

文章编号: 1004-4353(2014)04-0328-04

五味子籽压榨油中3种木脂素含量的测定及 对酒精肝损伤的保护作用研究

宋影影¹, 冯婷婷², 李洪发³, 朴明贯^{1*}

(1. 延边大学药学院, 吉林 延吉 133002; 2. 大庆市妇女儿童医院药剂科, 大庆 163000;

3. 敦化市广晟油脂生物科技有限责任公司, 吉林 敦化 133700)

摘要: 采用高效液相色谱法测定五味子籽压榨油中的五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素, 结果显示其含量分别为 2.518%、0.577% 和 2.736%。五味子籽压榨油对小鼠的半数致死量(LD₅₀)为 10.8 g/kg, 30 d 小鼠喂养试验的血液生化指标均在正常范围内, 表明五味子籽压榨油的毒性较低。通过建立小鼠酒精性肝损伤模型, 并分别给予小鼠不同量的五味子籽压榨油以研究其对小鼠酒精肝损伤的保护作用, 结果表明高剂量组与模型组呈显著性差异, 证明五味子籽压榨油具有一定的肝保护作用。

关键词: 五味子籽油; 木脂素; 半数致死量; 酒精肝; 肝损伤

中图分类号: R285

文献标识码: A

Determination three kinds of lignans content and research on alcohol liver injury protection of pressure oil of *Schisandrae chinensis* seed

SONG Yingying¹, FENG Tingting², LI Hongfa³, PIAO Mingguan^{1*}

(1. College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, China;

2. Pharmacy Department of Daqing Women and Children's Hospital, Daqing 163000, China;

3. Dunhua Guangsheng Biotechnology Oil Co. Ltd., Dunhua 133700, China)

Abstract: Using HPLC method for determination Schizandrol A, Schisandrin A and Schisandrin B in the pressure oil of *Schisandra chinensis* seed, the results showed that the content were 2.518%, 0.577% and 2.736%, respectively. The LD₅₀ was 10.8 g/kg, and the 30 days feeding test showed that the biochemical indexes of blood all were within normal range in mice, that results showed that the pressure oil of *Schisandra chinensis* seed had low toxicity. To establishing the mouse model of alcoholic liver injury evaluated the protective effect of liver injury with given different doses of pressure oil of *Schisandra chinensis* seed. The alcoholic liver injury model experiment results showed that the high dose group compared with model group had significant difference, that demonstrate the pressure oil of *Schisandra chinensis* seed had particular effects on liver protection.

Key words: *Schisandra chinensis* seed oil; lignan; LD₅₀; alcoholic liver; liver injury

五味子籽压榨油为木兰科五味子(*Schisandra chinensis*)的干燥成熟的籽经过压榨工艺生产而成的黄色透明油状液体, 气清香, 味苦。五味

子果实中主要含有木脂素类化合物、多糖、挥发油和有机酸等多种化学成分^[1], 其中木脂素类化合物有五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素、丙素

等,具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心的功效^[2-4].对五味子的研究已有大量的报道,如王慧竹等^[5]研究了五味子果实、藤茎及藤皮的木质素含量,栗爽等^[6]利用 HPLC 法测定了不同产地五味子种子中 3 种木脂素类含量.目前,对五味子籽压榨油的研究尚未见报道,因此本文对五味子籽压榨油进行研究,测定其五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素的含量及其对酒精肝损伤的保护作用,以此为提高五味子的整体利用率提供依据.

1 实验仪器与试剂

仪器有:LC-10A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);HW-2250 轮转切片机(深圳市汇沃科技有限公司);BX51FL-OLYMPUS 电子显微镜(日本奥林巴斯株式会社);涡旋混合器(美国 Scientific Industries);TD5KR 冷冻离心机(长沙东旺实验仪器有限公司).

试剂有:五味子籽压榨油(敦化市广晟油脂生物科技有限责任公司);五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素标准品(>98%)(上海晶纯实业有限公司,批号分别为 46596、46597、46663);四氧嘧啶(上海晶纯实业有限公司,批号为 44591);谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、血糖(GLu)、血清白蛋白(ALb)、总蛋白(TP)、总胆固醇(TCH)和甘油三酯(TG)试剂盒(南京建成生物工程研究所).

2 木脂素含量的测定

2.1 色谱条件

色谱柱为反相 C₁₈ 柱(5 μm, 4.6 mm×250 mm),检测波长为 254 nm,流动相为甲醇/水(体积比为 77:23),流速为 1 mL/min,柱温为 35 ℃,进样量为 20 μL.

