

不同成熟度南五味子化学模式识别研究

吕 杨¹, 刘妍如^{1*}, 唐志书¹, 王 梅¹, 宋忠兴¹, 孔馨逸¹, 江大海¹, 钱大玮²

1. 陕西中医药大学 陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712083

2. 南京中医药大学 江苏省方剂高新技术研究重点实验室, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 建立不同成熟度南五味子中 6 种主要木脂素类成分的同时定量方法, 并基于化学模式识别技术, 对不同成熟度南五味子进行分类, 为南五味子合理采收加工提供科学依据。 **方法** 采用超高效液相色谱 (UPLC) 法建立不同成熟度五味子中 6 种木脂素类化合物的同时定量方法, 色谱条件为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1%甲酸水为流动相梯度洗脱, 体积流量 0.4 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温 35 °C。同时以南五味子的指标成分五味子酯甲为监测因子, 采用主成分分析 (PCA) 和分层聚类法 (HCA) 对不同成熟度的南五味子样品进行聚类分析。 **结果** 6 种木脂素类化合物在 1.257~156.250 μg/mL 线性关系良好 ($r < 0.999$), 重复性、稳定性、精密度试验 RSD 均 < 3%。根据不同成熟度主要成分的变化, PCA 和 HCA 分析将 6 个不同成熟度的五味子及混合样品主要分为 3 类: 60% 以下红, 70% 红以及全红的样品。 **结论** 60% 红样品的木脂素类化合物具有较高含量, 说明基于 UPLC 技术的聚类分析及 PCA 联合分析方法能够较好地地区分不同成熟度的南五味子药材质量, 为其质量控制和采收期选择提供了技术支持和科学依据。

关键词: 南五味子; 超高效液相色谱法; 模式识别; 主成分分析; 成熟度

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)09-2147-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.09.026

Classification analysis for *Schisandra sphenanthera* during different grades of maturity by chemical pattern recognition approach

LV Yang¹, LIU Yan-ru¹, TANG Zhi-shu¹, WANG Mei¹, SONG Zhong-xing¹, KONG Xin-yi¹, JIANG Da-hai¹, QIAN Da-wei²

1. Shaanxi Province Key Laboratory of New Drugs and Chinese Medicine Foundation Research, Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China

2. Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization of Jiangsu Province, Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medical Formular Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To establish the simultaneous determination method of six lignans from *Schisandra sphenanthera* and classify the different maturity of *Schisandra sphenanthera* via chemical pattern recognition approach. **Methods** The simultaneous determination method was established by UPLC technology, the samples were performed by Acquity UPLC BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) and eluted with acetonitrile and 0.1% formic acid, the flow rate was 0.4 mL/min, column temperature was 35 °C, and the detection wavelength was 254 nm. The collected data were analyzed and classified by principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) that the Schisantherin was selected as the monitoring component. **Results** Six lignans were in good linear relationship with the linear range 1.257—156.250 μg/mL ($r < 0.999$); Moreover, the RSD values of the repeatability, stability, and precision test were all less than 3%. According to the variation of main components in different grades of maturity, six different grades of maturity of *S. sphenanthera* were divided into three groups: 60%-mature sample, 70%-mature sample, and mature sample. **Conclusion** Cluster analysis based on UPLC technology and PCA joint analysis method are simple, rapid, sensitive, and accurate, which provides technical support and scientific basis for the selection of quality control and harvest time.

Key words: *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils.; UPLC; pattern recognition; PCA; grade of maturity

收稿日期: 2017-12-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81501229); 陕西省教育厅自然科学专项项目 (15JK1200)

作者简介: 吕 杨 (1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂。Tel: 15691046968 E-mail: mrvictoryjack@sina.com

*通信作者 刘妍如 (1985—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为药物分析。Tel: (029)38182207 E-mail: yanzi_2203@aliyun.com

南五味子为木兰科植物华中五味子 *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils. 的干燥成熟果实, 具有补肾宁心、益气生津、收敛固涩等功用^[1], 常用于久咳虚喘、久泻不止、心悸失眠、津伤口渴、遗尿尿频等症^[2]。

