

# 两面针与毛两面针的HPLC指纹图谱对比研究<sup>Δ</sup>

黄琪<sup>1,2\*</sup>, 雷鹏<sup>1,2#</sup>, 刘海涛<sup>1,2</sup>, 朱露<sup>1,2</sup>, 谭润雅<sup>1,2</sup> (1.中南大学湘雅医院药学部, 长沙 410008; 2.中南大学药学院, 长沙 410013)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)03-0377-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.03.28

**摘要** 目的:建立并比较两面针与毛两面针的高效液相色谱指纹图谱。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Promosil C<sub>18</sub>,流动相为乙腈(流动相A)-0.2%磷酸-0.2%三乙胺水溶液(流动相B)(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为283 nm,柱温为20 ℃,进样量为10 μl。收集不同批次的33批样品进行测定,并使用聚类分析和主成分分析对指纹图谱进行模式识别研究,利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)对33批样品的相似度进行评价。结果:从两面针、毛两面针药材的指纹图谱中分别得出18、27个特征峰,经对照,指出木兰花碱、橙皮苷、氯化两面针碱、乙氧基白屈菜红碱4种共有成分,而毛两面针素为毛两面针药材独有,两种药材的相似度均>0.87。两者除指标成分的种类不同外,其含量也有较明显的差异。结论:两面针与毛两面针药材所含指标成分的种类和含量均有所不同,该方法可为两面针和毛两面针的鉴别提供依据。

**关键词** 两面针;毛两面针;聚类分析;指纹图谱;高效液相色谱法;对比

## Comparison of HPLC Fingerprints between *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC and *Z. nitidum* f. *fastuosum*

HUANG Qi<sup>1,2</sup>, LEI Peng<sup>1,2</sup>, LIU Hai-tao<sup>1,2</sup>, ZHU Lu<sup>1,2</sup>, TAN Run-ya<sup>1,2</sup> (1.Dept. of Pharmacy, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2.School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To compare and establish HPLC fingerprint of *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC and *Z. nitidum* f. *fastuosum*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Promosil C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile (A)-0.2% phosphoric acid-0.2% triethylamine solution (B) with gradient elution at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 283 nm and column temperature was 20 ℃. The sample size was 10 μl. 33 samples from various batches were analyzed, and cluster analysis and principal component analysis (PCA) were applied to study fingerprint and chemical pattern recognition. The similarity of 33 batches of samples was evaluated by Important Chromatogram Fingerprint Similarity Evaluation System (2004 A edition). RESULTS: 18 and 27 characteristic peaks were identified in the fingerprint of *Z. nitidum* (Roxb.) DC and *Z. nitidum* f. *fastuosum*. 4 common components were identified, as magnoflorine, hesperidin, nitidine chloride and ethoxychelerythrine. Toddalolactone was only found in *Z. nitidum* f. *fastuosum*. The similarity of two medicinal materials were higher than 0.87. The result showed that their contents of samples were different significantly and the types of indicator components were different. CONCLUSIONS: The indicator components of *Z. nitidum* (Roxb.) DC and *Z. nitidum* f. *fastuosum* are different in type and content. The method is stable, precise and reproducible, and can be used for the identification of *Z. nitidum* (Roxb.) DC and *Z. nitidum* f. *fastuosum*.

**KEYWORDS** *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC; *Z. nitidum* f. *fastuosum*; Cluster analysis; Fingerprint; HPLC; Comparison

两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. 为芸香科花椒属木质藤本植物两面针的干燥根<sup>[1]</sup>, 自1977年始被收入《中国药典》。其化学成分及药理学研究发现, 两面针茎皮、根和根皮中含有生物碱类<sup>[2-4]</sup>、苯丙素类<sup>[5]</sup>、香豆素类<sup>[6]</sup>、黄酮苷类<sup>[7]</sup>、甾醇类<sup>[8]</sup>、无机元素<sup>[9-10]</sup>等成分, 具有解痉、镇痛、抗炎、抗菌、抗癌等药理活性<sup>[11-14]</sup>。毛两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. f. *fastuosum* 为两面针的变种, 毛两面针素为毛两面针的主要成分之一<sup>[15]</sup>。自2000年以后《中国药典》检查项下明确规定正品

