

五味子醋制前后指纹图谱的分析比较

朱明贵¹,李丽²,肖永庆^{1,2*},于定荣²,麻印莲²,顾雪竹²

(1. 首都医科大学中医药学院,北京 100069; 2. 中国中医科学院中药研究所,北京 100700)

[摘要] 目的:建立五味子指纹图谱测定方法,分析比较五味子醋制前后物质基础的变化。方法:采用 HPLC,以乙腈-15 mmol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液(pH 2.0)为流动相,梯度洗脱,检测波长 210,254 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 35 ℃,分别测定生、醋五味子指纹图谱。结果:五味子醋制前后指纹图谱有明显的差异,其中以 5-羟甲基糠醛含量变化最显著。结论:建立的方法可以较好体现出五味子醋制前后物质基础的差异,为五味子饮片的质量评价标准及炮制原理提供了科学依据。

[关键词] 五味子; 指纹图谱; 醋制

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)20-0060-05

[doi] 10.11653/syfy2013200060

Analysis and Comparison of the Fingerprint of Schisandrae chinensis Fructus after Vinegar Processing

ZHU Ming-gui¹, LI Li², XIAO Yong-qing^{1,2*}, YU Ding-rong², MA Yin-lian², GU Xue-zhu²

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective: To study the difference of material base after vinegar processing by establishing

[收稿日期] 20130501(006)

[基金项目] 国家中医药管理局中医药行业专项(201007012-1)

[通讯作者] * 肖永庆,首席研究员, Tel:010-84040221, E-mail: x. heqi@ 163. com

[11] Li X, Wu X, Huang L. Correlation between antioxidant activities and phenolic contents of Radix Angelicae Sinensis (Danggui) [J]. Molecules, 2009, 14 (12):5349.

[12] Ozsoy N, Yilmaz T, Kurt O, et al. In vitro antioxidant activity of Amaranthus lividus L [J]. Food Chemistry, 2009,116(4):867.

[13] 蒋惠娣,季燕萍,张水利. 紫珠属药用植物体外抗氧化作用[J]. 中药材,1999,22(3):139.

[14] 宁德生,李典鹏,黄胜,等. 七种紫珠属植物水提取物中总黄酮、总酚酸及其抗氧化活性的测定[J]. 广西植物,2012,32(6):845.

[15] 谷陟欣,刘宇婧,颜冬兰,等. 裸花紫珠、大叶紫珠和广东紫珠的研究进展[J]. 中国医药导报,2011,8(29):11.

[16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:320.

[17] 林朝展,柴玲,蔡昭喜,等. 枇杷叶紫珠中苯乙醇苷类成分研究[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(3):276.

[18] He Z, Lau K, Xu H, et al. Antioxidant activity of phenylethanoid glycosides from Brandisia hancei [J]. J Ethnopharmacol,2000,71(3):483.

[19] Tatli I I, Takamatsu S, Khan I A, et al. Screening for Free Radical Scavenging and Cell Aggregation Inhibitory Activities by Secondary Metabolites from Turkish Verbascum species[J]. Z Naturforsch C J Biosci,2007, 62c (9/10):673.

[20] 何建波,独家启,袁圣杰,等. 木犀草素与槲皮素抗氧化性能差异的电化学研究[J]. 食品科学,2009,30(9):37.

[责任编辑 顾雪竹]

the fingerprint of *Schisandrae chinensis fructus* and its processed products. **Method:** The chromatographic separation was performed at 35 °C, with the acetonitrile-15 mmol·L⁻¹ monopotassium phosphate (pH 2.0) as the mobile phase in gradient elution. The detection wavelength was set at 254 nm and 210nm, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** There are significant differences after vinegar processing, in which 5-hydroxymethyl furfural content (5-HMF) in the most significant change. **Conclusion:** The established method can better reflect the differences of material foundation before and after processing, provides the scientific basis for quality evaluation of *Schisandrae* standards, and lays the foundation for further revealing the scientific connotation of the principle of schisandra.

