

# 超高液相色谱法同时测定北五味子中 7 种木脂素类化合物

白宏博<sup>1</sup>, 冯志强<sup>2</sup>, 史鑫波<sup>1</sup>, 孙晓春<sup>1</sup>, 刘妍如<sup>1\*</sup>, 唐志书<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>陕西中医药大学 陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西省中药基础与新药研究实验室, 咸阳 712083; <sup>2</sup>西安万隆制药股份有限公司, 西安 710119

**摘要:**建立了超高效液相色谱法(UPLC)同时测定北五味子中 7 种主要木脂素类成分的检测方法。采用 ACQUITY UPLC® BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 以水-乙腈为流动相, 梯度洗脱分离, PDA 检测波长 254 nm, 流速 0.4 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 2 μL。优化了色谱分离条件, 并进行了线性方程、准确度、重复性、回收率等方法学考察, 在优化条件下, 7 种木脂素的出峰时间在 5 min 内, 且线性关系良好( $r > 0.9994$ ), 方法检出限范围为 0.0105 ~ 0.1600 μg/mL, 定量限为 0.1050 ~ 0.8200 μg/mL, 相对标准偏差(RSD)在 0.0340% ~ 1.3800% 之间, 样品加样回收率在 95.09% ~ 104.50% 范围内。本方法大大缩短了分析时间, 灵敏度高, 适用于北五味子中 7 种木脂素类成分的同时测定。

**关键词:**北五味子; 超高效液相色谱法; 木脂素类化合物; 同时测定

中图分类号: R932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.4.013

## Simultaneous Determination of Seven Lignans from *Schisandrae Chinensis* Fructus by Ultra-performance Liquid Chromatography

BAI Hong-bo<sup>1</sup>, FENG Zhi-qiang<sup>2</sup>, SHI Xing-bo<sup>1</sup>, SUN Xiao-chun<sup>1</sup>, LIU Yan-ru<sup>1\*</sup>, TANG Zhi-shu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Shaanxi province key laboratory of new drugs and Chinese medicine foundation research, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China; <sup>2</sup>Shaanxi Xingshengde Pharmaceutical Limited Liability Company, Xi'an 710119, China

**Abstract:** In this study, an ultra-performance liquid chromatography (UPLC) was developed for the simultaneous determination of 7 lignans from *Schisandra chinensis* fruits. The analytes were separated on an ACQUITY UPLC® BEH C<sub>18</sub> column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) with acetonitrile-water as mobile phases in gradient elution under 254 nm. The flow rate was 0.4 mL/min and column temperature was set as 30 °C. The injection volume was 2 μL. By using the optimized method, the detection limits of the 7 lignans ranged from 0.0105 to 0.1600 μg/mL, the limits of quantitation ranged from 0.1050 to 0.8200 μg/mL. The recoveries of the 7 lignans in the samples were 95.09% to 104.5% with relative standard deviation (RSD%) ranged from 0.0340% to 1.3800%. The established UPLC method for the simultaneous determination of 7 lignans can provide a more comprehensive reference for the quality control of *S. chinensis*.

**Key words:** *Schisandra chinensis*; ultra-high performance liquid chromatography; lignans; simultaneous determination

北五味子, 为木兰科 (Magnoliaceae) 植物北五味子 [*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill] 的干燥成熟果实。具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心的功效, 临床用于保肝、镇静、催眠、抗衰老、抗肿瘤、抗疲劳, 调节免疫治疗<sup>[1,2]</sup>。北五味子的主要活性成分为木脂素类化合物, 其中五味子醇甲、五味子醇乙、五味

