

HPLC法同时测定不同产地五味子中4种木脂素类成分的含量^Δ

沈晓君^{1*}, 刘玉翠², 曲晓波¹, 雷钧涛³, 肖井雷^{1#} (1. 长春中医药大学药学院, 长春 130117; 2. 吉林紫鑫药业股份有限公司, 长春 130031; 3. 吉林医药学院药学院, 吉林 吉林 132013)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)03-0387-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.03.28

摘要 目的: 建立同时测定五味子中4种木脂素类成分的含量, 并比较不同产地间的差异。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为Hypersil ODS-C₁₈, 流动相为乙腈-水(梯度洗脱), 流速为1.0 mL/min, 检测波长为217 nm, 柱温为30 ℃, 进样量为10 μL。结果: 五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素检测进样量线性范围分别为0.375 3~2.251 8 μg($r=0.999 6$)、0.056 8~0.341 1 μg($r=0.999 8$)、0.077 4~0.464 4 μg($r=0.999 3$)、0.310 5~1.863 0 μg($r=0.999 8$); 精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%; 加样回收率分别为97.94%~100.30% (RSD=0.98%, $n=6$)、97.59%~99.61% (RSD=0.73%, $n=6$)、100.86%~103.10% (RSD=0.83%, $n=6$)、98.39%~101.03% (RSD=1.03%, $n=6$)。结论: 该方法操作简便, 精密度、稳定性、重复性良好, 可用于五味子中4种木脂素类成分含量的同时测定; 不同产地五味子中上述4种木脂素类成分含量具有较大差异。

关键词 不同产地; 五味子; 木脂素; 高效液相色谱法

Simultaneous Determination of 4 Lignans in *Schisandra chinensis* from Different Habitats by HPLC

SHEN Xiaojun¹, LIU Yucui², QU Xiaobo¹, LEI Juntao³, XIAO Jinglei¹ (1. School of Pharmacy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Jilin Zixin Pharmaceutical Co., Ltd., Changchun 130031, China; 3. School of Pharmacy, Jilin Medical University, Jilin Jilin 132013, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of 4 lignans in *Schisandra chinensis*, and compare the differences among different habitats. METHODS: HPLC was performed on the column of Hypersil ODS-C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-water (gradient elution) at a flow rate of 1.0 mL/min, the detection wavelength was 217 nm, column temperature was 30 ℃ and injection volume was 10 μL. RESULTS: The linear range was 0.375 3-2.251 8 μg for schizandrol A ($r=0.999 6$), 0.056 8-0.341 1 μg for schisantherin A ($r=0.999 8$), 0.077 4-0.464 4 μg for deoxyschizandrin ($r=0.999 3$) and 0.310 5-1.863 0 μg for schisandrin ($r=0.999 8$); RSDs of precision, stability and reproducibility were lower than 2.0%; recoveries were 97.94% -100.30% (RSD=0.98%, $n=6$), 97.59% -99.61% (RSD=0.73%, $n=6$), 100.86% -103.10% (RSD=0.83%, $n=6$), 98.39% -101.03% (RSD=1.03%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple with good precision, stability and reproducibility, and can be used for the simultaneous determination of lignans in *S. chinensis*; there are quite large differences in the contents of 4 lignans in *S. chinensis* from different habitats.

KEYWORDS Different habitats; *Schisandra chinensis*; Lignan; HPLC

五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实。我国五味子资源丰富, 家种也比较成熟, 东三省是其主要产区, 内蒙古、河北、山西、北京也有少量产出^[1]。现代研究表明, 五味子主要含有挥发油、有机酸、维生素、木脂素、三萜、倍半萜及多糖等多种化学成分, 木脂素类成分为其最主要的活性成分, 主要含有五味子甲素、五味子乙素、五味子醇甲、五味子酯甲等^[2]。为了准确评价五味子药材的质量, 本课题组对第四次全国中药资源普查和药材市场流通的31份商品进行了木脂素类成分的比较研究, 以为五味子药

材商品的质量评价与标准提升提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-2010AHT型高效液相色谱(HPLC)仪, 包括二极管阵列检测器(日本Shimadzu公司); SB-3200D型超声波清洗机(杭州法兰特超声波科技有限公司, 功率: 250 W, 频率: 40 kHz); AL204型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 试剂

