

环境、坡向、海拔高度、经纬度、日照时间、雨水、病虫害以及农药、杀虫剂的使用等因素密切相关。例如对于抚松北岗、敦化青沟子乡、安图万宝镇、珲春市和长白二道岗村而言,这5个产地的人参水溶性蛋白含量相对较高,尤其以蛋白条带3,4,6,7和12的含量居高。从地理位置上可以看出,除了抚松北岗和长白二道岗以外,敦化青沟子、安图万宝和珲春这3个产地基本位于吉林省的东北部地区,这说明对于人参蛋白带3,4,6,7和12而言,这3个位于东北部地区所产的人参具有较高的含量,可以为日后专项研究此5种人参蛋白提供理论依据。而通过观察集安县、长白新房子镇、安图白河镇、通化县、临江东北岔乡、抚松黄泥村、敦化秋梨沟镇、黑龙江穆棱和牡丹江这9个人参水溶性蛋白含量相对较低的产区可以发现,除了黑龙江省的牡丹江和穆棱位于吉林省东北部以外,集安、长白新房子、安图白河、通化县、临江东北岔和抚松黄泥村这6个产区均基本上位于吉林省的东南部地区,所产人参中水溶性蛋白含量相对较低。对于抚松县的3个产地北岗、板石河和黄泥村而言,人参蛋白含量呈高、中、低的变化趋势,这可能与抚松县的特殊地理位置有关,通过分析发现,位于抚松县的东北部地区所产的人参中蛋白含量相对较高,而位于其西南及东南地区所产的人参中蛋白含量

相对较低,因此可粗略地认为抚松县为一分界线,大体上可以把吉林省东部地区所产的人参质量做一划分,为吉林省的人参种植、栽培和繁育提供地理位置依据。

人参的蛋白种类和含量是基因表达的结果,蛋白含量的高低可间接反应各产地间的地域性差别,因此本研究对进一步推动人参产业的发展和人参系列产品质量的提高等都较为重要。

REFERENCES

- [1] YAO Z S, WANG D Q, XIONG Y K. Pharmaceutical Botany(药用植物学) [M]. Beijing: Traditional Chinese Medicine Press, 2005: 310.
- [2] ZHANG W, JIANG X G, MA J, et al. Study on the thermal stability of ginseng protein by SDS-PAGE and gel filtration chromatography [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2007, 9(4): 7-10.
- [3] ZHANG W, LI H Y, MA J, et al. Purification of several ginseng proteins [J]. J Jilin Agricultural Univ(吉林农业大学学报), 2008, 30(1): 36-39.
- [4] HAO C, HAN L P, JIANG L L, et al. Purification and characterization of low molecular weight polypeptides from the venom of Guangdong cobra(Naja Naja Atra) [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2011, 28(5): 383-386.
- [5] JIANG X G, ZHAO Y, ZHANG W, et al. Studies on SDS-PAGE fingerprints chromatogram of ginseng hydrophilic proteins [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2008, 28(6): 873-876.
- [6] NIU F, ZHAO Y, TANG R N, et al. Study on SDS-PAGE fingerprints chromatogram of Sika Antlerbase proteins [J]. China Pharm(中国药业), 2010, 19(10): 21-22.

收稿日期: 2012-03-13

超临界 CO₂ 萃取远志挥发油气相指纹图谱对比研究

王颖莉, 王秀文, 裴晓丽, 赵晓光, 陆芳芳, 刘亚明^{*}(山西中医学院中药系, 太原 030024)

摘要:目的 建立远志挥发油成分的气相指纹图谱,研究种植与野生、不同提取方法对远志挥发油成分的影响。方法 采用超临界 CO₂ 萃取对 10 批不同产地的远志提取挥发油,用气相色谱仪对挥发油进行分析,建立超临界 CO₂ 远志挥发油的气相指纹图谱。结果 超临界 CO₂ 萃取远志挥发油出油率在 0.29%~0.82%之间,高于水蒸气蒸馏法提取率,与水蒸气蒸馏法提取法得到的易挥发油成分基本相同,人工种植较野生远志挥发油成分种类更丰富。结论 超临界 CO₂ 萃取法提取远志挥发油效率高,为研究远志挥发性成分提供了较好的提取方法。

