

一测多评法同时测定两面针中 5 种成分

乔丽娅¹, 胡凤云¹, 沈卓², 黄宝优¹, 夏祥华^{1,3*}, 张占江^{1*}
(1. 广西壮族自治区药用植物园, 广西南宁 530023; 2. 广东省农业科学院蔬菜研究所, 广东广州 510640; 3. 中国科学院高能物理研究所, 北京 100049)

摘要: **目的** 建立一测多评法同时测定两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. 中木兰花碱、橙皮苷、盐酸血根碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱的含量。**方法** 两面针 70% 甲醇提取物的分析采用 Agilent Eclipse C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 20% 乙腈-0.1% 甲酸-三乙胺; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 273、284 nm; 以氯化两面针碱为内标, 计算其他 4 种成分的相对校正因子, 测定含量。**结果** 5 种成分在各自范围内线性关系良好 ($r>0.999\ 6$), 平均加样回收率 97.93%~99.98%, RSD 0.82%~1.43%。一测多评法所得结果与外标法接近。**结论** 该方法准确稳定, 重复性好, 可用于两面针的质量控制。

关键词: 两面针; 化学成分; 一测多评法

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2021)07-1794-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.07.021

Simultaneous determination of five constituents in *Zanthoxylum nitidum* by QAMS

QIAO Li-ya¹, HU Feng-yun¹, SHEN Zhuo², HUANG Bao-you¹, XIA Xiang-hua^{1,3*}, ZHANG Zhan-jiang^{1*}

(1. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China; 2. Vegetable Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; 3. Institute of High Energy Physics Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

ABSTRACT: AIM To establish a quantitative analysis of multi-components by single mark (QAMS) method for the simultaneous content determination of magnoflorine, hesperidin, sanguinarine hydrochloride, nitidine, chelerythrine in *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC.. **METHODS** The analysis of 70% methanol extract of *Z. nitidum* was performed on a 30 ℃ thermostatic Agilent Eclipse C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of 20% acetonitrile-0.1% methane acid triethylamine flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 273, 284 nm. With nitidine as an internal standard, the relative correction factors of the other four constituents were calculated, followed by the determination of their contents. **RESULTS** Five constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r>0.999\ 6$), whose average recoveries were 97.93%–99.98% with the RSDs of 0.82%–1.43%. The results obtained by QAMS approximated those obtained by external standard method. **CONCLUSION** This accurate, stable and reproducible method can be used for the quality control of *Z. nitidum*.

KEY WORDS: *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC.; chemical constituents; multi-components by single marker (QAMS)

收稿日期: 2020-09-23
基金项目: 广西科技基地和人才专项 (桂科 AD1850002); 中央本级重大增减支项目 (2060302-1906-24)
作者简介: 乔丽娅 (1987—), 女, 硕士, 助理研究员, 从事中药材质量控制研究。Tel: (0771) 2443050, E-mail: 422703886@qq.com
* 通信作者: 夏祥华 (1978—), 男, 博士, 高级工程师, 从事中药材质量和安全性评价研究。Tel: (0771) 2443020, E-mail: 3071084529@qq.com
张占江 (1976—), 男, 博士, 副研究员, 从事中药资源开发利用研究。Tel: (0771) 2443020, E-mail: 176594625@qq.com

两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. 为芸香科花椒属木质藤本植物，根部入药^[1]，主要分布于我国两广、贵州、云南、福建等亚热带季风气候地区^[2]，富含多种生物碱类、黄酮类等活性成分^[3]，具有抗炎、抗氧化、抗癌、保护心血管系统等作用^[4-6]。虽然对两面针成分分析已有报道^[7-9]，但主流的 HPLC 法需要所有成分作为对照品，而盐酸血根碱、白屈菜红碱、橙皮苷、木兰花碱分离纯化难度大，不易获得，对照品价格昂贵，从而限制了该方法在实际生产和检测中的应用。

一测多评法^[10-11]是利用中药有效成分之间的外标内在函数和比例关系，通过测定一种成分而实现多种成分的同步测定，具有成本低、方法简便等特点，在中药材多指标质量评价中具有一定的优势^[11-12]。本实验采用该方法，以含量高、便宜易得的氯化两面针碱为内标，计算其他 4 种成分的相对校正因子，测定其含量，以期为该药材质量控制提供新思路。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 Infinity 型高效液相色谱仪（四元泵、自动进样器、二极管阵列检测器、柱温箱，美国安捷伦公司）；Cary 50 型紫外分光光度计（美国 Varian 公司）；KQ5200E 型超声波清洗仪（昆山市超声仪器有限公司）；CP225D 型电子分析天平（十万分之一，德国 Sartorius 公司）。

