

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.01.014

高效液相色谱法和紫外-可见分光光度法测定竹叶花椒中2种主要成分的含量*

齐景梁^{1,2}, 高必兴^{1,2}, 周娟¹, 苟琰^{1,2}, 耿昭¹, 姜卫东^{1△}, 陈茜²

(1. 四川省食品药品检验检测院·国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 四川 成都 611731;
2. 成都中医药大学, 四川 成都 611137)

摘要:目的 建立测定竹叶花椒中羟基- α -山椒素和羟基- β -山椒素含量的高效液相色谱法和紫外-可见分光光度法。方法 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Kromasil 100-5 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-水(40:60, V/V), 检测波长为 270 nm, 流速为 1 mL/min, 进样量为 10 μ L, 测定羟基- α -山椒素和羟基- β -山椒素的总含量; 采用紫外-可见分光光度法, 以羟基- α -山椒素为对照品, 于 270 nm 波长处测定酰胺类物质的总量。结果 高效液相色谱法中, 羟基- α -山椒素和羟基- β -山椒素进样量分别在 0.079 11~3.955 50 μ g 和 0.009 5~0.473 6 μ g 范围内与峰面积线性关系良好; 平均加样回收率分别为 97.28% 和 98.90%, RSD 分别为 1.79% 和 1.56% (n=6); 紫外-可见分光光度法中, 羟基- α -山椒素质量浓度在 0.791 0~7.910 0 μ g/mL 范围内与吸光度线性关系良好, 平均加样回收率为 95.84%, RSD 为 0.78% (n=6)。结论 所建立的含量测定方法准确、可靠, 可用于竹叶花椒药材质量的控制。

关键词: 竹叶花椒; 高效液相色谱法; 紫外-可见分光光度法; 羟基- α -山椒素; 羟基- β -山椒素; 含量

中图分类号: R932; R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)01-0052-05

Content Determination of Two Main Components in *Zanthoxyli Armati Pericarpium* by HPLC and Ultraviolet-Visible Spectrophotometry

QI Jingliang^{1,2}, GAO Bixing^{1,2}, ZHOU Juan¹, GOU Yan^{1,2}, GENG Zhao¹, JIANG Weidong¹, CHEN Xi²

(1. Sichuan Institute for Food and Drug Control·National Medical Products Administration Key Laboratory of Quality Evaluation of Chinese Patent Medicines, Chengdu, Sichuan, China 611731; 2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan, China 611137)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) and ultraviolet-visible spectrophotometry method for content determination of hydroxy- α -sanshool and hydroxy- β -sanshool in *Zanthoxyli Armati Pericarpium*. **Methods** HPLC method was used to determine the total content of hydroxy- α -sanshool and hydroxy- β -sanshool, the chromatographic column was Kromasil 100-5 C₁₈ column(250 mm×6 mm, 5 μ m), the mobile phase was acetonitrile-water(40:60, V/V), the detection wavelength was 270 nm, the flow rate was 1 mL/min, and the injection volume was 10 mL. The total content of acylamides was determined at 270 nm wavelength by ultraviolet-visible spectrophotometry with hydroxy- α -sanshool as the control. **Results** In the HPLC method, the hydroxy- α -sanshool and hydroxy- β -sanshool showed a good linear relationship with the peak area in the ranges of 0.079 11~3.955 50 μ g and 0.009 5~0.473 6 μ g, respectively. The average recoveries were 97.28% and 98.90%, and the RSDs were 1.79% and 1.56%, respectively (n=6). In the ultraviolet-visible spectrophotometry method, hydroxy- α -sanshool showed a good linear relationship with the absorbances in the range of 0.791 0~7.910 0 μ g/mL, the average recovery was 95.84%, and the RSD was 0.78% (n=6).

Conclusion The methods are accurate and reliable, which can be used for the quality control of *Zanthoxyli Armati Pericarpium*.

