

基于 UPLC-Q-TOF/MS 的五味子不同部位化学成分研究

周永峰¹, 李瑞煜¹, 张定堃², 董 琦¹, 乔 滢¹, 张蓉蓉¹, 王伽伯^{1*}, 张 萍^{1*}

1. 解放军第302医院, 北京 100039

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

摘要: **目的** 通过分析五味子 *Schisandra chinensis* 中不同部位化学成分的差异, 为五味子不同部位的合理应用提供初步的理论依据。**方法** 运用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF/MS) 技术对五味子不同部位的化学成分信息进行采集, 结合多元统计分析手段对所采集到的相关信息进行处理分析, 发现并鉴定五味子不同部位的差异化合物, 并对其进行分析。**结果** 从五味子不同部位的色谱图中共鉴定了 29 个化合物, 其中 23 个为木脂素类化学成分, 经正交偏最小二乘法 (OPLS-DA) 分析, 通过保留时间与质谱信息进行比对, 共识别 14 个特征差异性化合物。**结论** 五味子中木脂素类化学成分主要集中分布于种子 (种仁和种皮) 中, 为五味子不同部位的合理应用提供一定的理论依据。

关键词: 五味子; 超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱; 木脂素; 正交偏最小二乘法; 特征差异性化合物

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)06-1087-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.06.006

Chemical constituents in different parts of *Schisandrae Fructus* based on UPLC-Q-TOF/MS

ZHOU Yong-feng¹, LI Rui-yu¹, ZHANG Ding-kun², DONG Yi¹, QIAO Ying¹, ZHANG Rong-rong¹,
WANG Jia-bo¹, ZHANG Ping¹

1. 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China

2. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: **Objective** To analyze the difference of chemical constituents in the different parts of *Schisandrae Fructus* (SF) for researching regularities of their distribution and try to provide the basis for reasonable application of different parts of SF. **Methods** An ultra-high performance liquid chromatography coupled with time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) was carried out to acquire the chemical constituents information in samples with different parts of SF. High precise mass data were processed by multivariate statistical analysis techniques to discover and identify the constituents with significant difference. **Results** A total of 29 compounds were identified and 23 compounds were lignans. The differences of chemical constituents among the three parts of SF could be obviously observed by the method of OPLS-DA in positive mode. There were 14 chemical ingredients of lignans with significant differences identified by comparison with retention time and mass spectra. **Conclusion** The chemical constituents of lignans are mainly distributed in the seed and this study provides the basis for clinical reasonable application of different parts of SF.

Key words: *Schisandrae Fructus*; UPLC-Q-TOF/MS; lignans; OPLS-DA; characteristic difference compound

五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实, 主产于我国东北三省, 习称“北五味子”, 主要具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心等功效, 常用于治疗久嗽虚喘、梦遗滑精、遗尿尿频、久泻不止等症状^[1]。《本草纲

目》记载: “五味子, 入补药熟用, 入嗽药生用。五味子酸咸入肝而补肾, 辛苦入心而补肺, 甘入中宫益脾胃”。五味子果肉味酸入肝而补肾, 种子辛、苦入心而补肺, 表明五味子不同部位的功效是具有差异性的。然而, 这种差异性有无科学依据? 其物质

收稿日期: 2016-10-11

基金项目: 全军后勤科研计划面上项目 (cws14j072)

作者简介: 周永峰 (1991—), 男, 硕士, 主要从事中药质量相关研究。Tel: (010)66933227 E-mail: zhouyfyf@163.com

*通信作者 王伽伯 (1981—), 男, 副研究员, 主要从事临床中药学研究。E-mail: wjb0126@126.com

张 萍 (1978—), 女, 副主任药师, 主要从事临床中药学研究。E-mail: zhp1231@126.com

基础如何? 尚有待考证。

超高效液相色谱 (UPLC) 与质谱串联使用, 集合了优越的色谱分离性能和高灵敏度、高分辨的质谱定性性能于一体, 因此, 已日渐成为中药材的复杂化学成分体系分析的关键技术^[2]。本实验采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF/MS) 对五味子不同部位的化学成分进行分析, 对五味子不同部位的特征差异性化合物进行标记, 为五味子不同部位的合理应用提供初步的理论依据。

