

HPLC 法测定酸枣仁与五味子配伍前后酸枣仁皂苷 A 和五味子醇甲

高家荣^{*}, 周丽, 韩燕全, 姚丹, 夏伦祝

(安徽中医学院第一附属医院, 国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 合肥 230031)

[摘要] 目的: 考察酸枣仁与五味子配伍前后酸枣仁皂苷 A 和五味子醇甲的含量变化。方法: 利用 HPLC 法, 测定酸枣仁皂苷 A、五味子醇甲在单煎液、合煎液及混合液中的含量, 比较配伍前后单煎液、合煎液和单煎混合液中两药主要组分酸枣仁皂苷 A 和五味子醇甲的含量变化。结果: 配伍合煎液中的酸枣仁皂苷 A、五味子醇甲组分的含量均低于单煎液及混合液中的含量。结论: 酸枣仁五味子配伍对两药主要组分溶出有较大影响, 该影响主要在煎煮过程中发生。

[关键词] 酸枣仁; 五味子; 酸枣仁皂苷 A; 五味子醇甲; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0038-04

Determination of Jujuboside A and Schisandrin Contents before and after the Combination of Semen Ziziphi Spinosae with Schisandra Chinensis

GAO Jia-rong^{*}, ZHOU Li, HAN Yan-quan, YAO Dan, XIA Lun-zhu

(The First Affiliated Hospital of Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Chinese Pharmaceutics Laboratory of The Third Grade of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

[Abstract] Objective: To investigate the content variation of jujuboside A and schisandrin before and after the combination of Semen Ziziphi Spinosae with Schisandra chinensis. **Method:** Jujuboside A and Schisandrin Contents were decocted with water separately and the separate aqueous extract were combined partly. Then the contents of Jujuboside A and Schisandrin determined by high performance liquid chromatography (HPLC). **Results:** Both contents of Jujuboside A and Schisandrin were declined significantly when Semen Ziziphi Spinosae and Schisandra Chinensis decocted together. **Conclusion:** The great influence of the combination of Semen Ziziphi Spinosae with Schisandra chinensis on the contents of main chemical constituents was mainly carried on in the decoction process which provides a certain scientific basis for the reasonable Chinese herbal medicine.

[Key words] Semen Ziziphi Spinosae; Schisandra chinensis; jujuboside A; schisandrin; HPLC

药对是中药复方配伍的最简单、最基本和最常见的形式, 其配伍符合中医“七情和合”理论和组合原则, 具备复方的基本主治功能和疗效, 可以通过揭示药对配伍规律阐明复方配伍的科学性。采用化学研究方法研究配伍或煎煮制备过程中化学成分所发

生的量的变化和质的改变是研究中药配伍的一条可行性路径。酸枣仁为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujube* Mill var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. chou 的干燥成熟种子, 有补肝宁心、镇静安神、敛汗、生津之功效^[1], 为中医首选安神药, 用于治疗虚烦不眠、惊悸多梦、体虚多汗、津伤口渴等症。五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis*(Turcz) Baill 的干燥成熟果实, 有收敛固涩、益气生津、补肾宁心之功效^[2]。酸枣仁和五味子配伍使用在较多方剂中出现, 如天王补心丹、补肾益脑片、强身健脑片、加味酸枣仁合

[收稿日期] 2009-11-30

[基金项目] 安徽省教育厅课题(KJ2008A41 ZC)

[通讯作者] * 高家荣, Tel: (0551) 2838556

剂等,是中医临床常用的药对之一。本文通过测定煎出物中酸枣仁皂苷 A 和五味子醇甲的含量来比较酸枣仁与五味子单煎与合煎条件对酸枣仁皂苷 A 和五味子醇甲煎出量的影响,以期为两药的配伍使用提供一定的实验依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Waters 高效液相色谱仪(600 泵,2487 检测器,Millennium³² 工作站),BP211D 电子天平(德国塞多利斯公司),HHS 型水浴锅(巩义市英峪予华仪器厂),500 mL 调温电热套(上海浦东新区电仪仪器厂),SK3200H 超声清洗器(上海科导仪器有限公司),SYZ-B 石英亚沸高纯水蒸馏器,AP-01 型真空泵。

