

文章编号: 1006-2858(2008)08-0650-06

评价五味子和南五味子质量的 GC 指纹图谱的建立与分析

沈振铎, 陈晓辉, 熊 丽, 毕开顺
(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立评价五味子和南五味子质量的 GC 指纹图谱分析和鉴定方法。方法 利用 GC 方法测定了 26 批五味子药材, 其中 14 批为北五味子, 12 批为南五味子。样品采用水蒸气蒸馏法进行挥发油提取。气相色谱条件: DB-17 石英毛细管色谱柱 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm), 氢火焰离子化检测器 (FID), 进样口温度 230 °C, 检测器温度 250 °C, 柱温以 50 °C 为起始温度, 保持 2 min, 以 10 °C·min⁻¹ 升温至 130 °C, 保持 20 min, 以 30 °C·min⁻¹ 升温至 190 °C, 保持 6 min, 以 10 °C·min⁻¹ 升温至 210 °C, 保持 3 min。载气为氮气, 流速为 1.2 mL·min⁻¹, 进样方式为分流进样, 分流比 50:1, 进样量为 1 μL。结果 确定了北五味子挥发油类成分中的 28 个共有峰, 南五味子挥发油类成分中的 16 个共有峰。根据聚类分析和相似度分析结果, 将北五味子药材分为 2 类, 南五味子药材分为 2 类。同时利用指纹图谱方法对南、北五味子进行了鉴别。结论 本方法可为科学评价与鉴定五味子药材质量提供方法。

关键词: 五味子; 挥发油; 指纹图谱

中图分类号: R 94 文献标志码: A

五味子系木兰科植物 (Magnoliaceae) 五味子 (*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.) 或华中五味子 (*Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils.) 的干燥成熟果实^[1], 是常用中药材之一, 具有敛肺生津, 补肾养心, 收敛固涩之功效^[2]。五味子主要含有木脂素类、挥发油类成分, 尚含糖类、脂肪酸和维生素等^[3]。目前人们对五味子的研究大部分都集中在木脂素上, 而对挥发油的研究比较少^[4]。据文献报道挥发油中含大量倍半萜烯成分, 王炎等通过对北五味子挥发油的 GC-MS 研究鉴定出衣兰烯、柠檬烯、乙酸龙脑酯和蒎烯为其主要成分^[5]。其中柠檬烯、乙酸龙脑酯和蒎烯有着重要的药理作用^[6-9], 因此对挥发油研究有重要意义。北五味子与南五味子外观、气味、性状极其相似, 经常混淆, 但二者所含成分确有较大区别, 从二者木脂素类成分的指纹图谱就可以进行鉴别^[10-11]。为了更好的控制与鉴别北五味子与南五味子, 本文作者首次对五味子挥发性成分进行了指纹图谱研究, 并对二者进行了鉴别, 以防市场上的混淆, 为五味子进一步开发利用提供参考。

1 仪器与材料

Agilent 6890 毛细管气相色谱仪 (美国 Agilent 公司), 氢火焰离子检测器 (FID) (美国 Agilent 公司), HP CORE 色谱工作站 (美国 Agilent 公司)。

蒎烯对照品 (批号为 070202, 含量质量分数 > 96%, 上海友思生物技术公司), 蒎烯对照品 (批号为 070203, 含量质量分数 > 96%, 上海友思生物技术公司), 月桂烯对照品 (批号为 070301, 含量质量分数 > 85%, 上海友思生物技术公司), 柠檬烯对照品 (批号为 A0226819, 含量质量分数 > 97%, 北京百灵威公司), 乙酸龙脑酯对照品 (批号为 110759, 含量质量分数 > 99%, 中国药品生物制品检定所), 重蒸水为自制, 正己烷 (色谱纯, 天津康科德科技有限公司), 无水硫酸钠 (天津大茂化学试剂厂)。

不同产地五味子药材共 26 批 (来源见表 1), 其中 14 批 (1~14) 为北五味子, 12 批 (15~26) 为南五味子, 药材经沈阳药科大学中药学院孙启时

收稿日期: 2007-10-24

作者简介: 沈振铎 (1981-) 男 (汉族), 吉林四平人, 硕士研究生; 毕开顺 (1956-) 男 (汉族), 河北唐山人, 教授, 主要从事药物分析和中药现代化的研究, Tel. 024-23986016, E-mail bikashun@yahoo.com.

