doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.10.019

高效液相色谱法测定两面针药材中 2 种成分含量*

马　庆[1]，魏伟锋[1]，袁焕合[2]，许　雷[1]，张洪胜[1]，邬国松[3]，陈剑洪[1]，韩正洲[1]，林锦锋[2△]

（1. 华润三九医药股份有限公司，广东 深圳　518110；2. 广东省药品检验所，广东 广州　510663；
3. 广东省广州市白云区人民医院，广东 广州　510006）

摘要：目的　建立测定两面针药材中 2 种成分含量的高效液相色谱（HPLC）法。**方法**　采用 HPLC 法测定不同来源（野生、栽培、药材市场）两面针药材样品（根、茎）中氯化两面针碱和白屈菜红碱成分含量，色谱柱为 Thermo BETASIL C_{18} 柱（250 mm × 4. 6 mm，5 μm），流动相为含 0. 2% 三乙胺的 0. 3% 磷酸溶液 - 乙腈（77∶23，*V* / *V*），流速为 1. 0 mL / min，检测波长为 273 nm，柱温 30 ℃，进样量 10 μL。**结果**　氯化两面针碱、白屈菜红碱进样量分别在 0. 018 2 ~ 1. 138 μg（*r* = 0. 999 9，*n* = 5）和 0. 013 9 ~ 0. 868 μg（*r* = 0. 999 9，*n* = 6）范围内与峰面积线性关系良好；精密度、稳定性、重复性试验的 *RSD* 均小于 2. 2%；平均加样回收率分别 96. 30% 和 94. 07%，*RSD* 分别为 1. 15% 和 1. 31%（*n* = 6）。21 批药材样品中氯化两面针碱和白屈菜红碱总含量为 0. 068% ~ 0. 395%，限度条件为两者总含量不得少于 0. 150%。**结论**　该方法简单、可行，能有效评价两面针根及茎的质量，可为两面针药用部位的增加及资源可持续开发利用提供参考。

关键词：两面针；药用部位；高效液相色谱法；质量标准

中图分类号：R917；R927；R286.0　　**文献标志码：A**　　**文章编号：1006 - 4931（2022）10 - 0081 - 05**

Content Determination of Two Components in *Zanthoxylum Nitidum* by HPLC

MA Qing[1], *WEI Weifeng*[1], *YUAN Huanhe*[2], *XU Lei*[1], *ZHANG Hongsheng*[1], *WU Guosong*[3], *CHEN Jianhong*[1], *HAN Zhengzhou*[1], *LIN Jinfeng*[2]

（1. China Resources Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen, Guangdong, China 518110; 2. Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou, Guangdong, China 510663; 3. The People's Hospital of Baiyun District, Guangzhou, Guangdong, China 510006）

Abstract: Objective　To establish a high - performance liquid chromatography（HPLC）method for the content determination of two

* **基金项目：**国家科技重大专项子课题［2014ZX09301306 - 001］。

第一作者：马庆，男，硕士，中级工程师，研究方向为中药资源开发，（电子信箱）maq@999. com. cn。

△ **通信作者：**林锦锋，男，博士，主任中药师，研究方向为中药质量分析，（电子信箱）linchina@163. com。

于控制样品中的微粒子数。采用沉降法测定微粒子数量，测得的结果以质量百分比计算，采用激光粒度仪法测得的粒径 < 5 μm 粒子数采用体积百分数表示，故沉降法的限度不适用于激光粒度仪法。若采用激光粒度仪法控制微粒子数量，需制订合适的限度。

综上所述，聚苯乙烯磺酸钙散在水中分散良好；所建立的方法简便快速，耐用性良好，重复性好，适用于该制剂的粒径控制。

参考文献

［1］杨　成，逄玉涛，潘德璋. 聚苯乙烯磺酸钙治疗高钾血症的临床观察［J］. 中华肾病研究电子杂志，2021，10（3）：162 - 165.

［2］周凌辉，裴　娟，侯香华，等. 单纯低钾饮食和低钾饮食联合小剂量聚苯乙烯磺酸钙治疗维持性血液透析患者高钾血症的疗效比较［J］. 中国全科医学，2016，19（27）：3351 - 3355.

［3］赵　锋. 聚苯乙烯磺酸钙治疗慢性肾脏病高钾血症患者的临床疗效观察［J］. 河北医药，2015，37（20）：3120 - 3122.

［4］杨道媛，马成良，孙宏巍，等. 马尔文激光粒度分析仪粒度检测方法及其优化研究［J］. 中国粉体技术，2002，8（5）：27 - 30.

