

超高效液相色谱法测定不同种质资源五味子藤茎中 5 种黄酮类成分的含量

金银萍, 王英平, 王振兴, 郭靖, 艾军*

中国农业科学院特产研究所, 长春 130112

摘要: 建立超高效液相色谱法同时检测五味子藤茎中芦丁、金丝桃苷、槲皮素-3-O-葡萄糖、槲皮素-3-O-木糖和槲皮素的含量, 并比较不同种质资源五味子藤茎中 5 种黄酮类成分的含量差异。采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 5.0 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 0.1% 磷酸水溶液-乙腈进行梯度洗脱, 检测波长为 360 nm 流速为 0.35 mL/min, 柱温为 30 °C。在该色谱条件下, 五味子藤茎中的 5 种黄酮类成分能得到较好的分离, 方法的加标回收率在 96.83% ~ 102.2%, RSD < 3%。19 种不同种质资源间五味子藤茎的黄酮类成分含量存在较大差异, 其中 94-9-2、130-9-3 和 99-8-7 显著优于其他品系, 94-9-2 品系最佳。该方法操作简便, 可为五味子藤茎的质量控制提供参考, 同时为五味子的种质资源收集和品种选育提供理论参考。

关键词: 五味子; 黄酮; 种质资源; UPLC

中图分类号: R283.6/R284.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.1.011

Simultaneous Determination of Five Flavonoids Ingredients in the Stems of *Schisandra chinensis* from Different Germplasm Resources by UPLC

JIN Yin-ping, WANG Ying-ping, WANG Zhen-xing, GUO Jing, AI Jun*

Institute of Special Wild Economic Animals and Plants, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China

Abstract: An UPLC method was established for simultaneous determination of five flavonoids in the stems of *Schisandra chinensis*, including rutin, hyperoside, quercetin-3-O-glucoside, quercetin-3-O-xyloside and quercetin. This method was then used to determine the contents of flavonoids in the stems of *S. chinensis* from different germplasm resources. The five compounds were analyzed simultaneously with an ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 5.0 mm, 1.7 μm) column by gradient elution using 0.1% (v/v) phosphoric acid-acetonitrile as the mobile phase at the flow rate of 0.35 mL/min; The detection wavelength was set at 360 nm, and the column temperature was maintained at 30 °C. The five flavonoids ingredients of *S. chinensis* can be separated in the chromatographic conditions. The recoveries of five components were 96.83% ~ 102.15%, with RSD less than 3%. The contents of flavonoids in the stems of *S. chinensis* from 19 different germplasm resources had significant differences; 94-9-2, 130-9-3 and 99-8-7 were significantly better than other strains, 94-9-2 was the best. This method was easy to operate and could provide a reference for the quality control of the stem of *S. chinensis*, and provided theoretical reference for the collection and breeding of *S. chinensis* germplasm resources.

Key words: *Schisandra chinensis*; flavonoid; germplasm resource; UPLC

五味子藤茎为五味子科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥藤茎, 民间常采用五味子藤茎晒干代花椒做调味品, 习称“山花椒藤”。五味子果实入药, 具有收敛固涩, 益气生津, 补肾宁心的功效^[1]。目前, 国内外对五味子的研究开发多集中于果实, 而对藤茎的研究很少。随着野生五味

子资源逐年减少与需求的不断增加, 五味子人工栽培已经成为主流, 然而价格受市场波动影响较大。目前, 五味子开发还不全面, 市场上多是使用果实, 或以果实提取物为加工原料, 种植户也仅是靠采收出售果实盈利。近年来的科学研究表明, 五味子藤茎和叶不仅含有与果实相同的活性成分木脂素, 还含有大量的酚酸和黄酮类成分^[2,3], 具有很强的抗氧化活性^[4,5], 可以作为活性成分的提取原料, 且相比五味子果实, 具有价格低廉、资源丰富的优点。通过对五味子藤茎的综合开发利用, 将具有可观的经

收稿日期: 2017-09-26 接受日期: 2017-11-02

基金项目: 吉林省科技厅科技成果转化项目(20170309012YY)

