

# 双波长HPLC法同时测定两面针药材中5种成分的含量<sup>Δ</sup>

孙科<sup>1\*</sup>, 陈冉<sup>2</sup>, 陆世惠<sup>3#</sup>(1.右江民族医学院生化教研室, 广西百色 533000; 2.右江民族医学院科学实验中心, 广西百色 533000; 3.右江民族医学院药学院, 广西百色 533000)

中图分类号 R284.1; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)03-0393-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.03.30

**摘要** 目的: 建立同时测定两面针药材中5种成分含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为Luna C<sub>18</sub>, 流动相为乙腈-水(含0.2%磷酸、0.25%三乙胺)(梯度洗脱), 流速为1.0 mL/min, 检测波长为273、284 nm, 柱温为30 ℃, 进样量为20 μL。结果: 别隐品碱、盐酸血根碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱、芝麻素检测质量浓度线性范围分别为0.8~200、0.2~50、0.44~110、0.208~52、0.944~236 μg/mL(*r*均为0.999 9); 精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%; 加样回收率分别为101.47%~103.92%(RSD=0.92%, *n*=9)、102.52%~104.68%(RSD=0.63%, *n*=9)、97.55%~101.22%(RSD=1.09%, *n*=9)、103.35%~104.93%(RSD=0.71%, *n*=9)、99.31%~103.86%(RSD=1.34%, *n*=9)。结论: 该方法操作简便, 精密度、稳定性、重复性好, 可用于两面针药材中5种成分含量的同时测定。

**关键词** 高效液相色谱法; 两面针; 别隐品碱; 盐酸血根碱; 氯化两面针碱; 白屈菜红碱; 芝麻素; 含量

## Simultaneous Determination of 5 Components in *Zanthoxylum nitidum* by Dual-wavelength HPLC

SUN Ke<sup>1</sup>, CHEN Ran<sup>2</sup>, LU Shihui<sup>3</sup> (1. Dept. of Biochemistry, Youjiang Medical University for Nationalities, Guangxi Baise 533000, China; 2. Science Experiment Center, Youjiang Medical University for Nationalities, Guangxi Baise 533000, China; 3. School of Pharmacy, Youjiang Medical University for Nationalities, Guangxi Baise 533000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of 5 components in *Zanthoxylum nitidum*. METHODS: HPLC was performed on the column of Luna C<sub>18</sub> with mobile phase of acetonitrile-water (containing 0.2% phosphoric acid, 0.25% triethylamine) (gradient elution) at a flow rate of 1.0 mL/min, detection wavelength was 273, 284 nm, column tem-

4、7、10、11为首次从白花蛇舌草植物中分离得到。本研究结果对白花蛇舌草植物的质量标准及开发具有一定参考价值。

### 参考文献

- [1] 黄建荣, 刘咏海, 喻志标, 等. 白花蛇舌草化学成分和药理活性研究进展[J]. 中成药, 2005, 27(11): 1329-1331.
- [2] 王顺启, 陈力, 倪虹, 等. 白花蛇舌草对肝癌细胞SMMC-7721基因表达的影响[J]. 中药材, 2007, 30(10): 1285-1287.
- [3] 于亮, 吕青涛, 黄祝刚, 等. HPLC法比较不同产地白花蛇舌草中两种香豆素类成分的含量[J]. 现代仪器与医疗, 2015, 21(3): 85-87.
- [4] 周应军, 吴孔松, 曾光尧, 等. 白花蛇舌草化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(7): 590-592.
- [5] 吴孔松, 张坤, 谭桂山, 等. 白花蛇舌草化学成分的研究[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(11): 817-819.
- [6] 罗扬婧, 左月明, 张忠立, 等. 梔子化学成分研究: III[J]. 中药材, 2014, 37(7): 1196-1198.

<sup>Δ</sup> 基金项目: 广西自然科学基金资助项目(No.2014GXNSF-BA118185)

