

中图分类号: R932; R284.1; R286.0
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.13.016

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2023)13-0072-05



基于偏最小二乘法-判别分析算法分析五味子不同炮制品 高效液相色谱指纹图谱的变化

赵李妮¹, 林波¹, 梁振纲², 方草^{1△}

(1. 海南医学院第二附属医院, 海南 海口 570102; 2. 海口海关技术中心, 海南 海口 570102)

摘要:目的 建立五味子不同炮制品高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并对其进行偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)。方法 色谱柱为 Agilent Polaris Amide-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 250 nm,进样量为 10 μL。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012A 版进行相似度分析,通过 PLS-DA 算法对炮制前后五味子指纹图谱进行分析。结果 建立了五味子炮制前后的 HPLC 指纹图谱共有模式,五味子及其炮制品醋五味子与酒五味子指纹图谱中共有峰分别有 19 个和 21 个;经相似度分析,与对应对照指纹图谱相似度均大于 0.9;经与对照品比对,指认出 6 个化合物;且 PLS-DA 分析筛选出 6 号峰(5-羟甲基糠醛)、8 号峰(五味子醇甲)、18 号峰、10 号峰(五味子甲素)、5 号峰和 19 号峰为主要差异标志物。结论 该方法可用于五味子、醋五味子及酒五味子的指纹图谱分析,为完善五味子的质量标准提供了参考。

关键词:五味子;炮制;高效液相色谱指纹图谱;相似度;偏最小二乘法-判别分析

Changes in HPLC Fingerprints of Different Processed Products of Schisandrae Chinensis Fructus Based on Partial Least Squares-Discriminant Analysis

ZHAO Lini¹, LIN Bo¹, LIANG Zhengang², FANG Cao¹

(1. The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan, China 570102; 2. Haikou Customs Technical Centre, Haikou, Hainan, China 570102)

Abstract: Objective To establish high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints of different processed products of Schisandrae Chinensis Fructus, and to analyze them by partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA). **Methods** The chromatographic column was Agilent Polaris Amide C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.05% phosphoric acid aqueous solution with gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 250 nm, and the injection volume was 10 μL. The Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Version 2012A) was used for similarity analysis, and the fingerprint of Schisandrae Chinensis Fructus before and after the processing was analyzed by the PLS-DA. **Results** A common pattern of HPLC fingerprints before and after processing of Schisandrae Chinensis Fructus was established. There were 19 common peaks in the fingerprint of Schisandrae Chinensis Fructus, and 21 common peaks in the fingerprint of vinegar-processed Schisandrae Chinensis Fructus and wine-processed Schisandrae Chinensis Fructus. Similarity analysis results showed that their similarities with their corresponding control fingerprints were higher than 0.9. Six compounds were identified by comparison with the reference substance, and peak 6 (5-hydroxymethyl furfural), peak 8 (schisandrin), peak 18 and peak 10 (deoxyschisandrin), peak 5, and peak 19 were identified as the main differential markers by the PLS-DA. **Conclusion** This method can be used for fingerprint analysis of Schisandrae Chinensis Fructus, vinegar-processed Schisandrae Chinensis Fructus, and wine-processed Schisandrae Chinensis Fructus, which can provide a reference for improving the quality standards of Schisandrae Chinensis Fructus.

Key words: Schisandrae Chinensis Fructus; processing; HPLC fingerprint; similarity; partial least squares-discriminant analysis

五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实, 又称北五味子, 具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心的功效^[1]。《本草纲目》曰“五味子, 入补药熟用, 入嗽药生用”, 五味子常用炮制品有醋五味子和酒五味子^[2]。五味子生品以敛肺止咳、生津敛汗为主, 醋制后酸涩收敛之性增强, 酒制后益肾

固精作用增强^[3]。现代研究发现, 五味子、醋五味子和酒五味子均有镇静催眠、祛痰、保肝护肝等作用, 但醋五味子和酒五味子镇静催眠作用均优于五味子生品, 祛痰作用弱于五味子生品, 同时酒五味子的保肝护肝作用较醋五味子和五味子生品强^[4-5]。故借助药物分析手段及化学计量学分析方法初步探讨五味子、醋五味子

第一作者: 赵李妮, 女, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为医院药学, (电子信箱)zhaolini008@163.com。

