

本文引用:凌勇根,王月秀,冷其霖,刘洋,谭喜平,龚云,龚力民,林丽美,张鹏.单面针药材真伪鉴别研究及等级评价体系的初步建立[J].湖南中医药大学学报,2022,42(7):1112-1120.

单面针药材真伪鉴别研究及等级评价体系的初步建立

凌勇根¹,王月秀¹,冷其霖¹,刘洋¹,谭喜平¹,龚云¹,龚力民²,林丽美²,张鹏^{1*}
(1.株洲千金药业股份有限公司,湖南株洲412007;2.湖南中医药大学,湖南长沙410208)

[摘要] 目的 研究单面针药材区分两面针药材及常见混伪品的鉴别方法;对单面针药材多种质控指标进行检测和聚类分析,初步建立单面针药材等级评价体系,规范单面针药材的质量规格。方法 采用薄层色谱法和高效液相色谱法区分单面针的真伪品;并对30批不同等级的单面针药材展开性状、杂质、直径、水分、总灰分、二氧化硫残留量、重金属和有害元素残留量、醇溶性浸出物及木兰花碱含量等质控指标的检测,应用SPSS 19.0统计软件聚类分析各项指标与单面针药材之间的相关性。结果 研究发现单面针与两面针及常见混伪品在薄层色谱 $R_f=0.9$ 上下各有两条亮红色斑点及在高效液相色谱的1号峰可以作为区分点。30批样品分为3类,1批一等:醇溶性浸出物不少于6.8%,直径不小于2.8 cm,木兰花碱含量不少于0.19%;9批二等:醇溶性浸出物5.8%~7.0%,直径1.3~2.2 cm,木兰花碱含量0.05%~0.17%;20批三等:醇溶性浸出物3.9%~5.8%,直径大小不等,木兰花碱含量0.06%~0.16%。结论 本研究确证了薄层色谱法和高效液相色谱法能够有效鉴别和区分单面针药材与两面针药材及常见混伪品,该方法专属性强、灵敏度高、简便实用;本研究初步建立了单面针3个等级规格药材评价体系,实践中容易掌握,为评价单面针药材质量提供了数据支持,对药材的采收与产地加工、销售流通及临床应用具有一定的指导和实践意义。

[关键词] 单面针;薄层色谱法;高效液相色谱法;真伪鉴别;等级评价

[中图分类号]R282.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.07.010

Authenticity identification and preliminary establishment of grade evaluation system for Zanthoxylum dissitum

LING Yonggen¹, WANG Yuexiu¹, LENG Qilin¹, LIU Yang¹, TAN Xiping¹, GONG Yun¹,
GONG Limin², LIN Limei², ZHANG Peng^{1*}

(1. Zhuzhou Qianjin Pharmaceutical Co., Ltd., Zhuzhou, Hunan 412007, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 41208, China)

[Abstract] **Objective** To study the method of distinguishing Zanthoxylum dissitum from Zanthoxylum nitidum and common fake products; to detect and cluster analyze multiple quality control indicators of Zanthoxylum dissitum, and to initially establish a Zanthoxylum dissitum grade evaluation system and standardize quality specifications of Zanthoxylum dissitum. **Methods** Thin-layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography were used to distinguish the authenticity of Zanthoxylum dissitum; in addition, 30 batches of different grades of Zanthoxylum dissitum were tested for quality control indicators such as properties, impurities, diameter, moisture, total ash, sulfur dioxide residues, heavy metals and harmful elements residues, alcohol-soluble extracts and magnolia alkali content. SPSS 19.0 statistical software was used to cluster analyze the correlation between various indicators and Zanthoxylum dissitum medicinal materials. **Results** The study found that Zanthoxylum dissitum, Zanthoxylum nitidum and common fake products had two bright red spots on the TLC $R_f=0.9$ and the peak 1 in the high performance liquid chromatography can be used as the distinguishing point; 30 batches of samples were divided into 3 categories, 1 batch was first

[收稿日期]2021-12-20

[基金项目]国家中药标准化项目(ZYBZH-C-HUN-21)。

[第一作者]凌勇根,女,副主任中药师,研究方向:中药质量分析和制剂研究。

[通信作者]*张鹏,男,博士,高级工程师,研究方向:天然药物化学,E-mail:pengzhangbjmu@163.com。

class: alcohol-soluble extract was not less than 6.8%, diameter was not less than 2.8 cm, magnolia alkali content was not less than 0.19%; 9 batches were second class: alcohol-soluble extract was 5.8%–7.0%, diameter was 1.3–2.2 cm, magnolia alkali content was 0.05%–0.17%; 20 batches were third class: the alcohol-soluble extract was 3.9%–5.8%, the diameter was different, and the magnolia alkali content was 0.06%–0.16%. **Conclusion** This study confirmed that TLC and high performance liquid chromatography can effectively identify and distinguish *Zanthoxylum dissitum* from *Zanthoxylum nitidum* and common fake products. The method is highly specific, highly sensitive, simple and practical; this research is initially established the evaluation system of three grades of *Zanthoxylum dissitum*, which is easy to grasp in practice. It provides data support for evaluating the quality of *Zanthoxylum dissitum*. It has certain guidance and practical significance for the collection and origin processing, sales circulation and clinical application of the medicinal materials.

