

五味子咀嚼片的 HPLC-DAD 指纹图谱研究

于 敏¹, 王 雪^{1,2}, 焦安妮³, 尹春梅², 焦连庆^{1,2*}

1. 吉林省中医药科学院植物化学所, 吉林 长春 130012

2. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

3. 沈阳师范大学, 辽宁 沈阳 110034

摘要: **目的** 建立五味子咀嚼片的 HPLC-DAD 指纹图谱, 对 10 个不同批次的五味子咀嚼片进行质量评价。**方法** 使用 Luna C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-0.05%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 检测波长 220 nm, 进样量 20 μL。**结果** 通过测定 10 批五味子咀嚼片的 HPLC-DAD 图谱, 建立了指纹图谱的共有模式, HPLC-DAD 指纹图谱共有峰 39 个, 相似度为 0.914~0.999; 确认了五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子乙素、五味子丙素、丹参素钠、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 II_A、原儿茶醛、木犀草苷、蒙花苷。**结论** 方法准确、可靠、重现性好, 为评价五味子咀嚼片的质量提供了科学依据。

关键词: 五味子咀嚼片; 指纹图谱; 高效液相色谱法-二极管阵列检测器; 五味子醇甲; 五味子醇乙; 五味子酯甲; 五味子乙素; 五味子丙素; 丹参素钠; 丹酚酸 B; 隐丹参酮; 丹参酮 II_A; 原儿茶醛; 木犀草苷; 蒙花苷

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)16-2413-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.16.012

Chromatography fingerprint of *Schisandra chinensis* Chewable Tablets by HPLC-DAD

YU Min¹, WANG Xue^{1,2}, JIAO An-ni³, YIN Chun-mei², JIAO Lian-qing^{1,2}

1. Jinlin Academy of Traditional Chinese Medicine, Institute of Plant Chemistry, Changchun 130012, China

2. College of Chinese Material Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

3. Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China

Abstract: **Objective** To establish the chromatography fingerprint of *Schisandra chinensis* Chewable Tablets (SCCT) with HPLC-DAD and to evaluate SCCT from 10 different batches. **Methods** Luna C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used, mobile phase was acetonitrile-0.05% phosphate, flow speed was 1.0 mL/min, temperature of column was set at 35 °C, detected wavelength was at 220 nm, and injection volume was 20 μL. **Results** The chromatography fingerprint of SCCT from 10 different batches was established. In the chromatography fingerprint with HPLC-DAD of SCCT, 39 common peaks were demarcated and the similarities of SCCT were between 0.914—0.999. Schizandrin, schisandrol B, schisantherin A, schisandrin B, schisandrin C, salvianic acid A sodium, salvianolic acid B, cryptotanshinone, tanshinone II_A, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, luteoloside, and buddleoside were identified. **Conclusion** The method is accurate, reliable and with good reproducibility, and can be used as the evidence for the quality evaluation of SCCT.

Key words: *Schisandra chinensis* Chewable Tablets; chromatography fingerprint; HPLC-DAD; schizandrin; schisandrol B; schisantherin A; schisandrin B; schisandrin C; salvianic acid A sodium; salvianolic acid B; cryptotanshinone; tanshinone II_A; 3,4-dihydroxybenzaldehyde; luteoloside; buddleoside

五味子咀嚼片由五味子、丹参、野菊花、茯苓、香附组成, 用于酒精性肝损伤的预防和治疗。目前

已有五味子、丹参、野菊花、茯苓、香附单独的指纹图谱研究报道^[1-9], 但采用 HPLC-DAD 技术^[10]对

收稿日期: 2015-02-10

基金项目: 吉林省科技厅项目 (20130727084YY)

作者简介: 于 敏, 女, 副主任药师, 主要从事天然药物化学研究。Tel: 13252648465 E-mail: 644988139@qq.com

*通信作者 焦连庆, 男, 主任药师, 主要从事天然药物化学及代谢研究。Tel: 18686602593 E-mail: jllq51@tom.com

同时含有这5种药材的药物指纹图谱研究尚未见报道。本实验建立了10批五味子咀嚼片的HPLC-DAD指纹图谱,相似度均大于0.90,并确认了五味子中五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子乙素、五味子丙素;丹参中丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮II_A;野菊花中木犀草苷和蒙花苷,为五味子咀嚼片的鉴定及质量控制提供了科学依据。