子酯乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和五味子酚是具有代表药理活性的木脂素类化合物<sup>[3,4]</sup>。研究发现, 五味子醇甲、五味子酯甲和五味子乙素能够调整血清谷丙转氨酶, 谷草转氨酶含量, 抑制肝微粒体脂质过氧化, 保护多种原因引起的肝损伤<sup>[5-7]</sup>。五味子甲素和五味子乙素可以增强并活化 caspase-8、9, 激活 caspase-3, 诱导肿瘤凋亡, 对 SGC-7901 胃癌细胞、SHG-44 胶质瘤细胞、T47D 和 MCF-7 乳腺癌细胞等多种肿瘤细胞有显著的抑制作用; 同时可阻碍 P-糖蛋白的外排, 改善对药物的耐药性<sup>[8,9]</sup>。五味子乙素能抑制氧自由基产生, 降低

收稿日期: 2016-10-25 接受日期: 2017-02-27

基金项目: 国家自然科学基金(81501229); 陕西省协同创新计划(2015XT-35); 陕西省教育厅专项科研计划(20104-203010012); 陕西省科技统筹创新工程计划(2011KTCL03-05)

\* 通讯作者 Tel: 86-29-38180560; E-mail: tzs6565@163.com

LPO 含量,增强心肌 SOD 活性,有效调控血压,扩张血管,具有显著的保护心血管系统的功效<sup>[10]</sup>。此外,五味子酚还能够抑制海马区 Caspase-3 蛋白的表达、NF- $\kappa$ B 核转,降低脂质过氧化物含量,进而产生神经保护的作用<sup>[11]</sup>。

《中华人民共和国药典》(2015 版)中将五味子醇甲作为北五味子质控的主要标准。北五味子中木脂素的测定方法最初为高效液相色谱方法,随后由高效液相方法向超高液相色谱法(UPLC)的发展,定性定量越来越快速、准确<sup>[12,13]</sup>。常见的五味子测定标准和文献中主要涉及北五味子的高效液相测定方法,采用 UPLC 测定北五味子中的多种木脂素类化合物,能大大缩短分析时间,灵敏度高,准确性好,可满足北五味子质控的检测需要。

目前,采用高效液相色谱法测定北五味子中木脂素类成分的报道很多,但同时针对 7 种主要木脂素化合物的 UPLC 分析方法还未见报道<sup>[14,15]</sup>。本文通过优化色谱条件,建立了 UPLC 分析方法,可同时测定北五味子中 7 种木脂素类化合物,简单、快速、灵敏度、准确度高。

## 1 仪器与材料

Waters Acquity UPLC H-Class System, 配备有 Acquity UPLC QSM、Acquity UPLC Sample Manager FTN、Acquity UPLC PDA Detector 以及 Empower 2 工作站(美国 Waters 公司);KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);十万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);小型台式离心机(Thermo Pico17)。

对照品五味子醇甲(批号 110857-201412)、五味子酯甲(批号 111529-200604)、五味子甲素(批号 110764-200107)购自中国食品药品检定研究院;五

味子醇乙(批号 MUST-15070312)、五味子乙素(批号 MUST-15021710)、五味子酯乙(批号 MUST-14101907)、五味子酚(批号 MUST-15020101)购自成都曼斯特生物科技有限公司。三批北五味子药材(批号 20141101、20141201、20150101)购自陕西兴盛德药业有限责任公司。

## 2 实验方法

### 2.1 对照品溶液的制备

分别取五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子酯乙、五味子甲素、五味子乙素和五味子酚对照品适量,精密称定,配制成浓度分别为 792.00、603.36、875.00、603.00、684.00、762.00 和 654.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合标准工作溶液,于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 2.2 供试品溶液的制备

精密称取北五味子药材粉末约 0.3 g(过三号筛),置于 25 mL 容量瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 20 kHz) 20 min,放置室温,用甲醇补足减失重量,摇匀,0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

### 2.3 色谱条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> (50 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ );流动相 A 相为水, B 相为乙腈,梯度洗脱条件为:0 ~ 1 min, 40% ~ 70% B; 1 ~ 4 min, 70% B; 4 ~ 5 min, 70% ~ 40% B; 流速 0.4 mL/min; 进样量为 2  $\mu\text{L}$ ; 柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ ; 检测波长 254 nm。

