

· 基础研究 ·

HPLC 同时测定五味子中 7 个木脂素类化合物的含量[△]王书云^{1,2,3}, 梁宏刚^{2,3}, 黄健^{2,3}, 王金辉^{2,3*}, 杨宝峰³

1. 河南大学 药学院, 河南 开封 475004;

2. 哈尔滨医科大学药化教研室/省部共建生物医药工程重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150081;

3. 沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016

[摘要] 目的: 建立同时测定五味子中五味子醇甲、戈米辛 D、五味子醇乙、当归酰戈米辛 H、五味子甲素、戈米辛 N、五味子乙素含量的 HPLC 方法。方法: 采用 SunFire™ C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-水梯度洗脱, 流速: 1 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温: 30 ℃。结果: 7 个化合物在各自范围内均呈良好的线性关系, 平均加样回收率为 98.23%~100.51%, RSD 为 0.68%~1.80%。发现不同产地五味子中化合物的含量差别不大, 7 个木脂素的总质量分数最高为 16.27 mg·g⁻¹, 最低为 9.52 mg·g⁻¹。结论: 本实验建立的 HPLC 含量测定方法准确、可靠、重复性好, 可用于五味子的质量控制。

[关键词] 五味子; 联苯环辛烯型木脂素类化合物; 高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R282.71; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)04-0473-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20181016006

HPLC Simultaneous Determination of 7 Major Dibenzocyclooctadiene-type Lignans in fruits of *Schisandrae chinensis*WANG Shu-yun^{1,2,3}, LIANG Hong-gang^{2,3}, HUANG Jian^{2,3}, WANG Jin-hui^{2,3*}, YANG Bao-feng²

1. School of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475004, China;

2. Department of Medicinal Chemistry and Natural Medicine Chemistry(State-Province Key Laboratories of Biomedicine-Pharmaceutics of China, Harbin Medical University, Harbin 150081, China;

3. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the simultaneous determination of 7 dibenzocyclooctadiene-type lignans in Fructus Schisandrae Chinensis. **Methods:** The analysis was performed on a SunFire™ C₁₈ column(150 mm×4.6 mm, 5 μm) at 30℃, with the mobile phase acetonitrile-water system in a gradient elution manner at a flow rate of 1.0 ml/min, and the detection wavelength was set at 254 nm. **Results:** The linear range of the seven dibenzocyclooctadiene-type lignans were good in their own ranges, and their average recovery were between 98.23% and 100.51% with the RSDs of 0.68%–1.80%. There was no significant difference of the contents of seven compounds in Fructus Schisandrae Chinensis from different batches. The total content of seven investigated lignans was among 9.52–16.27 mg·g⁻¹. **Conclusions:** The method is accurate, convenient and reproducible for the determination of 7 dibenzocyclooctadiene-type lignans in Fructus Schisandrae Chinensis.

[Keywords] Fructus Schisandrae Chinensis; dibenzocyclooctadiene-type lignans; HPLC; quality control

五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* Baill. 的干燥成熟果实, 主产于辽宁、吉林、黑龙江、内蒙古等地, 故又称北五味子。《神农本草经》列为上品, 性温, 味酸、甘, 归肺、肾、心经, 具有生津敛汗、益气滋肾、宁心安神的作用, 常用于

久嗽虚喘、遗尿尿频、心悸失眠等症^[1]。

五味子含有多种成分, 主要成分为木脂素类, 约占 8%^[2]。五味子中木脂素类化合物以联苯环辛烯型木脂素类化合物为主, 且为五味子中最主要的活性成分, 如: 五味子甲素、五味子乙素、五味子

[△] [基金项目] 国家重大新药创制(2018ZX09305005); 护肝片标准化建设(ZYBZH-C-HLJ-15); 博士科研启动基金(CJ3050A24051)

* [通信作者] 王金辉, 教授, 研究方向: 中药及民族药药效及物质基础研究; Tel: (451)86685745, E-mail: wangjh_716@163.com

