

高效液相色谱法测定五味子和含五味子的制剂中五味子乙素及多种活性成分时流动相体系的选择

杨孝容* , 向清祥 , 陈稼轩

(乐山师范学院化学与生命科学学院, 四川 乐山 614004)

摘要 :建立了用高效液相色谱法测定五味子和含五味子的制剂中五味子乙素的流动相体系。用 Shim-pack VP-ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 在柱温 30 ℃、检测波长 285 nm、流速 1.0 mL/min 的条件下, 用不同的流动相组成及其不同比例研究了五味子提取液中 3 种木脂素(五味子乙素、安五脂素和五味子甲素)的保留时间及其分离情况, 从中选择测定五味子乙素的流动相体系。结果表明, 在甲醇-水、甲醇-冰醋酸-水的流动相体系中, 安五脂素和五味子乙素很难完全分离, 而在乙腈-甲醇-水和乙腈-冰醋酸-水流动相体系中, 3 种木脂素可很好地分离。以乙腈-甲醇-水(体积比为 17:58:25)为流动相测定五味子和护肝片中 3 种木脂素的含量, 相对标准偏差($n = 4$)为 0.95% ~ 5.8%, 平均加标回收率为 94.50% ~ 105.6%。将该流动相体系用于供试品中 3 种木脂素含量的测定, 分离效果好, 结果令人满意。

关键词 :高效液相色谱法 ; 流动相 ; 五味子乙素 ; 安五脂素 ; 五味子甲素 ; 五味子 ; 中药制剂

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2009)03-0313-05 栏目类别 :研究论文

Selection of mobile phases for the determination of γ -schisandrin and multi-active constituents in *Schisandra chinensis* and its preparations by high performance liquid chromatography

YANG Xiaorong* , XIANG Qingxiang , CHEN Jiakuan

(Department of Chemistry and Life Science, Leshan Teachers College, Leshan 614004, China)

Abstract : The systems of mobile phase for the determination of γ -schisandrin in *Schisandra chinensis* and its preparations were developed by high performance liquid chromatography (HPLC). The separation was performed on a Shim-pack VP-ODS column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) at 30 ℃, the detection wavelength was set at 285 nm and the flow rate was 1.0 mL/min. Retention times and separation were investigated in mixed solution of three reference substances (γ -schisandrin, anwulignan, and deoxyschizandrin) and methanol extract of *Schisandra chinensis* by different systems and proportions of mobile phases to select optimal conditions for the determination of γ -schisandrin. The results showed that the complete separation of γ -schisandrin and anwulignan was difficult in the systems of methanol-water and methanol-acetic acid-water. The separation of γ -schisandrin, anwulignan and deoxyschizandrin can be completed in the systems of acetonitrile-methanol-water and acetonitrile-acetic acid-water when their proportions were suitable. The mobile phase of acetonitrile-methanol-water (17:58:25, v/v/v) was selected for the determination of deoxyschizandrin, γ -schisandrin and anwulignan in *Schisandra chinensis* and Hupan tablets. The determination results of the three substances were satisfactory with the relative standard deviations ($n = 4$) ranged from 0.95% to 5.8%, and the average recoveries ranged from 94.50% to 105.6%. The efficiency of separation and the results of determination were satisfactory for the real samples.

Key words : high performance liquid chromatography (HPLC); mobile phase; γ -schisandrin; anwulignan; deoxyschizandrin; *Schisandra chinensis*; Chinese herbal preparation

* 通讯联系人: 杨孝容, 副教授. E-mail: yangxy22@lsc.edu.cn; yangxiaorong22@sohu.com.
基金项目: 四川省教育厅科研基金(No. 2006C039)和乐山市科技局基金项目(No. 06SZD104).
收稿日期: 2008-09-17

中药五味子(*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.)为木兰科植物五味子的干燥成熟果实,具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心之功效。我国临床研究发现五味子能明显降低肝炎患者血清谷丙转氨酶水平^[1,2]。五味子除了有明显的保肝作用外,近年还发现其有抗癌、抗艾滋病病毒^[3,4]等作用。五味子科植物分为五味子属(又称北五味子)和南五味子属。北五味子主产于辽宁、吉林、黑龙江、河北和内蒙古等地,南五味子主产于河南、陕西、甘肃、四川等地;两种五味子中的活性成分五味子乙素的含量差别很大,前者中五味子乙素的含量较高,而在药材市场上前者的价格较后者要贵几倍。根据五味子乙素含量这一指标可判定五味子药材的优劣。