[**Key words**] *Schisandrae chinensis fructus*; fingerprint; vinegar processing

五味子为木兰科植物五味子的干燥成熟果实,习称“北五味子”,始载于《神农本草经》,列为上品,具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心的功效,五味子炮制品主要有五味子、醋五味子、酒五味子、蜜五味子等,其中临床应用较为广泛的是其生品和醋制品^[1-3]。目前,对于五味子及醋五味子的研究报道较多^[4-10]。为了全面反映五味子醋制前后物质基础的变化情况,本文对生、醋五味子进行了指纹图谱的比较研究。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪(Waters 2695 pump, Waters 2996 检测器,Empower2 数据处理软件),KQ-500DB 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司),乙腈为色谱纯,水为纯净水,使用前均经 0.45 μm 滤膜滤过,其他试剂均为分析纯。

对照品五味子醇甲(100857-200709)、五味子甲素(110764-200609)、五味子乙素(批号 110765-200710)、五味子酯甲(批号 111529-200503)、柠檬酸(批号 111679-200401)、原儿茶酸(批号 110809-200604)购自中国食品药品检定研究院。五味子醇乙、五味子丙素、奎尼酸为实验室分离鉴定,纯度均>98%。

五味子药材购自辽宁大梨树五味子种植基地,经中国中医科学院中药研究所胡世林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;五味子饮片购自上海华宇药业、沪谯药业、济人药业等企业。

2 方法与结果

2.1 饮片炮制

2.1.1 五味子饮片炮制^[1] 取不同产地五味子药材,除去枝梗、青果、霉变果实及杂质,制备成五味子饮片。

2.1.2 醋五味子饮片炮制^[4] 取五味子生品各 300 g,迅速淋洗,除去表面尘土,加米醋 60 mL 拌匀,闷润 2 h,置于蒸锅内,隔水蒸 12 h,饮片表面乌黑色有油润光泽时,取出,晾干,50 °C 鼓风干燥 2 h,

制备成醋五味子饮片。

2.2 色谱条件 Spursil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Phenomenex 保护柱,柱芯规格(3 mm × 4 mm),流动相为乙腈(A)-15 mmol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液(B, pH 2.0)梯度洗脱(0~8 min, 1% A; 8~40 min, 1%~24% A; 40~60 min, 24%~60% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 210, 254 nm,进样量 10 μL,柱温 35 °C。在此条件下五味子样品中色谱峰数量及分离状况较好。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取对照品柠檬酸、奎尼酸、原儿茶酸、5-羟甲基糠醛、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素适量,加甲醇溶解,分别制备成 0.241, 0.160, 0.013 53, 0.007 41, 0.009 16, 0.009 08, 0.013 46, 0.010 28 g·L⁻¹,作为对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备 取五味子饮片粉末(过 40 目筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入 30% 甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声提取 10 min,放冷,密塞,再称定质量,用 30% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液 10 mL 回收溶剂至干后以水溶解,定容至 5 mL,以微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

2.5 精密度试验 五味子饮片供试品溶液,重复进样 5 次,依法测定,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD。在两个检测波长下,相对峰面积的 RSD 均<3%,相对保留时间的 RSD 均<0.3%。精密度结果良好。

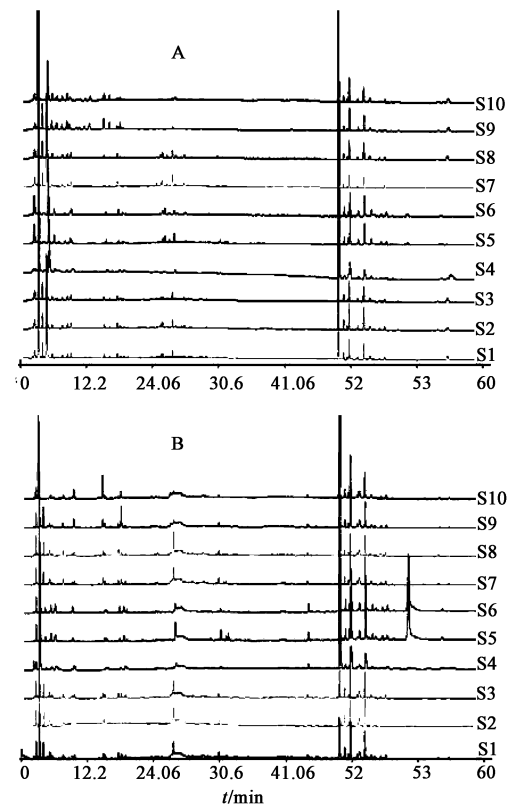
2.6 稳定性试验 五味子饮片供试品溶液,间隔一定时间进样共 6 次,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD。在 210, 254 nm 下,相对峰面积的 RSD 均<3%,相对保留时间的 RSD 均<0.3%。可见供试品溶液在 24 h 内保持稳定。