五味子的活性成分主要为木脂素类化合物^[3], 其中包括五味子醇甲、五味子酯乙、五味子甲素、五味子酯甲等。现代研究表明, 木脂素类化合物在保肝、抗肿瘤、抗氧化等方面具有显著的药理活性^[4]。五味子酯甲保肝效果显著^[5], 五味子乙素具有明确的抗肿瘤作用^[6-7], 五味子甲素抗炎活性显著^[8], 五味子醇甲在治疗老年性痴呆方面具有显著的药理活性^[9]。

五味子因受生长条件如温度、湿度、光照、水分活度等多种因素影响, 同一采收期, 其果实成熟度也存在较大差异, 有效成分含量、疗效也不同^[10-11]。中药发挥药效是一系列复杂化学成分协同作用的过程, 因此, 结合现代检测分析手段, 对不同成熟度五味子差异有效成分进行快速测定, 对于五味子采收期的合理筛选提供量化依据。

《中国药典》2015 年版中仅以五味子酯甲作为南五味子的指标性成分, 评价体系单一, 不能全面地评价五味子药材的质量优劣。聚类分析法可以综合利用多个变量信息, 在特定空间中寻找可识别的数据结构, 进行样品的归类。此外, 目前研究多以 HPLC 法进行五味子药材的质量控制^[12-17], 但采用 HPLC 法进行定量测定所需时间较长, 一般需要 40~50 min, 甚至更长的时间, 影响了质量评价的效率。与 HPLC 法相比, 超高效液相法 (UPLC) 可以在更短的时间内对低含量样品进行分析, 且具有高分离度、高灵敏度等优点, 尤其适用于中药复杂成分的快速分析。针对五味子因生长地区条件不同 (温度、湿度、光照等), 而表现出果实颜色表型的广泛差异, 有必要建立五味子中木脂素类含量和果实颜色表型相关的分析方法, 从而以不同成熟度果实颜色数值来评价五味子质量。本实验以不同成熟度的南五味子为研究对象, 通过测定其主要的 6 种木脂素类成分, 并结合主成分分析法 (PCA) 及聚类分析法对不同成熟度 (不同果实颜色) 五味子样品中木脂素类成分的含量变化情况进行综合分析, 试图找到这些成分与成熟度之间的相关性, 为南五味子的采收和加工提供相关依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters Acquity UPLC H-Class System, 配备有 Acquity UPLC QSM、Acquity UPLC Sample Manager FTN、Acquity UPLC PDA Detector 以及 Empower 2 工作站 (美国 Waters 公司); KQ-300DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 十万分之一电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司)。

1.2 材料

对照品五味子甲素 (批号 110764-200107)、五味子醇甲 (批号 110857-201412)、五味子酯甲 (批号 111529-200604) 购自中国食品药品检定研究院, 质量分数均为 98%; 五味子醇乙 (批号 MUST-15070312)、五味子酯乙 (批号 MUST-14101907)、五味子乙素 (批号 MUST-15021710) 购自成都曼斯特生物科技有限公司, 质量分数大于 98%。南五味子药材采自陕西省周至县, 经陕西中医药大学药学院胡本祥教授鉴定为华中五味子 *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils. 的干燥成熟果实。

2 方法与结果

2.1 干燥方法

取新鲜成熟的南五味子果实进行清洗, 按果实成熟颜色 (果穗中红色成熟果实数量百分比) 分为全红、70%红、60%红、50%红、40%红、全绿和各等级混合 (混合比例为 1:1:1:1:1:1) 7 个等级。分别取各等级果实适量, 装入 7 个不锈钢托盘中均匀摊开, 以此标为全红组、70%红、60%红、50%红、40%红、全绿和各等级混合组 (简称混合组), 所有样品进行 50 °C 烘干处理, 粉碎后过 3 号筛, 装袋保存。分类如图 1 所示。

2.2 色谱条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为水 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱程序: 0~1 min, 40%~70% B; 1~4 min, 70% B; 4~5 min, 70%~40% B; 体积流量 0.4 mL/min; 进样量为 2 μL; 柱温 35 °C; 检测波长 254 nm。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品储备液的制备 分别精密称取五味子醇甲、五味子酯乙、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素对照品适量置 10 mL 量瓶中, 加甲醇制成质量浓度分别为 100.50、99.00、

