

五味子苦味物质组成及其生物活性研究

李丽,肖永庆*,刘颖,顾雪竹,于定荣,李文,殷小杰,朱明贵
(中国中医科学院中药研究所,北京 100700)

[摘要] 目的:分析五味子苦味物质组成及其生物活性。方法:采用有机溶剂提取,柱色谱分离的方法制备五味子苦味物质,以 HPLC 对其进行定性定量分析并观察苦味物质的生物活性。结果:苦味物质主要含有木脂素类成分,五味子醇甲等 6 种木脂素总量约为 42.5%。苦味物质高剂量组能对小鼠自主活动有明显抑制作用($P<0.05$);高、低剂量组均能显著延长戊巴比妥钠小鼠的睡眠时间($P<0.001$);苦味物质对小鼠负重游泳时间无明显影响,但可以延长其耐常压缺氧时间($P<0.05$);苦味物质高、低剂量组均能降低高脂大鼠的总胆固醇(TC)含量($P<0.01$),升高低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)的含量,且高剂量组作用强于低剂量组。结论:五味子苦味物质是其镇静、催眠、抗缺氧及降血脂作用的物质基础。

[关键词] 五味子;苦味物质;镇静;催眠;抗缺氧;降血脂

[中图分类号] R284.1,285 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)05-0110-04

[doi] 10.11653/syfy2014050110

Composition and Biological Activity of Bitter Substance
of *Schisandra chinensis*

LI Li, XIAO Yong-qing*, LIU Ying, GU Xue-zhu, YU Ding-rong, LI Wen, YIN Xiao-jie, ZHU Ming-gui
(Institute of Chinese Mateia Madica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** Reveal the composition of bitter substance and its biological activity of *Schisandra chinensis*. **Method:** Using organic solvent extraction and silica gel separation to prepare bitter substances from *Schisandra chinensis*, HPLC were applied for qualitative and quantitative analysis. Meanwhile, observed the biological activity of bitter substance. **Result:** The bitterness substances mainly contains lignans, the total amount of six lignans were approximately 42.5%. The bitterness substances in high dose group had significant inhibitory effect on the spontaneous activity of mice ($P<0.05$) and also could significantly prolong the sleeping time of mice with pentobarbital sodium ($P<0.001$); and there has no obvious effect on the swimming time of mice, but can prolong the normobaric hypoxia tolerance time ($P<0.05$); high and low groups bitter substance can reduce total cholesterol in hyperlipidemic rats (TC) ($P<0.01$), elevated low density lipoprotein (LDL) and high density lipoprotein (HDL) content, and high dose group was stronger than the low dose group. **Conclusion:** Bitter substance of *S. chinensis* is the Pharmacodynamic substance with sedative, hypnotic, antihypoxia and hypolipidemic effect.

[Key words] *Schisandrae chinensis*; bitter substance; sedation; hypnosis; anti-hypoxia; reducing blood lipid

五味子始载于《神农本草经》,列为上品,是药食两用的常用中药之一。《唐本草》谓之“皮肉甘酸,核中辛苦,都有咸味”,故而得名五味子^[1]。根据《唐本草》中关于“苦味”的叙述以及课题组对五味子的化学成分研究,本文以五味子种子为原料,分离制备苦味物质,并根据五味子的功能主治及苦味

[收稿日期] 20130731(011)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30973874);中医药行业专项(201007012-1)

[第一作者] 李丽,博士,副研究员,从事中药炮制及质量评价标准研究,Tel: 010-84040221,E-mail: lili7755@163.com

[通讯作者] *肖永庆,博士,首席研究员,从事中药化学、中药炮制及质量标准研究,Tel: 010-64014919,E-mail: x.heqi@163.com

药物能燥、能泄的功效特点,对五味子苦味物质进行生物活性研究,为揭示五味子苦味物质组成及其与五味子药性及功效的相关性提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 Waters 高效液相色谱仪(Waters 2695 Separations Module, Waters 2996 PAD 检测器, Empower 2 数据处理软件), KQ-500DB 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司), YLS-1A 型多功能小鼠自主活动记录仪(山东省医科院设备站), GF-D800 型半自动生化分析仪(山东高密彩虹分析仪器有限公司)。

1.2 试剂与试药 乙腈为色谱纯,水为纯净水,使用前均经 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜滤过;其他试剂均为分析纯。戊巴比妥钠(批号 020402),购自北京化学试剂公司;总胆固醇测定试剂盒(TC,批号 20111103);甘油三酯测定试剂盒(TG,批号 20111103);高密度脂蛋白胆固醇测定试剂盒(HDL,批号 20111103);低密度脂蛋白胆固醇测定试剂盒(LDL,批号 20111103)。

