

HPLC 同时测定五味子中 6 种木脂素类成分

黄文倩^{1,2}, 李丽¹, 肖永庆^{1*}, 张村¹, 于定荣¹, 麻印莲¹, 田国芳¹, 王云¹

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立同时测定五味子中 6 种木脂素类成分的 HPLC 含量测定方法。方法: 采用 HPLC, 以甲醇-0.5% 冰醋酸为流动相, 梯度洗脱, 检测波长 254 nm, 流速 0.9 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 同时测定五味子药材中五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲等 6 种木脂素类成分的含量。结果: 不同产地五味子药材中均含有上述 6 种成分, 且均以五味子醇甲的含量最高, 五味子丙素含量最低。结论: 建立的方法可以同时测定五味子药材中的 6 种木脂素类成分, 为五味子及其炮制品的质量评价提供了更为全面的科学依据。

[关键词] 五味子; 木脂素; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0063-04

Simultaneous Determination of Six Lignan Components in Schisandrae Chinensis Fructus by HPLC

HUANG Wen-qian^{1,2}, LI Li¹, XIAO Yong-qing^{1*}, ZHANG Cun¹,
YU Ding-rong¹, MA Yin-lian¹, TIAN Guo-fang¹, WANG Yun¹

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[收稿日期] 2010-12-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973874)

[通讯作者] * 肖永庆, 首席研究员, Tel: 010-84040221, E-mail: x. heqi@163.com

[参考文献]

- [1] 吴国芳. 中国灯心草属植物的研究[J]. 植物分类学报, 1994, 32(5): 433.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2010: 137.
- [3] Katsuhito Shima, Masao Toyota, Yoshinori Sakawa. Phenanthrenederivatives from the medullae of *Juncus effusus* [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(9): 3149.
- [4] Mariamichela Corsaro, Marina Della Greca, Antonio Fiorentino, et al. Cycloartane glucosides from *Juncus effusus* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(2): 515.
- [5] Marina Della Greca, Antonio Fiorentino, Pietromonaco, et al. Cycloartane triterpenes from *Juncus effusus* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 35(4): 1017.
- [6] 陈玉, 杨光忠. 灯心草属植物萜类化合物结构和生物活性的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(4): 496, 505.
- [7] 金东哲, 闵知大, 孔令义, 等. 灯心草科植物中二萜成分[J]. 国外医药·植物药分册, 1995, 10(5): 208.
- [8] Liao Y J, Zhai H F, J M Huang, et al. Anxiolytic and sedative effects of dehydroeffusol from *Juncus effusus* in mice [J]. *Planta Medica*, 2011, 77(5): 416.
- [9] 逢楠楠, 毕开顺, 闫宝庆, 等. 芫花高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药, 2010, 5(5): 818.
- [10] 王花红, 郭五保, 顾莹, 等. 山茱萸药材指纹图谱的研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(10): 1922.
- [11] 苏娟, 吴立军, 屠鹏飞, 等. 黄芪药材 RRLC-UV-MS 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(6): 732.

[责任编辑 蔡仲德]

[Abstract] Objective: To establish a HPLC method for the simultaneous determination of six lignan components (deoxyschizandrin, schizandrin B, schizandin C, schisandrin, schizandrol B, schisantherin A) in *Schisandra chinensis*. **Method:** The chromatographic separation was performed on an Agilent Eclipse XDB C₁₈ Column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at 35 °C with the methanol-0.5% glacial acetic acid as the mobile phase in gradient elution. The detection wavelength was set at 254 nm and the flow rate was 0.9 mL · min⁻¹. **Result:** Six lignans can be detected in different samples and the content of the schisandrin is the highest while the schizandin C is the lowest. **Conclusion:** The method that established by this paper can be used to determine six lignan components in *Schisandrae Chinensis Fructus* simultaneously, and provide a more comprehensive scientific basis for the quality evaluation of *Schisandrae Chinensis Fructus* and its processed products.

[Key words] *Schisandrae Chinensis Fructus*; lignan; content determination

五味子是木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实, 习称“北五味子”, 主要含有木脂素、挥发油、多糖、有机酸等成分, 其中又以木脂素类成分为主要活性成分, 具有抑制血清中谷丙转氨酶 (SGPT)、谷草转氨酶 (SGOT) 升高、抗自由基氧化和保肝等作用^[1]。目前, 《中国药典》2010 年版中仅以五味子醇甲为指标成分, 进行五味子药材及饮片的质量控制, 显然缺乏质量评价的科学性和全面性。另外大量文献报道^[2-3] 亦多以五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素等 4 种成分为指标, 进行不同产地或不同饮片的比较研究。本文以 HPLC 法同时测定五味子药材中 6 种木脂素类成分的含量, 为科学评价五味子药材、饮片及其制剂的质量提供了参考依据, 也为五味子“五味”物质基础的相关研究奠定了基础。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪 (Waters 2695 pump, Waters 2996 检测器, Empower2 数据处理软件); KQ-500DB 超声清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 甲醇为色谱纯, 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。