△通信作者: 方草, 女, 大学本科, 主任药师, 研究方向为医院药事管理与临床药学, (电子信箱)tjdaiyan@126.com。

和酒五味子化学成分的差异,可为五味子炮制及炮制品的质量控制及进一步开发利用提供数据支持。2020年版《中国药典(一部)》收载的五味子炮制品仅有醋五味子,缺少酒五味子的相关炮制及质控研究,且仅以五味子醇甲的含量作为定量分析指标,不能全面反映五味子的内在质量,以及五味子、醋五味子和酒五味子的质量变化。相关研究多集中在化学成分含量变化^[6-10],针对五味子、醋五味子和酒五味子3种炮制品指纹图谱的比较,同时采用偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)算法分析差异性成分的研究较少。本研究中收集10批五味子,获得五味子及其炮制品的色谱图,导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统2012A版分别建立五味子及其炮制品高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,通过PLS-DA比较不同炮制方法(醋制和酒制)对五味子指纹图谱的影响,以期五味子药材的研究提供实验依据。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695型高效液相色谱仪(美国沃特世科技<上海>有限公司);SECURA125-1CN型电子天平(德国赛多利斯科学仪器<北京>有限公司,精度为十万分之一);BKE-1006DHT型数控超声波清洗器(杭州博可超声波仪器有限公司,功率为300 W,频率为40 kHz);JC-FW-100型粉碎机(青岛聚创环保集团有限公司,功率为800 W,转速为26 000 r/min)。

1.2 试药

五味子醇甲对照品(批号为110857-201714,含量以99.9%计),原儿茶酸对照品(批号为110809-201205,含量以99.9%计),五味子甲素对照品(批号为110764-201915,含量以99.5%计),5-羟甲基糠醛对照品(批号为111626-201711,含量以99.4%计),五味子乙素对照品(批号为110765-201512,含量以99.0%计),柠檬酸对照品(批号为111679-201602,含量以97.0%计),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇均为色谱纯,磷酸为分析纯,水为娃哈哈纯净水;五味子药材来源于安徽省亳州市张仲景中药饮片有限公司,共10批,经海南大学药学院邓世明教授鉴定均为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Polaris Amide-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.05%磷酸水溶液(B)^[11],梯度洗脱(0~7 min时10%A,7~25 min时10%A→35%A,25~35 min时35%A→60%A,35~45 min

时60%A,45~60 min时60%A→95%A,60~70 min时95%A→10%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:250 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.2 五味子炮制品制备

五味子:除去果梗和杂质,洗净,晒干,编号为S1-S10。

醋五味子:取净五味子,按2020年版《中国药典(四部)》0213 炮制通则项下醋炙法炮制,五味子与醋的比例为100:30(*m/V*)^[12],编号为S11-S20。

酒五味子:取净五味子,按2020年版《中国药典(四部)》0213 炮制通则项下酒炙法炮制,五味子与酒的比例为100:20(*m/V*)^[13],编号为S21-S30。

2.3 溶液制备

取对照品各适量,精密称定,置100 mL容量瓶中,用甲醇溶解并配制含质量浓度分别为柠檬酸0.199 mg/mL、原儿茶酸0.250 mg/mL、5-羟甲基糠醛0.257 mg/mL、五味子醇甲0.173 mg/mL、五味子甲素0.217 mg/mL、五味子乙素0.195 mg/mL的混合对照品溶液,备用。取药材细粉1.0 g(过3号筛),精密称定,置锥形瓶中,加甲醇25 mL,精密称定,超声提取(功率为300 W,频率为40 kHz)40 min^[14-15],放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.4 方法学考察

精密度试验:取样品(编号S1),按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图,计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。结果的RSD分别小于0.76%和1.83%(*n*=6),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(编号S1),按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件分别于制备后0,2,4,8,16,24 h时进样测定,记录色谱图,计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。结果的RSD分别小于0.58%和1.97%(*n*=6),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(编号S1)6份,按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。结果的RSD分别小于0.77%和1.60%(*n*=6),表明方法重复性良好。

2.5 HPLC 指纹图谱建立

2.5.1 指纹图谱建立及相似度评价

分别取五味子(编号S1-S10)、醋五味子(编号S11-S20)和酒五味子(编号S21-S30),按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统2012A版进行分析,结果见图1。可知,五味子指纹图谱