五味子甲素(批号 110764-200609)、五味子乙素(110765-200710)、五味子醇甲(110857-200709)、五味子酯甲(批号 111529-200503)购自中国生物制品检定研究院,五味子丙素为课题组自五味子中分离鉴定,含量达到 98% 以上,可供含量测定用。

五味子药材购自辽宁省丹东市大梨树村五味子种植基地,经中国中医科学院中药研究所胡士林研究员鉴定为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz) Baill. 的干燥成熟果实。

高脂饲料(胆固醇 1%、猪胆盐 0.2%、猪油 10%、蛋黄粉 10%、0.2% 甲基硫氧嘧啶),基础饲料 88.6%,由维通利华饲料厂加工。

1.3 动物 昆明种小鼠,雄性,体重 $18\sim 22\ \text{g}$,许可证号 SCXK(京)2006-0008(0167112),北京大学医学部实验动物科学部提供。SD 大鼠,雄性,许可证号 SIXR(京)2009-001(0241505),由中国食品药品检定研究院实验动物资源中心提供。

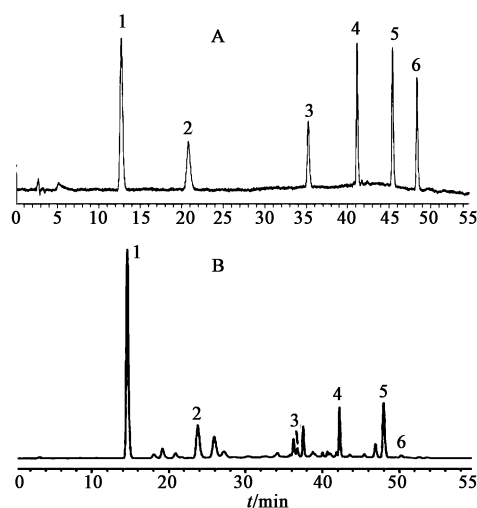
2 五味子苦味物质的制备与分析

2.1 五味子苦味物质的制备 五味子药材 $20\ \text{kg}$,以水浸泡分离果皮与种子,种子粉碎后以水蒸气蒸馏法提取挥发油,药渣再以乙醇提取,经硅胶柱色谱分离,得苦味物质 $241\ \text{g}$ 。

2.2 五味子苦味物质主要成分的含量测定

2.2.1 色谱条件^[2] Agilent XDB C_{18} ($4.6\ \text{mm}\times 250\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$), Phenomenex 保护柱(柱芯 $3\ \text{mm}\times 4$

mm)。甲醇(A)-0.5% 冰醋酸(B)梯度洗脱, $0\sim 25\ \text{min}$, 62% A; $25\sim 37\ \text{min}$, 62% ~ 80% A; $37\sim 50\ \text{min}$, 80% ~ 90% A。流速 $0.9\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长 $254\ \text{nm}$, 柱温 $35\ ^\circ\text{C}$ 。在此条件下五味子苦味物质中 6 种木脂素类成分与其他组分均能达到基线分离。结果见图 1。



A. 对照品; B. 苦味物质; 1. 五味子醇甲; 2. 五味子醇乙; 3. 五味子酯甲; 4. 五味子甲素; 5. 五味子乙素; 6. 五味子丙素

图 1 五味子对照品和供试品 HPLC

2.2.2 供试品溶液制备 取五味子苦味物质 $10\ \text{mg}$, 精密称定, 加甲醇溶解定容至 $25\ \text{mL}$, 过微孔滤膜($0.45\ \mu\text{m}$), 作为供试品溶液。

2.2.3 结果 五味子苦味物质中木脂素类成分总量达 42.50%, 其中五味子醇甲的含量最高, 为 20.38%, 五味子丙素的含量最低, 为 0.21%。结果见图 2。

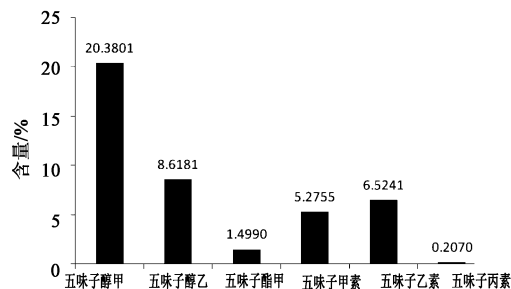


图 2 “苦味”物质中木脂素类成分的含量测定

3 五味子苦味物质的生物活性

3.1 苦味物质供试品溶液的制备 取苦味物质适量, 加 0.2% 吐温-80 研磨均匀, 缓慢加入蒸馏水配置成含药 $0.5\ \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.125\ \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。