Key words: *Zanthoxyli Armati Pericarpium*; HPLC; ultraviolet-visible spectrophotometry; hydroxy- α -sanshool; hydroxy- β -sanshool; content

竹叶花椒来源于芸香科花椒属植物竹叶花椒 *Zanthoxylum armatum* DC. 的干燥成熟果皮, 主要分布于我国西南、华南、华东和华中地区^[1-2], 四川地区常称其为“藤椒”, 具有较长的药用历史, 常作民间药用或在部分地区作花椒用。竹叶花椒在《本草纲目》《证类本草》《植物名实图考》等古代本草中均有记载^[3-4], 具有温中止痛、杀虫止痒之功效, 用于治疗脘腹冷痛、呕吐泄泻、虫积腹痛, 外治湿疹瘙痒^[5-6]。现代研究表明, 竹叶花椒主要含有挥发油、酰胺类物质、生物碱、黄酮等成分, 具有抑菌、抗炎、杀虫、麻醉、镇痛、调节糖脂代谢紊乱、保护胃肠道等功效^[7-10]。

其中, 酰胺类物质是竹叶花椒产生麻味的物质基础, 又以山椒素类物质如羟基- α -山椒素、羟基- β -山椒素为代表^[11-12], 具有广泛的生物活性^[13-15]。目前, 部分省市的地方中药材标准如 2009 年版《湖南省中药材标准》、1999 年版《广西中药材标准》、2003 年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》等均收载有竹叶花椒, 但由于制订时间较早, 标准较简单, 缺乏含量控制项, 不能很好地控制其质量^[16-18]。本研究中, 分别采用高效液相色谱法和紫外-可见分光光度法测定竹叶花椒中羟基- α -山椒素和羟基- β -山椒素的含量, 为完善竹叶花

*基金项目: 四川省中医药管理局科学技术研究专项[2018YY002]; 四川省科技计划项目[2018SZ0064]。

第一作者: 齐景梁, 男, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为中药质量评价与中药质量标准, (电话)028-87877141(电子信箱) qijingl@126.com。

△通信作者: 姜卫东, 男, 大学本科, 主任药师, 研究方向为药品检验与药品质量控制, (电话)028-87877181(电子信箱)JWD-322@163.com。

椒药材质量标准提供科学依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

XP205 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司,精度为 0.01 mg);e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);TU-1901 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);HU-20500D 型超声波清洗仪(天津市恒奥科技发展有限公司,功率为 400W,频率为 40kHz)。

1.2 试剂

羟基- α -山椒素(批号为 RP181113),羟基- β -山椒素(批号为 RP180508),均购自成都麦德生科技有限公司,规格为每支 20 mg,纯度 $\geq 98.00\%$;乙腈(赛默飞世尔科技有限公司,色谱纯);甲醇(成都科隆化学品有限公司,分析纯);水为超纯水;20 批竹叶花椒样品产地见表 1,经四川省食品药品检验检测院黎跃成主任中药师鉴定为正品。

表 1 样品产地信息

Tab. 1 Origin information of samples

样品编号	产地	样品编号	产地
ST-1	三台县芦溪镇	YY-1	盐源县平川镇
ST-2	三台县芦溪镇	YY-2	盐源县平川镇
ST-3	三台县芦溪镇	YY-3	盐源县平川镇
ST-4	三台县潼川镇	FS-1	富顺县怀德镇
ST-5	三台县潼川镇	FS-2	富顺县怀德镇
ST-6	三台县潼川镇	FS-3	富顺县怀德镇
JY-1	金阳县木府乡	HY-1	洪雅县洪川镇
JY-2	金阳县木府乡	HY-2	洪雅县洪川镇
JY-3	金阳县木府乡	HY-3	洪雅县洪川镇
JY-4	金阳县木府乡	HY-4	洪雅县洪川镇

2 方法与结果

2.1 高效液相色谱法

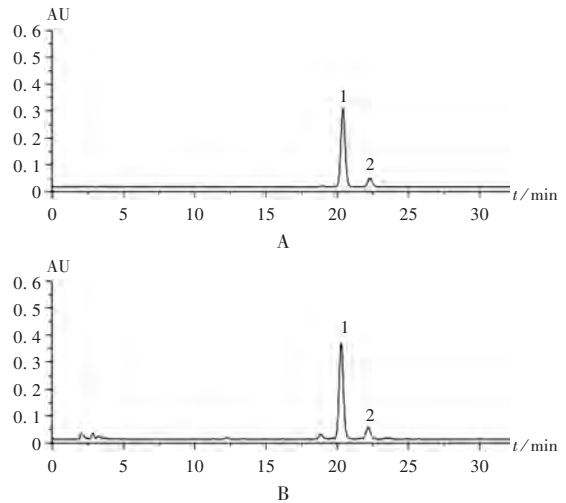
2.1.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Kromasil 100-5 C₁₈ 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-水(40:60, V/V);流速:1 mL/min;柱温:30 $^{\circ}$ C;检测波长:270 nm。分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 10 μ L,注入高效液相色谱仪,按拟订色谱条件进样测定,目标色谱峰与邻近峰均达到完全分离(分离度大于 1.5)。羟基- α -山椒素和羟基- β -山椒素理论板数均在 20 000 以上。色谱图见图 1。

