

五味子提取物定性鉴别和含量测定研究

许丽丽¹, 章曙丹², 杨苏蓓² (1.浙江中医药大学, 杭州 310051; 2.浙江省中药研究所, 杭州 310023)

摘要: 目的 建立五味子提取物的定性鉴别和含量测定标准。方法 采用 TLC 鉴别五味子; 采用紫外可见分光光度法, 570 nm 波长, 测定五味子木脂素含量; 采用 RP-HPLC, 以甲醇-乙腈-水(1:1:1)为流动相, 250 nm 为检测波长, 测定五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素含量。结果 供试品色谱中, 在与对照品和对照药材色谱相应的位置上, 显示相同颜色的荧光斑点; 五味子木脂素以乙素计, 在 0.005 5~0.026 7 mg·mL⁻¹ 内, 线性关系良好, 平均回收率 101.4%(RSD=2.5%); 五味子醇甲在 0.275~1.375 μg ($r=0.999\ 7$)内、五味子甲素在 0.125~0.625 μg ($r=0.999\ 7$)内、五味子乙素在 0.160~0.800 μg ($r=0.999\ 7$)内, 线性关系良好, 平均回收率分别为 97.9%(RSD=1.4%)、99.0%(RSD=1.9%)、98.2%(RSD=1.9%)。结论 采用方法简便、准确、快速, 可对五味子提取物进行有效的质量控制。

关键词: 五味子; 紫外可见分光光度法; 高效液相色谱法

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2009)06-0467-04

Identification and Determination of Qualitative Research for Extraction of *Schisandra Chinensis*(Turcz.) Baill.

XU Lili¹, ZHANG Shudan², YANG Subei² (1. Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310051, China; 2. Zhejiang Institute of Chinese Materia Medica, Hangzhou 310023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the identification and determination of qualitative standard for extraction of *Schisandra Chinensis*(Turcz.) Baill. **METHODS** *Fructus Schisandra Chinensis* was identified by TLC. The determination of lignan was performed by UV-visible spectrophotometry. The determination of effective components were performed by HPLC with the mobile phase consisted of methanol-acetonitrile-water(1:1:1), and the wavelength was set at 250 nm. **RESULTS** The tested products in chromatography, in contrast with the reference substance and medicine by the corresponding position, showed the same color of fluorescent spots. Schisandra lignans of the γ -Schisandrin, a good linearity of γ -Schisandrin was obtained ranged from 0.005 5-0.026 7 mg·mL⁻¹, and the average recovery was 101.4%(RSD=2.5%). Three good linearities of Schisandrin, Deoxyschisandrin and γ -Schisandrin were obtained ranged from 0.275-1.375 μg ($r=0.999\ 7$), 0.125-0.625 μg($r=0.999\ 7$) and 0.160-0.800 μg($r=0.999\ 7$), and the average recoveries were 97.9%(RSD=1.4%), 99.0%(RSD=1.9%) and 98.2%(RSD=1.9%). **CONCLUSION** The methods are simple, accurate, and specific, and can be used for the quality control of extraction of *Schisandra Chinensis* (Turcz.) Baill.

KEY WORDS: *Schisandra Chinensis* (Turcz.) Baill.; UV-visible spectrophotometry; HPLC

五味子为木兰科植物五味子 [*Schisandra chinensis*(Turcz.)Baill.]的干燥成熟果实。始载于《神农本草经》,列为上品,具有收敛固涩,益气生津,补肾宁心等功效。本课题组药理实验证明,五味子具有降低转氨酶和降低血糖作用。五味子提取物为五味子药材经超临界 CO₂ 提取制备而成,是中药新药“降糖软胶囊”及其他产品的原料,建立五味子提取物的质量标准,可用于提取工艺的优化和以其为原料的产品的质量标准的制定。

1 仪器与试药

Lambda 20 紫外可见分光光度计、Agilent Series 1100 高效液相色谱仪、紫外光灯(254 nm)(安

捷伦科技有限公司)。硅胶 GF₂₅₄ 薄层板(自制)。五味子甲素、五味子乙素、五味子醇甲(供含量测定用,中国药品生物制品检定所,批号:0764-200005,765-200104,110857-200203);五味子对照药材(中国药品生物制品检定所,批号:120922-200606);甲醇(色谱纯,天津四友生物医学技术有限公司);其余试剂为分析纯。五味子药材购于安徽亳州,由浙江省中药研究所王溶溶教授级高级工程师鉴定为五味子,批号:20080318,提取物为本研究所自制,批号:071023,080919,080920,080921。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