2.7 重复性试验 取五味子粉末 5 份,各约 0.5 g,精密称定,依法制成供试品溶液,测定,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD。在 210, 254

nm 下,相对峰面积的 RSD 均 <3% ,相对保留时间的 RSD 均 <0.3% 。表明实验重复性良好。

2.8 结果

2.8.1 五味子及醋五味子指纹图谱的建立 五味子及醋五味子饮片各 10 批,精密称定饮片粉末各 0.5 g,照 2.4 项下条件制备供试品溶液,测定指纹图谱。见图 1~2。

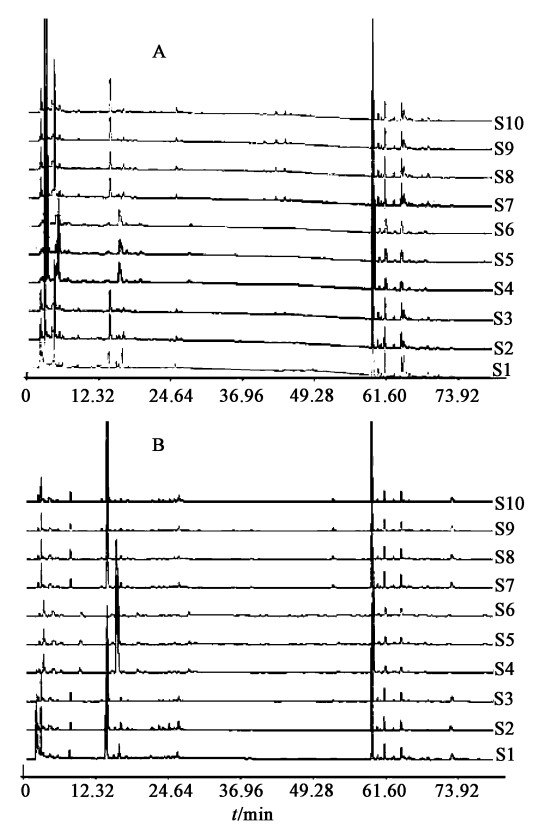


A. 210 nm; B. 254 nm; S1. 大梨树-1; S2. 大梨树-2; S1. 大梨树-3; S4. 大梨树-4; S5 吉林白山; S6 沈阳农大; S7 大黑沟; S8 三七家子; S9 沪漉药业; S10 济人药业

图 1 五味子饮片指纹图谱

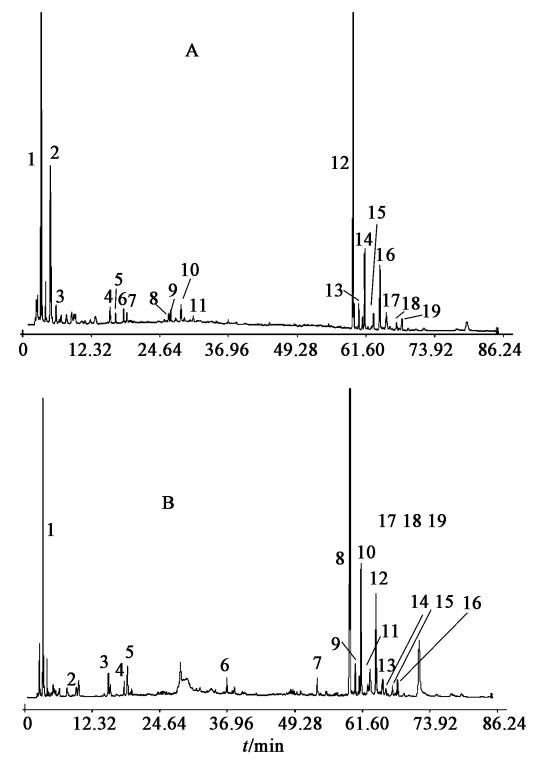
2.8.2 五味子及醋五味子对照图谱的生成 利用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”拟合生、醋五味子饮片对照图谱。生五味子饮片 210 nm 图谱中可指定共有峰 19 个, 254 nm 波长下共有峰 16 个;醋五味子饮片 210 nm 图谱中可指定共有峰 20 个, 254 nm 波长下共有峰 23 个;五味子及醋五味子 210 nm 对照图谱中以 12 号峰为参照峰、254 nm 对照图谱中以 8 号峰为参照峰(s)。见图 3~4。

