

广西不同产区两面针 HPLC 指纹图谱研究

雷欣潮¹, 杨焕琪¹, 赖茂祥³, 冯看¹, 刘华钢^{2*}

1. 广西中医学院药学院, 广西 南宁 530001

2. 广西医科大学, 广西 南宁 530021

3. 广西中医药研究院, 广西 南宁 530022

摘要: 目的 采用高效液相色谱法建立两面针的 HPLC 色谱指纹图谱分析方法, 为其品质控制提供可靠依据。方法 采用 HPLC-UV 分析两面针的指纹图谱。色谱柱: UltimateTMXB C₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为水 (0.2%磷酸+0.2%三乙胺) (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~5 min, 8%~12% B; 5~7 min, 12%~15% B; 7~14 min, 15%~21% B; 14~35 min, 21%~25% B; 35~40 min, 25%~36% B; 40~60 min, 36%~52% B; 60~80 min, 52%~100% B; 80~95 min, 100% B; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 °C; 检测波长 250 nm, 测定 24 批两面针指纹图谱, 应用相似度分析、系统聚类分析, 对两面针进行分类研究。结果 在色谱指纹图谱中, 确定了 22 个共有峰, 根据相似度分析、系统聚类分析的结果, 将 24 批药材分为 2 类。结论 该指纹图谱检测方法方便, 重现性好, 可用于两面针质量控制。

关键词: 两面针; 指纹图谱; HPLC-UV; 相似度分析; 聚类分析

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2012)05 - 1003 - 06

HPLC fingerprint of *Zanthoxylum nitidum* from different habitats

LEI Xin-chao¹, YANG Huan-qi¹, LAI Mao-xiang³, FENG Kan¹, LIU Hua-gang²

1. College of Pharmacy, Guangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China

2. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

3. Guangxi Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530022, China

Key words: *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC.; fingerprint; HPLC-UV; similarity analysis; cluster analysis

两面针为芸香科植物两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. 的干燥根^[1-2], 又名入地金牛、蔓椒、双面针、双背针等, 是广西的道地药材, 其茎皮、根和根皮中均含有生物碱类、无机元素、木质素类。主治风湿性关节痛、牙痛、胃痛、咽喉肿痛、毒蛇咬伤等症, 现代研究表明两面针具有消肿止痛、抗菌等活性, 尤其在抗肿瘤方面具有较大开发价值^[3-5]。目前, 两面针由于市场用量的逐年增大, 两面针原材料的采集已越来越困难, 临近枯竭, 市场上两面针原料的伪品也较多。本实验建立了两面针指纹图谱的分析方法, 能更有效地控制其质量, 两面针的 GAP 规范种植提供借鉴。

1 仪器与材料

岛津高效液相色谱仪 (包括 LC-20A 二元泵,

SIL—20A 标准自动进样器, SPD—20A 紫外可见检测器, CTO—20A 柱温箱, CBM—20A 工作站)。SB—3200T 超声波清洗仪 (上海能信超声有限公司); Barnstead D3750 超纯水仪; BP—211D 电子分析天平 (德国赛多利斯 BS—224s); RE—52AA 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂)。

鹅掌楸碱 (质量分数>98%) 由广西师范大学药用资源化学与药用分子教育部重点实验室分离所得; 氯化两面针碱 (批号 110848-200502)、乙氧基白屈菜红碱 (批号 110847-200601)、L-芝麻素 (质量分数>98%, 批号 SE060523)、两面针对照药材 (批号 121014-200302) 购于中国药品生物制品检定所。乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher 公司), 甲醇 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 超纯水。各药材

收稿日期: 2011-09-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30760302); 广西壮族自治区科技攻关与新产品试剂 (桂科攻 0992003A-21)

作者简介: 雷欣潮 (1985—), 男, 畲族, 福建宁德市人, 硕士研究生, 从事中药质量标准和药效研究。

Tel: 18702772862 E-mail: xinchao223@163.com

*通讯作者 刘华钢 Tel: (0771)5350964 E-mail: hgliu@126.com

样品具体来源见表 1, 均由广西中医药研究院中药研究所赖茂祥研究员鉴定为两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. 的根。将药材 45 ℃干燥后粉碎, 过 40 目筛备用。