1 仪器与材料

LC-20A 高效液相色谱仪,SPD-M20A 二极管阵列检测器,SIL-10AF 自动进样器,LC-15C 二元梯度泵,LC-solution 色谱工作站,日本岛津公司;AK-400A 粉碎机,温岭市奥力中药机械有限公司;BT-25S 天平,德国赛多利斯公司;HH-4 数显恒温水浴锅,常州中捷实验仪器制造有限公司。

对照品五味子醇甲、五味子酯甲、五味子乙素、丹参素钠、丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮II_A、原儿茶醛、木犀草苷和蒙花苷购于中国食品药品检定研究院,批号分别为110857-201309、111529-201306、110855-201412、110765-201005、111652-201311、110852-200806、110766-201012、110810-201007、111720-201408、11528-201308,质量分数均>98%;对照品五味子醇乙和五味子丙素购于成都瑞芬思生物科技有限公司,批号分别为W-008-140801、W-009-140801,质量分数均>98%。纯净水为超纯水,乙腈为色谱纯,其余均为分析纯。

五味子咀嚼片由吉林省公共医药平台有限公司生产,批号分别为20141001~20141010,编码为S1~S10。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为Luna C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液,二元梯度洗脱:0~10 min, 15%~20%乙腈;10~20 min, 20%~35%乙腈;20~25 min, 35%~60%乙腈;25~40 min, 60%~70%乙腈;40~50 min, 70%~50%乙腈;50~60 min, 50%~90%乙腈;60~70 min, 90%乙腈;柱温35℃,检测波长220 nm,体积流量1 mL/min,进样量20 μL。

2.1.1 溶剂的选择 取S3批五味子咀嚼片5片研磨成细粉(过80目筛),精密称取0.25 g,分别用10 mL 90%、70%、50%甲醇,水,90%、70%、50%乙醇7种不同溶剂溶解,滤过,滤液转移置10 mL

棕色量瓶中,分别加入相应的溶剂定容至刻度,摇匀,即得供试品溶液。每种溶剂分别进样20 μL,对得到的色谱图进行比较,研究发现,50%甲醇提取效果优于其他溶剂,所得峰数量最多,峰形好,因此选择50%甲醇作为溶剂。

2.1.2 检测波长的选择 取同一供试品溶液,按上述洗脱梯度进行检测,比较220、254、286、334 nm检测结果,结果表明,220 nm得到的色谱峰数目较多,色谱峰峰形对称,不拖尾,与其他4个波长相比此波长为最佳检测波长,故选择220 nm作为检测波长。

2.2 溶液的配制

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取各对照品适量,用甲醇分别溶解并定容至量瓶中,配成单个对照品储备液,分别精密量取各储备液适量,置同一棕色量瓶中,甲醇溶解定容至刻度,配制成含五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子乙素、五味子丙素、丹参素钠、丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮II_A、原儿茶醛、木犀草苷、蒙花苷质量浓度分别为57.0、47.5、36.0、49.6、52.3、47.0、64.0、26.0、110.0、24.0、38.0、62.0 μg/mL的混合对照品溶液,避光低温保存。

2.2.2 供试品溶液的制备 取S1~S10批五味子咀嚼片各5片研磨成细粉(过80目筛),精密称取0.25 g,加入50%甲醇约10 mL置锥形瓶中,超声,滤过,滤液转移至10 mL棕色量瓶中,加50%甲醇定容至刻度,摇匀,即得。

吸取“2.2.1”和“2.2.2”项溶液,经0.45 μm微孔滤膜滤过,续滤液即为上样溶液。

2.3 指纹图谱的方法学考察

2.3.1 精密度试验 取S3批五味子咀嚼片,按“2.2.2”项方法制备得供试品溶液,连续进样6次,进样量为20 μL,统计并计算所得谱图的相似度均大于0.99,相似度RSD小于0.33%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取S3批五味子咀嚼片按“2.2.2”项制备得供试品溶液,室温放置,分别于0、3、6、9、12、24 h进样,进样量为20 μL,计算所得谱图的相似度均大于0.98,相似度RSD小于1.50%,表明样品稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取S3批五味子咀嚼片6份,按“2.2.2”项制备得供试品溶液,按上述条件测定。6份样品所得谱图的相似度大于0.98,相似度RSD