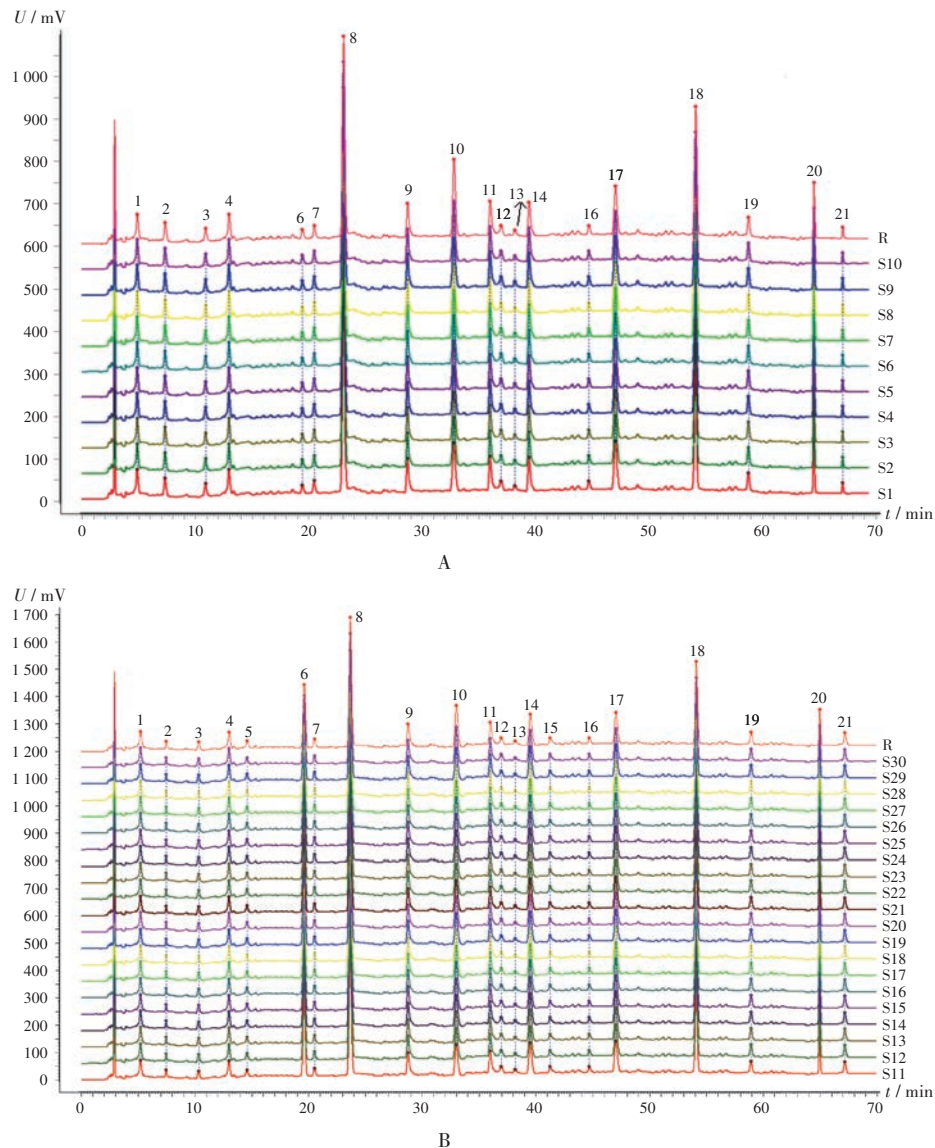


图1 五味子及其炮制品高效液相色谱指纹图谱及对照指纹图谱(R)
A. 五味子 B. 醋五味子与酒五味子

Fig. 2 HPLC fingerprints of Schisandrae Chinensis Fructus and processed Schisandrae Chinensis Fructus and their reference fingerprints (R)
A. Schisandrae Chinensis Fructus B. Vinegar - processed Schisandrae Chinensis Fructus and wine - processed Schisandrae Chinensis Fructus

共标定19个共有峰,醋五味子和酒五味子共标定21个共有峰。10批五味子与对照品指纹图谱的相似度分别为0.991, 0.993, 0.989, 0.992, 0.974, 0.967, 0.998, 0.991, 0.996, 0.982;醋五味子与对照品指纹图谱的相似度分别为0.995, 0.969, 0.987, 0.969, 0.994, 0.992, 0.989, 0.994, 0.978, 0.963;酒五味子与对照品指纹图谱的相似度分别为0.984, 0.992, 0.985, 0.974, 0.988, 0.994, 0.991, 0.988, 0.971, 0.969。