教授鉴定其原植物为 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 和 *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils.。样品预处理:样品粉碎过 350 μm 筛,置广口瓶中,干燥阴凉处密闭保存。

Table 1 Sources of samples collected

No.	Source	No.	Source
1	Liaoning Jinzhou	14	Liaoning 1
2	Liaoning Tieling	15	Shanxi Fengxian
3	Liaoning 3	16	Guangdong 2
4	Jilin	17	Sichuan 1
5	Liaoning 2	18	Hu nan Hengshan
6	Liaoning Huairenwulidianzi	19	Yunnan Tonghai
7	Liaoning Dandong	20	Sichuang 2
8	Liaoning Huairenheigou	21	Guangxi Longsheng
9	Jilin Gongzhuling	22	Shanxi Baoji
10	Jilin Baishan	23	Guangdong 1
11	Jilin Dunhua	24	Yunnan Lijiang
12	Heilongjiang Qitaihe	25	Fujian
13	Heilongjiang Haerbin	26	Gansu

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性

色谱柱:DB-17 石英毛细管色谱柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm);进样口温度:230 ;检测器温度:250 ;柱温:50 为起始温度,保持 2 min,以 10 $\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 130 ,保持 20 min,以 30 $\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 190 ,保持 6 min,以 10 $\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 210 ,保持 3 min。载气:氮气;流速:1.2 mL $\cdot\text{min}^{-1}$;进样方式:分流,分流比 50 :1;进样量:1 μL 。理论板数按乙酸龙脑酯计算大于 50 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

分别取 α -蒎烯、 β -蒎烯、月桂烯、柠檬烯和乙酸龙脑酯对照品适量,精密称定,用正己烷溶解并稀释成质量浓度为 2.078、1.034、20.100、1.675、9.800 g L^{-1} 的溶液。

2.2.2 样品溶液的制备

取各批药材约 30 g,精密称定,按《中华人民共和国药典》2005 年版(一部)附录 XD 甲法提取各样品的挥发油^[12],加适量无水硫酸钠脱水,振摇,静置,过夜。将脱水后的挥发油置 5 mL 量瓶

中,加正己烷溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验

精密吸取南五味子(No. 22)和北五味子(No. 5)药材供试品溶液 1 μL ,分别在上述色谱条件重复进样 5 次,记录色谱指纹图谱。结果表明,各共有色谱峰与内参比峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 4.1%。

2.3.2 重复性试验

分别取南五味子样品(No. 22)和北五味子样品(No. 5)各 5 份,精密称定,按“2.2.2”条制备供试品溶液,分别在上述色谱条件进样分析,计算各色谱峰与内参比峰的相对保留时间和相对峰面积,其 RSD 均小于 4.6%。

2.3.3 稳定性试验

精密吸取南五味子(No. 22)和北五味子(No. 5)供试品溶液 1 μL ,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样分析,计算各色谱峰与内参比峰的相对保留时间和相对峰面积,其 RSD 均小于 4.9%,结果表明,样品溶液在 24 h 内稳定。

2.4 五味子药材指纹图谱的绘制

根据 14 批不同产地的北五味子供试品指纹图谱(见图 1)的检测结果,共确定了 28 个共有峰(见图 2),其中指认了 5 个色谱峰(见图 3): α -蒎烯(1)、 β -蒎烯(3)、月桂烯(4)、柠檬烯(6)和乙酸龙脑酯(13)。将乙酸龙脑酯(13)作为内参比峰,以其色谱峰对内参比峰的相对保留时间和相对峰面积定性。根据 12 批不同产地的南五味子供试品指纹图谱(见图 4)的检测结果,共确定了 16 个共有峰(见图 5),其中上述 5 种对照品未检测到或含量极低。将 6 号峰作为内参比峰,以其色谱峰对内参比峰的相对保留时间和相对峰面积定性。

