

在较大差异,说明胡芦巴种质资源的生态类型多,遗传背景较复杂,这些差异既和生长环境有关,也与遗传基础有关。然而,外部形态的变异受环境因子影响较大,因此,对胡芦巴种质资源遗传多样性作更为准确的研究还应结合等位酶分析、DNA 分子标记等手段来进行。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 第四十二卷第二分册. 北京: 科学出版社, 1998
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 下册. 上海: 上海科学技术出版社, 1994
- [3] 荆宇, 赵余庆. 胡芦巴化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2003, 34(12): 1146-1149
- [4] 赵怀清, 曲燕, 王学娅, 等. 不同产地胡芦巴种子中胡芦巴碱的含量测定 [J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(8): 617-619
- [5] 鲁鑫焱, 张超, 赵怀清, 等. 不同产地胡芦巴中总黄酮和槲皮素的含量测定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 26(6): 439-433
- [6] 吴延丽, 李微, 林锋, 等. 大庆产胡芦巴种子中生物碱及总黄酮成分的研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2007, 41(4): 385-387
- [7] 卜凤泉, 刘忠英, 石艳, 等. 胡芦巴提取物对实验性糖尿病大鼠的降血糖作用 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2007, 33(1): 88-89
- [8] 石艳, 靳英丽, 于晓艳, 等. 胡芦巴多糖 A2 对糖尿病大鼠肾脏 ECM 的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(10): 942-944
- [9] 陈君, 丁万隆, 陈震, 等. 不同种源胡芦巴生长发育特性初步观察 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(4): 237-240
- [10] 田振荣, 蒙蕊学, 李杰, 等. 旱地胡芦巴种植密度试验结果 [J]. 甘肃农业科技, 2002(11): 22-23
- [11] 吴宏亮, 许强, 王俊. 胡芦巴引种试验研究初报 [J]. 宁夏农学院学报, 2003, 23(1): 7-9

刺壳花椒 HPLC 指纹图谱的研究

汪文涛¹, 伍城颖², 马一华³, 汪灿^{1*}

(1 湖南省药品检验所, 湖南长沙 410001; 2 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208;
3 株洲千金药业股份有限公司, 湖南株洲 412003)

摘要: 目的 采用高效液相色谱法研究并建立了产于张家界的刺壳花椒药材的指纹图谱。方法 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 乙腈-水流动相系统梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 278 nm。结果 对所采集的 10 批刺壳花椒药材进行了测定, 建立了刺壳花椒的指纹图谱, 共有 11 个共有峰。结论 HPLC 法色谱指纹图谱分析技术可用于刺壳花椒药材质量的控制。

关键词: 刺壳花椒; 指纹图谱; 高效液相色谱

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)04-0634-04

HPLC Fingerprint of *Zanthoxylum echinocarpum*

WANG Wen-tao¹, WU Cheng-ying², MA Yi-hua³, WANG Can¹

(1 Hunan Provincial Institute for Drug Control, Changsha 410001, China; 2. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 3. Zhuzhou Qianjin Pharmaceutical Co., Ltd., Zhuzhou 412003, China)

Abstract: **Objective** To study chromatography fingerprints of *Zanthoxylum echinocarpum* by HPLC. **Methods** Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-water gradient elution, at flow-rate of 1.0 mL/min, detection wavelength at 278 nm. **Results** HPLC was used to establish fingerprint chromatograph of water extraction from ten batches of *Z. echinocarpum*, which had been harvested from the same area in Zhangjiajie at the same time. The result showed that 11 peaks were common. **Conclusion** The method could be used for the quality control of *Z. echinocarpum*.

Key words: *Zanthoxylum echinocarpum* Hemsl; fingerprint; HPLC

芸香科花椒属刺壳花椒 *Zanthoxylum echinocarpum* Hemsl 是我国南方地区民间常用药, 主要产于南方及西南等地, 其药用部位有根、根皮、茎和叶, 有行气止痛的功效。刺壳花椒中已知的化学成

分有木兰花碱、α-别隐品碱、白藜碱、γ-花椒碱、茵芋碱等生物碱类^[1~3]。由于受产地、气候和生态环境等的影响, 不同药材所含成分有一定差异, 仅针对药材的某个有效成分或指标成分进行定性、定量分析,

* 收稿日期: 2008-06-13

基金项目: 湖南省科学技术厅科技计划重点项目 (2007SK2005)