2.5.2 共有指纹峰标定与分析

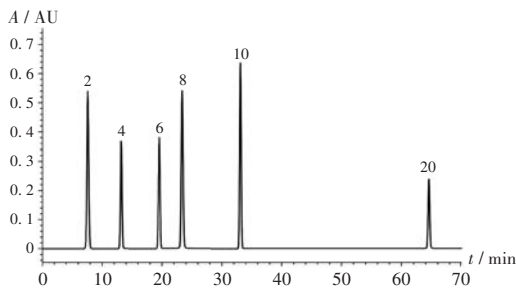
由图2可知,与混合对照品溶液色谱图保留时间比对,共标定出6个色谱峰,分别为柠檬酸(2号峰)、原儿茶酸(4号峰)、5-羟甲基糠醛(6号峰)、五味子醇甲(8号峰)、五味子甲素(10号峰)、五味子乙素(20号

峰)。五味子甲素色谱峰保留时间居中,与相邻色谱峰分离度较好,且性质稳定^[16],故以五味子甲素色谱峰作为参照,计算五味子指纹图谱中其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD分别为0.41%~1.83%($n=10$)和4.36%~41.05%($n=10$),醋五味子和酒五味子指纹图谱中其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD分别为0.67%~1.43%($n=20$)和10.52%~52.36%($n=20$),表明五味子炮制前后建立的指纹图谱共有峰保留时间相对稳定,而峰面积差异较大。

2.6 PLS-DA

2.6.1 PLS-DA模型构建

为真实、准确、形象地反映五味子与酒五味子、醋



2. 柠檬酸 4. 原儿茶酸 6. 5-羟甲基糠醛 8. 五味子醇甲
10. 五味子甲素 20. 五味子乙素

图2 混合对照品溶液高效液相色谱图

2. Citric acid 4. 3,4-Dihydroxybenzoic acid 6. 5-Hydroxymethyl
furfural 8. Schizandrin 10. Deoxyschizandrin 20. γ -Schisandrin

Fig. 2 HPLC chromatogram of the mixed reference solution

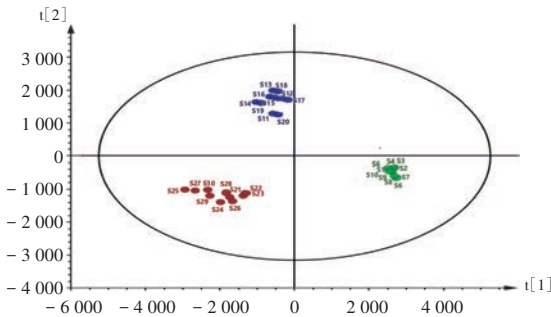


图3 PLS-DA得分散点图

Fig. 3 PLS-DA score scatter plots

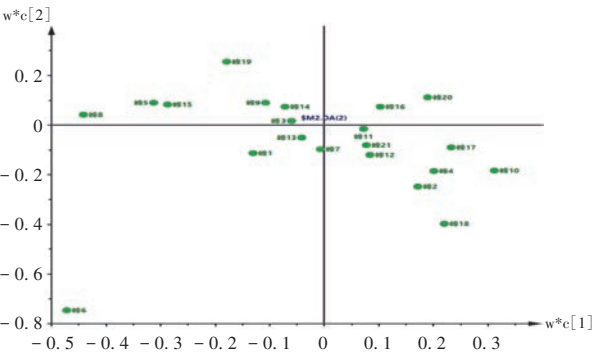


图4 PLS-DA载荷散点图

Fig. 4 PLS-DA loading scatter plots

五味子间的差异, 本研究中采用SIMCA-P 14.1统计软件, 构建共有峰峰面积矩阵 $M(X \times Y)$, 建立PLS-DA模型, 依次提取到3个主成分, 能说明94.9% X 变量和99.5% Y 变量的变化, 并拥有99.4% Q^2 预测能力^[17-19], 表明所建PLS-DA模型有较好的稳定性和预测力, 能有效判别分析五味子、醋五味子和酒五味子的差异。模型分析结果见图3至图5。

