

五味子的 UPLC 指纹图谱研究

刘 芷¹, 贾 英¹, 赵 旭¹, 张晨宁¹, 吴 博¹, 毕开顺^{2*}

1. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳市中药药效物质基础筛选与评价重点实验室, 辽宁 沈阳 110016

2. 沈阳药科大学药学院, 中药质量控制关键技术国家地方联合工程实验室, 辽宁 沈阳 110016

摘 要: 目的 建立五味子 *Schisandra chinensis* 的超高效液相色谱 (UPLC) 指纹图谱。方法 采用 Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 以乙腈-水为流动相梯度洗脱; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 216 nm; 进样量 2 μL。结果 首次建立了五味子的 UPLC 特征指纹图谱共有模式, 标定了 21 个共有峰, 结合保留时间和紫外光谱分析, 指认了五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛 H、五味子酯甲、五味子酯乙、五味子甲素、五味子 γ-乙素、五味子乙素和五味子丙素的峰位。19 批五味子的相似度均在 0.970 以上。结论 该方法快速、高效, 可用于五味子的质量评价。

关键词: 五味子; 超高效液相色谱; 指纹图谱; 质量评价; 木脂素

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)11-1631-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.11.024

UPLC fingerprint of *Schisandra chinensis*

LIU Zhi¹, JIA Ying¹, ZHAO Xu¹, ZHANG Chen-ning¹, WU Bo¹, BI Kai-shun²

1. Shenyang Key Laboratory of Active Components of Chinese Medicine Screening and Evaluation, School of Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. State-Local Union Engineering Laboratory of Key Technique of Quality Control of Chinese Medicine, School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To establish the UPLC fingerprint of *Schisandra chinensis*. **Methods** The chromatographic fingerprint was obtained with Acquity UPLC HSS T3 column (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) and gradient eluted with acetonitrile and water; The flow rate was 0.5 mL/min, and the column temperature was maintained at 30 °C. The detection wavelength was set at 216 nm, and the injection volume was 2 μL. **Results** The common mode of UPLC fingerprint of *S. chinensis* was set up for the first time. There were 21 common peaks in the fingerprints. Schisandrin, schisandrol B, angeloylgomisin H, schisantherin A, schisantherin B, deoxyschizandrin, γ-schisandrin, gomisin N, and schisandrin C were identified by comparing the retention time and their ultraviolet spectra. The similarities of 19 batches of *S. chinensis* were above 0.970. **Conclusion** The method is fast and efficiency. It can be used for the quality evaluation of *S. chinensis*.

Key words: *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.; UPLC; fingerprint; quality evaluation; lignanoid

五味子是木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实, 习称“北五味子”^[1]。其味酸、甘, 性温; 有收敛固涩、益气生津、补肾宁心的功能; 用于久咳虚喘、遗精、滑精、遗尿、尿频、久泻不止、自汗、盗汗、津伤口渴、短气脉虚、内热消渴、心悸失眠等症^[2]。

五味子主要含有木脂素、多糖、挥发油、有机酸和维生素等多种化学成分, 其中木脂素是五味子

镇静催眠的主要活性成分^[3-4]。通过 HPLC 和 LC-MS 建立五味子的指纹图谱已有大量的文献报道, 但单独采用超高效液相色谱 (UPLC) 法建立五味子的指纹图谱分析方法目前国内还未见报道。UPLC 是以 1.8 μm 的超细色谱柱填料为核心技术的新型色谱分离分析技术, 相对于常规 HPLC 而言, 有更好的分离效率及灵敏度^[5]。本实验采用 UPLC 法进行五味子的指纹图谱研究, 该方法较 HPLC 更快速、

收稿日期: 2014-01-17

基金项目: 辽宁省科学技术计划项目资助 (2011412004-1); 沈阳市科技计划项目 (F12-153-9-00, F13-287-1-00)

作者简介: 刘 芷 (1989—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药质量控制。Tel: 13840353137 E-mail: lauzhi0710@163.com

*通信作者 毕开顺 Tel: 13909820903 E-mail: bikaishun@126.com

高效, 且较 LC-MS 更实用, 应用更广泛。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY UPLC 仪, 美国 Waters 公司, 包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器 (PDA)、Empower2 色谱工作站; BP210S 电子天平 (德国 Sartorius 公司); AB135—S 十万分之一天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); KQ5200B 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