[**Keywords**] *Zanthoxylum dissitum*; thin-layer chromatography; high performance liquid chromatography; authenticity identification; grade evaluation

单面针又名山枇杷、大叶花椒、蚬壳花椒等^[1],为我国南方重要的珍稀木本药用植物资源^[2],主产于我国西南及湖南、湖北、广东、广西等地^[3]。其主要含有多种生物碱^[4-5]、内酯类^[6]和黄酮类^[7]等化学成分,具有活血散瘀、祛风除湿、理气止痛的功效。单面针为芸香科植物蚬壳花椒(*Zanthoxylum dissitum* Hemsl.)或刺壳花椒(*Zanthoxylum echinocarpum* Hemsl.)的干燥根和茎^[8]。同属植物两面针为芸香科植物两面针[*Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC.]的干燥根,具有活血化瘀、行气止痛、祛风通络、解毒消肿功效,用于治疗跌打损伤、胃痛、牙痛等^[9],两者的化学成分的相似,混用现象较常见,市场上常见的伪品还有野生花椒等,上述混伪品严重影响了单面针药材的安全应用和质量保障。

“辨状论质”作为中药品种传统经验鉴别,最早由我国著名中药学家谢宗万教授概括提出^[10],即通过“辨状”,包括药材的形状、大小、色泽、表面特征、质地、断面特征及气味等来辨别药材的真伪和评判药材的优劣,即“论质”。也有报道以性状特征^[11]、红外光谱^[12]、分子生物学^[13]和质谱技术^[14]等进行区分,但关于系统地薄层色谱法和高效液相色谱法却少有报道。本研究采用薄层色谱法和高效液相色谱法系统地比较分析,旨在找到单面针与两面针及混伪品的明显区分点,为单面针真伪鉴别和质量控制提供参考。

《七十六种药材商品规格标准》^[15]作为中药材分级的国家标准,执行至今已有35年,但单面针药材一直未被收录,本研究收集30批单面针药材,通过对不同批药材的性状、杂质、直径、水分、灰分、二氧化硫残留量、重金属和有害元素残留量、醇溶性浸出物及木兰花碱含量进行检测和分析,采用SPSS 19.0

统计软件分析单面针药材等级与各质控指标之间的相关性,建立了初步的等级评价体系,为优质的单面针药材质量控制提供了依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

ATS 4 薄层色谱全自动点样仪、ADC 2 薄层色谱全自动展开仪、Derivatizer 薄层色谱全自动喷雾系统、Visualizer 2 薄层色谱数码成像系统(瑞士CAMAG公司);TH-II 薄层色谱显色加热器(上海科哲生化科技有限公司);Waters e2695 型高效液相色谱仪、Waters 2998 型 PDA 检测器(美国 Waters 公司);iCAP RQ ICP-MS 电感耦合等离子体质谱仪(美国赛默飞世尔科技有限公司);AB204-S 型电子天平、AB135-S 型电子天平(瑞士梅特勒公司);KQ300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);SM100 型切割室研磨仪[弗尔德(上海)仪器设备有限公司];114B 型摇摆式中药粉碎机(瑞安市永历制药机械有限公司);A11 型分析型研磨仪(德国 IKA 公司);DZAKW-D-6 型恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司);SX2-4-10 型系列箱式电阻炉(上海力辰仪器科技有限公司)。

1.2 试剂

木兰花碱对照品(批号:M-026-180524)购于成都瑞芬思生物科技有限公司;氯化两面针碱(110848-201604)购于中国食品药品检定研究院。甲醇(批号:P1441123)、95%乙醇(批号:P1433419)、三氯甲烷(批号:P1318320)、乙醇(批号:P1437228)、乙酸乙酯(批号:P1429095)、氨水(批号:P1375833)、二氯甲烷(批号:P1454839)、二乙胺(批号:P1382819)均

为分析纯,购于 General-Reagent 公司;甲醇(批号:P1433419)、甲酸(批号:P1441123)为色谱纯,购于 General-Reagent 公司。药材均为株洲千金药业股份有限公司提供,经由湖南中医药大学龚力民教授鉴定,单面针为芸香科植物蚬壳花椒(*Zanthoxylum dissitum* Hemsley)或刺壳花椒(*Zanthoxylum echinocarpum* Hemsley)的茎,两面针为芸香科植物两面针[*Zanthoxylum nitidum*(Roxb.) DC.]的根,野花椒为芸香科植物野花椒(*Zanthoxylum simulans* Hance.)的茎,飞龙掌血为芸香科植物飞龙掌血[*Toddalia asiatica*(L.) Lam.]的茎。详见表 1。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱法

2.1.1 供试品溶液的制备 取供试品粉末(过二号筛)2 g,置具塞锥形瓶,加乙醇 40 mL,密闭,超声处理 60 min,过滤,水浴蒸干,残渣加 2 mL 乙醇溶解即得,作为供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液的制备 取木兰花碱、氯化两面针碱对照品适量,分别加乙醇制成 1 mL 中含 1 mg 和 0.5 mg 的对照品溶液。

2.1.3 薄层色谱鉴定 照薄层色谱法(《中华人民共和国药典》2020 年版四部通则 0502)^[16]试验,吸取上述对照品溶液 5 μ L;供试品溶液 5~10 μ L 分别点于同一硅胶 GF254 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水-二乙胺(40:10:1:0.1)为展开剂,展开,取出,晾干,在 365 nm 下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

