

引用:陈美先,牛昱婷,徐浩南,等.HPLC法同时测定五味子根皮中五种木脂素的含量[J].陕西中医药大学学报,2024,47(6):24-28.

HPLC法同时测定五味子根皮中 五种木脂素的含量*

陈美先¹ 牛昱婷² 徐浩南² 邓翀² 王薇² 张东东^{2**}

(1.长武县人民医院,陕西 咸阳 713600;2.陕西中医药大学药学院,陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 建立 HPLC 法同时测定五味子根皮中五味子酚、安五脂素、五味子甲素、五味子乙素及五味子丙素的含量。方法 采用 Intertsil ODS-3 色谱柱(4.6×250 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~28 min,49%→96% A;28~31 min,96%→96% A;31~35min,96%→100% A);流速 0.5 mL·min⁻¹;检测波长 220 nm;柱温 30 ℃;进样量 10 μL,测定五味子根皮五味子酚、安五脂素、五味子甲素、五味子乙素及五味子丙素含量。结果 该色谱条件下,五种木脂素类化学成分具有良好的线性关系,其含量分别为 0.70 mg·g⁻¹、6.53 mg·g⁻¹、2.24 mg·g⁻¹、1.75 mg·g⁻¹、1.16 mg·g⁻¹;重复性(RSD)分别为 2.65%、1.18%、2.94%、1.53%、1.50%;稳定性(RSD)分别为 2.50%、1.60%、1.93%、1.69%、1.86%。结论 所建立的含量测定方法稳定可行,重复性好,为后续建立五味子根皮质量标准研究提供了依据。

关键词:高效液相色谱;五味子;木脂素;含量测定;资源

中图分类号:R284

文献标识码:A

文章编号:2096-1340(2024)06-0024-05

DOI:10.13424/j.cnki.jsctcm.2024.06.004

Simultaneous Determination of Five Lignans in the Root Bark of Schisandra Chinensis by HPLC Method

CHEN Meixian¹ NIU Yuting² XU Haonan²

DENG Chong² WANG Wei² ZHANG Dongdong²

(1.Changwu County People's Hospital,Shaanxi Xianyang 713600,China;

2.College of Pharmacy,Shaanxi University of Chinese Medicine,Shaanxi Xianyang 712046,China)

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for simultaneous determination of schisandrin, sphingolipids, schisandrin A, schisandrin B, and schisandrin C in the root bark of Schisandra chinensis. **Methods** Intertsil ODS-3 chromatographic column (4.6×250 mm,5 μm) was used;Mobile phase: acetonitrile (A) -water (B),gradient elution (0-28 min,49%→96% A;28-31 min,96%→96% A;31-35min,96%→100% A);Flow rate of 0.5 mL/min;Detection wavelength 220 nm;Column temperature 30 ℃;The injection volume is 10 μL,and the contents of schisandrin, aconitine, schisandrin A, schisandrin B, and schisandrin C in the root bark of Schisandra chinensis were determined. **Results** Under the chromatographic conditions, the five lignans showed a good linear relationship, with contents of 0.70 mg·g⁻¹, 6.53 mg·g⁻¹, 2.24 mg·g⁻¹, 1.75 mg·g⁻¹, 1.16 mg·g⁻¹ respectively; The repeatability (RSD) were 2.65%, 1.18%, 2.94%, 1.53%, and 1.50% respectively; The stability (RSD) were 2.50%, 1.60%, 1.93%, 1.69%, and 1.86% respectively. **Conclusion** The established content determination method is stable, feasible, and has good reproducibility, providing a basis for the subsequent establishment of quality standards for Schisandra root bark.

Key words: High-performance liquid chromatography; Schisandra chinensis; Lignan; Content determination; Resources

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82174111);陕西中医药大学创新团队项目(2023-CXTD-05)