五味子醇甲 (批号 100857-200709)、五味子甲素 (批号 110764-200609)、五味子乙素 (批号 110765-200710)、五味子酯甲 (111529-200503) 对照品购自中国药品生物制品检定所。五味子醇乙、五味子丙素为实验室分离纯化, 经核磁共振鉴定, 纯度达到 98% 以上, 可供含量测定用。

药材采自辽宁省凤城市大梨树村等地, 经中国中医科学院中药研究所胡世林研究员鉴定为木兰科植物五味子 *S. chinensis* 的干燥成熟果实。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent XDB C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Phenomenex 保护柱 (柱芯 3 mm × 4 mm)。流动相 A 为甲醇, B 为 0.5% 冰醋酸; 0 ~ 25 min, 62% A; 25 ~ 37 min, 62% ~ 80% A; 37 ~ 50 min, 80% ~ 90% A。流速 0.9 mL · min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 35 °C。在此条件下五味子样品中五味子醇甲等 6 种成分与其他组分均能达到基线分离。见图 1。

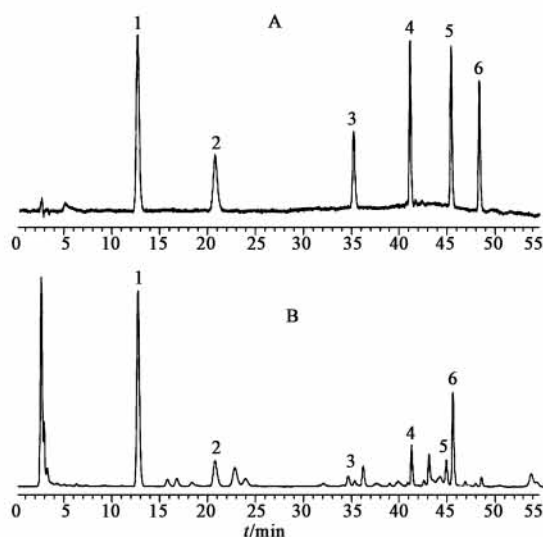


图 1 五味子 HPLC

A. 对照品; B. 样品;

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; 6. 五味子丙素

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、五味子乙素、五味子丙素对照品各适量, 分别加甲醇制成浓度为 122.4, 75.2, 4.26, 3.88, 15.84, 96.8, 3.84 g · L⁻¹ 的溶液, 作为对照品溶液。

2.3 线性关系考察 取上述对照品溶液,五味子醇甲进样1,3,5,7,9,11 μL;五味子醇乙进样1,2,4,6,8,10 μL;五味子酯甲进样1,5,10,15,20,25 μL;五味子甲素和五味子丙素分别进样1,5,10,15,20 μL;五味子乙素进样1,3,5,7,9 μL,依法测定。以进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,计算回归方程及相关系数。结果见表1。

表1 线性关系考察

成分	回归方程	r
五味子醇甲	$Y = 2\ 244\ 686.7X - 2\ 757.9$	0.999 8
五味子醇乙	$Y = 1\ 593\ 895.4X - 133.7$	0.999 8
五味子酯甲	$Y = 1\ 259\ 117.1X - 2\ 041.8$	0.999 8
五味子甲素	$Y = 2\ 248\ 206.6X - 4\ 549.6$	0.999 9
五味子乙素	$Y = 1\ 800\ 629.1X - 12\ 012.1$	0.999 8
五味子丙素	$Y = 1\ 787\ 765.8X - 1\ 014.0$	0.999 9

2.4 供试品溶液的制备 取五味子粉末(过40目筛)各0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,密塞,称定质量,超声提取10 min,放冷,密塞,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,以微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

2.5 精密度试验 将上述供试品溶液,重复进样5

次,依法测定,各成分峰面积5次测定结果的RSD均<2.0%。结果见表2。

表2 精密度、稳定性、重复性试验 RSD(n=5) %

成分名称	精密度	稳定性	重复性
五味子醇甲	0.94	0.83	0.56
五味子醇乙	0.85	1.16	1.21
五味子酯甲	1.18	1.71	1.40
五味子甲素	1.48	1.27	0.81
五味子乙素	1.20	1.76	1.17
五味子丙素	1.04	1.61	1.41

2.6 稳定性试验 将上述供试液溶液,间隔一定时间进样共8次,由峰面积值统计结果可见样品溶液在24 h内保持稳定。结果见表2。

2.7 重复性试验 取五味子粉末5份,各约0.5 g,精密称定,制备成供试品溶液,依法测定并计算含量,结果各对照品7次测定值的RSD均<2.0%。结果见表2。

2.8 加样回收试验 精密称定已知含量五味子粉末适量,共5份,分别精密加入各对照品适量,按供试品溶液制备及测定法操作,进行色谱分析,见表3。

表3 五味子中6种成分加样回收试验($\bar{x} \pm s, n=3$)