2.6.2 数据分析

由图3可知, 得分矩阵图中各点的聚焦状态反映了五味子、醋五味子和酒五味子内在质量的异同。由图4

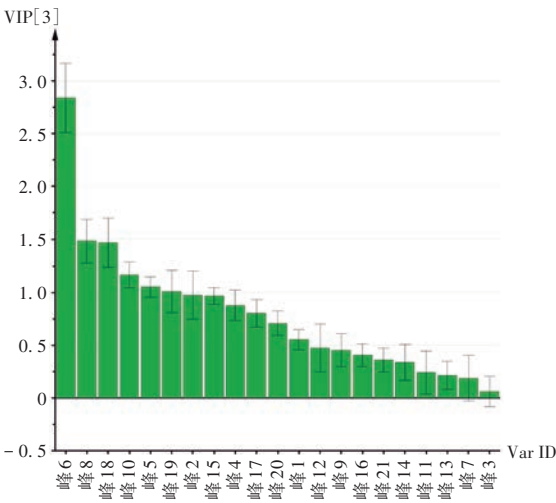


图5 PLS-DA VIP值图

Fig. 5 VIP plot of PLS-DA

可知, 载荷散点图中各点距离中心的离散程度反映该保留时间对应的共有峰峰面积对样品内在质量的影响大小, 离散度越大, 影响越大。其中, 6号和8号色谱峰离散度较大。由图5可知, 变量重要性投影(VIP)值可直观反映共有峰对样品内在质量的影响大小, VIP值大于1的变量为引起五味子、醋五味子和酒五味子间化学成分差异的主要标志物^[18]。五味子(编号S1-S10)、醋五味子(编号S11-S20)和酒五味子(编号S21-S30)各自聚为一类, 区分明显, 表明五味子、醋五味子和酒五味子化学成分的峰面积存在差异。共标记6个差异标志物, 按影响大小依次为6号峰(5-羟甲基糠醛)、8号峰(五味子醇甲)、18号峰、10号峰(五味子甲素)、5号峰和19号峰。

3 讨论

3.1 指认指标成分选择

现代药理学研究发现, 五味子的主要成分木脂素为联苯环辛烯型化合物, 结构中具有许多羟基和甲氧基, 可使蛋白质的生物学活性发生改变, 使五味子发挥肝脏保护作用。五味子中有机酸类成分含量约占10%^[4], 是五味子发挥抑制血小板聚集、抗氧化、收敛止泻、增强心血管功能等药理作用的主要活性成分, 五味子生品中葡萄糖等单糖在高温炮制过程中可转化为5-羟甲基糠醛, 且5-羟甲基糠醛具有抗心肌缺血、抗氧化、降压、改变血液流变学等药理活性, 故本研究中选择木脂素类(五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素)、有机酸类(柠檬酸、原儿茶酸)及5-羟甲基糠醛作为指认指标成分。

3.2 色谱条件优化

本研究中采用二极管阵列检测器(DAD)对供试品

溶液进行190~400 nm全波长扫描,结果于250 nm波长处指纹图谱色谱峰数量较多,基线平稳,色谱峰分离度均大于1.5,对称因子均在0.95~1.05范围内,且6个指标成分的峰形、峰高适中,故选择250 nm波长作为检测波长。曾比较乙腈-水系统、甲醇-水系统,以及添加不同浓度消尾剂(磷酸、醋酸、甲酸)的流动相系统对指纹图谱的影响,结果乙腈-0.05%磷酸水溶液(梯度洗脱)的洗脱能力、色谱峰峰形均明显优于其他流动相系统。故最终选择此流动相。

3.3 供试品处理方法优化

通过比较不同提取方法(超声、回流和冷浸)对提取效果的影响发现:加热回流对5-羟甲基糠醛稳定性影响较大,超声较冷浸时间短,效果好,故选择超声法提取。同时考察不同体积分数有机溶剂(45%,70%,100%甲醇溶液和45%,70%,100%乙醇溶液)作为提取溶剂及不同提取时间(30,40,50 min)对提取效果的影响,结果以甲醇为提取溶剂时指纹图谱色谱峰较多,6个指标成分的含量较高,提取时间为40 min时指纹图谱各色谱峰提取率最高,故选择甲醇超声提取40 min作为五味子、醋五味子和酒五味子供试品处理方法。

