

广西十个不同产地的两面针中 活性成分的分析

刘绍华¹, 覃青云¹, 方 堃¹, 唐献兰¹, 杨卫豪¹, 张祥民²

(1. 柳州两面针股份有限公司博士后工作站, 广西柳州 545001; 2 复旦大学化学系, 上海 200433)

摘要: 采用 HPLC 法对广西十个不同产地的两面针中具有抗肿瘤活性的氯化两面针碱和具有镇痛活性的 L-芝麻脂素的含量进行了分析和比较。发现在不同产地的两面针中氯化两面针碱和 L-芝麻脂素的含量差别都较大, 广西百色的两面针中氯化两面针碱含量和 L-芝麻脂素的含量均最高, 氯化两面针碱 0.467%, L-芝麻脂素 0.160%; 广西金秀的两面针中氯化两面针碱含量和 L-芝麻脂素的含量均最低, 氯化两面针碱 0.0490%, L-芝麻脂素 0.0370%。分析的色谱柱为 HYPERSIL BDS C₁₈, 测定氯化两面针碱的条件为, 流动相乙腈: 0.02 mol/L KH₂PO₄ 溶液 (34:66), 流速为 1.0 mL/min, 柱温 40 °C, 检测波长 329 nm, 进样量为 20 μL; 测定 L-芝麻脂素的条件为, 流动相乙腈: 水 (50:50), 流速为 1.0 mL/min, 柱温 40 °C, 检测波长 287 nm, 进样量为 20 μL。该研究为两面针在抗肿瘤药物和镇痛等方面的开发利用提供了可靠的理论依据, 具有重要应用价值。

关键词: 高压液相色谱; 两面针; 氯化两面针碱; 芝麻脂素; 抗肿瘤; 镇痛

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2005)06-0591-05

The determination of nitidine chloride and L-sesamin of *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC growing in ten areas of Guangxi

LIU Shao-hua¹, QIN Qing-yun¹, FANG Kun¹, TANG Xian-lan¹,
YANG Wei-hao¹, ZHANG Xiang-min²

(1. Workstation of Postdoctor of Liuzhou Liangmianzhen Co. LTD., Liuzhou 545001, China;

2. Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Active compounds of *Zanthoxylum nitidum* growing in ten different areas of Guangxi were analysed in this study. The results were as follows: The content of nitidine chloride and L-sesamin had great difference in the ten growing areas of Guangxi. The highest content of the nitidine chloride 0.467% and L-sesamin 0.160% of *Zanthoxylum nitidum* was growing at Baise of Guangxi; the lowest content of the nitidine chloride 0.0490% and L-sesamin 0.0370% of *Zanthoxylum nitidum* was growing at Jinxiu of Guangxi. The high performance liquid chromatography (HPLC) was utilized for this purpose with the column of HYPERSIL BDS C₁₈. For nitidine chloride, the mobile phase containing acetonitrile and 0.02 mol/L monobasic potassium phosphate (34:66), the detection wavelength was 329 nm, flowing rate was 1.0 mL/min, column temperature was 40 °C, sample injection was 20 μL. For L-sesamin, the mobile phase containing acetonitrile and water (50:50), the detection wavelength was 287 nm, flowing rate was 1.0 mL/min, column temperature was 40 °C, sam-

收稿日期: 2004-12-13 修订日期: 2005-04-20

基金项目: 复旦大学博士后流动站; 柳州两面针股份有限公司博士后工作站博士后研究项目内容之一 (Supported by Workstation of Postdoctor of Liuzhou Liangmianzhen Co. L.ro.; Department of Chemistry, Fudan University).