Δ 基金项目: 湖南省中医药科研计划项目(No. 2009008); 长沙市科技计划项目(No. K0802115-31)

\* 药师, 硕士。研究方向: 中药质量控制、中药新药研发。电话: 0731-84327114。E-mail: huangqi20021986@163.com

# 通信作者: 副教授, 副主任医师, 博士。研究方向: 中药质量控制、中药新药研发。电话: 0731-84327584。E-mail: lp7222003@126.com

两面针不得检出毛两面针素。由于毛两面针人工种植、生产成本较低, 价格便宜, 植物形态学也与两面针极其相似, 常被代替为两面针使用, 导致了现药材市场上两面针品种的混乱。为了充分合理利用与开发两面针资源, 本文采用高效液相色谱(HPLC)模式识别技术, 对比两面针与毛两面针中的化学成分, 以为两者药材鉴别及开发利用提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1100 型 HPLC 仪, 包括 G1311A 四元梯度泵、G1313A 自动进样器、G1315A 二极管阵列检测器(美国安捷伦公司); AG285 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); KS600D 型超声波清洗仪(宁波科生仪器厂); 台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂); MS1 型漩涡震荡混合器(广州仪科实验室技术有限公司)。

## 1.2 试剂

橙皮苷对照品(批号:110721-201014)、氯化两面针碱对照品(批号:110848-200502)、乙氧基白屈菜红碱对照品(批号:110847-200601)及毛两面针素对照品(批号:111531-200902)均购于中国食品药品检定研究院;木兰花碱对照品(批号:BBP01035,纯度>98%)购于云南西力生物技术有限公司;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

## 1.3 药材

5批野生两面针与野生毛两面针采自广西壮族自治区桂北山区,经中南大学湘雅医院药剂科徐平声副教授鉴定为芸香科花椒属植物两面针 *Z. nitidum* 及毛两面针 *Z. nitidum* (Roxb.)DC. f. *fastuosum* 的干燥根;其余28批次的药材购于全国各大医药公司、药店以及药材市场,标本均存放于湘雅医院药剂科。药材来源见表1。

表1 药材来源

Tab 1 Origin sources of medicinal materials

编号	药材来源	部位	产地	批号/采集日期
S1	广西自采(两面针)	根	广西	2009.02.25
S2	广西自采(两面针)	根	广西	2010.01.12
S3	广西自采(两面针)	根	广西	2009.04.07
S4	广西自采(两面针)	根	广西	2009.07.02
S5	广西自采(毛两面针)	根	广西	2009.05.20
S6	湖南振兴医药有限公司	根	广西	110624
S7	湖南振兴医药有限公司	茎	广东	101113
S8	湖南神农医药有限公司	根	广西	100407
S9	湖南神农医药有限公司	根	广西	110705
S10	湖南神农医药有限公司	茎	广西	071205
S11	湖南神农医药有限公司	茎	广西	100705
S12	湖南长沙市老百姓大药房	茎	广西	100901
S13	湖南长沙市楚仁堂大药房	茎	广西	110101
S14	湖南药圣堂制药有限公司	茎	广西	100101
S15	湖南三湘饮片有限公司	茎	湖南	110613
S16	湖南双舟大药房	茎	湖南	070902
S17	湖南望城县药王堂药店	茎	湖南	070910
S18	湖南岳阳市天香中药有限公司	茎	-	091266
S19	广西贺州市莫普特新兴药店	茎	广西	20111013
S20	广西贺州荣和医药荣兴药房	茎	-	111006
S21	广西贺州市桂东大药房	茎	-	20111009
S22	广西贺州市大参林药房	茎	-	20110801
S23	广西贺州市莫普特第27分店	茎	-	20081204
S24	广东佛山市臻诚中药有限公司	根	广东	100424
S25	广东汕头市吉庆善养生堂药店	根	福建	110810
S26	云南昆明市千草源药材市场	茎	广西	110130
S27	云南昆明市千草源药材市场	茎	广西	110815
S28	河北石家庄诚信医药有限公司	茎	-	110101
S29	福建福州市永惠医药	茎	福建	110202
S30	江苏徐州市尊善堂中药店	茎	-	110901
S31	北京同仁堂药店	茎	广西	070719
S32	安徽濠州新源堂药材专营店	茎	广西	100101
S33	山东泰安市金泰联医药有限公司	根	-	-