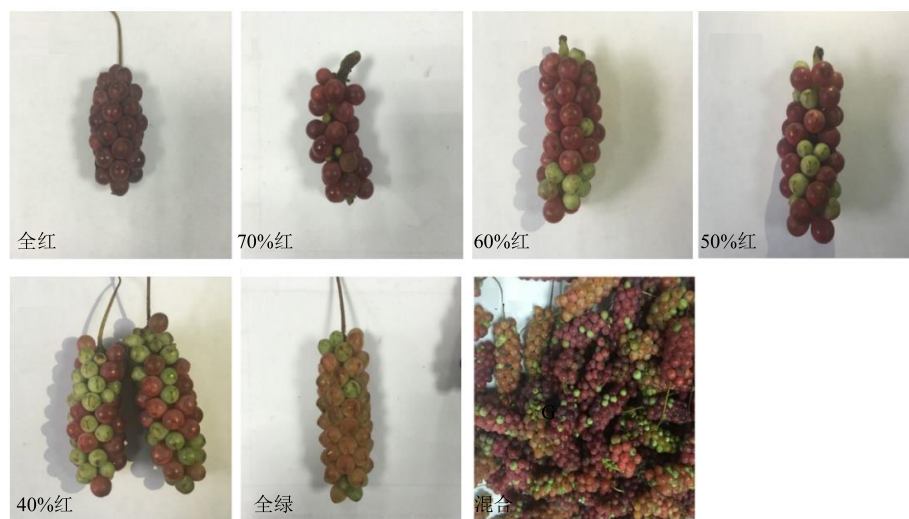


图 1 6 种成熟度五味子果实及混合样品

Fig. 1 Six different grades of maturity and mixed sample of *Schisandrae Sphenantherae*

90.00、180.00、159.00 和 111.40 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取五味子药材粉末约 0.3 g（过 3 号筛），置于 25 mL 量瓶中，精密加入甲醇 25 mL，称定质量，经超声处理（功率 250 W，频率 20 kHz）20 min，放至室温，用甲醇补足减失质量，摇匀，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取“2.3.1”项 6 个稀释成不同质量浓度梯度的混合对照品溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图，以进样量为横坐标（ X ），峰面积为纵坐标（ Y ），绘制标准曲线，计算各成分的回归方程和线性范围。6 种木脂素线性范围为 1.26~156.25 $\mu\text{g/mL}$ ，且相关系数均大于 0.999，表明各对照品线性关系良好，结果见表 1。

2.4.2 定量限（LOQ）和检出限（LOD） 取混合对照品溶液，用甲醇以 10 倍稀释法逐步稀释，按“2.2”项下设定色谱条件，进样量为 2 μL ，以各对

照品信噪比（ S/N ）10:1 为 LOQ， S/N 3:1 为 LOD，结果见表 1。

2.4.3 精密度试验 取同一供五味子组别的供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次，进样量为 2 μL ，测得五味子酯甲、五味子醇甲、五味子甲素、五味子醇乙、五味子乙素、五味子酯乙各色谱峰的峰面积，计算 RSD 分别为 0.91%、0.88%、0.28%、0.77%、1.66%、2.07%，表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一五味子供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件分别于制备后 0、2、4、6、10、14、20、24 h 进样，进样量为 2 μL ，测得五味子酯乙、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子乙素、五味子甲素、五味子酯甲各色谱峰面积的 RSD 值分别为 2.79%、0.92%、1.04%、1.12%、1.86%、1.57%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 取同一组别五味子药材粉末 5 份，按“2.3.2”项下方法平行制备供试品溶液 5 份，按“2.2”项下色谱条件，进样，进样量为 2 μL ，测得五味子酯乙、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子

表 1 6 种木脂素类化合物的线性方程、相关系数、线性范围、LOD 和 LOQ

Table 1 Linearity, regressions coefficients, linear range, limit of detection, limits of quantification of six lignans

化合物	线性方程	相关系数	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	LOD/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	LOQ/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
五味子醇甲	$Y=2.392\ 1\times 10^6 X+1\ 098.3$	0.999 5	2.48~19.80	0.16	0.82
五味子醇乙	$Y=5.27\times 10^6 X+3\ 041.7$	0.999 5	1.26~12.57	0.06	0.11
五味子甲素	$Y=5.025\ 9\times 10^6 X-64\ 935$	0.999 6	31.80~159.00	0.06	0.17
五味子乙素	$Y=6.727\ 2\times 10^6 X-2\ 888$	0.999 6	1.39~11.14	0.16	0.80
五味子酯甲	$Y=2.671\ 3\times 10^6 X-72\ 586$	0.999 6	31.25~156.25	0.01	0.13
五味子酯乙	$Y=2.152\times 10^6 X-32\ 028$	0.999 5	25.00~125.00	0.01	0.11