* 通信作者 Tel: 86-431-81919827; E-mail: aijun1005@163.com

济效益和良好的发展前景,对稳定五味子的价格,保障种植户的经济收入,保持五味子产业的快速健康发展,具有重要的意义。

本试验共收集了19种五味子优秀品系,其中包括新鉴定的新品种“嫣红”,以及从吉林省各道地产区收集到的18种品系,目前均种植于通化国家农业科技产业园五味子优良种苗示范推广基地。本文首次建立了五味子藤茎中5种黄酮类成分含量测定的方法,并对19种不同种质资源五味子藤茎中黄酮类成分的含量进行了测定,该方法简便易行,可为五味子藤茎的质量控制及五味子的综合开发利用提供参考,同时为五味子的种质资源收集和品种选育提供理论依据。

1 仪器与材料

ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);CPA225D 电子天平(德国 Sartorius 公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

芦丁(批号:Y19N7S25244,纯度 $\geq 98\%$)、金丝桃苷(批号:Y20J7X9353,纯度 $\geq 98\%$)、槲皮苷(批号:P01M8F30364,纯度 $\geq 98\%$)购自上海源叶生物有限公司,槲皮素-3-O-葡萄糖(批号:16051121,纯度 $\geq 98\%$)、槲皮素-3-O-木糖(批号:17033129,纯度 $\geq 98\%$)购自上海同田生物技术股份有限公司,槲皮素(批号:4284,纯度99.2%)、山奈酚(批号:1367,纯度99.6%)购自上海诗丹德生物有限公司。

乙腈(美国 Fisher 公司),水为纯净水。实验用的五味子藤茎采自通化国家农业科技产业园五味子优良种苗示范推广基地,经艾军研究员鉴定为五味子科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的藤茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C_{18} (2.1 mm \times 5.0 mm, 1.7 μ m),流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱程序:0~5 min, 14% A; 5~6 min, 14%~30% A; 6~7 min, 30%~42% A; 7~8 min, 42%~95% A; 8~10 min, 95%; 10~11 min, 95%~14% A; 11~13 min, 14% A。流速 0.35 mL/min,检测波长 360 nm,柱温 30 $^{\circ}$ C,进样量 1.0 μ L。

2.2 对照品溶液制备

分别配制一定浓度的芦丁、金丝桃苷、槲皮素-

3-O-葡萄糖、槲皮素-3-O-木糖、槲皮苷、槲皮素和山奈酚储备液,再分别移取一定体积的储备液于 50 mL 棕色容量瓶内,加入甲醇定容至刻度,摇匀备用,得到混合对照品溶液。混合对照品溶液中各成分的含量分别为:芦丁 90.0 μ g/mL、金丝桃苷 54.0 μ g/mL、槲皮素-3-O-葡萄糖 78.0 μ g/mL、槲皮素-3-O-木糖 30.0 μ g/mL、槲皮苷 33.0 μ g/mL、槲皮素 63.0 μ g/mL 和山奈酚 37.5 μ g/mL。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取五味子藤茎药材粉末(过四号筛)2.0 g,用滤纸包好,置于 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 50 mL 甲醇,超声提取(500 W, 40 kHz)3 次,每次 30 min,滤过,合并滤液,减压浓缩至干,加入适量蒸馏水溶解,用石油醚萃取,弃去萃取液,将水层减压浓缩至干,加甲醇定容至 25 mL 棕色容量瓶内,摇匀,即得。

2.4 专属性考察

取对照品溶液和供试品溶液各 1.0 μ L,按“2.1”项下色谱条件,进行测定分析,芦丁、金丝桃苷、槲皮素-3-O-葡萄糖、槲皮素-3-O-木糖、槲皮苷、槲皮素和山奈酚的保留时间分别为 1.721、1.853、2.023、2.427、3.505、6.444、6.920 min,色谱图如图 1 所示。

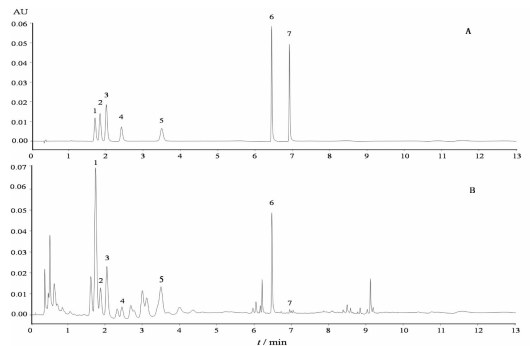


图 1 混合对照品溶液(A)与(B)五味子藤茎样品的 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of mixed substances (A) and sample of *S. chinensis* stems (B)