注:“-”表示商家未提供产地信息

Note:“-” means the seller dose not provide the origin information

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Promosil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:A为乙腈,B为0.2%磷酸-0.2%三乙胺水溶液,梯度洗脱(0~10

min, 12% A; 11~18 min, 12% → 23% A; 19~30 min, 23% → 28% A; 31~35 min, 28% → 45% A; 36~48 min, 45% → 60% A; 49~70 min, 60% → 85% A);流速:1.0 ml/min;检测波长:283 nm;柱温:20 ℃;进样量:10 μl。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取木兰花碱、橙皮苷、氯化两面针碱、乙氧基白屈菜红碱、毛两面针素对照品各19.13、21.26、13.24、10.04、21.60 mg,加甲醇溶解并定容至100 ml,超声(功率:250 W,频率:35 kHz)处理5 min,作为对照品贮备液。分别吸取上述对照品贮备液各7、10、2、1、5 ml,加甲醇稀释并定容至同一25 ml量瓶中,摇匀,即得混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取药材粉末约0.5 g,精密称定,加甲醇10 ml,摇匀,超声(功率:250 W,频率:35 kHz)提取0.5 h,取出,放冷至室温,以5 000 r/min离心5 min,吸取上清液至同一25 ml量瓶中量瓶,保留滤渣。滤渣加80%甲醇10 ml,重复上述操作,合并两次滤液至25 ml量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

### 2.3 参照峰的选择

精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液和供试品溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,确定特征峰,指认其中d峰为氯化两面针碱,并将其作为参照峰。高效液相色谱图见图1。

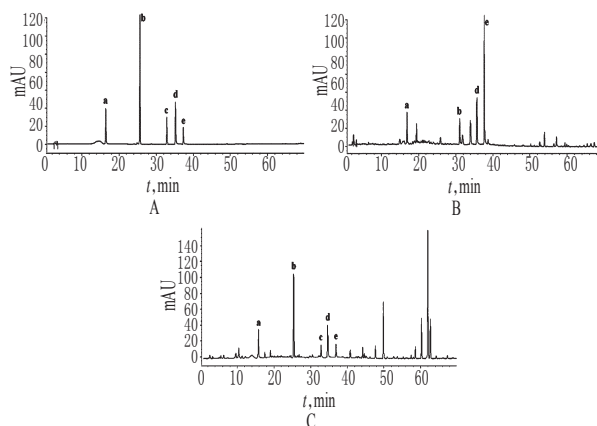


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.两面针供试品;C.毛两面针供试品;a.木兰花碱;b.橙皮苷;c.毛两面针素;d.氯化两面针碱;e.乙氧基白屈菜红碱

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. *Z. nitidum* (Roxb.) DC; C. *Z. nitidum* f. *fastuosum*; a. magnoflorine; b. hesperidin; c. toddalactone; d. nitidine chloride; e. ethoxy-chelerythrine

### 2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密称取两面针和毛两面针药材粉末(S1和S5)各约0.2 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件连续进样6次。结果,氯化两面针碱峰面积的RSD<2%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一份供试品溶液(S1和S5),分别于放置0、3、6、9、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,氯化两面针碱峰面积的RSD<3%,表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 精密称取两面针和毛两面针药材粉末(S1和S5)各约0.2 g,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品

溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,氯化两面针碱色谱峰峰面积的RSD<3%,表明该方法重复性良好。

## 2.5 模式识别研究

2.5.1 聚类分析 将33批样品的色谱峰相对保留时间相对于参照峰的峰面积进行量化,得到原始数据矩阵。采用SPSS 16.0统计软件对其进行聚类分析,采用离差平方和法进行计算,用欧氏距离作为样品的测度。聚类分析树状图见图2。

