

# UPLC-DAD 法研究栽培两面针不同生长期 不同部位有效成分的动态累积

何丽丽<sup>1</sup>, 林钻煌<sup>2</sup>, 胡永志<sup>2</sup>, 覃青云<sup>2</sup>, 黄光伟<sup>2</sup>, 胡东南<sup>1\*</sup>

(1. 广西壮族自治区药用植物园, 南宁 530023; 2. 广西柳州两面针股份有限公司, 广西 柳州 545001)

**[摘要]** 目的: 研究栽培两面针有效成分在不同生长期及不同药用部位的动态累积规律, 以为两面针合理用药及人工优质栽培提供理论依据。方法: 采用 UPLC-DAD 法, 测定栽培两面针药材不同生长期、不同药用部位(根、茎、枝)中氯化两面针碱含量变化。结果: 两面针根、茎、枝不同部位中均含有氯化两面针碱, 但含量差异较大, 依次为根 > 茎 > 枝条; 不同部位、不同生长期两面针药材中氯化两面针碱含量呈规律变化, 出现两个较明显的高峰及一个低谷, 即 5、10~11 月含量较高, 6 月含量最低。结论: 两面针不同生长期, 不同部位有效成分累积分布不同, 根据其含量变化规律, 建议两面针最佳采收期在栽培第 3 年的 10~11 月, 药用部位为根部。两面针全株植物均具有一定的药用价值。

**[关键词]** 栽培两面针; 氯化两面针碱; 动态累积; UPLC-DAD; 含量; 最佳采收期

**[中图分类号]** R282.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0165-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013130165

## Dynamic Accumulation Research of Active Ingredient in Different Part and Growth Phase of Cultivative *Zanthoxylum nitidum* by UPLC-DAD

HE Li-li<sup>1</sup>, LIN Zuan-huang<sup>2</sup>, HU Yong-zhi<sup>2</sup>, QIN Qing-yun<sup>2</sup>, HUANG Guang-wei<sup>2</sup>, HU Dong-nan<sup>1\*</sup>

(1. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning 530023, China;

2. Liuzhou Liangmianzhen Company Limited, Liuzhou 545001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate dynamic accumulation of active ingredient in different part and growth phase of cultivative *Zanthoxylum nitidum*, and provide the basis for the GAP planting and the rational utilization. **Method:** A sensitive and accurate method was developed to determined the nitidine chloride in different parts (root, stem, and branch) and different harvest times of *Z. nitidum* by ultra performance liquid chromatography (UPLC) with diode array detector (DAD) for the first time. **Result:** The variation of the nitidine chloride contents was existed in different parts of *Z. nitidum*, which sequence was showed as follows: root > stem > branch, there was regulation dynamic changes of nitidine chloride content in different part and growth phase, which exist two obvious peak and a valley, that is the content of nitidine chloride reached highest value at May and October and lowest at June. **Conclusion:** The active ingredient distributed in cultivative *Z. nitidum* was different in different part and growth phase, the optimal harvest time was at October and November in the third-year, and the root was the main medicinal parts. All part of *Z. nitidum* have the medicinal value.

**[Key words]** cultivative *Zanthoxylum nitidum*; nitidine chloride; dynamic accumulation; UPLC-DAD; content; harvest time