2.5 药材评价与鉴定方法的建立

2.5.1 聚类分析

本研究应用 SPSS 软件,采用离差平方和(Ward's)法,利用夹角余旋(Cosine)作为样品测度,14 批北五味子样品可以分为 2 类,第 1 类包括 No. 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12;第 2 类包括 No. 13、14;12 批南五味子样品可分为 2 类,第 1 类包括 No. 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25;第 2 类包括 No. 26。聚类分析见图 6、7。

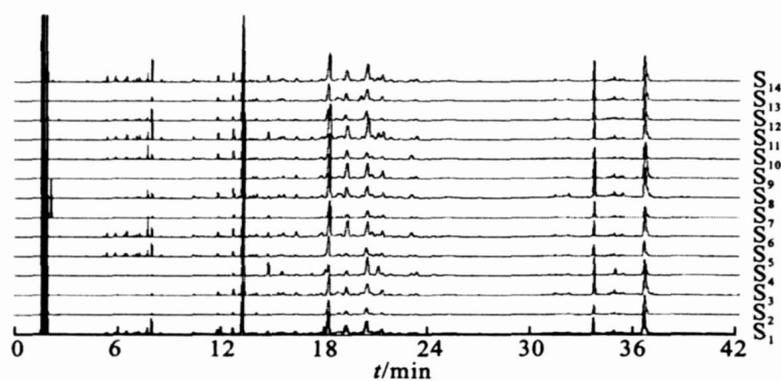


Fig. 1 Fingerprint of 14 different samples for *Schisandra chinensis*(Turcz.) Baill.

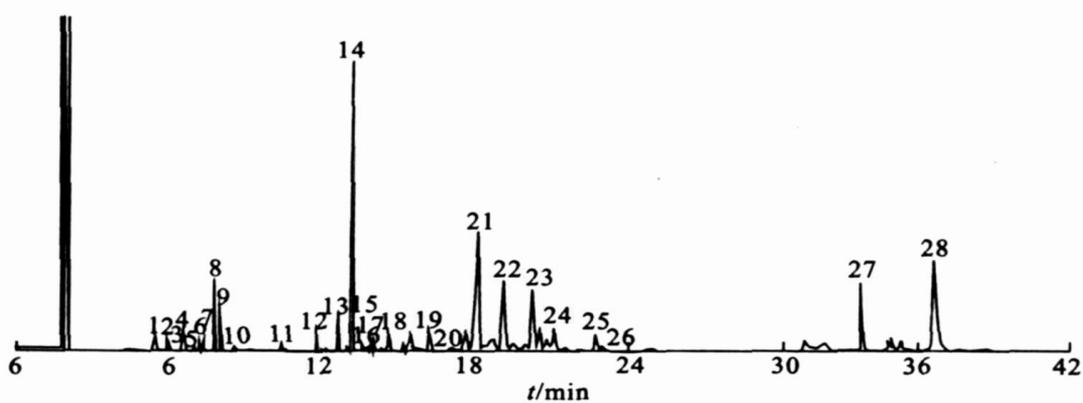
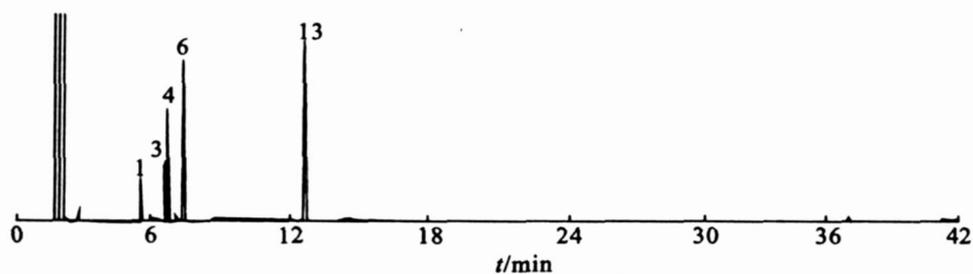


Fig. 2 Standard fingerprint of *Schisandra chinensis*(Turcz.) Baill.