2.1.2 溶液制备

对照品溶液:分别精密称取羟基- α -山椒素对照品和羟基- β -山椒素对照品适量,置棕色容量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 含羟基- α -山椒素 79.11 μ g、羟基- β -山椒素 9.471 μ g 的溶液,即得。

供试品溶液:取供试品粉末(过 3 号筛)约 0.3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减



1. 羟基- α -山椒素 2. 羟基- β -山椒素
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. hydroxy- α -sanshool 2. hydroxy- β -sanshool

A. Reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 10 mL,置 25 mL 棕色容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 方法学考察

线性关系考察:精密量取 2.1.2 项下对照品溶液 10, 20, 50 μ L,稀释 2 倍、10 倍后的对照品溶液各 10 μ L 分别注入液相色谱仪,测定峰面积,并以峰面积(Y)为纵坐标、进样量(X, μ g)为横坐标进行线性回归,得回归方程,羟基- α -山椒素为 $Y_1 = 8397.76X_1 + 135685.15$ ($r_1 = 1.00$),羟基- β -山椒素为 $Y_2 = 8893.16X_2 - 18858.23$ ($r_2 = 1.00$)。羟基- α -山椒素与羟基- β -山椒素进样量分别在 0.079 11 ~ 3.955 50 μ g 和 0.009 5 ~ 0.473 6 μ g 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取 2.1.2 项下对照品溶液,连续进样 6 次,记录峰面积。结果羟基- α -山椒素、羟基- β -山椒素峰面积的 RSD 分别为 0.42% 和 0.67% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一样品(编号为 HY-4),平行制备 6 份供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果羟基- α -山椒素、羟基- β -山椒素含量的 RSD 分别为 0.50% 和 0.65% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一样品(编号为 HY-4),依法制备供试品溶液,室温下保存,分别于 0, 2, 4, 8, 12 h 时测定。结果羟基- α -山椒素、羟基- β -山椒素含量的 RSD 分别为 0.74% 和 1.13% ($n = 6$),表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

加样回收试验:取 6 份已知含量的样品(编号为 HY-4)粉末(过 3 号筛)0.15 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别

表2 高效液相色谱法加样回收试验结果 ($n=6$)

Tab. 2 Results of recovery test by HPLC ($n=6$)

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
0.1567	5.184	0.544	4.513	0.592	9.574	1.128	97.27	98.65				
0.1561	5.165	0.542	4.513	0.592	9.607	1.133	98.43	99.83				
0.1533	5.072	0.532	4.513	0.592	9.438	1.114	96.74	98.31	97.28	98.90	1.79	1.56
0.1553	5.138	0.539	4.513	0.592	9.511	1.122	96.90	98.48				
0.1534	5.075	0.532	4.513	0.592	9.344	1.105	94.59	96.79				
0.1549	5.125	0.537	4.513	0.592	9.627	1.137	99.76	101.35				

注:A为羟基- α -山椒素,B为羟基- β -山椒素。表3同。

Note:A is hydroxy- α -sanshool,B is hydroxy- β -sanshool,as well as Tab. 3.

精密加入与样品中的量相当的羟基- α -山椒素对照品和羟基- β -山椒素对照品,按2.1.2项方法制备供试品溶液,进样测定,计算回收率。结果见表2。

耐用性试验:取同一样品(编号为HY-4),分别考察Kromasil 100-5 C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), Thermo Hypersil GOLD C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), Waters Xbridge C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)。结果不同色谱柱测得羟基- α -山椒素含量的RSD为0.25%,羟基- β -山椒素含量的RSD为1.04%,表明方法耐用性良好。

2.1.4 样品含量测定

取20批样品,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果见表3。

表3 高效液相色谱法含量测定结果(%, $n=3$)

Tab. 3 Results of content determination by HPLC(%, $n=3$)