1.2 药品与试剂 酸枣仁、五味子药材(安徽中医学院第一附属医院中药库房提供,经黄玉霞主管中药师鉴定两药均为正品),酸枣仁皂苷 A 对照品(批号 110857-200709)、五味子醇甲对照品(批号 110857-200709)均购自中国药品生物制品检定所,甲醇、乙腈均为色谱纯;重蒸水自制,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 酸枣仁皂苷 A: Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(35:65),流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 205 nm;五味子醇甲: Waters Symmetry C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),甲醇-水(75:25),流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 250 nm,柱温室温,进样量 20 μL。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取酸枣仁皂苷 A 对照品 15.03 mg 至 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解,定容,作为酸枣仁皂苷 A 对照品贮备液(0.601 2 mg · mL⁻¹)。精密称取五味子醇甲对照品 15.09 mg 至 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解,定容,作为五味子醇甲对照品贮备液(0.603 6 mg · mL⁻¹)。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 酸枣仁单煎液 精确称取酸枣仁 10.0 g,置 500 mL 圆底烧瓶中,加入 10 倍量的蒸馏水,煎煮 2 次,每次 1 h,过滤合并滤液,即得酸枣仁单煎液。将滤液蒸干,加 5% NaOH 溶液 50 mL 使完全溶解,转移至分液漏斗中,乙醚脱脂 3 次,每次 30 mL,弃去乙醚层,下层挥尽乙醚后,用水饱和的正丁醇萃取 3 次,每次 30 mL,合并正丁醇液,用正丁醇饱和的水洗涤 2 次,每次 10 mL,正丁醇液水浴蒸干,残渣用

甲醇溶解,定容至 10 mL 量瓶中,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,得酸枣仁单煎液供试品。

2.3.2 五味子单煎液 精确称取五味子 10.0 g,置 500 mL 圆底烧瓶中,加入 10 倍量的蒸馏水,煎煮 2 次,每次 1 h,过滤合并滤液,即得五味子单煎液。将滤液蒸干,甲醇溶解定容至 50 mL 量瓶中,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,得五味子单煎液供试品。

2.3.3 酸枣仁五味子合煎液 精确称取酸枣仁 10.0 g 及五味子 10.0 g,置 500 mL 圆底烧瓶中,同法煎煮,过滤合并滤液,即得酸枣仁五味子合煎液。将此合煎液分别按上述酸枣仁单煎液、五味子单煎液处理方法处理,供含量测定。

2.3.4 酸枣仁五味子单煎混合液 先制备酸枣仁单煎液和五味子单煎液,制备方法同上,再将两单煎液混合,即得酸枣仁五味子单煎混合液。将此合并液分别按上述酸枣仁单煎液、五味子单煎液处理方法处理,供含量测定。

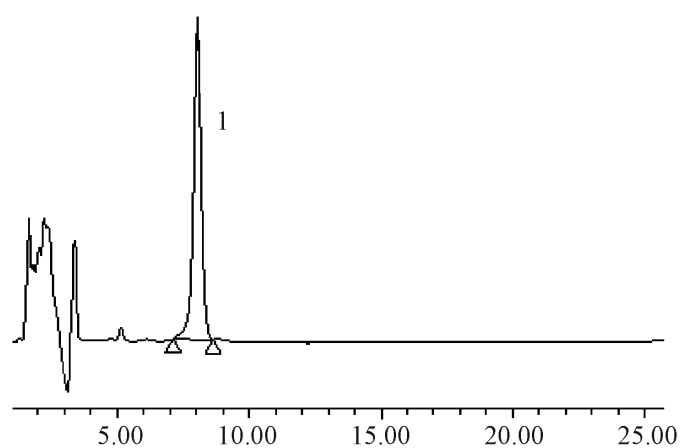
2.4 标准曲线绘制 精密吸取酸枣仁皂苷 A 对照品贮备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 分别至 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,按上述色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,酸枣仁皂苷 A 对照品浓度(μg · μL⁻¹)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 3.07 \times 10^5 X - 5.72 \times 10^4$, $r = 0.999 8$,酸枣仁皂苷 A 在 0.601 ~ 6.012 μg 具有良好的线性关系。精密吸取五味子醇甲对照品贮备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 分别至 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,按上述色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,五味子醇甲对照品浓度(μg · μL⁻¹)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 4.88 \times 10^4 X - 2.04 \times 10^4$, $r = 0.9999$,五味子醇甲在 0.604 ~ 6.036 μg 具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取 0.240 5 mg · mL⁻¹ 的酸枣仁皂苷 A 对照品溶液和 0.181 1 mg · mL⁻¹ 的五味子醇甲对照品溶液 20 μL 分别连续测定 5 次,测定峰面积并计算 RSD 分别为 1.94%, 0.14%,表明仪器精密度良好。