3.4 五味子炮制前后指纹图谱分析

五味子、醋五味子和酒五味子的指纹图谱中,五味子有19个共有峰,而醋五味子和酒五味子均标定了21个共有峰,将醋五味子和酒五味子合并建立指纹图谱共有模式,且经相似度分析,30批样品与对照指纹图谱相似度均大于0.9。以五味子甲素为参照峰,其他共有峰相对保留时间基本一致,而相对峰面积差异较大,表明指纹图谱中化学成分基本相同,但不同批次间化学成分含量有差异。由峰面积分析结果可知,醋五味子和酒五味子中五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素较五味子生品均有不同程度增加,而柠檬酸和原儿茶酸均有不同程度降低,这与醋五味子和酒五味子的镇静催眠作用增强,而祛痰作用减弱有一定相关性。本研究因条件限制仅指认了其中6个化学成分,不能全面体现其他共有峰对五味子炮制前后药理作用变化的影响,后续可考虑采用液质联用技术对共有峰进行进一步分析。

3.5 方法评价

本研究中建立的五味子及其炮制品(醋五味子、酒五味子)HPLC指纹图谱分析方法有效、准确,同时结合PLS-DA判别分析,可为五味子生熟异用的理论研究提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2020:68.
- [2] 李伟,宋永贵,刘匡一,等. UHPLC-MS^E与代谢组学技术对北五味子炮制前后化学成分迁移研究[J]. 药学学报,2016,51(9):1445-1450.
- [3] 初丽娟. 五味子炮制品的临床合理应用[J]. 内蒙古中医药,2016,35(8):99.
- [4] 田洋. 炮制对五味子有效成分的影响[J]. 当代农机,2020(10):60-62.
- [5] 李海涛. 不同炮制方法对五味子中木脂素类成分含量的影响分析[J]. 中国医药指南,2017,15(35):14-15.
- [6] 王连芝,付克,顾媛媛,等. 不同产地五味子药材色谱图谱研究[J]. 中国中医药信息杂志,2016,23(11):103-106.
- [7] 许金华,苏联麟,王巧晗,等. HPLC法测定五味子不同炮制品中柠檬酸、L-苹果酸和5-羟甲基糠醛的含量[J]. 西北药学杂志,2017,32(5):548-551.
- [8] 刘亚涛,刘芳,贺晓立,等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱测定五味子和醋五味子中8种木脂素成分含量[J]. 中国医院药学杂志,2020,40(13):1421-1427.
- [9] 向会,蔡晚霞,周巍. HPLC法同时测定不同产地五味子生品及醋炙品中5个主要活性成分的含量[J]. 中国药师,2020,23(1):186-188.
- [10] 范卓文,谢明,李晓梅,等. 东北三省不同采收期五味子HPLC指纹图谱的研究[J]. 中医药信息,2015,32(5):57-60.
- [11] 王书云,梁宏刚,黄健,等. HPLC同时测定五味子中7个木脂素类化合物的含量[J]. 中国现代中药,2019,21(4):473-477.
- [12] 刘炬灼,何凡,孙小玲. 正交试验和Box-Behnken设计-响应面法优化五味子炮制工艺比较[J]. 亚太传统医药,2019,15(11):88-91.
- [13] 李林福,张赛男,刘海清,等. 五味子炮制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(3):232-234.
- [14] 戴辉,苏杭,蔡鹏飞,等. 五味子醋蒸前后颜色及8种木脂素变化[J]. 中成药,2019,41(5):1091-1096.
- [15] 王书云,李钦,刘亚芳,等. 五味子高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 时珍国医国药,2018,29(11):2680-2683.
- [16] 李静,张培,李文尧,等. 五味子甲素研究进展[J]. 中国药业,2020,29(5):53-56.
- [17] 杨玉莹,张丹丹,罗心遥,等. 指纹图谱及多成分定量结合化学模式识别法评价不同产地青钱柳质量[J]. 中草药,2020,51(4):1082-1088.
- [18] 李永鹏,卜晨琛,宋霞,等. 酒萸肉超高效液相色谱指纹图谱的建立及化学计量分析[J]. 中国药业,2021,30(6):35-40.
- [19] 张薇,张洁,岳峰梅. HPLC指纹图谱技术结合PLS-DA在养阴清肺颗粒质量控制中的应用[J]. 中国药师,2021,24(2):218-222.

(收稿日期:2022-08-15;修回日期:2022-11-20)