注:1 芦丁;2 金丝桃苷;3 槲皮素-3-O-葡萄糖;4 槲皮素-3-O-木糖;5 槲皮苷;6 槲皮素;7 山奈酚

Note:1 rutin;2 hyperoside;3 quercetin-3-O-glucoside;4 quercetin-3-O-xyloside;5 quercitrin;6 quercetin;7 kaempferol

2.5 线性关系考察与检测限(LOD)、定量限(LOQ)

精密吸取混合对照品储备液适量,稀释配制一系列浓度梯度的对照品溶液。按照“2.1”项下的色

谱条件进行测定。以色谱峰峰面积为纵坐标 Y、对照品浓度为横坐标 X ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 绘制标准曲线, 结果表明这 7 种黄酮类成分在一定浓度范围内线性关系

良好。各黄酮类成分的检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 由 3 倍和 10 倍信噪比计算而来。具体如表 1 所示。

表 1 五味子藤茎中 7 种黄酮类成分的线性关系考察

Table 1 Results of linear ranges of seven flavonoids in the stems of *S. chinensis*

对照品 Reference substances	线性方程 Regression equation	线性范围 Linear range ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	相关系数 r^2	LOD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
芦丁 Rutin	$Y = 2680X + 5880$	12.0 - 90.0	1	0.267	0.888
金丝桃苷 Hyperoside	$Y = 5720X + 5350$	7.2 - 54.0	0.9999	0.12	0.4
槲皮素-3-O-葡萄糖 Quercetin-3-O-glucoside	$Y = 5640X + 7820$	10.4 - 78.0	0.9999	0.132	0.44
槲皮素-3-O-木糖 Quercetin-3-O-xyloside	$Y = 6780X + 3210$	4.0 - 30.0	0.9999	0.191	0.637
槲皮苷 Quercitrin	$Y = 7370X + 3450$	4.4 - 33.0	0.9999	0.866	0.289
槲皮素 Quercetin	$Y = 10500X + 8500$	8.4 - 63.0	0.9999	0.037	0.122
山奈酚 Kaempferol	$Y = 14600X + 5720$	5.0 - 37.5	0.9998	0.041	0.138

2.6 精密度试验

取混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 进样量 $1.0 \mu\text{L}$, 测定峰面积, 计算得芦丁、金丝桃苷、槲皮素-3-O-葡萄糖、槲皮素-3-O-木糖、槲皮苷、槲皮素和山奈酚的峰面积 RSD 分别为 0.41%、0.56%、0.37%、0.62%、0.74%、0.45% 和 0.59%, 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一五味子藤茎供试品溶液, 室温下放置, 分别于 0、2、4、6、8、10 h 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 结果芦丁、金丝桃苷、槲皮素-3-O-葡萄糖、槲皮素-3-O-木糖和槲皮素的峰面积 RSD 分别为 1.15%、1.43%、1.39%、2.03% 和 2.41%, 表明供试品溶液在 10 h 内稳定性较好。

2.8 重复性试验

分别精密称取同一五味子藤茎样品 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件进行测定, 结果芦丁、金丝桃苷、槲皮素-3-O-葡萄糖、槲皮素-3-O-木糖和槲皮素的峰面积 RSD 分别为 1.37%、2.03%、1.85%、2.16% 和 2.26%, 表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取已知含量的五味子藤茎样品 6 份, 加入混合对照品适量, 按“2.3”项下方法制备加样供试品溶液, 测定, 结果显示各成分的加样回收率和 RSD 分别为: 芦丁 98.3%、2.12%, 金丝桃苷 97.83%、2.33%, 槲皮素-3-O-葡萄糖 96.83%、2.94%, 槲皮素-3-O-木糖 102.15%、2.89% 和槲皮

素 98.11%、2.70%。

2.10 含量测定

按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 测定样品。试验结果表明, 芦丁、金丝桃苷、槲皮素-3-O-葡萄糖、槲皮素-3-O-木糖、槲皮素和山奈酚分离度良好, 而槲皮苷峰型不好, 有间峰, 经 HPLC-MS 分析, 此处为槲皮苷和 kaempferol-3-glucoside 的混合物, 经多次更改条件仍无法达到基线分离, 因此在统计含量时未作计算。在 19 种五味子藤茎种质资源中, 检测到山奈酚的存在, 但含量极微, 未作统计。

芦丁、金丝桃苷、槲皮素-3-O-葡萄糖、槲皮素-3-O-木糖和槲皮素的含量与黄酮总计的变化趋于一致, 不同种质资源间五味子藤茎的黄酮类成分含量存在较大差异, 其中 94-9-2、130-9-3 和 99-8-7 显著优于其他品系, 94-9-2 品系最佳。具体如表 2 所示。