表 1 样品来源

Table 1 Sources of samples

编号	来源	编号	来源
S1	广西南宁市大塘	S13	广西灵山县沙坪镇
S2	广西大新县榄圩镇	S14	广西马山县
S3	广西大新县上古岭	S15	广西南宁市
S4	广西大新县	S16	广西宁明县
S5	广西金秀县大瑶山	S17	广西融水县
S6	广西扶绥县	S18	广西上思县十万大山
S7	广西南宁市高峰	S19	广西天等县
S8	广西南宁市高峰林场	S20	广西田东县
S9	广西崇左市	S21	广西武鸣县
S10	广西隆安县	S22	广西武鸣县伊岭岩
S11	广西南宁市西乡塘区	S23	广西玉林市
S12	广西南宁市老虎岭	S24	中国药品生物制品检定所

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 UltimateTMXB C₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为水 (0.2%磷酸+0.2%三乙胺) (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~5 min, 8%~12% B; 5~7 min, 12%~15% B; 7~14 min, 15%~21% B; 14~35 min, 21%~25% B; 35~40 min, 25%~36% B; 40~60 min, 36%~52% B; 60~80 min, 52%~100% B; 80~95 min, 100% B。体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 ℃; 检测波长 250 nm; 进样量 10 μL; 分析时间 95 min。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取氯化两面针碱对照品 2.41 mg、乙氧基白屈菜红碱对照品 3.91 mg、鹅掌楸碱对照品 1.53 mg 置 10 mL 棕色量瓶中, L-芝麻素对照品 1.87 mg, 置于 25 mL 棕色量瓶中, 加适量无水乙醇使之溶解并加至刻度, 摆匀, 得到混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取两面针药材 0.5 g, 精密称定, 加甲醇 30 mL, 回流提取 30 min, 滤过, 浓缩, 残渣定容到 25 mL 量瓶中, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 得供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一两面针药材供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 5 次, 记录色谱图, 结果表明, 各共有峰与参比峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 值分别为 0.02%~0.20% 与

0.80%~2.87%, 结果表明仪器精密度较好, 符合指纹图谱要求。

2.4.2 稳定性试验 取同一供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进行测定。各共有峰与参比峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 值分别为 0.12%~0.35% 与 0.80%~2.87%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.4.3 重复性试验 取同一两面针药材 5 份, 同法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别进样检测, 记录色谱图, 结果表明, 各共有峰与参比峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 值分别为 0.13%~0.35% 与 0.05%~2.70%, 说明本实验方法的重复性良好, 符合指纹图谱要求。

2.5 样品测定

分别吸取两面针供试品溶液与对照品溶液 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件进行测定。

2.6 指纹图谱的建立及共有峰的确定

分别制备 24 批两面针供试品溶液, 按以上色谱条件测定, 记录色谱图(图 1)。根据 24 个产地两面针指纹图谱的检测结果, 生成两面针共有模式的对照指纹图谱, 分别选择鹅掌楸碱、氯化两面针碱、乙氧基白屈菜红碱、L-芝麻素的色谱峰为参照峰。分析色谱图可以确定两面针指纹图谱中的 22 个色谱峰为其共有特征峰(图 2)。

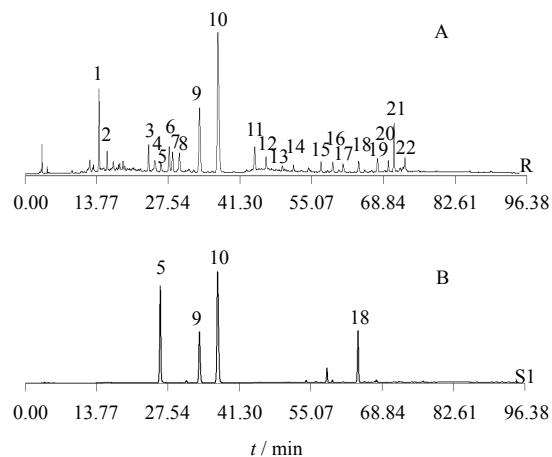


图 1 两面针参考指纹图谱 (A) 与混合对照品 (B) HPLC 图
Fig. 1 Reference fingerprint (A) and HPLC chromatogram of mixed reference substances (B) of *Z. nitidum*