### 2.4 系统适用性试验

按“2.3”项下设定色谱条件,混合对照品溶液,供试品溶液,分别进样 2  $\mu\text{L}$  进行色谱分析。混合对照品溶液、供试品溶液对比色谱图见图 1,结果显示各成分分离度符合测定要求且空白溶液在相应位置未见干扰。

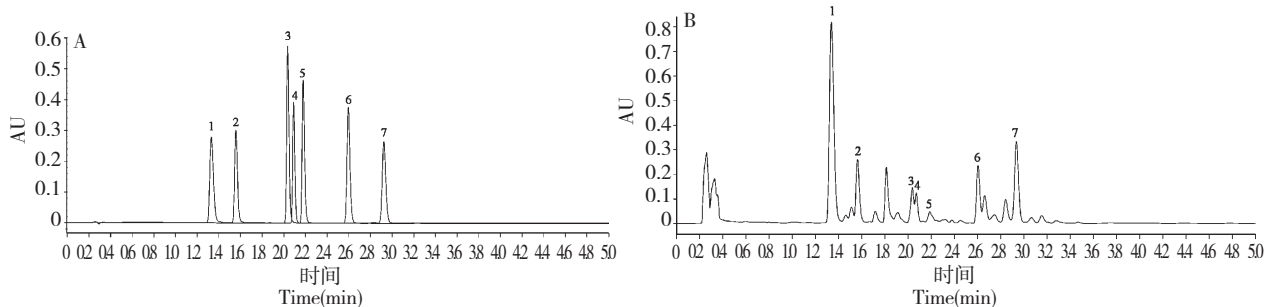


图 1 混合对照品(A)、北五味子提取物(B)的 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of mixed reference substances(A) and *S. chinensis* sample(B)

1. 五味子醇甲, 2. 五味子醇乙, 3. 五味子酯乙, 4. 五味子酯甲, 5. 五味子酚, 6. 五味子甲素, 7. 五味子乙素

1. Schizandrin, 2. Schisandrol B, 3. Schisandrol B, 4. Schisantherin A, 5. Schisanhenol, 6. Schisanhenol A, 7. Schizandrin B

## 2.5 线性关系考察

按“2.3”项下设定色谱条件,精密吸取“2.1”项下混合标准工作溶液,按7个梯度体积稀释,同体积进样,进样量为2  $\mu\text{L}$ ,进行色谱分析,以色谱峰峰面积( $Y$ )为纵坐标,以标准溶液中化合物浓度( $x$ ,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )绘制标准曲线,计算各成分的回归方程和线性范围。7种木脂素线性范围为54.50~875.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,表明各木脂素对照品在实验浓度范围内,线性

关系良好(表1)。

## 2.6 定量限与检测限

以空白样品为检测对象,添加不同体积的混合标准溶液,按“2.3”项下设定色谱条件,进样量为2  $\mu\text{L}$ ,以各对照品信噪比( $S/N$ )10:1为定量限(LOQ),信噪比( $S/N$ )3:1为检测限(LOD),结果见表1。

表1 7种木脂素类化合物的线性范围、相关系数、检测限和定量限

Table 1 Linear ranges,  $r$ , LODs and LOQs of the 7 lignans

化合物 Compounds	线性范围 Linear range ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	回归方程 Regression equation	相关系数 $r$ Correlation coefficient	LOD ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
五味子醇甲 Schizandrin	99.00 ~ 792.00	$Y = 5 \times 106X + 21671$	0.9994	0.1600	0.8200
五味子醇乙 Schisandrol	100.56 ~ 603.36	$Y = 4 \times 106X + 30633$	0.9999	0.0570	0.1130
五味子酚 Schisanhenol	54.50 ~ 654.00	$Y = 4 \times 106X - 872.02$	1.0000	0.0200	0.1700
五味子甲素 Schizandrin A	127.00 ~ 762.00	$Y = 5 \times 106X + 3099.1$	0.9999	0.0560	0.1670
五味子乙素 Schizandrin B	114.00 ~ 684.00	$Y = 4 \times 106X - 11090$	0.9999	0.1600	0.8000
五味子酯甲 Schisantherin A	125.00 ~ 875.00	$Y = 2 \times 106X + 3847.6$	0.9999	0.0120	0.1250
五味子酯乙 Schisantherin B	100.50 ~ 603.00	$Y = 3 \times 106X + 18490$	0.9998	0.0105	0.1050