作者简介: 刘绍华(1962-), 男, 广西桂林人, 博士, 副教授, 研究方向: 靶向药物的开发研究, E-mail: <lshao-hua18@yahoo.com.cn>.

ple injection was 20 μ L. This study will supply a reliable theoretic direction to develop and make use of *Zanthoxylum nitidum* in anti-tumor, antinociceptive and so on.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); *Zanthoxylum nitidum*; nitidine chloride; L-sesamin; anti-tumor; antinociceptive

两面针 [*Zanthoxylum nitidum* (Rox.) DC.] 系芸香科花椒属植物, 别名上山虎、人地金牛、两背针, 主要分布于我国广西、广东、云南、贵州、四川、浙江、福建、江西、台湾等省, 生于山野坡地灌木丛中。在我国的传统医药开发中, 中药两面针具有悠久的药用历史, 其根和茎皮具有驱风化湿、消肿止痛、行气之功效, 民间用中药两面针水煎服或研粉冲服, 广泛用于镇痛、抗炎和麻醉, 主治风湿关节痛、跌打扭伤肿痛、神经痛、牙痛、肠胃绞痛、胆道蛔虫症引起的疼痛及疡病等(江苏新医学院, 1977; 杨仓良, 1993)。1977 年被收入《中国药典》(国家药典委员会, 1977)。1980 年黄治勋等报导氯化两面针碱能延长小鼠艾氏腹水癌的生命, 对慢性粒细胞型白血病有近期疗效(黄治勋等, 1980)。药典是以薄层扫描法测定其中氯化两面针碱的含量作为对两面针进行质量控制的方法(中华人民共和国药典, 1995)。有学者报导用 TLC-UV 法测定氯化两面针碱(赖茂祥等, 1992), 有用反相 HPLC 测定的报导(陈钧等, 2001), 也有用 HPLC 测定两面针中氯化两面针碱含量的报导, 此方法简便、灵敏、准确、重现性好(张守尧等, 1998)。1982 年曾报导从中药两面针中分离出来一种木脂素化合物叫两面针结晶-8(结构未确定)具有解痉、镇痛和镇静等作用(曾雪瑜, 1982)。洪庚辛等(1983)还报导了两面针结晶-8 镇痛作用机理。因此, 有学者建议将木脂素的鉴别和测定作为衡量两面针质量的标准之一(张守尧等, 2002)。本研究采用 HPLC 法对广西十个不同产地的两面针进行氯化两面针碱和木脂素化合物——L-芝麻脂素的分析和比较, 为中药两面针的最佳原料产地的选择和两面针的开发利用提供可靠的理论依据, 具有重要的指导意义。

1 仪器、药材和试剂

1.1 仪器

日本岛津 UV-2201 紫外分光光度计, 日本岛津高效液相色谱仪(LC-10A 高压泵, SPD-10A 紫外检测器, GS-light 色谱数据处理软件)。

1.2 药材

氯化两面针碱标准品为外购商品(由中国药品制品检定所提供), L-芝麻脂素对照品由本研究小组分离和鉴定。两面针样品来自广西的金秀, 百色, 北流, 钦州, 融水, 天峨, 桂平, 邕宁, 桂林, 龙州十个不同产地。样品由柳州两面针股份有限公司黄光伟高级工程师鉴定, 并保存在柳州两面针股份有限公司。

1.3 试剂

乙腈: HPLC 级色谱纯; 甲醇: HPLC 级色谱纯。

2 实验方法

2.1 氯化两面针碱的检测

2.1.1 色谱条件 大连依利特公司 HYPERSIL BDS C_{18} 高效液相色谱柱(5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm), C_{18} 保护柱, 检测波长: 329 nm, 柱温: 40 $^{\circ}$ C, 流动相:(乙腈:0.02 mol/L KH_2PO_4 溶液(34:66)), 流速: 1.0 mL/min, 进样量: 20 μ L, 外标法定量。

2.1.2 求标准曲线和线性回归方程 准确称取 0.0015 g 氯化两面针碱标准品, 用 HPLC 级甲醇溶解后定容于 25.00 mL 容量瓶中, 摇匀后作为标准品贮备液。

准确量取标准品贮备液 0.10、0.25、0.50、1.00、2.00、3.00 mL 和 4.00 mL 于 10.00 mL 容量瓶中, 以甲醇定容至标线, 摇匀, 得如表 1 所示的各梯度浓度的标准品溶液。

取各浓度标准溶液 20 μ L 进样测定, 每个浓度进样 3 次, 以平均峰面积为纵坐标, 对应的浓度 c (mg/mL) 为横坐标作标准曲线和线性回归方程, 在 0.0006~0.0240 mg/mL 范围内的线性关系良好, 见表 1、图 1。