2.1.4 样品结果 采用上述色谱法对 4 批蚬壳花椒(S₁~S₄)、3 批刺壳花椒(C1~C3)、4 批两面针样品(LS26~LS29)及 3 批伪品[1 批飞龙掌血(W1)、2 批野花椒(W2、W3)]进行薄层鉴别,结果样品中斑点清晰,不同基原样品具有良好的一致性,在 R_f=0.9 处,各有两条亮红色斑点,可以作为单面针与两面针及伪品的鉴别点,可以达到区分伪品的目的。薄层图谱见图 1。

表 1 实验样品信息

批号	产地	基原部位	收集时间	批号	产地	基原部位	收集时间
S1	贵州铜仁	蚬壳花椒茎	2016-02-17	S27	广西南宁	蚬壳花椒茎	2017-12-15
S2	广东陆丰	蚬壳花椒茎	2016-02-17	S28	广西玉林	蚬壳花椒茎	2018-03-07
S3	湖南张家界	蚬壳花椒茎	2016-03-08	S29	湖南吉首	蚬壳花椒茎	2018-03-07
S4	湖南怀化	蚬壳花椒茎	2016-03-10	S30	湖南怀化	蚬壳花椒茎	2018-06-01
S5	湖南吉首	蚬壳花椒茎	2016-03-11	LS26	广西玉林	两面针根	2016-02-01
S6	湖南吉首	蚬壳花椒茎	2016-06-17	LS27	湖南湘潭	两面针根	2016-05-01
S7	湖南怀化	蚬壳花椒茎	2016-06-17	LS28	湖南怀化	两面针根	2016-05-01
S8	广西桂林	蚬壳花椒茎	2016-07-20	LS29	湖南岳阳	两面针根	2016-05-01
S9	湖南张家界	蚬壳花椒茎	2016-07-22	LS30	广西贺州	两面针根	2016-08-01
S10	广东广州	蚬壳花椒茎	2016-07-22	LS31	广西南宁	两面针根	2016-08-01
S11	湖南吉首	蚬壳花椒茎	2016-09-09	LS32	湖南长沙	两面针根	2016-05-01
S12	湖南吉首	蚬壳花椒茎	2016-10-19	LS33	广东佛山	两面针根	2016-11-01
S13	湖南吉首	蚬壳花椒茎	2016-12-21	LS34	广东汕头	两面针根	2016-11-01
S14	湖北襄阳	蚬壳花椒茎	2016-12-21	LS35	广东广州	两面针根	2016-11-01
S15	广东广州	蚬壳花椒茎	2016-12-21	LS36	广东清远	两面针根	2016-11-01
S16	湖南吉首	蚬壳花椒茎	2017-01-23	LS37	广东珠海	两面针根	2016-11-01
S17	湖南张家界	蚬壳花椒茎	2017-01-23	LS38	湖南长沙	两面针根	2016-05-01
S18	贵州铜仁	蚬壳花椒茎	2017-03-23	LS39	湖北武汉	两面针根	2016-07-01
S19	广东广州	蚬壳花椒茎	2017-03-23	LS40	安徽亳州	两面针根	2016-08-01
S20	广西来宾	蚬壳花椒茎	2017-03-23	W1	湖南吉首	飞龙掌血茎	2018-04-24
S21	湖北宜昌	蚬壳花椒茎	2017-04-03	W2	湖南吉首	野花椒茎	2018-04-24
S22	贵州三穗	蚬壳花椒茎	2017-04-03	W3	湖南张家界	野花椒茎	2018-04-26
S23	湖南吉首	蚬壳花椒茎	2017-04-03	C1	湖南吉首	刺壳花椒茎	2018-03-28
S24	湖南张家界	蚬壳花椒茎	2017-06-01	C2	湖南吉首	刺壳花椒茎	2018-03-30
S25	湖南怀化	蚬壳花椒茎	2017-06-01	C3	湖南恩施	刺壳花椒茎	2018-04-03
S26	湖北荆州	蚬壳花椒茎	2017-09-12				

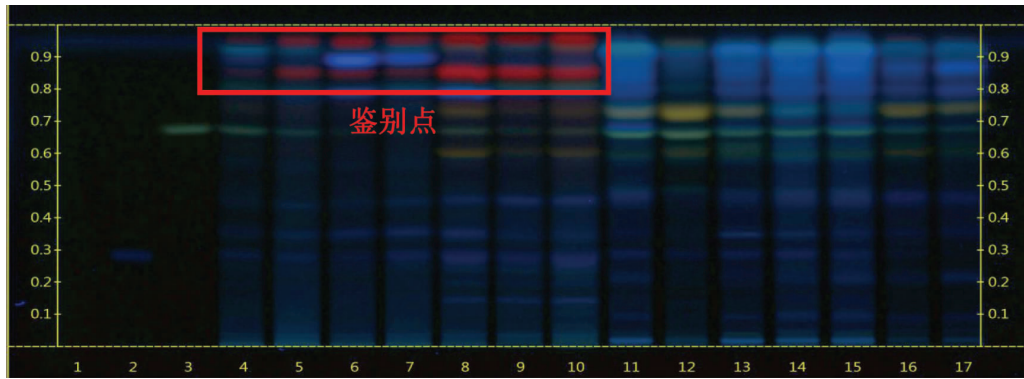


图1 薄层色谱样品检测

注:1.空白溶剂(乙醇);2.木兰花碱对照品溶液;3.氯化两面针碱对照品溶液;4~7.蝮壳花椒供试品(样品编号依次为S1、S2、S3、S4);8~10.刺壳花椒供试品(样品编号依次为C1、C2、C3);11~14.两面针供试品(样品编号依次为LS26、LS27、LS28、LS29);15.飞龙掌血供试品(样品编号为W1);16.野花椒供试品(样品编号为W2、W3)。