取本品(071023)20 mg, 加甲醇 20 mL, 加热回流 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 2 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取对照药材 1 g, 同法制成对照药材溶液。再取五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素对照品, 加甲醇分别制成每 1 mL 含 1.2, 0.7, 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法^[1], 吸取上述对照品溶液 5 μ L、供试品溶液 10 μ L 及对照药材溶液 2 μ L, 分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 以甲苯-乙酸乙酯-乙酸(9:1.5:0.2)的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 置紫外灯(254 nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照品和对照药材色谱相应的位置上, 显示相同颜色的斑点。薄层色谱见图 1。

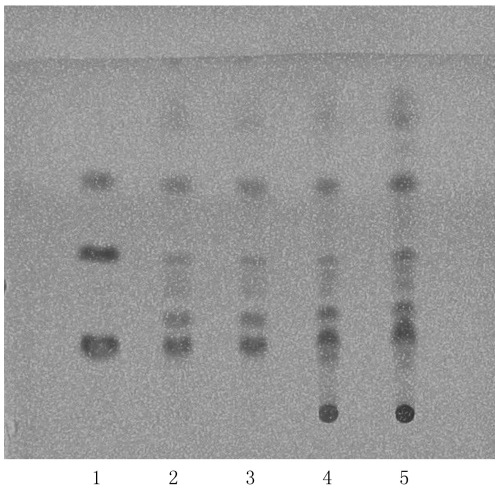


图 1 TLC 色谱图(071023)
1-五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素混合对照品溶液; 2, 3-样品溶液; 4-五味子对照药材; 5-五味子药材

Fig 1 TLC chromatogram
1-Schisandrin, Deoxyschizandrin and γ -Schisandrin control mixed solution; 2,3-sample; 4-reference substance with *Schisandra Chinensis*(Turcz.) Baill.; 5-*Schisandra Chinensis* (Turcz.) Baill.

2.2 比色法测定五味子提取物中木脂素含量
2.2.1 木脂素标准曲线的制备 取五味子乙素对照品 1.5 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀。精密吸取上述溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL, 置试管中, 水浴挥干甲醇, 依次精密加入 10%变色酸 0.5 mL, 浓硫酸 3.0 mL, 蒸馏水 1.5 mL, 摇匀, 沸水浴 30 min, 取出, 立即冷却。置分光光度计中, 在 570 nm 处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标, 得五味子木脂素以乙素计标准曲线, 回归方程为 $Y=0.0120X+0.0003$, $r=0.9993$, 浓度范围 0.005 5~0.026 7 mg·mL⁻¹。
2.2.2 样品处理与含量测定 取五味子提取物

(071023)约 20 mg, 精密称定, 置烧瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定重量, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。精密吸取上述供试品溶液 0.5 mL, 置试管中, 水浴挥干甲醇, 依次精密加入 10%变色酸 0.5 mL, 浓硫酸 3.0 mL, 蒸馏水 1.5 mL。摇匀, 沸水浴 30 min, 取出, 立即冷却。于 570 nm 处测定吸光度, 按标准曲线计算, 即得。
2.2.3 稳定性试验 取批号为 071023 样品约 20 mg, 1 份, 按“2.2.2”项下方法处理, 分别在 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 测定其吸光度。结果平均含量为 12.80%, RSD=0.56%。表明样品在显色后 24 h 内稳定。
2.2.4 重复性试验 取批号为 071023 样品约 20 mg, 6 份, 按“2.2.2”项下方法进行含量测定。结果平均含量为 12.34%, RSD=2.07%。表明本方法重复性良好。
2.2.5 回收率试验 取批号为 071023 样品约 10 mg, 6 份, 添加一定含量的五味子乙素对照品(浓度为 1.67 mg·mL⁻¹)0.7 mL, 按“2.2.2”项下方法进行含量测定, 由测得量和加入量计算回收率。结果见表 1。
表 1 五味子乙素的回收率试验(n=6)
Tab 1 Recovery of γ - Schisandrin(n=6)

样品含量 /mg	加入量 /mg	测定量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1.367 0	1.169 0	2.585 2	103.60		
1.380 8	1.169 0	2.548 6	99.91		
1.367 0	1.169 0	2.571 6	102.60		
1.394 6	1.169 0	2.525 6	97.28	101.4	2.6
1.407 0	1.169 0	2.633 9	104.12		
1.400 8	1.169 0	2.579 8	100.71		

2.2.6 样品测定 取 3 批样品(080919, 080920, 080921), 按“2.2.2”项下方法进行测定。含量分别为 12.35%, 4.16%, 13.29%。
2.3 HPLC 测定五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素的含量
2.3.1 色谱条件与系统适用性实验 色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-乙腈-水(1:1:1); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 254 nm; 进样量: 10 μ L; 柱温: 30 $^{\circ}$ C。理论板数按五味子醇甲峰计算不低于 5 000。见图 2。