关键词: 远志; 挥发油; 超临界 CO₂; 气相色谱指纹图谱

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)11-0983-05

基金项目: 山西省科技攻关项目(20100311090); 山西省科技厅平台建设项目(2011091014); 山西省卫生厅科技攻关项目(2008034)

作者简介: 王颖莉,女,博士生,副教授 Tel: (0351)2272269 E-mail: wyltyut@163.com ^{*}通信作者: 刘亚明,男,博士,教授,博导 Tel: (0351)2272163 E-mail: liuyaming66@yahoo.com.cn

Supercritical CO₂ Extraction of Volatile Components of *Polygala Tenuifolia* Willd. and Analysis of Characteristics through Fingerprint

WANG Yingli, WANG Xiuwen, PEI Xiaoli, ZHAO Xiaoguang, LU Fangfang, LIU Yaming* (Department of Traditional Chinese Pharmacology, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effects of cultivated growing and wild growing *Polygala tenuifolia* Willd specieses and different extracted methods on volatile oil of *Polygala tenuifolia* Willd, characteristics of fingerprints was set up based on supercritical CO₂ extraction method. **METHODS** The volatile oil of *Polygala tenuifolia* Willd of different origins was refined through the supercritical CO₂ extraction, and was analyzed by GC fingerprint. **RESULTS** The extraction rate of volatile oil from *Polygala tenuifolia* Willd through the supercritical CO₂ extraction was between 0.29%–0.82%, and the components of volatile oil were basically the same compared with those extrated by steam distillation; the type of the volatile oil in cultivation was more abundant compared with the components of volatile oil in wild *Polygala tenuifolia* Willd. **CONCLUSION** The method of the supercritical CO₂ extraction is high efficiency, which provides a better extraction method for the volatile oil of *Polygala tenuifolia* Willd.

KEY WORDS: *Polygala tenuifolia* Willd.; volatile oil; supercritical CO₂ extraction; GC fingerprint

中国药典 2010 年版收载远志来源系远志科 (*Polygalaceae*) 植物远志 (*Polygala tenuifolia* Willd.) 或卵叶远志 (*Polygala sibirica* L.) 的干燥根^[1]。我国有远志属植物 42 种, 变种 8 个, 主要分布于山西、陕西、河北等地, 以山西、陕西两地产量最多, 普遍也以这 2 个产地的质量为最好^[2]。远志的主要成分为三萜皂苷类、糖类、生物碱、脂肪油、树脂等物质^[3]。目前, 已有许多学者对远志皂苷的提取、分离及药理作用进行了深入研究^[4], 远志皂苷一直以来被认为是远志的主要活性成分, 但远志皂苷不能完全说明该中药表现出的多种生理活性。研究表明, 远志挥发油中含有多种活性成分, 如油酸、亚油酸、棕榈酸、硬脂酸等^[5], 因此, 对其挥发油成分进行研究具有一定的意义。

本实验采用超临界 CO₂ 萃取技术对不同产地远志挥发油进行了提取, 采用气相色谱法, 借助中药色谱指纹图谱相似度评价软件对所获得的气相图谱进行了对比分析, 获得了有意义的结果。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent6890 气相色谱仪, 色谱柱为 HP-5 Phenyl Methyl Siloxane(30.00 m×0.25 mm, 0.25 μm) 弹性石英毛细管柱; SFE-2 超临界 CO₂ 萃取仪(美国应用分离公司); JA4003 精密电子天平(上海良平仪器仪表有限公司); 101-2BS 型电热恒温鼓风干燥箱(上海医疗器械有限公司); HX-200A 型中药粉碎机(浙江省永康市溪岸五金药具厂); TDL-5 离心机(上海安亭科学仪器厂), JP300 型功率超声(武汉嘉鹏电子有限公司), SB25-12D 型超声波清洗

机(宁波新芝生物科技股份有限公司), 挥发油提取器等。

1.2 药品与试剂

正己烷为色谱纯(天津市河东区红岩试剂厂); 不同产地的远志药材经山西中医学院裴香平副教授鉴定为植物远志, 见表 1。

2 方法

2.1 超临界 CO₂ 萃取远志挥发油

将远志药材自然晾晒 2 周, 除去其中的水分, 粉碎成粗粉, 每次称取 20 g 粗粉于 SFE-2 超临界 CO₂ 萃取仪中进行萃取。在萃取条件为: 釜压力 45 MPa, 温度 35 °C, 流量达到预定值时, 开始计时达到 2 h 后, 收集分离釜的萃取物, 称重, 计算出油率。

$$\text{出油率} = \frac{\text{萃取物质量(g)}}{\text{原料质量(g)}} \times 100\%$$

2.2 水蒸气蒸馏法提取远志挥发油

取 1 号远志药材粗粉 100 g, 置于 2 000 mL 圆底烧瓶中, 按水蒸气蒸馏装置连接好仪器, 加热至沸腾, 保持微沸 6 h。将提取后的挥发油与水的混合物用 30~60 °C 的石油醚萃取, 将萃取后的石油醚挥干, 得到黄色的挥发油, 分析其挥发油成分^[6]。