作者简介: 汪文涛 (1944—), 男, 主任药师, 主要从事新药研究开发。Tel: (0731) 2275848 E-mail: hnyjw@163.com

并不能有效控制中药材的质量。中药指纹图谱能较为全面地反映中药的整体化学特征,较为全面地反映药材的内在质量,具有整体性、特征性和稳定性等特点,目前已成为国际公认的控制中药或天然药物质量的有效手段^[4]。本实验按照指纹图谱的技术要求^[5],对采集于湖南省张家界市的 10 批刺壳花椒药材进行测定,建立刺壳花椒药材的 HPLC 指纹图谱,以期对刺壳花椒药材的质量控制提供有效的方法。

1 实验材料

1.1 实验仪器与试剂: LC—20AT 高效液相色谱仪、SPD—M20A 二极管阵列检测器、CTO—20AC 柱温箱、SIL—20AC 自动进样器(日本岛津)、LC solution 色谱工作站(日本岛津)、Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, Dikma)、AUW—220D 电子天平(日本岛津)。

木兰花碱(天津中新药业中药现代化技术工程中心)、乙腈(色谱纯,浙江临海市浙东特种试剂厂,台州)、水(重蒸水经 0.45 μm 微孔滤膜抽滤);磷酸、三乙胺等其余试剂均为分析纯(湖南师大化学试剂厂)。

1.2 药材来源:2006 年 8 月由株洲千金药业股份有限公司马一华采集于湖南省张家界市,经中南林业科技大学喻勋林教授鉴定为芸香科花椒属的刺壳花椒 *Zanthoxylum echinocarpum* Hemsl,药用部位为根和茎。样品来源见表 1。

表 1 药材来源

Table 1 Source of sample

序号	品名	样品编号	采集来源
1	刺壳花椒	2006003-1	湖南省张家界市永顺县三家馆镇
2	刺壳花椒	2006003-2	湖南省张家界市永定区仙人溪
3	刺壳花椒	2006003-3	湖南省张家界市永定区沅古坪镇
4	刺壳花椒	2006003-4	湖南省张家界市桑植县温塘镇
5	刺壳花椒	2006003-5	湖南省张家界市永顺县罗依溪
6	刺壳花椒	2006003-6	湖南省张家界市桑植县温塘镇
7	刺壳花椒	2006003-7	湖南省张家界市永定区沅古坪镇
8	刺壳花椒	2006003-8	湖南省张家界市永定区沅古坪镇
9	刺壳花椒	2006003-9	湖南省张家界市永定区沅古坪镇
10	刺壳花椒	2006003-10	湖南省张家界市桑植县温塘镇

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:采用梯度洗脱, A 相为 0.2% 磷酸和 0.2% 三乙胺的水溶液, B 相为乙腈,考察了 120 min 的供试品溶液图谱,70 min 之后再无特征峰出现,洗脱时间定为 70 min 比较合理;体积流量:1.0 mL/min,分析时间为 70 min;柱温 30℃;检测波长为 278 nm,进样量为 10 μL。梯度洗脱程序为:0~

10 min, A-B (95:5); 10~25 min, A-B (90:10); 25~70 min, A-B (90:10); 70 min 以后, A-B (60:40)。色谱图见图 1。

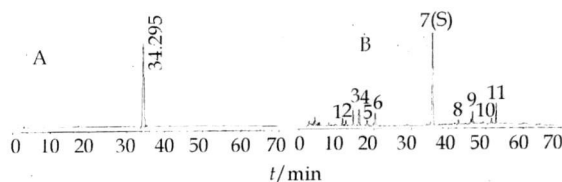


图 1 木兰花碱对照品(A)和样品(B)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of escholine reference substance (A) and *Z. echinocarpum* (B)

2.2 供试品溶液的制备:精密称取药材粉末 1.0 g,置烧杯中,加水 30 mL,浸泡 30 min,煎煮并保持微沸 30 min,倾出煎煮液,再加水 20 mL,煎煮并保持微沸 20 min,滤过,合并滤液,转移定容于 50 mL 量瓶中,摇匀,即得(生药浓度为 0.02 g/mL)。

2.3 对照品溶液的制备:精密称取木兰花碱对照品,加色谱纯甲醇溶解,制成含木兰花碱 1 mg/mL 的溶液,摇匀,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验:取同一供试品溶液,连续进样 5 次,其相对应的色谱峰相对保留时间的 RSD 小于 3.0%,主要峰的相对峰面积的 RSD 小于 5.0%,表明进样的精密度良好。

2.4.2 重现性试验:精密称取同一药材粉末 5 份,分别按“2.2”的方法制备供试品溶液并测定,其相对应的色谱峰相对保留时间的 RSD 小于 3.0%,主要峰的相对峰面积的 RSD 小于 5.0%,表明本方法重现性良好。