醇甲、五味子醇乙、戈米辛 J、戈米辛 K、当归酰戈米辛 H 等^[2-9]。

五味子为临床常用中药之一,具有保肝、镇静、催眠、保护脑神经细胞、提高记忆力、抗老年痴呆、提高免疫力、抗氧化、抗肿瘤等作用^[10-18],其质量优劣直接影响到临床疗效和用药安全。影响药材质量的因素很多,从产地、采收与加工,到五味子的炮制、运输与贮存等方面,均对五味子药材质量优劣产生影响。在前期对五味子指纹图谱研究的基础上,确定五味子中7个主要的化合物,并对这7个主要化合物进行提取、分离、鉴定,确定化合物为:五味子醇甲(1)、戈米辛 D(2)、五味子醇乙(3)、当归酰戈米辛 H(4)、五味子甲素(5)、戈米辛 N(6)、五味子乙素(7),化合物结构见图1。本文建立同时测定五味子中7个主要的联苯环辛烯型木脂素类化合物含量的 HPLC 方法,为五味子的质量控制及保证五味子临床用药的安全、有效、质量可控提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪(HPLC Waters 2690 Separations Module),检测器:Waters 2996 photodiode Array Detector,色谱柱:SunFire™ C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);KQ 5200 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);FA1004N 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);粉碎机(型号:FW-80,功率:460 W,转速:24 000 转/min);SPE 固相萃取小柱(ODS, 0.5 g)等。

1.2 试剂

液相分析用甲醇、乙腈为色谱纯(J. T. Baker);甲醇、乙醇、95%乙醇等分析纯有机试剂(天津市富宇精细化工有限公司);磷酸为色谱纯(天津市科密欧化学试剂有限公司);实验用水均为双蒸水。

对照品五味子醇乙(成都生物制品检定所,批号: MUST-13042601);五味子醇甲、五味子乙素、五味子甲素(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110857-201211、110765-200710、0764-200107);戈米辛 D、戈米辛 N、当归酰戈米辛 H 为实验室自制,纯度均大于 98%。

五味子药材分别购于沈阳、丹东、吉林、黑龙江等地药材市场或药店。

2 方法

2.1 色谱条件

SunFire™ C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相 A(乙腈)-B(水),梯度洗脱:0 ~ 10 min, 38% ~ 44% A;10 ~ 18 min, 44% ~ 45% A;18 ~ 28 min, 45% ~ 48% A;28 ~ 35 min, 48% ~ 60% A;35 ~ 37 min, 60% ~ 47% A;37 ~ 65 min, 47% ~ 48% A;65 ~ 67 min, 48% ~ 60% A;67 ~ 76 min, 60% ~ 61% A;76 ~ 78 min, 61% ~ 85% A,检测波长:254 nm,柱温:30 ℃,进样量 20 μL,理论塔板数以五味子醇甲计算,不低于 5000。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素、戈米辛 D、戈米辛 N、当归酰戈米辛 H 适量,色谱甲醇溶解,配制成质量浓度分别为 1.00、1.20、0.94、1.18、1.46、1.13、2.10 mg·mL⁻¹的对照品储备液。

分别精密吸取五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素、戈米辛 D、戈米辛 N、当归酰戈米辛 H 适量至 5 mL 容量瓶,色谱甲醇定容至刻度,摇匀,即得五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素、戈米辛 D、戈米辛 N、当归酰戈米辛 H 质量浓度分别为 45.00、9.96、7.98、14.99、9.05、10.96、10.92 μg·mL⁻¹的混合对照品溶液。