3.2 对小鼠自主活动的影响 小鼠按体重随机分组, 设高剂量组 $10\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、低剂量组 $5\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、空白对照组和吐温溶剂对照组, 每组 10 动物。先预防性

给药 2 次,每天 1 次。第 3 天药后 30 min,将小鼠放入活动仪的观察盒中,适应 5 min 后测定各组小鼠 5 min 内的活动次数,以活动次数的多少来判断药物镇静作用的强弱。结果见表 1。

表 1 五味子苦味物质对小鼠自主活动的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)		
组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	5 min 活动数/次
空白对照	—	79.4 $\pm$ 30.1
溶剂对照	—	86.2 $\pm$ 22.3
五味子苦味物质	10	49.2 $\pm$ 27.4 ¹⁾
	5	78.0 $\pm$ 25.2

注:与溶剂对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

结果显示,苦味物质高剂量组对小鼠自主活动有明显的抑制作用,与溶剂对照组比较($P < 0.05$)。

3.3 对戊巴比妥钠小鼠睡眠时间的影响 按体重选取 18 ~ 22 g 的雄性小鼠,随机分空白组、溶剂对照组苦味物质高、低剂量组($10, 5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组小鼠 10 只。灌胃给药后 40 min,腹腔注射 $38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 戊巴比妥钠 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,以翻正反射消失为入睡时间,从翻正反射消失至恢复时间为睡眠持续时间。与空白对照组和溶剂对照组比较,用组间 t 检验检测其差异显著性。结果见表 2。

表 2 五味子苦味物质对小鼠睡眠阈值、睡眠时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)			
组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	睡眠阈值/ min	睡眠时间/ min
空白对照	—	4.56 $\pm$ 0.93	41.90 $\pm$ 19.75
溶剂对照	—	4.49 $\pm$ 1.37	23.99 $\pm$ 12.67
五味子苦味物质	10	4.15 $\pm$ 1.46	95.17 $\pm$ 35.74 ¹⁾
	5	4.59 $\pm$ 1.36	59.58 $\pm$ 41.82 ¹⁾

注:与溶剂对照组比较¹⁾ $P < 0.001$ 。

结果显示,苦味物质对小鼠睡眠阈值无明显影响;其高、低剂量组均能显著延长小鼠的睡眠时间,

表明苦味物质有较强的协同戊巴比妥钠的作用。

3.4 对小鼠负重游泳及耐常压缺氧作用的影响 按体重选取 18 ~ 20 g 的雄性小鼠,随机分为空白组、溶剂对照组苦味物质高低剂量组($10, 5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组小鼠 10 只。灌胃给药后 30 min 将小鼠放入盛有 15 g 钠石灰的广口瓶内(每瓶只放 1 只小鼠),用凡士林涂抹瓶口盖严,使之不漏气,即刻计时。以呼吸停止为指标,观察小鼠因缺氧而死亡的时间。与对照组比较进行统计学处理。结果见表 3。

表 3 苦味物质对小鼠负重游泳时间和耐常压缺氧的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)			
组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	小鼠游泳时间/ s	耐缺氧时间/ min
空白对照	—	3.76 $\pm$ 2.08	13.55 $\pm$ 2.67
溶剂对照	—	5.93 $\pm$ 1.72 ¹⁾	12.94 $\pm$ 1.92
五味子苦味物质	10	4.07 $\pm$ 1.49	16.14 $\pm$ 2.79 ²⁾
	5	6.0 $\pm$ 3.86	15.14 $\pm$ 1.57 ²⁾

注:与空白对照比较¹⁾ $P < 0.05$,与溶剂对照组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

结果显示,五味子苦味物质对小鼠负重游泳时间无明显影响;高、低剂量组均能延长小鼠耐缺氧时间。

3.5 对大鼠高脂血症的影响 雄性 SD 大鼠 150 只,随机分成空白对照组、溶剂对照组;模型组和给药组。空白对照组用普通饲料喂养 15 d,第 16 天开始每天灌胃蒸馏水一次 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续两周。模型组用高脂饲料喂养 15 天,第 16 天开始每天灌胃蒸馏水一次 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续两周。苦味物质分高剂量($7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、低剂量组($3.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)高脂饲料喂养 15 天,第 16 天开始每天灌胃药物 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续两周。实验结束时,禁食不禁水 8 ~ 12 h,眼眶取血离心分离血清按试剂盒说明测定总胆固醇(TC);甘油三酯(TG);高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C);低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。结果见表 4。