1 — Pinene; 3 — Pinene; 4 — Myrcene; 6 — Limonene; 13 — Bornyl acetate

Fig. 3 Chromatograms of reference substances

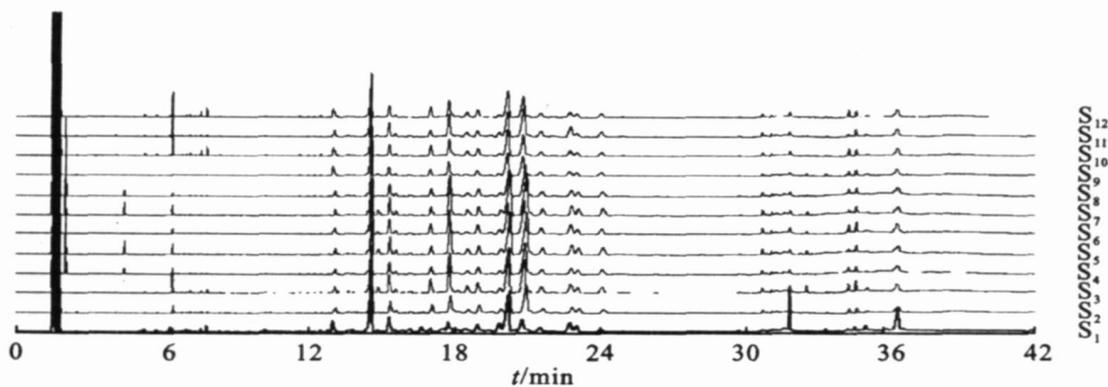


Fig. 4 Fingerprint of 12 different samples for *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils

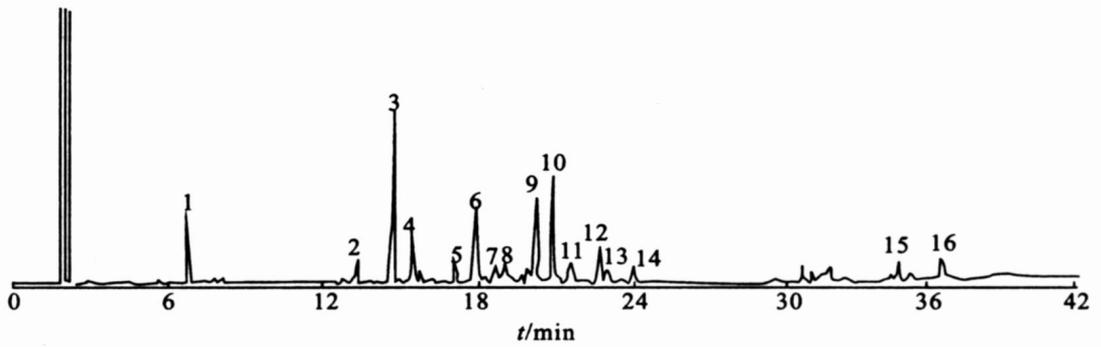


Fig. 5 Standard fingerprint of *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils

Dendrogram using Ward Method

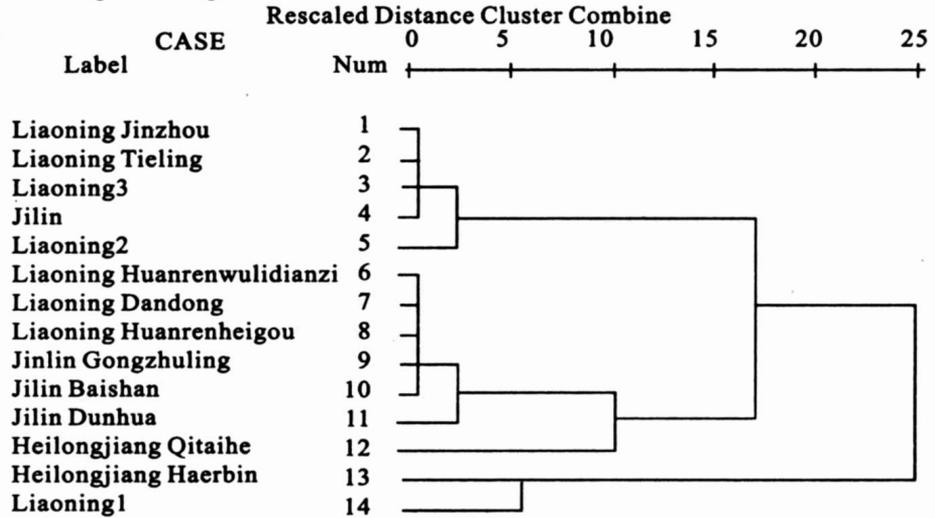


Fig. 6 Hierarchical cluster analysis of *Schisandra chinensis*(Turcz.) Baill.