2.2 L-芝麻脂素的检测

2.2.1 色谱条件 大连依利特公司 HYPERSIL BDS C_{18} 高效液相色谱柱(5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm), C_{18} 保护柱, 检测波长: 287 nm, 柱温: 40 $^{\circ}$ C, 流动相: 乙腈-水(50:50), 流速: 1.0 mL/min, 进样量: 20 μ L, 外标法定量。

2.2.2 求标准曲线和线性回归方程 准确称取

0.0066 g L-芝麻脂素对照品,用甲醇溶解后定容于 50.00 mL 容量瓶中,摇匀作为对照品贮备液。

准确量取对照品贮备液 0.20、0.40、0.50、0.70、0.80 mL 和 1.00 mL 于 10.00 mL 容量瓶中,以甲醇定容至标线,摇匀,得对照品溶液。

取各浓度对照品溶液 20 μL 进样测定,每个浓度进样 3 次,以平均峰面积为纵坐标,对应的浓度 c (mg/mL)为横坐标作标准曲线和线性回归方程,在 0.00264~0.01320 mg/mL 范围内的线性关系良好,见表 2、图 2。

表 1 标准品氯化两面针碱溶液的浓度和峰面积

Table 1 The concentration and the peak area of nitidine chloride as reference substance

浓度 Concentration (mg/mL)	峰面积 Peak area			
	1	2	3	平均值 Mean value
0.000 6	50 194	49 814	51 721	50 576
0.001 5	137 554	141 760	134 931	138 082
0.003 0	265 660	275 074	281 069	273 934
0.006 0	458 108	471 101	475 913	468 374
0.012 0	1 030 700	1 008 190	1 018 728	1 019 206
0.018 0	1 507 985	1 540 084	1 553 505	1 533 858
0.024 0	2 106 440	2 107 418	2 116 895	2 110 251

表 2 对照品 L-芝麻脂素溶液的浓度和峰面积

Table 2 The concentration and the peak area of L-sesamin as reference substance

浓度 Concentration (mg/mL)	峰面积 Peak area			
	1	2	3	平均值 Mean value
0.002 64	72 957	72 688	71 783	72 476
0.005 28	131 062	129 408	134 437	131 636
0.006 60	174 752	173 642	167 753	172 049
0.009 24	242 801	236 939	240 132	239 957
0.010 56	272 368	272 748	262 313	26 9143
0.013 20	342 440	337 101	329 866	336 469

2.3 样品分析

取广西十个不同产地两面针根的干燥横切薄片约 0.55 g,精密称定,置于 100 mL 圆底烧瓶中,加 45 mL 甲醇,于 68 °C 水浴中加热回流 2 h,冷却后用甲醇定容至 50.00 mL,摇匀,用 0.45 μm 有机相滤膜过滤,取 20 μL 进样测定,每个样品进样 3 次,以平均峰面积根据线性回归方程计算其浓度 (mg/mL),然后计算药材中氯化两面针碱的含量 (%) 和 L-芝麻脂素的含量 (%)。

对照品溶液与两面针原根药材中的氯化两面针碱的色谱图见图 3、图 4。

对照品溶液与两面针原根药材中的 L-芝麻脂素的色谱图见图 5 和图 6。

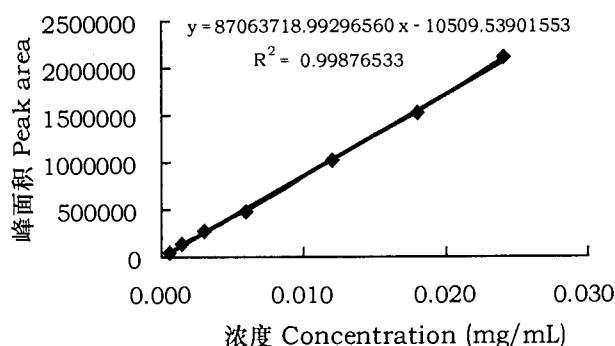


图 1 标准品氯化两面针碱的标准曲线和线性回归方程
Fig. 1 The standard curve and the linear regression equation of nitidine chloride as reference substance