五味子醇甲对照品(批号: 110857-201412)、五味子酯甲对照品(批号: 111529-201411)、五味子甲素对照品(批号: 110764-201312)、五味子乙素对照品(批号: 110765-201312)均购自中国食品药品检定研究院, 纯度均>98%; 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

1.3 药材

Δ 基金项目: 中医药行业科研专项(No.201207002-05); 吉林省中医药科技项目(No.2014-Q37); 吉林省教育厅“十三五”科学技术研究项目(No.吉教科合字[2016]第25号)

* 讲师, 硕士。研究方向: 药物质量分析。E-mail: 3089028512@qq.com

通信作者: 副教授, 硕士。研究方向: 中药资源与质量标准化。电话: 0431-81104585。E-mail: cc-xjl@163.com

笔者采集了22个产地五味子药材,并收集了9个市售商品(见表1),经长春中医药大学姜大成教授鉴定均为真品。

表1 五味子药材来源

Tab 1 Source of *S. chinensis*

编号	采集/收集地	编号	采集/收集地
1	河南禹州中药材市场	17	吉林省东丰县永胜屯
2	四川荷花池中药材市场	18	吉林省汪清大兴沟岭东林场
3	四川荷花池中药材市场	19	吉林省桦甸市沿河村
4	河北安国中药材市场	20	吉林省通化县
5	安徽亳州中药材市场	21	吉林省靖宇县福兴村王广宏山
6	广西玉林中药材市场	22	吉林省抚松县松河镇
7	广西玉林中药材市场	23	辽宁省凤城市东汤镇
8	四川省南苑	24	辽宁省本溪市桓仁县下古城子村
9	广州市清平中药材市场	25	辽宁省本溪市本溪县南甸镇石人山
10	福建福州中药材市场	26	辽宁省丹东市宽甸县宽甸镇崴山娘娘沟
11	吉林省和龙市德化镇仙景台	27	黑龙江省五大连池市小兴安岭
12	吉林省抚松县北岗镇	28	黑龙江省虎林市
13	吉林省安图县新合乡	29	黑龙江省尚志市
14	吉林省琿春市哈达门乡	30	黑龙江省牡丹江市
15	吉林省长白县民主村	31	河北省承德市热河
16	吉林省集安市高台村		

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil ODS-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(洗脱程序见表2);流速:1.0 mL/min;检测波长:217 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL^[3-6]。

表2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution program

时间,min	A,%	B,%
0~17	50	50
17~25	50→55	50→45
25~30	55→75	45→25
30~35	75	25
35~40	75→65	25→35
40~45	65→50	35→50

2.2 溶液的制备

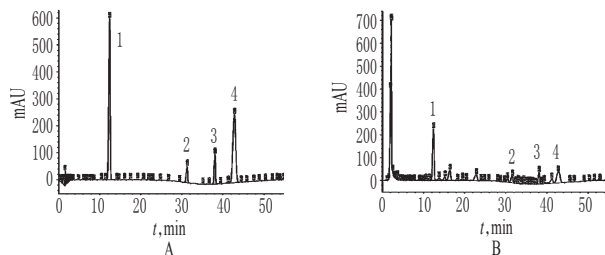
2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取各待测成分对照品适量,加甲醇溶解,制成单一对照品贮备液。精密量取上述单一对照品贮备液各适量,制成五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素质量浓度分别为0.125 1、0.018 95、0.025 8、0.103 5 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品粉末约0.3 g(过3号筛),精密称定,置于25 mL量瓶中,加甲醇约2.0 mL,超声处理20 min,加甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果表明,理论板数以各待测成分峰计均>4 000;分离度>1.5,各成分基线分离良好。

2.4 线性关系考察



A.混合对照品;B.供试品;1.五味子醇甲;2.五味子酯甲;3.五味子甲素;4.五味子乙素

A.mixed reference substance; B.test sample; 1.schizandrol A; 2.schisantherin A; 3.deoxyschizandrin; 4.schisandrin

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液3、5、8、10、12、15、18 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量($x, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程与线性范围,详见表3。

表3 回归方程与线性范围

Tab 3 Regression equation and linear range

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
五味子醇甲	$y=6\ 922.8x+23\ 506$	0.999 6	0.375 3~2.251 8
五味子酯甲	$y=4\ 297.9x+6\ 550.3$	0.999 8	0.056 8~0.341 1
五味子甲素	$y=5\ 807.4x+8\ 267.2$	0.999 3	0.077 4~0.464 4
五味子乙素	$y=6\ 325.0x+18\ 684$	0.999 8	0.310 5~1.863 0