2.2 高效液相色谱法^[7]

2.2.1 色谱条件与系统适应性 色谱柱为 Waters SunFire C₁₈(柱长25 cm,内径为4.6 mm,粒径为5 μm),以甲醇为流动相A,以0.1%甲酸溶液为流动相B,梯度洗脱(表2);流速为1.0 mL/min;柱温为30 ℃;检测波长为268 nm。理论塔板数按木兰花碱计算应不低于5000。

表2 流动相梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	6	94
12	40	60
14	40	60
25	65	35

2.2.2 对照品溶液的制备 取木兰花碱对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含木兰花碱60 μg的溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 分别取30批单面针和15批两面针样品,粉碎,过3号筛,约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇10 mL,称定重量,超声处理(功率200 W,频率40 kHz)45 min,放冷,再称定重量,用70%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 样品测定 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各5 μL,注入液相色谱仪,测定,即得。

2.2.5 样品结果 单面针药材标志性成分主要为1号峰和2号峰(木兰花碱),通过单面针与两面针色谱图对比分析,1号峰可作为区分单面针和两面针的特征性成分。30批单面针图谱和15批两面针图谱见图2-4。

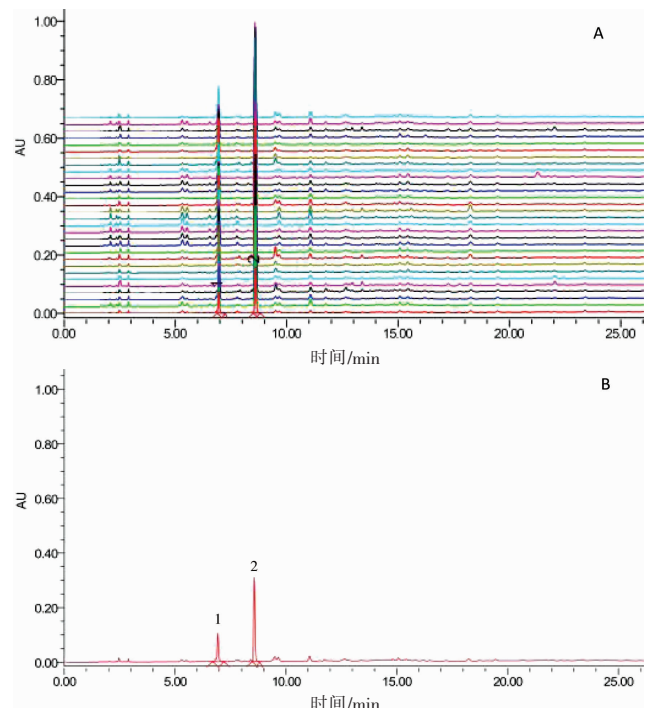


图2 单面针色谱图

注:A.30批单面针样品(S1~S30);B.1批单面针样品(S1)。

2.3 外观特征

2.3.1 性状 按照《湖南省中药材标准》(2009年版)^[8]规定对30批单面针药材进行测定。

本品为类圆形。茎表面灰褐色或暗灰色,有纵向突起的棱纹或皮孔,乳头状突起的皮刺或椭圆形的皮刺疤痕。质坚硬,难折断,切面皮部极窄,木部黄白色或淡棕红色,可见同心性环纹及密集的射线。髓部白色,迎光可见闪烁的小亮点。味稍苦而有刺喉感。