** 通讯作者:张东东,副教授。E-mail:zhangnatprod@163.com

华中五味子主产于中国和东亚其他地区,应用历史悠久。其果实、藤茎及根部都可药用,现代药理学表明其具有抗炎^[1-3]、抗肿瘤^[4]、抗氧化^[5-9]、神经保护^[10-12]、镇静作用^[13]、抗菌^[14]等多种药理活性,其包含有木脂素^[15-16]、黄酮^[17]、三萜、简单苯丙素^[18]等多种化学成分。五味子根皮,又名长胜七,为陕西秦岭特色中草药“太白七药”之一,来源于五味子科(*Schisandraceae*)五味子属(*Schisandra*)植物华中五味子(*Schisandra sphenanthera*)的根皮,生于海拔 600~3000 米的湿润山坡边或灌丛中。分布于秦岭山脉和大巴山区各地。陕西境内主产于太白县、周至县等地,具有健脾化湿、涩精止泻等功效,主要用于治疗消化不良、肺虚咳嗽等,在民间应用广泛^[19]。在传统中药中,五味子根皮具有多种保健功效,具有养胃和促进消化的作用,其传统功效和临床应用均有较高研究价值^[20],在《陕西中草药》中记载:“根皮健脾胃,助消化,生津止渴,利水,止咳化痰,活血消肿,止痛。主治消化不良,腹胀,积块,久咳,跌打损伤,骨折及小儿遗尿”。通过现代技术手段分析发现,五味子根皮中主要化学成分为木脂素类、简单苯丙素类、黄酮类等^[21-22],其中木脂素类成分具有潜在的抗肿瘤活性,如 schisphenlignan M, schisphenlignan 等报道其 IC_{50} 为 1.40~48.83 μM ^[12],此外,还发现五味子根皮中五味子脂素、桑辛素、五内脂 A 等具有潜在的抗病毒(HSV-1, ZIKV 和 EV-A71)活性,其病毒抑制率为 53.84%~73.20%^[23]。

值得注意的是,虽然五味子根皮在传统民间医学中的使用历史悠久,而且初步研究也显示出其前景,然而目前的研究尚未有相关的限量检查,缺少主要化学成分的含量测定,难以有效控制其质量。因此本实验拟采用 HPLC 法对五味子根皮中的五种木脂素类成分含量进行测定,以期后续为其质量标准的建立提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Waters e2695 型高效液相色谱仪(包括自动进样器,四元泵,柱温箱,2998PDA 检测器); Intertsil ODS-3 色谱柱(4.6×250 mm, 5 μm); KQ-300E 超声波清洗器(上海楚定分析仪器公司); WB-502S 电热恒温水浴锅(广东环凯生物科技有限公司); BT-125D 电子分析天平(谷德森电子分析天平公司)。

1.2 试药 华中五味子根皮于 2019 年 9 月采自于陕西省宝鸡市眉县境内,经陕西中医药大学王薇教授鉴定为五味子科五味子属华中五味子(*Schisandra sphenanthera*)的根皮。五味子酚(批号:PS001207)、安五脂素(批号:PS000099)、五味子甲素(批号:PS000928)、五味子乙素(批号:PS010450)及五味子丙素(批号:PS020290),样品纯度均 $\geq 98.5\%$,均来自于宝鸡市辰光生物科技有限公司。娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈股份有限公司),色谱甲醇(天津市科密欧化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液的制备 分别称取五味子酚、安五脂素、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素对照品适量,定容至质量浓度分别为 22.4 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 、168 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 、80.8 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 、50.4 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 、30.2 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 的混合对照品储备液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取干燥的五味子根皮,粉碎,过 60 目筛,取粉末 0.5 g,精密称定。置于锥形瓶中,加甲醇 25 mL,精密称定重量。超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 30 min,取出放至室温,用甲醇补足减失重量,摇匀,取续滤液 10 mL,定容至 20 mL 容量瓶中,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.2 HPLC 色谱条件 采用 Intertsil ODS-3 色谱柱(4.6×250 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~28 min, 49%→96% A; 28~31 min, 96%→96% A; 31~35 min, 96%→100% A);流速 0.5 $mL \cdot min^{-1}$;检测波长 220 nm;柱温 30 $^{\circ}C$;进样量 10 μL 。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系 精密吸取“2.1.1”项下制备好的混合对照品溶液 2.0 mL、1.5 mL、1.0 mL、0.5 mL、0.2 mL 置 2 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度。在“2.2”项下条件测定峰面积,以对照品质量浓度(X)与峰面积(Y)作标准曲线,得到回归方程、相关系数和线性范围,结果见表 1。

2.3.2 精密度实验 精密吸取同一混合对照品溶液,进样 10 μL ,按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次,进行 HPLC 分析,测得五味子酚、安五脂素、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素峰面积的 RSD 值为 1.20%~1.31%,表明仪器精密度良好。

表 1 线性范围考察结果

序号	成分	回归方程	R^2	线性范围 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	五味子酚	$Y=128958X+18801$	0.9998	2.24~22.40
2	安五酯素	$Y=33903X-40405$	0.9998	16.8~168.00
3	五味子甲素	$Y=136733X-65566$	0.9993	8.08~80.80
4	五味子乙素	$Y=143026X-5498.9$	0.9994	5.04~50.40
5	五味子丙素	$Y=124396X+5190.6$	0.9999	3.02~30.20