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素峰面积的RSD分别为0.06%、0.11%、0.09%、0.08% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:2)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、18、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素峰面积的RSD分别为0.07%、0.15%、0.11%、0.09% ($n=7$),表明供试品溶液在室温放置24 h内基本稳定。

2.7 重复性试验

精密称取同一批样品(编号:2)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素峰面积的RSD分别为1.5%、0.9%、1.4%、1.2% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量样品(编号:2)适量,共6份,分别加入一定质量的待测成分对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表4。

表4 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 4 Results of recovery test(n=6)

待测成分	取样量, g	样品含量, mg	加样量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %			
五味子醇甲	3.000 9	5.579 9	5.500 0	10.975 4	98.10	98.60	0.98			
	3.001 5	5.592 1	5.500 0	11.108 6	100.30					
	3.000 6	5.584 5	5.500 0	10.977 3	98.05					
	3.003 7	5.586 0	5.500 0	10.972 7	97.94					
	3.000 6	5.591 8	5.500 0	10.981 3	97.99					
	3.001 5	5.597 8	5.500 0	11.055 5	99.23					
	五味子酯甲	3.001 4	1.461 0	1.500 0	2.931 6			98.04	98.42	0.73
		3.002 5	1.400 2	1.500 0	2.894 4			99.61		
		3.001 5	1.423 9	1.500 0	2.899 3			98.36		
		3.002 8	1.480 1	1.500 0	2.944 0			97.59		
3.002 4		1.487 9	1.500 0	2.958 2	98.02					
五味子甲素	3.003 0	1.455 6	1.500 0	2.938 7	98.87	102.43	0.83			
	3.000 2	1.404 9	1.420 0	2.837 0	100.86					
	3.001 6	1.416 1	1.420 0	2.866 1	102.12					
	3.000 9	1.422 3	1.420 0	2.917 5	102.61					
	3.001 1	1.425 7	1.420 0	2.889 9	103.10					
	3.001 8	1.426 9	1.420 0	2.889 8	103.01					
	3.002 2	1.428 1	1.420 0	2.889 7	102.91					
	五味子乙素	3.004 7	3.321 9	3.320 0	6.609 0			99.01	99.46	1.03
3.002 7		3.329 1	3.320 0	6.595 6	98.39					
3.000 3		3.313 3	3.320 0	6.646 6	100.40					
3.000 6		3.326 1	3.320 0	6.608 9	98.88					
3.003 0		3.326 4	3.320 0	6.614 9	99.05					
3.002 2		3.339 5	3.320 0	6.693 7	101.03					

2.9 样品含量测定

取31批次样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量^[7-10],结果见表5。

表5 样品含量测定结果(n=3, %)

Tab 5 Results of content determination of samples(n=3, %)

样品编号	五味子醇甲	五味子酯甲	五味子甲素	五味子乙素
1	0.738 2	0.210 4	0.188 5	0.341 6
2	0.527 4	0.153 3	0.132 7	0.254 3
3	0.403 9	0.114 4	0.096 3	0.185 2
4	0.506 7	0.174 1	0.110 3	0.259 0
5	0.656 7	0.189 4	0.161 0	0.334 3
6	0.742 2	0.178 1	0.149 3	0.406 5
7	0.525 7	0.145 1	0.104 9	0.258 2
8	0.704 7	0.192 9	0.143 1	0.347 9
9	0.574 8	0.158 3	0.126 2	0.276 7
10	0.709 7	0.214 1	0.178 3	0.313 1
11	0.588 9	0.180 6	0.193 5	0.260 7
12	0.704 7	0.168 2	0.156 3	0.361 2
13	0.704 1	0.190 3	0.099 4	0.353 9
14	0.555 8	0.149 1	0.144 2	0.336 0
15	0.639 8	0.173 0	0.177 5	0.257 6
16	0.587 4	0.163 1	0.138 3	0.296 0
17	0.690 9	0.207 5	0.158 0	0.329 1
18	0.489 7	0.118 4	0.113 1	0.259 9
19	0.365 3	0.085 4	0.065 9	0.252 7
20	0.594 8	0.148 4	0.133 3	0.312 4
21	0.609 8	0.161 9	0.128 1	0.282 4
22	0.818 3	0.263 4	0.140 6	0.416 4
23	0.599 4	0.151 6	0.110 3	0.271 1