2.7 共有指纹峰的相对保留时间及相对峰面积

在供试品色谱图中,以乙氧基白屈菜红碱色谱

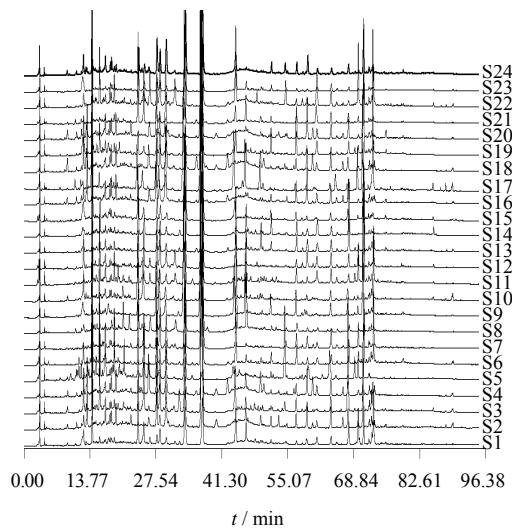


图 2 24 批两面针的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of 24 batches of *Z. nitidum*

峰(10号峰)为参照峰^[6],将其保留时间和色谱峰面积为1,将其他特征峰的保留时间与峰面积和乙氧基白屈菜红碱的保留时间与峰面积相比,得到各峰的相对保留时间和相对峰面积(表2和3)。按以上方法计算24个产地药材的22个共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积显示出了很好的“共有”特点。

2.8 指纹图谱相似度评价

采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A版)对24批不同产地的两面针分别进行相似度评价,计算各色谱图的整体相似度(表4)。除S1、S4、S8、S14、S17、S18、S23相似度低于0.90外,其他产地的两面针指纹图谱相似度均高于0.90。

2.9 各产地两面针的聚类分析

将不同产地两面针HPLC图谱中22个共有峰的峰面积值标准化组成 24×22 阶原始数据矩阵,运用SPSS17.0软件对其进行系统聚类分析,采用组间

表 2 24 批样品共有峰的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks

样品	各指纹峰相对保留时间										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
S1	0.383	0.425	0.640	0.672	0.706	0.746	0.763	0.798	0.903	1.000	1.187
S2	0.385	0.427	0.644	0.677	0.703	0.748	0.765	0.800	0.906	1.000	1.188
S3	0.385	0.427	0.643	0.675	0.703	0.748	0.765	0.801	0.905	1.000	1.188
S4	0.385	0.427	0.643	0.663	0.702	0.748	0.765	0.800	0.906	1.000	1.187
S5	0.384	0.426	0.641	0.673	0.700	0.745	0.763	0.798	0.901	1.000	1.185
S6	0.384	0.426	0.643	0.675	0.709	0.748	0.765	0.800	0.905	1.000	1.193
S7	0.385	0.428	0.645	0.677	0.712	0.750	0.768	0.804	0.908	1.000	1.197
S8	0.383	0.426	0.642	0.675	0.708	0.747	0.763	0.799	0.904	1.000	1.190
S9	0.385	0.427	0.643	0.675	0.703	0.748	0.765	0.800	0.904	1.000	1.190
S10	0.386	0.428	0.644	0.676	0.703	0.748	0.766	0.801	0.904	1.000	1.191
S11	0.385	0.428	0.645	0.678	0.712	0.750	0.768	0.803	0.906	1.000	1.196
S12	0.386	0.428	0.644	0.676	0.711	0.750	0.767	0.803	0.907	1.000	1.194
S13	0.385	0.427	0.644	0.676	0.711	0.749	0.766	0.801	0.904	1.000	1.194
S14	0.384	0.426	0.642	0.675	0.707	0.747	0.764	0.799	0.902	1.000	1.190
S15	0.386	0.427	0.639	0.671	0.703	0.747	0.765	0.801	0.904	1.000	1.181
S16	0.386	0.428	0.646	0.679	0.709	0.749	0.767	0.801	0.907	1.000	1.197
S17	0.384	0.426	0.639	0.671	0.700	0.746	0.763	0.800	0.901	1.000	1.187
S18	0.384	0.428	0.641	0.663	0.701	0.747	0.765	0.799	0.906	1.000	1.185
S19	0.385	0.427	0.644	0.676	0.703	0.749	0.766	0.801	0.904	1.000	1.193
S20	0.387	0.426	0.647	0.680	0.710	0.750	0.767	0.802	0.908	1.000	1.196
S21	0.385	0.427	0.643	0.676	0.709	0.749	0.766	0.801	0.904	1.000	1.192
S22	0.384	0.426	0.642	0.674	0.707	0.747	0.764	0.800	0.903	1.000	1.190
S23	0.384	0.426	0.642	0.675	0.709	0.747	0.764	0.799	0.903	1.000	1.188
S24	0.386	0.426	0.646	0.668	0.708	0.744	0.764	0.793	0.904	1.000	1.187