高效液相色谱法(HPLC)作为一项高效、快速、高灵敏的分离和分析技术,在中药材指纹图谱的建立、活性成分的含量分析和天然产物中残留药物的检测等^[5-9]方面已被广泛应用。其中有关五味子乙素含量分析的报道较多^[9-14],涉及另一活性成分安五脂素的报道仅有 2 篇^[11,12]。作者多年来一直从事用 HPLC 测定五味子和含五味子的制剂中五味子活性成分含量的工作^[15-17],在这个过程中发现随着色谱柱使用时间的增加及柱效的降低,若以甲醇-水和甲醇-冰醋酸-水体系为流动相,安五脂素和五味子乙素的保留时间很接近,两者无法完全分离,造成五味子乙素的峰形不对称或保留时间有较小的变化^[13,14],尤其是若选用 220 nm 左右的检测波长,会给五味子乙素的定量带来严重的影响,甚至是完全错误的结果。本文通过对测定五味子乙素时的流动相体系的选择,建立了测定五味子乙素的最好流动相体系,同时测定了不同产地的五味子和不同批号的护肝片中五味子甲素、五味子乙素和安五脂素的含量。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

LC-2010A 高效液相色谱仪(日本岛津),配四元泵溶剂淋洗系统、自动进样系统和紫外检测器;TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);KQ-50B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

对照品:五味子甲素(deoxyschizandrin)、五味子乙素(γ -schisandrin)购于中国药品生物制品检定所(+)-安五脂素[(+)-anwulignan]从广西五味子种子中分离得到,经核磁共振氢谱、碳谱及红外光谱和质谱确认,其结构与文献^[18,19]报道的结果一致,HPLC 检测为单峰。

供试品:五味子药材(自购于乐山药材市场,产地为辽宁和四川);护肝片(黑龙江葵花药业股份有限公司产品,批号 200801094;广东康尔丹制药有限公司产品,批号 060601)。甲醇、乙腈为色谱纯;冰醋酸为分析纯;水为二次蒸馏水。

1.2 溶液的制备

单一对照品工作溶液:准确称取一定量的(+)-安五脂素、五味子甲素和五味子乙素,溶于少量甲醇中,转移至 50 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配制质量浓度分别为 446、230 和 200 mg/L 的单标对照品储备液。再分别取(+)-安五脂素、五味子甲素和五味子乙素的储备液依次为 2.50、7.50 和 13.00 mL,各置于 50 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,制成 3 种对照品质量浓度依次为 22.3、34.5 和 52.0 mg/L 的单一对照品工作溶液。

混合对照品工作溶液:分别取(+)-安五脂素、五味子甲素和五味子乙素的储备液依次为 2.50、7.50 和 13.00 mL 置于同一 50 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,制成 3 种对照品质量浓度依次为 22.3、34.5 和 52.0 mg/L 的混合对照品工作溶液。

供试品溶液:称取产于四川和辽宁的两个五味子果实样品和两个批号的护肝片(去除糖衣)各约 10 g,于 55 °C 条件下烘干,粉碎,过 60 目筛,混匀。精密称取五味子每份 0.15 g,护肝片每份 0.5 g。每种供试品各 8 份,置于具塞锥形瓶中,精密加入 25 mL 甲醇,其中 4 份加入对照品混合工作液 5.00 mL(作加标回收试验),称重,超声处理 30 min,放冷,再称重,用甲醇补足减失的重量,摇匀。用 0.45 μ m 的滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

护肝片的阴性溶液:按护肝片的处方^[20]制备不含五味子药材的阴性对照品,按供试品溶液的制备项下同法操作,即得。

1.3 实验方法

1.3.1 紫外分析

在 1 cm 的石英比色皿中,加入一定体积(小于 3.00 mL)的五味子甲素、五味子乙素或安五脂素对照品工作溶液,用移液管加甲醇补足到 3.00 mL,混匀。以甲醇作参比,进行紫外光谱检测。

1.3.2 高效液相色谱分析

色谱柱:日本岛津 Shim-pack VP-ODS(250 mm \times 4.6 mm 5 μ m);柱温 30 °C;流速 1 mL/min;检测波长 285 nm;进样量 5 μ L;流动相:不同比例的甲醇-水、甲醇-0.2% 冰醋酸水溶液、乙腈-0.2% 冰醋酸水溶液、乙腈-甲醇-水体系,用于考察五味子提取液的分离情况;进行供试品含量分析时选择流动相体系为乙腈-甲醇-水(体积比为 17:58:25)。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的选择