## 2.7 精密度

### 2.7.1 日内精密度

取同批的供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件连续进样6次,进样量为2  $\mu\text{L}$ ,测得五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酚、五味子甲素、五味子乙素、五味子酯甲、五味子酯乙各峰的日内相对标准偏差(RSD)分别为0.23%、0.22%、0.40%、0.27%、0.33%、0.57%、0.25%。表明日内精密度良好。

### 2.7.2 日间精密度

取同批的供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件进样6次,进样量为2  $\mu\text{L}$ ,测得五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酚、五味子甲素、五味子乙素、五味子酯甲、五味子酯乙日间的RSD分别为1.86%、0.15%、0.27%、0.18%、0.18%、0.48%、0.17%。表明日间精密度良好。

## 2.8 稳定性

取同批供试品溶液,分别与制备后0、2、4、6、8、10、24 h,按“2.3”项下色谱条件进样,进样量为2  $\mu\text{L}$ ,进行24 h内稳定性试验。测得五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酚、五味子甲素、五味子乙素、五味子酯甲、五味子酯乙各峰的RSD分别为0.57%、0.66%、1.38%、0.45%、0.46%、0.60%、0.61%。表明样品在24 h内稳定。

## 2.9 重复性

取同批供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件,连续进样6次,进样量为2  $\mu\text{L}$ ,进行重复性试验,测得五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酚、五味子甲素、五味子乙素、五味子酯甲、五味子酯乙各峰的RSD值分别为0.26%、0.26%、0.71%、0.32%、0.31%、0.23%、0.29%。说明此方法重复性良好。

## 2.10 加样回收率

分别精密称取7个木脂素类成分对照品,配成五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酚、五味子甲素、五味子乙素、五味子酯甲、五味子酯乙浓度分别为635、210、50、240、228、117、115  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液。精密称取已测知7个木脂素类成分含量的五味子样品约0.3 g,按“2.2”项下方法制备成体积分别为0.5 mL的三份供试品溶液。根据样品中已知五味子成分含有量的80%、100%、120%,分别向上述供试品溶液加入上述混合对照品溶液0.4、0.5、0.6 mL。按“2.3”项下色谱方法进样,进样量为2  $\mu\text{L}$ ,记录不同木脂素类成分的信号强度。结果如表2所示,五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子酯乙、五味子酚、五味子甲素、五味子乙素的平均加样回收率分别为99.01%、101.09%、100.58%、102.04%、98.81%、99.54%、99.57%,结

果显示加样回收率良好。

表2 加样回收率试验结果(%, n=6)

Table 2 Recoveries and relative standard deviations(RSD) of the 7 lignans(%, n=6)

化合物名称 Compounds	样品含量 Sample content ( $\mu\text{g/mL}$ )	加入量 Spiked amount ( $\mu\text{g/mL}$ )	实际测得量 Detected amount ( $\mu\text{g/mL}$ )	回收率 Recovery(%)	RSD (%)	平均回收率 Average recovery(%)
五味子醇甲 Schizandrin	477.8	378.3	867.5	103.01	0.214	100.9
	477.8	465.8	937.1	98.6	0.233	
	477.8	574.7	1058.9	101.11	0.187	
五味子醇乙 Schisandrol	204.3	156.27	367.7	104.5	0.251	100.19
	204.3	214.3	409.5	95.75	0.261	
	204.3	246	451.1	100.33	0.251	
五味子酯甲 Schisantherin A	107	83.2	189.9	99.63	0.176	100.3
	107	110	219	101.81	0.163	
	107	127.6	233.9	99.45	0.322	
五味子酯乙 Schisantherin B	105	83	185	96.38	0.585	100.75
	105	110	217	101.81	0.034	
	105	123	233	104.06	0.452	
五味子酚 Schisanhenol	43.2	34.48	78.4	102.08	0.245	100.81
	43.2	43	85.8	99.06	0.337	
	43.2	51.75	95.62	101.29	0.142	
五味子甲素 SchisanhenolA	216.4	173.2	390.1	100.28	0.78	101.09
	216.4	200	423.4	103.5	0.78	
	216.4	260.7	475.8	99.5	1.02	
五味子乙素 Schizandrin B	218.8	176.4	387.3	95.52	0.335	96.78
	218.8	210	418.5	95.09	0.54	
	218.8	263.5	481.6	99.73	0.411	