2.2 标准品溶液的配制

精密称取五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素标准品各 10 mg,分别置于 25 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,得质量浓度为 0.4 mg/mL 的标准品储备液.各取上述溶液 0.75、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL,置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,即配制成系列浓度的混合标准品溶液.

2.3 供试品溶液的配制

精密吸取 90 μL 的五味子籽压榨油置于 25 mL 容量瓶中,加入 2 mL 乙酸乙酯溶解,再用甲醇稀释至刻度,即得五味子籽压榨油供试品溶液.取 50 mg 干燥的五味子果实的 80% 乙醇提取物置于 25 mL 容量瓶中,加入 10 mL 甲醇,超声处理 30 min 后加入甲醇稀释至刻度,即得五味子果实供试品溶液.

2.4 标准曲线的绘制

分别取不同浓度的混合标准品溶液 20 μL,在选定色谱条件下进样测定,混合标准品溶液的色谱图如图 1 所示.测定结果显示,3 种木脂素的分离度较好,峰型尖锐,以峰面积为纵坐标、样品浓度(μg/mL)为横坐标进行线性回归,3 种组分在 30~120 μg/mL 范围内均呈良好的线性关系,其中:五味子醇甲的线性回归方程为 $y = 3482x + 2485$, $R^2 = 0.9997$;五味子甲素的线性回归方程为 $y = 4060x + 4705$, $R^2 = 0.9999$;五味子乙素的线性回归方程为 $y = 2577x + 6572$, $R^2 = 0.9999$.

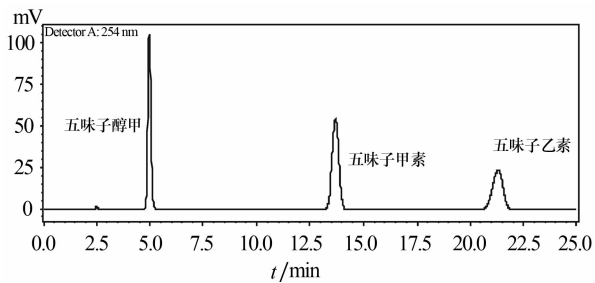


图 1 3 种混合标准品的色谱图

2.5 方法学考察

精密吸取同一浓度标准品混合溶液,重复进样 5 次,分别测定五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素的峰面积以评价精密性;分别测定同一份供试品溶液的五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素的含量,以考察本方法的重现性;以不同时间(0、1、2、4、6、8 h)分别测定供试品样品溶液中的 3 种木脂素的峰面积,以考察供试品溶液在 8 h 内的稳定性;按 2.3 供试品的配制方法配制样品,加入适量五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素混合标准品,测定其峰面积,并计算平均加样回收率及 RSD 值,结果见表 1.由表 1 可知,本文方法具有准确、快速、灵敏度高、重现性好等特点,可用于五

五味子中有效成分的定量分析.

表 1 方法学考察测定结果($n=5$)					%
木脂素	精密度 RSD	重现性 RSD	稳定性 RSD	加样回收率 RSD	平均加样 回收率
五味子醇甲	0.14	1.97	0.20	2.92	99.49
五味子甲素	0.05	2.26	1.18	2.44	100.93
五味子乙素	0.06	1.36	1.96	2.26	102.33

2.6 供试品的含量测定

按 2.3 方法制备供试品溶液,在 2.1 色谱条件下同时测定供试品中的五味子醇甲、五味子甲素及五味子乙素的含量,结果显示其含量分别为 2.518%、0.577%和 2.736%;五味子果实中的五味子醇甲、五味子甲素及五味子乙素的含量分别为 1.217%、0.242%和 0.867%.这说明,五味子籽压榨油中的五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素的含量高于五味子果实,具有很高的商业开发价值.

3 半数致死量的测定

试验小鼠均为昆明种小鼠,体重为(20±2) g,由延边大学动物实验中心提供,饲养条件为 SPF 级.

3.1 预试验

根据《国家急性毒性试验标准》^[7]的霍恩氏法,预试动物在 24 h 内的死亡情况,估计 LD₅₀的可能范围,确定正式试验的剂量组.将 14 只雄性小鼠随机分 7 个剂量组(0.3、1.65、3.0、12、21、30、40 g/kg),灌胃给予不同剂量的五味子籽压榨油.

3.2 正式试验

将 25 只小鼠随机分为 5 组,灌胃给予不同剂量(2.15、4.64、10.0、21.5、46.4 g/kg)的五味子

籽压榨油后观察 7 d,并记录死亡情况.LD₅₀的测定实验结果如图 2 所示,根据霍恩氏法计算得小鼠的 LD₅₀值为 10.8 g/kg,可信限为 0.74~1.57,说明五味子籽压榨油的毒性较低.