1 仪器与材料

1200 型高效液相色谱仪 (四元泵、自动进样器及 UV 检测器), 1290 Infinity UPLC 超高效液相色谱仪, i Funnel 6550 Q-TOF LC/MS 四级杆串联飞行时间质谱, 美国 Agilent 公司; Gradient A10 Mill-Q 超纯水器, 法国 Millipore 公司。

乙腈、甲醇 (色谱纯, Fisher Scientific, Fairlawn, NJ, 美国); 甲酸 (色谱纯, Sigma, 美国); 水为纯净水 (杭州娃哈哈集团), 其余试剂为分析纯。五味子药材经解放军第 302 医院中药研究所肖小河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。五味子的不同部位 (果肉、种皮、种仁) 为实验室自制。

2 方法

2.1 五味子不同部位样品制备^[3]

分别取五味子药材不同部位样品粉碎, 过 80 目筛。精密称取 1.0 g 粉末置 50 mL 锥形瓶中, 加甲醇 80 mL, 超声处理 (功率 250 W, 频率 30 kHz) 30 min 后滤过, 滤液以 10 000 r/min 离心 10 min, 合并上清液转移至 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为储备液。进样前将储备液用甲醇稀释 10 倍, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2 色谱条件^[4]

色谱柱 Zorbax RRHD 300SB-C₁₈ 柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm , Agilent Technology, 美国), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量为 0.4 mL/min; 进样量为 2 μL ; 流动相为 0.1% 甲酸水 (A) - 乙腈 (B)。B 相比比例随时间变化: 0~5 min, 15%~40% B; 5~12 min, 40%~60% B; 12~25 min, 60%~90% B; 25~30 min, 90% B; 30~35 min, 90%~15% B 并以 15% B 保持 5 min。

2.3 质谱条件

电喷雾电离离子源 (ESI), 正离子模式, 质量范围 m/z 100~900, 毛细管电压 3 500 V, 喷嘴电压 1 000 V, 干燥气温度 200 $^{\circ}\text{C}$, 干燥气体积流量 12

L/min, 雾化气温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 雾化气体积流量 14 L/min。

2.4 数据处理

采用 Agilent Mass Hunter Profinder B.0 6.00 版本软件对正离子模式下的质谱原始数据进行处理。数据过滤参数: 质量范围 m/z 100~1 000, 校正误差 0.100, 保留时间窗口 0.3 min。多元分析采用 SIMCA-P 13.0 软件, 以 Pareto (Par) 方式对数据进行标准化处理, 采用无监督的主成分分析 (PCA) 方法观察样本整体分布趋势, 有监督的 OPLS-DA 方法对有差异样本进行判别分析。统计分析采用 SPSS 22.0 软件, $P < 0.05$ 认为有显著性差异, 作图软件采用 Origin 9.2 软件。

