

五味子助眠成分的分离鉴定

Separation and identification of the hypnotic active ingredients of *Schisandra chinensis*

张梓毓 徐德平

ZHANG Zi-yu XU De-ping

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(Food Faculty of Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:通过高效液相色谱法(HPLC)对小鼠大脑皮层中多巴胺(DA)含量进行检测和直接观察睡眠法对五味子助眠作用进行研究;用大孔树脂柱、MCI柱、ODS柱等方法分离出具有助眠作用的有效成分;利用核磁共振(NMR)对有效成分中分离得到的化合物进行结构鉴定。结果表明:五味子水洗脱部分和95%乙醇洗脱部分能显著提高小鼠睡眠率和睡眠时间,水洗脱部分得到化合物 α -氨基- β -羟基异丁酸、 β -乙氧基氨基丙酸,95%乙醇洗脱部分分离得到戈米辛 N。五味子中氨基酸和木质素一样具有较好的助眠功效。

关键词:五味子;助眠;氨基酸;木质素

Abstract: To screen the constituents with dormant activity in *Schisandra chinensis* and analyze the active ingredients. The content of dopamine (DA) in mouse cerebral cortex was detected by high performance liquid chromatography (HPLC), and the sleeping effect was observed by sleep method. The effects of *S. chinensis* on the hypnotic effect were studied by using macroporous resin column, MCI column and ODS column. Active ingredients with hypnotic effect were separated, and the compounds isolated from active ingredients were structurally identified by nuclear magnetic resonance (NMR). The elution fraction of MCI and the elution fraction of 95% ethanol in macroporous resin significantly increased the sleep rate and sleep time in mice. The compounds α -amino- β -hydroxyisobutyric acid, β -ethoxyaminopropionic acid were obtained from the water elution part, and Gomisins N were from 95% ethanol elution part. Amino acids and lignin in *S. chinensis* had the same good hypnotic effect.

Keywords: Schisandra; hypnosis; amino acids; lignin

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金(编号:JUSRP21127)

作者简介:张梓毓,男,江南大学在读硕士研究生。

通信作者:徐德平(1965—),男,江南大学副教授,博士。

E-mail: xdp1219@sina.com

收稿日期:2017-11-26

五味子为木兰科多年生落叶木质藤本植物,《中华人民共和国药典》收录有2种五味子药材,分别为北五味子(*Schisandra chinensis* Baill)和华中五味子(*Schisandra sphenanthera* Rehd.et Wils)的成熟干燥果实(南五味子)^[1]。五味子中含有多种成分,具有镇静安神、收敛固涩、益气生津、补肾宁心等功效。近年来,中国对五味子的研究^[2-3]显示木质素类物质为五味子中具有镇静安神的功效成分,并阐明其结构。以往研究的重点在于五味子中的木质素类、萜类等较为复杂的有机物上^[4-6],忽略了一些结构简单却同样具有较好助眠功效的物质。现有的相关研究对五味子中氨基酸的报道仅停留在分离和结构鉴定上,并没对其中氨基酸的功能性作用进行研究,本试验拟对五味子不同提取物的助眠作用进行研究,通过分析脑部组织的神经递质含量的变化得到除木质素类物质外的具有助眠作用的氨基酸,为五味子进一步开发提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

北五味子:安徽亳州药材市场;

DA标准品:美国Sigma公司;

无水乙醇、高氯酸:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

甲醇、磷酸二氢钾:色谱级,国药集团化学试剂有限公司;

硅胶板:GF254,山东烟台芝罘化工厂;

大孔吸附树脂:AB-8型,天津南开大学化学工厂;

Octadecylsilyl(ODS)填料:北京绿百草科技发展有限公司;

Middle Chromatogram Isolated Gel(MCI GEL)填料:三菱化学控股集团。

1.2 试验仪器

龙视安摄像头:LS-Q130W-1型,广东东莞市盛鼎电子

科技有限公司;

磨粉机:CLF-205型,浙江省温州市创立药材器械厂;

萃取罐:RAT-100型,无锡申科仪器有限公司;

旋转蒸发器:R-1002型,上海申顺生物科技有限公司;

数显恒温水浴锅:HH-4型,江苏省金坛市荣华仪器厂;

恒流泵:SYB106-100型,天津市科器高新技术公司;

暗箱式紫外透射仪:ZF-90型,上海顾村光电仪器厂;

