



RP-HPLC 同时测定白鲜皮中 3 种活性成分的含量

杨晓娟, 刘艳芳, 鲍忠, 姜勇*, 屠鹏飞

(北京大学药学院天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京 100191)

[摘要] 目的: 建立同时测定白鲜皮中白鲜碱、黄柏酮和梣酮含量的反相高效液相色谱法, 为中药白鲜皮标准的制定提供依据。方法: 采用甲醇热回流提取, 以 Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 为固定相, 甲醇-水 (60:40) 为流动相, 检测波长 236 nm, 流速 1 mL · min⁻¹, 柱温为 25 °C。结果: 该 3 种成分分离良好, 线性范围依次为 0.002 1 ~ 0.106 0, 0.020 1 ~ 0.920 0 和 0.010 2 ~ 1.020 g · L⁻¹, 加样回收率分别为 100.5 %, 99.2 % 和 100.2 %。结论: 本方法操作简单、快捷、重现性好、准确率高, 可用于白鲜皮药材的质量控制。

[关键词] 白鲜皮; 梣酮; 白鲜碱; 黄柏酮; HPLC

白鲜皮为芸香科白鲜属植物白鲜 *Dictamnus dasycarpus* Turcz. 的干燥根皮, 具有清热解毒、祛风止痒等功效, 可用于治疗风热疮毒、皮肤瘙痒以及急性慢性黄疸症等^[1]。此外, 白鲜皮对皮肤化脓性溃疡、结核性脓胸和晚期肺癌也有一定的治疗效果^[2]。关于白鲜皮的质量控制方法, 2005 年版《中国药典》及有关文献仅对梣酮的含量进行了测定^[1,3], 此外, 还有关于白鲜碱定量的研究报道^[4-7]。然而, 近年来国内外研究表明, 白鲜皮中所含的有效成分除梣酮和白鲜碱外, 黄柏酮也具有较好的体外抗癌活性^[8-10]。并且, 在前期的研究过程中, 作者发现黄柏酮也为白鲜皮药材中的主要成分之一^[11]。因此, 为了更全面评价白鲜皮药材的质量, 本实验建立了 HPLC 同时测定白鲜皮中 3 种活性成分——梣酮、白鲜碱和黄柏酮含量的方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 二极管阵列检测器 (DAD), 四元低压梯度泵, 真空脱气机, 柱温箱, 自动进样器; 自动双重纯水蒸馏器 (SZ-II 型, 上海嘉鹏科技有限公司)。

白鲜碱、黄柏酮和梣酮对照品由本实验室自制, 其¹H-NMR, ¹³C-NMR 和 MS 数据与文献报道^[8,12-14]的白鲜碱、黄柏酮和梣酮相一致, 纯度经 HPLC 分

析, 大于 98 %。自制重蒸水 (乐百氏纯净水经自动双重纯水蒸馏器蒸馏所得); 色谱级甲醇 (天津市西华特种试剂厂)。

作者收集了不同产地白鲜皮药材共 18 批, 经北京大学药学院屠鹏飞教授鉴定, 为芸香科植物白鲜 *D. dasycarpus* 的干燥根皮。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil 100 Å C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 保护柱为 Phenomenex 100 C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 50 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (60:40), 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 236 nm; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL。在上述条件下, 白鲜碱、黄柏酮和梣酮的保留时间分别为 11.7, 12.8, 16.7 min, 无杂质干扰, 三者分离度良好 (图 1)。

2.2 溶液配制 对照品溶液: 精密称取白鲜碱、黄柏酮、梣酮对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 分别含梣酮 60 μg、白鲜碱 10 μg、黄柏酮 100 μg 的混合对照品溶液, 即得。