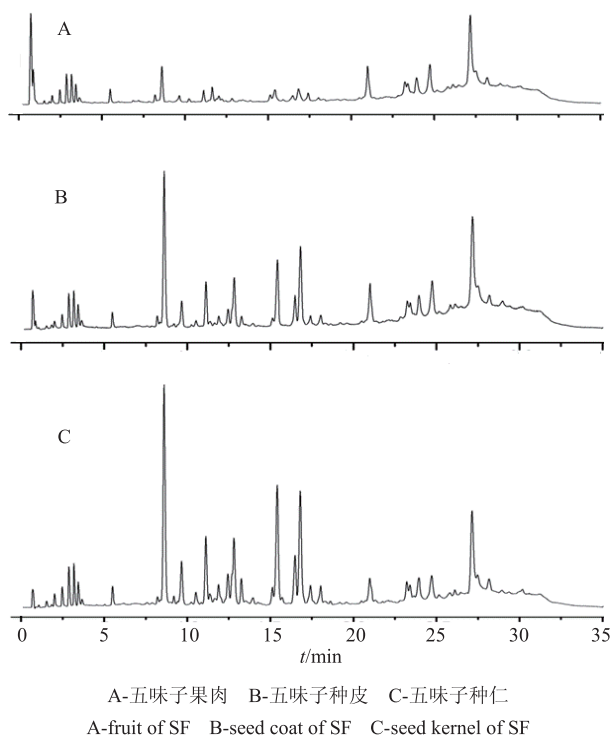
3 结果

3.1 五味子不同部位总离子流图

五味子不同部位的总离子流图如图 1 所示, 结果表明五味子的不同部位其化学成分之间存在明显的差异。尤其是五味子的果肉部位与种皮和种仁之间存在显著差异。

3.2 化合物的鉴定^[3,5]

基于文献检索以及相关数据库, 通过对各化合物的保留时间、相对分子质量等相关信息对化合物进行识别, 最终确定 29 个化合物 (表 1)。



A-五味子果肉 B-五味子种皮 C-五味子种仁

A-fruit of SF B-seed coat of SF C-seed kernel of SF

图 1 五味子不同部位总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of different parts of SF

表 1 五味子化合物鉴定结果
Table 1 Results of identification about chemical constituents of SF

编号	化合物	分子式	相对分子质量	t_R/min	理论值 (m/z)	实际值 (m/z)	偏差 ($\times 10^{-6}$)
1	β -花柏烯酸	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$	234.162 0	13.186	235.169 3	235.170 2	3.827 015
2	米戈辛 J	$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_6$	388.188 6	9.453	389.195 9	389.195 8	-0.256 940
3	五味子醇甲	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_7$	432.214 8	8.606	433.222 1	433.222 5	0.923 313
4	五味子醇乙	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_7$	416.183 5	9.718	417.190 8	417.189 2	-3.835 190
5	前戈米辛	$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_6$	390.204 2	10.714	391.211 5	391.211 4	-0.255 620
6	巴豆酰戈米辛 H	$\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_8$	500.241 0	10.664	501.284 2	501.284 3	0.199 488
7	巴豆酰戈米辛 P	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_9$	514.220 3	13.876	515.227 6	515.227 8	0.388 178
8	苯甲酰戈米辛 H	$\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_8$	522.225 4	11.178	523.232 6	523.232 6	0
9	当归酰戈米辛 Q	$\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{O}_9$	530.251 6	9.187	531.220 8	531.220 9	0.188 246
10	五味子酯甲	$\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_9$	536.204 6	13.253	537.211 9	537.211 4	-0.930 730
11	五味子酯丁	$\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{O}_9$	520.173 3	18.115	543.162 6	543.165 5	5.339 073
12	戈米辛 K1	$\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_6$	402.204 2	12.423	403.211 5	403.213 3	4.464 138
13	戈米辛 E	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_9$	514.220 3	13.916	515.227 6	515.228 7	2.134 974
14	戈米辛 L1	$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_6$	386.172 9	13.551	387.180 2	387.180 3	0.258 278
15	恰米醛	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$	218.167 1	15.725	219.174 3	219.175 2	4.106 304
16	五味子甲素	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$	416.219 9	15.443	417.227 2	417.229 2	4.793 528
17	γ -五味子醇甲	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_6$	400.188 6	16.754	401.195 9	401.197 9	4.985 071
18	表戈米辛 O	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_7$	416.783 5	15.476	417.190 8	417.188 0	-6.711 600
19	五味子乙素	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_6$	400.188 6	16.854	401.195 9	401.197 9	4.985 071
20	五味子丙素	$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_6$	384.157 3	17.600	385.164 6	385.165 1	1.298 145
21	苯甲酰异戈米辛 O	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_8$	498.225 4	18.065	521.217 0	521.214 6	-4.604 630
22	nigranoic acid	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$	470.339 6	19.960	471.346 9	471.347 1	0.424 316
23	neoisostegane	$\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_7$	414.167 9	8.621	415.175 1	415.178 9	9.152 681
24	plaulol	$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_8$	416.147 1	9.650	417.154 4	417.156 0	3.835 496
25	gedunin	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_7$	482.230 5	11.126	483.237 7	483.239 8	4.345 669
26	戈米辛 R	$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_7$	400.152 2	11.786	401.159 5	401.159 7	0.498 555
27	schisantherin B/C	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_9$	514.220 3	13.881	515.227 6	515.227 1	-0.970 450
28	merulinic acid A	$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$	390.227 0	27.024	391.284 3	391.285 5	3.066 814
29	schinsanlignone A	$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_7$	430.199 2	11.525	431.206 4	431.208 0	3.710 506