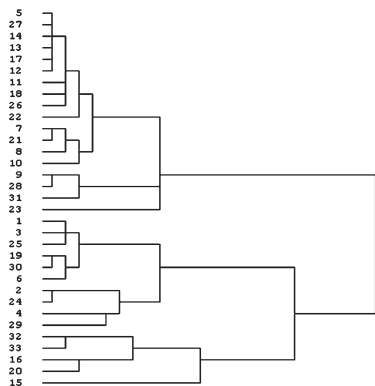


图2 聚类分析树状图  
Fig 2 Dendrogram of cluster analysis

由图2可以看出,33批药材样品共聚为3类:第1类的10批药材中包含有4批(S1~S4)经鉴定为野生两面针的药材,初步认定这10批药材(S1~S4,S25,S19,S30,S6,S24,S29)与野生两面针药材属同一品种;第2类的18批药材中包含有1批(S5)经鉴定为野生毛两面针的药材,初步认定这18批药材(S5,S7~S14,S17~S18,S21~S28,S31)与野生毛两面针药材为同一品种;其余5批次(S15,S16,S20,S32,S33)的药材暂无法辨别其品种。

2.5.2 主成分分析 将33批次药材的色谱数据导入SPSS 16.0统计软件进行数据分析,得到三维投影图。根据各批次投影点与坐标轴距离的不同,33批药材可分为3类:样品编号为S1、S2、S3、S4、S6、S19、S24、S25、S29、S30的药材为第1类,样品编号为S15、S16、S20、S32、S33的药材为第3类,其余样品编号的为第2类。这与聚类分析结果一致,也与生药学鉴定结果一致。

### 2.6 两面针指纹图谱的建立

将10批(S1~S4,S25,S19,S30,S6,S24,S29)两面针药材按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进行测定。将色谱数据导入国家药典委员会开发的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)软件进行分析,生成两面针药材共有模式的对照指纹图谱,得到18个特征峰。通过与混合对照品图谱对照,指认其中的a、b、d、e峰分别为木兰花碱、橙皮苷、氯化两面针碱、乙氧基白屈菜红碱(见图1)。10批两面针药材的HPLC指纹图谱见图3,相似度计算结果见表2。由表2可见,10批样品中除S25、S30的峰面积差异较大以外,其他批次的相似度均>0.90,表明该图谱可用作两面针的质量评价。

### 2.7 毛两面针药材标准指纹图谱的建立

将18批(S5,S7~S14,S17~S18,S21~S28,S31)毛两面针药材按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定。将色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)软件进行分析,生成毛两面针药材共

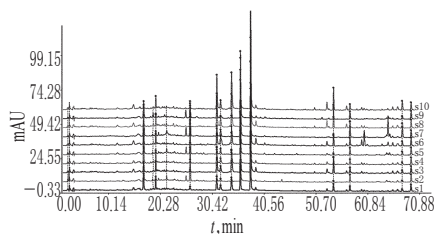


图3 两面针药材的HPLC指纹图谱  
Fig 3 HPLC fingerprints of *Z. nitidum* (Roxb.) DC

表2 两面针药材的相似度计算结果

Tab 2 The results of similarity evaluation for *Z. nitidum* (Roxb.) DC

编号	相似度, %	编号	相似度, %
S1	0.986	S19	0.973
S2	0.990	S24	0.906
S3	0.982	S25	0.724
S4	0.984	S29	0.985
S6	0.969	S30	0.459

有模式的对照指纹图谱,得到27个特征峰。通过与混合对照品图谱对照,指认其中的a、b、c、d、e峰分别为木兰花碱、橙皮苷、毛两面针素、氯化两面针碱、乙氧基白屈菜红碱(见图1)。18批毛两面针药材的HPLC指纹图谱见图4,相似度计算结果见表3。由表3可见,18批样品的相似度均>0.87,表明该图谱可用作毛两面针的质量评价。