可见分光光度计:WFJ 2000型,优尼柯上海仪器有限公司;

公司;

核磁共振仪:Avance 500 MHz型,美国Bruker公司;

高效液相色谱仪(紫外+荧光检测器)(反相):1525型,美国沃特世公司。

1.3 试验动物

SPF级昆明小鼠:18~22 g,上海斯莱克实验动物有限公司。

1.4 试验方法

1.4.1 五味子提取物的制备 将10 kg北五味子粉碎后,按料液比1:10(g/mL)加入体积分数为80%的乙醇,于50℃搅拌提取3 h,过滤取上清液,重复2次。将3次所得上清液减压浓缩去乙醇后即得五味子醇提取物,于-18℃保存备用^[7]。

1.4.2 五味子活性成分的粗分 将已得到的五味子醇提取物用AB-8型大孔树脂柱(12 cm×150 cm)进行分离^[8],用体积分数为30%,50%,70%,95%的乙醇洗脱,分别得到30%乙醇洗脱物(1)、50%乙醇洗脱物(2)、70%乙醇洗脱物(3)和95%乙醇洗脱物(4)4个部分,浓缩并冷冻保存备用。大孔树脂粗分离后经试验确定有助眠活性部分用MCI柱(5 cm×100 cm)进一步分离,用去离子水和体积分数为30%,50%的乙醇洗脱,分别得到水洗脱物(5)、MCI柱30%乙醇洗脱物(6)和MCI柱50%乙醇洗脱物(7)3个部分,浓缩并冷冻保存备用。

1.4.3 五味子助眠作用 取小鼠80只,体重18~22 g,随机分成8组,每组10只,灌胃给药。灌胃剂量分别为:五味子大孔树脂30%乙醇洗脱物(A组)1 g/kg·BW;50%乙醇洗脱物(B组)1 g/kg·BW;70%乙醇洗脱物(C组)1 g/kg·BW;95%乙醇洗脱物(D组)1 g/kg·BW;五味子MCI柱水洗脱物(A1组)1 g/kg·BW;五味子MCI柱30%乙醇洗脱物(A2组)1 g/kg·BW;五味子MCI柱50%乙醇洗脱物(A3组)1 g/kg·BW;空白对照组(CK)给等量生理盐水。每天1次,连续给药1周。1周后用监控摄像观察并记录灌胃30 min后各组小鼠的睡眠率、灌胃结束后12 h内各组小鼠的睡眠时间。

1.4.4 小鼠大脑皮层中多巴胺(DA)含量的测定

(1) 脑组织样品匀浆制备:取冷冻保存的大脑皮层组织称重,按1:3(g/mL)的比例加入0.01 mol/L高氯酸溶液,置于冰上匀浆,4℃、13 000 r/min离心10 min后取上清液,0.22 μm针头过滤器过滤后即可进样^[9]。

(2) 色谱条件:色谱柱:Quattro 3 C₁₈柱(150 mm×

2.1 mm,3 μm);流动相:甲醇和0.1 mol/L磷酸二氢钾(体积比15:85);流速:0.2 mL/min;柱温:35℃;进样量:20 μL^[10]。

(3) 数据处理和分析:记录每组HPLC图谱上的峰面积;并用SPSS 20.0软件对试验所得数据进行统计,计量数据使用均值±标准差(mean±SD)表示。组间差异比较采用单因素方差分析,P<0.05为差异有统计学意义。

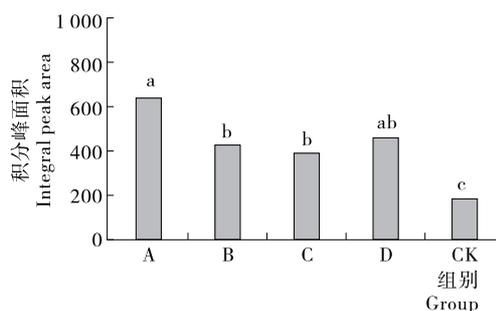
1.5 五味子活性单体化合物的分离

大孔树脂柱和MCI柱分离后经试验确定具有活性成分的主要部分用ODS柱(4 cm×100 cm)分离,得到其中的单体。

2 分析与讨论

2.1 五味子大孔树脂不同洗脱部分助眠作用

五味子大孔树脂不同洗脱部分对小鼠睡眠率和睡眠时间的的影响见表1,大孔树脂不同洗脱部分对小鼠大脑皮层中多巴胺含量的影响见图1。



不同字母表示差异显著(P<0.05)