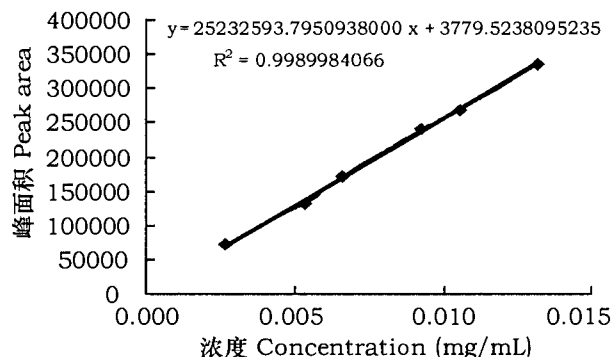


图 2 对照品 L-芝麻脂素的标准曲线和线性回归方程
Fig. 2 The standard curve and the linear regression equation of L-sesamin as reference substance

2.4 精密度试验

在十个不同产地两面针样品中,精密吸取试样溶液 20 μL,连续进样 3 次,计算相对标准偏差 RSD。以邕宁、桂林、龙州三个不同产地的两面针为例来进行日内反复测定氯化两面针碱,计算 RSD 和测量误差。同样,以桂林产的两面针为例来进行日内反复测定 L-芝麻脂素,计算 RSD 和测量误差。

2.5 加标回收率的测定

准确量取已经过测定,含量已知的百色两面针横切片,准确加入一定量的氯化两面针碱对照品,依 2.3 法提取,测定并计算加标回收率;用同样的方法测定并计算 L-芝麻脂素加标回收率。

3 实验结果

(1) 广西十个不同产地两面针中氯化两面针碱

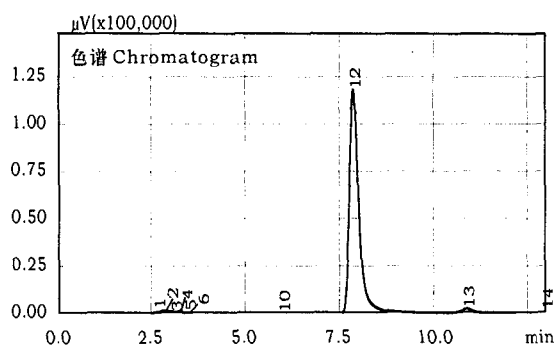


图 3 对照品溶液色谱图(12; 生物碱)

Fig. 3 The chromatogram of nitidine chloride as reference substance (12; nitidine chloride)

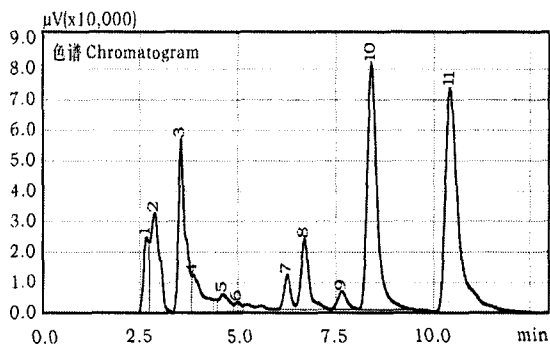


图 4 两面针根提取液色谱图(10; 生物碱)

Fig. 4 The chromatogram of nitidine chloride in the root of *Zanthoxylum nitidum* extract(10; nitidine chloride)

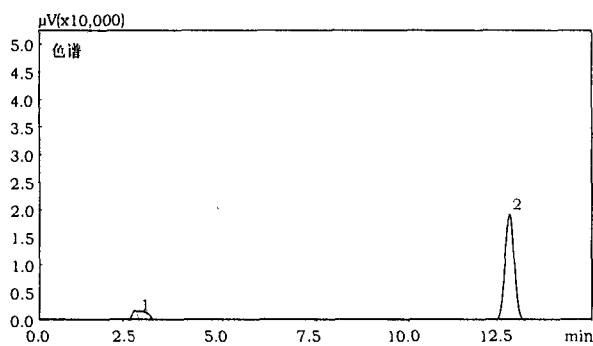


图 5 对照品溶液色谱图(2; 芝麻脂素)

Fig. 5 The chromatogram of L-sesamin as reference substance (2; sesamin)