2.8.3 生、醋五味子指纹图谱比较 以中药色谱指纹图谱相似度评价系统对生、醋五味子饮片进行分析和比较。两个波长下(210,254 nm),10 批五味子饮片与对照指纹图谱的相似度均 >95% ,与标准指



A. 210 nm; B. 254nm; S1. 沪漉药业-醋; S2. 济人药业-醋; S3. 大梨树醋-1; S4. 大梨树醋-2; S5. 大梨树醋-3; S6. 大梨树醋-4; S7. 吉林白山醋; S8. 沈阳农大醋; S9. 大黑沟醋; S10. 三七家子醋

图 2 醋五味子饮片指纹图谱



A. 210 nm; B. 254 nm

图 3 五味子饮片对照指纹图谱

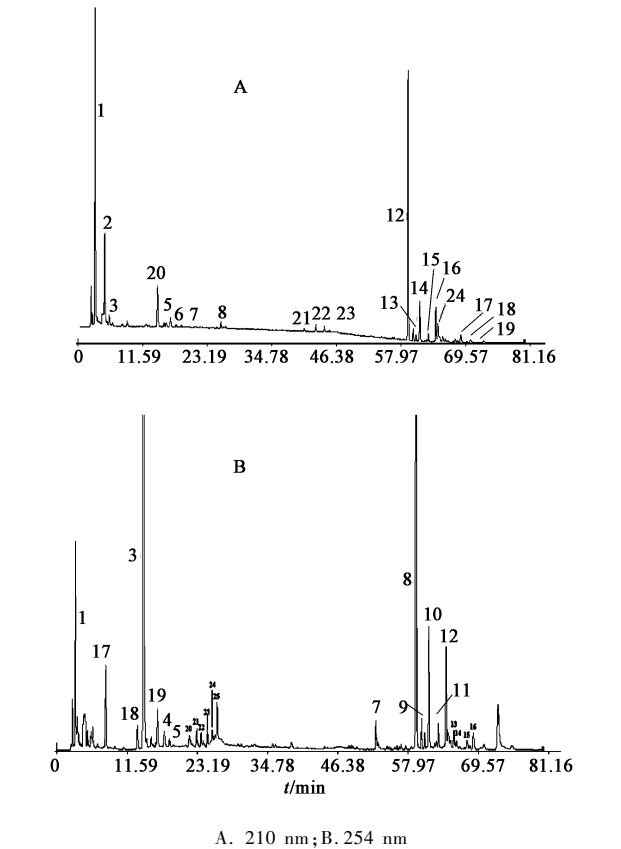


图 4 醋五味子饮片对照指纹图谱

纹图谱对照,应分别出现 19 个、16 个共有峰。10 批醋五味子饮片与对照指纹图谱的相似度均 > 98%,与标准指纹图谱对照,应分别出现 20 个、23 个共有峰。结果见表 1。

表 1 五味子,醋五味子饮片指纹图谱相似度 (210,254 nm)

