

五味子降糖有效部位的 HPLC 指纹图谱研究

章曙丹^{1,2}, 徐强¹, 聂磊² (1. 山东大学药学院药物分析研究所, 济南 250012; 2. 浙江省中药研究所, 杭州 310023)

摘要: 目的 对五味子降糖有效部位提取物的 HPLC 指纹图谱进行研究, 以更有效地控制产品质量。方法 采用 HPLC 测定 10 批样品并建立标准对照指纹图谱。色谱条件: Dikma-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水, 梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长为 250 nm, 柱温为 40 ℃。结果 建立了五味子降糖有效部位的 HPLC 对照指纹图谱, 标示出 9 个共有指纹峰。结论 HPLC 指纹图谱的建立为科学评价五味子降糖有效部位的质量提供了依据, 有助于提高质量控制水平。

关键词: 五味子; 有效部位; 指纹图谱; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)07-0617-04

Study on HPLC Fingerprints of the Antidiabetic-active Fraction of Schisandrae Chinensis Fructus

ZHANG Shudan^{1,2}, XU Qiang¹, NIE Lei² (1. Research Institute of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Shandong University, Ji'nan 250012, China; 2. Research Center of Chinese Traditional Patent Medicine, Zhejiang Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the HPLC fingerprints of the antidiabetic-active fraction of Schisandrae Chinensis Fructus for better quality control. **METHODS** Ten samples were analysed to establish the standard fingerprint of the effective parts of Schisandrae Chinensis Fructus by HPLC. The chromatographic conditions were: Dikma-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column at the temperature of 40 ℃, a gradient mobile phase of methanol-water with a flow rate of 1 mL·min⁻¹, the detection wavelength was set at 250 nm. **RESULTS** A standard HPLC fingerprint of the antidiabetic-active fraction of Schisandrae Chinensis Fructus was established with 9 indicated common peaks. **CONCLUSION** The established fingerprint is reliable and sensitive which could be used in the quality evaluation and control process of Schisandrae Chinensis Fructus products.

KEY WORDS: Schisandrae chinensis Fructus; active fraction; chromatographic fingerprint; HPLC

五味子降糖有效部位是由五味子药材经 CO₂ 超临界提取而成, 其主要成分为木脂素类和挥发油类成分^[1-2]。经本课题组药理实验结果证明,

降糖功效明确^[3-4]。在前期定性定量质控方法的基础上^[5], 为更全面地评价和控制五味子有效部位的质量, 本试验对五味子有效部位的指纹图谱进行

作者简介: 章曙丹, 女, 高级工程师

Tel: (0571)85229644

E-mail: sodahz@163.com

了研究^[6]。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

PerkinElmer Series200 高效液相色谱仪: 脱气机, 四元泵, 自动进样仪, 柱温箱, Chemstation 色谱工作站; DAD 检测器。中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)(国家药典委员会)。

1.2 材料与试剂

五味子醇甲对照品(批号: 110857-200406)、五味子甲素对照品(批号: 110764-200408)、五味子乙素对照品(批号: 110765-200609), 均为含量测定用; 五味子对照药材(批号: 120922-200705), 均由中国药品生物制品检定所提供。甲醇为色谱纯(天津四友医学技术有限公司), 其它试剂为分析纯, 水为娃哈哈纯净水。10 批五味子有效部位提取样品由本所制剂室提供, 所用的 10 批药材经本所药材室鉴定均符合中国药典的规定。药材编号与样品编号一一对应。药材来源见表 1。

表 1 药材编号及来源

Tab 1 Crude material number and source

编号	来源(产地)
1	辽宁省本溪县
2	辽宁省本溪县
3	辽宁省铁岭市
4	辽宁省丹东市
5	辽宁省丹东市
6	安徽省亳州市药材市场(辽宁省新宾自治县)
7	安徽省亳州市药材市场(黑龙江省五常市)
8	安徽省亳州市药材市场(辽宁省本溪县)
9	浙江省杭州市武林药店(辽宁省沈阳市)
10	浙江省杭州市九洲大药房(辽宁省桓仁市)