Dendrogram using Ward Method

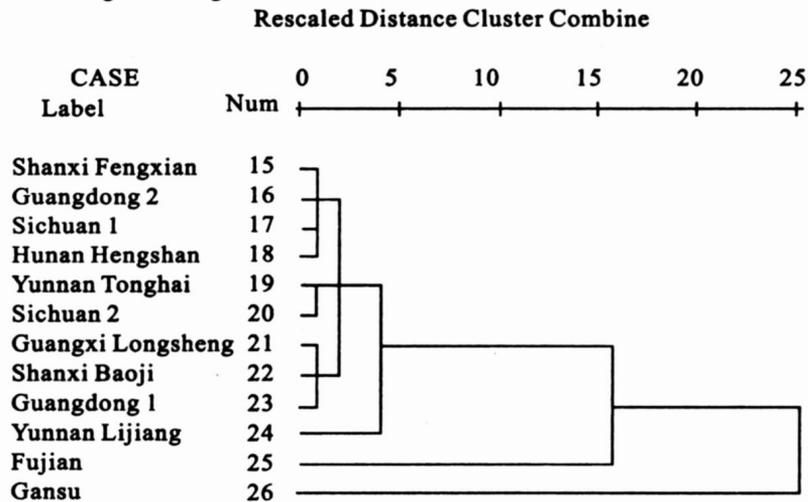


Fig. 7 Hierarchical cluster analysis of *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils.

2.5.2 相似度评价

结合聚类分析结果,分别从 14 批北五味子中选取第 1 类 12 批药材(No. :1 - 12);12 批南五味子中选取第 1 类 11 批药材(No. :15 - 25),分别建立共有模式。计算各样品与共有模式之间的相

似度(见表 2)。若样品与共有模式间的相似度在 0.90 以上,则为推荐药材。由于 25 号样品从图谱和含量上看与第 1 类相似,且相似度计算结果也与第 1 类接近,故将其归到第 1 类中;若样品与共有模式间的相似度在 0.70 ~ 0.89 则为一般品;

若在 0.70 以下为伪劣品。实验结果表明,相似度分析结果与系统聚类结果一致,两种方法得到了相互验证。

2.5.3 鉴定分析

在同一色谱条件下,南、北五味子的 GC 指纹图谱有着显著不同。由二者的色谱图可知,北五味子 GC 指纹图谱在整体含量上要高于南五味子,而且北五味子 GC 指纹图谱在前 12 分钟内的峰明显多于南五味子,南五味子在这一区域色谱峰数很少或者含量极低。南五味子 GC 指纹图谱的色谱峰主要集中在 12~25 min 内,其 3 号峰为最大峰,峰面积明显大于北五味子在同一位置的

色谱峰,北五味子的 14 号峰为其最大峰,通过 GC-MS 以及文献报道可知是依兰烯^[13],是北五味子挥发油中的主要成分,而南五味子挥发油中含量很小,这也是二者的重要区别之一。应用相似度计算可以对样品进行鉴别,以 No. 5 样品为例,将该样品指纹图谱数据分别带入南、北五味子 2 个共有模式模板计算相似度,分别为 0.94 和 0.03,说明该样品为北五味子。南、北五味子植物学形态十分相似,市场使用非常混乱,以南五味子冒充北五味子的现象十分普遍。因此,如何鉴别是合理使用的前提。试验表明,通过 GC 指纹图谱可以很容易地将它们相互区别开来。

Table 2 Results of similarity analysis

Schisandra chinensis (Turcz.) Baill.		Schisandra sphenanthera Rehd. et Wils	
No.	Similarity	No.	Similarity
1	0.98	15	0.95
2	0.98	16	0.97
3	0.95	17	0.96
4	0.98	18	0.97
5	0.94	19	0.99
6	0.98	20	0.97
7	0.97	21	0.95
8	0.97	22	0.97
9	0.98	23	0.96
10	0.91	24	0.97
11	0.98	25	0.87
12	0.94	26	0.32
13	0.74		
14	0.84		