3.3 多元统计分析结果

将质谱的原始数据经过 Profinder 软件处理共得到 2 000 个化合物相关数据, 将处理后的数据以峰面积为变量导入 SIMCA-P 软件中进行 PCA 分析, 结果见图 2。从得分散点图中可以看出, 五味子不同部位的样本能够得到较好的分离, 说明五味子不同部位的化学内涵之间存在一定的差异性。

为进一步探索五味子不同部位之间的成分差异, 分别将五味子的不同部位样品之间建立 OPLS-DA 模型并进行两两相互比较, 以找出样品间差异代谢产物。为防止模型的过度拟合, 验证模型

可靠性, 进行外部模型验证, 对随机产生的 R^2 以及 Q^2 值与原始累计的 R^2 及 Q^2 值进行线性回归, 结果表明模型质量良好。OPLS-DA 模型 CV-ANOVA 验证的 P 值小于 0.05 (表 2)。说明两者之间的差异具有统计学意义。结果如图 3 所示。图 3-A、C、E 分别为种皮与果肉, 种仁与果肉, 种仁与种皮之间的比较的得分散点图, 可以看出五味子不同部位之间均可得到明显的区分。图 3-B、D、F 则分别为 S-plot, 图中距离中心原点越远且分布于两端的化合物, 其对于区分两组的贡献度则越大, 结合变量权重重要性排序 (variable importance in projection, VIP) 进

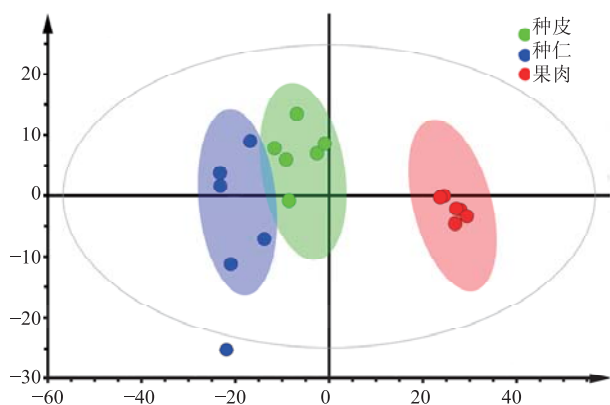


图 2 五味子不同部位的得分散点图

Fig. 2 Score scatter of different parts of SF

行筛选, 筛选条件为 $VIP > 1$, 将筛选到的化合物与之前鉴定的化合物进行对比, 共鉴定出 14 个化合物。

质谱图谱的积分面积可以反映出化合物的相对含量, 因此对这 14 个化合物进行手动积分, 以峰面积为纵坐标, 绘制五味子不同部位化学成分的相对含量图, 结果如图 4 所示。结果表明五味子的不同

表 2 OPLS-DA 模型参数

Table 2 Parameters of OPLS-DA models

OPLS-DA 模型	R^2X	R^2Y	Q^2	P
种皮与果肉	0.578	0.997	0.962	<0.05
种仁与果肉	0.651	0.998	0.978	<0.05
种仁与种皮	0.573	0.997	0.887	<0.05

