± 18.1	4.9 ± 0.7
高剂量	122.4 ± 17.7	4.7 ± 0.5	155.7 ± 41.9	5.9 ± 1.6
低剂量	148.6 ± 46.1	5.5 ± 1.8 <sup>2)</sup>	167.7 ± 29.5	6.2 ± 1.0 <sup>1)</sup>

注: 与空白对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

结果显示, 给药组动物胸腺指数、脾脏指数与空白对照组和溶剂对照组比较均有不同程度增加, 其中低剂量胸腺指数、脾脏指数与正常对照组比较增加的明显( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 提示酸味物质可明显增加小鼠免疫器官质量, 具有免疫增强作用。

**3.4** 小鼠网状内皮系统对血流中炭粒吞噬廓清能力的影响 小鼠按体重随机分为12组, 每组10只。酸味基础物质设高(10 g·kg<sup>-1</sup>)、低(5 g·kg<sup>-1</sup>)剂量组, 每日灌胃给药1次0.02 mL/g, 正常对照组、溶剂对照组灌胃等量蒸馏水和加有吐温-80的蒸馏水溶液。连续给药10 d, 末次药后24 h, 于尾静脉注入印度墨汁(用1%的明胶溶液4倍稀释)0.1 mL/10 g。同一只动物分别于注入墨汁30 s和6 min由眼眶采血25 μL, 放入装有2 mL 0.1%的Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>试管中。以正常小鼠血液25 μL溶于2 mL 0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>液体调零, 于分光光度计675 nm处比色测定OD值, 按下列公式计算吞噬指数K值及吞噬系数(校正吞噬指数a)。见表3。

$$K = \frac{\lg C_1 - \lg C_2}{T_2 - T_1} \quad a = \frac{W}{WLS} \sqrt{K}$$

表3 对小鼠RES吞噬功能的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	K值	a值
正常对照	-	0.013 ± 0.007	5.008 ± 1.225
溶剂对照	-	0.012 ± 0.004	5.236 ± 1.281
高剂量	10.0	0.025 ± 0.009 <sup>1)</sup>	6.894 ± 1.141 <sup>2)</sup>
低剂量	5.0	0.020 ± 0.010 <sup>3)</sup>	6.822 ± 1.098 <sup>2)</sup>

注: 与正常对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.001$ 。

结果显示, 高、低剂量组可显著提高正常小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能提高吞噬指数K值和吞噬系数a值, 与正常对照组、溶剂对照组比较有显著性差异, 说明酸味物质对小鼠非特异性免疫功能有较好的促进作用。

**3.5** 对二硝基氯苯所致迟发型皮肤过敏反应的影响 小鼠按体重随机分为12组, 给药组从致敏当日起每日灌胃五味子酸味基础物质(10, 5 g·kg<sup>-1</sup>)共13 d, 空白对照组和溶剂组给等容积蒸馏水和加有吐温的溶液。首次给药即于脱毛的颈部皮肤上滴12.5% DNCB丙酮溶液8 μL/只致敏。13日后。在事先脱毛的同一只小鼠腹部皮肤上涂5.0% DNCB丙酮溶液10 μL/只进行攻击。24 h后, 每鼠尾静脉注射1%伊文思蓝10 mL·kg<sup>-1</sup>。30 min后, 处死小鼠, 取下腹部染蓝皮肤, 剪碎, 置试管中, 用1:1丙酮生理盐水溶液4 mL浸泡24 h后, 离心取上清液, 用分光光度计测定吸光度。以吸光度表示迟发型过敏反应的强度。吸光度越大, 反应越强。结果以吸光度(X)及其标准差(SD)表示, 进行组间比较。见表4。

结果可见五味子酸味物质低剂量组A增加明显, 与正常对照组比较差异显著, 提示在对二硝基氯苯所致迟发型皮肤过敏反应中, 五味子酸味物质能够抵抗迟发型皮肤过敏反应, 对身体起到较好的保护作用。