1.2 试剂 盐酸血根碱（批号 510001-201101，纯度 99.3%）、氯化两面针碱（批号 110848-200603，纯度 99.2%）、白屈菜红碱（批号 111718-201402，纯度 80.5%）对照品均购自中国食品药品检定研究院；橙皮苷对照品（批号 160406，纯度 98.0%）购自北京博艺汇科生物技术有限公司；木兰花碱对照品（批号 P11A10L85442，纯度 98.0%）购自上海源叶生物科技有限公司。甲醇、乙腈均为色谱纯（美国赛默飞世尔科技有限公司）。

1.3 药材 12 批两面针经广西药用植物园标本馆黄宝优高级工程师鉴定为两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. 的根，信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Eclipse C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相 20% 乙腈- 0.1% 甲酸(三乙胺调节 pH 至 4.5)；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 273、284 nm；进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取各对照品适量，

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	来源	采集时间
Z1	广西苍梧县	2019. 10
Z2	广西龙州县	2019. 10
Z3	广西兴业县	2019. 10
Z4	广西靖西县	2019. 11
Z5	广西东兰县	2019. 11
Z6	广西巴马县	2019. 11
Z7	广西隆安县	2019. 11
Z8	广西那坡县	2019. 12
Z9	广西环江县	2019. 12
Z10	广西武鸣区	2019. 12
Z11	广西恭城县	2019. 12
Z12	广西平南县	2019. 12

70% 甲醇溶解并定容至 25 mL，制成不同质量浓度贮备液（氯化两面针碱 0.045 6 mg/mL、木兰花碱 0.193 3 mg/mL、橙皮苷 0.195 6 mg/mL、盐酸血根碱 0.050 0 mg/mL、白屈菜红碱 0.147 2 mg/mL），置于 4 ℃ 冰箱中保存备用。精密量取 1 mL，70% 甲醇定容至 2、5、10、25 mL，即得。

2.2.2 供试品溶液 精密称定样品粉末（粒径 ≤ 0.5 mm）1.0 g，置于具塞锥形瓶中，70% 甲醇超声提取 30 min，重复 3 次（料液比 1：6），合并提取液，乙醇定容至 50 mL 量瓶中，0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.3 系统适用性考察 吸取“2.2.1”项下对照品溶液适量，在“2.1”项色谱条件下进样，结果见图 1。由此表明，理论塔板数以木兰花碱、橙皮苷、盐酸血根碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱峰计，分别为 23 611、27 270、20 760、41 923、50 087，分离度均大于 1.5，各基线分离良好。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 吸取“2.2.1”项下对照品溶液适量，在“2.1”项色谱条件下进样。以质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，结果见表 2，表明各成分在各自范围内线性关系良好。

表 2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ (μg·mL ⁻¹)
木兰花碱	<i>Y</i> = 20 717 <i>X</i> + 14. 686 9	0. 999 8	7. 7~193. 3
橙皮苷	<i>Y</i> = 11 667 <i>X</i> + 7. 627 3	0. 999 8	7. 8~195. 6
盐酸血根碱	<i>Y</i> = 47 687 <i>X</i> - 3. 063 7	0. 999 6	2. 0~50. 0
氯化两面针碱	<i>Y</i> = 56 676 <i>X</i> + 1. 337 9	0. 999 7	1. 8~45. 6
白屈菜红碱	<i>Y</i> = 74 383 <i>X</i> + 33. 050 1	0. 999 7	5. 9~147. 2