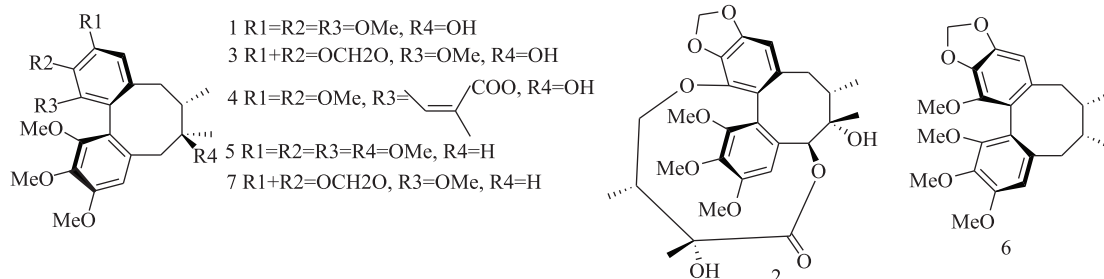


图1 化合物的结构式

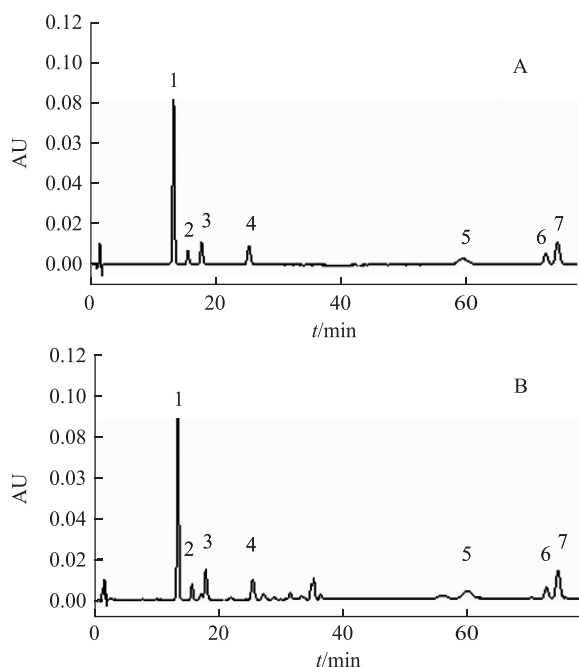
2.3 供试品溶液的制备

精密称取五味子药材粉末约 1.0 g, 精密加入甲醇 25 mL, 称质量, 超声 30 min, 冷却, 称质量, 补质量, 精密取上清液 2 mL 过 SPE 柱, 色谱甲醇洗 3 次, 每次 2 mL, 将滤液转移至 10 mL 量瓶, 色谱甲醇定容至刻度, 摇匀, 过 0.22 μm 滤膜, 即得药材供试品溶液。

3 结果

3.1 方法专属性

分别精密吸取空白溶剂、混合对照品溶液、药材供试品溶液 20 μL 注入高效液相色谱仪测定, 按 2.1 项下色谱条件进行分析, 绘制高效液相色谱图, 见图 2。由色谱图可知, 在对照品色谱峰相应的位



注: A. 对照品; B. 样品; 1. 五味子醇甲; 2. 戈米辛 D; 3. 五味子醇乙; 4. 当归酰戈米辛 H; 5. 五味子甲素; 6. 戈米辛 N; 7. 五味子乙素。

图 2 对照品和供试品的 HPLC 图

置上, 供试品溶液具有相同保留时间的色谱峰, 且其他杂质对五味子多组分含量测定均无干扰, 说明此方法专属性良好。

3.2 线性关系考察

取五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素、戈米辛 D、戈米辛 N、当归酰戈米辛 H 质量浓度分别为 45.00、9.96、7.98、14.99、9.05、10.96、10.92 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液过 0.22 μm 滤膜, 分别精密进样 2、5、10、20、30、40、50 μL , 按 2.1 项下色谱条件进行分析。以对照品进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 并进行线性回归, 得各化合物的回归方程, 见表 1。

3.3 精密度试验

取五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素、戈米辛 D、戈米辛 N、当归酰戈米辛 H 质量浓度分别为 45.00、9.96、7.98、14.9、9.05、10.96、10.92 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液在 2.1 项下色谱条件连续进样 6 针, 进样量 20 μL , 7 个成分的 RSD 分别为 0.93%、0.88%、0.31%、0.91%、1.86%、0.72%、1.41% ($n=6$), 说明仪器精密度良好, 符合含量测定的要求。

3.4 重复性试验

分别精密取五味子药材粉末 6 份, 每份约 1.0 g, 按 2.3 项下方法操作制备供试品溶液, 分别进样 20 μL , 在 2.1 项下色谱条件分析测定, 7 个成分的 RSD 分别为 1.65%、1.54%、1.55%、1.80%、1.26%、1.94%、1.57% ($n=6$), 符合含量测定的要求。

3.5 稳定性试验

按 2.3 项下方法制备的供试品溶液, 在 0、4、8、12、24、48 h, 分别进样 20 μL , 在 2.1 项下色谱条件分析测定, 结果表明 7 个化合物在 48 h 内稳定, RSD 分别为 0.52%、1.58%、0.63%、1.51%、1.71%、1.41%、1.85% ($n=6$) 符合含量测定的要求。