#### 4 讨论

五味子化学成分种类丰富, 除含有多种木质素

表4 对小鼠 DNCB 迟发型皮肤过敏反应的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	皮肤反应 /A	吸光度增加 /%
正常对照	-	0.117 ± 0.029	-
溶剂对照	-	0.134 ± 0.029	-
高剂量	10	0.127 ± 0.034	9
低剂量	5.0	0.201 ± 0.070 <sup>1)</sup>	72

注:与正常对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.001$ 。

类成分外,还含有约20%的有机酸类成分<sup>[3]</sup>。本文采用有机溶剂提取,大孔树脂及有机溶剂分离的方法富集了五味子中的酸性组分,并通过HPLC分析,明确了酸性组分主要由柠檬酸和奎尼酸组成,总量约为55.8%,其中又以柠檬酸为主,含量为48.1%。柠檬酸是三羧酸循环中重要的中间代谢产物,对糖和脂肪酸的代谢有着极其重要的意义,因此被广泛应用于食品<sup>[4]</sup>、饲料<sup>[5-6]</sup>、化妆品<sup>[7]</sup>及环境治理<sup>[8-9]</sup>。有研究报道,雾化吸入柠檬酸可减轻肺成纤维细胞增生及胶原纤维沉积,降低肺纤维化相关蛋白MMP-9及TIMP-1的表达<sup>[10]</sup>。

本文研究结果显示,五味子酸性组分能够显著延长小鼠负重游泳时间,明显增加小鼠免疫器官质量、提高小鼠巨噬细胞的吞噬功能,并能抵抗二硝基氯苯导致的迟发型皮肤过敏反应,说明五味子酸性组具有较好的抗疲劳和免疫增强作用。因此,五味子临床上除广泛应用于肝脏疾病的治疗,对心血管疾病及糖尿病也有着较好的疗效<sup>[11-12]</sup>,这与其所含有的有机酸类成分有着密不可分的关系。进一步深入研究五味子中酸性组分与其他成分的量比关系,以及由此所导致的生物活性变化,对于五味子的开发利用具有重要的意义。

## [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.
- [2] 陈长勋. 中药药理学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:174.
- [3] 李丽,肖永庆,于定荣,等. HPLC测定五味子中3种有机酸的含量[J]. 中国中药杂志,2011,36(23):3286.
- [4] 陈效兰,雷钢铁. 柠檬酸在食品工业中的应用[J]. 食品研究与开发,2000,21(3):6.
- [5] 潘庆,谭永刚,毕英佐,等. 柠檬酸对罗非鱼生长、体成分和消化酶活性的影响[J]. 中国水产科学,2004,11(4):344.
- [6] 李建平,单安山,陈志辉,等. 五味子、柠檬酸对断奶仔猪生长性能和抗氧化功能的影响[J]. 东北农业大学学报,2010,41(2):91.
- [7] 孟琳,白云平,葛双启. 果酸在化妆品中的应用[J]. 化学与生物工程,2005,(4):45.
- [8] 许超,夏北城,林颖. 柠檬酸对低污染土壤中重金属的淋洗动力学[J]. 生态环境学报,2009,18(2):507.
- [9] 唐敏,张焕祯,李亮. 砷污染土壤柠檬酸萃取修复技术研究[J]. 环境污染与防治,2010,32(12):31.
- [10] 顾小利,潘秀颖,杨陟华,等. 雾化吸入柠檬酸对贫铀致大鼠非常纤维细胞增生的影响[J]. 中国药房,2012,23(25):2313.
- [11] 向辉,邱云波. 五味子药效与临床应用研究[J]. 医药导报,2011,30(增刊):89.
- [12] 唐喜兰,刘建勋,李磊. 中药有机酸类成分的药理作用及在心血管疾病的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):243.

[责任编辑 顾雪竹]

欢迎投稿

欢迎订阅