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Dikma C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)-水(B)梯度洗脱, 0~20 min 甲醇 65%, 20~80 min 甲醇(65%→70%); 检测波长: 250 nm; 进样量: 20 μL; 记录时间: 80 min。

2.2 对照品溶液的制备

取真空干燥至恒重的五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素各适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 分别制成每 1 mL 含 70, 20, 40 μg 的溶液, 作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取本品 20 mg, 精密称定, 精密加甲醇 25 mL, 称定重量, 超声提取 20 min, 取出, 放冷, 再次称定重量, 加甲醇补足减失的重量, 滤过, 取续滤液适量, 以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 HPLC 图谱绘制

分别精密吸取供试品溶液与对照品溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件绘制液相色谱图。结果提示, 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应位置上, 有相同保留时间色谱峰, 并标定了 9 个与相邻组分分离度良好的共有色谱峰。

2.5 方法学考察

以五味子醇甲为参照物, 采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软件(2004A 版)对分析方法的相似度进行评价。

2.5.1 仪器精密度试验 取同一份供试品溶液, 精密吸取 20 μL, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图。结果供试品溶液 9 个主色谱峰面积的 RSD 值均小于 1.5%; 各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 1.8%, 表明本法仪器精密度较好。

2.5.2 重复性试验 精密称取 2 号样品 6 份, 按“2.3”项下方法, 分别制成供试品溶液进行分析, 记录色谱图。结果供试品溶液各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 3.0%, 表明本法重复性较好。

2.5.3 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液, 分别于 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 进样分析, 记录色谱图。结果供试品溶液各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 3.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

3 结果

3.1 五味子降糖有效部位 HPLC 指纹图谱共有模式的建立

取 1~10 号五味子有效部位样品, 按“2.3”项下方法制备供试液, 精密吸取 20 μL 按上述色谱条件进样分析, 测定其指纹图谱, 发现其中有 9 个色谱峰是 10 批样品的共有峰, 确定为五味子降糖有效部位样品的指纹图谱的共有峰, 其它峰为非共有峰, 非共有峰总面积小于总峰面积的 10%。根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》规定, 进行指纹图谱相似度比较, 建立 10

批五味子有效部位样品的共有模式图,结果见图 1 和图 2。

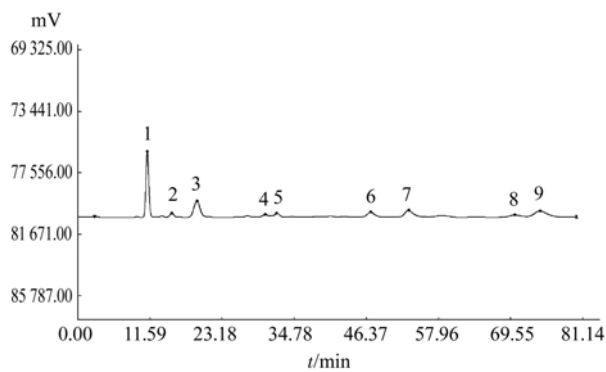


图1 五味子降糖有效部位样品 HPLC 指纹图谱共有模式图
1-五味子醇甲; 6-五味子甲素; 9-五味子乙素

Fig 1 HPLC fingerprint common pattern of the antidiabetic-active fraction of Schisandrae Chinensis Fructus
1-schisandrin; 6-deoxyschisandrin; 9-γ-schisandrin