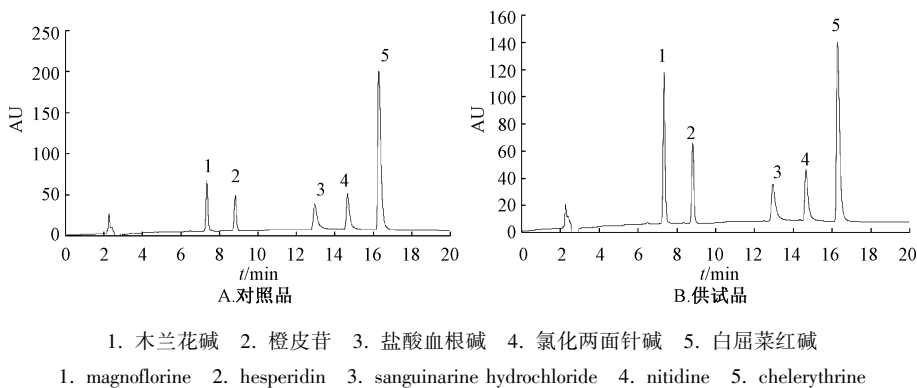


图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.4.2 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样 5 次，测得木兰花碱、橙皮苷、盐酸血根碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱峰面积 RSD 分别为 0.45%、0.21%、0.63%、0.33%、0.29%，表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液，于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样，测得木兰花碱、橙皮苷、盐酸血根碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱峰面积 RSD 分别为 1.29%、0.98%、1.27%、1.08%、0.83%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 精密称取同一批供试品（Z2）粉末 6 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样，测得木兰花碱、橙皮苷、盐酸血根碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱含量 RSD 分别为 1.48%、2.24%、1.43%、1.32%、2.36%，表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取同一批供试品（Z2），按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样，计算回收率，结果见表 3。

2.5 一测多评

2.5.1 相对校正因子计算 采用多点校正法计算相对校正因子 (f_{vc})^[13]，取平均值，公式为 $f_{\text{vc}} = f_{\text{x}} / f_{\text{c}} = (M_{\text{c}} \times A_{\text{x}}) / (M_{\text{x}} \times A_{\text{c}})$ ，其中 M_{c} 为内参物质量浓度， A_{x} 为待测组分的峰面积， M_{x} 为待测组分的质量， A_{c} 为内参物峰面积。吸取“2.2.1”项下对照品溶液适量，在“2.1”项色谱条件下测定，由于氯化两面针碱较易获得，价格低廉，而且在样品中的含量较高，故选择其作为内标，计算木兰花碱、橙皮苷、盐酸血根碱、白屈菜红碱的 f_{vc} ，

结果见表 4，表明均有良好的重复性。

2.5.2 重复性试验 选择 Shimadzu WondaCract ODS-2、Tianhe Kromasil C₁₈、Phenomenex Luna C₁₈、Dalian Elite hypersil BDS C₁₈、Agilent Zorbax SB-aq C₁₈ 色谱柱，计算相对校正因子，结果见表 5，可知该方法能满足定量分析要求。

2.6 含量测定结果比较 精密称取 12 批样品适量，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算含量，结果见表 6，通过配对 t 检验^[13] 分析其差值，发现 2 种方法下各成分含量均无明显差异。

3 讨论

2015 年版《中国药典》中，两面针质量评价只测定了氯化两面针碱含量。本实验参照文献 [14-15] 测定 5 种成分含量，可用于该药材质量控制。

参照 2015 年版《中国药典》氯化两面针碱的测定方法，分别以不同体积比例的乙醇和甲醇为提取溶剂。结果表明，70% 甲醇、无水甲醇中提取效率较高，由于前者成本更低，因此选用其作为提取溶剂。

比较甲醇-0.1% 甲酸、甲醇-0.1% 甲酸-三乙胺 (pH 4.5)、乙腈-0.1% 甲酸、乙腈-0.1% 甲酸-三乙胺 (pH 4.5)，发现乙腈-0.1% 甲酸、乙腈-0.1% 甲酸-三乙胺 (pH 4.5) 作为流动相时供试品峰形较好。由于三乙胺与 SiO⁻ 作用力更强，可降低生物碱吸附，抑制峰拖尾，减少损伤色谱柱，故最终以乙腈-0.1% 甲酸-三乙胺 (pH 4.5) 为流动相。

采用二极管阵列 PDA 检测器对 5 种成分进行全波长扫描分析，结果表明木兰花碱、橙皮苷的最大吸收波长在 284 nm 处，而盐酸血根碱、氯化两面针碱、白屈菜红碱在 273 nm 处。

本研究分别采用一测多评和外标法对 12 个产

表 3 各成分加样回收率试验结果 (n=9)

Tab. 3 Results of recovery tests for various constituents (n=9)