图1是五味子中3种木脂素的紫外吸收谱图。五味子甲素和五味子乙素都是联苯环辛二烯木脂素,因此它们的紫外吸收光谱相似,而安五脂素属于2,3-二甲基-1,4-二芳基丁烷木脂素,吸收曲线与前者两者差异较大。考虑到在北五味子中五味子乙素含量较高,而安五脂素含量较低,为了使两者的吸收峰强度的差异缩小,选择安五脂素的灵敏度较五味子乙素高的吸收波长285 nm为HPLC检测波长。

2.2 流动相的选择

本实验考察了上述3种木脂素以及四川和辽宁产五味子的提取液在不同比例的甲醇-水、甲醇-0.2%冰醋酸水溶液、乙腈-甲醇-水和乙腈-0.2%冰醋酸水溶液流动相体系中的色谱分离情况。各对

照品的保留时间列于表1中,不同流动相体系中辽宁五味子提取液的典型色谱图见图2。

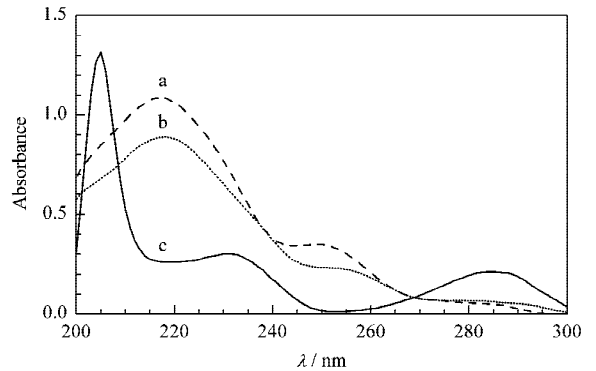


图1 (a)五味子甲素(10.8 mg/L)、(b)五味子乙素(10.0 mg/L)和(c)安五脂素(11.1 mg/L)的紫外光谱图

Fig. 1 UV spectra of (a) deoxyschizandrin (10.8 mg/L), (b) γ -schisandrin (10.0 mg/L) and (c) anwulignan (11.1 mg/L)

表1 在不同流动相体系中3种目标物的保留时间

Table 1 Retention times of three reference substances in different mobile phases

Mobile phase		Retention times/min		
composition	proportion (volume ratio)	deoxyschizandrin	anwulignan	γ -schisandrin
Methanol-water	75:25	18.72	29.33	29.93
	78:22	13.95	20.60	21.31
	80:20	11.82	16.78	17.58
Methanol-0.2% acetic acid solution	75:25	18.17	28.51	29.07
	78:22	13.79	20.48	21.13
	80:20	11.64	16.60	17.36
Acetonitrile-methanol-water	17:58:25	18.66	22.22	26.88
	45:30:25	17.98	16.87	23.83
	75:0:25	13.07	10.59	16.05
Acetonitrile-0.2% acetic acid solution	68:32	18.59	15.26	24.28
	72:28	14.77	12.02	18.51
	75:25	12.66	10.28	15.50

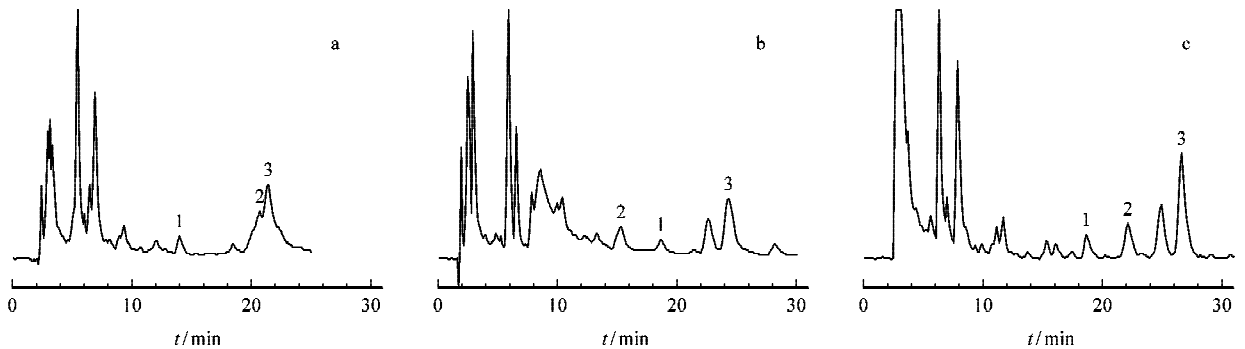


图2 在不同流动相体系中辽宁五味子提取液的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of the methanol extracts of *Schisandra chinensis* from Liaoning with different mobile phases

Mobile phases: a. methanol-water (78:22, v/v); b. acetonitrile-0.2% acetic acid solution (68:32, v/v); c. acetonitrile-methanol-water (17:58:25, v/v/v).