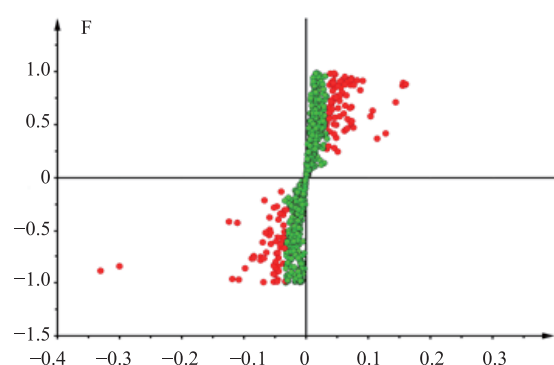
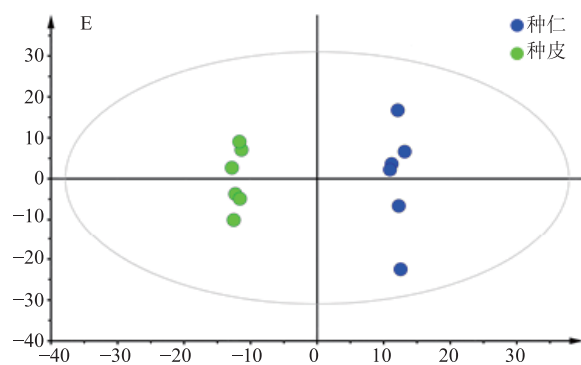
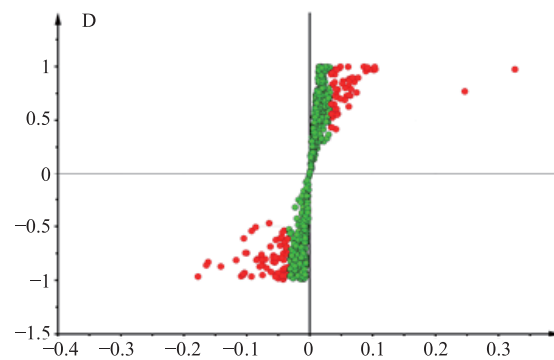
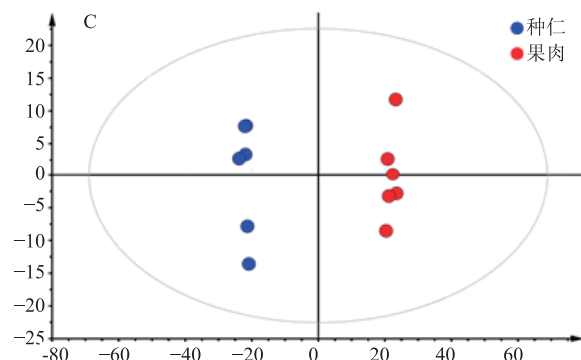
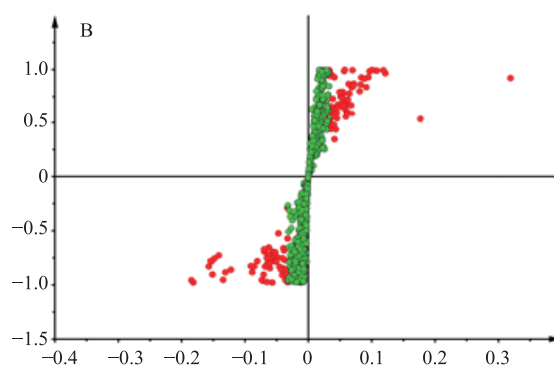
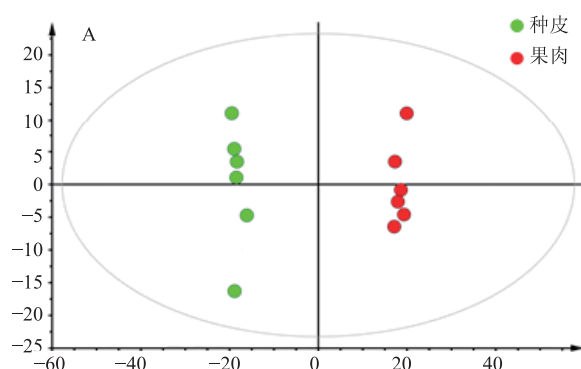