饮片			醋五味子		
	R ₂₁₀	R ₂₅₄		R ₂₁₀	R ₂₅₄
S1	0.999	0.993	S1	0.978	0.903
S2	0.998	0.995	S2	0.995	0.997
S3	0.999	0.995	S3	0.998	0.996
S4	0.989	0.992	S4	0.982	0.97
S5	0.995	0.955	S5	0.992	0.991
S6	0.991	0.958	S6	0.992	0.988
S7	0.999	0.994	S7	0.994	0.981
S8	0.995	0.991	S8	0.991	0.978
S9	0.994	0.991	S9	0.996	0.998
S10	0.974	0.985	S10	0.995	0.903

在 210 nm 指纹图谱中归属了 6 个色谱峰;在 254 nm 下因柠檬酸没有吸收,所以归属了 5 个色谱峰。五味子醋制后,两个波长的指纹图谱与生品相比均有显著变化。210 nm 指纹图谱中 4 ~ 11,17 ~

19 号色谱峰面积显著降低甚至消失,同时新增了 A ~ F 等 6 个色谱峰;254 nm 图谱中 1 ~ 7,15,16 号色谱峰面积显著降低甚至消失,新增 a-n 等 14 个色谱峰,其中又以色谱峰 C(5-羟甲基糠醛)的增加幅度最为显著(图 5,6)。

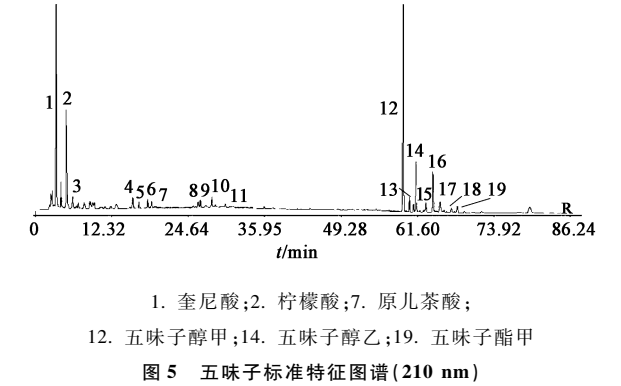


图 5 五味子标准特征图谱 (210 nm)