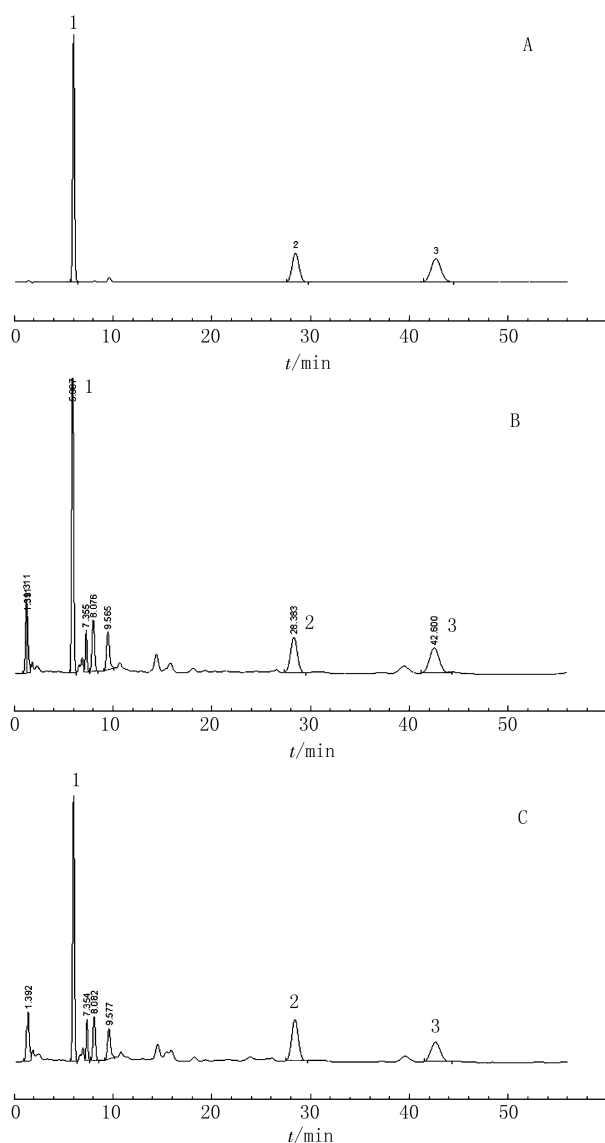


图2 HPLC 色谱图

A-混合对照品; B-样品; C-药材; 1-五味子醇甲; 2-五味子甲素; 3-五味子乙素

Fig 2 HPLC chromatograms

A-mixed reference substances; B-sample; C-Schisandra Chinensis (Turcz.) Baill.; 1-Schisandrin; 2-Deoxyschizandrin; 3-γ-Schisandrin

2.3.2 对照品溶液的制备 取五味子醇甲对照品 9.2 mg、五味子甲素对照品 3.1 mg、五味子乙素对照品 4.7 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.3.3 供试品溶液制备 取五味子提取物(071023) 约 20 mg, 精密称定, 置烧瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定重量, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。取五味子药材粉末(过三号筛)约 0.2 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇约 20 mL, 超

声处理 20 min, 取出, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.4 标准曲线绘制 取五味子醇甲对照品 5.5 mg、五味子甲素对照品 2.5 mg、五味子乙素对照品 3.2 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀。精密量取上述对照品储备液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL, 分别稀释至 10 mL, 摇匀, 滤过。分别取上述各浓度续滤液 10 μL, 进样测定。以峰面积为纵坐标, 进样质量浓度为横坐标, 进行线性回归。结果见表 2。

表2 各组分线性回归结果

Tab 2 Results of linear regression

成分	回归方程	线性范围 /mg·mL ⁻¹	r
五味子醇甲	$Y=12\,528.545\,5\,X-13.345\,0$	0.0275~0.1375	0.999 7
五味子甲素	$Y=12\,773.600\,0\,X-10.390\,0$	0.0125~0.0625	0.999 7
五味子乙素	$Y=11\,279.375\,0\,X-16.670\,0$	0.0160~0.0800	0.999 7

2.3.5 仪器精密度的试验 精密吸取对照品溶液 10 μL, 重复进样 5 次, 五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素峰面积 RSD 值分别为 0.70%、0.73%和 0.88%。表明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性试验 取批号为 071023 样品约 20 mg, 6 份, 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下, 进样测定。五味子醇甲平均含量为 79.04 mg·g⁻¹, RSD=1.6%; 五味子甲素平均含量为 24.20 mg·g⁻¹, RSD=1.7%; 五味子乙素平均含量为 32.38 mg·g⁻¹, RSD=1.5%。表明本方法重复性良好。

2.3.7 稳定性试验 取批号为 071023 样品约 20 mg, 1 份, 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下, 分别在 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 进样测定。五味子醇甲平均含量为 77.97 mg·g⁻¹, RSD=2.4%; 五味子甲素平均含量为 23.68 mg·g⁻¹, RSD=2.4%; 五味子乙素平均含量为 31.93 mg·g⁻¹, RSD=2.6%。表明样品在 24 h 内稳定。