续表5

Continued Tab 5

样品编号	五味子醇甲	五味子酯甲	五味子甲素	五味子乙素
24	0.675 8	0.202 3	0.160 7	0.317 1
25	0.654 8	0.196 4	0.167 4	0.327 9
26	0.439 8	0.048 4	0.056 9	0.305 1
27	0.575 9	0.098 7	0.125 2	0.371 3
28	0.625 8	0.192 7	0.178 1	0.438 6
29	0.665 8	0.173 6	0.134 4	0.324 9
30	0.709 8	0.199 9	0.175 3	0.336 3
31	0.617 4	0.135 1	0.365 1	0.336 1

3 讨论

笔者比较了甲醇、乙酸乙酯和乙醇3种溶剂对木脂素提取率的影响,结果显示甲醇提取效果最佳;同时考察了超声提取法和加热回流提取法,结果显示超声提取效率高,并以提取20 min效果最佳。

由结果可知,五味子醇甲的含量范围在0.365 3%~0.818 3%,其中吉林省桦甸市沿河村产者含量最低,吉林省抚松县松江河镇产者含量最高;五味子酯甲的含量范围在0.048 4%~0.263 4%,其中辽宁省丹东市宽甸县宽甸镇产者含量最低,吉林省抚松县松江河镇产者含量最高;五味子甲素的含量范围在0.056 9%~0.365 1%,其中辽宁省丹东市宽甸县宽甸镇产者含量最低,河北省承德市热河产者含量最高;五味子乙素的含量范围在0.185 2%~0.438 6%,其中四川荷花池中药材市场商品含量最低,黑龙江省虎林市产者含量最高。

通过对31份五味子药材商品中4种木脂素类成分的分析,得出不同产地五味子中木脂素类成分含量具有较大差异性,品质间存在一定的差异。本研究为多指标成分控制五味子饮片质量提供了科学依据,同时为进一步研究五味子及其制剂的质量控制、药理活性以及临床应用提供了一定参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社,2015:66.
- [2] 李霞,贾晓斌,魏惠华,等. 五味子提取工艺的优化研究[J]. 中国药房,2007,18(6):424-426.
- [3] 胡俊扬,陆兔林,毛春芹,等. HPLC法同时测定不同产地五味子中8种木脂素类成分[J]. 中成药,2012,34(2):313-315.
- [4] 谭晓虹,王志宝,赵倩. HPLC测定南、北五味子中五味子甲素和五味子乙素的含量[J]. 中成药,2010,32(1):155-157.
- [5] 郑春英,李宏涛,吴桐,等. HPLC法同时测定五味子不同部位中三种木脂素成分含量[J]. 食品科学,2007,28(7):376-378.
- [6] 丁佐,鲁巍巍,李宏博,等. HPLC同时测定北五味子中5种木脂素的含量[J]. 中国中药杂志,2010,35(13):1728-1731.
- [7] 王丽薇. 北五味子的化学成分[J]. 杭州师范学院学报:自然科学版,2007,6(5):363-365.

白花蛇舌草氯仿部位的化学成分研究^Δ

于亮^{1,2*}, 姜洁³, 刘勇¹, 付小凯¹, 黄祝刚¹, 容蓉¹, 蒋海强¹, 巩丽丽¹, 吕青涛^{1#} (1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 山东省药学科学院中医药研究所, 济南 250101; 3. 山东大学齐鲁医院, 济南 250012)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)03-0390-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.03.29

摘要 目的: 研究白花蛇舌草氯仿部位的化学成分。方法: 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱和薄层色谱对白花蛇舌草氯仿部位化合物进行分离纯化, 根据理化性质和波谱数据分析鉴定化合物结构。结果: 从白花蛇舌草氯仿部位中分离得到 11 个化合物, 分别鉴定为 2-羟基-3-甲基蒽醌(1)、2-羟基-1-甲氧基-3-甲基蒽醌(2)、2-羟基-1-甲氧基蒽醌(3)、邻苯二甲酸二丁酯(4)、甲基异茜草素(5)、熊果酸(6)、耳草酮 B(7)、茛菪亭(8)、2,6-二羟基-3-甲基-4-甲氧基蒽醌(9)、2-羟基-3-羟甲基蒽醌(10)、正十六烷(11)。结论: 化合物 4、7、10、11 为首次从白花蛇舌草植物中分离得到, 本研究为白花蛇舌草质量评价奠定了一定基础。
关键词 白花蛇舌草; 邻苯二甲酸二丁酯; 耳草酮 B; 2-羟基-3-羟甲基蒽醌; 正十六烷