2.4.3 稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于 0、2、4、8、10、12 h 测定,检测色谱图,对其中的共有色谱峰进行分析,结果表明供试品溶液至少在 12 h 内稳定。

2.5 HPLC 指纹图谱建立

2.5.1 图谱的制备:比较供试品的 HPLC 色谱图,其中有 11 个色谱峰是 10 批刺壳花椒药材共有的,因此确定为共有指纹峰。10 批供试品溶液检测结果见表 2~4。按 2.2 制备采集自张家界市的 10 批刺壳花椒药材的供试品溶液并测定,各批供试品的指纹图谱见图 2。

通过对照品与样品图谱比较,对样品图中色谱峰进行标定,样品图中保留时间为 35 min 处的色谱峰(即 7 号峰)为木兰花碱对照品的色谱峰。

表 2 10 批刺壳花椒药材指纹图谱共有峰相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks for ten batches of <i>Z. echinocarpum</i> in HPLC fingerprints											
批号	各峰相对保留时间										
	1	2	3	4	5	6	7(S)	8	9	10	11
2006003-1	0 320 5	0 346 4	0 400 2	0 442 2	0 500 5	0 559 7	1	1 179 5	1 287 3	1 426 7	1 461 2
2006003-2	0 320 5	0 346 4	0 399 7	0 441 8	0 499 5	0 558 3	1	1 177 3	1 285 2	1 424 6	1 459 0
2006003-3	0 318 5	0 344 2	0 397 5	0 439 2	0 499 7	0 560 9	1	1 171 6	1 278 3	1 416 7	1 450 9
2006003-4	0 316 3	0 342 8	0 396 7	0 439 2	0 497 0	0 553 7	1	1 186 2	1 300 1	1 443 3	1 478 5
2006003-5	0 318 5	0 344 5	0 398 1	0 439 0	0 496 2	0 553 3	1	1 173 2	1 285 1	1 424 4	1 458 6
2006003-6	0 332 8	0 358 9	0 415 4	0 461 2	0 522 9	0 588 2	1	1 223 2	1 321 1	1 463 8	1 498 6
2006003-7	0 331 6	0 357 8	0 414 2	0 460 0	0 521 8	0 586 8	1	1 221 8	1 319 7	1 462 2	1 497 0
2006003-8	0 329 4	0 355 6	0 411 6	0 456 2	0 516 6	0 580 4	1	1 212 5	1 315 4	1 457 7	1 492 4
2006003-9	0 326 9	0 352 9	0 408 3	0 452 6	0 512 8	0 576 0	1	1 206 2	1 308 4	1 449 8	1 484 3
2006003-10	0 329 9	0 356 1	0 411 9	0 456 4	0 516 6	0 579 5	1	1 214 4	1 318 1	1 461 3	1 496 2
均值	0 324 5	0 350 5	0 405 3	0 448 8	0 508 4	0 5697	1	1 196 6	1 301 9	1 443 089	1 477 7
RSD/ %	1. 91	1. 79	1. 87	2. 07	2. 11	2. 42	0	1. 74	1. 28	1. 27	1. 26

表 3 10 批刺壳花椒药材指纹图谱共有峰相对峰面积

Table 3 Relative areas of common peaks for ten batches of <i>Z. echinocarpum</i> in HPLC fingerprints											
批号	各峰相对峰面积										
	1	2	3	4	5	6	7(S)	8	9	10	11
2006003-1	0 064 734	0 044 272	0 159 146	0 137 415	0 062 154	0 165 621	1	0 045 953	0 147 946	0 052 126	0 113 042
2006003-2	0 064 883	0 043 929	0 154 803	0 132 588	0 061 922	0 174 397	1	0 065 752	0 183 143	0 063 911	0 145 872
2006003-3	0 074 502	0 050 737	0 189 735	0 165 079	0 074 267	0 176 728	1	0 072 423	0 196 216	0 109 010	0 328 698
2006003-4	0 090 608	0 061 401	0 222 864	0 194 443	0 105 398	0 231 388	1	0 077 738	0 202 320	0 112 000	0 353 347
2006003-5	0 028 254	0 019 281	0 066 147	0 054 471	0 026 617	0 084 817	1	0 029 514	0 092 298	0 033 187	0 104 917
2006003-6	0 038 872	0 030 364	0 105 736	0 104 174	0 042 694	0 110 229	1	0 031 364	0 063 936	0 038 200	0 091 231
2006003-7	0 055 506	0 045 402	0 149 420	0 144 532	0 061 534	0 153 456	1	0 045 232	0 193 346	0 058 599	0 202 913
2006003-8	0 097 495	0 066 019	0 266 557	0 219 786	0 087 589	0 294 199	1	0 098 189	0 295 837	0 101 036	0 315 528
2006003-9	0 024 993	0 019 761	0 062 685	0 052 665	0 024 459	0 061 364	1	0 028 329	0 059 032	0 021 958	0 098 624
2006003-10	0 031 631	0 028 027	0 088 552	0 069 827	0 036 045	0 092 933	1	0 026 845	0 110 999	0 023 400	0 077 163
均值	0 057 147 80	0 040 919	0 146 565	0 127 498	0 058 268	0 154 513	1	0 052 134	0 154 507	0 061 343	0 183 134
RSD/ %	45. 26	39. 73	45. 96	45. 00	45. 25	46. 12	0	47. 88	47. 97	56. 55	59. 62

