

南北五味子醇提液的荧光光谱鉴别

杨孝容* 向清祥 熊俊如 陈 刚
(乐山师范学院化学与生命科学学院 乐山 614004)

摘 要 建立了用荧光光谱法快速鉴别五味子和部分含五味子制剂中五味子药材种属的方法。研究了五味子中的五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和安五脂素5种活性成分以及南北五味子和护肝片的乙醇提取液的荧光光谱,并用高效液相色谱测定了供试品中5种活性成分的含量。结果表明,安五脂素和五味子乙素具有强荧光性且峰形差异显著,五味子甲素和五味子醇甲的荧光性较弱,而五味子酯甲不具有荧光性;南北五味子的主要荧光物质分别为安五脂素和五味子乙素,据此可用乙醇提取液的荧光光谱快速鉴别南北五味子。

关键词 南北五味子,五味子乙素,安五脂素,乙醇提取液,荧光鉴别

中图分类号:O657.3

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2009)09-1070-05

中药五味子[*Schisandra chinensis*(Turcz.) Baill.]是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,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],并且具有抗癌和抗艾滋病的活性^[3,4]。五味子科植物分为五味子属(*Schisandra*)(又称北五味子)和南五味子属(*Kadsura*)2个属^[5]。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、广西、陕西、甘肃、四川、云南等地。

南北五味子提取液的化学成分和荧光光谱均有较大的差异,根据荧光光谱鉴别南北五味子已有文献^[6]报道,但有关南北五味子荧光光谱差异的原因并未阐明,且分别采用水溶性和脂溶性提取液的激发光谱进行鉴别,该方法相对复杂、费时。本文对五味子的乙醇提取液,采用255、285 nm作激发波长和355、322 nm作发射波长分别进行扫描,根据发射光谱的相对强弱和最大发射波长以及激发光谱的峰形方便地鉴别了南北五味子药材以及部分含五味子的中药制剂中五味子的种属来源;利用高效液相色谱测定了供试品中五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和安五脂素的含量,并研究了这5种物质的荧光性质,找出了南北五味子荧光光谱差异的物质原因。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

TU-1901型双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),1 cm石英液池,乙醇作参比,扫描紫外吸收光谱;Cary Eclipse型荧光分光光度计(美国Varian),1 cm石英液池,激发和发射狭缝均为5 nm,扫描荧光光谱;LC-2010A型高效液相色谱仪(日本岛津公司),配四元泵溶剂淋洗系统,自动进样系统和紫外检测器,色谱柱(Shim-pack VP-ODS,250 mm×4.6 mm,5 μm),柱温30℃,进样量5 μL,检测波长285 nm,流动相V(甲醇):V(乙腈):V(水)=57:17:26,流速1 mL/min。

对照品:五味子醇甲(schisandrol A)(No. 110857-200405)、五味子酯甲(schisantherin A)(No. 111529-200302)、五味子甲素(deoxyschizandrin)(No. 0764-200107)和五味子乙素(γ-schisandrin)(No. 110765-200205),均购自中国药品生物制品检定所,(+)-安五脂素(+)-anwulignan从广西五味子中分离得到,经MS、¹H NMR、¹³C NMR、DEPT、IR和UV确定结构与文献^[7]报道相同,高效液相色谱检测为单峰。

2008-10-20收稿,2008-11-25修回

四川省教育厅科研基金(2006C039)和乐山市科技局基金(06SZD104)资助项目

通讯联系人:杨孝容,女,副教授;E-mail:yangxy22@lsc.edu.cn;研究方向:药物分析

供试品:五味子药材购于乐山市药材公司(产地为广西、四川和辽宁),护肝片(葵花药业生产的葵花护肝片,批号:200801094;广东康尔丹制药有限公司生产的奕凯护肝片,批号:060601)购于乐山药店;色谱分析用溶剂为色谱纯;荧光分析溶剂乙醇为分析纯,蒸馏处理;其它试剂为分析纯。二次蒸馏水。