表 1 五味子中 7 个主要木脂素含量测定的线性、检测限及定量限

化合物编号	线性方程	r	线性范围/ μg	检测限/ng	定量限/ng
1	$Y = 2.01 \times 10^3 X - 1.70 \times 10^4$	0.999 9	0.09 ~ 2.25	0.90	2.25
2	$Y = 8.32 \times 10^2 X - 3.06 \times 10^3$	0.999 8	0.02 ~ 0.45	4.53	9.05
3	$Y = 1.40 \times 10^3 X - 1.43 \times 10^3$	1.000 0	0.02 ~ 0.50	1.99	4.98
4	$Y = 1.42 \times 10^3 X - 3.18 \times 10^5$	0.999 9	0.02 ~ 0.55	2.18	5.46
5	$Y = 2.00 \times 10^3 X - 7.86 \times 10^3$	0.999 7	0.02 ~ 0.40	7.98	15.95
6	$Y = 1.01 \times 10^3 X - 2.53 \times 10^3$	0.999 8	0.02 ~ 0.55	2.10	5.48
7	$Y = 1.56 \times 10^3 X - 1.13 \times 10^4$	0.999 7	0.03 ~ 0.75	3.00	7.49

3.6 回收率试验

精密称取已知含量的五味子药材粉末6份,每份约0.5 g,分别加入一定量的对照品,按2.3项下方法操作制备供试品溶液,分别进样20 μL ,在2.1项下色谱条件分析测定,结果见表2。

表2 五味子中7个木脂素含量测定的加样回收率试验结果($n=6$)

化合物编号	样品含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	平均回收率/ %	RSD/ %
1	5.63	4.50	10.05	100.33	1.80
2	1.04	0.91	1.95	99.60	0.68
3	1.44	1.00	2.42	100.17	1.63
4	1.23	1.09	2.33	100.51	1.61
5	0.98	0.80	1.79	99.22	1.36
6	1.05	1.10	2.10	98.23	1.77
7	1.96	1.50	3.45	99.90	1.14

3.7 样品测定

分别精密称取不同产地五味子药材粉末约1.0 g,按2.3项下方法操作制备供试品溶液,分别进样20 μL ,在2.1项下色谱条件分析测定不同产地五味子中7个化合物的含量,结果见表3。

表3 不同产地五味子中7个木脂素的含量测定结果
 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

编号	质量分数							总质量分数
	1	2	3	4	5	6	7	
S1	5.67	0.56	2.06	1.42	0.65	1.07	2.49	13.92
S2	5.42	0.49	1.88	1.21	0.81	1.01	2.37	13.19
S3	3.89	0.43	1.77	0.82	0.52	0.81	1.86	10.10
S4	6.00	0.50	1.74	1.51	0.89	1.07	2.56	14.27
S5	5.69	0.48	1.57	1.24	1.04	1.03	2.40	13.45
S6	4.12	0.43	1.50	0.85	0.57	0.86	1.96	10.29
S7	6.08	0.48	1.56	1.48	1.01	1.00	2.59	14.20
S8	5.78	0.40	1.53	1.34	1.07	0.93	2.45	13.50
S9	4.15	0.36	1.37	0.83	0.54	0.69	1.96	9.90
S10	7.10	1.34	1.59	1.47	1.14	1.31	2.32	16.27
S11	4.96	0.39	1.65	1.14	1.13	1.18	2.33	12.78
S12	5.55	0.47	1.97	1.32	1.05	1.26	2.62	14.24
S13	5.60	0.36	1.47	1.38	0.93	0.93	2.62	13.29
S14	5.34	0.36	1.38	1.20	0.91	0.93	2.53	12.65
S15	3.88	0.31	1.25	0.84	0.55	0.70	1.99	9.52

4 讨论

4.1 色谱柱的选择

本文考察了 SunFire™ (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), Shimadzu vp-ODS (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), Kromasil (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 3种色谱柱对五味子甲醇提取物的分离情况,综合峰形、分离度、使用范围等因素,选定 SunFire™ 色谱柱作为分析柱。

4.2 色谱条件的选择

为了提高分析的灵敏度和精确度,本文考察了不同流动相组成(甲醇-水,乙腈-水溶液)对实验结果的影响,结果表明,流动相采用水(A)-乙腈(B)梯度洗脱,能够获得良好的色谱分离效果。采用二极管阵列检测器(190~800 nm)对检测波长进行了考察,结果显示,联苯环辛烯型木脂素类化合物在254 nm处均有较好的紫外吸收,且色谱峰信息最为丰富,杂质较少,因此,选择254 nm作为检测波长。