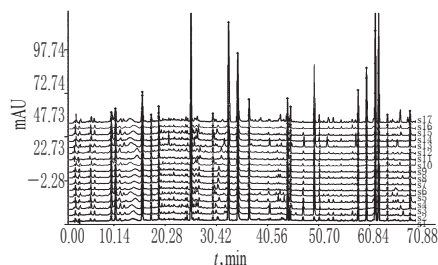


图4 毛两面针药材的HPLC指纹图谱  
Fig 4 HPLC fingerprints of *Z. nitidum* f. *Fastuosum*

表3 毛两面针药材的相似度计算结果

Tab 3 Results of similarity evaluation for *Z. nitidum* f. *Fastuosum*

编号	相似度, %	编号	相似度, %
S5	0.979	S17	0.903
S7	0.876	S18	0.955
S8	0.934	S21	0.980
S9	0.902	S22	0.986
S10	0.973	S23	0.932
S11	0.933	S26	0.931
S12	0.966	S27	0.928
S13	0.986	S28	0.899
S14	0.958	S31	0.886

### 2.8 两面针与毛两面针的指纹图谱信息比较

本研究将两面针与毛两面针中5种指标成分的指纹图谱进行对比,结果发现两面针图谱信息提示其主要含有3种生物碱类成分,其中乙氧基白屈菜红碱含量较高;而毛两面针图谱提示5种成分均有,其中毛两面针素和橙皮苷的峰面积所占比重较大,而乙氧基白屈菜红碱峰面积所占比重则极小,与文献<sup>[15]</sup>报道的结果一致。此外,在强极性部分(40 min以前)两

种药材图谱的共有峰相对较多,但峰面积差异较大;在非极性部分(50 min以后)共有峰相对较少,两面针药材在非极性部分体现的化学信息较少,毛两面针则存在几个较强的信号峰,其化学成分有待进一步分析研究。两面针与毛两面针的HPLC指纹图谱比较见图5。

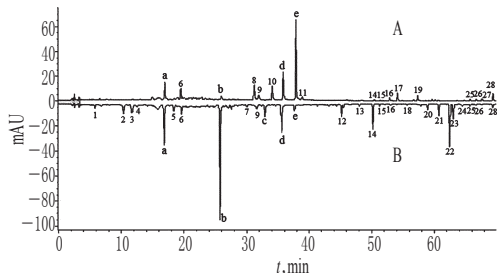


图5 两面针与毛两面针的HPLC指纹图谱比较

A.两面针;B.毛两面针;a.木兰花碱;b.橙皮苷;c.毛两面针素;d.氯化两面针碱;e.乙氧基白屈菜红碱

### Fig 5 Comparison of HPLC fingerprints of *Z. nitidum* (Roxb.) DC and *Z. nitidum* f. *fastuosum*

A. *Z. nitidum* (Roxb.) DC; B. *Z. nitidum* f. *fastuosum*; a. magnoflorine; b. hesperidin; c. toddalactone; d. nitidine chloride; e. ethoxychelerythrine

## 3 讨论

### 3.1 提取方法的选择

为了较为全面地反映两面针与毛两面针药材的整体质量,本研究探讨了两面针与毛两面针供试品溶液的制备方法,其中包括不同提取方式、提取溶剂以及提取时间对药材化学成分产生的影响。在提取溶剂方面,考虑到80%甲醇提取的色谱图出峰数最多、有较丰富的色谱信息,而橙皮苷及部分化合物则选用纯甲醇提取效果更佳,为此本研究采用两次不同溶剂分别超声提取的方法,得到了更完整的色谱指纹图谱信息。

### 3.2 色谱条件的选择

本研究参考了相关文献<sup>[15-16]</sup>,采用乙腈-水(含0.2%磷酸和0.2%三乙胺)为流动相进行梯度洗脱,既缩短了分析时间,又可提供更多的信息;并采用二极管阵列检测器绘制三维图谱,结果提示各组分的最大吸收波长主要集中在270~350 nm附近。从图1可以看出,毛两面针素对照品虽然在328 nm附近有最大吸收,但在283 nm波长下也有一定吸收,而328 nm处部分化合物则无法检测得到紫外吸收。为了在图谱中不丢失信息,尽可能地反映组分全貌,本研究选用283 nm作为本研究的检测波长。经查阅文献,本研究是首次在同一色谱条件下对两面针与毛两面针进行鉴定分析。

