

应用 Box-Behnken 响应面法开展超高效液相色谱测定五味子中醇甲、醇乙、甲素和乙素的方法研究

王姣姣¹, 李凡^{1*}, Amila Dissanayake², 张沿军², 陆峥飞²

1. 康宝莱蓄硕(湖南)天然产物有限公司, 湖南长沙 410100

2. 康宝莱全球测试中心 HP1 实验室, 美国 加利福尼亚州托伦斯市 90502

DOI:10.61369/SE.2025100033

摘要 : 目的: 本研究旨在以 Box-Behnken 试验设计模型为指导, 建立并优化一种同时测定五味子中五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素和五味子乙素的超高效液相色谱法 (UPLC), 且只建立一种标准曲线, 采用相对保留时间和相对标准峰面积比进行定量分析。方法: 采用 Minitab 中的 Box-Behnken 模型对试验条件进行优化, 以五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素和五味子乙素的提取率为响应值, 确定超声温度、超声时间和乙醇浓度三个因素的最佳提取条件。结果: 通过使用超高效液相色谱法对五味子中四种目标组分进行分析, 得到最佳提取条件为: 超声温度 60°C、超声时间 40min、乙醇浓度 88.4% 或超声温度 60°C、超声时间 20min、乙醇浓度 95%。结论: 建立了一种超高效液相色谱法来同时测定五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素和五味子乙素, 且只用一种标准物质来定量分析四种组分。

关键词 : Box-Behnken; 五味子; 五味子醇甲; 五味子醇乙; 五味子甲素; 五味子乙素; UPLC

The Method for the Determination of Schisandrin, Schisandrol B, Schisandrin A and Gamma-schisandrin in Schisandra Chinensis by Ultra-performance Liquid Chromatography was Studied by Using the Box-Behnken Response Surface Method

Wang Jiaojiao¹, Li Fan^{1*}, Amila Dissanayake², Zhang Yanjun², Lu Zhengfei²

1. Herbalife NatSource (Hunan) Natural Products Co., LTD., Changsha, Hunan 410100

2. Herbalife Global Testing Center HP1 Laboratory, Torrance, CA, USA 90502

Abstract : Objective: This study aimed to establish and optimize an UPLC method for the simultaneous determination of Schisandrin, Schisandrol B, Schisandrin A and Gamma-schisandrin in Schisandra Berry guided by the Box-Behnken design in Minitab. There was only one standard curve used for quantitative analysis with the relative retention time and the relative standard peak area ratio. Method: With the extraction rates of four target components taken as response values, the best extracting conditions for the ultrasonic temperature, ultrasonic time and ethanol concentration was found based on the Box-Behnken. Results: By using ultra-high performance liquid chromatography to analyze four target components in Schisandra chinensis, the optimal extraction conditions were determined as follows: ultrasonic temperature of 60°C, ultrasonic time of 40 minutes, and ethanol concentration of 88.4%; or ultrasonic temperature of 60°C, ultrasonic time of 20 minutes, and ethanol concentration of 95%. Conclusion: An UPLC method was successfully established to simultaneously quantify Schisandrin, Schisandrol B, Schisandrin A and Gamma-schisandrin with one reference standard.

Keywords : Box-Behnken; schisandra chinensis; Schisandrin, Schisandrol B, Schisandrin A and Gamma-schisandrin; UPLC

五味子 (*Schisandra Chinensis*) 是木兰科一种干燥成熟的果实, 作为一种传统道地药材, 主产于黑龙江、吉林和辽宁等省, 因其果实甘、酸、辛、苦、咸五味俱全而得名。五味子在中国有着悠久的药用历史, 自《神农本草经》问世以来, 人们就开始使用五味子, 因为它具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心的功效^[1-2]。五味子中含有木脂素、挥发油、有机酸、多糖等成分, 其中木脂素类主要有五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素和五味子乙素等成分。现代研究表明, 木脂素类是五味子中的主要生物活性物质, 具有保肝、抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、神经保护等药理作用^[3-8]。因此, 快速准确地测定五味子中五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素和五味子乙素的含量非常重要。

目前行业内主要采用 HPLC 法来测定这四种木脂素成分, 分析时间较长。本研究以 Box-Behnken 试验设计模型为指导, 建立并优化了一种同时测定五味子中五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素和五味子乙素的超高效液相色谱法, 快速而高效。

一、材料与方法

(一) 标准品及试剂

五味子醇甲, 中检所; 五味子醇乙, 诗丹德; 五味子甲素, 中检所; 五味子乙素, 中检所; 乙醇, HPLC 级; 超纯水; 磷酸, 试剂级。

(二) 植物原料

五味子购于山东恒达药业有限公司

(三) 实验仪器

Waters ACQUITY UPLC with PDA (L15SDI657G)
可加热超声仪 (IOTE0450), Shanghai Kedao
十万分之一的天平 (XP205DR:B315215353), Mettler Toledo
万分之一的天平 (MS204S:B250612873), Mettler Toledo