\* 助理实验师, 硕士研究生。研究方向: 药物分析。E-mail: 1571474488@qq.com

# 通信作者: 高级实验师, 博士研究生。研究方向: 天然产物的提取分离鉴定及其生物活性。E-mail: lushihui0818@126.com

- [7] 陈红, 陈敏, 黄泽豪, 等. 巴戟天的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21): 69-71.
- [8] 王宁辉, 马养民, 康永祥, 等. 白檀化学成分的研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(11): 2624-2626.
- [9] Chen YH, Chang FR. New cytotoxic 6-oxygenated 8, 9-dihydrofurocoumarins, hedyotiscone A-C, from *Hedyotis biflora*[J]. *Planta Med*, 2006, 72(1): 75-78.
- [10] 谢韬, 梁敬钰, 刘净, 等. 滨蒿化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(5): 15-17.
- [11] Wu YB, Zheng CJ, Qin LP, et al. Antiosteoporotic activity of anthraquinones from *Morinda officinalis* on osteoblasts and osteoclasts[J]. *Molecules*, 2009, 14(1): 573-576.
- [12] Kang XD, Li X, Zhao CC, et al. Two new anthraquinones from *Hedyotis diffusa* W[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2008, 10(2): 193-195.
- [13] 黄艳丽, 项伟, 宋启示. 美丽蛇根草的化学成分研究[J]. 中草药, 2009, 40(4): 519-521.
- [14] Lawrence B Alemany. Exceptional resolution and new signals detected in the <sup>13</sup>C-NMR spectra of alkanes[J]. *Magn Reson Chem*, 1989, 27(11): 1065-1068.

(收稿日期: 2016-02-07 修回日期: 2016-09-27)

(编辑: 张 静)

perature was 30 °C, and the injection volume was 20 μL. RESULTS: The linear range was 0.8-200 μg/mL for allocryptopine ( $r=0.9999$ ), 0.2-50 μg/mL for sargentine hydrochloride ( $r=0.9999$ ), 0.44-110 μg/mL for nitidine chloride ( $r=0.9999$ ), 0.208-52 μg/mL for toddaline ( $r=0.9999$ ) and 0.944-236 μg/mL for sesamin ( $r=0.9999$ ); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recoveries were 101.47%-103.92% (RSD=0.92%,  $n=9$ ), 102.52%-104.68% (RSD=0.63%,  $n=9$ ), 97.55%-101.22% (RSD=1.09%,  $n=9$ ), 103.35%-104.93% (RSD=0.71%,  $n=9$ ), 99.31%-103.86% (RSD=1.34%,  $n=9$ ). CONCLUSIONS: The method is simple with good precision, stability and reproducibility, and can be used for the simultaneous determination of 5 components in *Z. nitidum*.

**KEYWORDS** HPLC; *Zanthoxylum nitidum*; Allocryptopine; Sargentine hydrochloride; Nitidine chloride; Toddaline; Sesamin; Content

两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC., 为芸香科花椒属植物, 根部入药, 主要分布在我国南方等地<sup>[1]</sup>, 主治风湿骨痛、跌打损伤、牙痛、毒蛇咬伤等症。两面针中富含多种抗肿瘤的活性成分, 如别隐品碱、盐酸血根碱<sup>[2]</sup>、氯化两面针碱、白屈菜红碱<sup>[3]</sup>、芝麻素<sup>[4]</sup>等, 上述成分还具有良好的抗菌、抗炎、抗氧化、镇痛活性<sup>[5-9]</sup>。目前关于两面针中活性成分的测定局限于主要成分, 如氯化两面针碱、白屈菜红碱<sup>[10-11]</sup>, 目标组分单一, 不能全面反映两面针药材的质量。本试验旨在建立一种高效、快速的高效液相色谱法(HPLC)同时测定两面针中别隐品碱、盐酸血根碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱、芝麻素多种组分的含量, 为完善该药材的质量控制提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

U3000型HPLC仪, 包括PDA二极管阵列检测器(美国Dionex公司); KQ-250DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 功率: 250 W, 频率: 40 kHz); FA2004N型电子分析天平(上海民析精密科学仪器公司); 101-3型电热鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器公司)。

### 1.2 试剂

别隐品碱对照品(北京盛世康谱化工技术研究院, 批号: B-059-140727)、盐酸血根碱对照品(批号: 510001-201101)、氯化两面针碱对照品(批号: 110848-200603)、白屈菜红碱对照品(批号: 111718-201402)、芝麻素对照品(批号: 110386-201005)均购自中国食品药品检定研究院, 纯度均>98%; 乙腈为色谱纯, 乙醇、甲醇、磷酸、三乙胺为分析纯, 水为超纯水。

### 1.3 药材

两面针药材(产地: 广西)经广西中医药研究院赖茂祥研究员鉴定为真品。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Luna C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-水(含0.2%磷酸和0.25%三乙胺, B), 梯度洗脱(0~6 min, 25% A; 6~25 min, 25%→32% A; 25~29 min, 32%→60% A; 29~42 min, 60% A); 流速: 1.0 mL/min;