2.3.8 回收率试验 取批号为 071023 样品约 10 mg, 6 份, 分别精密加入一定含量的对照品溶液 9.0 mL。然后按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下, 进样测定。由测得量和加入量计算回收率。结果见表 3, 4, 5。

表 3 五味子醇甲的回收率试验(n=6)

Tab 3 Recovery of Schisandrin(n=6)

样品含量 /mg	加入量 /mg	测定量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.790 4	1.170 0	1.961 5	100.14		
0.861 5	1.170 0	1.994 6	95.72		
0.885 2	1.170 0	2.017 5	95.74		
0.893 1	1.170 0	2.050 6	98.60	97.9	1.4
0.861 5	1.170 0	2.004 4	96.85		
0.877 3	1.170 0	2.009 9	95.74		

表 4 五味子甲素的回收率试验(n=6)

Tab 4 Recovery of Deoxyschizandrin(n=6)

样品含量 /mg	加入量 /mg	测定量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.242 0	0.306 0	0.554 0	102.48		
0.263 8	0.306 0	0.561 0	96.67		
0.271 0	0.306 0	0.570 0	97.42		
0.273 5	0.306 0	0.581 0	100.55	99.0	1.9
0.263 8	0.306 0	0.567 0	98.94		
0.268 6	0.306 0	0.567 0	97.17		

表 5 五味子乙素的回收率试验(n=6)

Tab 5 Recovery of γ -Schisandrin(n=6)

样品含量 /mg	加入量 /mg	测定量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.323 8	0.423 0	0.751 7	101.51		
0.352 9	0.423 0	0.761 4	95.89		
0.362 6	0.423 0	0.774 4	96.91		
0.365 8	0.423 0	0.786 3	99.32	98.2	1.9
0.352 9	0.423 0	0.769 9	98.30		
0.359 4	0.423 0	0.767 1	95.74		

2.3.9 样品测定 取 3 批样品约 20 mg, 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下, 进样测定。计算含量, 结果见表 6。

3 讨论

3.1 流动相的选择

据文献[2-3], 对五味子有效成分的含量测定, 多采用甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-水, 且多为梯度洗脱。色谱柱也多为长柱。本实验证明甲醇-水等

表 6 五味子醇甲、甲素和乙素的含量测定(n=3)

Tab 6 Contents of Schisandrin, Deoxyschizandrin and γ -Schisandrin(n=3)

	批号	五味子醇甲/%	五味子甲素/%	五味子乙素/%
1	080529	4.51	1.77	2.31
2	080619	4.62	1.83	2.25
3	080620	4.67	1.86	2.34

度洗脱, 色谱峰分离度尚可, 但保留时间过长; 而甲醇-乙腈-水(1:1:1)等度洗脱, 保留时间适中, 可以满足试验要求。此外, 采用 150 mm 的色谱短柱, 可缩短保留时间, 提高分离效率。

3.2 提取条件的考察

通过甲醇超声、回流各 30 min 进行对比, 结果回流比超声效率高。又在回流前提条件下对两个提取时间(30, 60 min)进行对比, 试验结果显示 30 min 可基本提取完全。

3.3 木脂素的含量测定

文献报道多采用比色法测定总木脂素的含量, 其原理是利用木脂素亚甲二氧基与浓硫酸作用后释放出甲醛, 再与变色酸产生紫红色。但是五味子醇甲和五味子甲素的结构中没有亚甲二氧基, 因此, 用比色法测得的木脂素含量, 并不是真正意义上的总木脂素含量。其测定的结果, 只是样品中含有亚甲二氧基的木脂素类成分(如: 五味子乙素)的含量, 而并不包括其他不含亚甲二氧基的木脂素类成分(如: 五味子甲素、五味子醇甲)的含量。因此, 比色法测定的木脂素含量与 HPLC 测定的含量对本品而言, 具有互补性。

REFERENCES

[1] Ch.P (2005) Vol I (中国药典 2005 年版.一部)[S]. 2005: Apendix 44.
[2] ZHANG S D, NI S, YUAN A Z. Determination of Schisandrin, Deoxyschizandrin and γ -Schizandrin in Jiangtang soft capsules by HPLC [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理), 2003, 14(5): 334-336.
[3] ZHENG C Y, LI H T, WU T, et al. Simultaneous determination of Schisandra, Deoxyschizandra and γ -Schizandra in different parts of *Schisandra Chinensis* (Turcz.) Baill by HPLC [J]. Food Sci (食品科学), 2007, 28 (7): 376-378.

收稿日期: 2008-07-22