4.3 供试品溶液制备的优化

为了使五味子中联苯环辛烯型木脂素类化合物能被更完全地提取出来,本文首先对提取方式(超声提取、回流提取、索氏提取)、提取溶剂(甲醇、30%甲醇水、50%甲醇水、70%甲醇水、90%甲醇水)、料液比(10、20、25、50倍量)、提取时间(15、30、60、90 min)等影响因素进行考察,记录色谱图。结果显示,以25倍量甲醇为提取溶剂、超声提取30 min制备样品的色谱图峰面积相对较大,化合物总含量相对较高,故最终确定供试品的制备方法:25倍量甲醇超声提取30 min。

本文建立了同时定量测定五味子中7个主要木脂素类化合物的HPLC方法,并测定了收集到的不同产地的15批五味子样品中7个主要木脂素类化合物的含量,结果发现,不同产地五味子中化合物的含量差别不大,7个木脂素的总质量分数最高为16.27 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,最低为9.52 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。该方法准确、可靠、重复性好,可用于五味子的质量评价。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:66.

- [2] 薛雪,张红芬,白小红,等.超分子有序聚集凝固液相微萃取及其对五味子中木脂素类化合物的测定及质量评价[J].高等学校化学学报,2012,5(33):942-947.
- [3] XUE Y B,ZHANG Y L,YANG J H,et al. Nortriterpenoids and lignans from the fruit of *Schisandra chinensis*[J]. Chem Pharm Bull,2010,58(12):1606-1611.
- [4] 王梅,刘明明,梁晨光,等.五味子水提工艺优化及液质联用测定方法研究[J].中国现代中药,2016,18(11):1484-1489.
- [5] ZHANG W D,WANG Q,WANG Y,et al. Application of ultrahigh-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry for analysis of lignans and quality control of fructus *Schisandrae chinensis* [J]. J Sep Sci,2012,35(17):2203-2209.
- [6] HUANG S X,YANG J,HUANG H,et al. Structural characterization of schintrialactone, a new class of nortriterpenoids from *Schisandra chinensis*[J]. Org Lett,2007,9(11):4175-4178.
- [7] 王丽薇.五味子的化学成分研究[D].杭州:浙江大学,2004.
- [8] ZHANG L K,CHEN H X,TIAN J G,et al. Antioxidant and anti-proliferative activities of five compounds from *Schisandra chinensis* fruit[J]. Ind Crops Prod,2013,50:690-693.
- [9] 张继丹,李化,柯华香,等.离子液体超声提取五味子木脂素的工艺研究[J].中国现代中药,2017,19(5):700-705.
- [10] 朱艳,王俊平.五味子乙素对丙戊酸钠肝脏损伤的保护作用[J].中国中西医结合儿科学,2012,4(5):405-406.
- [11] 万丽华,石绘,范新田.北五味子醇提取物的镇静催眠作用[J].中国民康医学,2012,12(20):2461-2462.
- [12] 殷路萍,李志西,张村雪.五味子酒改善小鼠睡眠作用的研究[J].食品工业科技,2013,34(14):346-349.
- [13] 辛晓林,张桂春,黄清荣.五味子镇痛效果研究[J].安徽农业科学,2009,37(32):15842-15843.
- [14] 周妍研,刘艳丽,董春雪,等.五味子醇甲对APP/PS1双转基因痴呆模型小鼠脑组织突触素、 α -突触核蛋白表达的影响[J].中国药理学通报,2013,29(8):1076-1078.
- [15] 贾丽艳.五味子酮对阿尔茨海默病防治作用的机制研究[D].上海:第二军医大学,2005.
- [16] 李尽贺,张涛,王明富,等.五味子纳米微粒水提液对衰老小鼠脑线粒体能量代谢的影响[J].中国老年学杂志,2008,4(28):667-668.
- [17] 李艳,董佳梓,贾朝娟,等.五味子对去卵巢致骨质疏松大鼠胫骨护骨素、核因子- κ B受体活化因子配体蛋白表达的影响[J].中医杂志,2010,51(11):1028-1029.
- [18] 王蕾,唐勇,黄山.五味子乙素和五味子醇甲对PC12细胞氧化损伤的保护作用[J].中国临床康复,2006,10(47):64-67.

(收稿日期:2018-10-16 编辑:王笑辉)