检测波长: 273, 284 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取待测成分对照品适量, 分别置于10 mL量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 制成别隐品碱、盐酸血根碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱、芝麻素质量浓度分别为1.00、0.25、1.10、0.52、1.18 mg/mL的单一对照品贮备液。分别量取上述单一对照品贮备液各适量, 置于同一10 mL量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 制成别隐品碱、盐酸血根碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱、芝麻素质量浓度分别为200、50、110、52、236 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品粉末(粒径≤0.5 mm)适量, 精密称定20.0 g, 加60%乙醇超声提取20 min, 重复提取3次(料液比均为1:6), 合并提取液, 加乙醇定容至360 mL, 微孔滤膜(0.22 μm)滤过, 取续滤液, 即得。

### 2.3 系统适用性试验

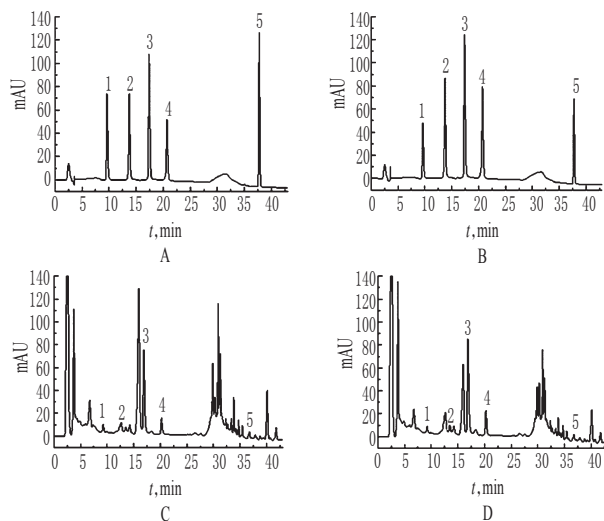
取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液各适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图1。结果表明, 理论板数以别隐品碱、盐酸血根碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱、芝麻素峰计分别为9 824、16 113、30 250、37 974、188 114; 分离度均>1.5, 各成分基线分离良好。

### 2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.02、0.25、1.0、2.0、4.0 mL, 分别置于10 mL量瓶中, 加甲醇定容, 制成系列混合对照品溶液。精密量取上述系列混合对照品溶液各20 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以待测成分质量浓度( $x$ , μg/mL)为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归, 得别隐品碱、盐酸血根碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱、芝麻素回归方程分别为 $y=0.191x-0.412$  ( $r=0.9999$ )、 $y=1.697x-0.704$  ( $r=0.9999$ )、 $y=1.860x-0.947$  ( $r=0.9999$ )、 $y=1.629x+0.751$  ( $r=0.9999$ )、 $y=0.498x-0.644$  ( $r=0.9999$ )。结果表明, 别隐品碱、盐酸血根碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱、芝麻素检测质量浓度线性范围分别为0.8~200、0.2~50、0.44~110、0.208~52、0.944~236 μg/mL。

### 2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次, 记录峰面积。结果, 别隐品



A.混合对照品(284 nm);B.混合对照品(273 nm);C.供试品(284 nm);D.供试品(273 nm);1.别隐品碱;2.盐酸血根碱;3.氯化两面针碱;4.白屈菜红碱;5.芝麻素

A.mixed reference substance (284 nm) ; B.mixed reference substance (273 nm) ; C.test sample (284 nm) ; D.test sample (273 nm) ; 1.alloctyptopine; 2.sanguinarine hydrochloride; 3.nitidine chloride; 4.toddaline; 5.sesamin

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

碱、盐酸血根碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱、芝麻素峰面积的RSD分别为0.45%、0.37%、0.25%、0.64%、0.58% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0、4、8、10、12、24、48、96 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,别隐品碱、盐酸血根碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱、芝麻素峰面积的RSD分别为0.41%、0.39%、0.28%、0.59%、0.67% ( $n=8$ ),表明供试品溶液在室温放置96 h内基本稳定。

### 2.7 重复性试验

精密称取同一批样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,别隐品碱、盐酸血根碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱、芝麻素平均含量分别为0.544、0.078、0.982、0.234、0.055 mg/g, RSD 分别为0.91%、0.78%、0.90%、0.37%、1.06% ( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

### 2.8 加样回收率试验

取已知含量的样品适量,共6份,分别加入低、中、高质量的待测成分对照品,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,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

### 2.9 样品含量测定

取样品适量,分别按“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,记录峰面积并计算样品含量,结果见表2。