### 3.3 参照峰的选择

采用氯化两面针碱对照品的峰面积作为基准计算相对峰面积,既能表征各成分在同一样品中的相对含量,又能较客观地反映不同样品中各共有峰所代表的化学成分的数量。在此色谱条件下,能同时记录两面针、毛两面针中橙皮苷等水溶性成分和脂溶性成分的色谱峰,较全面地反映了二者的化学组成,再通过使用指纹图谱模式识别技术结合相似度评价,能够快速、准确地鉴别两面针以及两面针变种毛两面针。

由本研究结果可以看出,两面针与毛两面针不仅在5种指标成分的种类上存在一定差异,在非极性部分也存在着较大差异(毛两面针所体现的化学信息相对较多)。这些成分及含量上的差异是否预示着两种药材药理活性上的差异,值得探究。若差异的化学成分无生理活性,不影响主要成分疗效,则认为毛两面针能代替两面针等同使用;若毛两面针具较强药理活性,即可作为另一种药材与两面针区别对待,单独使用;若存在毒性,则对于两者代替使用尤需慎重。各种情况下化学成分和含量的差异,是否影响该药材的药效和毒性,尚有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] 国家中医药管理局. 中华本草: 四部[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 3 821.
- [2] Yang GH, Chen DF. Alkaloids from the roots of *Zanthoxylum nitidum* and their antiviral and antifungal effects [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2008, 5(9): 1 718.
- [3] Chen JJ, Lin YH, Day SH, et al. New benzenoids and anti-inflammatory constituents from *Zanthoxylum nitidum* [J]. *Food Chemistry*, 2011, 125(2): 282.
- [4] 李定祥, 闵知大. 两面针中生物碱的分离 [J]. 中国天然药物, 2004, 2(5): 285.
- [5] 胡疆, 徐希科, 柳润辉, 等. 两面针中苯丙素类成分研究 [J]. 药学服务与研究, 2006, 6(1): 51.
- [6] 沈建伟, 张晓峰, 汤子俊, 等. 两面针中的香豆素成分 [J]. 中草药, 2004, 35(6): 619.
- [7] 胡疆, 张卫东, 柳润辉, 等. 两面针的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(20): 1 689.
- [8] 李启发, 王晓玲, 官艳丽, 等. 两面针药材挥发油的GC-MS分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(Suppl): 69.
- [9] 冯洁, 王冬梅, 周劲帆, 等. 中药两面针不同入药部位金属元素的含量测定 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(12): 2 232.
- [10] 覃姣兰, 陈振锋, 刘延成, 等. ICP-AES法测定中草药毛两面针中微量金属元素的含量 [J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(10): 2 851.
- [11] 申庆荣, 黄慧学, 王宏虹, 等. 两面针提取物抗胃癌谱-效关系研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(19): 2 693.
- [12] 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.
- [13] 黄琪, 雷鹏, 欧阳冬生. 芸香科花椒属植物两面针抗肿瘤作用研究进展 [J]. 肿瘤药学, 2011, 1(6): 482.
- [14] 李艳芝, 王慧云. 两面针化学成分及其药理活性研究进展 [J]. 中国药房, 2013, 24(31): 2 966.
- [15] 黄琪, 雷鹏, 刘英慧, 等. 高效液相色谱法同时测定毛两面针药材中5种化学成分含量 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47(18): 1 514.
- [16] 孙培文, 刘海涛, 雷鹏, 等. 反相高效液相色谱法同时测定毛两面针中氯化两面针碱、乙氧基白屈菜红碱和毛两面针素的含量 [J]. 中南药学, 2011, 9(3): 175.

(收稿日期: 2014-02-08 修回日期: 2014-05-19)

(编辑: 孙 冰)