图1 不同组别小鼠大脑中多巴胺(DA)的积分峰面积
Figure 1 The peak areas of dopamine in different groups of mouse brains

由图1可知,五味子大孔树脂30%乙醇洗脱物的试验组小鼠脑中多巴胺(DA)含量最高,与空白组有显著性差异(P<0.05),95%乙醇洗脱物的试验组小鼠脑中多巴胺(DA)的含量与空白组也具有显著性差异(P<0.05)。五味子大孔树脂30%乙醇洗脱物和95%乙醇洗脱物的试验组小鼠脑中多巴胺(DA)含量均高于大孔树脂50%乙醇洗脱物和70%乙醇洗脱物的。

由表1可知,五味子大孔树脂30%乙醇洗脱物的试验组小鼠睡眠时间和睡眠率均为最佳;95%乙醇洗脱物的试验组小鼠睡眠率和50%乙醇洗脱物的相同,但睡眠时间差异显著(P<0.05);95%乙醇洗脱物的试验组小鼠睡眠率高于70%乙醇洗脱物的,但睡眠时间无显著性差异(P>0.05)。

综合表1和图1可知,五味子大孔树脂30%乙醇洗脱物和95%乙醇洗脱物均有较好的助眠作用,30%乙醇洗脱物的助眠效果要稍好于95%乙醇洗脱物的。

2.2 MCI不同分离部分的助眠作用

MCI不同分离部分对小鼠睡眠率和睡眠时间的的影响见表2。

表 1 不同洗脱部分对小鼠睡眠率和时间的影响[†]

Table 1 Effect of different elution parts on the sleep rate and time of mice

组别	小鼠只数/只	给药剂量/(g · kg ⁻¹ · BW)	30 min 后睡眠数量/只	睡眠率/%	睡眠时间/min
CK	10	等量生理盐水	3	30	158.8±6.36
A	10	1	8	80	326.0±15.56*
B	10	1	6	60	189.5±4.95
C	10	1	4	40	228.7±25.10*
D	10	1	6	60	223.0±11.31*

† * 表示与空白对照组比较差异显著, P<0.05。

表 2 MCI 不同分离部分对小鼠睡眠率和睡眠时间的影响[†]

Table 2 Effect of different MCI resin separation section on the sleep rate and time of mice

组别	小鼠只数/只	给药剂量/(g · kg ⁻¹ · BW)	30 min 后睡眠数量/只	睡眠率/%	睡眠时间/min
A1	10	1	9	90	412.8±10.89*
A2	10	1	6	60	249.3±10.47
A3	10	1	7	70	302.0±14.78*
CK	10	等量生理盐水	3	30	158.8±6.36

† * 表示与空白对照组比较差异显著, P<0.05。

由表 2 可得出,五味子 MCI 水洗脱物组小鼠的睡眠率最高为 90%,同时睡眠时间最长,与其他 2 组和空白组均有显著性差异(P<0.05)。由此可知,五味子大孔树脂 30%乙醇洗脱物中具有助眠作用的功效成分,且主要集中在 MCI 水洗脱物中。

2.3 单体化合物的分离与鉴定

从五味子 MCI 水洗脱物中分离得到 I 和 II 2 个化合物,从五味子大孔树脂 95%乙醇洗脱物中分离得到一个化合物 III。

物 III。

化合物 I、II 均为黄色油状,易溶于水;结合其理化性质和¹³C-NMR 解析,化合物 I 为 α-氨基-β-羟基异丁酸,化合物 II 为 β-乙氧氨基丙酸。化合物 III 为白色无定形粉末,易溶于甲醇、乙醇等溶剂;结合其理化性质和¹³C-NMR 解析,参照文献[11]中的报道,化合物 III 为戈米辛 N。化合物 I、II 和 III 的核磁数据见表 3,化合物 III 的核磁数据见表 4。化合物 I、II 和 III 的¹³C-NMR 见图 2,结构图见图 3。