2.3.3 重复性实验 取 6 份五味子根皮样品,分别按“2.1.2”项下方法制备供试液,按“2.2”项下色谱条件进样 HPLC 分析,结果五味子酚、安五酯素、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素五种木脂素的 RSD 均<3%,表明该方法重复性良好。

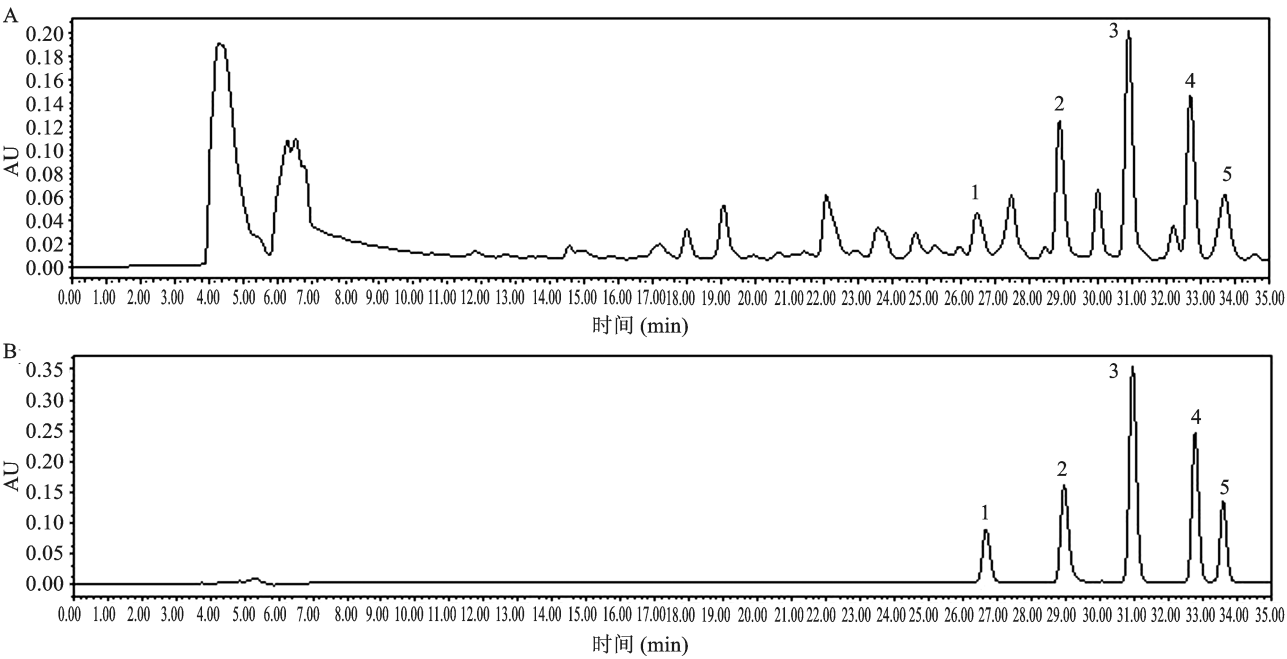
2.3.4 稳定性实验 精密吸取同一供试品溶液,分别于配制后的 0、2、4、8、12 和 24 h 按“2.2”项下色谱条件进样 HPLC 分析,测得五味子酚、安五酯素、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素 24 h 内峰面积的 RSD 值为 1.60%~2.50%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.5 含量测定结果 取混合对照品溶液,按“2.1.1”项下方法制备五味子根皮样品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样 HPLC 分析,结果见图 1。计算样品中五味子酚、安五酯素、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素的含量,结果见表 2。

表 2 含量测定结果

化合物	含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	化合物	含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
五味子酚	0.70	五味子乙素	1.75
安五酯素	6.53	五味子丙素	1.16
五味子甲素	2.24		

2.3.6 加样回收率实验 取已知含量的药材粉末 6 份,每份精密称定约 0.5 g,分别置于 100 mL 具塞对照品溶液,按照“2.1.2”项下的方法制备各供试锥形瓶中,再分别精密加入等量的对照品溶液,按照“2.2”项下色谱条作进样,所得平均回收率为 97.62%、97.83%、98.27%、92.20%、98.37%,RSD 均小于 3%,表明该法的准确性较好。结果见表 3。