(四) 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse Plus C18, 1.8um 2.1*50mm; 检测波长: 210nm; 流动相 A: 纯乙腈; 流动相 B: 0.4% H_3PO_4 ; 梯度洗脱程序见表1; 恒温柱箱温度: 30 °C; 流速: 0.613 mL/min; 进样体积: 1.0 μ L。

表1 UPLC 梯度洗脱程序

时间	流速 (mL/min)	A%	B%
0	0.613	40	60
0.14	0.613	40	60
2.18	0.613	80	20
2.72	0.613	90	10
3.40	0.613	95	5
3.74	0.613	95	5
4.08	0.613	100	0
4.49	0.613	100	0
4.56	0.613	40	60
5.10	0.613	40	60

(五) 分析方法

1. 溶剂制备: 45% 乙醇, 70% 乙醇, 95% 乙醇。

2. 标准品制备

(1) 五味子醇甲标准储备液: 准确称取约 10mg 的五味子醇甲到 100mL 容量瓶中, 加入约 20mL 乙醇, 常温超声 10 分钟后, 用乙醇定容至刻度, 混合均匀。(-20°C 冰箱保存 6 个月)

(2) 五味子醇甲标准工作液: 用溶剂稀释标准储备液, 配得浓度为 0.0005mg/mL, 0.008mg/mL, 0.012mg/mL, 0.020mg/mL, 0.032mg/mL 的标准系列工作液, 标准储备液直接作为第 6 个浓度的标准工作液, 临用现配。

(3) 其他标准溶液: 称取适量的五味子醇乙, 五味子甲素和五味子乙素, 配得浓度约为 0.02mg/mL 的标准溶液。(仅用于方法开发定位目的)

(4) 样品制备: 称大约 100g 五味子原料, 用研磨机研成粉末, 确保 85% 的样品通过 20 目筛, 丢弃未过筛的样品。准确称取五味子粉末约 1g 到 50 mL 螺旋盖试管中, 加入 30 mL 提取液, 然后按试验设计超声提取。如需要, 稀释至标准曲线浓度范围内。

二、结果

(一) Box-Behnken 试验设计参数及各组分提取率见表2 (每个结果为三组平行实验的均值)。

表2 试验设计参数及各组分提取率

组	因素			各组分提取率			
	A (°C)	B (min.)	C (%)	五味子醇 甲 (%)	五味子醇 乙 (%)	五味子甲 素 (%)	五味子 乙素 (%)
1	25	20	70	0.5368%	0.1166%	0.1464%	0.2108%
2	60	20	70	0.5479%	0.1190%	0.1506%	0.2191%
3	25	40	70	0.5287%	0.1147%	0.1445%	0.2074%
4	60	40	70	0.5426%	0.1179%	0.1491%	0.2185%
5	25	30	45	0.5135%	0.1078%	0.1209%	0.1288%
6	60	30	45	0.5189%	0.1102%	0.1298%	0.1566%
7	25	30	95	0.5371%	0.1169%	0.1495%	0.2229%
8	60	30	95	0.5472%	0.1190%	0.1523%	0.2273%
9	43	20	45	0.5148%	0.1087%	0.1250%	0.1409%
10	43	40	45	0.5241%	0.1110%	0.1284%	0.1460%
11	43	20	95	0.5415%	0.1178%	0.1505%	0.2248%
12	43	40	95	0.5475%	0.1190%	0.1520%	0.2276%
13	43	30	70	0.5346%	0.1156%	0.1466%	0.2088%
14	43	30	70	0.5320%	0.1150%	0.1457%	0.2069%
15	43	30	70	0.5310%	0.1149%	0.1459%	0.2091%

说明:

五味子醇乙 VS 五味子醇甲的相对标准峰面积比^{*} 为 0.93

五味子甲素 VS 五味子醇甲的相对标准峰面积比^{*} 为 1.07

五味子乙素 VS 五味子醇甲的相对标准峰面积比^{*} 为 0.95

* 相对标准峰面积比定义: 分析相同浓度 (如 1mg/mL) 的每个标准品的峰面积, 得到每个组分的相对标准峰面积比。

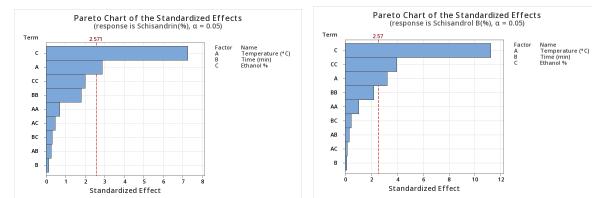
(二) 试验数据回归分析

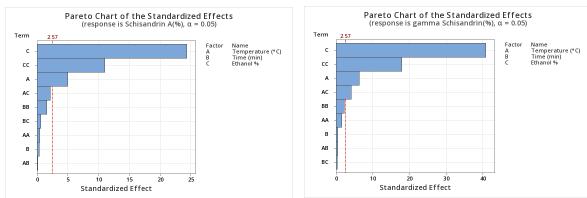
使用 Minitab 对五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素和五味子乙素的提取率进行回归分析。各组分的回归分析和显著性检验结果见表3。本实验的模型显著 ($P < 0.05$), 失拟项 (Lack-of-Fit > 0.05) 不显著, R^2 和调整后的 R^2 都很好, 说明该模型拟合良好, 能够准确反映各变量与响应量之间的关系^[9-12]。