2.3.2 直径样品测定 取30批单面针药材,直径按照《中华人民共和国药典》(2020年版)四部^[16]规定进行测定,结果见表3。

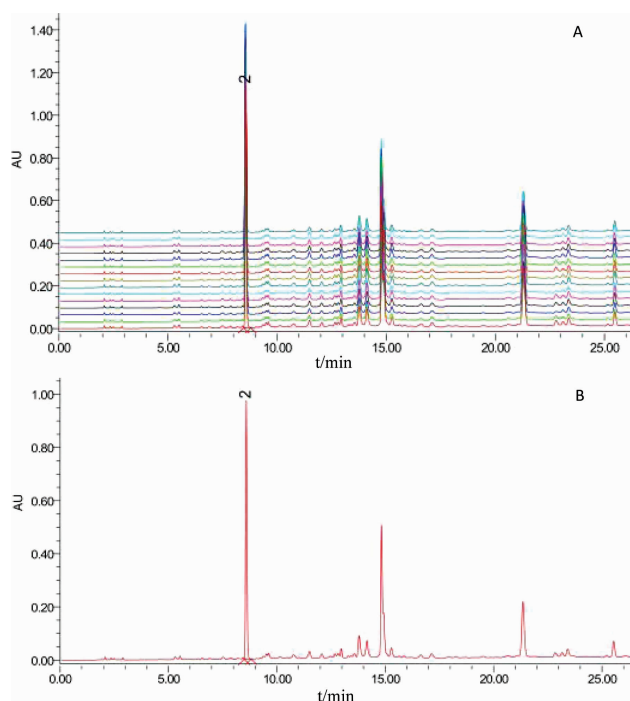


图3 两面针色谱图

注:A.15批两面针样品(LS26~LS40);B.1批两面针样品(LS26)。

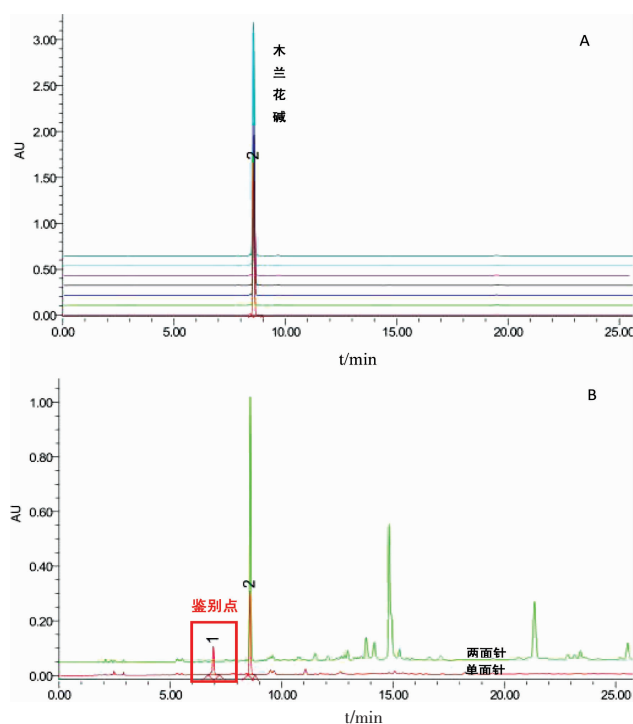


图4 单面针及两面针液相鉴别区分点

注:A.木兰花椒对照品;B.单面针(S1)及两面针(LS26)叠加图。

2.3.3 样品结果 30批单面针样品直径范围1.1~2.8 cm,变异幅度达到1.7 cm,说明不同产地单面针直径大小存在一定差异,通过感官可直接分辨大小。

2.4 内在质量

2.4.1 样品测定 取30批单面针药材,杂质、水分、总灰分、醇溶性浸出物、重金属及有害元素、有机氯

表3 30批单面针外观特征测定结果

批号	平均直径/cm	批号	平均直径/cm
S1	1.7	S16	2.0
S2	2.2	S17	1.8
S3	1.1	S18	1.9
S4	2.8	S19	1.4
S5	2.1	S20	1.5
S6	1.4	S21	2.1
S7	1.9	S22	1.4
S8	1.2	S23	2.2
S9	2.3	S24	1.9
S10	1.6	S25	1.3
S11	1.6	S26	2.0
S12	1.3	S27	1.6
S13	1.7	S28	2.0
S14	1.4	S29	2.1
S15	2.0	S30	1.9

农药残留、二氧化硫残留量按照《中华人民共和国药典》(2020年版)四部^[16]规定进行测定,木兰花碱含量按照“2.2”项进行测定,结果见表4~6。

2.4.2 样品结果 杂质的含量为1%~3%。水分的含量为7.2%~9.2%,均不超过《湖南省中药材标准》(2009年版)中单面针水分规定的限量14.0%。总灰分的含量为2.3%~3.9%,均不超过《湖南省中药材标准》(2009年版)中单面针总灰分规定的限量5.0%。醇溶性浸出物的含量为3.9%~7.0%,平均值5.4%,均符合《湖南省中药材标准》(2009年版)中单面针浸出物规定的限量3.0%。重金属及有害元素中铅的含量为0.5~3.2 mg/kg、镉的含量为0.1~0.6 mg/kg、砷的含量为0.04~0.2 mg/kg、汞的含量均未超过0.01 mg/kg、铜的含量为2.2~8.3 mg/kg。均在中国《药用植物及制剂进出口绿色行业标准》^[18]规定限度内,处于安全水平。总六六六、总滴滴涕、五氯硝基苯均未检出,故本品未规定有机氯农药残留量的限度。二氧化硫残留量均未超过150 mg/kg,均不超过《中华人民共和国药典》(2020年版)四部^[16]中二氧化硫残留量规定的限量150 mg/kg。

单面针中的木兰花碱具有明显的抗炎、抗菌等药理作用^[19],通过对不同产地单面针进行木兰花碱含量测定,结果表明单面针木兰花碱含量为0.05%~0.19%,说明不同产地的单面针样品中木兰花碱含量存在差异。

表4 30批单面针水分、总灰分、浸出物、含量测定结果

批号	杂质/%	水分/%	总灰/%	浸出物/%	含量/%	批号	杂质/%	水分/%	总灰/%	浸出物/%	含量/%
S1	2	8.2	2.8	5.2	0.15	S16	2	8.2	3.4	6.7	0.07
S2	2	7.6	2.4	4.8	0.14	S17	2	8.7	3.6	5.0	0.12
S3	1	7.6	2.4	4.5	0.09	S18	3	8.9	3.9	5.2	0.07
S4	1	7.7	2.3	6.8	0.19	S19	1	8.5	2.7	5.0	0.09
S5	1	8.0	2.4	5.2	0.14	S20	2	8.6	2.9	6.1	0.05
S6	1	7.9	2.5	5.3	0.11	S21	1	8.0	2.4	5.2	0.10
S7	3	7.6	2.3	3.9	0.07	S22	2	9.2	2.6	6.3	0.05
S8	2	7.7	2.3	4.0	0.08	S23	3	9.1	2.3	6.8	0.17
S9	3	7.2	2.5	5.8	0.16	S24	2	7.4	2.5	4.2	0.07
S10	2	7.7	3.2	5.0	0.06	S25	3	7.6	2.8	4.2	0.07
S11	2	8.5	2.6	6.8	0.08	S26	2	8.6	3.2	5.0	0.06
S12	1	8.6	3.0	5.8	0.08	S27	3	7.7	2.8	4.3	0.06
S13	2	8.6	2.5	6.4	0.10	S28	1	8.1	2.5	5.1	0.14
S14	1	8.7	3.5	6.8	0.05	S29	2	7.6	2.9	5.0	0.14
S15	1	8.3	3.7	7.0	0.05	S30	2	8.8	3.1	5.3	0.12