1.2 溶液配制

对照品溶液:准确称取一定量的五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和安五脂素对照品,用少量乙醇溶解,转入50 mL容量瓶,乙醇定容,分别得质量浓度为236 mg/L(5.46×10^{-4} mol/L)、324 mg/L(6.04×10^{-4} mol/L)、386 mg/L(9.28×10^{-4} mol/L)、286 mg/L(7.15×10^{-4} mol/L)和446 mg/L(1.36×10^{-3} mol/L)的各对照品储备液。分别取上述储备液2.70、4.00、4.40、9.50和2.50 mL用乙醇定容至50 mL,得5种对照品的混合工作液,质量浓度分别为12.7、25.9、34.0、54.3和22.3 mg/L,供HPLC分析用。

供试品溶液:将产于四川、广西和辽宁的3个五味子果实样品和2个批号的护肝片(去除糖衣),称取约10 g,粉碎,过0.3 mm孔筛,混匀。五味子果实供试品称取每份0.15 g左右,护肝片每份0.5 g左右,每种供试品精密称取各4份,置具塞锥形瓶中,加入25 mL乙醇,称定质量,超声处理30 min,放冷,再称定质量,用乙醇补足减失的质量,摇匀,用0.45 μ m滤膜过滤,弃初滤液,取续滤液作为分析溶液。

阴性溶液的制备:按护肝片的处方制备^[8]不含五味子药材的阴性对照品,照供试品溶液制备项下方法制得。

2 结果与讨论

2.1 紫外和荧光光谱

图1为五味子中5个活性成分对照品的紫外吸收光谱。由图1可知,安五脂素在近紫外区有3个吸收峰,最大吸收波长分别为205、230和284 nm;五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素的紫外吸收光谱相似均分别在215~225、250~260、280~290 nm之间存在3个吸收峰,因为它们都具有联苯环辛二烯木脂素结构。

图2为4个对照品的激发光谱(A)和发射光谱(B)。图2表明,安五脂素有2个激发峰,对应波长分别在230和285 nm,其发射峰只有1个,对应波长为322 nm。五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素的激发光谱和发射光谱均相似,激发光谱均有3个峰,对应波长在225~230 nm、250~260 nm、280~290 nm之间,且按这个顺序峰的强度依次减弱,最大发射波长均在355 nm附近;五味子乙素具有较强的荧光发射,五味子甲素和五味子醇甲的荧光均比较弱。五味子酯甲虽与五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素的紫外吸收相似,但五味子酯甲却没有荧光。图2可知,这5种活性成分中,荧光性较强的物质是安五脂素和五味子乙素,且它们的激发光谱和发射光谱的峰形差异明显。

2.2 5种对照品对五味子乙醇提取液荧光光谱的影响

在辽宁五味子乙醇提取液中分别加入五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和安五脂素,分别记录 $\lambda_{em}=355$ nm的激发光谱(图3A)和 $\lambda_{ex}=255$ nm的发射光谱(图3B)。结果表明,在辽宁五味子乙醇提取液中分别加入4种联苯环辛二烯木脂素成分后,荧光光谱形状基本不变。五味子酯甲使体系的激发光强度和发射光强度均减弱,五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素使体系的发射光强度和激发光强度均增加且五味子乙素的影响最大;而安五脂素的加入,体系的光谱形状变化非常大,表现

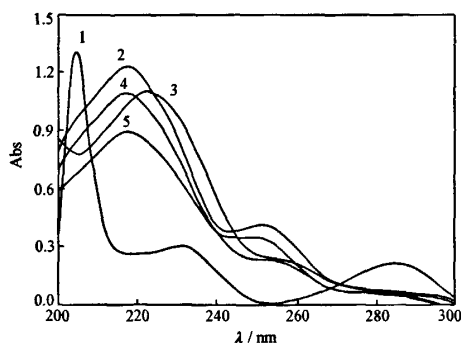


图1 5种活性成分的紫外吸收光谱

Fig. 1 Ultraviolet absorption spectra of 5 active components

1. anwulignan, 11.1 mg/L; 2. schisandrol A, 11.8 mg/L;
3. schisantherin A, 10.8 mg/L; 4. deoxyschizandrin, 10.3 mg/L;
5. γ -schisandrin, 10.0 mg/L