表1 加样回收率试验结果( $n=9$ )

Tab 1 Results of recovery test ( $n=9$ )

待测成分	取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
别隐品碱	1.005	0.546 4	0.435 2	1.020 1	103.92	102.83	0.92
	1.007	0.547 5	0.435 2	1.011 2	102.90		
	0.998	0.543 2	0.435 2	1.015 2	103.76		
	0.996	0.541 6	0.544 0	1.105 1	101.79		
	0.995	0.541 3	0.544 0	1.118 6	103.07		
	1.003	0.545 7	0.544 0	1.105 7	101.47		
	1.004	0.545 3	0.652 8	1.239 4	103.45		
	1.001	0.544 1	0.652 8	1.224 3	102.29		
	0.997	0.540 5	0.652 8	1.226 7	102.8		
	盐酸血根碱	1.005	0.080 1	0.062 4	0.148 1		
1.007		0.080 3	0.062 4	0.148 9	104.34		
0.998		0.078 4	0.062 4	0.147 1	104.47		
0.996		0.077 2	0.078 0	0.160 4	103.35		
0.995		0.076 4	0.078 0	0.158 3	102.52		
1.003		0.078 8	0.078 0	0.162 8	103.82		
1.004		0.029 2	0.093 6	0.180 9	104.68		
1.001		0.078 1	0.093 6	0.178 9	104.19		
0.997		0.077 3	0.093 6	0.177 2	103.68		
氯化两面针碱		1.005	0.985 2	0.785 6	1.725 6	97.55	98.61
	1.007	0.987 6	0.785 6	1.736 4	97.92		
	0.998	0.981 1	0.785 6	1.749 8	98.04		
	0.996	0.980 5	0.982 0	1.943 9	99.05		
	0.995	0.979 7	0.982 0	1.937 1	98.75		
	1.003	0.983 8	0.982 0	1.931 6	98.26		
	1.004	0.984 3	1.178 4	2.189 0	101.22		
	1.001	0.982 6	1.178 4	2.120 5	98.13		
	0.997	0.979 4	1.178 4	2.127 8	98.61		
	白屈菜红碱	1.005	0.237 5	0.187 2	0.440 2	103.65	
1.007		0.238 1	0.187 2	0.445 8	104.82		
0.998		0.232 3	0.187 2	0.440 2	104.93		
0.996		0.231 6	0.234 0	0.481 2	103.35		
0.995		0.231 3	0.234 0	0.484 5	104.12		
1.003		0.235 1	0.234 0	0.482 9	103.94		
1.004		0.235 3	0.280 8	0.540 7	104.77		
1.001		0.234 2	0.280 8	0.535 7	104.01		
0.997		0.231 6	0.280 8	0.537 6	104.92		
芝麻素		1.005	0.057 4	0.044 0	0.100 7	99.31	102.6
	1.007	0.058 6	0.044 0	0.105 8	103.12		
	0.998	0.054 9	0.044 0	0.101 7	102.83		
	0.996	0.053 1	0.055 0	0.110 9	102.59		
	0.995	0.053 5	0.055 0	0.111 2	102.49		
	1.003	0.056 6	0.055 0	0.115 8	103.76		
	1.004	0.056 2	0.066 0	0.124 7	102.05		
	1.001	0.055 7	0.066 0	0.126 4	103.86		
	0.997	0.053 4	0.066 0	0.123 5	103.43		

## 3 讨论

### 3.1 检测波长的选择

利用PAD二极管阵列检测器对5种待测成分对照品进行三维图谱分析,结果显示别隐品碱、盐酸血根碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱、芝麻素的吸收波长分别在284、273、273、268、284 nm处,其中,白屈菜红碱在268和273 nm波长处的吸收值相近、其余4种组分在284和273 nm波长处的吸收值相差较大,为提高检测灵敏度,采用双波长同时测定的模式进行测定。选择在284

nm 波长处检测别隐品碱、芝麻素, 273 nm 波长处检测盐酸血根碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱。

表2 样品含量测定结果( $n=3$ , mg/g)

Tab 2 Results of contents determination of samples ( $n=3$ , mg/g)

待测成分	含量	平均含量
别隐品碱	0.545	0.544
	0.549	
	0.539	
盐酸血根碱	0.077	0.078
	0.078	
	0.079	
氯化两面针碱	0.972	0.982
	0.983	
	0.991	
白屈菜红碱	0.235	0.234
	0.232	
	0.236	
芝麻素	0.055	0.055
	0.054	
	0.056	