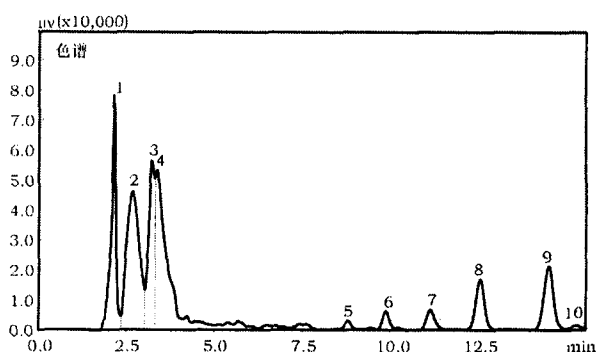


图 6 两面针根提取液色谱图(8; 芝麻脂素)

Fig. 6 The chromatogram of extracted L-sesamin from root of *Zanthoxylum nitidum* (8; sesamin)

表 3 广西十个不同产地两面针根中氯化两面针碱含量
Table 3 The content of nitidine chloride in the roots of *Zanthoxylum nitidum* from 10 growing areas of Guangxi

产地 Growing areas	1	2	3	平均含量 Mean content (%)	标准偏差 RSD
金秀	0.048	0.048	0.051	0.049	0.002
百色	0.476	0.471	0.455	0.467	0.011
北流	0.187	0.169	0.187	0.181	0.011
钦州	0.078	0.081	0.084	0.081	0.003
融水	0.327	0.338	0.358	0.341	0.016
天峨	0.383	0.378	0.388	0.383	0.005
桂平	0.037	0.034	0.039	0.037	0.002
邕宁	0.165	0.168	0.166	0.166	0.001
桂林	0.150	0.157	0.153	0.153	0.004
龙州	0.301	0.299	0.295	0.298	0.003

及 L-芝麻脂素的含量(%)和 RSD(n=3)见表 3、4。

(2)在邕宁、桂林、龙州三个不同产地的两面针样品中,日内反复测量氯化两面针碱的含量,计算其 RSD 和相对误差,结果见表 5;同样,以桂林两面针

为例,日内反复测定 L-芝麻脂素的含量,计算 RSD 和测量误差,结果见表 6。

表 4 广西十个不同产地两面针根中 L-芝麻脂素含量
Table 4 The content of L-sesamin in the roots of *Zanthoxylum nitidum* from 10 growing areas of Guangxi

产地 Growing areas	1	2	3	平均含量 Mean content (%)	标准偏差 RSD
金秀	0.037	0.038	0.038	0.037	0.001
百色	0.159	0.180	0.141	0.160	0.020
北流	0.062	0.062	0.057	0.060	0.003
钦州	0.083	0.091	0.092	0.089	0.005
融水	0.047	0.054	0.060	0.053	0.007
天峨	0.101	0.100	0.107	0.103	0.004
桂平	0.046	0.047	0.046	0.046	0.001
邕宁	0.109	0.103	0.106	0.106	0.004
桂林	0.088	0.087	0.089	0.088	0.001
龙州	0.106	0.114	0.115	0.111	0.005

(3)加标回收率实验结果见表 7 和表 8。

4 讨论

氯化两面针碱和木脂素类化合物被认为是两面针中的有效成分。其中氯化两面针碱能延长小鼠艾氏腹水癌的生命,对慢性粒细胞型白血病有近期疗效,是抗肿瘤药物的有效成分,而也有文献提出将木脂素类化合物的含量测定和鉴定作为衡量两面针质量的标准之一(张守尧等,2002)。据此本研究将广西十个不同产地两面针根中的氯化两面针碱和L-芝麻脂素进行了含量的测定,结果发现广西百色的

两面针中氯化两面针碱的含量最高,为0.467%,其次是天峨,为0.383%,含量最低的是金秀样品,为0.049%。同样,发现来自广西百色的两面针中L-芝麻脂素含量最高,为0.160%,其次是龙州,含量为0.111%,金秀样品的含量最低,为0.037%。因此,可以确定,生长在广西桂西、桂南一带的两面针中氯化两面针碱和L-芝麻脂素含量较高。这为两面针在抗肿瘤药物和镇痛等方面的最佳原料产地的选择和两面针的开发利用提供了可靠的理论依据,具有重要应用价值。

参考文献:

中华人民共和国药典. 1995. 《药典第一部》[M]. 广州:广东科技出版社,144.
 江苏新医学院. 1977. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:上海人民出版社,40.
 杨仓良. 1993. 毒药本草. 北京:中国中医药出版社,431.
 陈 钧,段更利,黄建明. 2001. 反相高效液相色谱法测定两面针霜剂和生药两面针中氯化两面针碱的含量[J]. 复旦学报(医学科学版),28(5):436-437.
 国家药典委员会: 1977. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,1977. 144.
 赖茂祥,刘布鸣,蒋瑾华,等. 1992. 用薄层一紫外分光光度法测定两面针中氯化两面针碱的含量. 中国中药杂志[J]. 17(9):554-555.
 Hong GX(洪庚辛), Zeng XY(曾雪瑜). 1983. Studies on the mechanism of analgesic action of crystal-8 isolated from *Zanthoxylum nitidum* (ROXB.) DC. (两面针结晶-8镇痛作用的机理研究)[J]. Yao-Hsueh-Hsueh-Pao(药学报),18(3):227-230.
 Huang ZX(黄治勋), Li ZH(李志和). 1980. Studies on the antitumor constituents of *Zanthoxylum nitidum* (ROXB.) DC. (两面针抗肿瘤有效成分的研究)[J]. Acta Chimica Sin(化学学报),38(6):535-542.
 Zeng XY(曾雪瑜), Chen XF(陈学芬), He XQ(何兴全), et al. 1982. Studies on the antispasmodic and analgesic actions of crystal-8 isolated from *Zanthoxylum nitidum* (ROXB.) DC. (两面针结晶-8的解痉和镇痛作用)[J]. Yao-Hsueh-Hsueh-Pao(药学报),17(4):253-258.
 Zhang SY(张守尧), Wang GF(王桂芳), Zou HQ(邹恒琴). 1998. Determination of nitidine chloride in Shinyleaf Pricklyash (*Zanthoxylum nitidum*) (HPLC法测定两面针中氯化两面针碱的含量)[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs(中草药),29(7):445-446.
 Zhang SY(张守尧), Zhou BJ(周本杰), Wang Y(汪 艳), et al. 2002. Determination of L-sesamin and L-asarinin in *Zanthoxylum nitidum* (ROXB.) DC. by high performance liquid chromatography(高效液相色谱法测定不同部位原植物中L-芝麻脂素和L-细辛脂素的含量)[J]. J First Mil Med Univ(第一军医大学学报),22(7):654-655.

表5 三个不同产地的两面针样品中氯化两面针碱在日内测量值的标准偏差和相对误差

Table 5 RSDs and REs of nitidine chloride content of *Zanthoxylum nitidum* in three different growing areas

产地 Growing areas	1	2	3	平均含量 Mean content (%)	标准偏差 RSD	相对误差 RE(%)
邕宁	0.165	0.158	0.16	0.164	0.005	-1.205
桂林	0.153	0.151	0.156	0.153	0.003	0
龙州	0.297	0.300	0.309	0.302	0.006	1.342

表6 L-芝麻脂素日内含量的标准偏差和相对误差
Table 6 RSD and RE of of L-sesamin in one day content measured in content measured

产地 Growing areas	1	2	3	平均含量 Mean content (%)	标准偏差 RSD	相对误差 RE(%)
桂林	0.090	0.088	0.089	0.089	0.001	1.136

表7 加标回收率实验结果

Table 7 Recovery rate of nitidine chloride in the samples (n=3)

加入量 Sample (mg/mL)	测得量 Recovery sample (mg/mL)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Mean recovery rate (%)	标准偏差 RSD
0.014 26	0.013 78	96.6	—	—
0.011 09	0.010 81	97.5	97.4	0.80
0.008 95	0.008 79	98.2	—	—

表8 L-芝麻脂素加标回收率实验结果

Table 8 Recovery rate of l-seamin in the samples(n=3)

加入量 Sample (mg/mL)	测得量 Recovery sample (mg/mL)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Mean recovery rate (%)	标准偏差 RSD
0.005 56	0.005 47	98.4	—	—
0.008 43	0.008 36	99.2	99.5	1.33
0.011 37	0.011 48	101.0	—	—