表 4 10 批刺壳花椒药材指纹图谱共有峰的峰面积

Table 4 Areas of common peaks for ten batches of <i>Z. echinocarpum</i> in HPLC fingerprints											
批号	峰面积										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
2006003-1	88 418	60 470	217 373	187 691	84 895	226 217	1 365 871	62 766	202 075	71 198	154 401
2006003-2	50 805	34 397	121 212	103 817	48 485	136 554	783 007	51 484	143 402	50 043	114 219
2006003-3	123 590	84 167	314 746	273 846	123 199	293 169	1 658 874	120 140	325 497	180 834	545 268
2006003-4	129 710	87 899	319 041	278 355	150 883	331 243	1 431 549	111 286	289 631	160 333	505 834
2006003-5	60 039	40 971	140 560	115 750	56 561	180 235	2 124 975	62 716	196 130	70 521	222 946
2006003-6	116 707	91 163	317 453	312 762	128 180	330 942	3 002 314	94 166	191 957	114 689	273 904
2006003-7	123 424	100 957	332 252	321 384	136 828	341 227	2 223 618	100 579	429 927	130 301	451 200
2006003-8	148 243	100 383	405 304	334 188	133 180	447 333	1 520 514	149 297	449 825	153 627	479 764
2006003-9	55 849	44 156	140 072	117 682	54 655	137 121	2 234 553	63 303	131 911	49 066	220 381
2006003-10	72 534	64 269	203 059	160 122	82 655	213 106	2 293 109	61 558	254 533	53 659	176 943
均值	96 931. 8	70 883. 2	251 107. 2	220 559. 7	99 952. 1	263 714. 7	1 863 838	87 729. 5	261 488. 8	103 427. 1	314 486

共有峰 的峰面 积	总峰 面积	共有峰面 积占总峰 面积百分 比/ %
2 721 375	2 778 204	97. 95
1 637 424	1 769 802	92. 52
4 043 330	4 285 927	94. 34
3 795 764	4 103 599	92. 50
3 271 404	3 571 399	91. 60
4 974 237	5 216 279	95. 36
4 691 697	4 918 256	95. 39
4 321 658	4 798 595	90. 06
3 248 749	3 452 566	94. 10
3 635 547	3 984 514	91. 24
3 634 119	3 887 914	93. 51

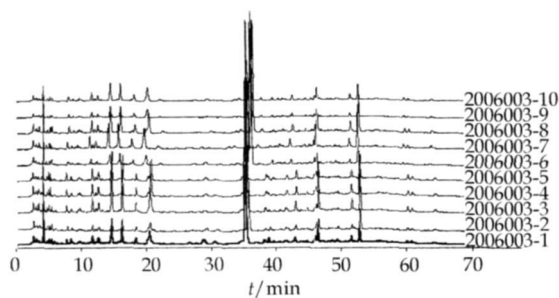


图 2 10 批刺壳花椒 HPLC 图谱叠加图

Fig. 2 Overlapping HPLC chromatogram for ten batches of *Z. echinocarpum*

从表 2~ 4 数据可以看出, 共有峰的相对保留时

表 5 10 批样品的相似度计算结果

Table 5 Results of similarity analysis for ten batches of *Z. echinocarpum* in HPLC fingerprints