2.3 气相色谱分析供试品溶液的制备

远志挥发油 20 μL 用正己烷稀释到 2.0 mL, 静置, 用一次性无菌注射器将供试品通过 0.45 μm 微孔滤膜过滤待用。

2.4 色谱条件

以 1 号远志挥发油为色谱条件研究的供试品

溶液,进样 0.4 μL ,以不同升温程序分别进行试验,以分析时间和分离度为评价指标,筛选出最优升温条件为:柱温为 45 $^{\circ}\text{C}$,以 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 246 $^{\circ}\text{C}$,保持 5 min,再以 1 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 250 $^{\circ}\text{C}$,保持 3 min,最后以 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 280 $^{\circ}\text{C}$;检测器温度:280 $^{\circ}\text{C}$;进样口温度:250 $^{\circ}\text{C}$;载气:氮气;压力:0.5 MPa;分流比:10:1。

2.5 气相色谱图数据分析方法

采用国家药典委员会编写的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”。参数设置如下^[7]:
①参照谱图:采用远志药材挥发油山西产的色谱图作为相似度计算时校正的参照谱图;
②时间窗宽度:0.10;
③数据剪切:未剪切;
④校正方式:自动校正;
⑤对照谱图的生成采用平均算法,由 10 批远志药材挥发油指纹图谱生成;
⑥指纹图谱相似度计算结果:以对照谱图为参照,各样品指纹图谱与对照谱图进行比较,计算每个色谱图与之相比较的相似度。

3 结果与讨论

3.1 远志挥发油的出油率

超临界 CO_2 萃取远志挥发油的出油率,结果见表 1。

表 1 超临界 CO_2 萃取不同产地远志挥发油的出油率

Tab 1 The extraction rate of volatile oil of *Polygala tenuifolia* Willd. from different origins by supercritical CO_2 extraction

样品号	来源地	出油率/%	符号/备注
1 号	山西	0.40	POVO-1
2 号	山西运城	0.30	POVO-2
3 号	山西吉县红山	0.40	POVO-3(野生)
4 号	山西吉县东城	0.56	POVO-4(野生)
5 号	山西吉县中垛	0.82	POVO-5(野生)
6 号	内蒙	0.30	POVO-6
7 号	陕西	0.29	POVO-7
8 号	河北	0.38	POVO-8
9 号	四川	0.36	POVO-9
10 号	甘肃	0.36	POVO-10

水蒸气蒸馏法提取 1 号远志的出油率为 0.08%,略低于文献值出油率 0.1%^[8],表明超临界 CO_2 萃取法出油率>水蒸气蒸馏法。

由出油率结果可知,POVO-3、POVO-4、POVO-5 山西野生远志出油率在 0.40%~0.82%,高于其他 7 个非野生远志的出油率。分析原因,可

能是由于非野生远志是生长 2~3 年采收^[9],而野生远志可能生长时间更长,导致其挥发油成分含量更多,也可能是由于采收时间的不同导致出油率的差异。

3.2 内参比峰的选择

参考文献^[10],考虑到由于无法取得对照品,且色谱图中的峰比较密集,难以插入适当的内标物,参考 10 个品种的远志气相图谱后,选择 10 个图谱均存在的保留时间在 39 min 左右,对称性好且较稳定的色谱峰作为内参比峰,见图 1。