1. deoxyschizandrin; 2. anwulignan; 3. γ -schisandrin.

从表1和图2可知,在甲醇-水和甲醇-冰醋酸-水体系中,安五脂素的保留时间一般比五味子乙素稍短,但比五味子甲素长;流动相比比例的改变对3种

木脂素的相对保留时间影响很小,安五脂素和五味子乙素很难完全分离,随着柱效的降低,两者的峰可能合二为一,使北五味子中五味子乙素的分析结果

偏高,而南五味子中安五脂素含量高,五味子乙素含量低,有的甚至无法检出,有可能把安五脂素的峰误判为五味子乙素,造成完全错误的结果。但在乙腈-甲醇-水体系中,若固定水的比例,随着乙腈比例的增加,安五脂素相对于五味子乙素的保留时间在缩短,可以出现在五味子甲素和五味子乙素之间,甚至可以出现在五味子甲素之前或与五味子甲素的峰重叠;而乙腈-冰醋酸-水的体系中乙腈与冰醋酸的相对量也会影响各木脂素的保留时间和出峰顺序。

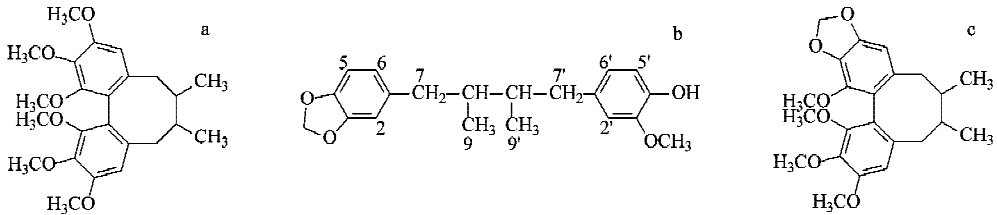


图 3 (a)五味子甲素、(b)安五脂素和(c)五味子乙素的结构式
Fig. 3 Structures of (a) deoxyschizandrin, (b) anwulignan and (c) γ -schisandrin

若实验的目的是为了测定五味子乙素,在甲醇-水和甲醇-冰醋酸-水流动相体系中由于五味子乙素和安五脂素可能不能完全分离,因而这 2 种流动相体系中需加入一定量的乙腈后方能适用;若要同时测定五味子甲素,若采用乙腈-甲醇-水体系为流动相时,各组分的比例要恰当,否则可能出现安五脂素

3 种木脂素结构(见图 3)的不同是出现上述情况的根本原因。从它们的结构式可看出,安五脂素有一个酚羟基,而五味子甲素和五味子乙素却没有;酚羟基受流动相极性的影响强于 3 种物质中的其他基团,因此安五脂素对流动相的极性变化较五味子甲素和五味子乙素敏感,随着乙腈比例的增加,流动相的极性减小,安五脂素保留时间缩短的幅度比五味子甲素和五味子乙素的幅度大,因此出现了图 2 所示的结果。

和五味子甲素的色谱峰部分或全部重叠。本文同时测定五味子甲素、五味子乙素和安五脂素,选用乙腈-甲醇-水的体积比为 17:58:25 的体系为流动相,在五味子提取液中这 3 种木脂素与其他物质均能完全分离(见图 2-c),护肝片的提取液中其他物质的存在对这 3 种木脂素的测定也没有影响(见图 4)。