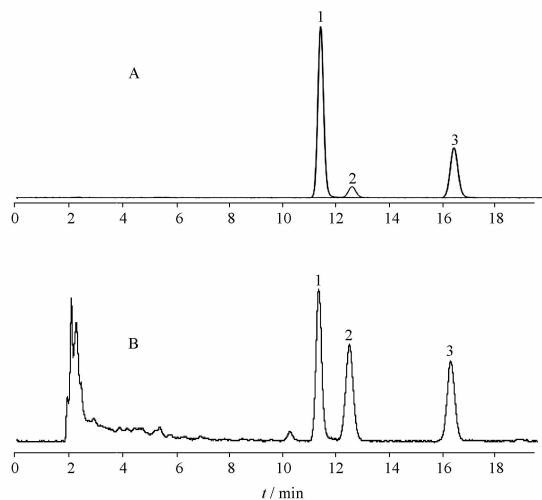
供试品溶液: 取白鲜皮中粉 (过 4 号筛) 约 1.0 g, 加甲醇 10 mL, 回流提取 1 h, 放冷, 滤至 25 mL 量瓶中, 用少量甲醇清洗滤渣及滤器 3 次, 合并滤液, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 线性关系考察 取白鲜碱、黄柏酮及梣酮对照品母液, 用甲醇依次稀释配制成系列浓度, 最终白鲜碱质量浓度分别为 0.002 1, 0.006 4, 0.010 6, 0.021 2, 0.063 6, 0.106 0 g · L⁻¹, 黄柏酮质量浓度分别为 0.020 1, 0.080 4, 0.100 5, 0.201 0, 0.251 3, 0.920 0 g · L⁻¹, 梣酮质量浓度分别 0.010 2, 0.020 4,

[收稿日期] 2009-07-01

[基金项目] 2010 年版《中国药典》品种修订—白鲜皮药材 (YZ-008-009)

[通信作者] * 姜勇, 副教授, 研究方向为天然活性成分及新药研究, Tel: (010)-82802719, E-mail: yongjiang@bjmu.edu.cn



A. 混合对照品; B. 白鲜皮样品; 1. 白鲜碱; 2. 黄柏酮; 3. 梣酮。

图1 对照品及样品 HPLC 图

0.040 8, 0.081 6, 0.102 0, 0.408 0, 1.020 g · L⁻¹。分别进样 10 μL, 以对照品质量浓度 X 对色谱峰面积 Y 做标准曲线, 得回归方程分别为: 白鲜碱 $Y = 148\ 599X - 62.14, r = 0.999\ 1 (n = 6)$; 黄柏酮 $Y = 5\ 374.6X - 15.227, r = 0.999\ 4 (n = 6)$; 梣酮 $Y = 20\ 686X + 71.577, r = 1.000 (n = 7)$ 。

2.4 精密度试验 取供试品溶液, 连续进样 6 次, 结果白鲜碱、黄柏酮及梣酮峰面积的 RSD 分别为 1.3%, 2.1% 和 0.77%, 表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 取供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 进行测定, 结果白鲜碱、黄柏酮及梣酮峰面积的 RSD 分别为 0.56%, 0.84% 和 0.55%, 表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.6 重复性试验 取同一批药材粉末 6 份, 按照供试品溶液的制备方法制备, 平行测定, 结果白鲜碱、黄柏酮及梣酮含量的 RSD 分别为 1.6%, 3.1% 和 2.6%, 表明方法重复性良好。

2.7 回收率试验 称取已知含量的药材粉末约 0.5 g, 共 6 份, 其中每份分别加入白鲜碱、黄柏酮及梣酮对照品溶液适量, 按照供试品溶液的制备方法制备, 含量测定方法测定。结果表明, 白鲜碱、黄柏酮及梣酮的回收率分别为 100.5%, 99.2%, 100.2%, RSD 分别为 3.7%, 2.7% 和 1.7%, 说明该方法准确率高(表 1)。

2.8 不同产地样品的含量测定 分别称取不同产地的药材粉末, 按照供试品溶液的制备方法操作, 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定, 即得(表 2)。