表5 30批单面针重金属及有害元素测定结果(mg/kg)

批号	铅	镉	砷	汞	铜	批号	铅	镉	砷	汞	铜
S1	0.5	0.2	0.10	0.005	6.6	S16	0.9	0.5	0.20	未检出	2.7
S2	0.9	0.4	0.10	0.070	6.2	S17	2.0	0.2	0.10	未检出	3.6
S3	1.1	0.4	0.10	0.008	7.3	S18	2.1	0.3	0.10	未检出	2.9
S4	1.3	0.2	0.10	0.007	6.8	S19	3.2	0.3	0.08	未检出	3.8
S5	1.4	0.3	0.10	0.007	7.0	S20	3.0	0.4	0.06	未检出	4.8
S6	1.5	0.3	0.10	0.010	7.1	S21	2.5	0.6	0.10	未检出	4.9
S7	0.6	0.1	0.09	0.060	5.7	S22	1.4	0.3	0.20	0.03	8.1
S8	1.2	0.2	0.08	0.005	6.6	S23	1.0	0.3	0.06	未检出	3.9
S9	2.1	0.4	0.10	未检出	4.7	S24	3.0	0.6	0.20	0.01	5.7
S10	0.6	0.3	0.08	0.008	8.3	S25	2.1	0.4	0.10	未检出	5.1
S11	1.9	0.2	0.10	0.008	3.0	S26	1.1	0.2	0.06	未检出	3.4
S12	1.4	0.2	0.09	未检出	2.6	S27	3.1	0.6	0.20	0.008	5.5
S13	1.1	0.2	0.10	未检出	2.2	S28	1.8	0.4	0.10	未检出	4.6
S14	0.6	0.4	0.10	未检出	5.6	S29	1.5	0.3	0.05	未检出	3.4
S15	1.1	0.2	0.08	未检出	3.2	S30	0.5	0.1	0.04	未检出	2.8

2.5 单面针药材等级评价体系的初步研究

2.5.1 实验材料 样品信息见表2,批号为S1~S30,共计30批。

2.5.2 等级划分指标的确定 采用软件SPSS 19.0对30批单面针样品外在特征和内在质量进行统计分析,见表7-9。

由表7各指标的描述统计可知,单面针外观特征指标杂质与直径的变异系数分别为44.4%、22.2%。单面针内在指标成分木兰花碱含量、总灰分、浸出物的变异系数分别为40.00%、17.9%、16.7%。由表8各指标的相关性分析可知,直径、木兰花碱含量、浸出物、总灰分在0.01水平上呈显著的正相关。由表

9对各指标的主成分分析可知,主成分一的特征值为2.019,贡献率为33.651%;主成分二的特征值为1.659,贡献率为27.642%;主成分三的特征值为1.090,贡献率为18.160%,累积贡献率为79.453%,特征向量的大小代表各性状指标对主成分贡献的大小,综合考虑特征值和贡献率的大小,结合实际情况和可操作性,故选用直径、浸出物、木兰花碱含量作为药材等级划分指标。

2.5.3 分级 将每批单面针样品的直径、浸出物、含量作为聚类指标,运用SPSS 19.0统计分析软件对30批单面针样品进行分析,结果见图5。

表 6 30 批单面针有机氯农药残留量、二氧化硫残留量测定结果(mg/kg)

批号	有机氯农药			二氧化硫	批号	有机氯农药			二氧化硫
	总六六六	总滴滴涕	五氯硝基苯			总六六六	总滴滴涕	五氯硝基苯	
S1	未检出	未检出	未检出	46	S16	未检出	未检出	未检出	未检出
S2	未检出	未检出	未检出	13	S17	未检出	未检出	未检出	55
S3	未检出	未检出	未检出	10	S18	未检出	未检出	未检出	85
S4	未检出	未检出	未检出	23	S19	未检出	未检出	未检出	16
S5	未检出	未检出	未检出	23	S20	未检出	未检出	未检出	59
S6	未检出	未检出	未检出	81	S21	未检出	未检出	未检出	27
S7	未检出	未检出	未检出	18	S22	未检出	未检出	未检出	58
S8	未检出	未检出	未检出	20	S23	未检出	未检出	未检出	未检出
S9	未检出	未检出	未检出	148	S24	未检出	未检出	未检出	100
S10	未检出	未检出	未检出	31	S25	未检出	未检出	未检出	110
S11	未检出	未检出	未检出	未检出	S26	未检出	未检出	未检出	58
S12	未检出	未检出	未检出	未检出	S27	未检出	未检出	未检出	109
S13	未检出	未检出	未检出	未检出	S28	未检出	未检出	未检出	62
S14	未检出	未检出	未检出	80	S29	未检出	未检出	未检出	未检出
S15	未检出	未检出	未检出	61	S30	未检出	未检出	未检出	12