［5］狄天云，高原雨，朱　捷，等. 激光粒度仪测定醋酸氟轻松乳膏粒度的方法学研究［J］. 药物分析杂志，2016，36（1）：181 - 184.

［6］柳　青，陈　超，杨　辑，等. 激光检测药用蒙脱石粒度的方法［J］. 中国粉体技术，2020，26（1）：41 - 45.

［7］王　禄，刘宝树，孙　华. 激光粒度仪测定非诺贝特粒度分布的应用研究［J］. 中国抗生素杂志，2016，41（9）：675 - 679.

［8］寻明金，冯　中，张贵民. 激光粒度仪测定单硝酸异山梨酯缓释片中间产品粒度的方法学研究［J］. 药学研究，2020，39（4）：213 - 216.

［9］刘培炎. 激光粒度仪干法和湿法测试在涂料粒径分析中的应用［J］. 涂料工业，2016，46（12）：58 - 62.

［10］陈　雯，龙　翔，李海艳，等. 激光粒度仪测定气相氧化法二氧化钛粒径的研究［J］. 无机盐工业，2020，52（2）：69 - 71.

［11］张洪英，李双连，郭亚丽，等. 激光粒度仪测定盐酸莫西沙星原料药的粒度研究［J］. 广东化工，2021，48（3）：182 - 183.

［12］李　喆，黄小艳，吴　燕，等. 激光粒度仪在评价吸附无细胞百白破疫苗颗粒一致性及稳定性中的应用［J］. 中国生物制品学杂志，2020，33（7）：818 - 823.

［13］徐　登. 激光粒度仪测定盐酸吗啡粒度分布的应用研究［J］. 海峡药学，2021，33（2）：53 - 55.

［14］刘　慧，李玉萍，姚红林，等. 马尔文激光粒度仪在测定催化裂化催化剂粒度分布中的应用［J］. 齐鲁石油化工，2020，48（3）：241 - 245.

［15］赵　宇，赵建刚，李梅楠，等. 激光粒度仪在碳酸钙粉粒度分析中的应用［J］. 地质装备，2017，18（6）：29 - 31.

（收稿日期：2021 - 10 - 09；修回日期：2021 - 12 - 15）

components in *Zanthoxylum nitidum*. **Methods** HPLC method was used to determine the contents of nitidine chloride and chelerythrine in *Zanthoxylum nitidum* samples (roots and stems) from different sources (wild, cultivated and marketed). The chromatographic column was Thermo BETASIL C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.3% phosphoric acid solution containing 0.2% triethylamine (23 ∶ 77, *V* / *V*), the flow rate was 1 mL / min, the detection wavelength was 273 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of nitidine chloride and chelerythrine were 0.018 2 - 1.138 μg (r = 0.999 9, n = 5) and 0.013 9 - 0.868 μg (r = 0.999 9, n = 6), respectively. The *RSD*s of precision, stability and repeatability tests were less than 2.2%. The average recoveries of nitidine chloride and chelerythrine were 96.30% and 94.07% with *RSD*s of 1.15% and 1.31% (n = 6), respectively. The total content of nitidine chloride and chelerythrine in 21 batches of samples was 0.068% - 0.395%, and the limit condition was that the total content of both should not be less than 0.150%. **Conclusion** The method is simple and feasible, and can effectively evaluate the quality of roots and stems of *Zanthoxylum nitidum*, so as to provide a reference for the increase of medicinal parts of *Zanthoxylum nitidum* and the sustainable development and utilization of resources.

Key words: *Zanthoxylum nitidum*; medicinal parts; HPLC; quality standard

两面针 *Zanthoxylum nitidum*（Roxb.）DC. 以蔓椒之名始载于《神农本草经》[1]，列为下品，亦收载于《名医别录》《本草经集注》《本草图经》《本草术原》等本草名著，别名甚多。其味苦、辛，性平，有小毒，归肝、胃经，有活血化瘀、行气止痛、祛风通络、解毒消肿功效，可外用治疗跌扑损伤、胃痛、牙痛、风湿痹痛、毒蛇咬伤、烧烫伤等[2]。两面针是60余种中成药的组方药材之一，药理作用广泛，临床应用价值较高，市场需求逐年上升。2020年版《中国药典（一部）》收录两面针的药用部位为根，对其质量要求为含氯化两面针碱（$C_{21}H_{18}NO_4$·Cl）不得少于0.13%，加之其生长年限长、产量低、可再生能力差、土地沙漠化等因素，致使其严重供不应求。而历代本草、地方标准及方剂均有其不同药用部位（包括果实、根、茎、叶）的记载，但多以根和茎入药（见表1）。有研究证实，两面针根部和茎的成分种类基本一致[3-4]，且药理作用及其对应的药效也基本相似[5-6]。两面针药材中的主要活性成分为氯化两面针碱、白屈菜红碱、8-甲氧基二氢白屈菜红碱及橙皮苷等化合物，其中前两种成分含量较高[3,7]。因此，本研究中拟采用高效液相色谱（HPLC）法测定上述2种成分含量，以期为两面针药材资源的可持续发展、合理开发利用提供参考。现报道如下。