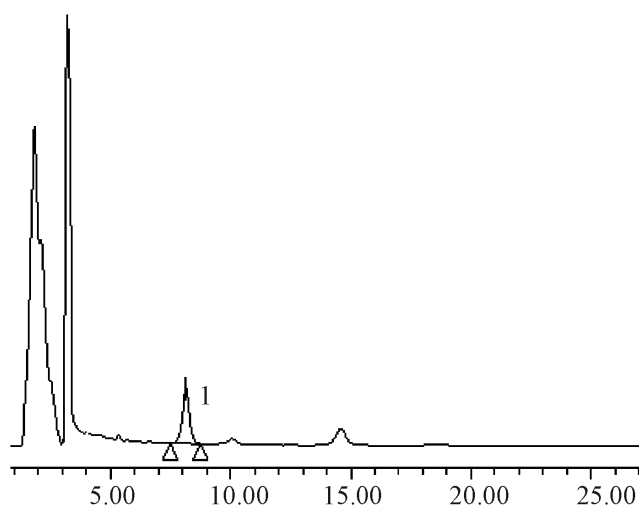
2.6 稳定性试验 精密吸取浓度为 0.240 5 mg · mL⁻¹ 的酸枣仁皂苷 A 对照品溶液和浓度为 0.181 1 mg · mL⁻¹ 的五味子醇甲对照品溶液,在 0, 2, 4, 6, 8 h 进样,测定峰面积,结果酸枣仁皂苷 A 对照品溶液峰面积 RSD 为 1.86%,五味子醇甲对照品溶液峰面积 RSD 为 0.20%,表明两种对照品溶液均在 8 h 内

稳定。

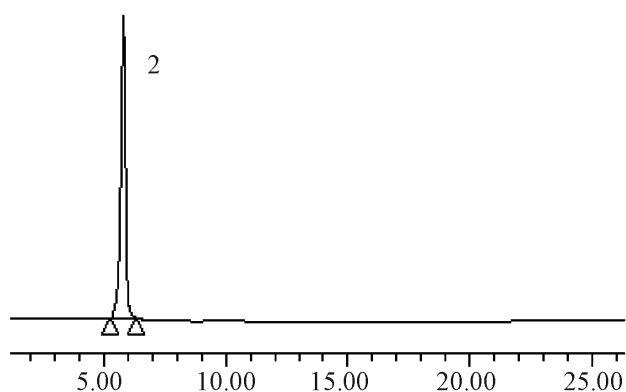
2.7 重复性试验 取同一批酸枣仁和五味子样品各 6 份, 分别按 2.3 项处理后, 进样, 每份进样 1 针, 共测定 6 次, 结果酸枣仁单煎样品中酸枣仁皂苷 A 的平均含量为 $0.1782 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 2.22%, 五味子单煎样品中五味子醇甲的平均含量为 $1.2627 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 1.67%。



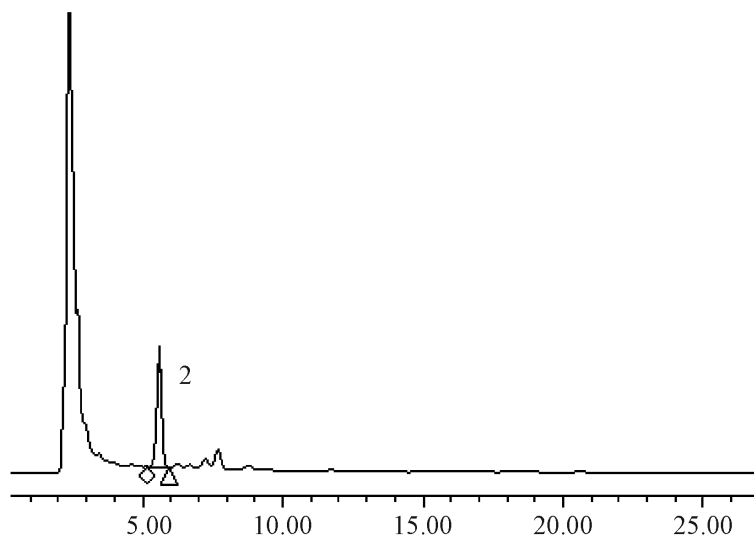
A



B



C



D

t/min

图 1 酸枣仁皂苷 A、五味子醇甲色谱图

A. 酸枣仁皂苷 A 对照品; B. 样品; C. 五味子醇甲对照品; D. 样品

1. 酸枣仁皂苷 A; 2. 五味子醇甲

表 1 酸枣仁五味子单煎合煎液样品测定

No.	酸枣仁皂苷 A/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$			五味子醇甲/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$		
	单煎液	单煎混合液	合煎液	单煎液	单煎混合液	合煎液
1	0.182 8	0.211 2	0.003 4	1.265 4	1.332 1	0.406 6
2	0.179 2	0.230 0	0.003 3	1.268 3	1.346 3	0.411 6
3	0.177 9	0.215 8	0.003 5	1.260 2	1.371 4	0.409 9
平均	0.180 0	0.219 0	0.003 4 ¹⁾	1.264 6	1.349 9	0.409 4 ^{**}