对照品	称样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
五味子醇甲	0.250 1	1.302 7	1.224 0	2.506 2	98.322 2	99.55	1.26
	0.251 9	1.312 1		2.519 5	98.641 1		
	0.252 1	1.313 2		2.554 6	101.419 0		
	0.252 1	1.313 2		2.539 1	100.157 0		
	0.250 8	1.306 4		2.520 7	99.204 2		
五味子醇乙	0.250 1	0.467 7	0.489 0	0.978 7	104.495 2	103.27	0.85
	0.251 9	0.471 0		0.975 9	103.251 8		
	0.252 1	0.471 4		0.974 5	102.892 1		
	0.252 1	0.471 4		0.970 8	102.117 5		
	0.250 8	0.469 0		0.975 6	103.595 9		
五味子酯甲	0.250 1	0.087 8	0.085 2	0.176 3	103.873 5	104.26	0.33
	0.251 9	0.088 4		0.177 5	104.546 0		
	0.252 1	0.088 5		0.177 6	104.569 2		
	0.252 1	0.088 5		0.177 0	103.917 2		
	0.250 8	0.088 0		0.177 0	104.404 7		
五味子甲素	0.250 1	0.226 3	0.221 8	0.456 7	103.875 5	103.22	0.96
	0.251 9	0.228 0		0.459 8	104.507 2		
	0.252 1	0.228 1		0.454 6	102.107 3		
	0.252 1	0.228 1		0.457 0	103.182 6		
	0.250 8	0.227 0		0.454 2	102.447 7		

续表 3

对照品	称样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均/%	RSD/%
五味子乙素	0.250 1	0.640 8	0.666 3	1.335 9	104.326 1	104.17	0.15
	0.251 9	0.645 4		1.338 6	104.042 2		
	0.252 1	0.645 9		1.341 2	104.347 3		
	0.252 1	0.645 9		1.339 5	104.099 8		
	0.250 8	0.642 5		1.335 6	104.027 7		
五味子丙素	0.250 1	0.059 8	0.053 8	0.115 8	104.060 1	103.26	0.77
	0.251 9	0.060 2		0.115 7	103.132 2		
	0.252 1	0.060 2		0.115 5	102.721 1		
	0.252 1	0.060 2		0.115 2	102.304 8		
	0.250 8	0.059 9		0.115 9	104.095 6		

2.9 样品测定 取不同产地五味子粉末,制成供试品溶液,进样 10 μ L 依法测定其 6 种成分的含量。结果见表 4。

3 讨论

本文以 HPLC 梯度洗脱的方法建立了五味子药材中 6 种木脂素类成分的含量测定方法,实验过程

中对甲醇、乙醇、氯仿等提取溶剂以及超声、回流和冷浸等提取方法进行了比较,综合 6 种成分的含量测定结果,最终确定为甲醇超声 10 min,所测定的 6 种木脂素类成分含量较高,方法操作简便,重复性好,可用于不同产地五味子药材及炮制品中木脂素成分的含量分析。

表 4 不同产地五味子药材中木脂素成分测定

No.	采购地	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	五味子丙素	总量
1	辽宁大梨树-1	0.499 5	0.170 8	0.033 6	0.092 0	0.248 2	0.024 4	1.068 5
2	辽宁大梨树-2	0.502 7	0.176 3	0.032 2	0.097 8	0.249 7	0.024 1	1.082 7
3	沈阳农业大学种植场	0.622 1	0.161 4	0.050 6	0.224 1	0.294 3	0.015 6	1.368 1
4	辽宁桓仁满族自治县	0.546 8	0.186 8	0.037 5	0.170 8	0.296 3	0.024 5	1.262 5
5	大连抚顺县	0.577 8	0.225 5	0.042 1	0.126 5	0.311 7	0.027 4	1.310 9
6	葫芦岛连山区	0.546 2	0.135 2	0.042 9	0.255 2	0.287 6	0.013 9	1.281 1
7	辽宁省朝阳市	0.579 6	0.102 2	0.048 9	0.334 0	0.282 7	0.013 3	1.360 7
8	吉林省临江市	0.614 1	0.203 1	0.085 6	0.157 0	0.333 9	0.029 8	1.423 4
9	安国药材市场	0.341 9	0.133 0	0.014 1	0.061 1	0.129 9	0.021 4	0.701 4
10	亳州药材市场	0.411 2	0.165 8	0.017 1	0.092 3	0.162 7	0.026 3	0.875 4

此外,从测定结果中可发现,当年采收的五味子药材(3~8号)中木脂素类成分的含量较高,保存一年左右的药材(1~2号),所测定的木脂素总含量略有降低(约 25%),并以五味子甲素降低的幅度最大。而购自药材市场的五味子,由于采收后放置时间较长,木脂素类成分的含量降低明显,与当年采收的药材相比,木脂素总量降低了约 40%,因此提示五味子采收后储存时间不宜过长。

[参考文献]

- [1] 陈业高,泰国伟,谢毓元. 五味子科植物木脂素类成分生物活性研究进展[J]. 中药材,2001,24(1):62.
- [2] 张延妮,岳宣峰,王喆之. 反相高效液相色谱同时测定五味子中五味子醇甲、五味子酯甲和五味子乙素的含量[J]. 分析科学学报,2007,23(1):41.
- [3] 倪瑞婕,毛春芹,陆兔林. 五味子不同炮制品中五味子醇甲及五味子乙素的含量测定[J]. 药学服务与研究,2009,9(6):460.

[责任编辑 蔡仲德]