

## 薄层扫描法测定毛两面针三种生物碱的含量

欧阳熙林<sup>1</sup>, 欧尚瑶<sup>1</sup>, 王朝阳<sup>2</sup>, 张晓璞<sup>1</sup>, 罗朝晖<sup>1</sup>, 王恒山<sup>1\*</sup>

(1. 广西师范大学 化学化工学院, 广西 桂林 541004; 2. 温州市进出口检验检疫局, 浙江 温州 325028)

**摘要:** 从广西大瑶山产毛两面针中提取到了鹅掌楸碱(I)、白屈菜红碱(II)、氯化两面针碱(III)三种生物碱,用薄层扫描法(TLCS)同时测定其含量,并与玉林、百色两面针中的同种生物碱进行对比。研究表明,毛两面针和两面针均含II、III,在毛两面针还能检测到I的存在,其含量为0.00957%。

**关键词:** 薄层扫描法; 毛两面针; 两面针; 鹅掌楸碱; 白屈菜红碱; 氯化两面针碱

中图分类号: Q946.88 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2010)05-0710-03

## Determination of three alkaloids of *Zanthoxylum nitidum* var. *fastuosum* using TLCS

OUYANG Xi-Lin<sup>1</sup>, OU Shang-Yao<sup>1</sup>, WANG Chao-Yang<sup>2</sup>,  
ZHANG Xiao-Pu<sup>1</sup>, LUO Zhao-Hui<sup>1</sup>, WANG Heng-Shan<sup>1\*</sup>

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China; 2. Zhejiang Import and Export Commodities Inspection Corporation Wenzhou Branch, Wenzhou 325028, China)

**Abstract:** Three alkaloids were isolated from *Z. nitidum* var. *fastuosum* of Dayao Mountain and their structures were characterized as Liriodenine (I), Chelerythrine (II) and Nitidine chloride (III). Their contents were determined by TLCS and compared with *Z. nitidum* from Yulin and Baise in Guangxi. The result showed that both II and III were found in *Z. nitidum* var. *fastuosum* and *Z. nitidum*. Furthermore, I was detected in *Z. nitidum* var. *fastuosum*, with a content of 0.00957%.

**Key words:** TLCS; *Z. nitidum* var. *fastuosum*; *Z. nitidum*; Liriodenine; Chelerythrine; Nitidine chloride

两面针(*Zanthoxylum nitidum*)又名蔓椒、入地金牛、两背针,属于芸香科花椒属植物,广泛分布于我国广西、广东、云南、台湾等南方省份。两面针最早以蔓椒之名记载于《神农本草经》:“蔓椒味苦,性温,主治风寒湿痹,历节痛,除四肢厥气、膝痛”。其可用于治疗胃痛、牙痛、风湿骨痛、神经痛、毒蛇咬伤等多种痛症,也可外用治疗烫伤。两面针中含有的氯化两面针碱、白屈菜红碱等多种生物碱是主要活性成分。赖茂祥等(1992)用薄层—紫外分光光度

法测定两面针碱的含量。近年来,有些学者采用HPLC对两面针中氯化两面针碱、L-芝麻脂素或其它生物碱等活性成分的含量测定(刘绍华等,2005; Liang等,2006)。而薄层扫描法(TLCS)仅见组方中含两面针的药物其它组分的活性成分测定(莫少红等,2003)。虽然HPLC测定化合物含量的检出限很低,在重现性和精密度性优于TCLCS,但TCLCS运用较HPLC早,普及程度高,作为一种成熟的定量方法,具有快捷,方便,投入成本低等优点,中国药

收稿日期: 2009-03-09 修回日期: 2010-02-17

基金项目: 国家科技支撑计划(2006BAI06A18-14); 药用资源化学与药物分子工程广西(教育部)重点实验室资助课题(桂科能 0630006-5D09); 桂林市科学研究与技术开发项目(20090106-4)[Supported by Key Technologies R&D Program(2006BAI06A18-14); Key Laboratory of Medicinal Chemical Resources and Molecular Engineering, Guangxi Normal University, China(0630006-5D09); Scientific Research and Technology Development Program of Guilin City(20090106-4)]

作者简介: 欧阳熙林(1972-),男,江西兴国人,硕士,(E-mail)oyxl-xg@163.com。

\*通讯作者(Author for correspondence, E-mail: hshwang2002@126.com)