Study on the Chemical Constituents of the Chloroform from *Hedyotis diffusa*

YU Liang^{1,2}, JIANG Jie³, LIU Yong¹, FU Xiaokai¹, HUANG Zhugang¹, RONG Rong¹, JIANG Haiqiang¹, GONG Lili¹, LYU Qingtao¹ (1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Jinan 250101, China; 3. Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the chemical constituents of the chloroform from *Hedyotis diffusa*. METHODS: Silica gel, Sephadex LH-20 column chromatography and preparative thin layer chromatography were conducted to classify and purify of chemical constituents of the chloroform from *H. diffusa*, the chemical structures were analyzed and identified based on physicochemical properties and spectral data. RESULTS: Totally 11 compounds were obtained from the chloroform of *H. diffusa*, namely 2-hydroxy-3-methylanthraquinone (1), 2-hydroxy-1-methyl-3-methoxyanthraquinone (2), 2-hydroxy-1-methoxyanthraquinone (3), dibutyl phthalate (4), rubiadin (5), ursolic acid (6), hedyotiscone B (7), scopoletin (8), 2, 6-dihydroxy-3-methyl-4-methoxyanthraquinone (9), 2-hydroxy-3-hydroxymethylanthraquinone (10) and *n*-hexadecane (11). CONCLUSIONS: Compound 4, 7, 10, 11 are firstly obtained from *H. diffusa*, the study had laid certain foundation for the quality evaluation of *H. diffusa*.

KEYWORDS *Hedyotis diffusa*; Dibutyl phthalate; Hedyotiscone B; 2-Hydroxy-3-hydroxymethylanthraquinone; *n*-Hexadecane

白花蛇舌草为茜草科 Rubiaceae 耳草属 *Hedyotis* L. 植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd. 的全草, 具有清热、解毒、消肿、止痛之功效^[1], 现临床主要用于抗癌治疗^[2], 其主要含有三萜类、蒽醌类、环烯醚萜类、甾醇类、香豆素类、黄酮类、烷烃类等化学成分^[3]。前期药理实验已表明白花蛇舌草氯仿部位具有较强的抗子宫内癌 Ishikawa 细胞的活性, 为探究其活性成分, 本试验对该植物氯仿部位的化学成分进行了系统分离, 以为白花蛇舌草资源的开发利用提供一定参考。

1 材料

1.1 仪器

MAT-212 型质谱仪 (美国 Varian 公司); Bruker AM-400/600 型核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); XRC-1 型显微熔点仪 (四川大学科教仪器开发公司); 1200 型高效液相色谱 (HPLC) 仪, 包括二极管阵列检测器 (美国 Agilent 公司); AZL-600Y 型粉碎机 (永康市艾泽拉仪器有限公司); EYELA 型旋转蒸发器 (日本东京理化器械株式会社)。

1.2 试剂

柱色谱硅胶 (规格: 100~200、200~300 目)、薄层层

[8] 孙慧珠, 徐乐, 袁浩, 等. HPLC 法同时测定参芪五味子胶囊中五味子酯甲和五味子甲素的含量[J]. 中国药房, 2014, 25(8): 752-754.

[9] 李莉, 苏华, 张玉红. 灯盏生脉软胶囊质量标准研究[J]. 中国新药与临床杂志, 2010, 29(3): 213-215.

[10] 王薇丹, 周大铮, 叶正良. 五味子属植物降三萜成分研究进展[J]. 中成药, 2009, 31(12): 1912-1915.

(收稿日期: 2016-02-25 修回日期: 2016-06-12)

(编辑: 张静)

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81173614)

* 硕士研究生。研究方向: 药物化学。E-mail: yulianger777@163.com

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 天然药物化学成分及化学分析。E-mail: luqingtao9@163.com