表 4 苦味物质对高脂血症模型大鼠血脂的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)						$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TC	TG	HDL	LDL	
空白对照组	—	77.93 $\pm$ 9.10	61.99 $\pm$ 19.89	50.50 $\pm$ 8.36	0.91 $\pm$ 6.43	
溶剂对照组	—	79.24 $\pm$ 11.55	59.34 $\pm$ 25.91	52.29 $\pm$ 8.52	-6.41 $\pm$ 5.42	
模型组	—	382.51 $\pm$ 102.33 ¹⁾	30.88 $\pm$ 9.15 ¹⁾	50.17 $\pm$ 5.20	270.33 $\pm$ 104.37 ¹⁾	
五味子苦味物质	10	238.69 $\pm$ 57.12 ³⁾	22.66 $\pm$ 1.28	67.26 $\pm$ 10.93 ²⁾	97.08 $\pm$ 63.90 ³⁾	
	5	271.99 $\pm$ 77.33 ²⁾	22.78 $\pm$ 2.26	59.55 $\pm$ 12.44 ²⁾	167.92 $\pm$ 105.43	

注:与溶剂对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与空白对照比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

五味子苦味物质高剂量组可显著降低 TC 含量、升高 LDL 含量,与空白对照组相比 $P < 0.01$,此外还能升高 HDL 含量($P < 0.05$);低剂量组可降低 TC 含量,升高 HDL 的含量,但程度不及高剂量组。

4 讨论

本文以有机溶剂提取,硅胶柱色谱分离制备了苦味物质,经 HPLC 分析确定五味子苦味物质以木脂素类成分为主,五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素、五味子酯甲、五味子丙素等 6 种成分总量约为 42.5%。这与文献[3]关于五味子中木脂素类成分主要存在于种子的报道相符。

中药的性味是构成药物性能的基本要素,也是阐明药物特点和指导临床遣方用药的基本依据。五味,即辛、甘、酸、苦、咸 5 种味道,是中药的真实滋味与功效相结合的归纳^[4]。传统中医药理论认为苦味药具有泄火、燥湿等作用,多用于治疗湿热证、痈肿疮疡等。现代研究认为其多来源与生物碱、苷类和苦味质,但也只是粗略的划分,不排除成分的交叉和特殊成分的作用^[5]。而作为五味子苦味物质主要成分的木脂素是否具有与传统理论叙述的苦味药物功效相一致的药理作用呢?结合五味子的功能主治,本文观察了苦味物质对小鼠自主活动、睡眠时间、负重游泳时间、常压耐缺氧以及高血脂症大鼠血脂的影响,结果显示五味子苦味物质具有镇静、催眠、抗缺氧及调节血脂等作用。说明五味子苦味物质与广义上的苦味药物功效有一定差异,五味子本身就是“五味俱全”的一味特殊中药,因此其药理作用不仅体现了木脂素类成分的多种生物活性,而且也反映出多种木脂素之间及其与其他成分的相互作用。

有关五味子木脂素类成分的研究始于 20 世纪 70 年代,通过大量深入的研究,先后研发了治疗慢

性肝炎的新药联苯双酯(DDB)和双环醇(bicyclol)^[6-10],但都是基于单体成分经结构修饰或经化学合成的药物。从本文的研究结果可知,苦味物质更符合中医药传统理论的用药原则,进一步深入研究有望开发出物质组成清楚疗效确切的中药新药。

[参考文献]

- [1] 张贵君. 中药鉴定学[M]. 北京:科学出版社, 2002:298.
- [2] 黄文倩,李丽,肖永庆,等. HPLC 法同时测定五味子中 6 种木脂素类成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10):101.
- [3] 赵玥,王冰,孟雪君. 五味子不同部位 5 种木脂素成分的含量测定[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(11):222.
- [4] 左文,陆兔林,毛春芹. 中药的四气五味[J]. 中国药房, 2010, 21(7):653.
- [5] 张维玲. 浅谈中药五味-化学成分-药物功能三者之间的关系[J]. 河北医学, 1998, 11(4):91.
- [6] 余凌虹,刘耕陶. 五味子联苯环辛烯类木脂素成分的结构与药理活性关系和药物创新[J]. 化学进展, 2009, 21(1):66.
- [7] 刘耕陶. 双环醇的抗病毒与肝细胞保护作用及其作用机制[J]. 中国新药杂志, 2001, 10(5):325.
- [8] 刘耕陶,张纯贞,李燕. 抗肝炎新药双环醇的研究[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(7):1.
- [9] 孙华,刘耕陶. 联苯双酯抗人高转移肝癌细胞株 MHCC97-H 侵袭转移的作用及其机制研究[J]. 癌症, 2006, 25(12):1464.
- [10] 孙华,魏怀玲,刘耕陶. 联苯双酯对肝癌发生的化学预防作用观察[J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(12):1433.

[责任编辑 顾雪竹]