

[10]

贾玉梅, 王君明, 崔 瑛. 基于二苯乙烯类为主要活性成分的虎杖药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 263-269.

[11]

王 君, 方 芳. 虎杖苷在心脑血管系统的药理研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(13): 2105-2107.

[12]

安 梅, 周 瑾, 陈晓宇. 白藜芦醇药理学作用的研究进展[J]. 肿瘤药学, 2014, 4(4): 242-246.

[13]

马 宁, 王建芬, 徐 芳, 等. 白藜芦醇衍生物及类似物的药理活性与分析方法研究进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(2): 120-128.

[14]

柳 莹, 卢敬光, 吴 丽, 等. 不同炮制工艺对藏边大黄中藏黄苷 A 和总蒽醌含量的影响[J]. 华西药学杂志, 2010, 25(3): 331-333.

[15]

李 芸, 苗小楼, 吴平安, 等. 大黄不同品种不同产地加工品的蒽醌含量比较[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(12): 2257-2261.

[16]

刘 佳, 李 莉, 胡会娟, 等. 不同道地产区大黄功效组分含量的差异分析[J]. 中国现代中药, 2017, 19(5): 662-669.

[17]

方 芳, 龚云麒, 陈锦铎. 一种测定拉萨大黄成分含量的超高效液相色谱方法: 中国, CN201410008299 [P]: 2015-06-17.

[18]

安利贞, 陈云建, 方 芳, 等. 超高效液相色谱法测定拉萨大黄中三种化学成分的含量[J]. 云南中医学院学报, 2013, 36(1): 31-34.

五味子中山葡萄 HPLC 指纹图谱的建立及其伪品鉴别

干建伟^{1,2}, 胡 敏², 钱广生^{1*}, 韦 婷²
(1. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041; 2. 华润三九(雅安)药业有限公司, 四川 雅安 625000)

摘要: **目的** 建立五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Bail 中山葡萄 HPLC 指纹图谱及其伪品鉴别。**方法** 五味子水提物的分析采用 Waters symmetry shield™ RP₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5.0 μm); 流动相乙腈-水, 梯度洗脱; 柱温 30 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 210 nm。**结果** 10 批样品指纹图谱中有 10 个共有峰, 相似度均大于 0.90。用该液相方法检测山葡萄与五味子, 指纹图谱有显著差异。**结论** 该方法准确灵敏、重复性好, 能够准确鉴别五味子伪品山葡萄。
关键词: 五味子; 山葡萄; 伪品; HPLC 指纹图谱; 紫外-可见分光光度法
中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)02-0363-06
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.02.024

Establishment of HPLC fingerprints of *Vitis amurensis* from *Schisandra chinensis* and its counterfeit identification

GAN Jian-wei^{1,2}, HU Min², QIAN Guang-sheng^{1*}, WEI Ting²
(1. West China School of Pharmacy Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. China Resources Sanjiu (Yaan) Pharmaceutical Co. Ltd, Yaan 625000, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the HPLC fingerprints of *Vitis amurensis* from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Bail and to identify its counterfeit. **METHODS** The analysis of aqueous extract from *S. chinensis* was developed on a 30 ℃ thermostatic Waters symmetry shield™ RP₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5.0 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-water flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 210 nm. **RESULTS** There were ten common peaks in the fingerprints of ten batches of samples, with the similarities of more than 0.90. There were significant differences in the HPLC fingerprints between *V.*

收稿日期: 2018-05-07
作者简介: 干建伟 (1983—), 男, 工程师, 主要从事中药制药新技术与工艺过程研究。Tel: 18086997715, E-mail: suiyue121@163.com
*通信作者: 钱广生 (1969—), 男, 硕士生导师, 副教授, 从事药品质量控制和仪器分析。Tel: 13540460087, E-mail: qgs@scu.edu.cn

amurensis and *S. chinensis*. **CONCLUSION** This accurate, stable and reproducible method can be used to identify the *V. amurensis* from *S. chinensis*.