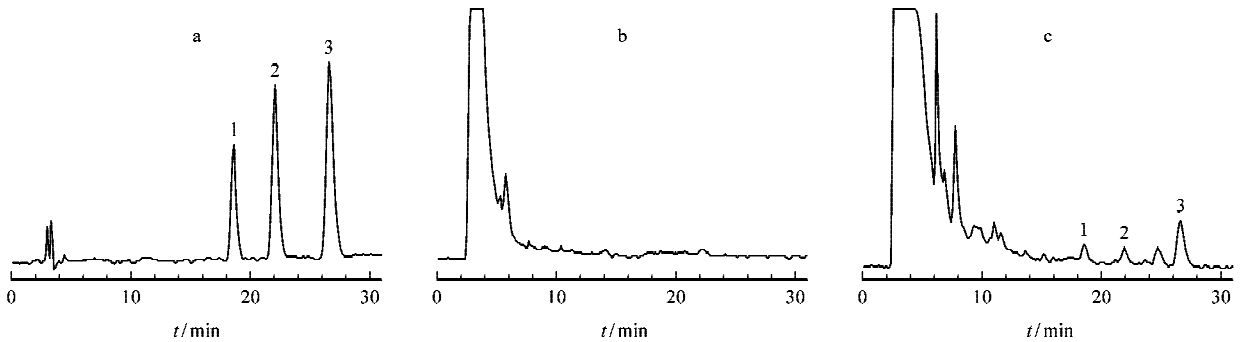


图 4 (a)对照品混合液、(b)护肝片阴性液和(c)护肝片的色谱图
Fig. 4 Chromatograms of (a) a mixture of standards, (b) a negative sample of Huguang tablets and (c) a sample of Huguang tablets

Mobile phase: acetonitrile-methanol-water (17:58:25, v/v/v).
1. deoxyschizandrin; 2. anwulignan; 3. γ -schisandrin.

2.3 线性关系和检出限

用甲醇配制 7 个不同浓度的混合对照品工作溶液,在“1.3.2”节条件下(流动相为乙腈-甲醇-水(体积比为 17:58:25))进行测定($n=3$),以质量浓度

α (mg/L)为横坐标,峰面积 S 为纵坐标进行线性回归,其线性范围、线性方程、相关系数、检出限($S/N=3$)列于表 2 中。结果可知,每种物质在其线性范围内均有良好的线性关系。

表 2 本方法的线性关系及检出限(LOD)
Table 2 Linear equations, correlation coefficients and limits of detection (LOD) of the method

Substance	Linear range/(mg/L)	Linear equation ¹⁾	Correlation coefficient	LOD ²⁾ /(mg/L)
Deoxyschizandrin	1.38 - 104	$S = -1.36 \times 10^3 + 1.72 \times 10^3 C$	0.9991	0.47
Anwulignan	0.892 - 66.9	$S = -2.57 \times 10^3 + 4.99 \times 10^3 C$	0.9994	0.31
γ -Schisandrin	2.08 - 156	$S = -3.65 \times 10^3 + 2.59 \times 10^3 C$	0.9998	0.71

1) S : peak area; C : mass concentration, mg/L. 2) LOD: $S/N=3$.

2.4 回收率测定

取“1.2”节中所述每种样品的4份加标溶液(各目标组分在不同基质和本底值样品中的绝对加标水平如下:五味子甲素172.5 μg、五味子乙素260.0 μg、安五脂素111.5 μg)进行加标回收率测定,结果见表3。

表3 加标回收率的测定结果($n=4$)

Table 3 Recoveries of the 3 substances ($n=4$) %

Sample	Deoxyschizandrin		Anwulignan		γ -Schisandrin	
	recovery	RSD	recovery	RSD	recovery	RSD
A	94.50	2.7	101.7	3.4	104.5	4.3
B	96.51	3.6	94.66	3.3	103.9	3.1
C	105.6	3.0	104.8	1.4	104.9	2.6
D	102.8	3.5	97.98	2.4	105.2	0.54

A: *Schisandra chinensis* from Sichuan; B: *Schisandra chinensis* from Liaoning; C: Hugan tablet (batch number: 200801094); D: Hugan tablet (batch number: 060601).

2.5 供试品分析

将“1.2”节下处理的两个五味子果实样品和两个护肝片的甲醇提取液,在“1.3.2”节条件下(流动相为乙腈-甲醇-水(体积比为17:58:25))进行高效液相色谱分析,分析结果见表4。

表4 实际样品中3种目标物的含量($n=4$)

Table 4 Contents of the 3 substances in real samples ($n=4$)

Sample	Deoxyschizandrin		Anwulignan		γ -Schisandrin	
	found/ (mg/g)	RSD/ %	found/ (mg/g)	RSD/ %	found/ (mg/g)	RSD/ %
A	4.18	2.8	5.13	1.9	-	-
B	0.702	4.1	0.602	3.7	4.28	2.3
C	0.283	4.2	0.173	5.1	0.943	2.8
D	0.162	5.1	0.107	5.8	0.605	0.95

A: *Schisandra chinensis* from Sichuan; B: *Schisandra chinensis* from Liaoning; C: Hugan tablet (batch number: 200801094); D: Hugan tablet (batch number: 060601).