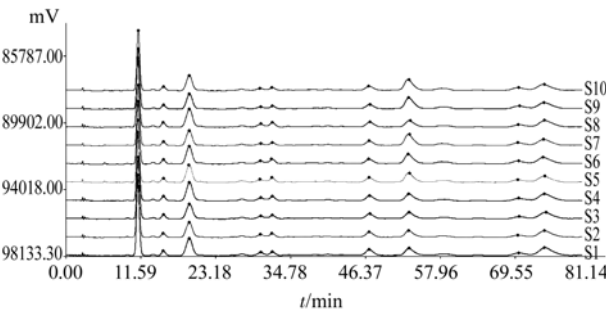


图2 10批五味子降糖有效部位样品图谱
Fig 2 The HPLC chromatogram of ten samples

表 2 五味子有效部位共有峰相对保留时间表

Tab 2 Relative retention time of common pattern peaks

样品序号	相对保留时间								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1	1.338 5	1.699 1	2.673 1	2.829 1	4.187 8	4.688 1	6.230 4	6.589 8
2	1	1.336 8	1.697 0	2.666 1	2.823 2	4.178 6	4.681 4	6.213 5	6.577 2
3	1	1.336 8	1.699 3	2.671 5	2.826 9	4.186 4	4.688 4	6.228 3	6.588 2
4	1	1.335 8	1.697 4	2.658 7	2.830 7	4.191 5	4.692 6	6.235 7	6.601 2
5	1	1.334 7	1.699 5	2.653 6	2.826 0	4.178 6	4.681 5	6.211 4	6.579 8
6	1	1.339 3	1.692 2	2.660 1	2.815 0	4.166 9	4.663 7	6.194 2	6.555 4
7	1	1.3402	1.698 5	2.658 1	2.829 8	4.189 1	4.684 2	6.219 6	6.584 6
8	1	1.338 9	1.691 3	2.649 3	2.818 7	4.171 6	4.664 4	6.196 9	6.557 4
9	1	1.336 0	1.691 9	2.641 6	2.807 3	4.160 6	4.649 5	6.174 1	6.529 2
10	1	1.335 0	1.691 8	2.658 5	2.821 9	4.168 8	4.652 7	6.176 7	6.537 8
平均值	1	1.3	1.7	2.7	2.8	4.2	4.7	6.2	6.6
RSD(%)		0.14	0.21	0.36	0.26	0.26	0.34	0.35	0.36

3.2 相关技术参数

3.2.1 共有峰的标定 取 10 批五味子有效部位样品,按“2.3”项下方法制备样品溶液,分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL,按“2.1”项下色谱条件,注入高效液相色谱仪,记录色谱图,得到不同批次的五味子有效部位样品的 HPLC 色谱图。以五味子醇甲色谱峰的保留时间与峰面积值为参照,确定基准为 1,分别计算不同批次五味子药材的色谱峰相对保留时间和相对峰面积的比值,根据色谱峰在不同样品中的共有率,结合成分分析和 HPLC 色谱图分析,标定了 9 个共有色谱峰,共有峰的相对保留时间(平均值)依次为 1.0, 1.3, 1.7, 2.7, 2.8, 4.2, 4.7, 6.2, 6.6。结果见表 2。

3.2.2 共有峰面积比值 以供试品色谱中五味子醇甲的色谱峰面积作为 1,计算各共有峰的相对峰面积。结果见表 3。

3.2.3 相似度考察

3.2.3.1 谱峰匹配 本实验根据样品相对保留时间,结合样品指纹图谱的谱峰形状特点对标定的共有峰进行匹配,共标定 9 个共有峰。

3.2.3.2 相似度计算 以共有模式为参照,通过《中药指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》计算得到各批次药材色谱指纹图谱的相似度。结果见表 4。

表 3 五味子有效部位共有峰相对峰面积表

Tab 3 Relative peak area of common pattern peaks

样品序号	相对峰面积								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1	0.088 1	0.516 5	0.056 0	0.076 4	0.182 0	0.273 3	0.126 5	0.457 6
2	1	0.086 1	0.505 8	0.053 8	0.076 5	0.177 1	0.271 6	0.122 3	0.456 9
3	1	0.085 6	0.509 5	0.054 5	0.075 4	0.179 5	0.267 6	0.118 2	0.450 9
4	1	0.085 9	0.510 6	0.054 6	0.075 4	0.177 6	0.269 1	0.133 8	0.458 3
5	1	0.085 8	0.510 6	0.055 1	0.075 2	0.183 7	0.274 4	0.141 7	0.470 6
6	1	0.087 0	0.516 3	0.055 4	0.075 2	0.183 4	0.270 4	0.141 3	0.467 2
7	1	0.084 4	0.509 5	0.054 1	0.076 2	0.189 6	0.292 2	0.135 9	0.468 9
8	1	0.089 0	0.515 0	0.055 6	0.079 1	0.188 4	0.288 2	0.141 7	0.470 0
9	1	0.086 9	0.506 7	0.055 7	0.076 0	0.187 6	0.277 6	0.145 2	0.473 9
10	1	0.085 9	0.510 3	0.057 4	0.075 7	0.187 6	0.278 5	0.143 5	0.466 6
平均值	1	0.086 5	0.511 1	0.055 2	0.076 1	0.183 6	0.276 3	0.135 0	0.464 1