注: 与单煎混合液比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

2.9 加样回收率试验 取已知含量的同一批号酸枣仁、五味子药材粉末各 6 份, 精密称定, 分别加入

2.8 样品含量测定 取 2.3 项下处理好的酸枣仁单煎液、五味子单煎液、酸枣仁五味子合煎液、酸枣仁五味子单煎混合液分别进行测定, 进样量 $20 \mu\text{L}$, 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图(图 1), 以外标法计算样品中的酸枣仁皂苷 A 和五味子醇甲的含量, 结果见表 1。酸枣仁和五味子配伍后, 酸枣仁皂苷 A 和五味子醇甲的煎出量明显降低。

相应量的的酸枣仁对照品和五味子醇甲对照品, 按 2.3 项下单煎液的处理方法处理, 进样量 $20 \mu\text{L}$, 测定峰面积, 计算回收率, 结果见表 2。

3 讨论

中药复方是一个复杂的体系, 建立一套稳定、可靠、重复性好、有较好的分离度和适当分离时间的色谱分析方法, 是研究中药配伍的必要手段。酸枣仁的含量测定方法 2005 年版《中国药典》未收载, 其主要成分以酸枣仁皂苷 A 为代表, 文献报道较多^[3-5], 五味子的含量测定方法参照 2005 年版

《中国药典》^[5], 以五味子醇甲为指标成分, 通过预试验考察, 我们采用高效液相色谱法测定酸枣仁皂苷 A 和五味子醇甲的含量。通过复方合煎与各味

药单煎及单煎混合的指标性成分含量比较分析, 可以得出两药配伍前后化学成分相互作用而出现量的变化情况。

表 2 回收率试验

检测指标	称样量 /g	样品中量 /mg	加入对照品量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
酸枣仁皂苷 A	4.949 1	0.904 7	0.910 0	1.802 8	98.69	97.89	1.24
	5.060 7	0.925 1	0.910 0	1.803 0	99.47		
	5.002 7	0.914 5	0.910 0	1.801 0	97.42		
	5.060 2	0.925 0	0.910 0	1.828 4	99.27		
	4.952 4	0.905 3	0.910 0	1.784 5	96.62		
	5.058 0	0.924 6	0.911 0	1.824 4	98.88		
五味子醇甲	4.834 0	6.117	6.308	12.348	98.78	98.53	0.65
	4.902 8	6.204	6.308	12.357	97.54		
	4.865 7	6.157	6.308	12.350	98.18		
	4.826 1	6.107	6.308	12.371	99.30		
	4.937 6	6.248	6.308	12.454	98.38		
	4.896 5	6.196	6.308	12.442	99.02		

本实验结果显示, 对于酸枣仁皂苷 A 和五味子醇甲的含量, 酸枣仁五味子单煎液和合煎液之间有显著性差异 ($P < 0.01$), 单煎液中的酸枣仁皂苷 A 和五味子醇甲含量显著高于合煎液中的含量, 单煎混合液中的酸枣仁皂苷 A 和五味子醇甲含量也显著高于合煎液中的含量, 而单煎液混合液中的酸枣仁皂苷 A 和五味子醇甲含量略高于单煎液。提示, 对酸枣仁皂苷 A 和五味子醇甲的含量影响主要发生在煎煮过程中。

中药配伍后的化学成分并非是单味药化学成分的简单加和, 煎煮过程中复方有化学成分含量的变化。出现上述结果的原因可能是酸枣仁和五味子在煎煮过程中, 化学成分发生改变, 溶液 pH 的变化, 皂苷、鞣质等成分的影响, 各化学成分之间的反应以及煎煮中的受热水解等, 都可能导致复方在煎煮过程中其化学成分发生量或质的变化。中药复方研究的另一重要任务就是寻找能够提升复方疗效、使药效指标达到综合最优的配伍比例。酸枣仁五味子的

不同配伍比例、多个主要指标成分在单煎与合煎情况下的含量考察以及药效学研究均有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 史琪荣, 周耘, 周萍, 等. 中药酸枣仁的研究概况[J]. 药学实践杂志, 2004, 22(2): 94.
- [2] 刘超, 朱宏吉. 五味子研究现状[J]. 中国医药导报, 2007, 4(32): 15.
- [3] 夏苗芬, 董珂, 朱锵林. 薄层扫描法测定酸枣仁中酸枣仁皂苷 A 含量[J]. 中国药师, 2007, 2(10): 180.
- [4] 周庆武, 李玲玲, 纪标, 等. 反相高效液相色谱法测定酸枣仁颗粒中酸枣仁皂苷 A 与酸枣仁皂苷 B 的含量[J]. 时珍国医国药, 2008, 3(19): 718.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 44.

[责任编辑 顾雪竹]