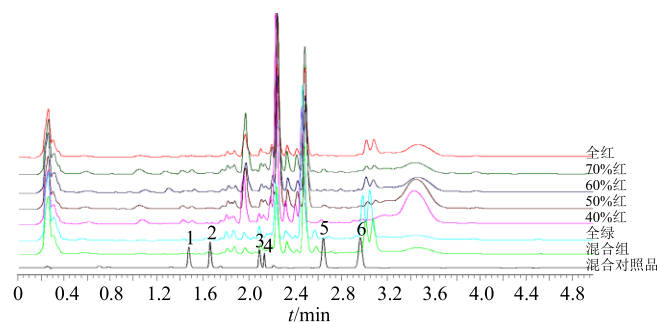
乙素、五味子甲素、五味子酯甲各峰的 RSD 值分别为 0.69%、0.75%、0.67%、0.71%、1.90%、0.60%，表明此方法重复性良好。

2.5 五味子差异性成分聚类分析及 PCA

2.5.1 聚类分析 聚类分析可以通过数据建模将多维数据进行简化，是一种通过将具有特征的数据进行归类找到样品与样品间关系的统计学方法。由于聚类分析建模稳定，已广泛应用于中药质量控制、品种分类等方面。本研究对 6 个不同成熟度的五味子及混合样品进行色谱分析，混合对照品及样品色谱图见图 2，将数据导入 simca-p 13.0 版软件，采用 HCA 聚类分析方法，对各批数据进行聚类分析，结果见图 3-A。结果表明，6 个不同成熟度的五味子及混合样品主要分为 3 类，70%红归为一类、全红和混合样品归为一类、60%以下红的样品聚为一类。说明 60%以下红的五味子和 60%以上以及全红的样品在成分上存在一定的差异。

2.5.2 PCA 为了更直观地评价模型对样品的分类能力，对各样品数据进行降维处理，采用 PCA 方法观察样品差异情况，结果得到 3 个最大特征值的主成分 PC1、PC2 和 PC3，第一主成分 PC1 的贡献率为 69.5%，包含差异信息最多。前 2 个主成分的累积贡献率为 86.5%，说明模型拟合能力较好，选取前 2 个主成分进行模型预测能够反映不同成熟度样品的基本特征。以前 2 个主成分建立投影，得到散点图（图 3-B）。由图 3-B 可以看出从全红到 70%

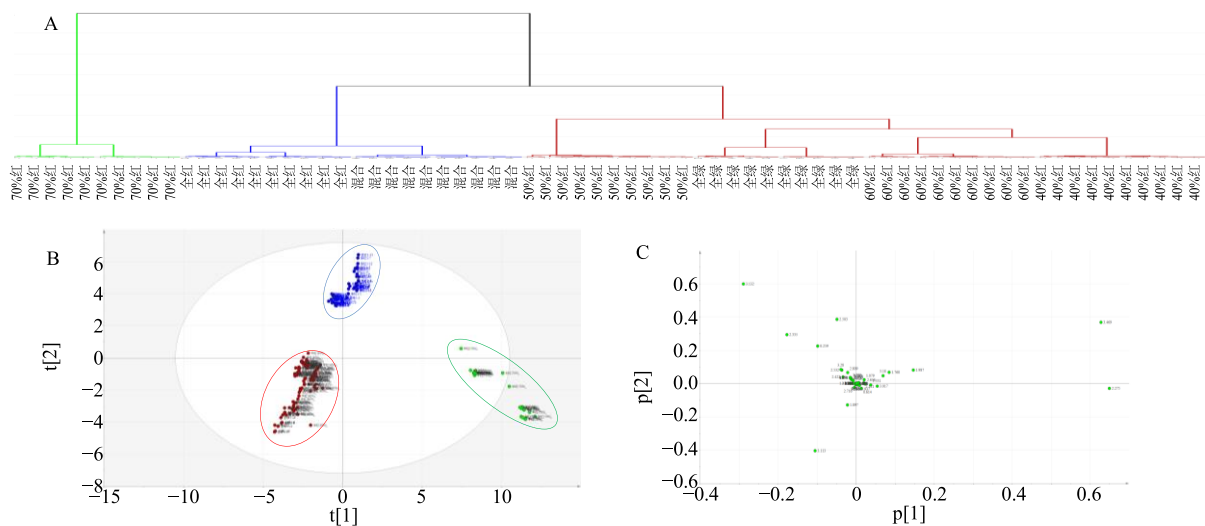
红到 60%以下红呈现顺时针的变化情况，这一结果与聚类分析结果一致。说明五味子样品差异从 70%以上成熟开始。由化学成分载荷图（图 3-C）可以看出，其差异主要表现在保留时间为 3.132、2.275、3.469、3.113、2.503、2.335、0.259、1.897 和 1.987 min 处峰代表的几个化学成分上。其中 1.987 min 处代表的化合物为五味子酯乙，2.503 min 处峰代表的化合物为五味子甲素。说明不同成熟度的五味子中化学成分含量变化明显。由图 4 所示，6 个不同成熟度五味子果实及混合样品中 6 种木脂素类成分含量差异