图 3 OPLS-DA 得分图 (A、C、E) 和 S-plot (B、D、F)

Fig. 3 OPLS-DA Score plot (A, C, E) and S-plot (B, D, F)

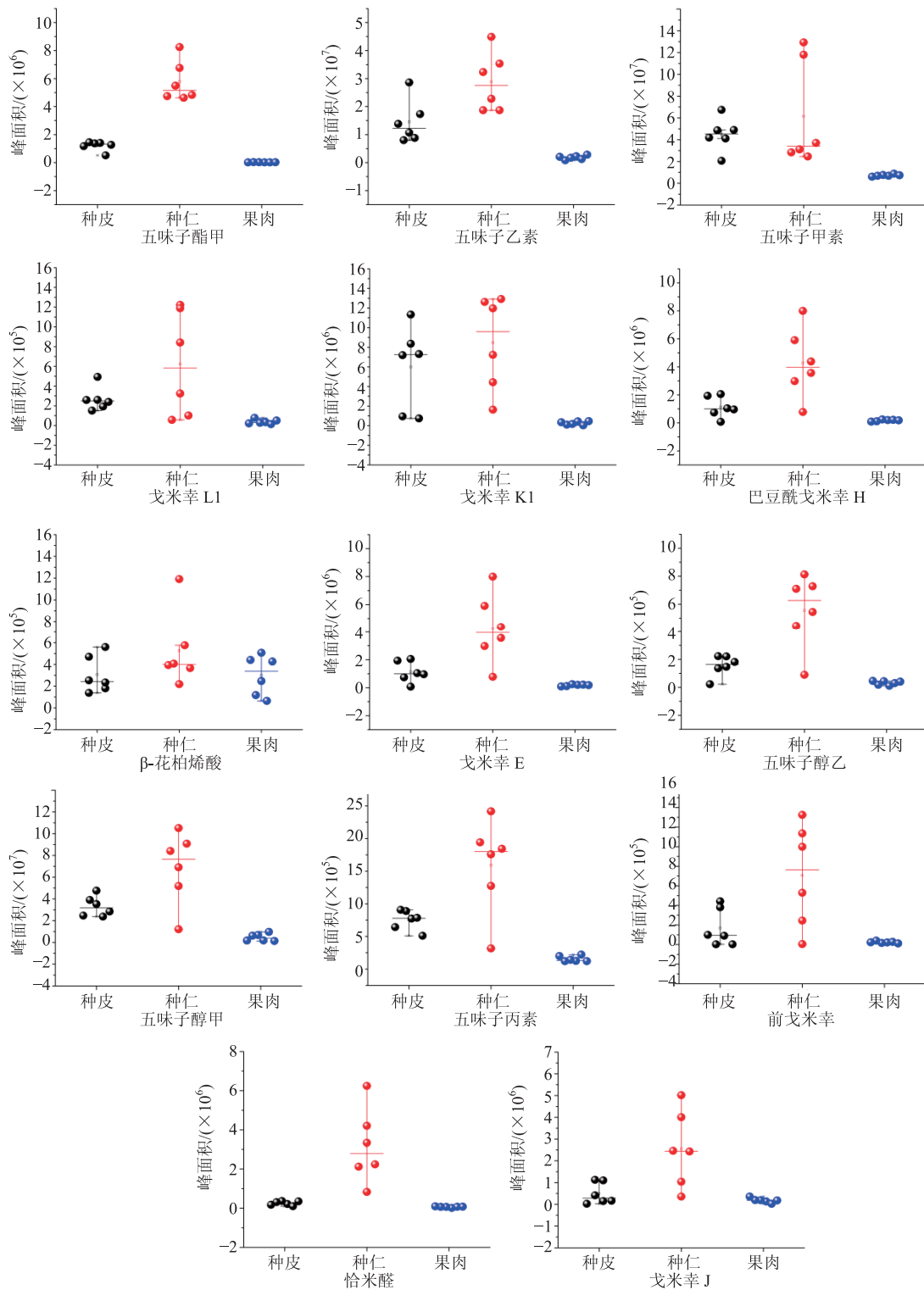


图 4 五味子不同部位化学成分量的差异

Fig. 4 Contents of chemical constituents in different parts of SF

部位，其化学成分的量之间存在显著差异性。

4 讨论

五味子不仅是我国的一种传统中药，同时也是一种“药食同源”功能性保健食品，其具有毒副作

用小、营养丰富、药理作用广泛等特点，是一种十分具有开发前景的中药材。现代研究表明五味子具有多糖、挥发油、萜类以及木脂素类众多化学成分^[6]，其不同化学成分的功效亦存在一定的差异性。五

味子中木脂素类成分具有保肝^[7]、抗炎^[8]以及抗肿瘤^[9]等功效,而多糖类化学成分则具有增强免疫^[10]等功效。

中药五味子药材的主要药用部位为五味子的果实,而其果实则主要可分为果肉,种皮以及种仁等3部分,不同部分其化学成分是具有差异性的。研究发现五味子果肉中的多糖的量是种子量的33倍^[11]。本实验基于UPLC-Q-TOF/MS对五味子不同部位的化学成分进行分析,实验结果表明五味子中木脂素类化学成分主要分布于种子中。鉴于五味子不同部位化学成分之间的差异,以及五味子果实晒干后果肉、种子难以分开等原因,为了更加合理、高效地利用五味子的资源,可考虑在五味子药材采收时进行适当的加工处理,尝试趁鲜加工,将五味子的果肉和种子分开,将其果肉用于饮料等食品领域的开发,而种子则可用于有效成分的提取或者其他相关药品领域的开发研究。本实验为提高中药材五味子的利用率,充分开发和利用五味子的资源提供一定的参考。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 师 萱, 阳 勇, 张小梅, 等. 基于 UPLC/Q-TOF-MS/MS 对雷公藤次碱在小鼠体内代谢的分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(24): 2175-2178.
- [3] 李 伟, 刘亚丽, 宋永贵, 等. UPLC-Q-TOF-MS-E 结合 OPLS-DA 模式快速鉴定南、北五味子化学成分与识别差异标志物 [J]. 中草药, 2015, 46(15): 2212-2218.
- [4] 李瑞煜, 张定堃, 韩 雪, 等. 基于代谢组学方法的制附片煎煮过程成分变化规律及煎煮时限探讨 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 38-45.
- [5] 夏丽雯, 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.
- [6] 史 琳, 王志成, 凤叙桥. 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.
- [7] Cheng N, Ren N, Gao H, *et al.* Antioxidant and hepatoprotective effects of *Schisandra chinensis* pollen extract on CCl₄-induced acute liver damage in mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 55(3): 234-240.
- [8] Chen H, Sohn J, Zhang L, *et al.* Anti-inflammatory effects of chicanine on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory cytokines in I κ B α /MAPK/ERK signaling pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 724: 168-174.
- [9] 刘晓阳, 王立波, 侯晓节, 等. 五味子乙素抑制胶质瘤生长的作用 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(17): 4176-4177.
- [10] 苗明三, 方晓艳. 五味子多糖对正常小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国中医药科技, 2003, 10(2): 100.
- [11] 李立顺, 时维静, 马迅兵. 北五味子种子和果肉中的活性成分比较 [J]. 食品科学, 2012, 33(16): 175-178.