典仍以使用 TCLS 测定两面针植物中两面针碱的含量做为标准,附录 VI B 也把薄层扫描法作为一种含量测定继续保留收录(国家药典委员会,2005)。

毛两面针(*Z. nitidum* var. *fastuosum*)为两面针的变种,两者在形态、组织特征无明显区别(孙小文等,1996),化学成分很少文献报道(王恒山等,2006),生物碱含量测定未见报道。本文介绍了从广西大瑶山毛两面针中分离到鹅掌楸碱、白屈菜红碱和氯化两面针碱,用 TCLS 法对三种生物碱进行了定量检测。

## 1 实验部分

### 1.1 材料

毛两面针采自柳州地区的大瑶山,玉林两面针采自容县十里乡,百色两面针购于德保县城药材市场,经广西师范大学生命科学学院唐绍清教授鉴定。鹅掌楸碱、白屈菜红碱和氯化两面针碱标准品均课题组提取,核磁共振数据鉴定结构。Dragendorff 试剂按文献(肖崇厚等,2002)自制,除工业酒精外,其余试剂均为国产分析纯试剂。GF254 预制硅胶板为青岛海洋化工厂生产。

### 1.2 仪器

RE-52AA 旋转蒸发仪;DZF-150 型数显小型真空干燥箱;日本岛津 CS-9000 型双波长薄层扫描仪;WRS-1A 数字熔点仪;瑞士 Bruker 公司 500MHz 超导核磁共振波谱仪。

### 1.3 生物碱的提取与纯化

取毛两面针全草干药材 500 g,60 °C 时用 75% 工业酒精回流三次,每次 3 h,合并提取液,旋干回收酒精,残渣用水溶成悬浮液,氯仿萃取,水洗氯仿液,氯仿萃取液浓缩至 25 mL,用 10% 的盐酸溶液萃取(3×20 mL),盐酸液用稀氨水调 pH=10,氯仿萃取(5×20 mL),水洗氯仿液,回收氯仿,残留物经硅胶柱色谱和重结晶反复纯化,得化合物 I (36.5 mg)、化合物 II (305 mg)、III (487 mg)。

### 1.4 化合物的结构鉴定

化合物 I 黄色针晶(氯仿),mp. 280~281 °C,Dragendorff 试剂显橘红色,FAB-MS  $m/z$ : 276 [M+H]<sup>+</sup>,<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 500MHz): δ. 9.0 (1H, d, J = 5.16 Hz), 8.59(2H, dd, J = 1.25, 1.16 Hz), 7.76(2H, dd, J = 5.15, 1.07 Hz), 7.59(1H, d, J = 7.96 Hz), 7.20(1H, s), 6.39(2H, s); <sup>13</sup>C NMR(125MHz):

δ182.4, 151.7, 147.9, 145.5, 145.0, 135.7, 133.9, 132.9, 131.4, 128.8, 128.6, 127.4, 124.2, 123.3, 108.2, 103.3, 102.4。<sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 数据与鹅掌楸碱的数据一致(宋晓凯等,2002),这是我们首次从毛两面针植物中分离到该化合物(欧尚瑶,2005)。

化合物 II 黄色针晶,mp. 206~208 °C,Dragendorff 试剂显橘红色,<sup>1</sup>H NMR(CD<sub>3</sub>OD, 500MHz), 10.0 (1H, s), 8.74(1H, d, J = 9.25), 8.73(1H, d, J = 8.9), 8.29(1H, d, J = 8.6), 8.27(1H, s), 8.23(1H, d, J = 4.25), 7.62(1H, s), 6.30(2H, s), 5.03(3H, s), 4.31(3H, s), 4.17(3H, s), <sup>13</sup>C NMR(CD<sub>3</sub>OD, 125MHz), 150.7, 150.4, 149.6, 149.4, 146.2, 133.0, 131.3, 128.9, 126.1, 125.8, 124.3, 120.5, 119.6, 118.5, 118.2, 105.7, 103.7, 102.9, 61.4, 56.2, 51.5。<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 数据与氯化白屈菜红碱的波谱数据一致(Radek 等,1999)。II 鉴定为氯化白屈菜红碱。