KEY WORDS: *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.; *Vitis amurensis* Rupr; counterfeit; HPLC fingerprints; UV

五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实，习称北五味子。秋季果实成熟时采摘，晒干或蒸后晒干，除去果梗和杂质。作为一种传统中药，它具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心。临床用于久嗽虚喘、梦遗滑精、遗尿尿频、久泻不止等症^[1]。在对五味子药材的质量检查中发现有部分样品存在伪品，常见的为南五味子。文献主要对北五味子和南五味子物质成分对比，建立高效液相色谱进行鉴别^[2-8]，主要是南五味子和北五味子中木脂素成分存在较明显的差异，同时还发现在南五味子和北五味子中有其他类别伪品^[9-12]。在检验中首次发现另一类伪品，研究表明该伪品与文献所描述的山葡萄类似^[13]。《中国药典》中对五味子原料杂质比例可接受范围为1%，经检验发现该类伪品的比例在2%~4%，且难以发现及挑选，为了保证用药安全，对该伪品五味子进行高效液相色谱鉴别。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；岛津 UV-2600 紫外-可见分光光度仪（日本岛津公司）；奥林巴斯 BX43/DP26 显微镜（日本奥林巴斯公司）；BS244S 电子天平（德国赛多利斯公司）；XFB-200 高速中药粉碎机（吉首市中诚制药机械厂）。

1.2 试剂 乙腈（色谱纯，德国 Merck 公司）；无水乙醇、水合氯醛（分析纯，成都市科隆化学有限公司）；超纯水。

1.3 材料 五味子对照药材购自中国食品药品检定研究院（批号 120922-201610）；五味子购于同仁堂（批号 20150901、20150902、20150903），经华润三九（雅安）药业有限公司唐莉副总工程师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（批号 161001、161002、161003、161004、161005、161007、161008、161009、161010），购买于吉林市场，从其中挑选出五味子伪品。山葡萄采自东北野外，经副总工程师唐莉鉴定为葡萄科葡萄属植物山葡萄 *Vitis amurensis* Rupr. 的干燥成熟果实。

KM 小鼠〔清洁级，来源于四川省医学科学院（四川省人民医院实验动物研究所），动物合格证

编号 SCXK [111] 2013-15〕。

2 方法与结果

2.1 鉴别

2.1.1 性状

2.1.1.1 五味子 本品呈不规则的球形或扁球形。表面暗红色，皱缩，略显干瘪；有的表面出现“白霜”。果肉较少，种子1~2粒，肾形，表面棕黄色、有光泽，种皮薄而脆。

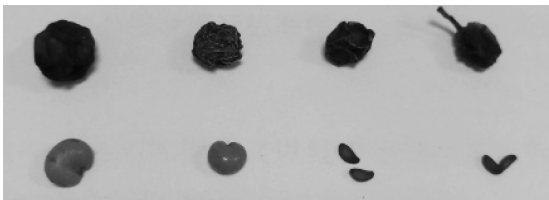
2.1.1.2 山葡萄 本品呈不规则椭圆形。表面棕红色、皱缩、略有光泽。果肉薄而软，内含种子4~5粒，相互抱合成近球形，种子之间被果肉隔开；种子黄棕色，种仁白色呈油性，倒卵圆形，基部有短喙，种脐在种子背面中部呈椭圆形，腹面中棱脊微突起，两侧洼穴狭窄呈条形，向上达种子中部或近顶端。

2.1.1.3 伪品 与山葡萄性状一致。掺伪北五味子药材性状图，见图1，油润五味子、干瘪五味子、伪品、山葡萄果实及种子性状比较图，见图2。



图1 掺伪北五味子药材性状

Fig. 1 Adulteration of *S. chinensis*



注：从左至右分别为油润五味子、干瘪五味子、伪品、山葡萄

图2 真伪品五味子药材及其种子性状鉴别

Fig. 2 Identification of *S. chinensis* and its seed characters

2.1.2 显微鉴别

2.1.2.1 供试品粗粉制备 取五味子伪品，在60℃以下烘烤约2h，取出放入干燥器内，约1h（放至室温）后取出，立即粉碎成粉，过4号筛，

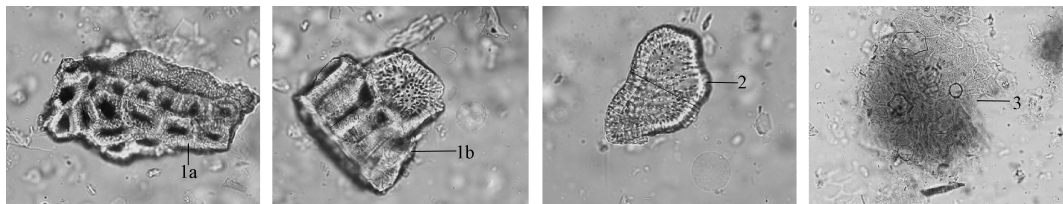
混合均匀。

2.1.2.2 对照药材粗粉制备 取五味子对照药材，按“2.1.2.1”项下方法制备。同法制备山葡萄粗粉。

2.1.2.3 鉴别 取对照药材和供试品粉末，按照显微鉴别2015年版《中国药典》四部2001要求制

片、检查。

五味子种皮表皮石细胞表面观呈多角形或长多角形，壁厚，孔沟极细密。种皮内层石细胞呈多角形、类圆形或不规则形。果皮表皮细胞表面观类多角形，垂周壁略呈连珠状增厚，表面有角质线纹，见图3。