表1 两面针药用部位

Tab. 1 Medicinal parts of *Zanthoxylum nitidum*

来源	入药部位	来源	入药部位
《神农本草经》	茎、根	《中华本草》	根、枝叶
《备急千金要方》	根、根皮、枝叶	《药用植物辞典》	根、枝叶
《开宝本草》	茎、根	《湖南中药材标准》	根、茎
《本草纲目》	茎、根、果实	《广西中药材标准》	全株
《本草求原》	茎、根	《广东省中药材标准》	根、茎
《中药志》	根	《中国药典》	根
《中药大辞典》	根、枝叶		

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1100型高效液相色谱仪（含DAD检测器，美国Agilent公司）；CP225D型分析天平（德国Sartorius公司）；UV-2550型紫外-可见分光光度计（日本Shimadzu公司）；Milli-Q超纯水处理系统（美国Millipore公司）。

1.2 试药

氯化两面针碱对照品（批号为110848-201604，含量91.0%），白屈菜红碱对照品（批号为111718-201402，含量80.5%），均购自中国食品药品检定研究院；甲醇、乙腈均为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为超纯水。两面针根部与茎部样品共21批（编号1~21，相关情况见表2），经广西壮族自治区中医药研究院赖茂祥研究员鉴定为正品（凭证标本存放于该研究院标本馆）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Thermo BETASIL C_{18}柱（250 mm × 4.6 mm，

表2 样品信息

Tab. 2 Information of the samples

编号	产地	来源	生长年限	编号	产地	来源	生长年限
1	广东电白区麻岗镇	栽培	5	12	广西靖西市化峒乡	野生	
2	广西大新县福隆乡	栽培	5	13	广西凌云县伶站乡	野生	
3	广西马山县合群乡	栽培	6	14	广东高州市镇江镇	野生	
4	广西灵山县旧州镇	栽培	3	15	广东高州市谢鸡镇	野生	
5	广东平远县黄花陂	栽培	6.5	16	广东茂名	药材市场	
6	广东平远县石正镇	栽培	5.5	17	广西玉林	药材市场	
7	广西马山县新汉村	栽培	4	18	广西平南	药材市场	
8	广西大新县龙门乡	野生		19	越南-1	药材市场	
9	广西邕宁蒲庙镇	野生		20	越南-2	药材市场	
10	广东英德市连江口镇	野生		21	越南-3	药材市场	
11	广西那坡县平孟镇	野生					

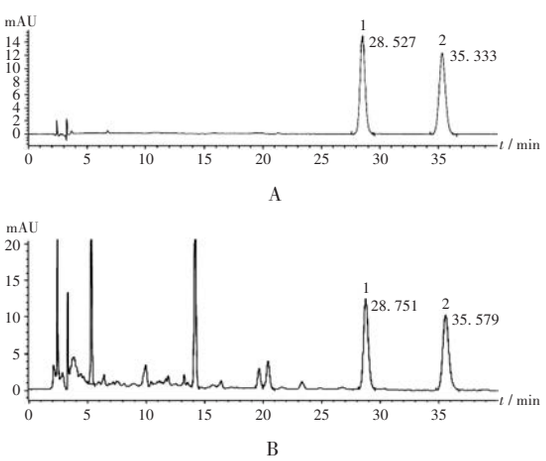
5 μm）；流动相：含 0.2% 三乙胺的 0.3% 磷酸溶液 - 乙腈（77∶23，*V* / *V*）；流速：1.0 mL / min；检测波长：273 nm；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。