续表 2

样品	各指纹峰相对保留时间										
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
S1	1.245	1.328	1.385	1.527	1.584	1.642	1.721	1.820	1.873	1.904	1.959
S2	1.248	1.332	1.390	1.532	1.593	1.647	1.727	1.823	1.880	1.908	1.963
S3	1.248	1.332	1.390	1.532	1.593	1.647	1.727	1.823	1.880	1.908	1.963
S4	1.248	1.331	1.390	1.531	1.593	1.647	1.726	1.823	1.880	1.908	1.970
S5	1.244	1.327	1.386	1.527	1.594	1.643	1.715	1.818	1.875	1.903	1.961
S6	1.251	1.335	1.392	1.534	1.596	1.651	1.730	1.829	1.883	1.913	1.969
S7	1.255	1.338	1.396	1.539	1.600	1.655	1.735	1.834	1.888	1.918	1.974
S8	1.247	1.329	1.388	1.530	1.590	1.646	1.724	1.822	1.876	1.906	1.958
S9	1.251	1.336	1.395	1.537	1.599	1.654	1.734	1.830	1.888	1.916	1.972
S10	1.253	1.337	1.396	1.539	1.601	1.656	1.736	1.832	1.890	1.918	1.977
S11	1.254	1.338	1.396	1.538	1.600	1.654	1.734	1.833	1.887	1.918	1.974
S12	1.253	1.335	1.394	1.536	1.598	1.652	1.732	1.831	1.885	1.916	1.972
S13	1.252	1.336	1.393	1.535	1.597	1.652	1.731	1.830	1.884	1.914	1.970
S14	1.247	1.330	1.388	1.529	1.590	1.645	1.724	1.823	1.877	1.907	1.959
S15	1.242	1.325	1.383	1.524	1.585	1.640	1.718	1.815	1.871	1.899	1.955
S16	1.255	1.337	1.397	1.539	1.601	1.656	1.736	1.834	1.891	1.920	1.974
S17	1.250	1.334	1.393	1.535	1.596	1.651	1.731	1.828	1.886	1.915	1.974
S18	1.245	1.327	1.386	1.527	1.587	1.643	1.722	1.818	1.875	1.903	1.961
S19	1.251	1.334	1.392	1.534	1.594	1.650	1.729	1.829	1.883	1.913	1.969
S20	1.255	1.339	1.397	1.540	1.602	1.657	1.736	1.835	1.891	1.920	1.974
S21	1.251	1.335	1.392	1.535	1.596	1.648	1.730	1.828	1.883	1.913	1.970
S22	1.248	1.331	1.388	1.530	1.591	1.646	1.725	1.824	1.878	1.908	1.964
S23	1.245	1.329	1.386	1.527	1.587	1.642	1.721	1.819	1.873	1.902	1.958
S24	1.243	1.327	1.387	1.525	1.590	1.640	1.721	1.824	1.880	1.904	1.952

连接法, 利用欧式距离(Euclidean)作为样品的测度。根据24个样品之间相关系数由大到小的顺序合并, 样品中S1、S2、S3、S4、S6、S7、S8、S9、S10、S11、S12、S13、S14、S15、S16、S17、S18、S19、S20、S21、S22、S23、S14可以聚为I类, S5单独聚为II类, 该结果与指纹图谱相似度分析结果相近(图3)。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