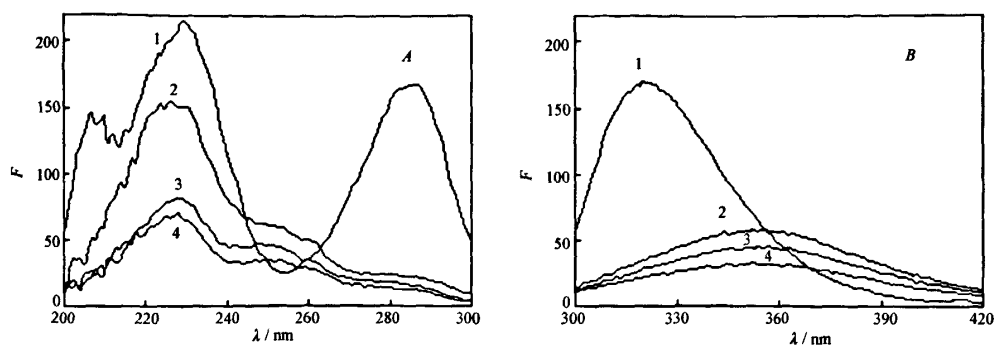
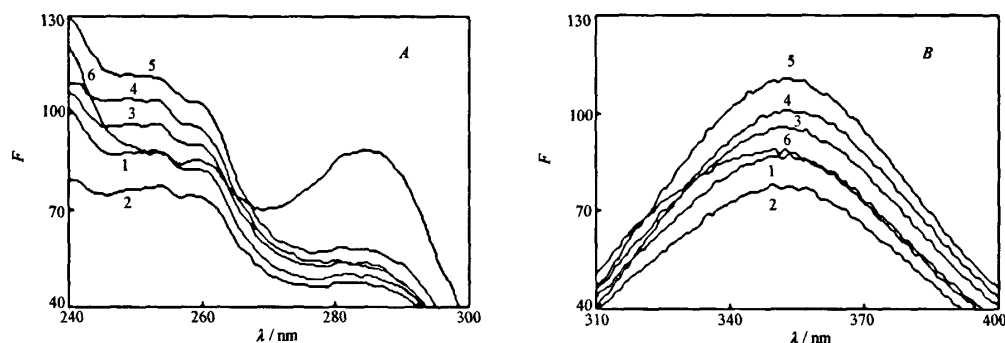


图2 4种活性成分的激发(A)和发射(B)荧光光谱

Fig. 2 Excitation(A) and emission(B) fluorescence spectra of 4 active components

1. anwulignan, $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 285 \text{ nm}/322 \text{ nm}$, 0.60 mg/L ($1.8 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$);
2. γ -schisandrin, $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 255 \text{ nm}/355 \text{ nm}$, 0.67 mg/L ($1.7 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$);
3. deoxyschizandrin, $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 255 \text{ nm}/355 \text{ nm}$, 7.7 mg/L ($1.8 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$);
4. schisandrol A, $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 255 \text{ nm}/355 \text{ nm}$, 3.1 mg/L ($7.2 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)

出了明显的安五脂素的光谱特征。由图2和图3的比较可看出,五味子乙醇提取液的荧光光谱主要由五味子乙素和安五脂素决定。

图3 激发光谱(A) ($\lambda_{em} = 355 \text{ nm}$) 和发射光谱(B) ($\lambda_{ex} = 255 \text{ nm}$)Fig. 3 (A) Excitation spectra ($\lambda_{em} = 355 \text{ nm}$) and (B) emission spectra ($\lambda_{ex} = 255 \text{ nm}$)