表 7 单面针各测定指标的描述统计

指标	木兰花碱含量/%	浸出物/%	杂质/%	水分/%	总灰分/%	直径/cm
极大值	0.19	7.0	3.0	9.2	3.9	2.8
极小值	0.05	3.9	0.5	7.2	2.3	1.1
均值	0.10	5.4	1.8	8.2	2.8	1.8
标准差	0.04	0.9	0.8	0.5	0.5	0.4
变异幅度	0.14	3.1	2.5	2.0	1.6	1.7
变异系数%	40.00	16.7	44.4	6.1	17.9	22.2

表 8 单面针各指标间相关性分析

指标	木兰花碱含量/%	浸出物/%	杂质/%	水分/%	总灰分/%	直径/cm
木兰花碱含量/%	1					
浸出物/%	0.093	1				
杂质/%	-0.087	-0.201	1			
水分/%	-0.182	-0.533**	-0.023	1		
总灰分/%	-0.442*	0.230	0.077	0.420*	1	
直径/cm	0.618**	0.262	0.104	-0.154	-0.086	1

注:**在 0.01 水平(双侧)上显著相关;*在 0.05 水平(双侧)上显著相关。

表 9 主成分分析

指标	木兰花碱含量/%	浸出物/%	杂质/%	水分/%	总灰分/%	直径/cm	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%
主成分一	-0.757	0.327	-0.026	0.703	0.737	-0.549	2.019	33.651	33.651
主成分二	0.502	0.835	-0.208	0.482	0.154	0.640	1.659	27.642	61.293
主成分三	-0.010	-0.106	0.923	0.020	0.316	0.355	1.090	18.160	79.453

由图 5 可以看出,将 30 批单面针样品分为 3 类:样品 S4 聚为一类,为一等品;样品 S11、S12、S13、S14、S15、S16、S20、S22、S23 聚为一类,为二等品;其他 20 批样品聚为一类,为统货样品,详见表 10。初步建立了单面针药材质量等级评价体系:1 批一等;

醇溶性浸出物不少于 6.8%,直径不小于 2.8 cm,木兰花碱含量不少于 0.19%;9 批二等:醇溶性浸出物 5.8%~7.0%,直径 1.3~2.2 cm,木兰花碱含量 0.05%~0.17%;20 批三等:醇溶性浸出物 3.9%~5.8%,直径大小不等,木兰花碱含量 0.06%~0.16%。

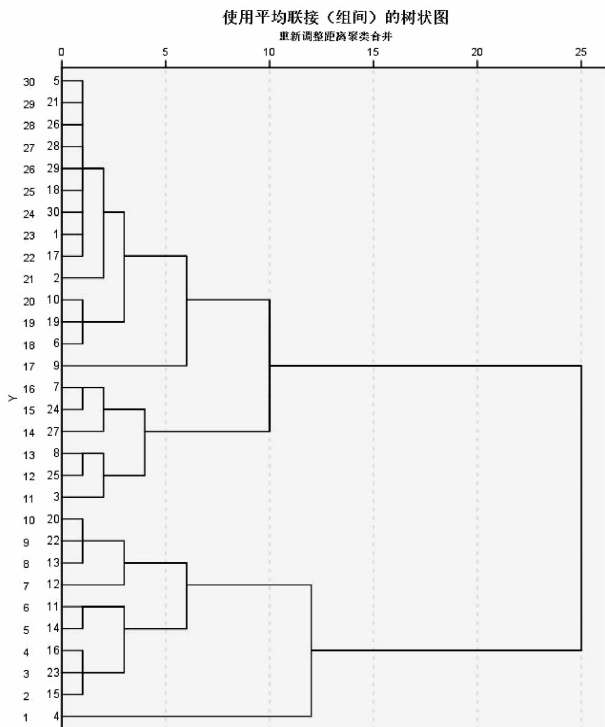


图5 30批单面针样品各指标聚类分析树状图

3 讨论

3.1 薄层色谱法

生物碱类化合物是单面针的主要活性成分之一,主要包含木兰花碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱等,通常是评价该药材质量的重要指标^[20-21]。以白屈菜红碱^[22]为对照进行薄层鉴别时,单面针特征斑点不明显,而两面针和伪品斑点特别明显^[9],故未选择白屈菜红碱作为定性指标。选择了木兰花碱和氯化两面针碱为对照,进行了供试品溶液的制备方法、薄层色谱鉴别展开条件的考察及方法学验证,薄层色谱鉴别可以很好分离和区分单面针、两面针及伪品,提取方法简单、快捷,斑点清晰,所用试剂易获取,便于操作。

3.2 高效液相色谱法

单面针与两面针均来源于芸香科,化学成分比较相似,采用高效液相色谱法对不同产地单面针和两面针进行对比分析,筛选出主要的差异成分为1号

峰,后续需对1号峰进行提取分离、结构确证、药理药效研究,以确证1号峰作为单面针特征性成分加以控制,以保障单面针基原准确,区分真伪品。

3.3 其他检测项

按照《湖南省中药材标准》(2009年版)、《中华人民共和国药典》(2020年版)等方法对不同产地单面针药材杂质、直径、水分、总灰分、醇溶性浸出物、重金属及有害元素、有机氯农药残留量、二氧化硫残留量、木兰花碱的含量等进行了全面的质量检测,均符合现行质量标准及药典要求,可为单面针质量标准完善提供数据支撑。