分别在210、220、230、250、260、272、285、300 nm的波长处对样品进行测定, 通过比较发现250 nm处色谱峰较多, 峰形较好且吸光度较大, 故选择250 nm作为测定波长。本实验考察了4种流动相系统: 甲醇-水、乙腈-水、甲醇-水(0.2%磷酸+0.2%三乙胺)、乙腈-水(0.2%磷酸+0.2%三乙胺)进行二元梯度洗脱, 结果表明, 甲醇-水系统中色谱

峰分离较差, 且甲醇-水、乙腈-水、甲醇-水(0.2%磷酸+0.2%三乙胺)系统基线漂移严重, 乙腈-水(0.2%磷酸+0.2%三乙胺)系统的分离效果较好, 故选择乙腈-水(0.2%磷酸+0.2%三乙胺)作为流动相进行二元梯度洗脱。

3.2 提取溶剂与提取方法

分别比较了甲醇、乙醇、石油醚、氯仿、醋酸乙酯对两面针的提取效果, 结果表明甲醇提取的效果最佳, 色谱峰的数目最多, 量较高, 且峰形较好, 因此选为提取溶剂。分别比较超声提取、索氏提取、加热回流3种方法, 结果表明加热回流0.5 h效果最好, 因此选加热回流提取作为提取方法。

3.3 结果分析

本实验通过对24批两面针的指纹色谱图的比较研究, 发现不同产地的两面针整体色谱峰峰形相似, 相似度较高, 但样品S5在非共有峰及特征指

表 4 样品相似度

Table 4 Similarity of samples

批号	相似度	批号	相似度
S1	0.794	S13	0.981
S2	0.925	S14	0.891
S3	0.922	S15	0.939
S4	0.888	S16	0.904
S5	0.498	S17	0.874
S6	0.978	S18	0.877
S7	0.940	S19	0.972
S8	0.848	S20	0.909
S9	0.976	S21	0.968
S10	0.951	S22	0.929
S11	0.973	S23	0.845
S12	0.959	S24	0.932

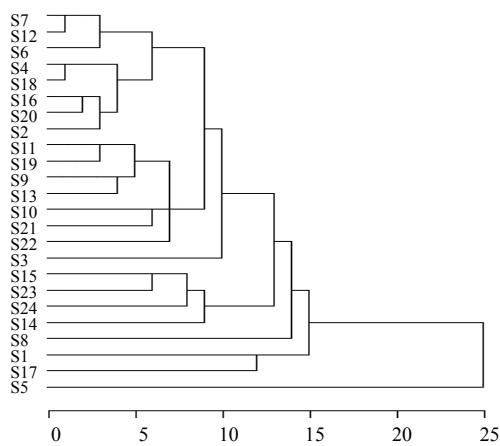


图 3 系统聚类分析结果

Fig. 3 Results of hierarchical cluster analysis

纹峰的相对大小上还存在一定的差别，说明不同产地的种源受地域、土壤环境等影响较大，这对两面针 GAP 规范种植产地规划具有一定参考作用。来源相近的样品 S7、S8，相似度评价和聚类分析并不接近，表明除了地域因素外，两面针受环境影响导致个体间差异。从分析结果还可以看出，24 批样品中绝大多数样品相似度均大于 0.9，表明各个产地药材质量具有较好的相似性，因此，从实验结果中判定作为两面针主产地的广西西南区域两面针质量是稳定的，可以建立合格的两面针指纹图谱。

参考文献

- [1] 肖培根. 新编中药志. [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [2] 王晓玲, 马燕燕, 丁克毅, 等. 两面针中的两个新生物碱 [J]. 中草药, 2010, 41(3):340-342.
- [3] 姚荣成, 胡疆. 两面针化学成分及其药理活性研究概况 [J]. 药学实践杂志, 2004, 22(5): 264-267.
- [4] 秦三海, 刘华钢, 王博龙, 等. 氯化两面针碱体外诱导肺癌 SPC-A-1、舌癌 Tca8113 两种肿瘤细胞株凋亡的研究 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(2): 279-280.
- [5] 王博龙, 刘华钢, 杨斌, 等. 氯化两面针碱体外对人口腔鳞癌多药耐药细胞 KBv200 的抗癌活性 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2007, 21(6): 512-515.
- [6] 《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求（暂行）》 [S]. 2000.