**[收稿日期]** 20121217(003)

**[基金项目]** 广西科学研究及技术开发计划项目(桂科攻 0815005-2-11)

**[第一作者]** 何丽丽, 硕士, 助理研究员, 从事中药质量控制及民族药物开发研究, Tel:0771-2443050, E-mail:lily80s@126.com

**[通讯作者]** \* 胡东南, 研究员, 从事药用植物资源学研究, Tel:0771-2443050, E-mail:nnomhdn@126.com

两面针 *Zanthoxylum nitidum*. (Roxb.) DC 为芸香科花椒属植物,别名野花椒,入地金牛,上山虎等,主要分布在我国浙江、福建、广东、广西、云南等南部地区,以广西的资源最为丰富<sup>[1]</sup>,是我国南方省区常用中药,主要用于治疗风湿性关节炎,跌打损伤,牙痛,胃痛,毒蛇咬伤等<sup>[2]</sup>。两面针的化学成分主要有生物碱类、木脂素类、苯丙素类,黄酮类等<sup>[3-5]</sup>,苯并菲啶类生物碱具有较强的生长抑制、抗肿瘤<sup>[6-7]</sup>、解痉镇痛<sup>[8]</sup>、抗菌<sup>[9]</sup>等活性,其中氯化两面针碱是《中国药典》2010 年版规定检测成分<sup>[2]</sup>,并以根部为药用部位。目前,有关两面针药材中氯化两面针碱含量测定的报道较多<sup>[10-11]</sup>,但系统研究栽培两面针药材不同生长期、不同部位氯化两面针碱含量的动态累积的报道较少<sup>[12-13]</sup>。为了更合理地开发利用栽培两面针药材资源,本实验在广西柳州两面针集团邕宁两面针 GAP 种植基地内随机收集不同栽培年次(3,4 年)全年不同月份,不同部位(根、茎、枝)的两面针药材,采用超快速液相色谱技术(UPLC-DAD)检测氯化两面针碱含量,6.0 min 内完成一次色谱分析,方法准确、快捷、重复性好。通过系统比较栽培两面针药材中氯化两面针碱含量动态累积规律,为确定两面针最佳采收期及全株植物的药用价值提供参考。

## 1 材料

**1.1 样品** 两面针药材采摘自广西柳州两面针集团邕宁市那马镇锦亮村两面针 GAP 栽培基地,分别于 2010,2011 年全年每隔 1 月采用随机方法进行取样。取样时将植株连根挖起,将泥土冲洗干净,去除叶子部分,然后将其分为根、茎、枝条 3 部分,在阴凉处阴干、粉碎,备用。

**1.2 仪器及试剂** Dionex UltiMate 3000 RSLC-DAD 超快速液相色谱仪;色谱龙色谱数据处理软件;SATORIOS CP225D 型 1/10 万电子分析天平(德国);SB-5200D 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);氯化两面针碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110848-200507),提取用甲醇为分析纯(广州光华化学试剂公司);分析用甲醇为色谱纯(FISHER,美国);超纯水(Milli-Q 超纯水系统,美国)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Acquity BEH 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),流动相乙腈-水(含 0.1% 三乙胺和 0.1% 磷酸,pH 4.5)(29:71)等度洗脱,流速 0.2 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 272 nm,进样量 0.5 μL,柱温

25 °C。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取对照品氯化两面针碱 9.50 mg,置于 50 mL 量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得到 0.19 g·L<sup>-1</sup>对照品储备液,4 °C 保存。

**2.3 供试品溶液的制备** 准确称取两面针药材粗粉约 2.0 g,置 100 mL 锥形瓶中,加入 7:1 000 盐酸-甲醇溶液 70 mL,超声提取 45 min,冷却,过滤,滤液浓缩后转移至 50 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀后,过 0.22 μm 微孔滤膜,进样 0.5 μL 测定。色谱图见图 1。

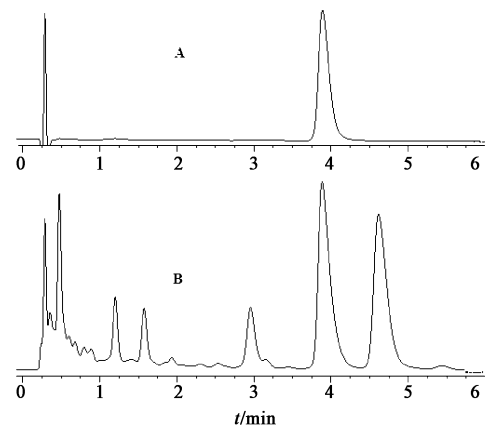


图 1 氯化两面针碱对照品(A)和供试品(B)UPLC 色谱

**2.4 线性关系考察及检测限、定量限** 取 2.2 项下的对照品溶液,分别吸取 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 μL,每个体积进样 2 次,以进样质量(ng)为横坐标,峰面积(Area)为纵坐标,得到回归方程  $Y = -0.5177 + 0.3247X$  ( $R^2 = 0.9999$ ),结果表明氯化两面针碱在 19.00 ~ 97.00 ng 线性关系良好。

分别稀释 2.2 项下氯化两面针碱对照品溶液,在 2.1 色谱条件下进样测定。以吸收信号为噪音信号 3 倍(S/N = 3)的量(ng)确定为检测限(LOD),吸收信号为噪音信号 10 倍(S/N = 10)的量(ng)为定量限(LOQ)。结果氯化两面针碱的检测限为 0.78 ng;定量限为 1.16 ng。

**2.5 稳定性试验** 取同一份两面针样品粉末供试品溶液,按照 2.3 项下方法制备供试品溶液,在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 分别进样分析,根据含量计算 RSD 1.58%,结果表明样品在 12 h 内稳定。