3.4 等级评价

通过对单面针药材外观特征和内在质量的全面分析,从描述性统计、相关性分析、主成分分析等确定了等级划分指标。采用聚类分析对30批单面针药材建立了初步的三级等级评价体系,结果显示,直径越大,内在质量越优。一等品1批,产地为湖南怀化;二等品共9批,产地分别为湖南吉首5批以及湖北、广西、广东、贵州各1批;三等品共20批,各个产地均有分布。不同省份不同批样品质量波动较大,同一省份不同批药材也有一定的差异,但相对来讲,湖南省样品相对优质且批间稳定。由于收集到的30批单面针药材生长年份不明确,故后续需对不同生长年份单面针质量进行更多的相关性和影响趋势研究。

4 结论

本研究确证了薄层色谱法和高效液相色谱法能够有效地鉴别和区分单面针药材与两面针药材及常见混伪品,方法专属性强、灵敏度高、简便实用,薄层色谱法与高效液相色谱法能够相互验证、互为补充,提供了有效的质控手段,为规范中药材市场奠定了基础。将传统的外观特征结合内在有效成分含量,初步建立了单面针3个规格药材的评价体系,实

表10 单面针药材等级评价指标

类别	等级	性状	直径/cm	浸出物/%	木兰花碱含量/%
一类	一等	类圆形。表面灰褐色或暗灰色,有纵向突起的棱纹或皮孔,乳头状突起的皮刺或椭圆	2.8	6.8	0.19
二类	二等	圆形的皮刺疤痕。质坚硬,难折断,切面皮部极窄,木部黄白色或淡棕红色,可见同	1.3~2.2	5.8~7.0	0.05~0.17
三类	三等	心性环纹及密集的射线。髓部白色,迎光可见闪烁的小亮点。味稍苦而有刺喉感。	大小不等	3.9~5.8	0.06~0.16

践中容易掌握,为评价单面针药材质量提供了数据支持,对药材的采收与产地加工具有一定的指导和实践意义,可以促进单面针商品药材的市场价格秩序化、合理化,以满足不同的临床应用需求。

参考文献

- [1] 曾建飞,霍春雁.中国植物志[M].2卷,北京:科学出版社.1977,26:332.
- [2] 王平,王海霞,马英姿,等.蚬壳花椒叶片不定芽诱导与内源激素的变化规律[J].中草药,2008,39(9):1400-1403.
- [3] 《全国中草药汇编》编写组.全国中草药汇编彩色图谱[M].北京:人民卫生出版社,1996:336.
- [4] 汤俊,朱卫,屠治本.蚬壳花椒化学成分的研究[J].中草药,1995,26(11):563-565.
- [5] TANG J, SUPINYA T, WANG Z T, et al. Aurantiamide A cetate from stems of *Zanthoxylum dissitum hemsley*[J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2003, 12(4):231-233.
- [6] 马英姿,王平,袁园,等.蚬壳花椒中性亲脂性成分的抑菌活性及其化学成分[J].林业科学,2010,46(2):162-165.
- [7] 刘韶,章伟,何桂霞,等.单面针茎化学成分的研究[J].中国中药杂志,2009,34(5):571-573.
- [8] 湖南省食品药品监督管理局.湖南省中药材标准[S].长沙:湖南科学技术出版社,2010.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [10] 谢宗万.中药品种传统经验鉴别“辨状论质”[J].时珍国药研究,1994,5(3):19-21.
- [11] 刘清凯.若干中草药混淆品种的鉴别(续)[J].亚热带植物科学,2004,33(1):57-59,63.
- [12] 陈铁寓,彭兴,龙盛京,等.二维红外相关光谱在两面针与单面针鉴别中的应用[J].现代仪器,2011,17(4):36-38.
- [13] 陈贝贝,宋经元,姚辉,等.基于ITS2条形码的两面针药材及其混伪品的鉴别[J].中草药,2013,44(15):2150-2154.
- [14] 杨鹏,卿志星,向锋,等.HPLC-Q-TOF/MS法鉴定两面针和单面针中的生物碱[J].中成药,2017,39(8):1646-1650.
- [15] 国家医药管理局,中华人民共和国卫生部.七十六种药材商品规格标准[S].1984:1-152.
- [16] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [17] 刘倩倩,雷思敏,胡玉珍,等.单面针 HPLC 指纹图谱及质量标准研究[J].中国中医药信息杂志,2020,27(10):73-79.
- [18] 中华人民共和国对外贸易经济合作部.药用植物及制剂进出口绿色行业标准[S].北京:中国标准出版社,2001:121.
- [19] 吴润菁,王欢,祝晨蓁,等.高效液相色谱法测定单面针中木兰花碱的含量[J].广州中医药大学学报,2014,31(3):443-447.
- [20] 李京生,武博,曹正青,等.中药材商品规格的变迁[J].首都医药,2012,19(3):41-42.
- [21] 刘媛媛,曹蔚,张雅,等.花椒属植物化学成分及其活性研究进展[J].中国民族民间医药,2012,21(3):28-30.
- [22] 肖灿,袁园,丁扬洲,等.单面针茎中生物碱类成分研究[J].中药材,2011,34(4):551-553.

(本文编辑 苏维)