化合物 III 黄色粉末,mp. 281~283 °C,<sup>1</sup>H NMR(CD<sub>3</sub>OD, 500MHz), 9.67(1H, s), 8.77(1H, d, J = 8.9 Hz), 8.31(1H, d, J = 8.9 Hz), 8.26(1H, s), 8.23(1H, s), 7.85(1H, s), 7.62(1H, s), 6.30(2H, s), 4.97(3H, s), 4.30(3H, s), 4.13(3H, s)。<sup>1</sup>H NMR 数据与氯化两面针碱波谱数据一致(崔天义等,1994)。III 鉴定为氯化两面针碱。

### 1.5 毛两面针和两面针生物碱的含量测定

1.5.1 标准品溶液的制备 准确称取 I、II、III 标准品各 0.3 mg,用甲醇溶解并定容于 10 mL 容量瓶中,备用(避光保存)。

1.5.2 样品液制备 分别准确称取毛两面针和容县、百色两面针根部各 2 g,30 mL 无水乙醇回流 3 次,每次 3 h,过滤后合并滤液,旋转蒸干乙醇。残渣用甲醇溶解,定容于 25 mL 容量瓶中,从中量取 2 mL 溶液定容于 10 mL 容量瓶,得样品溶液。

1.5.3 实验条件 薄层色谱条件:由于三种生物碱的极性差别大,故采用两次展开法。点样于硅胶高效板,以展开剂氯仿-甲醇(30:1)先将 I 与 II 分开,然后以展开剂氯仿-甲醇(15:1)将 III 上行展开,展距 10 cm。薄层扫描条件:采用反射式锯齿扫描, SX = 7,狭缝 1.2×1.2 mm,纸速 20 mm/min,灵敏度中等。各标准品测定波长:λ<sub>I</sub> = 410 nm, λ<sub>II</sub> = 400 nm, λ<sub>III</sub> = 310 nm。

1.5.4 标准曲线的绘制 分别将 I、II、III 标准品溶液 1、2、4、6、8、10 μL 点于三块高效板上,展开,晾

干,定位,扫描测定。结果在点样量范围内点样量与斑点吸收度峰面积呈良好的线性关系,其回归方程分别为 I:  $y=8713.2x+6366.8, r=0.9845$ ; II:  $y=5442.5x+268.49, r=0.9832$ ; III:  $y=67250x+135.32, r=0.9944$ 。

1.5.5 实验方法考察 (1)精密测定:在同一薄层板上点6个相同量的标准品,依法测定峰面积,其RSD% $<5\%$ ,说明精密测定较好(表1)。(2)稳定性试验:使用精密度的分析用量,三种标准品I、II、III经薄层分离、显色后,从薄层板在层析缸中取出算起,每隔1h重复扫描一次,以测定峰面积对时间做图,得各标准样品在薄层板上的稳定曲线。结果表明: I、II、III在6h内基本稳定,各标准品对应的RSD%分别为2.43%、2.57%、1.43%。在不同薄层板上测定同一样品,结果相近。(3)回收率测定:精密称取5份同一样品,4份中准确加入标准样品,一份为对照,按与样品测定的方法进行测定,测定的平均回收率为105.0%(表2)。

表1 精密测定实验结果(%)( $n=6$ )  
Table 1 The experiment result of precision

生物碱 Alkaloid	点样体积 Volume of point sample ( $\mu\text{L}$ )	峰面积 Peak area ( $\bar{x}\pm\text{SD}$ )	RSD (%)
I	2	24 195.52 $\pm$ 614.56	2.54
II	2	12 078.33 $\pm$ 339.40	2.81
III	1	68 451.62 $\pm$ 1129.44	1.65

表2 回收率实验结果( $n=5$ )  
Table 2 Result of recycle rate

生物碱 Alkaloid	变异系数 Coefficient of variance (%)	回收率 Percent recovery ( $\bar{x}\pm\text{SD}$ )(%)	RSD (%)
I	2.11	101.4 $\pm$ 2.6	1.26
II	1.71	107.8 $\pm$ 8.3	2.74
III	1.15	105.0 $\pm$ 3.1	1.35

1.5.6 样品测定 分别吸取三种标准液2、2、1  $\mu\text{L}$ 及样品液3  $\mu\text{L}$ 于同一块薄层板上,氯仿-甲醇(15:1)展开,展距7cm,用上述方法扫描斑点面积,计算相应生物碱含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 毛两面针和两面针生物碱的含量测定结果