1. ethanol extract of Schisandra chinensis from Liaoning; 2. $1 + 5.4 \text{ mg/L}$ schisantherin A;
3. $1 + 3.1 \text{ mg/L}$ schisandrol A; 4. $1 + 7.7 \text{ mg/L}$ deoxyschizandrin; 5. $1 + 0.33 \text{ mg/L}$ γ -schisandrin; 6. $1 + 0.45 \text{ mg/L}$ anwulignan

2.3 五味子乙醇提取液中5种成分的HPLC法测定

将本文“1.2”节下处理的3个产地的五味子药材和护肝片的乙醇提取液,进行高效液相色谱分析测定5种活性成分的含量,典型色谱图见图4,分析结果列表1。

表1 分析结果($n=4$)Table 1 Results of determination of samples($n=4$)

Sample	schisandrol A		schisantherin A		deoxyschizandrin		anwulignan		γ -schisandrin	
	Found/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/%	Found/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/%	Found/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/%	Found/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/%	Found/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/%
Guangxi	0.328	3.3	3.77	2.5	2.73	2.9	2.59	1.7	0.354	3.6
Sichuan	—	—	3.03	2.6	4.18	2.8	5.13	1.9	—	—
Liaoning	4.23	3.0	0.306	5.1	0.702	4.1	0.602	3.7	4.28	2.3
200801094	0.908	1.6	0.162	5.2	0.283	4.2	0.173	5.1	0.943	2.8
060601	0.620	2.0	—	—	0.162	5.1	0.107	5.8	0.605	0.95

“—” Lower than the determination limit.

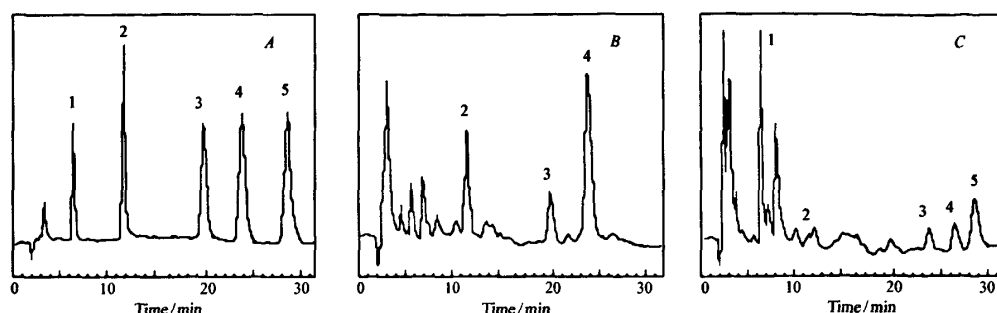


图4 5个对照品混合液(A)、四川五味子(B)和辽宁五味子(C)的HPLC色谱图

Fig.4 HPLC chromatograms of mixed solutions of (A) five reference substances,

(B) *Schisandra chinensis* from Sichuan and (C) Liaoning

1. schisandrol A; 2. schisantherin A; 3. deoxyschizandrin; 4. anwulignan; 5. γ -schisandrin

从表1可知,在被测的5种活性成分中,四川五味子的乙醇提取液主要为五味子酯甲、五味子甲素和安五脂素,四川五味子是南五味子的典型代表;而辽宁五味子和护肝片的乙醇提取液主要为五味子酯甲和五味子乙素,而安五脂素、五味子酯甲和五味子甲素含量较少,辽宁五味子是典型的北五味子,可知护肝片用的是北五味子。南北五味子强荧光物质的主要差异在于南五味子安五脂素含量比北五味子高,而北五味子的五味子乙素比南五味子高,与文献^[9,10]结果一致。