小于 1.21%，证明此方法重复性良好。

2.4 指纹图谱的建立

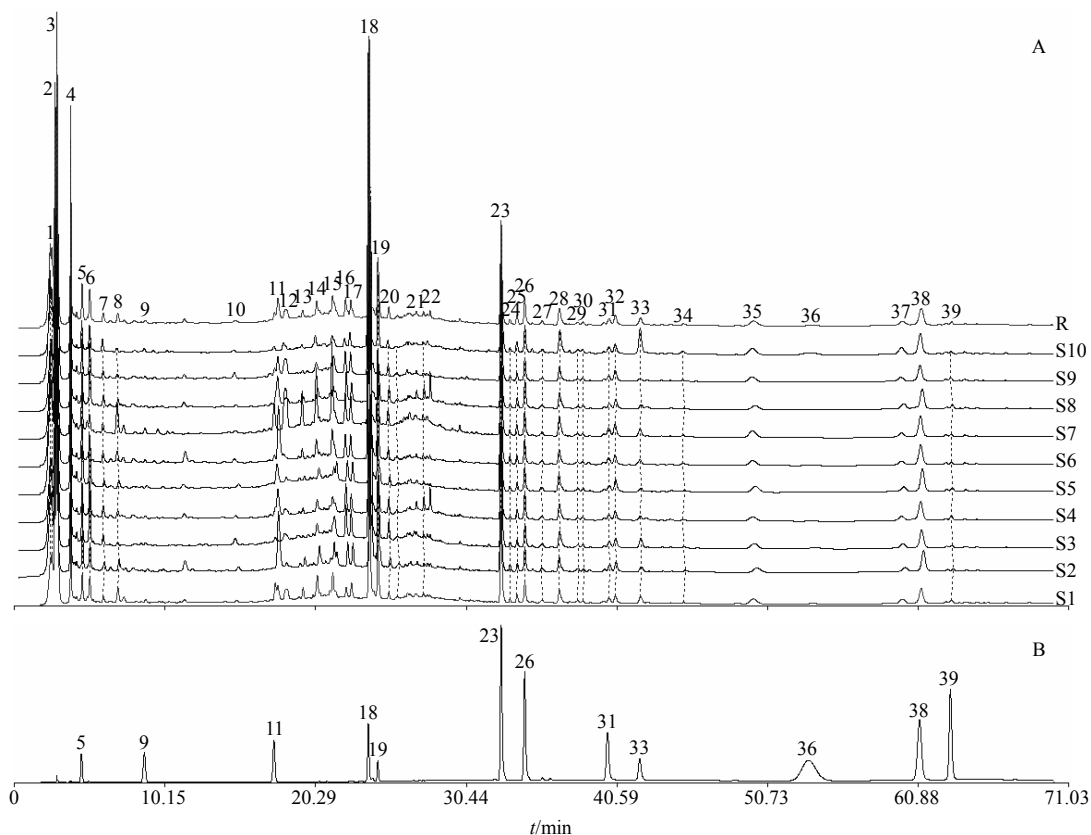
采用中药指纹图谱相似度软件（2004A 版）对 10 批不同批次的五味子咀嚼片指纹图谱数据进行处理，以 S8 样品为参照谱图，时间窗宽度为 0.50 s，采用多点校正的方法生成指纹图谱。为保证不同批次五味子咀嚼片指纹图谱匹配时校正时间的准确性，选择了主要色谱峰作为校正的 Mark 峰。10 批药材的 HPLC-DAD 指纹图谱及采用中位数法生成 10 批不同批次五味子咀嚼片的对照谱图（R），建立 HPLC-DAD 指纹图谱的共有模式，见图 1-A。

10 批五味子咀嚼片经 HPLC-DAD 分离得到 90 多个色谱峰，比较测定的色谱峰，获得 39 个共有峰。共有峰经与对照品比对（图 1-B），保留时间、紫外吸收光谱（DAD 检测器给出）均与对照品一致，确定了 5 号峰为丹参素钠、9 号峰为原儿茶醛、11 号峰为木犀草苷、18 峰为丹酚酸 B、19 号峰为蒙花苷、

23 号峰为五味子醇甲、26 号峰为五味子醇乙、32 号峰为五味子酯甲、33 号峰为隐丹参酮、36 号峰为丹参酮 II_A、38 号峰为五味子乙素、39 号峰为五味子丙素。23 号共有峰（五味子醇甲）峰面积超过总峰面积的 7.0%，结构稳定，分离度好，因此选五味子醇甲作为参比峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，测得 10 批产品与共有模式间的相似度依次为 0.970、0.976、0.973、0.991、0.975、0.976、0.962、0.991、0.986、0.968，相似度均大于 0.90，表明 10 批不同样品具有良好的相似性。