表3是毛两面针和两面针中三种生物碱I、II、III的定量检测结果。由表可知:毛两面针和两面针中都检测到两面针碱和白屈菜红碱,三产地的样品

中氯化两面针碱与白屈菜红碱均以玉林两面针含量为最高,分别达到0.0974%和0.103%。毛两面针中还能检测到鹅掌楸碱,其含量为0.00957%。

表3 毛两面针和两面针中三种生物碱的含量  
Table 3 Three alkaloids' contents of *Z. nitidum*  
var. *fastuosum* and *Z. nitidum*

生物碱(%) Alkaloid	1(玉林容县 两面针)	2 (百色两面针)	3 (毛两面针)
I	—	—	0.00957
II	0.103	0.0559	0.0418
III	0.0974	0.0726	0.0465

### 2.2 结语

在对于缺乏标准品的中草药的质量标准制订中,如何建立稳定、简便、可靠的方法非常重要。本实验从毛两面针中提取的三种生物碱作为标准品,研究了广西不同产地的毛两面针和两面针植物中两面针碱、白屈菜红碱和鹅掌楸碱的含量,为两面针的质量控制标准的建立提供了一种方法。

与张守尧等(2001)和刘绍华等(2005)的研究报道一样,在测定两面针植物中两面针碱的含量中,也低于药典规定的0.25%[按两面针碱( $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{NO}_4$ )计算],是地域、季节因素所致还是有其它的原因需进一步研究,也说明在控制两面针的药材质量标准上仍亟待加强。

### 参考文献:

- 孙小文,段志兴. 1996. 花椒属药用植物研究进展[J]. 药理学报,31(3):231-240
- 肖崇厚,等. 2002. 中药化学[M]. 上海:上海科学技术出版社:598
- 国家药典委员会. 2005. 中华人民共和国药典·一部[M]. 北京:化学工业出版社:116-117
- 欧尚瑶. 2005. 广西两面针植物化学成分研究[D]. 广西桂林:广西师范大学
- 崔天义,朱卫,李贞,等. 1994. 巴山花椒根的化学成分研究[J]. 武汉植物学研究,12(4):371-374
- 赖茂祥,刘布鸣,蒋瑾华,等. 1992. 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[J]. 中国中药杂志,17(9):554-555
- Liang MJ, Zhang WD, Hu J, et al. 2006. Simultaneous analysis of alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* by high performance liquid chromatography-diode array detector-electrospray tandem mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 42(2):178-183
- Liu SH(刘绍华), Qin QY(覃青云), Fang K(方堃), et al. 2005. The determination of nitidine chloride and L-sesamin of *Zanthoxylum nitidum* growing in ten areas of Guangxi(广西十个不同产地的两面针中活性成分的分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), 25(6):591-595
- Mo SH(莫少红), Chen XJ(陈晓军), Qin LJ(覃柳娟). 2003. (下转第 695 页 Continue on page 695)

到 83%, 其中, 罗勒烯 37.3%、苧烯 9.03%、对-伞花烯 8.10%、 $\beta$ -月桂烯 7.79%、 $\beta$ -反-罗勒烯 4.08%、对-孟-1-烯 4.00%。倍半萜类含量约为 3.29%, 其中  $\beta$ -金合欢烯为 1.22%。从表 2 看出, 水中乙醚萃取物的含氧化合物种类较多, 其中  $\alpha$ -松油醇 6.13%、对-伞花烯 5.57%、D-苧烯 5.33%、6-甲基-3, 5-庚二烯-2-酮 4.44%、4-甲基-4-戊烯-2-酮 4.16%。比较表 1 和表 2 发现, 油层和水层乙醚萃取物被鉴定为相同成分有 29 个, 被鉴定相同成分中的相对含量为: 油层 76.9%, 水层仅为 67.84%。

### 3 讨论

珍稀濒危植物单性木兰种皮的挥发组分在水中有一定溶解度, 实验结果表明, 从水中回收挥发组分达到 20%(0.7/3.5), 因此, 用水蒸汽蒸馏法提取植物香料时应关注水溶性芳香组分。

值得关注的是含量高达 37.3% 的罗勒烯, 该化合物在其它木兰精油中没有被发现, 非常有利于进行组分分离。另外苧烯、对-伞花烯、 $\beta$ -月桂烯的含量都超过了 7%。而罗勒烯和月桂烯都是合成名贵香料芳樟醇、香叶醇、橙花醇、紫罗兰酮的原料, 因此, 木兰种皮精油的在香料领域有潜在的应用前景。