### 3.2 流动相的选择

色谱柱固定相硅胶表面的硅羟基(SiOH) pKa 值为 2~3, 当流动相的 pH > 3 时, 部分 SiOH 电离以 SiO<sup>-</sup> 形式存在, 会与待分析的碱性生物碱发生很强的吸附作用, 造成生物碱的色谱峰展宽、拖尾、保留时间漂移、分离效果不佳。改性剂三乙胺因与 SiO<sup>-</sup> 具有更强作用力, 可以显著降低待分析生物碱的吸附作用, 且对色谱柱损伤小, 因此是作为色谱峰拖尾抑制剂的较佳选择<sup>[2]</sup>。本试验选择在流动相中加入一定量的三乙胺, 通过加磷酸调节 pH, 结果各组分的保留时间随 pH 的升高而增加, 且峰展宽, 峰型变差, 因此选择低 pH 的缓冲液, 但 C<sub>18</sub> 难以承受 pH < 2 的酸度。综合考虑, 最终选择以乙腈-0.2% 磷酸-0.25% 三乙胺(pH 2.5) 为流动相进行分析测定, 样品中待测组分峰形好, 且总体保留时间适中。

### 3.3 样品处理方法的优化

笔者考察了不同溶剂(40% 乙醇、60% 乙醇、80% 乙醇、无水乙醇、乙醇-丙酮、丙酮、乙酸乙酯、乙酸乙酯-正丁醇、正丁醇) 对提取效率的影响。结果显示, 别隐品碱、盐酸血根碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱在 60% 和 80% 甲醇中提取率较高, 这是由于这 4 种生物碱的极性较强, 用强极性溶剂更易于提取, 但有机溶剂含量太低, 又不利于其溶解, 因此用 40% 乙醇提取效果较差。最终采用 60% 乙醇作为提取溶剂。

本试验通过 HPLC-PAD 方法, 首次完成两面针药材

中别隐品碱、盐酸血根碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱、芝麻素 5 种成分含量的同时测定, 该方法操作简便, 精密度、稳定性、重复性好, 可为两面针药材的开发利用提供一定参考。

### 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: 第四十三卷: 第二分册[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 13-15.
- [2] 姚雯, 杨天衡, 刘学波. 血根碱清除自由基及抑制生物大分子氧化的作用[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 137-139.
- [3] 王培卿, 尹震花, 康文艺. 白屈菜红碱药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(17): 2745-2748.
- [4] 李先伟, 高云星, 李曙, 等. 芝麻素对野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠肺血管重构的影响[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(7): 1355-1357.
- [5] Bai LP, Zhao ZZ, Cai ZW, et al. DNA binding affinities and sequence selectivity of quaternary benzophenanthridine alkaloids sanguinarine, chelerythrine, and nitidine [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2006, 14(16): 5439-5441.
- [6] Pan X, Han H, Wang L. Nitidine chloride inhibits breast cancer cells migration and invasion by suppressing c-Src / FAK associated signaling pathway[J]. *Cancer Lett*, 2011, 313(2): 181-185.
- [7] 白金权, 车成日, 金虎日, 等. 芝麻素协同吉西他滨对人肺腺癌 A-549 细胞株的作用[J]. 中国新药与临床杂志, 2014, 33(7): 529-533.
- [8] 肖俐, 曾建国, 刘林, 等. 别隐品碱抗肝纤维化作用[J]. 中草药, 2011, 42(6): 1158-1161.
- [9] 黄琪, 雷鹏, 刘海涛, 等. 两面针与毛两面针的 HPLC 指纹图谱对比研究[J]. 中国药房, 2015, 26(3): 377-380.
- [10] Liang MJ, Zhang WD, Hu J, et al. Simultaneous analysis of alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* by high performance liquid chromatography-diode array detector-electrospray tandem mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 42(2): 178-181.
- [11] 方琳乔, 卢凌春, 龙盛京. HPLC 法同时测定两面针中氯化两面针碱与乙氧基白屈菜红碱的含量[J]. 西北药学杂志, 2011, 26(1): 19-21.
- [12] 罗忠勇, 曾建国, 黄敬. RP-HPLC 法测定小果博落回中 7 种异喹啉类生物碱[J]. 中草药, 2010, 41(7): 1188-1191.

(收稿日期: 2016-02-21 修回日期: 2016-05-09)

(编辑: 张 静)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA) 收录期刊, 欢迎投稿、订阅