## 2.11 样品测定

取3个批次的北五味子饮片,粉碎,过3号筛,精密称取0.3 g,平行称定6份。按照“2.2”项下方法制备成供试品溶液,分别精密吸取2  $\mu\text{L}$ 注入超

效液相色谱仪,按上述色谱条件进行UPLC分析,记录峰面积,根据标准曲线计算样品中五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、五味子酯乙和五味子酚的含量,结果见表3。

表3 五味子中7种木脂素类化合物成分含量测定结果(mg/g)

Table 3 Determination results of 7 lignans in *Fructus chinensis*

批号 No.	五味子醇甲 Schizandrin	五味子醇乙 Schisandrol	五味子酯甲 Schisantherin A	五味子酚 Schisanhenol	五味子甲素 Schisanhenol A	五味子乙素 Schizandrin B	五味子酯乙 Schisantherin B
20141100	39.81500	17.02667	8.93583	3.69333	18.03000	18.23750	8.79417
20141201	39.81500	17.02583	8.93583	3.69333	17.87917	18.23750	8.79500
20150103	41.36000	17.74000	9.47000	3.97583	18.73167	19.05917	9.20333

## 3 讨论

鉴于待测样品成分复杂多样的特点,分别对流动相pH(0.05%~0.2%甲酸)、检测波长(217、250、254 nm)、流速(0.2~0.5 mL/min)、柱温(25  $^{\circ}\text{C}$ ~

40  $^{\circ}\text{C}$ )等多种影响谱峰分离的因素进行考察。结果显示,在流动相中加入不同浓度的甲酸均对各成分的分离度及峰型影响不明显,因此流动相选择乙腈-水溶液;相对于217和250 nm,在254 nm波长下7个木脂素类成分均有良好的响应值和分离度,检测

波长确定为 254 nm;柱温过低或过高都会影响色谱峰的分度及峰型,柱温为 25 °C 和 30 °C 时,色谱峰的峰型较差,分离度较低,柱温为 35 °C 时,各色谱峰的峰型较好,分离度提高,柱温为 40 °C 时,各色谱峰的出峰时间提前,对峰型及分离度的影响不明显,因此选择 35 °C;随着流速增加,分离度增加,谱峰对称性提高。但当流速为 0.5 mL/min 时,分离度降低,因此流速选择 0.4 mL/min。综合以上预实验结果,将梯度洗脱条件:0 ~ 1 min, 40% ~ 70% B; 1 ~ 4 min, 70% B; 4 ~ 5 min, 70% ~ 40% B, 流动相水(A)-乙腈(B),检测波长 254 nm,柱温 35 °C,流速 0.4 mL/min 最终确定为本文选择的的色谱条件。

## 4 结论

北五味子活性成分复杂,不同产地的原药材具有明显的疗效差异,分析鉴定难度大,测定其中的单个有效成分并不能完全反映原药材的本质及质控情况。因此,建立一种快速、有效且经济的分析方法,对不同来源的北五味子进行鉴别和质控是规范中药的关键。