对照品五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素购自中国食品药品检定研究院 (批号: 110857-201211, 111529-200604, 110764-201111, 110765-200710), 五味子醇乙、当归酰戈米辛 H、五味子酯乙、五味子 γ -乙素和五味子丙素为实验室自制 (经核磁和质谱鉴定, 采用峰面积归一化法计算, 质量分数均 >98.0%)。乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 公司), 水为娃哈哈纯净水, 甲醇为分析纯。19 批北五味子来源见表 1, 经沈阳药科大学药教研室贾英教授鉴定, 均为正品五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的果实, 密封存放于阴凉干燥处。

表 1 五味子样品来源

Table 1 Origins of *S. chinensis*

编号	来源	编号	来源
S1	黑龙江 巴彦县	S11	吉林 和龙县
S2	辽宁 本溪	S12	黑龙江 佳木斯 2
S3	辽宁 沈阳 1	S13	黑龙江 哈尔滨 3
S4	辽宁 沈阳 2	S14	吉林 永吉县
S5	吉林 安图县	S15	吉林 舒兰县
S6	吉林 抚松县	S16	黑龙江 绥化
S7	黑龙江 佳木斯 1	S17	黑龙江 木兰县
S8	黑龙江 哈尔滨 1	S18	吉林 长白山
S9	辽宁 沈阳 3	S19	黑龙江 鹤岗
S10	黑龙江 哈尔滨 2		

2 方法与结果

2.1 色谱条件

ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μ m) 色谱柱, 流动相为水 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱条件: 0~6 min, 43%~52% B; 6~8 min, 52%~60% B; 8~10 min, 60%~62% B; 10~11 min, 62%~62% B; 11~14 min, 62%~66% B; 14~16 min, 66%~70% B; 16~18 min, 70%~100% B;

18~22 min, 100% B。体积流量 0.5 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C; 检测波长 216 nm; 进样量 2 μ L。

2.2 对照品溶液的制备

取五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛 H、五味子酯甲、五味子酯乙、五味子甲素、五味子 γ -乙素、五味子乙素和五味子丙素对照品各适量, 精密称定, 分别加甲醇溶解制成适当质量浓度的对照品贮备液。精密量取上述对照品贮备液各适量, 置同一 2 mL 的量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛 H、五味子酯甲、五味子酯乙、五味子甲素、五味子 γ -乙素、五味子乙素和五味子丙素的质量浓度分别为 156、25.5、15.3、31.2、10.5、25.9、10.2、40.0、10.5 μ g/mL 的混合对照品。

2.3 供试品溶液的制备

取样品粉末约 2 g, 精密称定, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 85% 甲醇 100 mL, 超声处理 30 min, 放至室温, 用甲醇补足减失质量, 摇匀, 过 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液 (S2), 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 2%。

2.4.2 重复性试验 分别取同一批 (S2) 北五味子样品适量, 共 6 份, 精密称定, 分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 照“2.1”项下色谱条件分别进样分析, 测得其各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2%, 表明重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液 (S2), 按“2.1”项下方法操作, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样, 测得其各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2%, 表明样品在 24 h 内稳定。

2.5 样品测定

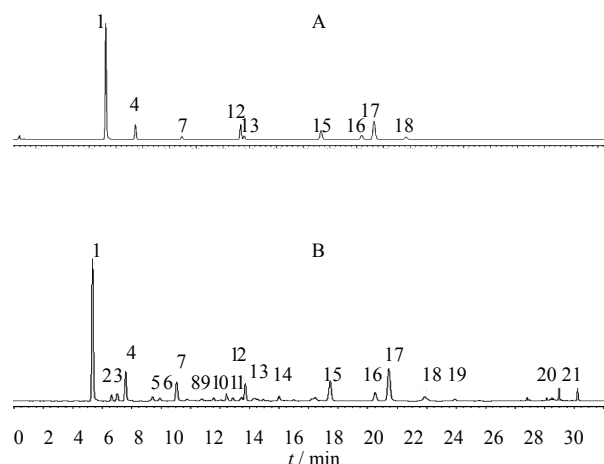
取 19 批北五味子样品, 按“2.3”项下制备供试品溶液, 在“2.1”项下的色谱条件下依次进样检测, 记录色谱图, 共获得 21 个共有峰, 指认了其中 9 个共有峰, 分别为 1、4、7、12、13、15、16、17 和 18。混合对照品 (A) 和典型五味子色谱图 (B) 见图 1。

2.6 特征指纹图谱的建立

2.6.1 参比峰的选择 在各批次样品图谱中五味子乙素的色谱峰 (17 号峰) 分离良好, 峰位居中, 峰面积较大且为所有样品共有, 所以确定五味子乙素为参比峰。