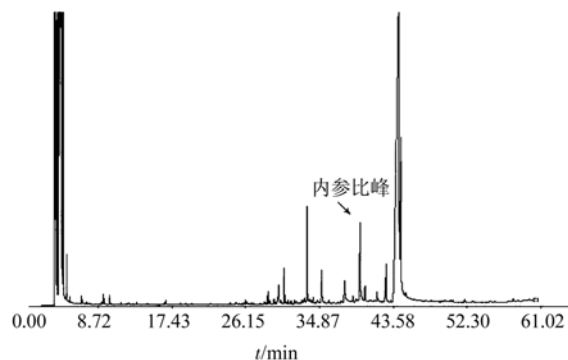


图 1 1 号远志挥发油气相图谱

Fig 1 The GC fingerprint of volatile oil of *Polygala tenuifolia* Willd. of sample 1

3.3 稳定性和重复性试验

选取 POVO-1 号远志挥发油为供试品溶液,以内参比峰为考察指标,分析计算其保留时间及 RSD 值,对仪器精密度、稳定性和重复性进行研究。

1 号样 0.4 μL 连续进样 5 次,考察仪器的精密度;另取该供试品溶液 0.4 μL ,于 0, 1, 2, 4, 8 h 进样,考察稳定性;最后取此同一份供试品 5 份,按挥发油制备方法进行制备,在建立的色谱条件下测定,考察重复性。39 min 的内参比峰保留时间和相对峰面积比值无明显变化, RSD<3%,说明样品的稳定性、仪器的精密度和方法重复性良好,符合指纹图谱的要求。

3.4 远志挥发油指纹图谱的建立与特征峰

分析得到的远志药材挥发油气相图谱,利用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件 2004A 版”选择各图谱共有的、保留时间及峰面积相对稳定的 18 个色谱峰作为远志挥发油指纹图谱的共有峰,生成远志挥发油共有模式的对照指纹图谱,见图 2。POVO-1 到 POVO-10 号远志挥发油指纹图谱见图 3。

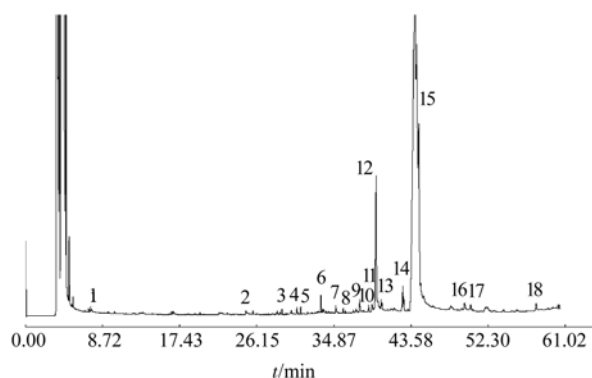


图2 远志挥发油对照指纹图谱

Fig 2 The GC reference fingerprint of volatile oil of *Polygala tenuifolia* Willd.

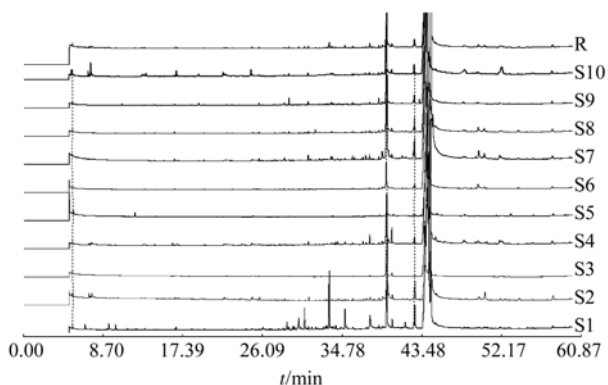


图3 1到10号远志挥发油指纹图谱

Fig 3 The GC fingerprint of volatile oil of *Polygala tenuifolia* Willd. from sample 1 to sample 10

图2中12号色谱峰强度适中、分离度好、峰形稳定,故选取作为参照峰。以12号色谱峰的保留时间和峰面积为1,计算其他各共有峰相对保留时间和相对峰面积,并将相对保留时间做为定性指标。

远志POVO-1~POVO-10与对照指纹图谱的相似度分别为0.96, 0.27, 0.96, 0.96, 0.27, 0.96, 0.90, 0.96, 0.96, 0.96。除POVO-2号和POVO-5号外,其他不同产地的远志挥发油指纹图谱相似度较高。POVO-2号和POVO-5号比较特殊,相似度与其他相差较大,POVO-2号原因有待于进一步研究,而POVO-5号指纹图谱相对于对照指纹图谱少了1号、2号、4号~9号、11号16号和17号,主要共有色谱峰缺少而导致相似度偏低。