1. 种皮表皮石细胞 (a. 表面观; b. 断面观) 2. 种皮内层石细胞 3. 果皮表皮细胞

1. epidermal stone cells (a. surface view; b. section view) 2. inner layer stone cells of testa 3. epidermal cells of pericarp

图3 五味子粉末

Fig. 3 Powder of fruit from *S. chinensis*

山葡萄果皮表皮细胞表面呈类多角形、类方形，种皮表皮细胞数列类圆形，种皮表皮下石细胞

表面呈类长方形、类方形，壁薄，具极细密的孔沟及纹孔，见图4。



1. 种皮表皮石细胞 (断面观) 2. 种皮内层石细胞 3. 果皮表皮细胞

1. epidermal stone cells (section view) 2. inner layer stone cells of testa 3. epidermal cells of pericarp

图4 山葡萄粉末

Fig. 4 Powder of fruit from *V. amurensis*

伪品显微鉴别结果与山葡萄一致，见图5。



1. 种皮表皮石细胞 (断面观) 2. 种皮内层石细胞 3. 果皮表皮细胞

1. epidermal stone cells (section view) 2. inner layer stone cells of testa 3. epidermal cells of pericarp

图5 伪品粉末

Fig. 5 Powder of fruit from counterfeit

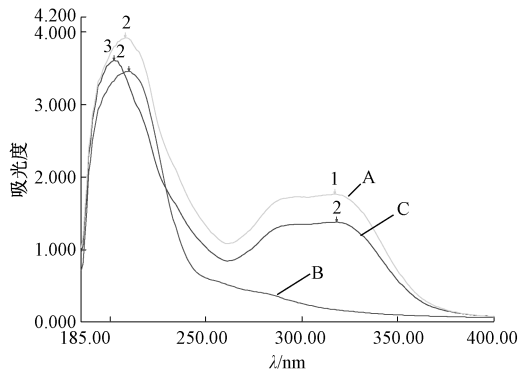
2.1.3 紫外鉴别

2.1.3.1 供试品溶液制备 取五味子伪品粉末(过4号筛)2.0 g，置于锥形瓶中，加100 mL纯化水煎煮120 min，过滤，取滤液5 mL，稀释8倍，搅匀即得。

2.1.3.2 对照溶液制备 取五味子对照药材粉末(过4号筛)2.0 g，按“2.1.3.1”项下方法制备，即得。同法制备山葡萄对照溶液。

2.1.3.3 紫外检测 取供试品和对照溶液，按照紫外分光光度法2015年版《中国药典》四部0401

检查 185~500 nm 处紫外吸收, 五味子于 210 nm 处有 1 个较高吸收峰值; 伪品于 200、320 nm 处有较高吸收峰值; 山葡萄于 208、320 nm 处有较高吸收峰值, 五味子与山葡萄、伪品存在较大的紫外吸收差异, 伪品与山葡萄紫外吸收基本一致, 见图 6。



注: A 为山葡萄, B 为五味子对照药材, C 为伪品

图 6 各样品紫外光谱图

Fig. 6 UV spectrogram of various samples

2.2 高效液相色谱鉴别

2.2.1 色谱条件 Waters symmetry shield™ RP₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5.0 μm); 流动相乙腈 (A) -水 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 10% A; 10~20 min, 10%~15% A; 20~65 min, 15%~60% A; 65~80 min, 60% A; 80~90 min, 60%~80% A; 90~100 min, 80%~100% A); 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 210 nm。

2.2.2 对照溶液制备 精密称定五味子粉末 (过 4 号筛) 2.0 g, 置于锥形瓶中, 加入 100 mL 纯化水煎煮 120 min, 过滤, 滤液浓缩至 10 mL, 加入 40 mL 无水乙醇, 搅匀后过滤, 挥去部分乙醇转移至量瓶中, 定容至 10 mL。摇匀后, 取溶液过 0.45 μm 微孔滤膜, 收集滤液即得。

2.2.3 供试品溶液制备 精密称定五味子伪品粉末 (过 4 号筛) 2.0 g, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液。