溶解于水的乙醚萃取物的含氧化合物种类较多, 而且成分的含量比油层含量增加原因是: 含氧化合物如醇、醛、酸等容易与水形成氢键, 在水中的溶解度增加, 因此用水蒸汽蒸馏法提取时, 溶解在水相中。如苯甲醛在水中有较高溶解度, 在油层中未检测到, 而在水中乙醚萃取物具有较高含量。又如  $\alpha$ -松油醇, 在精油层的含量仅为 0.95%, 而在乙醚萃

取物中的含量达到 6.13%。从化学成分和种类来看, 油层和水层的差别较大, 水层没有含量超过 7% 组分。

### 参考文献:

- Chen BH(陈炳华), Wang MC(王明兹), Liu JQ(刘剑秋). 2002. Chemical constituents of the volatile oil of *Parakmeria lotungensis* flower and its antibacterial activities *in vitro* (乐东拟单性木兰花部挥发油的化学成分及其抑菌活性)[J]. *Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), **20**(3): 229-232
- Cheng YX(程永现), Zhou J(周俊), Tan NH(谭宁华). 2001. The chemical constituents of *Parrkmeria yunnanensis* (云南拟单性木兰的化学成分)[J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **23**(3): 352-356
- Hao XY(郝小燕), Yu Z(余珍), Tian CG(田成国). 2000. A study of chemical constituents of the the essential oil of *Parrkmeria yunnanensis* (云南拟单性木兰精油化学成分的研究)[J]. *J Guizhou Norm Univ; Nat Sci Edi* (贵州师范大学学报·自然科学版), **18**(2): 17-18
- Lai JY(赖家业), Pan CL(潘春柳), Qin WG(覃文更), et al. 2007. Pollination ecology of rare and endangered species *Kmeria septentrionalis* (珍稀濒危植物单性木兰传粉生态学研究)[J]. *Guihaia* (广西植物), **27**(5): 736-740
- Xi YZ(席以珍), Zhang YL(张玉龙). 2000. A study of polle wall ultrastructure of *Kmeria septentrionalis* Dandy (单性木兰花粉壁超微结构的研究)[J]. *Bull Bot Res* (木本植物研究), **20**(4): 386-368
- Zhao TL(赵天林). 1994. Discovery of large areas and endangered species *Kmeria septentrionalis* Dandy in Huanjiang of Guangxi (广西环江县首次发现大面积珍稀濒危植物——单性木兰林)[J]. *Guihaia* (广西植物), **14**(2): 121
- Zhong RM(钟瑞敏), Zeng QX(曾庆孝), Zhang ZM(张振明), et al. 2006. Application of GC-MS combined with kovats retention indices to identify the composition of five Magnoliaceae species in the essential oils (气质联用结合保留指数对比在五种木兰科芳香精油成分鉴定中的应用)[J]. *J Instrumental Analysis* (分析测试学报), **25**(5): 16-20

(上接第 712 页 Continue from page 712)

- Study on quality standard for Shuanghuo Zhitong Tincture (双活止痛酊质量标准研究)[J]. *Chin Trad Pat Med* (中成药), **25**(8): 619-622
- Radek Marek, Jaromir Tousek, Jiri Dostal, et al. 1999.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR study of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids [J]. *Magn Reson Chem*, **37**: 781-787
- Song XK(宋晓凯), Wu LJ(吴立军), Tu PF(屠鹏飞). 2002. Studies on bioactive constituents in bark of *Tsoongi dendron odorm* (观光木树皮的生物活性成分研究)[J]. *Chin Trad*

- Herb Drugs* (中草药), **33**(8): 676-678
- Wang HS(王恒山), Ou SY(欧尚瑶), Pan YM(潘英明), et al. 2006. Essential oil from the hydrodistillation *Zanthoxylum nitidum* var. *fastuosum* (毛两面针挥发油化学成分)[J]. *Guihaia* (广西植物), **26**(1): 105-106
- Zhang SR(张守尧), Yao YF(姚育发), Liu CF(刘楚峰). 2001. Determination of nitidine in different parts of *Zanthoxylum nitidum* (不同部位两面针药材中两面针碱的含量测定)[J]. *J Chin Med Mat* (中药材), **24**(9): 649-650