3 讨论

a. 为了使五味子中挥发油组分具有良好的分离度和合适的保留时间,考察了 DB-1 (安捷伦公司,30 m × 0.25 mm,0.25 μm)、HP-5 (安捷伦公司,30 m × 0.32 mm,0.25 μm) 和 DB-17 (安捷伦公司,30 m × 0.25 mm,0.25 μm) 3 根不同型号的石英毛细管色谱柱。结果表明 DB-17 (安捷伦公司,30 m × 0.25 mm,0.25 μm) 石英毛细管色谱柱能够对样品实现良好的分离。

b. 中药材的鉴别和分类很大程度上还依赖于经验。采用指纹图谱鉴别中药材的真伪具有明

显优势。本研究建立的五味子 GC 指纹图谱方法可用于评价五味子的药材质量,快速,简便,重现性和稳定性均很好,特征性强,同时也可作为南五味子和北五味子药材鉴别的依据。

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:化学工业出版社,2005:44-45.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:902.
- [3] 靳杰. 中药五味子的研究进展[J]. 黑龙江医药,2005,18(5):335.

- [4] 应国清,俞志明,单剑峰,等. 北五味子有效组分的研究进展[J]. 河南中医,2005,25(6):84-87.
- [5] 王炎,王进福,尤宏,等. 北五味子种子挥发油的 GC-MS 分析[J]. 中国药学杂志,2001,2,36(2):91-92.
- [6] 李晓光. 乙酸龙脑酯药理作用的实验研究[J]. 浙江中医学院学报,2001,25(03):49-50.
- [7] CROWELL P L, GOULD M N. Chemoprevention and therapy of cancer by α -limonene[J]. Crit Rev Oncol, 1994,5(1):1-22.
- [8] CROWELL P L, SIAR Y OUBI A, BURKE Y D. Antitumorigenic effects of limonene and pefiHyl alcohol against pancreatic and breast cancer[J]. Adv Exp Med Biol,1996,401(2):131-136.
- [9] ELEGBEDE J A, ELSON C E, QURESHI A, et al. Inhibition of DMBA-induced mammary cancer by the monoterpenes α -limonene[J]. Carcinogenesis, 1998,5(5):661-664.
- [10] 殷放宙,陈斌,陆兔林,等. 五味子药材 RP-HPLC 指纹图谱及其共有模式的建立[J]. 中成药,2005,27(8):872-875.
- [11] 高建平,王彦涵,郁韵秋,等. 南五味子木脂素成分的 HPLC 含量测定及其变异规律[J]. 中国天然药物,2003,1(2):89-93.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社,2005:57.
- [13] 李晓宁,崔卉,宋又群,等. 辽五味子果实挥发油成分的鉴定[J]. 药学学报,2001,36(3):215-219.

Establishment and analysis of GC fingerprint for the quality assessment of the fruits of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. and *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils.

SHEN Zhen-duo, CHEN Xiao-hui, XIONG Li, BI Kai-shun

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract : Objective To assess the quality and identify GC fingerprint for the fruits of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. and *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils. **Methods** Fourteen batches of the fruits of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. and twelve batches of the fruits of *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils were analyzed by GC. The essential oil was extracted by steam distillation. Chromatographic conditions: capillary column DB-17 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m) was used. The detector was FID. Inlet temperature was 230 . The detector temperature was 250 . Column temperature :50 (2 min)³⁰—130 (20 min)¹⁰—190 (6 min)¹⁰—210 (3 min). Carrying gas was nitrogen (1.2 mL \cdot min⁻¹). Split ratio was 50:1. Volume was 1 μ L. **Results** In the fingerprint, 28 common peaks in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. were confirmed, and the fourteen batches of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. were classified as 2 clusters by cluster analysis and similarity analysis. Sixteen common peaks in *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils were confirmed, and twelve batches of *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils were classified as 2 clusters by cluster analysis and similarity analysis. On the other hand, the method might be used to identify *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. and *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils. **Conclusions** This method is simple, quick and specific. It can be used scientifically to evaluate and identify the quality of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. and *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils.

Key words : *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. ; essential oil ; chromatographic fingerprint