2.2 溶液制备

称取氯化两面针碱对照品 12.51 mg、白屈菜红碱对照品 10.78 mg，精密称定，置 20 mL 容量瓶中，加甲醇溶解并定容，即得含氯化两面针碱 569.205 μg / mL、白屈菜红碱 433.895 μg / mL 的混合对照品溶液。取药材样品适量，研为粉末，取 0.5 g（过二号筛），精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 90% 甲醇 100 mL，称定质量，加热回流 60 min，放冷，再称定质量，用 90% 甲醇溶液补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验：精密吸取 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，记录色谱图。供试品溶液色谱中，在与混合对照品溶液色谱相应位置有吸收峰。理论板数按氯化两面针碱峰及白屈菜红碱峰计均应不低于 3 000，分离度均大于 1.5，基线分离良好。详见图 1。



1. 氯化两面针碱　2. 白屈菜红碱

A. 混合对照品溶液　B. 供试品溶液

图 1　高效液相色谱图

1. Nitidine chloride　2. Chelerythrine

A. Mixed reference solution　B. Test solution

Fig. 1　HPLC chromatograms

线性关系考察：取 2.2 项下混合对照品溶液适量，加甲醇稀释，得氯化两面针碱质量浓度分别为 113.841，45.536，22.768，11.384，4.554，1.821 μg / mL，白屈菜红碱质量浓度分别为 86.779，34.712，17.356，8.678，3.471，1.388 μg / mL 的系列混合对照品溶液。按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以待测成分进样量为横坐标（*X*，μg）、峰面积（*Y*）为纵坐标进行线性回归，得氯化两面针碱回归方程为 $Y_1 = 4\,112.864X_1 - 18.523$（$r = 0.999\,9$，$n = 5$），白屈菜红碱回归方程为 $Y_2 = 5\,594.700X_2 - 20.357$（$r = 0.999\,9$，$n = 5$）。结果表明，氯化两面针碱、白屈菜红碱进样量分别在 0.018 2 ~ 1.138 μg 和 0.013 9 ~ 0.868 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验：取药材样品（编号为 1），按 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，平行测定 6 次，记录峰面积。结果氯化两面针碱、白屈菜红碱峰面积的 *RSD* 分别为 1.00% 和 0.80%（$n = 6$），表明方法精密度良好。

稳定性试验：取 2.2 项下供试品溶液，室温下放置 0，2，4，8，16，24，48 h 时，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果氯化两面针碱和白屈菜红碱峰面积的 *RSD* 分别为 0.30% 和 1.00%（$n = 7$），表明供试品溶液室温放置 48 h 内稳定。

重复性试验：取 1 号样品，按 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，记录峰面积并计算含量。结果氯化两面针碱和白屈菜红碱含量的 *RSD* 分别为 0.70% 和 2.10%（$n = 6$），表明方法重复性良好。

加样回收试验：取已知含 0.168 6%（未扣除水分）氯化两面针碱、0.138 7%（未扣除水分）白屈菜红碱为的 1 号样品共 6 份，每份约 0.25 g，精密称定，分别精密加入一定质量浓度的混合对照品溶液，再定容至 100 mL，按 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，记录峰面积并计算回收率。结果见表 3。

2.4 样品含量测定

取 21 批药材样品，分别按 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，记录色谱图，以外标一点法计算含量。结果见表 4。

可见，21 批药材样品中氯化两面针碱和白屈菜红碱总含量为 0.068% ~ 0.395%，平均 0.219%，因各批次间的测定结果较分散，以该值下调 30%，即得含量为 0.153%。故建议，规定本品含氯化两面针碱和白屈菜红碱的总含量不得少于 0.150%。在该条件下，21 批药材样品中有 6 批不符合规定。

3 讨论

3.1 检测波长选择

预试验中，分别在 200 ~ 500 nm 紫外波长范围内对氯化两面针碱对照品溶液、白屈菜红碱对照品溶液和混合对照品溶液进行扫描，结果分别在 272，282，273 nm 波长处有最大吸收峰。因本研究需同时测定此两种成分含量，故确定紫外检测波长为 273 nm。

3.2 色谱柱和流动相选择

预试验中，以含 0.2% 三乙胺的 0.3% 磷酸溶液 -

表3 加样回收试验结果（$n=6$）

Tab. 3 Results of the recovery test ($n=6$)

取样量(g)		样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$(%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.253 3	0.253 3	0.427 1	0.351 4	0.430 8	0.339 8	0.845 3	0.672 3	97.08	94.44	96.30	94.07	1.15	1.31
0.250 3	0.250 3	0.422 1	0.347 3	0.430 8	0.339 8	0.829 8	0.661 7	94.64	92.53				
0.253 3	0.253 3	0.427 1	0.351 4	0.430 8	0.339 8	0.842 0	0.668 8	96.31	93.41				
0.253 0	0.253 0	0.426 6	0.351 0	0.430 8	0.339 8	0.838 3	0.671 2	95.57	94.23				
0.249 7	0.249 7	0.421 1	0.346 4	0.430 8	0.339 8	0.842 4	0.673 2	97.79	96.17				
0.251 5	0.251 5	0.424 1	0.348 9	0.430 8	0.339 8	0.839 4	0.667 1	96.40	93.64				

注：A为氯化两面针碱，B为白屈菜红碱。

Note: A is nitidine chloride and B is chelerythrine.