本论文利用 UPLC 法,同时测定北五味子中 7 个木脂素类成分(五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子酯乙、五味子甲素、五味子乙素和五味子酚)的含量。方法专属性强、稳定性、灵敏度和准确性良好。在该分离系统下,主要活性成分出峰时间段,各色谱峰之间均有良好的分离度。说明本实验建立的基于 UPLC 技术的分析方法可以对北五味子的质量控制提供一个更高效的方法。

## 参考文献

- Gurley BJ, Fifer EK, Gardner Z. Pharmacokinetic herb-drug interactions (part 2): drug interactions involving popular botanical dietary supplements and their clinical relevance. *Planta Med*, 2012, 78: 1490-1514.
- Koncic MZ, Tomczyk M. New insights into dietary supplements used in sport: active substances, pharmacological and side effects. *Current Drug Targets*, 2013, 14: 1079-1092.
- Chien CF, Wu Y T, Tsai TH. Biological analysis of herbal medicines used for the treatment of liver diseases. *Biomed-Chromatogr*, 2011, 25: 21-38.
- Chan SW. *Panax ginseng*, *Rhodiola rosea* and *Schisandra chinensis*. *Int J Food Sci Nutr*, 2012, 63 Suppl 1: 75-81.
- Zhang LL(张林林), Wang YJ(王永吉), Li H(李航), et al. Simultaneous determination of schizandrolA, schisandrin A and schisandrin Bin Hugan Capsules by UFLC. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2013, 35: 96-99.
- Liang J(梁婧), Hou HY(侯海燕), Lan XX(兰晓霞), et al. Advance in study on pharmacological effect and molecular mechanisms of schisandrin B. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2014, 31: 506-510.
- Zhu CW(朱春雾), Lv J(吕靖), Zhao ZM(赵志敏), et al. Effect of schisantherin A inhibit liver sinusoid endothelial cell function and action against liver fibrosis relating to angiogenesis. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2016, 41: 279-284.
- Chen X(陈雪), Zhang YY(张玉影), Shao Y(邵玉), et al. Inhibitory effect of deoxyschizandrin on growth of brain glioma cells and its mechanism. *J Jilin Univ, Med Ed*(吉林大学学报,医学版), 2016, 42: 711-715.
- Zeng WQ(曾雯琼), Xu Q(徐青), Xu YY(许银燕). Influences of Schisandrin B on proliferation, apoptosis and Wnt /  $\beta$ -catenin signaling pathway of Skov3 human ovarian cancer cells. *Chin Clin Oncol*(临床肿瘤学杂志), 2014, 19: 589-593.
- Chun JN, Cho M, So I, et al. The protective effects of *Schisandra chinensis*, fruit extract and its lignans against cardiovascular disease: A review of the molecular mechanisms. *Fitoterapia*, 2014, 97: 224-233.
- Zhou SY(周世月), Deng ZR(邓之荣), Tan L(谭琳), et al. Protection effect of schisanhenol on learning and memory acquired disorder induced by scopolamine in mice. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2014, 49: 2088-2091.
- Jakimska A, KotWasik A, Namiesnik J. The current state-of-the-art in the determination of pharmaceutical residues in environmental matrices using hyphenated techniques. *Crit Rev Anal Chem*, 2014, 44: 277-298.
- Wei WL, Zeng R, Gu CM, et al. *Angelica sinensis*, in China-A review of botanical profile, ethnopharmacology, phytochemistry and chemical analysis. *J Ethnopharmacol*, 2016, 190: 116-141.
- Dou ZH(窦志华), An LP(安莉萍), Zhang L(张琳), et al. Assaying of 6 lignanoids in seed and pericarp of *Schisandra chinensis*. *West Chin J Pharm Sci*(华西药理学杂志), 2016, 31: 205-207.
- Wang LJ(汪丽君), Liu SM(刘淑敏), Mao CQ(毛春芹), et al. Simultaneous determination of 8 lignans in *Schisandra chinensis* by quantitative analysis of multi-components by single marker. *Chin J Phram Anal*(药物分析杂志), 2015, 35: 1191-1197.