表3 回归分析和显著性结果

组分	R ²	Adjusted R ²	P-Value	Lack-of-Fit
五味子醇甲	93.36%	81.41%	0.018	0.083
五味子醇乙	97.00%	91.60%	0.003	0.078
五味子甲素	99.34%	98.15%	0.000	0.066
五味子乙素	99.76%	99.33%	0.000	0.106

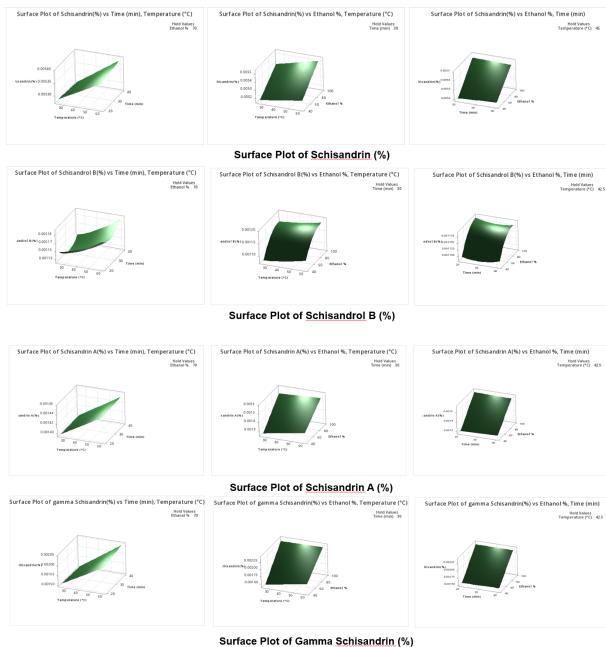
(三) 柏拉图分析显示影响四种组分提取率的主要显著因素是乙醇浓度 (C) 和提取温度 (A)。





(四) Surface Plot 交互作用分析

坡度越陡，影响作用越大。三个因素对四种组分提取率的影响趋势一致：乙醇浓度(C) > 超声提取温度(A) > 超声提取时间(B)^[9]。



三、讨论

本试验结果表明 Box-Behnken 模型对于该试验提取条件的优化是适用的，且乙醇浓度和超声提取温度对五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素和五味子乙素的提取影响更大，超声提取时间则无明显影响。在乙醇含量为 88.4%，温度为 60℃，反应时间为 40 分钟的条件下，提取率最高。在乙醇含量为 95%，温度为 60℃，反应时间为 20 分钟的条件下，与其最高提取率无显著差异。结果说明在 60℃ 条件下，通过较长的提取时间和较低的乙醇含量（40 分钟和 88.4% 乙醇）或较短的提取时间和较高的乙醇含量（20 分钟和 95% 乙醇）可以获得相似的提取率。

本研究成功建立了一种同时测定五味子中五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素和五味子乙素的超高效液相色谱法，简单可靠，分析时间较短，成本较低。

参考文献

- [1] 江怡琳, 杜萍, 毕珊珊. 五味子有效成分的研究 [J]. 科技创新导报, 2013, (34): 20.
- [2] 程振玉, 杨英杰. 五味子木脂素提取工艺研究新进展 [J]. 吉林化工学院学报, 2013, 30(01): 18-23.
- [3] 邢楠楠, 屈怀东, 任伟超, 等. 五味子主要化学成分及现代药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(15): 210-218.
- [4] 刘媛媛, 黄仕其, 李玉泽, 等. 五味子属植物木脂素类化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(06): 1903-1918.
- [5] 白晓蕾, 宋琳, 郑远武, 等. 五味子醇甲药理研究进展 [J]. 实用中医内科杂志, 2021, 35(02): 18-20.
- [6] 王会娟. 五味子总木脂素制备及初步效应评价研究 [D]. 南京中医药大学, 2013.
- [7] 苏振宏, 周小曼, 黄玉迪, 等. 五味子甲素的提取鉴定与功能研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(02): 433-437.
- [8] 商红军. 北五味子乙素提取纯化及生物活性研究 [D]. 沈阳农业大学, 2011.
- [9] 温丽敏, 诸永志, 罗章, 等. 响应面法优化小龙虾烤箱辅助烤制工艺 [J]. 肉类研究, 2023, 37(5): 39-48.
- [10] 李莉, 张赛, 何强, 等. 响应面法在试验设计与优化中的应用 [J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(08): 41-45.
- [11] 周燕霞, 雷英, 乐志艳. Box-Behnken 响应面法优化枫香树叶总酚酸提取工艺 [J]. 山东化工, 2023, 52(17): 45-47+53.
- [12] 马永全, 黄雪莲, 于新. 响应面法优化五味子提取工艺研究 [J]. 广东农业科学, 2010, 37(09): 151-153.