样品编号	A	B	总含量	样品编号	A	B	总含量
ST-1	5.730	0.730	6.460	YY-1	8.239	0.257	8.496
ST-2	5.932	0.754	6.686	YY-2	8.191	0.256	8.447
ST-3	5.609	0.726	6.335	YY-3	8.407	0.261	8.668
ST-4	5.796	0.752	6.548	FS-1	2.179	0.241	2.420
ST-5	6.156	0.579	6.735	FS-2	2.860	0.277	3.137
ST-6	6.161	0.659	6.820	FS-3	2.987	0.289	3.276
JY-1	6.608	0.453	7.061	HY-1	3.554	0.375	3.929
JY-2	6.550	0.451	7.001	HY-2	3.548	0.374	3.922
JY-3	7.371	0.423	7.794	HY-3	3.575	0.369	3.944
JY-4	7.398	0.424	7.822	HY-4	3.608	0.377	3.985

2.2 紫外-可见分光光度法

2.2.1 检测波长选择

在紫外-可见分光光度计下分别对羟基- α -山椒素对照品溶液、供试品溶液进行光谱扫描。结果,供试品溶液与羟基- α -山椒素对照品溶液吸收光谱一致,且均于270 nm波长处有最大吸收,故选择270 nm作为检测波长。

2.2.2 溶液制备

对照品溶液:精密称取羟基- α -山椒素对照品适

量,置棕色容量瓶中,加甲醇制成每1 mL含羟基- α -山椒素15.82 μ g的溶液,即得。

供试品溶液:取供试品粉末(过3号筛)约0.3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,称定质量,超声处理30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液10 mL,置25 mL容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,再精密量取0.3 mL,置10 mL棕色容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 方法学考察

线性关系考察:精密量取对照品溶液0.5,1,2,3,5 mL,置10 mL容量瓶中,分别加甲醇至刻度,摇匀,以甲醇为空白对照,照紫外-可见分光光度法(2015年版《中国药典(四部)》通则0401),于270 nm波长处测定吸光度,以吸光度(Y)为纵坐标、质量浓度(X)为横坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y=0.166X-0.003$, $r=1.00$ 。结果羟基- α -山椒素质量浓度在0.7910~7.9100 μ g/mL范围内与吸光度线性关系良好。

精密度试验:精密吸取2.2.2项下对照品溶液2 mL,置10 mL容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,以甲醇为空白对照,于270 nm波长处测定吸光度,连续测定6次。结果的RSD为0.23% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一样品(编号为HY-4),平行制备6份供试品溶液,依法进样测定。结果6份样品含量的RSD为0.29% ($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一样品(编号为HY-4),依法制备供试品溶液,分别于0,2,4,8,12 h时进样测定。结果的RSD为0.45% ($n=6$),表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

加样回收试验:取6份已知含量的样品(编号为HY-4)粉末(过3号筛)0.15 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入羟基- α -山椒素对照品溶液(每1 mL含羟基- α -山椒素0.1960 mg)25 mL,再精密加入甲醇25 mL,称定质量,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,依法进样测定,计算回收率。结果见表4。

表4 紫外-可见分光光度法加样回收试验结果(n=6)

Tab. 4 Results of recovery test by ultraviolet-visible spectrophotometry (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(%)
0.1551	7.064	4.900	11.824	97.14	95.84	0.78
0.1514	6.896	4.900	11.598	95.96		
0.1519	6.919	4.900	11.573	94.98		
0.1553	7.074	4.900	11.773	95.90		
0.1516	6.905	4.900	11.573	95.27		
0.1549	7.055	4.900	11.748	95.78		

2.2.4 样品含量测定

取20批样品,依法制备供试品溶液,按拟订方法进行测定。结果见表5。

表5 紫外-可见分光光度法含量测定结果(%, n=3)

Tab. 5 Results of content determination by ultraviolet-visible spectrophotometry (% , n = 3)

样品编号	含量	样品编号	含量
ST-1	8.207	YY-1	9.859
ST-2	8.468	YY-2	10.004
ST-3	7.921	YY-3	10.399
ST-4	8.220	FS-1	3.699
ST-5	8.479	FS-2	4.240
ST-6	8.540	FS-3	4.330
JY-1	8.891	HY-1	4.895
JY-2	8.469	HY-2	4.897
JY-3	9.342	HY-3	5.132
JY-4	9.283	HY-4	4.976