批号	2006003-1	2006003-2	2006003-3	2006003-4	2006003-5	2006003-6	2006003-7	2006003-8	2006003-9	2006003-10	对照指纹图谱
2006003-1	1.000	0.996	0.922	0.980	0.995	0.996	0.937	0.953	0.983	0.988	0.986
2006003-2	0.996	1.000	0.907	0.972	0.994	0.997	0.927	0.946	0.974	0.980	0.980
2006003-3	0.922	0.907	1.000	0.974	0.929	0.918	0.985	0.981	0.967	0.960	0.965
2006003-4	0.980	0.972	0.974	1.000	0.983	0.979	0.980	0.988	0.994	0.993	0.995
2006003-5	0.995	0.994	0.929	0.983	1.000	0.994	0.945	0.959	0.985	0.991	0.991
2006003-6	0.996	0.997	0.918	0.979	0.994	1.000	0.937	0.953	0.980	0.985	0.984
2006003-7	0.937	0.927	0.985	0.980	0.945	0.937	1.000	0.995	0.976	0.968	0.976
2006003-8	0.953	0.946	0.981	0.988	0.959	0.953	0.995	1.000	0.985	0.977	0.983
2006003-9	0.983	0.974	0.967	0.994	0.985	0.980	0.976	0.985	1.000	0.997	0.996
2006003-10	0.988	0.980	0.960	0.993	0.991	0.985	0.968	0.977	0.997	1.000	0.998
对照指纹图谱	0.986	0.980	0.965	0.995	0.991	0.984	0.976	0.983	0.996	0.998	1.000

3 讨论

3.1 前期药效试验证明刺壳花椒根和茎水提取物具有抗炎、镇痛药理作用, 因此采用 HPLC 法主要考察刺壳花椒药材水提部分, 对刺壳花椒药材进行水煎煮处理后进行指纹图谱研究。

3.1.2 检测波长的选择: 采用二极管阵列检测器对指纹图谱的检测波长进行了选择, 结果表明在 278 nm 进行检测时, 基线平稳, 各色谱峰的吸收较强、大部分色谱峰达到了基线分离, 在 70 min 以内, 色谱峰的分布比较均匀。因此采用 278 nm 波长作为刺壳花椒水提取物的检测波长。

3.1.3 流动相的选择: 在实验过程中对刺壳花椒水提部分进行了甲醇-水和乙腈-水流动相系统样品分离效果的反复摸索, 发现乙腈-水系统基线较甲醇-水系统平直, 流动相中加入磷酸可以改善色谱峰的峰形和分离程度, 加入有机胺可以减弱碱性溶质与残余硅醇基的强相互作用, 减轻或消除峰拖尾现象。

3.1.4 参照物的选择: 刺壳花椒中含的木兰花碱在刺

间的 RSD 小于 3.0%; 10 批样品共有峰总面积占总峰面积的平均百分比为 93.51%, 非共有峰总面积均小于总峰面积的 10%; 7 号木兰花碱参照峰的峰面积大于总峰面积的 25%; 除 7 号峰外, 其余峰的峰面积小于总峰面积的 10%。

2.5.2 指纹图谱相似度计算: 本实验采用《中国药典》指纹图谱相似度计算软件, 以 10 批刺壳花椒药材 HPLC 图谱建立其共有模式指纹图谱, 对 10 批刺壳花椒样品的 HPLC 图谱进行相似度计算, 结果见表 5。相似度计算结果显示, 10 批样品的相似度均在 0.9~1。

壳花椒水提取物的 HPLC 图谱中出峰时间约为 35 min, 此峰特征性最强、峰面积最大且稳定, 是刺壳花椒药材的主要特征性强峰, 也是指纹图谱中的一个重要鉴别色谱峰。因此实验选择木兰花碱作为刺壳花椒 HPLC 指纹图谱的参照物。

3.1.5 10 批刺壳花椒药材均于 2006 年 8 月采集自湖南省张家界市的不同县、乡镇, 从表 2 看出, 10 批药材各共有峰峰面积比值差异较大, 因此建议如果要进一步控制制剂的质量、使制剂质量稳定, 必须固定药材的产地, 并且在确定产地时范围不能太大, 减少因药材产地不同而导致的影响。

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局 5 中华本草编委会 1 中华本草 [M] 上海: 上海科学技术出版社, 1999
- [2] 张灿奎, 郑安庆, 糜留西, 等 1 刺壳花椒化学成分研究 [J] 武汉植物学研究, 2000, 18(5): 441-442
- [3] 陈世文, 赖茂祥 1 14 种花椒属药用植物根的生药鉴定 [J] 药学学报, 1985, 20(8): 598-605
- [4] 范丽芳, 张兰桐, 景秀娟, 等 1 河北道地药材远志 HPLC-UV 指纹图谱研究 [J] 中草药, 2008, 39(4): 595-598
- [5] 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行) [S] 2000