3.5 野生与种植远志的挥发油指纹图谱的差别

远志商品有野生与种植之分,对比研究POVO-3、POVO-4、POVO-5号3个野生远志与POVO-1号山西种植远志的指纹图谱,见图4。

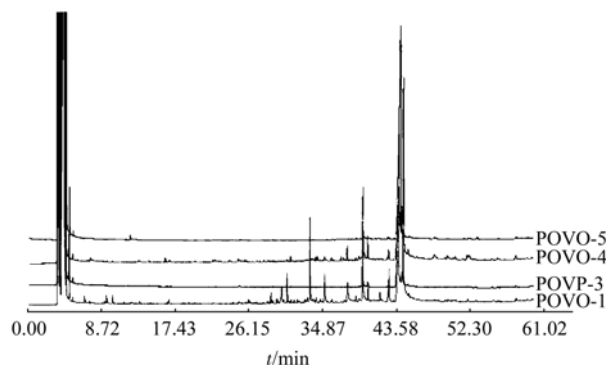


图4 野生与种植远志挥发油指纹图谱对比图

Fig 4 The GC fingerprint of volatile oil of the planting and wild *Polygala tenuifolia* Willd.

结果表明,野生远志的主要出峰时间与种植远志相比基本相同,但因其出油率不同故峰形高低及峰面积大小不同,差别较大。

POVO-1、POVO-3、POVO-4、POVO-5的6、14、15、18峰的出峰时间相对于12峰的相对保留值都几乎一样,因12峰为内参照峰,这4个色谱图的12峰为同一物质,则POVO-1、POVO-3、POVO-4、POVO-5的6、14、15、18峰也同一物质^[10]。将12峰的峰面积值定为1,则其他4个峰的峰面积比值见表2。

表2 POVO-1、POVO-3、POVO-4、POVO-5的12号峰峰面积与其他共有峰峰面积比值

Tab 2 The ratio of peak area of 12 peak area to other common peaks from POVO-1, POVO-3, POVO-4, POVO-5

挥发油	12峰面积	6峰面积	14峰面积	15峰面积	18峰面积
POVO-1	1	0.68	0.32	12.57	0.04
POVO-3	1	0.00	0.09	1.76	0.00
POVO-4	1	0.02	0.10	2.42	0.06
POVO-5	1	0.00	0.12	15.29	0.15

POVO-1各峰除15峰面积较大,其他各峰面积则较小;POVO-3各峰面积分布较小,6峰和18峰未出峰;POVO-4各峰面积均有,但相对于12峰均不大;POVO-5的6峰未出,而15峰峰面积相对于12峰特别大,其出油率高而相似度特别低,分析可能是由于其成分都集中在了15峰,其他几个峰较小有关。远志挥发油主要含有棕榈酸、油酸、亚油酸、硬脂酸等混合脂肪酸^[5],结合前期实验所做的GC/MS分析结果,推测15峰可能为是油酸、油酸乙酯等的混合物。

3.6 不同提取方法指纹图谱的比较

为比较2种提取方法的所得易挥发性成分的异同,1号远志分别采取了水蒸气提取法和超临界

CO₂ 萃取法提取挥发油，对挥发油进行了气相分析，结果见图 5。

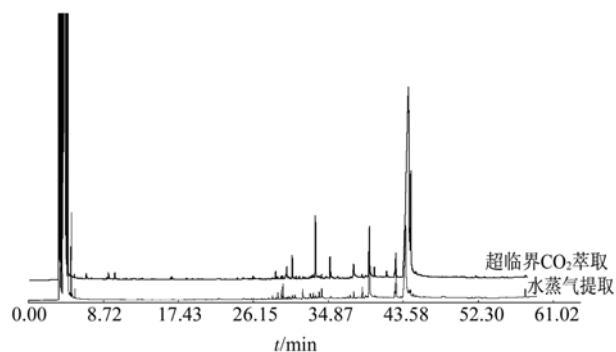


图 5 水蒸气提取法与超临界 CO₂ 萃取法远志挥发油指纹图谱

Fig 5 The GC fingerprint of volatile oil of *Polygala tenuifolia* Willd. refined by steam distillation extraction and supercritical CO₂ extraction