表4 样品含量测定结果(%)

Tab. 4 Results of content determination of nitidine chloride and chelerythrine in the samples (%)

编号	氯化两面针碱	白屈菜红碱	合计	编号	氯化两面针碱	白屈菜红碱	合计
1	0.086	0.027	0.113	12	0.130	0.096	0.226
2	0.152	0.097	0.249	13	0.169	0.172	0.341
3	0.132	0.044	0.176	14	0.029	0.039	0.068
4	0.054	0.022	0.076	15	0.126	0.120	0.247
5	0.128	0.066	0.194	16	0.175	0.164	0.339
6	0.099	0.041	0.140	17	0.049	0.076	0.126
7	0.108	0.050	0.158	18	0.128	0.086	0.213
8	0.169	0.135	0.304	19	0.174	0.154	0.328
9	0.088	0.058	0.146	20	0.226	0.169	0.395
10	0.160	0.051	0.210	21	0.195	0.164	0.359
11	0.136	0.064	0.200				

乙腈（78∶22，V/V）为流动相，比较了Thermo公司BETASIL C_{18}柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）和BDS HYPERSIL C_{18}柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm），结果前者峰形较好，而后者色谱峰拖尾较严重，故采用前者作为本研究的色谱柱。还比较了（A）0.1%甲酸（用三乙胺调pH至4.5）－乙腈（75∶25，V/V）、（B）含0.2%三乙胺的0.3%磷酸溶液－乙腈（77∶23，V/V）、（C）1 mmol/L庚烷磺酸钠（用3 mol/L磷酸调pH至2.6）－乙腈（70∶30，V/V）3种流动相，结果以流动相（B）峰形最好。

3.3 提取方式考察

预试验中，考察了2种提取方式（超声提取、加热回流），并在此基础上采用3因素、3水平的正交试验考察提取溶剂（50%，70%，90%甲醇）、提取时间（30，60，90 min）、溶液用量（25，50，100 mL）对提取效果的影响。结果表明，加热回流提取效果略优于超声提取，故选择加热回流提取；对提取得率的影响从大到小为甲醇体积分数＞溶剂体积＞提取时间，故最佳的提取条件以90%甲醇100 mL为溶剂，提取60 min。由此制备的供试品溶液色谱峰数目最多，峰面积较大，峰形较好。

3.4 方法评价

两面针含较多种化学成分，目前标准中的薄层色谱鉴别和含量测定项目仅针对其个别成分，不能综合反映两面针药材中各主要成分含量。因此，本研究中利用HPLC法对氯化两面针碱和白屈菜红碱进行定量分析。本方法重复性好，可操作性强，可用于两面针药材整体化学质量的一致性评价。

药材样品中氯化两面针碱和白屈菜红碱总含量（以下简称总含量）最高的是20号（越南－2），最低为14号（广东高州市镇江镇）。在栽培的药材样品中，同样为5年生栽培样品，2号（广西大新县福隆乡）总含量明显高于1号（广东电白区麻岗镇），且广东药材样品指标性成分含量普遍低于广西药材样品。就本研究中建议总含量不得少于0.150%的结果而言，广西更适合两面针的种植，且种植时间为5～6年，该结果在一定程度佐证了广西为两面针的道地产区，同时也为两面针的采收时间提供了一定参考。由于本研究中收集的21批药材采收时期、生长年份不同，同时也受到地域水土、气候等因素影响，可能导致药材化学成分含量差异较大，后续将会收集更多的药材样品对本研究进行深入分析。

综上所述，本研究中对不同来源（栽培、野生、药材市场）21批两面针药材样品（茎、根）进行含量测定，并制订了氯化两面针碱和白屈菜红碱总含量限度，可有效评价两面针根及茎的质量，为两面针资源的可持续发展及合理开发利用奠定基础。

参考文献

[1] 孙星衍，孙冯翼辑本．神农本草经·卷三[M]．北京：人民卫生出版社，1963：120.

[2] 国家药典委员会．中华人民共和国药典（一部）[M]．北京：中国医药科技出版社，2020：176－177.