**2.6 精密度考察** 取同一份样品溶液,连续进样 5 次,每次进样 0.5 μL,根据 5 次测定的含量,得氯化两面针碱的 RSD 2.52%,表明精密度良好。

**2.7 重复性试验** 精密称取同一编号的两面针样品粉末 5 份,每份 2.0 g,按照 2.3 项下方法制备 5

份供试品溶液,每个供试品溶液进样2次,根据含量计算RSD为1.85%,表明方法重复性良好。

**2.8 回收率试验** 称取已知含量的两面针样品(采收日期:2010-01-15;氯化两面针碱0.172%)6份,分别加入一定量的氯化两面针碱对照品,按照2.3项下方法制备供试溶液,按上述色谱条件进样测定并计算加样回收率及其RSD。结果见表1。

表1 氯化两面针碱加样回收率考察

称样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
2.00	3.44	1.50	4.91	98.00	99.43	1.18
1.99	3.42	1.50	4.93	100.67		
3.41	3.00	6.44	101.00			
3.43	3.00	6.41	99.33			
3.42	4.50	7.86	98.67			
3.45	4.50	7.90	98.89			

**2.9 样品测定** 取不同来源的样品各2份,按照2.3项下方法制备供试品溶液,以2.1项的色谱条件进行测定,以外标法计算含量。不同采集时间及不同部位的栽培两面针样品中氯化两面针碱含量检测结果见表2,3。

表2 三年生栽培两面针根部氯化两面针碱

含量动态累积变化(n=2) %

采收日期	氯化两面针碱	采收日期	氯化两面针碱
2010-01-15	0.172	2010-07-14	0.154
2010-02-20	0.181	2010-08-13	0.192
2010-03-14	0.169	2010-09-16	0.228
2010-04-17	0.156	2010-10-15	0.255
2010-05-15	0.177	2010-11-15	0.223
2010-06-17	0.118	2010-12-17	0.165

结果表明,两面针根、茎、枝不同部位氯化两面针碱含量差异较大,大小依次为根>茎>枝条;不同部位、不同生长期两面针药材中氯化两面针碱含量动态累积呈规律性变化,其中10~11月份含量最高,6月份含量最低,见图2,3。

### 3 讨论

**3.1 色谱条件优化** 尝试了不同的色谱柱,包括Venusil ASB C<sub>18</sub>(4.6 mm×150 mm, 3.0 μm), Acquity BEH C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), Acclaim® UPLC PA2(2.1 mm×100 mm, 2.2 μm),最后在Acquity BEH C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)(图1)上获得最好的基线分离效果及最短的分

表3 四年生栽培两面针不同部位氯化两面针碱含量动态累积变化(n=2) %

采收日期	氯化两面针碱		
	根部	茎部	枝条
2011-01-14	0.181	0.113	0.092
2011-02-19	0.192	0.152	0.102
2011-03-13	0.185	0.154	0.149
2011-04-17	0.181	0.143	0.098
2011-05-16	0.257	0.196	0.149
2011-06-14	0.133	0.118	0.094
2011-07-18	0.167	0.101	0.098
2011-08-20	0.221	0.120	0.098
2011-09-17	0.195	0.110	0.091
2011-10-14	0.287	0.172	0.111
2011-11-18	0.231	0.225	0.128
2011-12-16	0.171	0.155	0.113

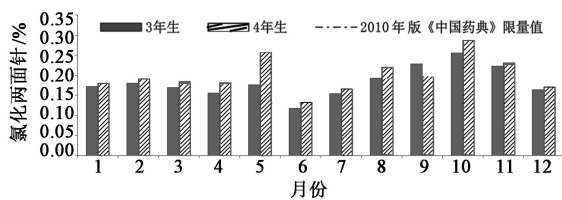


图2 不同栽培年次及月份两面针药材根部氯化两面针碱含量

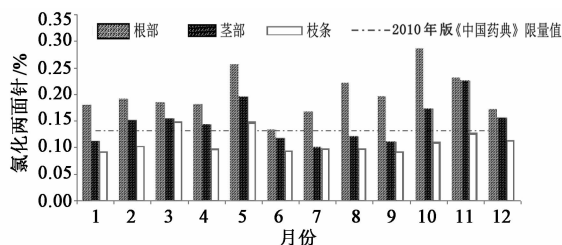


图3 四年生栽培两面针药材不同部位不同季节氯化两面针碱含量

析时间。考察了不同流动相(甲醇,乙腈,不同浓度的磷酸溶液及不同浓度的三乙胺溶液),最终选择乙腈-水(含0.1%三乙胺和0.1%磷酸,pH约为4.5)为流动相,以获得更好的峰形,并确定最佳流速为0.4 mL·min<sup>-1</sup>。