-: The content is lower than the limit of detection.

3 结论

采用高效液相色谱法测定五味子或含五味子的制剂中五味子乙素的含量,选择甲醇-水和甲醇-乙腈-水流动相时,安五脂素可能干扰五味子乙素的定量,甚至可能把安五脂素误判为五味子乙素;选择乙腈-甲醇-水和乙腈-冰醋酸-水或乙腈-水流动相体系,安五脂素不干扰五味子乙素的测定。若除了五味子乙素以外,还要测定其他活性成分,需注意调整流动相组分的比例,否则安五脂素可能会干扰其他活性成分的测定。本文同时测定五味子甲素、五味子乙素和安五脂素,选择乙腈-甲醇-水(体积比为17:58:25)为流动相,供试品的分离效果好,分析结果令人满意。

参考文献:

- [1] Institute of Materia Medica of Chinese Academy of Medical Science. Modern research of Chinese herbal medicine: Vol. 1. Beijing: Associated Press of Peking Medical University and Peking Union Medical College (中国医学科学院药物研究所. 中草药现代研究: 一卷. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社), 1995: 349
- [2] Liu J Y, Wang Y P, Liu H Z. Special Wild Economic Animal and Plant Research (刘继永, 王英平, 刘洪章. 特产研究), 2005, 27(3): 49
- [3] Wei L X, Liu M Y, Ning B G, et al. Org Lett, 2006, 8(5): 991
- [4] Sheng X H, Quan B H, Chun L, et al. Tetrahedron, 2008, 64: 4 260
- [5] Fu S P, Yang B, Chen T, et al. Chinese Journal of Chromatography (付绍平, 杨博, 陈彤, 等. 色谱), 2008, 26(1): 64
- [6] Wang J F, Yu Y H, Cai L J, et al. Journal of Changchun University of Science and Technology (王金凤, 于源华, 蔡林君, 等. 长春理工大学学报), 2006, 29(3): 69
- [7] Lü H T, Sun H F, Qu B H, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (吕海涛, 孙海峰, 曲宝涵, 等. 分析化学), 2007, 35(10): 1 425
- [8] Zhang X Y, Xu J Z, Shen C Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (张晓燕, 徐锦忠, 沈崇钰, 等. 色谱), 2008, 26(3): 395
- [9] Du Y F, Yuan Z F, Wang C Y, et al. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (杜英峰, 袁志芳, 王春英, 等. 药物分析杂志), 2004, 24(4): 397
- [10] Liu G, Wang C, Xue K C, et al. Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army (刘刚, 王驰, 薛克昌, 等. 解放军药科学学报), 2004, 20(2): 112
- [11] Wang Y H, Gao J P, Chen D F. China Journal of Chinese Materia Medica (王彦涵, 高建平, 陈道峰. 中国中药杂志), 2003, 28(12): 1 155
- [12] Gao J P, Wang Y H, Yu Y Q, et al. Chinese Journal of Natural Medicines (高建平, 王彦涵, 郁韵秋, 等. 中国天然药物), 2003, 1(2): 89
- [13] Zhang Y N, Yue X F, Wang Z Z. Journal of Analytical Science (张延妮, 岳宣峰, 王喆. 分析科学学报), 2007, 23(1): 41
- [14] Zhang L S, Fu Y H, Lü W J. Chinese Pharmaceutical Affairs (张立升, 富玉海, 吕文军. 中国药事), 2007, 21(6): 424
- [15] Yang X R, Xiang Q X, Xiong J R, et al. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (杨孝容, 向清祥, 熊俊如, 等. 药物分析杂志), 2006, 26(11): 1 558
- [16] Song J H, Yang X R, Zhang C Z. West China Journal of Pharmaceutical Sciences (宋九华, 杨孝容, 张成志. 华西药科学杂志), 2008, 23(1): 110
- [17] Song J H, Yang X R. Chinese Traditional Patent Medicine (宋九华, 杨孝容. 中成药), 2008, 30(3): 380
- [18] Woo W S, Shin K H, Wagner H, et al. Phytochemistry, 1987, 26(5): 1 542
- [19] You Z P, Liao M J, Shi Y H, et al. Acta Pharmaceutica Sinica (游志鹏, 廖玫江, 石玉瑚, 等. 药科学报), 1997, 32(6): 455
- [20] The Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Part 1. Beijing: Chemical Industry Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部. 北京: 化学工业出版社), 2005: 472