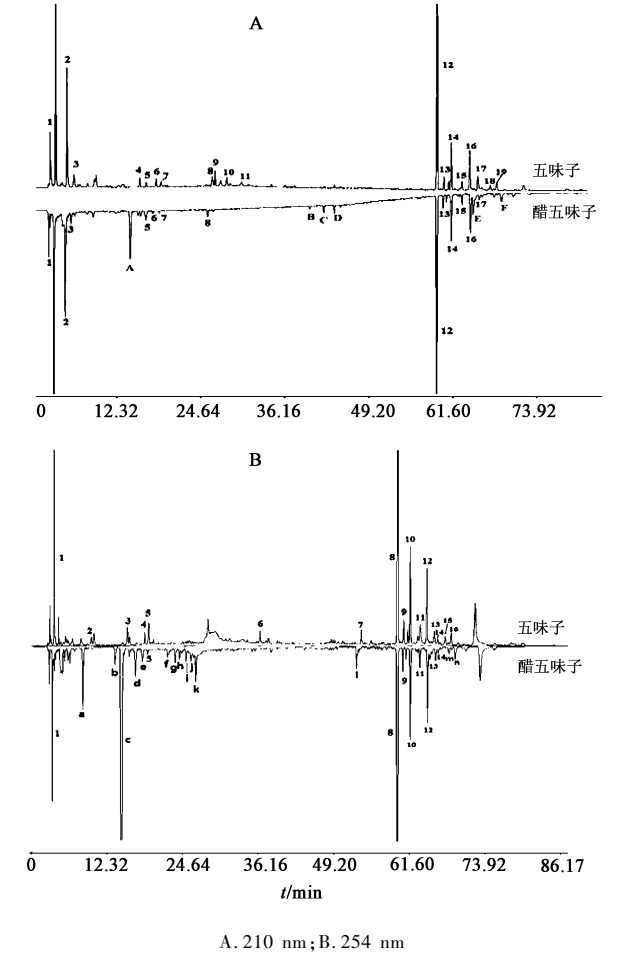


图 6 生、醋五味子指纹图谱镜像比较

3 讨论

五味子醋制前后 HPLC 指纹图谱的比较结果显示,醋制后五味子饮片化学成分组成及各色谱峰的比例都发生了显著地改变,其中以 5-羟甲基糠醛(5-

HMF)的含量变化最为明显。近年来,有大量研究^[12-17]阐述了关于 5-HMF 的来源机制及影响因素,饮片在炮制或煎煮过程中,糖类成分易发生热降解反应和 Maillard 反应而产生 5-HMF, 5-HMF 含量的高低可作为中药饮片炮制程度的一个指标成分。然而,关于 5-HMF 的药理作用一直颇有争议^[18-21],有研究报道其对人体横纹肌及内脏有损伤,具有神经毒性,能与人体蛋白结合产生积累中毒。但也有研究显示 5-HMF 具有抗氧化、抗心肌缺血、改变血液流变学以及对 CCl₄ 急性肝损伤组织有保护作用。因此,5-HMF 是否可以作为五味子饮片炮制工艺控制的关键参数还有待进一步研究,但将其作为五味子和醋五味子饮片的鉴别是切实可行的。

本文所建立的 HPLC 指纹图谱测定方法不仅为五味子生、醋饮片的鉴别提供了新的方法,而且也更为全面地反映了醋制前后饮片物质基础的变化规律,丰富了五味子饮片的质量评价内容,为进一步开展醋制与五味子功效改变的相关性研究提供参考。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国科技出版社,2010:61.

[2] 张贵君. 中药鉴定学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2009:244.

[3] 蔡宝昌. 中药炮制学[M]. 北京:中国中医药出版社,2008:264.

[4] 李丽,肖永庆,于定荣,等. HPLC 测定五味子中 3 种有机酸的含量[J]. 中国中药杂志,2011,36(23):3286.

[5] 任丽佳,黄玮,殷放宙,等. 五味子炮制前后总多糖的分析比较[J]. 南京中医药大学学报,2012,28(1):86.

[6] 陈佩东,吴玉,殷放宙. 醋蒸五味子化学成分研究[J]. 中药材,2011,34(11):1728.

[7] 周艳,祁英杰,闫小玉,等. 北五味子及其不同炮制品中 6 种木脂素类成分的含量测定[J]. 中国中药杂志,2011. 36(24):3449.

[8] 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.

[9] 李英华,吕秀阳,朱晓慧. 炮制对北五味子中 5-羟甲基糠醛含量的影响[J]. 中国现代应用药学,2010,27(11):992.

[10] 葛会奇. 五味子炮制工艺规范化及原理研究[D]. 大连:辽宁中医药大学,2007.

[11] 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.

[12] 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(11):1722-.

[13] 诸明娜,陆兔林,毛春芹,等. HPLC 测定山茱萸不同炮制品中 5-羟甲基糠醛和没食子酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):64.

[14] XU Qing, LI Ying-hua, Lü Xiu-yang. Investigation on influencing factors of 5-HMF content in Schisandra[J]. Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 2007 8(6):439.

[15] 李英华. 生脉饮中 5-HMF 来源机制及炮制对五味子中化学成分影响的研究[D]. 杭州:浙江大学,2006.

[16] 刘振丽. 何首乌炮制后化学成分的变化及中药中的 Maillard 反应[D]. 北京:中国中医科学院,2009.

[17] 李军,张丽萍,刘伟,等. 地黄清蒸不同时间 5-羟甲基糠醛含量变化研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(18):1438.

[18] 耿放,王喜军. 5-羟甲基-2-糠醛(5-HMF)在中药复方中的研究现状及相关药效探讨[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2005,7(6):52.

[19] 傅紫琴,王明艳,蔡宝昌. 5-羟甲基糠醛(5-HMF)在中药中的研究现状探讨[J]. 中华中医药学刊,2008,26(3):508.

[20] 丁霞,王明艳,余宗亮,等. 山茱萸中 5-羟甲基糠醛的分离鉴定及生物活性研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(4):392.

[21] 郭明,何玲,鲁小旺. 5-羟甲基糠醛与不同血清蛋白的结合反应机制研究[J]. 药学学报,2012,47(3):385.

[责任编辑 顾雪竹]