1-五味子醇甲 2-五味子醇乙 3-五味子酯乙 4-五味子酯甲
5-五味子甲素 6-五味子乙素
1-schizandrin 2-schisandrol B 3-schisantherin B 4-schisantherin A
5-deoxyschizandrin 6-γ-schizandrin

图 2 混合对照品和 6 种成熟度五味子果实及混合样品叠色谱

Fig. 2 2D overlay chart of hybrid reference substance and six different grades of maturity and mixed sample of *S. schenanthra*



A-聚类图 B-PCA 散点图* C-PCA 载荷图 *蓝色-全红 红色-全绿、40%~60%红 绿色-70%红

A-clustering plot B-PCA scores plot* C-PCA loading plot *The blue scatters in the scores plot represent fruit full maturity period, red scatters represent 40%—60% maturity period and immaturity period, green scatters represent more than 70% maturity period

图 3 6 种成熟度五味子果实及混合样品成分聚类与 PCA 结果

Fig. 3 HCA and PCA analysis of results of six different grades of maturity and mixed sample of *S. schenanthra*

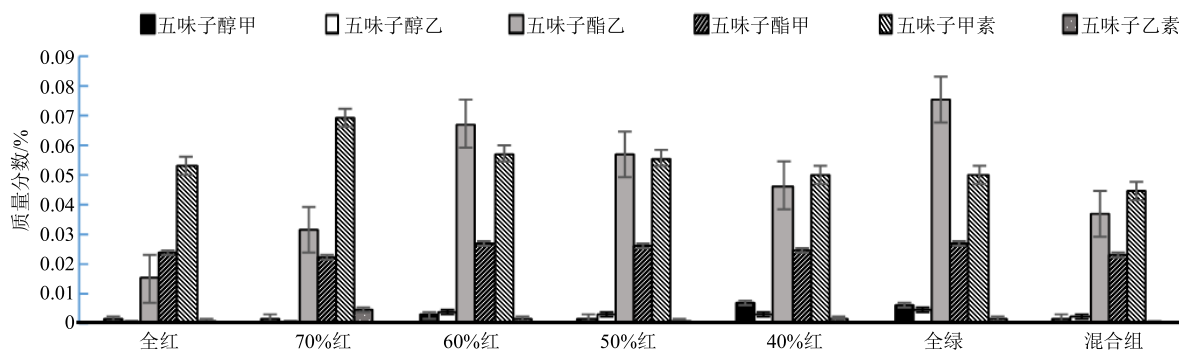


图 4 6 种成熟度五味子及混合样品果实中 6 种木脂素含量

Fig. 4 Content of six kinds of lignans in six different grades of maturity and mixed sample of *S. schenanthra*

的比较可以看出, 70%以上红的果实中未检出五味子醇乙, 五味子酯乙含量较 70%以下红的果实也降低明显, 这与聚类分析及 PCA 结果也相一致。

3 讨论

相关研究发现, 不同的干燥方法对五味子品质有较为明显的影响, 50 °C 烘干处理能得到五味子样品质量较好, 从成本、含量等方面综合考虑, 可采用 50 °C 干燥法代替药典的晒干法^[18-19]。故本实验采用 50 °C 烘干法进行考察, 对 6 种不同成熟度的五味子果实及混合样品, 运用 UPLC 指纹图谱技术, 进行了 6 种木脂素类成分的同时测定。通过 PCA 和聚类分析法对不同成熟度五味子进行分类。