2.2.4 方法学考察

2.2.4.1 精密度试验 取伪品样品 (批号 161001) 粉末按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2.1”项条件下连续进样 6 次, 测得各共有峰相对保留时间 RSD 0.14%~1.36%, 相似度均大于 0.999, 表明仪器精密度良好。

2.2.4.2 重复性试验 取伪品样品 (批号 161001) 粉末, 混匀, 精密称取粉末 1.6、2.0、

2.4 g 各 3 份, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2.1”项条件下进样检测, 测得各共有峰相对保留时间的 RSD 0.78%~1.05%, 相似度均大于 0.989, 表明该方法重复性好。

2.2.4.3 稳定性试验 取伪品样品 (批号 161001) 粉末, 混匀, 精密称取粉末 2.0 g, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2.1”项条件下, 分别于 0、1、3、6、12、24 h 进样, 测得各共有峰相对保留时间的 RSD 0.64%~1.36%, 相似度均大于 0.999, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.5 指纹图谱建立及评价 取伪品样品及五味子各 10 批, 按“2.2.2”及“2.2.3”项下方法制备对照溶液及供试品溶液, 在“2.2.1”项条件下, 进样分析, 见图 7~8。伪品在 80 min 内有 10 个峰为共有峰, 其面积占有所有色谱峰面积的 92.0% 以上。经中药色谱指纹图谱相似度评价系统^[14]分析, 相似度均在 0.90 以上。五味子在 80 min 内有 11 个峰为共有峰, 与伪品的指纹图谱完全不同。

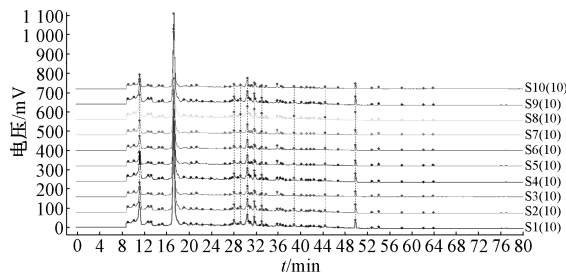


图 7 10 批伪品 HPLC 指纹图谱

Fig. 7 HPLC fingerprint of ten batches of counterfeit

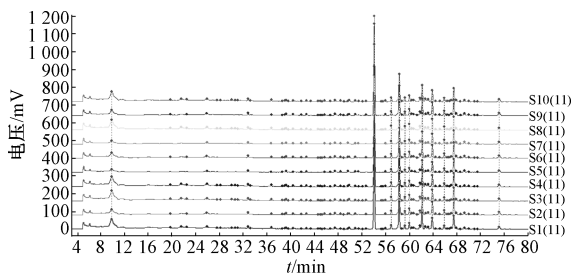


图 8 10 批五味子 HPLC 指纹图谱

Fig. 8 HPLC fingerprint of ten batches of *S. chinensis*

2.2.6 伪品鉴别 取伪品样品, 按照 1%、2%、3% 比例加入五味子中, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2.1”项条件下, 进样分析, 指纹图谱中 2 号特征峰为伪品中特有的成分, 能够通过 2 号特征峰显著区别五味子中是否存在伪品, 而且随着伪品比例增加峰面积增加, 见图

9~11。

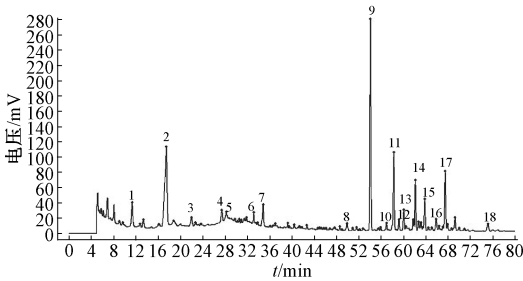


图9 1%伪品五味子 HPLC 色谱图
Fig. 9 HPLC chromatogram of *S. chinensis* of 1% counterfeit

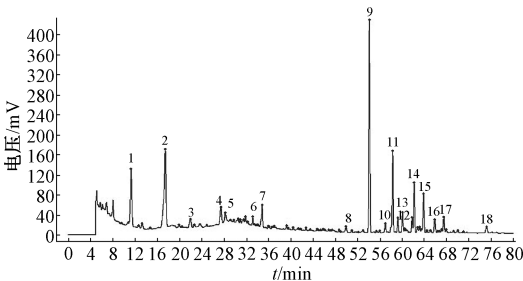


图10 2%伪品五味子 HPLC 色谱图
Fig. 10 HPLC chromatogram of *S. chinensis* of 2% counterfeit