成分	称样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
木兰花碱	0.500 8	0.089 1	0.071 4	0.157 1	97.86	99.10	0.82
	0.500 2	0.089 0	0.071 4	0.158 1	98.54		
	0.500 4	0.089 1	0.071 4	0.157 2	97.96		
	0.500 6	0.089 1	0.089 4	0.177 2	99.24		
	0.500 1	0.089 0	0.089 4	0.177 6	99.52		
	0.500 7	0.089 1	0.089 4	0.176 9	99.06		
	0.500 2	0.089 0	0.106 4	0.195 0	99.79		
	0.500 0	0.089 0	0.106 4	0.195 0	99.81		
	0.499 9	0.089 0	0.106 4	0.195 5	100.08		
橙皮苷	0.500 3	2.837 2	2.269 0	5.240 7	102.63	99.94	1.43
	0.500 1	2.836 1	2.269 0	5.173 9	101.35		
	0.500 5	2.838 3	2.269 0	5.139 9	100.64		
	0.500 7	2.839 5	2.836 2	5.654 5	99.63		
	0.500 4	2.837 8	2.836 2	5.578 3	98.31		
	0.500 9	2.840 6	2.836 2	5.568 2	98.09		
	0.501 2	2.842 3	3.403 4	6.232 1	99.78		
	0.500 2	2.836 6	3.403 4	6.195 9	99.29		
	0.501 5	2.844 0	3.403 4	6.231 9	99.75		
盐酸血根碱	0.501 6	0.008 5	0.006 8	0.014 9	97.21	97.93	1.43
	0.501 2	0.008 5	0.006 8	0.015 2	99.21		
	0.500 9	0.008 5	0.006 8	0.015 0	97.94		
	0.500 4	0.008 5	0.008 5	0.016 7	98.20		
	0.500 1	0.008 5	0.008 5	0.017 0	99.99		
	0.500 6	0.008 5	0.008 5	0.016 7	98.18		
	0.501 1	0.008 5	0.010 2	0.018 5	98.83		
	0.500 6	0.008 5	0.010 2	0.018 0	96.20		
	0.500 9	0.008 5	0.010 2	0.017 9	95.64		
氯化两面针碱	0.500 5	0.520 0	0.415 9	0.929 1	99.27	99.98	0.79
	0.500 8	0.520 3	0.415 9	0.932 4	99.59		
	0.500 9	0.520 4	0.415 9	0.932 2	99.56		
	0.500 0	0.519 5	0.519 8	1.027 4	98.85		
	0.500 2	0.519 7	0.519 8	1.032 8	99.35		
	0.500 1	0.519 6	0.519 8	1.034 3	99.51		
	0.500 6	0.520 1	0.623 8	1.155 7	101.03		
	0.500 3	0.519 8	0.623 8	1.156 2	101.10		
	0.500 3	0.519 8	0.623 8	1.161 2	101.54		
白屈菜红碱	0.501 0	0.227 5	0.184 0	0.408 4	99.26	99.72	1.22
	0.500 8	0.227 4	0.184 0	0.409 9	99.64		
	0.501 2	0.227 5	0.184 0	0.409 3	99.45		
	0.500 8	0.227 4	0.228 2	0.455 4	99.97		
	0.501 3	0.227 6	0.228 2	0.464 9	102.01		
	0.500 9	0.227 4	0.228 2	0.458 6	100.67		
	0.499 8	0.226 9	0.272 3	0.486 7	97.49		
	0.500 1	0.227 0	0.272 3	0.498 3	99.79		
	0.500 2	0.227 1	0.272 3	0.495 2	99.16		

表 4 各成分相对校正因子

Tab. 4 Relative correlation factors of various constituents

序号	f_m/f_1 (木兰花碱)	f_c/f_1 (橙皮苷)	f_y/f_1 (盐酸血根碱)	f_b/f_1 (白屈菜红碱)
1	0.366	0.206	0.841	1.316
2	0.368	0.207	0.836	1.317
3	0.374	0.211	0.833	1.335
4	0.381	0.215	0.821	1.354
5	0.375	0.206	0.835	1.351
平均值	0.373	0.209	0.833	1.335
RSD/%	1.60	1.88	0.89	1.35

表 5 不同色谱柱对相对校正因子的影响

Tab. 5 Effects of different columns on relative correction factors

色谱柱	f_m/f_1 (木兰花碱)	f_e/f_1 (橙皮苷)	f_y/f_1 (盐酸血根碱)	f_b/f_1 (白屈菜红碱)
Shimadzu WondaCract ODS-2	0.382	0.202	0.821	1.295
Tianhe Kromasil C ₁₈	0.376	0.211	0.833	1.341
Phenomenex Luna C ₁₈	0.387	0.215	0.824	1.310
Dalian Elite hypersil BDS C ₁₈	0.368	0.212	0.831	1.274
Agilent Zorbax SB-aq C ₁₈	0.365	0.208	0.814	1.284
平均值	0.376	0.210	0.825	1.301
RSD/%	2.46	2.35	0.93	2.01