注:A.五味子根皮药材 HPLC 分析图;B.对照品 HPLC 分析图。1.五味子酚;2.安五酯素;3.五味子甲素;4.五味子乙素;5.五味子丙素

图 1 HPLC 色谱图

表 3 加样回收率实验结果

化合物	编号	称样量 (g)	样品含量 (mg)	对照品加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
五味子酚	1	0.53	0.37	0.38	0.74	96.17	97.62	1.54
	2	0.56	0.39	0.38	0.77	99.87		

续表 3 加样回收率实验结果

化合物	编号	称样量 (g)	样品含量 (mg)	对照品加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
安五酯素	3	0.49	0.34	0.38	0.70	95.98	97.08	2.04
	4	0.55	0.39	0.38	0.76	97.06		
	5	0.51	0.36	0.38	0.73	98.58		
	6	0.53	0.37	0.38	0.74	98.05		
	1	0.51	3.33	3.34	6.66	99.58		
	2	0.52	3.40	3.34	6.60	96.01		
五味子甲素	3	0.51	3.33	3.34	6.56	96.78	98.27	1.02
	4	0.52	3.40	3.34	6.57	95.16		
	5	0.51	3.33	3.34	6.65	99.49		
	6	0.51	3.33	3.34	6.52	95.47		
	1	0.53	1.19	1.16	2.33	98.78		
	2	0.51	1.14	1.16	2.30	99.75		
五味子乙素	3	0.48	1.08	1.16	2.21	98.18	96.20	1.29
	4	0.52	1.16	1.16	2.29	97.12		
	5	0.51	1.14	1.16	2.29	98.59		
	6	0.53	1.19	1.16	2.31	97.19		
	1	0.51	0.89	0.91	1.76	95.28		
	2	0.5	0.88	0.91	1.75	95.75		
五味子丙素	3	0.48	0.84	0.91	1.74	98.68	98.03	1.42
	4	0.52	0.91	0.91	1.78	95.72		
	5	0.51	0.89	0.91	1.76	95.71		
	6	0.52	0.91	0.91	1.78	96.03		
	1	0.51	0.59	0.60	1.19	99.28		
	2	0.51	0.59	0.60	1.18	98.64		
	3	0.54	0.63	0.60	1.20	95.81	98.03	1.42
	4	0.52	0.6	0.60	1.19	98.32		
	5	0.53	0.61	0.60	1.19	96.91		
	6	0.51	0.59	0.60	1.19	99.23		

3 讨论

实验分别考察不同流动相乙腈-(A)-水(B)、甲醇(A)-水(B)、乙腈(A)-0.1%甲酸水(B),最终选取乙腈-(A)-水(B)梯度洗脱后图谱基线平稳,分离度较好。此外,还考察了不同波长^[24-27](203、220、254 nm)及不同柱温^[28-31](20、25、30 ℃)下样品的吸收与分离效果,最终确定波长在 220 nm,柱温为 30 ℃的条件下,样品的吸收与分离效果最好。五味子根皮作为民间常用中草药之一,具有养血消瘀、理气化湿的效用,且近年来的研究发现其主要成分木

脂素具有潜在的抗肿瘤及抗病毒活性^[21-23],故选取五味子根皮中五种木脂素类成分进行含量测定。

本实验采用 HPLC 法对五味子根皮中五种木脂素类成分五味子酚、安五酯素、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素同时进行了含量测定,据实验结果得知,这五类成分中,安五酯素含量最高,而五味子酚含量最低;此外,本研究还对五味子根皮中上述 5 种化学成分的色谱峰进行了定位,结果显示定位效果较好;同时所建立的方法可对 5 个及以上的指标成分进行同步分析,减少了样品分析时间及溶剂