水蒸气蒸馏法和超临界 CO₂ 萃取法提取的远志挥发油气相图谱的出峰数目与色谱峰种类基本相同，通过“中药色谱指纹图谱相似度评价软件 2004A 版”，超临界 CO₂ 萃取物为参照，其相似度为 0.96。超临界 CO₂ 萃取法提取出来的远志挥发油指纹图谱中的峰高远大于水蒸气提取法的，且前者在程序升温较低温度时的出峰峰高远大于后者的峰高。超临界 CO₂ 萃取法在接近室温(35~40 °C)下进行提取，能把高沸点、低挥发性、易热解的物质在其沸点温度以下萃取出来^[11-12]，故沸点较低的成分用超临界 CO₂ 萃取法提取出来较多些，而水蒸气蒸馏法则是高温持续提取，极易破坏掉挥发油中低沸点的成分，超临界 CO₂ 萃取法用于远志挥发油提取效果更好。

4 结论

气相色谱中色谱条件的选择至关重要，关系到指纹图谱的成功与否，实验中经过反复试验调整，最终选出最佳条件，发现远志挥发油的主要特征峰在 39 min 以后出峰，39 min 以前出峰较少且峰面积较小。

超临界 CO₂ 萃取法与水蒸气蒸馏法提取法提取远志挥发油，所获得的易挥发油成分基本相同。超临界 CO₂ 萃取法挥发油的出油率较高，且能降低沸点，易热解的物质可在其沸点温度以下萃取出来。超临界萃取全过程不用有机溶剂，避免了萃取物中溶剂的残留。

本实验对远志挥发油气相图谱，在整体分析基

础上，重点对其主要特征峰，而不是选出所有的特征峰来分析，更符合指纹图谱的整体性和模糊性要求。根据以上 10 批不同产地来源的远志挥发油分析结果，种植远志的挥发油成分较野生远志更多。

不同产地的远志药材挥发油指纹图谱相似度除山西运城和吉县中垛产的以外均在 0.90 以上，相似度较好，建立的远志药材挥发油的气相色谱指纹图谱的对照指纹图谱，共有 18 个色谱峰，各色谱峰分离度较好，符合指纹图谱的要求，可为远志质量的评定提供参考。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版.一部) [S]. 2010: 146-147.
- [2] ZHANG P X, DUAN R, HUANG P. The medicinal plant resources and distribution of *Polygala* at China [J]. *Primary J Chin Mater Med*(基层中杂志), 2002, 16(6): 42-43.
- [3] LI P. Studies on chemical constituents of *Polygala tenuifolia* Willd. and its pharmacological activities [D]. Changchun: Jilin University, 2002.
- [4] WANG J, ZHANG Y M, HAO Z Y, et al. Fingerprint chromatogram of *Polygalae Radix* from Shanxi province with HPCE [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2012, 29(2): 133-136.
- [5] LI Y F. Studies on chemical constituents of matched pair of *Radix Polygala* and *Rhizoma Acori Tenuifolia* and its pharmacokinetics [D]. Xi'an: Northwest University, 2002.
- [6] LI P, YAN M, LU D, et al. Analysis of the volatile oil components of *Polygala tenuifolia* Willd. by GC-MS [J]. *Special Wild Economic Animal Plant Res*(特产研究), 2003, 25(4): 43-45.
- [7] LEI H M, BI W, LI Q, et al. Fingerprint of *Rhizoma Polygoni Cuspidati* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2006, 37(7): 1084-1086.
- [8] FANG M F, ZHANG W J, LI Y F, et al. Analysis of fat-soluble componets from drug matched pair of *Polygala tenuifolia* Willd and *Acorus tatarinowii* Schott. by GC-MS [J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2010, 2(32): 311-314.
- [9] PENG W X, WU Z M, XIE X L. The advance of growing, diferentiation and machining in *Polygala tenuifolia* [J]. *J Hebei Agricultural Sci*(河北农业学报), 2005, 9(1): 111-113.
- [10] XIA H L, DONG M, WU X, et al. Comparison on HPLC fingerprints of pre-and post processed *Radix Polygala* with honey-fried method [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2006, 37(1): 1657-1659.
- [11] CHEN N. Study on extraction technique of the coumarin from *Melilotus officinalis*(L.) Lam by supercritical CO₂ extraction [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2011, 28(10): 927-930.
- [12] ZENG S L, DING H W. Recent development of CO₂ supercritical fluid extraction [J]. *Chin Med Equip J*(医疗卫生装备), 2009, 2(30): 31-33.

收稿日期: 2011-07-04