实验结果表明, 6 个不同成熟度的五味子及混合样品主要分为 3 类, 70%红归为一类、全红和混合样品归为一类、70%以下红的样品聚为一类, 说明 60%以下红的五味子和 60%以上以及全红的样品在成分上存在一定的差异。并且 PCA 分析结果也说明了不同成熟度的五味子中化学成分含量变化明显, 6 种指标性木脂素类成分中, 差异较大的为五味子甲素和五味子酯乙, 五味子酯乙在 60%红时含量最大, 70%以上红时明显减少, 且药典规定的南五味子指标性成分五味子酯甲在 60%红时含量最大, 这对五味子果实中木脂素类成分的采集时期具有一定借鉴意义, 提示采收时应以 60%红时为宜。此外, PCA 中, 保留时间 1.987 min 处峰代表化合物为五味子酯乙, 保留时间 2.503 min 处峰代表的化合物为五味子甲素。3.132、2.275、3.469、3.113、2.335、0.259 和 1.897 min 处代表的化合物非此次测定的 6 种木脂素类化合物, 具体为何种成分, 有待后续实验的进一步考证和鉴别。以上研究方法和结果可以为不同成熟度南五味子的成分分析、采收加工、功效评价和质量评价方面的研究提

供技术支持和科学依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 周海燕, 孟昭阳. 浅谈五味子的临床效用 [J]. 光明中医, 2015, 30(3): 642-643.
- [3] 杨 擎, 曲晓波, 李 辉, 等. 五味子化学成分与药理作用研究进展 [J]. 吉林中医药, 2015, 35(6): 626-628.
- [4] 马育轩, 黄艳霞, 周海纯, 等. 五味子现代药理及临床研究进展 [J]. 中医药信息, 2014, 31(1): 125-126.
- [5] 朱春雾, 吕 靖, 赵志敏, 等. 五味子酯甲抑制肝窦内皮细胞功能及血管新生的活性评价 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(2): 279-284.
- [6] Li L, Lu Q, Shen Y, et al. Schisandrin B enhances doxorubicin-induced apoptosis of cancer cells but not normal cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 71(5): 584-595.
- [7] 梁 婧, 侯海燕, 兰晓霞, 等. 五味子乙素的药理作用及其分子机制的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(4): 506-510.
- [8] 崔鹤蓉, 李朋彦, 李雨萌, 等. 五味子甲素对 NLRP3 炎性小体活性的抑制作用及机制初步研究 [J]. 药学报, 2017, 52(1): 80-85.
- [9] 周妍妍, 刘艳丽, 董春雪, 等. 五味子醇甲对 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠脑组织突触素、 α 转突触核蛋白表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(8): 1076-1079.
- [10] 沈晓君, 史 勇, 赵红菲, 等. 五味子果核的色泽与化学成分的相关性研究 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1216-1219.
- [11] 孙 丹. 不同基因型北五味子资源的鉴定及离体再生体系的建立 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2014.
- [12] 胡俊扬, 陆兔林, 毛春芹, 等. HPLC 法同时测定不同产地五味子中 8 种木脂素类成分 [J]. 中成药, 2012,

- 34(2): 313-316.
- [13] 王建花. 高效液相色谱法测定参芪降糖颗粒中五味子甲素、五味子乙素含量 [J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(18): 289-291.
- [14] 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.
- [15] 佟志军, 魏晓雨, 王美慧, 等. 五味子糖浆原药材、中间体及成品的 HPLC 指纹图谱相关性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(17): 3032-3038.
- [16] 郑艳超, 马琳, 张坚, 等. HPLC 法测定五味子果梗中 6 种木脂素 [J]. 中成药, 2017, 39(2): 355-359.
- [17] 倪琳, 杨锡. HPLC 法同时测定生脉饮中五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素 [J]. 中成药, 2012, 34(5): 872-875.
- [18] 张奇, 叶正良, 李德坤, 等. 不同加工方法和成熟阶段对五味子主要化学成分的影响 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(13): 1722-1724.
- [19] 华国栋, 谢春娥, 王建. 不同加工方法的五味子中五味子醇甲含量的比较 [J]. 北京中医, 2007, 26(7): 442-443.