2.4 供试品的荧光光谱

3个产地的五味子和护肝片的乙醇提取液的激发光谱和发射光谱如图5。图中可见,广西和四川五味子乙醇提取液以 $\lambda_{ex} = 285\text{ nm}$ 的发射光谱和 $\lambda_{em} = 322\text{ nm}$ 激发光谱与安五脂素基本一致;而辽宁五味子和护肝片乙醇提取液以 $\lambda_{ex} = 255\text{ nm}$ 的发射光谱和 $\lambda_{em} = 355\text{ nm}$ 激发光谱与五味子乙素的相似。说明尽管五味子和护肝片乙醇提取液的成分复杂,但体系荧光光谱分别与单一安五脂素和五味子乙素的荧光光谱相似,证明安五脂素是南五味子的主要荧光物质,五味子乙素则是北五味子的主要荧光物质。

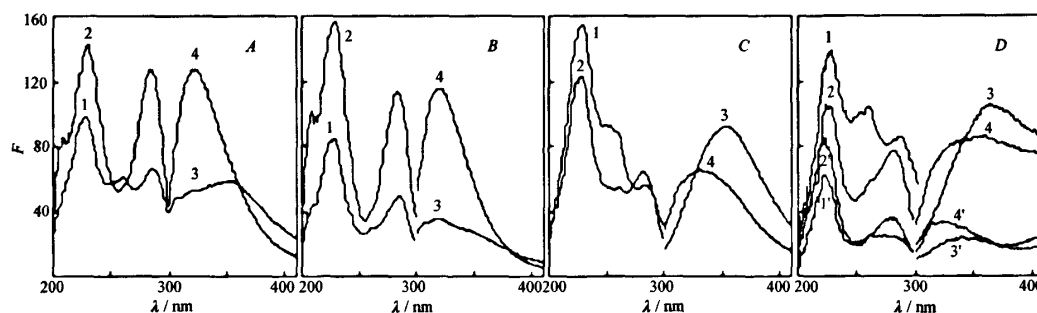


图5 广西(A)、四川(B)、辽宁(C)产五味子和护肝片(D)的荧光光谱

Fig.5 Fluorescence spectra of *Schisandra chinensis* from (A) Guangxi, (B) Sichuan, (C) Liaoning and (D) Huguang tablets

1, 1'. excitation spectra($\lambda_{em} = 355\text{ nm}$); 3, 3'. emission spectra($\lambda_{ex} = 255\text{ nm}$);

2, 2'. excitation spectra($\lambda_{em} = 322\text{ nm}$); 4, 4'. emission spectra($\lambda_{ex} = 285\text{ nm}$)

D 1, 2, 3, 4. Huguang tablets; 1', 2', 3', 4'. Huguang tablets without *Schisandra chinensis*

南北五味子乙醇提取液荧光的相对强度、最大发射波长和激发光谱形状的差异表现为:北五味子以 $\lambda_{ex} = 255\text{ nm}$ 发射光强度较 $\lambda_{ex} = 285\text{ nm}$ 的发射强度大,而南五味子刚好相反;当 $\lambda_{ex} = 255\text{ nm}$ 时,北五味子的最大发射波长在355 nm附近,而南五味子在322~355 nm之间;当 $\lambda_{ex} = 285\text{ nm}$ 时,北五味子最大发射波长在322~355 nm之间,南五味子则在322 nm附近;南五味子在 $\lambda_{em} = 322\text{ nm}$ 和 $\lambda_{em} = 355\text{ nm}$ 的激发光谱类似于安五脂素,分别在230和285 nm附近有激发双峰。而北五味子在 $\lambda_{em} = 355\text{ nm}$ 的激发光谱类似于五味子乙素有3个峰,对应波长在225~230 nm、250~260 nm、280~290 nm之间,且按这个

顺序峰的强度越来越弱,即使在护肝片中也表现出相似的规律。

上述结果表明,南北五味子乙醇提取液的发射光谱和激发光谱的差异是由其强荧光物质安五脂素和五味子乙素含量的差异所致,南五味子安五脂素含量高,与安五脂素的荧光光谱相似;而北五味子中五味子乙素含量高,荧光光谱与五味子乙素相似。可根据乙醇提取液的发射光谱的相对强度以及最大发射波长和激发光谱的峰形,快速判断五味子药材和部分含五味子制剂中五味子药材的种属。