3 讨论

本研究中参考花椒及作为食品的藤椒、藤椒油含量测定的相关研究^[19-22],建立了基于高效液相色谱法和紫外-可见分光光度法的竹叶花椒含量的测定方法。羟基- α -山椒素在特定条件下会转化为同分异构体羟基- β -山椒素^[23],本研究中建立的高效液相色谱法同时测定羟基- α -山椒素、羟基- β -山椒素,以二者的总含量进行评价,可避免因同分异构体转化而产生的误差。另外,酰胺类物质是竹叶花椒中的一类链状不饱和脂肪酸成分,除羟基- α -山椒素、羟基- β -山椒素外,竹叶花椒中还可能存在其他结构类似的酰胺类物质^[24],故建立了紫外-可见分光光度法测定酰胺类物质总量的方法。曾考察供试品溶液的提取方法(超声提取、回流提取)、提取溶剂(水、乙醇、甲醇)及提取时间(10,30,45,60 min)。最终,确定甲醇超声提取30 min作为供试品溶液的制备方法。高效液相色谱法和紫外-可见分光光度法含量测定方法中的供试品前处理相同,制备同一份供试品溶液可供2种方法使用,符合检验经济学的要求。

本研究主要针对竹叶花椒中的麻味物质进行质量

控制,但竹叶花椒中还含有挥发性香味物质。采用气相色谱-质谱联用方法分析鲜竹叶花椒果实中的挥发性物质,含量最高成分的是芳樟醇、柠檬烯、桉树脑等^[25-27]。对于挥发性物质可否作为指标成分对竹叶花椒药材进行质量控制及如何控制,需进一步开展系统研究。

参考文献

- [1] 《中国高等植物彩色图鉴》编委会. 中国高等植物彩色图鉴(第4卷)[M]. 北京:科学出版社,2016:467.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第43卷第2册)[M]. 北京:科学出版社,1997:43.
- [3] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草(第4册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:3793.
- [4] 徐国钧,徐璐珊,王铮涛. 常用中药材品种整理与质量研究(南方协作组第三册)[M]. 福州:福建科学技术出版社,1999:533.
- [5] 南京中医药大学. 中药大辞典(第二版·上册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:3244.
- [6] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(第二版·下册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1996:249.
- [7] 王永平,牛君侠,银航,等. 竹叶花椒研究进展[J]. 陕西林业科技,2019,47(5):102-107.
- [8] NOOREEN Z, TANDON S, YADAV NP, et al. Zanthoxylum: A Review of its Traditional Uses, Naturally Occurring Constituents and Pharmacological Properties[J]. Current Organic Chemistry, 2019,23(12):1307-1341.
- [9] 祝磊,陈茜,黎江华,等. 不同藤椒商品风味成分的分析研究[J]. 中国调味品,2019,44(1):141-146.
- [10] 李娟,张学顺,傅春升. 中药抗菌作用的研究进展[J]. 中国药业,2014,23(2):90-93.
- [11] KOO JY, JANG Y, CHO H, et al. Hydroxy- α -sanshool activates TRPV1 and TRPA1 in sensory neurons[J]. European Journal of Neuroscience, 2007,26(5):1139-1147.
- [12] SCINOB KUROKI, NOBUHIRO HAGURA, SHIN'YA NISHIDA, et al. Sanshool on The Fingertip Interferes with Vibration Detection in a Rapidly-Adapting (RA) Tactile Channel[J]. PLoS One, 2016,11(12):1-12.
- [13] 李焰梅,郝丹,蒋献. 山椒素药理学研究进展[J]. 中国药理学通报,2019,35(2):172-175.
- [14] KUBOTA K, OHTAKE N, OHBUCHI K, et al. Hydroxy- α -sanshool induces colonic motor activity in rat proximal colon: a possible involvement of KCNK9[J]. American Journal of Physiology. Gastrointestinal Liver Physiology, 2015, 308(7): G579-G590.
- [15] TIAN JM, WANG Y, XU YZ, et al. Characterization of isobutylhydroxyamides with NGF-potentiating activity from Zanthoxylum bungeanum[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2016,26(2):338-342.
- [16] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准:1990年版[M]. 南宁:广西科学技术出版社,1992:45-46.
- [17] 湖南省食品药品监督管理局. 湖南省中药材标准(2009年