的消耗。经方法学考察,本文所建立的含量测定方法准确、稳定、可靠,可作为五味子根皮的质量控制方法之一,为其后续质量标准研究提供方法学依据。

参考文献

- [1] 季嘉诚,邱峰,雷新响.华中五味子中一个新的糖苷类化合物及活性研究[J].天然产物研究与开发,2020,32(1):70-74.
- [2] 刘媛媛,黄仕其,李玉泽,等.五味子属植物木脂素类化学成分及其药理作用研究进展[J].中草药,2022,53(6):1903-1918.
- [3] 吴诗卉,袁子豪,王欣,等.安五脂素药理作用及机制的研究进展[J].吉林医学,2023,44(10):2934-2936.
- [4] 许利嘉,刘海涛,彭勇,等.五味子科药用植物亲缘学初探[J].植物分类学报,2008,46(5):692-723.
- [5] 姜侃,郭晔红.华中五味子根部木脂素类化学成分及其抗氧化活性研究[J].中草药,2022,53(21):6666-6673.
- [6] 张朝波,柳燕,李林燕,等.南五味子总木脂素有效部位镇静、催眠作用研究[J].中药药理与临床,2011,27(1):29-30.
- [7] 汪弄雪.华中五味子不同时期藤茎和叶总三萜提取及抗氧化抑菌研究[D].西安:陕西师范大学,2021.
- [8] 王鹏儒,李伟,彭雪米,等.五味子酮衍生物的合成与抗氧化活性研究[J].药实践杂志,2018,36(2):112-115,135.
- [9] 吕建勇.华中五味子酮改善 Alzheimer 病样大鼠学习记忆功能及提高脑组织抗氧化酶活力的研究[D].上海:第二军医大学,2007.
- [10] YANG K, QIU J, HUANG ZC, et al. A comprehensive review of ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and pharmacokinetics of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. and *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2022, 284: 114759.
- [11] 朱嘉琦,拓西平,贾丽艳,等.五味子酮对 β -淀粉样蛋白诱导大鼠海马神经元内游离钙离子浓度变化的影响[J].上海医学,2005,28(9):790-792.
- [12] 于方.五味子酮改善阿尔茨海默病样大鼠学习记忆功能及相关机制的研究[D].上海:第二军医大学,2007.
- [13] 张朝波,柳燕,李林燕,等.南五味子总木脂素有效部位镇静、催眠作用研究[J].中药药理与临床,2011,27(1):29-30.
- [14] 刘丽,于新,刘文朵,等.南五味子不同溶剂提取物抑菌活性及其组分性质研究[J].中国食品学报,2013,13(9):147-151.
- [15] 李斌,萧琪,张嘉诺,等.华中五味子果实化学成分的分鉴定及其抗糖尿病活性研究[J].中草药,2023,54(8):2379-2387.
- [16] 黄泽豪,秦路平.华中五味子藤茎的化学成分研究[J].中草药,2016,47(19):3374-3378.
- [17] LIANG CQ, LUO RH, YAN JM, et al. Structure and bioactivity of triterpenoids from the stems of *Schisandra sphenanthera* [J]. Archives of Pharmacal Research, 2014, 37(2):168-174.
- [18] 蒋艳.华中五味子化学成分及生物活性的研究[D].武汉:中南民族大学,2011.
- [19] 毛水龙.秦岭七药[M].西安:西安交通大学出版社,2011:68.
- [20] 刘媛媛,田煦莹,周益刚,等.长胜七中简单苯丙素类化学成分研究[J].陕西中医药大学学报,2022,45(4):27-31.
- [21] 刘媛媛,李睿,徐浩南,等.长胜七中酚类成分研究[J].中国中药杂志,2023,48(12):3287-3293.
- [22] 李睿,黄仕其,张子龙,等.华中五味子根皮乙酸乙酯部位化学成分研究[J].中南药学,2023,21(9):2288-2292.
- [23] 黄仕其.长胜七化学成分及体外生物活性研究[D].咸阳:陕西中医药大学,2022.
- [24] 张晓娟,陈凤.HPLC 法测定睡安胶囊中五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲及五味子甲素的含量[J].广西中医药大学学报,2021,24(1):77-80.
- [25] 王国丽,祝洪艳,林海成,等.反相高效液相色谱法同时检测不同样品中 6 种五味子木脂素[J].食品安全质量检测学报,2014,5(8):2470-2475.
- [26] 马健康,张秀荣,张宏梅,等.HPLC 法同时测定五味子微球中三种木脂素类成分的含量[J].药物分析杂志,2010,30(11):2220-2222.
- [27] 赵玥,王冰.辽宁凤城地区不同生长环境五味子 5 种木脂素成分含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(16):64-66.
- [28] 崔妮,王青,王莹,等.五味子药材中木脂素提取工艺优选及同时测定其不同产地 9 种木脂素的含量[J].实用药物与临床,2014,17(10):1298-1302.
- [29] 陈霞,窦志华,罗琳,等.五味子含药血清中 4 种木脂素类成分的含量测定[J].中医药导报,2013,19(10):78-80.
- [30] 丁璞,王冰,宋新,等.HPLC 测定五味子根茎叶中 6 种木脂素含量[J].中国中药杂志,2013,38(13):2078-2081.
- [31] 胡俊扬,陆兔林,毛春芹,等.HPLC 法同时测定五味子饮片中 6 个木脂素类成分的含量[J].药物分析杂志,2011,31(12):2225-2228.

(修回日期:2024-05-21 编辑:宋蓓)