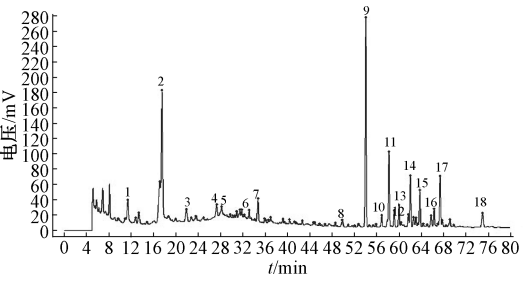


图11 3%伪品五味子 HPLC 色谱图
Fig. 11 HPLC chromatogram of *S. chinensis* of 3% counterfeit

2.3 异常毒性分析

2.3.1 异常毒性检测方法 取清洁级 KM 小鼠 5 只，3 只雄性 2 只雌性，体质量 18~22 g。每只小鼠分别给予静脉注射供试品溶液 0.5 mL，在 4~5 s 内匀速注射完毕。全部小鼠在给药后 48 h 内不得有死亡；如有死亡，应另取体质量 19~21 g 的小鼠 10 只复试，全部小鼠在 48 h 内不得有死亡。

2.3.2 五味子中伪品占比较高时异常毒性

2.3.2.1 对照溶液制备 取五味子 780 g 按照生脉注射液提取工艺制备^[15]，煎煮 3 次，每次加入 3 L 纯化水，煎煮 40 min。将煎煮液浓缩至比重 1.19~1.20，用乙醇醇沉 2 次，第 1 次使醇度达到 80%，第 2 次使醇度达到 85%，过滤，调 pH 近中性，回收乙醇，加入 3% 活性炭煮沸 30 min 后脱

炭。将五味子液分别按照五味子质量浓度 0.156、0.234、0.312、0.390 g/mL 配制成对照溶液，100 ℃，35 min 灭菌。

2.3.2.2 供试品溶液制备 取五味子 437 g 和五味子伪品 343 g，按“2.3.2.1”项下方法制成供试品溶液。

2.3.2.3 异常毒性检测 取对照溶液及供试品溶液，按“2.3.1”项下方法检测异常毒性，未见小鼠死亡，但五味子伪品异常毒性高于五味子。见表 1。

表1 含伪品与五味子异常毒性结果
Tab. 1 Results of abnormal toxicity for *S. chinensis* and counterfeit

质量浓度/(g·mL ⁻¹)	动物表现	对照表现
0.156	呼吸轻度急促，萎靡， 挠鼻，眼睑下垂	呼吸轻度急促
0.234		
0.312		
0.390		

2.3.3 1%、2%、3% 五味子伪品异常毒性比较 取五味子 780 g，按照“2.3.2.1”项下方法制备成 0.156 g/mL 对照溶液。分别取五味子 772.2 g、五味子伪品 7.8 g，五味子 764.4 g、五味子伪品 15.6 g，五味子 756.6 g、五味子伪品 23.4 g，按照“2.3.2.1”项下方法制备成 0.156 g/mL 供试品溶液。

取对照溶液及供试品溶液检测异常毒性，结果发现伪品比例较低时异常毒性与五味子无显著差异。见表 2。

表2 含五味子伪品 1%、2%、3% 样品异常毒性结果
Tab. 2 Results of abnormal toxicity for 1%, 2% and 3% counterfeit samples

伪品比例	动物表现	对照表现
1%	呼吸轻度急促	呼吸轻度急促
2%		
3%		

3 讨论

3.1 伪品分析 通过粉末显微比较研究，发现伪品与五味子药材之间差异明显，外观性状方面与干瘪型五味子较相似，与油性五味子差异较大。伪品的性状、显微鉴别与山葡萄一致，由此可确证五味子的此种伪品为葡萄科葡萄属植物山葡萄的干燥成熟果实。经调查发现，该山葡萄在青果时采摘晾干，被混入野生干瘪型五味子中，由于家种五味子采摘后性状为油性，性状差异与野生五味子有明显差异，暂未发现有山葡萄混入。

3.2 小结 本研究对伪品山葡萄的异常毒性进行了评价,在山葡萄比例加入到接近 50% 时略有毒性反应加强的现象,而在 3% 以内均未发现异常毒性加强,表明现有掺入比例对产品的异常毒性暂未出现显著影响,临床使用暂不能评价,应注意随着五味子价格上涨引起伪品掺入比例增加。

现阶段在干瘪类五味子中发现掺杂伪品,而油润型的五味子中暂未发现该类伪品,建立的高效液相色谱指纹图谱分析方法可通过特征峰确定是否有山葡萄加入,方法灵敏有效,可有效控制伪品的加入,用于五味子的质量控制。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 66-67.