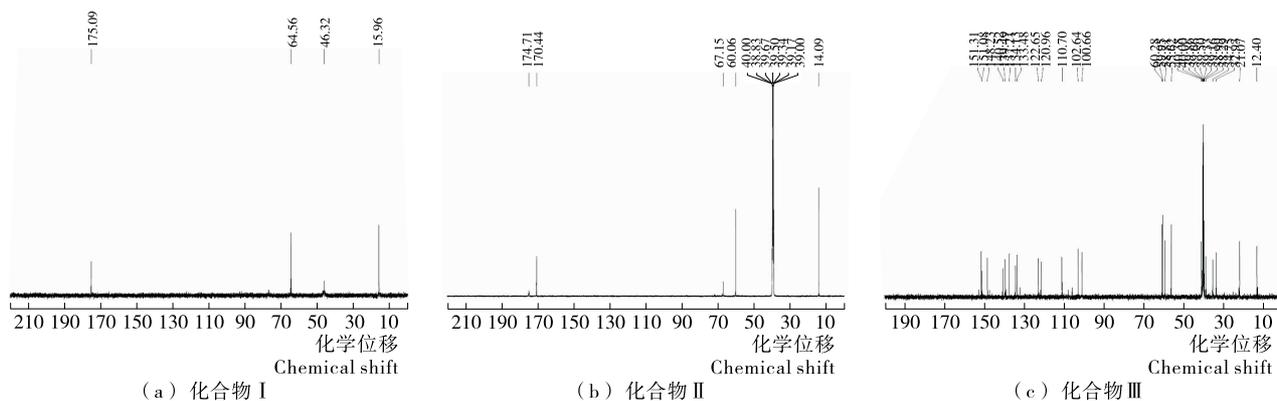


图 2 化合物 I、II 和 III 的¹³C-NMR

Figure 2 ¹³C-NMR spectrum of I, II and III

表 3 化合物 I、II 的核磁数据

Table 3 ¹³C-NMR data of compound I and II

碳位	δ	
	I	II
C-1	175.09	170.44
C-2	46.32	60.06
C-3	64.55	67.15
C-4	15.96	39.34
C-5		14.09

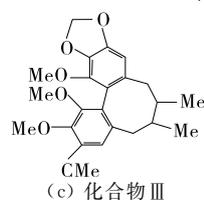
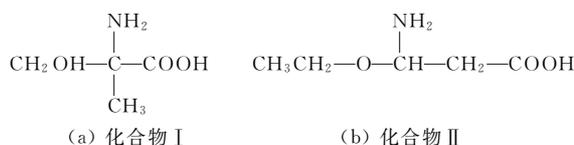


图 3 化合物 I、II 和 III 的结构

Figure 3 Structure of compound I, II and III

表4 化合物Ⅲ的核磁数据

Table 4 ¹³C-NMR date of compound Ⅲ

碳位	δ	碳位	δ
C-1	151.08	C-13	134.13
C-2	139.49	C-14	140.52
C-3	151.31	C-15	120.96
C-4	110.70	C-16	122.65
C-5	137.21	C-17	12.40
C-6	34.75	C-18	21.07
C-7	39.50	(OCH ₃)C-1	59.95
C-8	32.93	(OCH ₃)C-2	60.28
C-9	38.29	(OCH ₃)C-3	55.62
C-10	133.48	(OCH ₃)C-14	58.81
C-11	102.64	OCH ₂ O	100.66
C-12	148.23		

3 结论

本试验研究结果表明,五味子中除了木质素类、萜类等较为复杂的有机物具有较好的活性外,氨基酸和有机酸等较为简单的化合物同样具有较好的活性,这为五味子功能性成分的开发进一步提供了依据,开拓了五味子功能性成分开发的视野。试验还发现,α-氨基-β-羟基丁酸和β-乙氧基氨基丙酸具有助眠效果,但具体是哪一种氨基酸单独作用或者是哪几种氨基酸的协同作用还需要通过细胞试验与动物试验进一步验证。

(上接第92页)

幅减缓,此时螺旋切割器内压降是水平圆直管的225倍左右。本研究探究了螺旋切割器内气液两相流动特性,着重分析了雷诺数对压降的影响规律,但是未得出螺旋切割器内压力降的预测公式,这会在进一步的工作中体现。

参考文献

[1] 孟建军. 静态混合器在啤酒及其他液体食品工业中的应用[J]. 中外酒业·啤酒科技, 2012(3): 43-47.

[2] 刘涛. SK型静态混合器与喷射混合器的CFD模拟研究[D]. 青岛: 青岛科技大学, 2009: 3-4.