3 讨论

目前, 有关五味子藤茎中黄酮类成分的研究鲜有报道^[2,3,6], 因此本文主要参照五味子果实、叶中的黄酮类成分^[2,3], 选用芦丁、金丝桃苷、槲皮素-3-O-葡萄糖、槲皮素-3-O-木糖、槲皮苷、槲皮素和山奈酚等 7 种对照品进行测定, 并分析 19 种不同种质资源五味子藤茎中黄酮类成分的含量。不同种质资源间五味子藤茎的黄酮类成分含量存在较大差异, 其中 94-9-2、130-9-3 和 99-8-7 显著优于其他品系, 94-9-2 品系最佳。

在进行黄酮类成分的含量测定方法建立时, 摸

表2 不同种质资源五味子藤茎中5种黄酮成分的含量(mg/g, n=3)

Table 2 Contents of five flavonoids ingredients in the stems of *S. chinensis* from different germplasm resources(mg/g, n=3)

品系 Strain	芦丁 Rutin	金丝桃苷 Hyperoside	槲皮素-3-O-葡萄糖 Quercetin-3-O-glucoside	槲皮素-3-O-木糖 Quercetin-3-O-xyloside	槲皮素 Quercetin	总含量 Total content
18-10-3	0.615	0.063	0.135	0.013	0.051	0.877
84-7-2	0.909	0.071	0.152	0.013	0.081	1.227
A118-8-5	1.055	0.087	0.199	0.024	0.125	1.491
99-8-7	1.349	0.127	0.234	0.034	0.116	1.86
黄果	0.75	0.068	0.126	0.023	0.054	1.02
156-5-2	0.752	0.064	0.132	0.017	0.081	1.046
白果	0.715	0.076	0.149	0.016	0.102	1.058
A71-8-5	0.783	0.088	0.158	0.027	0.11	1.165
130-9-6	1.32	0.125	0.247	0.031	0.166	1.888
137-3-3	0.824	0.089	0.157	0.021	0.083	1.175
142-1-5	0.61	0.061	0.133	0.013	0.051	0.868
82-5-6	0.788	0.069	0.148	0.013	0.064	1.081
158-11-6	0.865	0.058	0.12	0.017	0.066	1.127
94-9-2	1.712	0.143	0.264	0.021	0.094	2.234
171-1-4	0.657	0.047	0.108	0.017	0.054	0.884
早红	0.93	0.078	0.147	0.014	0.069	1.239
20-28-1	1.114	0.087	0.169	0.029	0.06	1.458
17-11-3	0.785	0.075	0.169	0.02	0.134	1.183
嫣红	0.981	0.074	0.162	0.017	0.107	1.34

索流动相中磷酸的配比,分别对比了1‰、0.5‰、0.1‰等不同配比,结果表明,标准品的峰型差异不明显,但是样品的峰型有些许差异,考虑到整体峰型效果,选择低浓度的磷酸比例效果好一些,推测可能是因为五味子样品溶液中成分相对复杂,干扰成分多,而黄酮类成分所占比例小,因此低浓度的酸配比即可。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015, Vol I;66.
- 2 Mocan A, Schafberg M, Crisan G, et al. Determination of lignans and phenolic components of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. using HPLC-ESI-ToF-MS and HPLC-online TEAC; Contribution of individual components to overall an-

tioxidant activity and comparison with traditional antioxidant assays[J]. *J Funct Foods*, 2016, 24: 579-594.

- 3 Mocan A, Crisan G, Vlase L, et al. Comparative studies on polyphenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Schisandra chinensis* leaves and fruits [J]. *Molecules*, 2014, 19: 15162-15179.
- 4 Oroian M, Escriche, I. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis [J]. *Food Res Int*, 2015, 74: 10-36.
- 5 Hou W (侯微), Wei ZB (魏忠宝), Jiang YL (姜艳玲), et al. Antioxidant activity of the roots and stems from *Schisandra chinensis in vitro* [J]. *Jilin J Tradit Chin Med* (吉林中医药), 2010, 30: 1086-1088.
- 6 Liu JX (刘俊霞), Hou W (侯微), Dou FM (窦凤鸣), et al. Chemical constituents of n-butanol fraction from stems of *Schisandra chinensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2015, 46: 1878-1882.