[2] 周永峰, 王伽伯, 张定堃, 等. 不同产地五味子药材的质量特征比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (16): 3152-3157.

[3] 范文成, 常美玲, 张国良, 等. 不同产地野生五味子的含量研究 [J]. 中国药房, 2011, 22 (3): 248-250.

[4] 韩志福, 胡高升, 李 娜, 等. 不同产地五味子质量评价及抗氧化活性研究 [J]. 中 药 材, 2012, 35 (12): 1904-1909.

[5] 胡双丰, 杨志芬. 北五味子与南五味子的鉴别 [J]. 中医学报, 2010, 25 (6): 1149-1150.

[6] 谭春梅, 黄琴伟, 张文婷, 等. 五味子和南五味子的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国现代应用药学, 2008, 25 (6): 514-517.

[7] 刘少静, 李 艳, 张 颖, 等. RP-HPLC 测定南、北五味子中三种木脂素类成分的含量 [J]. 应用化工, 2014, 43 (11): 2107-2110.

[8] 邓 力, 王浩兵, 严书超, 等. 超高效液相色谱法同时测定南、北五味子中的 7 种木脂素含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37 (12): 1158-1162.

[9] 李 静, 胡晓炜, 宋旭峰. 南五味子伪品火棘果的鉴别 [J]. 中草药, 2003, 34 (8): 附 1.

[10] 方洪征, 张庆玲. 一种五味子伪品的真假鉴别 [J]. 基层中药杂志, 2002, 16 (6): 33-33.

[11] 杜秀芬, 廉景魁, 翟铁宏, 等. 五味子伪品鸡树条果的鉴别 [J]. 中药材, 1994, 17 (9): 23-24.

[12] 汪 平, 邹芙蓉, 成 龙. 五味子中掺伪品南五味子的鉴别 [J]. 中国药业, 2004, 13 (2): 62-63.

[13] 熊云珍, 肖 凌, 但汉雄. 南五味子伪品山葡萄的鉴别研究 [J]. 湖北中医药大学学报, 2012, 14 (5): 42-43.

[14] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求 (暂行) [S]. 中国药品标准, 2000, 1 (4): 3-7.

[15] 国家食品药品监督管理局. 生脉注射液国家标准 [S].

人参中五氯硝基苯残留的加工因子测定及其在膳食暴露评估中的应用

王 莹¹, 李耀磊¹, 于新兰², 王 赵¹, 金红宇^{1*}, 马双成^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院中药民族药检定所, 北京 100022; 2. 新疆维吾尔自治区食品药品检验所, 新疆 乌鲁木齐 830049)

摘要: **目的** 测定五氯硝基苯 (PCNB) 在人参 *Panac ginseng* C. A. Mey. 不同加工方式下的加工因子, 以应用于人参膳食风险评估。 **方法** 分别考察水煎煮、水浸泡、75% 乙醇提取 3 种加工方式 PCNB 的转移率, 采用硫酸磺化法进行前处理, GC-ECD 法测定 10 批人参药材、1 批药液及加工后药渣中 PCNB 的残留水平。 **结果** 10 批人参药材中 PCNB 的超标率为 50%, PCNB 最高残留量为 14.0 mg/kg。测得水煎煮、水浸泡、75% 乙醇提取 3 种方式的加工因子分别为 0.002、0.04、0.98。 **结论** 该方法准确稳定, 重复性好, 可用于人参药材和含人参中成药的质量控制。

关键词: 人参; 五氯硝基苯; 加工因子; 膳食评估

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)02-0368-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.02.025

收稿日期: 2017-12-20

基金项目: 国家药典委员会药品医疗器械审评审批制度改革项目 (ZG2016-2-01)

作者简介: 王 莹 (1986—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向为中药质量控制及安全检测。

*** 通信作者:** 金红宇, 男, 主任药师, 研究方向为中药质量控制及安全性研究。Tel: (010) 67095424, E-mail: jhyw@nifdc.org.cn
马双成, 男, 博士, 博士生导师, 研究方向为中药质量民族药质量控制和评价研究。Tel: (010) 67095277, E-mail: masc@nifdc.org.cn