**3.2 提取条件的优化** 对样品提取时间、提取溶剂、提取方法、提取溶剂体积、提取时间、提取次数等参数进行优化。提取溶剂考察主要包括甲醇、乙醇以及不同浓度的盐酸-甲醇溶液,通过比较氯化两面针碱的提取效率,最后确定7:1 000盐酸甲醇溶液为两面针氯化两面针碱的提取溶剂。提取方法考察包括索氏提取及超声提取,结果表明超声提取方法更简便、效率更高,最后选择超声提取作为样品的提

取方法。对提取时间的考察结果表明超声提取 45 min 是最佳提取时间,同时还对提取溶剂体积,提取次数进行考察,确定最佳提取溶剂体积为 70 mL,提取次数为 1 次。综合各因素,最后确定 2.3 项下两面针药材供试品制备方法。

**3.3 两面针药材氯化两面针碱动态累积规律** 实验样品采集自广西邕宁市那马镇锦亮村两面针 GAP 栽培基地,采用随机取样方法,样品具有代表性。两面针药材不同部位中氯化两面针碱含量差异较大,其中根部含量最高,茎部次之,枝条含量最低。根部、茎部有效成分随生长时间变化较明显,变化规律大致相似,其中 6 月含量最低,随后逐渐上升,至 10 月出现最大值,再缓慢下降,12 月至次年 4 月期间含量无明显变化,5 月出现明显高峰,至 6 月下降至最低。因此,7 月至 10 月是两面针有效成分累积的重要时期,氯化两面针碱含量呈上升趋势,不同生长年次的两面针药材中氯化两面针碱也呈规律上升,说明氯化两面针碱累积与两面针生长呈正相关。2010 年版《中国药典》规定两面针的药用部位为根部,从研究结果可见,3 年生两面针药材的根部,除 6 月以外,其他月份氯化两面针碱含量均已达到《中国药典》标准(0.13%),其中以 10 月份含量最高,达 0.255%;4 年生两面针药材根部中氯化两面针碱含量全年各季节均达到药典标准,茎部在 2~5 月,10~12 月期间含量亦达到药典标准,而枝条中氯化两面针碱含量大部分未达到标准。因此,依据氯化两面针碱含量变化情况,建议两面针最佳采收期在栽培第 3 年的 10~11 月份,药用部位为根部。

#### [参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 上册[M]. 上海:上海人

民出版社,1977:40.

- [2] 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,2010:157.
- [3] 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):1689.
- [4] 沈建伟,张晓峰,彭树林,等. 两面针中的化学成分[J]. 天然产物研究与开发,2005,17(1):33.
- [5] 杨国红. 两面针的化学成分和飞龙掌血酮内酯的晶体结构[J]. 中草药,2009,40(S1):93.
- [6] 黄慧琳,刘华钢,蒙怡,等. 氯化两面针碱和羟基喜树碱对斑马鱼胚胎发育的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):238.
- [7] 胡润生. 两面针根部生物碱有抗癌作用[J]. 国外药讯,1996(4):34.
- [8] 曾雪瑜,陈学芬,何兴全,等. 两面针结晶-8 的解痉和镇痛作用研究[J]. 药学报,1982,17(4):253.
- [9] 杨仓良. 毒药本草[M]. 北京:中国中医药出版社,1983:431.
- [10] 陈均,段更利,黄建明. 反相高交流相色谱法测定两面针霜剂和生药两面针中氯华针碱的含量[J]. 复旦学报:医学科学版,2001,28(5):554.
- [11] 梁广华,张建浩. 两面针中乙氧基白屈菜红碱和氯化两面针碱的测定[J]. 中药材,2005,28(6):898.
- [12] 刘华钢,黄秋洁,赖茂祥. HPLC 法测定不同生长期两面针药材中氯化两面针碱[J]. 中草药,2007,38(10):1576.
- [13] 谈英,仰铁锤,韩正洲,等. 高效液相色谱法测定两面针不同药用部位氯化两面针碱的含量[J]. 广州中医药大学学报,2011,28(2):188.

[责任编辑 邹晓翠]