表 4 样品相似度测定结果

Tab 4 Similarity analysis results of samples

编号	批 号	相似度
1	20091115	0.996
2	20091118	0.996
3	20091203	0.996
4	20091226	0.999
5	20100106	0.998
6	20100108	0.998
7	20100110	0.997
8	20100111	0.997
9	20100112	0.999
10	20100113	0.998

结果可见, 10 批次五味子有效部位样品指纹图谱的共有色谱峰相似系数均在 0.990 以上, 表明 10 批样品间具有较高的相似度。

4 讨论

对文献报道的几种分离效果较好的流动相进行了比较, 如乙腈-水、乙腈-甲醇-水, 甲醇-水等, 结果以甲醇-水梯度洗脱分离效果最好, 各色谱峰达到基线分离。

参考中国药典及相关文献^[7-10], 并根据本品主要成分的特点, 实验中采用 DAD 分别在 200, 240, 250, 280 nm 等处检测以确定合适的检测波长。结果表明, 低波长处基线漂移较严重, 而在 250 nm 处则可以检出相对较多的成分, 且杂质干扰少, 各组分之间分离度好, 故采用 250 nm 为检测波长。

本实验在前期对药材及中间体质量控制和指纹图谱研究的基础上, 展开对五味子降糖有效部位的指纹图谱研究。目前还未见五味子有效部位指纹图谱研究的相关报道。与已有文献报道的五味子指纹图谱相比, 本文研究的指纹图谱建立在

降糖药效的基础上, 与现有五味子药材指纹图谱普遍只关注化学成分有所区别, 可以为成品及同类产品的质量评价提供参考。

REFERENCES

- [1] YU Q, YANG S B, ZHANG S D, et al. Study on increasing lignan and essential oil content for fruits of *Schisandra chinensis* by supercritical CO₂ fluid extracting [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2007, 24(5): 377-379.
- [2] YANG S B. Study on supercritical CO₂ fluid extraction and separation of components from fruits of *Schisandra sphenanthera* [J]. China J Chin Meter Med(中国中药杂志), 2001, 26(11): 755-757.
- [3] CHAI K F, YANG S B, YANG M H. Study on effect of Tangke soft gel capsule on rats blood glucose [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol(中国中医药科技), 2006, 13(1): 22-23.
- [4] CHAI K F, YANG M H, YANG S B. Study on effect of Tangke soft gel capsule on blood glucose of different rats mode [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中医学刊), 2005, 23(4): 589-591.
- [5] XU L L, ZHANG S D, YANG S B. Identification and determination of qualitative research for extraction of *Schisandra chinensis*(Turcz.) Baill. [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2009, 26(6): 465-466.
- [6] Technical Requirement of the Fingerprint in Injection of Chinese Materia Medica(Tentative Standard)(中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)) [S]. 2001: 1-10.
- [7] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 44-45.
- [8] TAN C M, HUANG Q W. Study on the HPLC fingerprints of *Schisandrae chinensis* and *Fructus Schisandrae Sphenantherae* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2008, 25(6): 514-517.
- [9] FENG W, HAN H Y. HPLC fingerprints of water-soluble composition in *Fructus Schisandrae Chinensis* [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2006, 28(4): 477-479.
- [10] YU J, CUI B J, ZHANG X R. Study on preparation process for Wuweizi dropping pills [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(4): 326-329.

收稿日期: 2011-08-20