[3] 王修钢, 郭瓦力, 吴剑华. 静态混合器中液液分散的实验及CFD模拟[J]. 化工学报, 2012(63): 767-768.

[4] 孟辉波, 禹言芳, 王丰, 等. 水平与竖直布置方式下静态混合器内瞬态压力波动混沌特征[J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2013(40): 93-93.

[5] 邓超, 杨丽, 陈海军, 等. 微纳米气泡发生装置及其应用的研究进展[J]. 石油化工, 2014(43): 1 206-1 207.

[6] 刘季霖. 微纳米气泡发生装置研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012: 4-6.

[7] 李恒震. 微纳米气泡特性及其在地下水修复中的应用[D]. 北京: 清华大学, 2014: 10-13.

[8] 居迎军, 刘晓光, 高永亮, 等. 多相管流摩阻计算方法综述[J]. 中国石油和化工, 2008(10): 55-58.

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 66-67.

[2] 孙昌波, 王森, 丁向阳, 等. 五味子在食品工业中的应用及其开发前景[J]. 食品与机械, 2003(6): 9-10.

[3] 胥春霞, 刘嫚, 陈东林, 等. 北五味子化学成分的研究[J]. 中成药, 2017, 39(3): 547-550.

[4] 高春花, 钟海雁, 孙昌波. 五味子木脂素提取分离纯化和含量测定的研究进展[J]. 食品与机械, 2007, 23(1): 151-155.

[5] 孟宪军, 滕娜, 商红军, 等. 五味子乙素-阿霉素脂质体的抗肿瘤作用研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(2): 29-31.

[6] 孟宪军, 李元魁, 李斌, 等. 超声波辅助提取北五味子藤茎总三萜的工艺研究[J]. 食品与机械, 2010, 26(4): 105-108.

[7] 张守勤, 刘长姣, 王长征, 等. 五味子有效成分提取分离方法的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(10): 2 581-2 583.

[8] 李洪洋, 文连奎. 大孔树脂分离纯化五味子醇甲的研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(3): 56-58.

[9] 赵洪庆, 韩远山, 柳卓, 等. 焦虑性抑郁模型大鼠脑区单胺递质含量与神经因子表达的变化[J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(4): 373-379.

[10] WU Dong, XIE He, LU Hai-feng, et al. Sensitive determination of norepinephrine, epinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine by coupling HPLC with [Ag(HIO₆)₂]₅: luminol chemiluminescence detection[J]. Biomedical Chromatography Bmc, 2016, 30(9): 1 458-1 466.

[11] 程振玉, 杨英杰. 北五味子化学成分系统研究[J]. 吉林化工学院学报, 2013, 30(5): 36-39.

[9] MUDDE R F, PIJPEN C, BEUGELS R. Simulation of the laminar flow in a primix static mixer[C]//ASME 2002 Pressure Vessels and Piping Conference. New York: [s.n.], 2002, 448(2): 67-73.

[10] ETCHELLS A W, MEYER C F. Handbook of industrial mixing: Science and practice[M]. Hoboken: John Wiley Sons Inc, 2004: 426-431.

[11] 翟俊霞, 陈嘉南, 涂善东. 含静态混合元件管内流体速度测量与实验系统[J]. 石油机械, 2003, 31(12): 1-3.

[12] REGNER M, ÖSTERGREN K, TRÄGÅRDH C. Effects of geometry and flow rate on secondary flow and the mixing process in static mixers: A numerical study[J]. Chemical Engineering Science, 2006, 61(18): 6 133-6 141.

[13] REGNER M, ÖSTERGREN K, TRÄGÅRDH C. Influence of viscosity ratio on the mixing process in a static mixer: Numerical study[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2008, 47(9): 3 030-3 036.

[14] 刘德新. 精馏塔板气液两相流体力学和传质 CFD 模拟与新塔板的开发[D]. 天津: 天津大学, 2008: 23-28.

[15] 张春梅, 孔祥玲, 王宗勇, 等. SMV 静态混合器内气液两相流压降的研究[J]. 当代化工, 2011, 40(5): 490-493.

[16] 杨春玲. 新型离心螺旋曝气设备气液两相流数值模拟及实验研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2011: 27-29.

[17] 孙西欢, 阎庆斌, 武鹏林, 等. 圆管螺旋流起旋器结构参数与阻力研究[J]. 流体机械, 2000, 28(10): 7-9.