注:内标为氯化两面针碱。

表 6 一测多评法和外标法所得结果比较 (mg/g)

Tab. 6 Comparison of results obtained by QAMS method and external standard method (mg/g)

编号	氯化两面针碱	木兰花碱		橙皮苷		盐酸血根碱		白屈菜红碱	
	内标	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法
Z1	0.020	0.540	0.537	5.541	5.544	0.015	0.016	0.021	0.020
Z2	1.039	0.143	0.141	5.663	5.663	0.018	0.019	0.428	0.426
Z3	0.236	0.296	0.298	4.237	4.233	0.732	0.734	0.262	0.259
Z4	2.470	1.419	1.422	6.624	6.618	0.481	0.478	0.696	0.692
Z5	2.896	0.837	0.836	4.002	3.998	0.571	0.567	0.127	0.129
Z6	3.521	1.116	1.119	5.469	5.472	0.662	0.657	1.108	1.112
Z7	0.043	0.142	0.145	4.817	4.821	0.083	0.082	0.173	0.175
Z8	0.751	1.753	1.749	3.292	3.296	0.169	0.171	0.471	0.474
Z9	0.351	0.032	0.034	2.689	2.692	0.339	0.338	0.576	0.573
Z10	1.766	2.719	2.716	5.784	5.779	0.296	0.299	0.785	0.785
Z11	2.169	1.005	1.003	6.889	6.896	0.807	0.811	0.941	0.944
Z12	3.578	1.944	1.943	6.785	6.782	0.608	0.611	0.733	0.734

地的两面针进行含量测定，发现所得结果的相对偏差均小于 3%，证明一测多评法能准确测定该药材中 5 种成分的含量。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[2] 彭招华, 吴孟华, 谢志坚, 等. 两面针野生资源现状调查[J]. 今日药学, 2018, 28(7): 500-504.

[3] 李艳芝, 王慧云. 两面针化学成分及其药理活性研究进展[J]. 中国药房, 2013, 24(18): 2966-2968.

[4] Cai Z, Hong M, Xu L, *et al.* Prevent action of magnoflorine with hyaluronic acid gel from cartilage degeneration in anterior cruciate ligament transection induced osteoarthritis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 109733.

[5] Lu Q, Li C L, Wu G S. Insight into the inhibitory effects of *Zanthoxylum nitidum* against *Helicobacter pylori* urease and jack bean urease: Kinetics and mechanism[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249: 112419.

[6] 秦泽慧, 陈炜璇, 李茹柳, 等. 两面针根和茎抗胃炎、保护胃黏膜和改善胃肠运动功能的作用比较研究[J]. 中药材, 2016, 39(1): 164-169.

[7] 孙 科, 陈 冉, 陆世惠. 双波长 HPLC 法同时测定两面针

药材中 5 种成分的含量[J]. 中国药房, 2017, 28(3): 393-396.

[8] 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): 18-20.

[9] 郑娟梅, 韦文俊, 雷欣潮, 等. 基于 FTIR 技术和 HPLC 法的广西不同石山地区两面针化学成分比较分析[J]. 中国药房, 2011, 22(19): 1785-1788.

[10] 秦昆明, 杨 冰, 胡 静, 等. 一测多评法在中药多组分质量控制中的应用现状与思考[J]. 中草药, 2018, 49(3): 725-731.

[11] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925-1928.

[12] 王 欣, 覃 瑶, 王德江, 等. 一测多评法在中药质量控制中的应用进展[J]. 中成药, 2016, 38(2): 395-402.

[13] 匡艳辉. 一测多评在黄连、人参中的应用研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2009.

[14] 孙 科, 陈 冉, 陆世惠. 双波长 HPLC 法同时测定两面针药材中 5 种成分的含量[J]. 中国药房, 2017, 28(3): 393-396.

[15] 黄 琪, 雷 鹏, 李秀杰, 等. 两面针与毛两面针药材中 5 种化学成分的比较研究[J]. 中国药科大学学报, 2012, 43(2): 154-158.