3 讨论

采用 DAD 检测器对同一供试品溶液在 220、254、286、334 nm 检测波长下色谱进行比较，220 nm（五味子酯甲、五味子乙素、五味子丙素最大吸收波长）波长下色谱峰数量多（59 个，最小积分面积 4 万），分布均匀，峰形对称；254 nm 波长下色谱峰数量较少（36 个），10、24、25、29、30、34、39



5-丹参素钠 9-原儿茶醛 11-木犀草苷 18-丹酚酸 B 19-蒙花苷 23-五味子醇甲 26-五味子醇乙 31-五味子酯甲 33-隐丹参酮 36-丹参酮 II_A 38-五味子乙素 39-五味子丙素
5-sodium danshensu 9-protocatechuic aldehyde 11-cynaroside 18-salvianolic acid B 19-buddleoside 23-schisandrin 26-schisandrol B 31-schisantherrin A 33-cryptotanshinone 36-tanshinone II_A 38-schisandrin B 39-schisandrin C

图 1 10 批五味子咀嚼片 HPLC-DAD 指纹图谱及 R (A) 和混合对照品的 HPLC-DAD 图 (B)

Fig. 1 HPLC-DAD fingerprint of 10 batches of SCCT (A) and HPLC of reference substance (B)

(五味子丙素)号色谱峰未积分(小于最小积分面积);286 nm(丹酚酸B最大吸收波长)波长下色谱峰数量较少(34个),24、25、27、28、29、30、31、32(五味子酯甲)、34、35、37、39(五味子丙素)号色谱峰未积分;334 nm(蒙花苷最大吸收波长)波长下,只有前27 min有吸收峰(22个),选择334 nm作为检测波长不具代表性。确定检测波长为220 nm可较好地体现五味子咀嚼片中各味药材的化学成分特征。

五味子、丹参、野菊花阴性样品在五味子醇甲、五味子丙素、丹参酮II_A及木犀草苷的相应位置无色谱峰,其保留时间及紫外光谱与对照品的保留时间及紫外光谱一致。五味子中五味子醇乙、五味子酯甲和五味子乙素,丹参中丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸B和隐丹参酮,野菊花中蒙花苷在阴性样品中相应位置有干扰峰,其保留时间与相应的对照品的保留时间接近,但其紫外光谱与相应的对照品的紫外光谱不一致,故上述物质也能得到确认。丹参和野菊花中均检测出原儿茶醛,故指纹图谱中9号色谱峰来自于丹参和野菊花。茯苓的主要成分为多糖及三萜类化合物,香附的主要成分为挥发油 α -香附酮,分别对茯苓和香附水提浸膏进行液相色谱分析,结果表明茯苓和香附中所含色谱峰很少,并且吸光度低,故未能在指纹图谱中识别,已采用薄层色谱对2味药材进行鉴别。

参考文献

- [1] 付绍平,杨博,陈彤,等.北五味子的液相色谱指纹图谱的建立[J].色谱,2008,26(1):64-67.
- [2] 黎琼红,张国刚,徐世义,等.丹参药材脂溶性成分的HPLC指纹图谱[J].沈阳药科大学学报,2006,23(1):22-25.
- [3] 宋敏,杭太俊,张正行.丹参水溶性成分HPLC指纹图谱指纹对照品对照法的研究[J].中草药,2005,36(3):360-364.
- [4] 林丽美,李春,刘塔斯,等.野菊花药材HPLC指纹图谱[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(22):120-123.
- [5] 刘婷娜,朱恩圆,俞桂新,等.野菊花高效液相色谱指纹图谱及质量评价方法的建立[J].时珍国医国药,2009,20(4):823-825.
- [6] 宋桂萍,陈国宝,郑礼娟,等.不同产地茯苓饮片的HPLC指纹图谱研究[J].世界中西医结合杂志,2013,8(1):36-38.
- [7] 许腊英,万芳,付文强,等.不同产地茯苓中萜类成分的HPLC指纹图谱研究[J].湖北中医学院学报,2007,9(3):41-42.
- [8] 王艳,赵勇,郑金凤,等.香附挥发油指纹图谱的研究[J].中南药学,2013,11(2):126-128.
- [9] 徐媛,张文娟,王庆伟,等.香附不同炮制品HPLC指纹图谱研究[J].中国医药导报,2011,8(31):29-32.
- [10] 胡建兰,邵萌,余林中.凉膈散汤剂HPLC-DAD指纹图谱研究[J].中草药,2014,45(1):50-54.