2.6.2 指纹图谱共有模式的建立 结合形态学鉴定结果, 选择 19 批五味子建立共有模式。将 19 批样

品色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2009 版》软件,建立了五味子的指纹图谱共有模式图,结果见图 2。



1-五味子醇甲 4-五味子醇乙 7-当归酰戈米辛 H 12-五味子酯甲 13-五味子酯乙 15-五味子甲素 16-五味子 γ -乙素 17-五味子乙素 18-五味子丙素
1-schisandrin 4-schisandrol B 7-angeloylgomisins H 12-schisantherin A 13-schisantherin B 15-deoxyschisandrin 16- γ -schisandrin 17-gomisin N 18-schisandrin C

图 1 混合对照品 (A) 和五味子样品 (B) 的 UPLC 图谱
Fig. 1 UPLC of mixed reference substances (A) and *S. chinensis* (B)

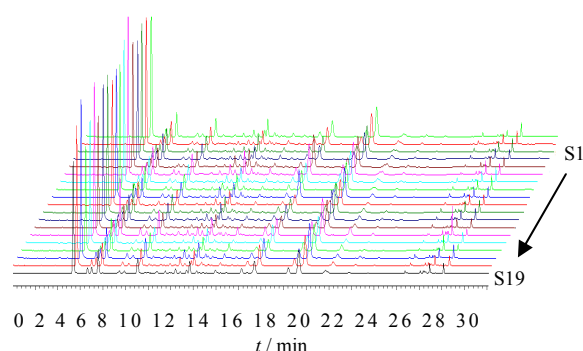


图 2 19 批五味子 UPLC 指纹图谱

Fig. 2 UPLC fingerprints for 19 batches of *S. chinensis*

2.6.3 相似度评价采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2009 版”对 19 批五味子样品的 UPLC 指纹图谱进行相似度评价,结果见表 2。分析结果显示 19 批次的五味子相似度均在 0.970 以上,表明各产地五味子具有较高的相似度。

3 讨论

3.1 样品提取条件考察

本实验对提取溶剂进行考察,比较了 50%、75%、85%、100% 甲醇、50%、75%、95% 乙醇,结

表 2 19 批五味子的相似度分析

Table 2 Similarity analysis of 19 batches of *S. chinensis*

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.999	S11	0.995
S2	0.989	S12	0.996
S3	0.993	S13	0.994
S4	0.998	S14	0.999
S5	0.999	S15	0.999
S6	0.997	S16	0.979
S7	0.995	S17	0.998
S8	0.998	S18	0.993
S9	0.999	S19	0.992
S10	0.999		

果表明,以 85% 甲醇提取的样品,色谱峰个数较多,峰面积较大,且无溶剂效应,故提取溶剂选择 85% 甲醇。对超声与回流 2 种不同的提取方法考察结果表明,2 种提取方法效率相当,考虑到超声操作较简便,故提取选择超声。超声时间 30 min,1 次即可提取较完全。故最终确定用 85% 甲醇超声 30 min,提取 1 次。

3.2 色谱条件的选择

本实验使用 Waters 的 PDA 检测器进行紫外区全波长扫描,结果表明在 216 nm 波长下,色谱图基线噪音较低,特征峰响应较高,木脂素类成分色谱峰信息较完全,因此选择 216 nm 作为本实验的检测波长。实验还考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-甲酸水、乙腈-磷酸水 4 个流动相系统,结果发现采用乙腈-水流动相系统,各峰的分离度较好,且基线平稳,因此最终采用乙腈-水系统作为流动相系统。

本研究首次建立了 22 min 内快速鉴别五味子的 UPLC 指纹图谱方法,相似度评价分析得 19 批五味子药材的相似度均在 0.970 以上,表现出很高的相似度。结果表明五味子在东北三省产地的相似度较高,无显著性差异,均为五味子的推荐品。

参考文献

- [1] 夏丽文,彭丽萍,杨东华,等.超高效液相色谱-电喷雾飞行时间质谱分析五味子化学成分[J].中医药信息,2012,29(4):27-30.
- [2] 中国药典[S].一部.2010.
- [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].中国药理学杂志,2011,46(17):1353-1356.
- [4] 邓少东,王莲婧,林励,等.化橘红黄酮类成分 UPLC 与 HPLC 指纹图谱的比较研究[J].中草药,2013,44(9):1195-1198.
- [5] 史琳,王志成,冯叙桥.五味子化学成分及药理作用的研究进展[J].药物评价研究,2011,34(3):208-212.