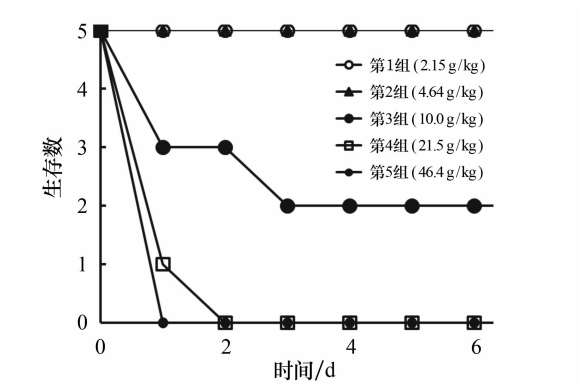


图 2 五味子籽压榨油对小鼠的半数致死量($n=5$)

4 30 d 喂养试验

将 80 只小鼠随机分为 4 组,每组雌雄各半.根据 LD₅₀试验结果分别设为低、中、高 3 个剂量组(0.68、1.69、2.70 g/kg)和 1 个对照组(纯大豆油),连续灌胃 30 d.第 31 天心脏取血,采用试剂盒测定血清中的 ALT、AST、BUN、Cr、GLu、ALb、TP、TCH 和 TG 等血液生化指标,测定结果见表 2.由表 2 可知,ALT、AST、BUN、Cr、GLu、ALb、TP、TCH 各剂量组与对照组相比均无显著性差异($P>0.05$),TG 高剂量组与空白对照组比较呈显著性差异($P<0.05$),这可能与用大豆油稀释给药有关,但大部分血液生化指标的平均值均在正常值范围内,说明五味子籽压榨油的毒性较低.

表 2 血液生化指标结果($\bar{x}\pm SD$, $n=10$)

小鼠性别	组别	ALT/ (U/L)	AST/ (U/L)	BUN/ (mmol/L)	Cr/ (μ mol/L)	GLu/ (mmol/L)	Alb/ (g/L)	TP/ (g/L)	TCH/ (mmol/L)	TG/ (mmol/L)
雄	高剂量组	44.64±4.06	203.91±15.19	5.51±0.55	25.23±3.83	8.16±0.34	35.44±1.69	61.87±3.31	1.77±0.15	1.32±0.17*
	中剂量组	45.68±4.22	202.25±16.45	5.45±0.55	23.54±4.74	8.30±0.30	35.17±1.40	62.31±3.42	1.79±0.14	1.23±0.17
	低剂量组	44.82±4.21	205.78±15.82	5.26±0.59	24.28±4.11	8.26±0.46	35.18±1.14	62.97±3.39	1.78±0.14	1.23±0.14
	对照组	42.77±3.30	203.41±17.80	5.37±0.71	24.74±3.53	8.49±0.39	35.12±1.14	63.46±3.17	1.80±0.14	1.16±0.13
雌	高剂量组	34.95±4.23	195.15±13.84	4.91±0.55	25.11±3.75	8.56±0.45	36.19±1.66	62.68±2.89	2.19±0.15	1.04±0.18*
	中剂量组	35.46±5.49	193.53±15.64	4.73±0.75	24.62±3.50	8.56±0.47	36.97±1.80	62.83±3.25	2.26±0.16	0.99±0.13
	低剂量组	35.93±4.78	198.75±13.82	4.69±0.80	24.93±3.67	8.62±0.43	36.38±1.65	63.06±3.25	2.28±0.17	0.98±0.11
	对照组	34.46±4.12	192.95±14.31	4.72±0.77	23.54±3.33	8.70±0.50	36.38±2.36	63.62±3.41	2.26±0.17	0.84±0.11

注:各剂量组与对照组比较,* $P<0.05$.

5 肝保护实验

根据 LD₅₀ 和 30 d 喂养试验结果将 50 只小鼠随机分为 5 组,分别为低、中、高剂量组(0.12、0.25、0.50 g/kg)和对照组、模型组,对照组和模型组给予等量的纯大豆油.连续灌胃 30 d 后,用浓度为 50%的乙醇溶液造成酒精肝损伤模型^[8].造模成功后取部分肝脏制备成浓度为 10%的组织匀浆液,离心后取上清液检测肝组织中丙二醛、谷胱甘肽和甘油三酯的含量,结果见表 3.由表 3 可知:小鼠肝组织中丙二醛和甘油三酯的含量随着灌胃剂量的增加而明显降低,而且高剂量组与模型组相比均呈显著性差异($P<0.05$);谷胱甘肽含量随着灌胃剂量的增加而明显增高,而且高剂量组与模型组相比呈显著性差异($P<0.05$).这表明,五味子籽压榨油对酒精中毒小鼠肝脏损伤的保护作用与其提高机体抗氧化能力有关.