参 考 文 献

- 1 Edited by Institute of Materia Medica of Chinese Academy of Medical Science(中国医学科学院药物研究所编著). *Modern Research of Chinese Herbal Medicine*(Vol. 1)(中草药现代研究(一卷))[M]. Beijing(北京):Peking Union Medical College and Beijing Medical University Press(北京医科大学中国协和医科大学联合出版社),1995:349
- 2 LIU Ji-Yong(刘继永),WANG Ying-Ping(王英平),LIU Hong-Zhang(刘洪章). *Spec Wild Economic Animal Plant Res*(特产研究)[J],2005,27(3):49
- 3 Xiao W L, Pu J X, Chang Y, Li X L, Huang S X, Yang L M, Li L M, Lu Y, Zheng Y T, Li R T, Zheng Q T, Sun H D. *Org Lett*[J],2006,8(7):1 475
- 4 Huang S X, Han Q B, Lei C, Pu J X, Xiao W L, Yu J L, Yang L M, Xu H X, Zheng Y T, Sun H D. *Tetrahedron*[J],2008,64:4 260
- 5 CHEN Ye-Gao(陈业高),QIN Guo-Wei(秦国伟),XIE Yu-Yuan(谢毓元). *J Wuhan Botan Res*(武汉植物学研究)[J],2001,19(2):158
- 6 CHENG Xiu-Min(程秀民),WANG Ke-Yuan(王科元),REN Jian(任健),GAO Yan-Zhong(高颜忠),TIAN Jin-Guo(田进国). *Prim J Chinese Mat Med*(基层中药杂志)[J],1994,8(2):3,19
- 7 Won Sick Woo, Kuk Hyun Shin, Hilderert Wagner, Hermann Lotter. *Phytochemistry*[J],1987,26(5):1 542
- 8 *Chinese Pharmacopoeia*(ChP)(中国药典)[M],Vol 1(一部). Beijing(北京):Chemical Industry Press(化学工业出版社),2005:472
- 9 GAO Jian-Ping(高建平),WANG Yan-Han(王彦涵),YU Yun-Qiu(郁韵秋),CHEN Dao-Feng(陈道峰). *Chinese J Nat Med*(中国天然药物)[J],2003,1(2):89
- 10 YANG Chun-Juan(杨春娟),XIONG Zhi-Li(熊志立),YANG Jing(杨晶),ZHAO Ni(赵霓),LI Fa-Mei(李发美). *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳医科大学学报)[J],2006,23(10):660,671

Fluorescence Identification of Kadsura and Schisandra in Ethanolic Extract

YANG Xiao-Rong*, XIANG Qing-Xiang, XIONG Jun-Ru, CHEN Gang

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

Abstract A method of rapid identification of Kadsura and Schisandra was established based on their fluorescence spectra. Fluorescence properties of the five active components (schisandrol A, schisantedrin A, deoxyschizandrin, γ -schisandrin and anwulignan) and the ethanol extracts of Schisandra chinensis and Hugin tablets were investigated by fluorospectrophotometry. The contents of the five components were determined by HPLC. The results show that the fluorescence properties of anwulignan and γ -schisandrin were much stronger than that of deoxyschizandrin and schisandrol A. The emission and excitation spectra of γ -schisandrin and anwulignan showed obvious difference. No fluorescence was produced by schisantherin A under the same condition. The main substance of fluorescence in Kadsura and Schisandra was anwulignan and γ -schisandrin, respectively. Fluorescence spectra of the ethanol extract could be used for the rapid identification of Kadsura and Schisandra.

Keywords Kadsura and Schisandra, γ -schisandrin, anwulignan, ethanolic extract, fluorescence identification