表 3 肝脏组织中 MDA、GSH、TD 的含量测定结果
($\bar{x}\pm SD$, $n=10$)

组别	MDA/ (nmol/mg)	GSH/ (μ mol/g)	TG/ (mmol/L)
对照组	0.52 \pm 0.20	2.93 \pm 0.70	8.37 \pm 1.54
模型组	0.90 \pm 0.26	1.88 \pm 0.87	14.93 \pm 1.19
低剂量组	0.76 \pm 0.31	2.11 \pm 0.65	12.07 \pm 1.89
中剂量组	0.54 \pm 0.21	2.63 \pm 1.32	10.12 \pm 2.91
高剂量组	0.53 \pm 0.12*	3.25 \pm 0.51*	8.61 \pm 2.03*

注:各剂量组与模型组比较,* $P<0.05$.

从小鼠肝左叶做组织切片,以苏木精-伊红染色法染色,用显微镜(40 \times 10)连续观察整个组织切片的病理学变化.由图 3 可知:对照组小鼠的肝细胞排列紧密,细胞核轮廓清晰;模型组小鼠的肝细胞则多肿胀坏死,细胞核染色有的较淡或没有颜色;低剂量组和中剂量组小鼠的肝细胞部分出现肿胀坏死,细胞轮廓模糊,细胞核染色较淡;高剂量组小鼠的肝细胞肿胀坏死情况低于低、中剂量组,细胞轮廓较为清晰.这表明,随着灌胃剂量的增加,五味子籽压榨油对酒精性肝损伤的保护效果增加.

6 结论

本文采用 HPLC 测得五味子籽压榨油中五

味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素的含量分别为 2.518%、0.577%和 2.736%,这表明压榨方法制备的五味子籽油富含较高的木脂素类化合物.用《国家急性毒性试验标准》中的霍恩氏法测定小鼠的半数致死量(LD₅₀)为 10.8 g/kg,表明五味子籽压榨油的毒性较低;五味子籽压榨油对酒精性肝损伤的实验证明,其对酒精引起的肝损伤具有一定的保护作用.本文结果有利于提高五味子的综合利用率及五味子籽压榨油的功能性保健食品的开发.

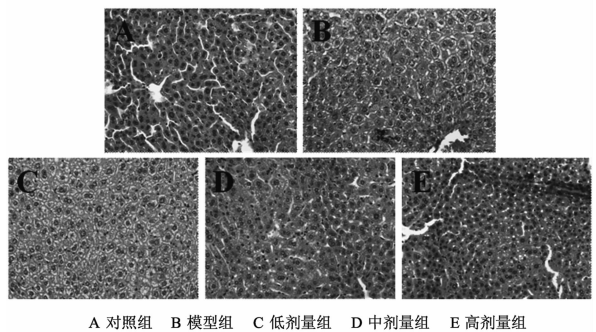


图 3 显微镜下的肝脏组织切片结果

参考文献:

[1] 王佳丽,杨洪涛.五味子主要化学成分的药理研究[J].河南中医,2014,34(2):357-359.

[2] 李晓亮,易进海,刘云华,等.南五味子、五味子 HPLC 指纹图谱研究和木脂素成分测定[J].中成药,2011,33(6):920-924.

[3] 周进东,陆兔林,毛春芹,等. HPLC 测定五味子不同炮制品中 6 种木脂素类成分的含量[J].中国药学杂志,2011,46(17):1353-1356.

[4] 宋九华,杨孝容. HPLC 测定安神补心丸中五味子醇甲、五味子酯甲和五味子甲素的含量[J].中成药,2008,30(3):380-383.

[5] 王慧竹,杨英杰,关铭,等.五味子果实、藤茎及藤皮的木质素成分分析[J].吉林化工学院学报,2011,28(9):32-34.

[6] 栗爽,王冰. HPLC 法测定不同产地五味子种子中 3 种木脂素类含量[J].江西中医药,2009,40(313):58-59.

[7] 中华人民共和国卫生部和中国国家标准化管理委员会. GB 15193.3—2003 国家急性毒性试验标准[S].北京:中国标准出版社,2003.

[8] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[S].北京:中国标准出版社,2003:799.