表1 白鲜碱、黄柏酮和梣酮的加样回收率 (n=6)

对照品	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
白鲜碱	0.499 4	0.089 9	0.084 0	0.171 5	97.1	100.5	3.7
	0.497 8	0.089 6	0.084 0	0.174 2	100.7		
	0.497 5	0.089 5	0.084 0	0.178 4	105.8		
	0.499 7	0.089 9	0.084 0	0.177 3	104.1		
	0.500 2	0.090 0	0.084 0	0.172 2	97.9		
	0.502 8	0.090 5	0.084 0	0.172 1	97.1		
黄柏酮	0.499 4	1.358	1.320	2.610	94.8	99.2	2.7
	0.497 8	1.354	1.320	2.654	98.5		
	0.497 5	1.353	1.320	2.684	100.8		
	0.499 7	1.359	1.320	2.694	101.2		
	0.500 2	1.360	1.320	2.651	97.8		
	0.502 8	1.367	1.320	2.714	102.0		
梣酮	0.499 4	0.464 1	0.634 0	1.092	99.1	100.2	1.7
	0.497 8	0.463 0	0.634 0	1.093	99.4		
	0.497 5	0.463 4	0.634 0	1.115	102.8		
	0.499 7	0.465 0	0.634 0	1.111	101.9		
	0.500 2	0.465 0	0.634 0	1.093	99.1		
	0.502 8	0.468 3	0.634 0	1.096	99.1		



表 2 不同产地药材中白鲜碱、黄柏酮和枞酮的含量测定结果($n=2$) %

药材产地	白鲜碱	黄柏酮	枞酮
河北邢台	0.023	0.291	0.136
黑龙江五常	0.029	0.382	0.211
湖南长沙	0.015	0.409	0.073
安徽合肥	0.020	0.321	0.097
陕西华县	0.055	0.809	0.222
山东济南-1	0.010	0.129	0.042
广东广州	0.011	0.207	0.049
四川成都	0.020	0.224	0.203
山东济南-2	0.034	0.398	0.356
江苏滨海	0.025	0.236	0.148
内蒙古-1	0.020	0.205	0.100
吉林长春-1	0.023	0.312	0.080
吉林长春-2	0.021	0.360	0.082
甘肃兰州	0.033	0.252	0.171
北京	0.019	0.388	0.123
内蒙古-2	0.025	0.245	0.191
东北牡丹江	0.016	0.383	0.093
吉林长春	0.015	0.322	0.100

3 讨论

3.1 色谱柱的选择 作者分别比较了 Kromasil 100 Å C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Phenomenex 100 Å C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 和 Polaris C₁₈-A (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 结果表明 Kromasil 100 Å C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 的分离度最好。考虑到目前国内 Kromasil 色谱柱的使用极其广泛, 因此选用了 Kromasil 100 Å C₁₈ 色谱柱。

3.2 检测波长的选择 作者分别对白鲜碱、黄柏酮和枞酮对照品的甲醇溶液进行了紫外扫描, 得到白鲜碱、黄柏酮和枞酮的最大吸收波长依次为 236, 212, 215 nm。应用 DAD 检测器, 作者分别在上述 3 个波长下对样品进行了检测。结果表明, 在 236 nm 下, 各色谱峰分离良好, 基线平稳, 且待测 3 种成分的峰面积接近; 而在 212 和 215 nm 下测定时, 3 个色谱峰的峰面积差异较大, 其中白鲜碱的峰面积明显减小。考虑到样品中白鲜碱的含量相对较低, 而黄柏酮和枞酮的含量相对较高, 为保证白鲜碱测定的灵敏度, 同时避免甲醇-水系统在末端波长处基线不易平衡的局限性, 最终确定检测波长为 236 nm。

3.3 药材的提取方法 文献报道采用超声提取 30 min^[15] 和 70 °C 回流提取 60 min^[3,5] 对白鲜皮中的白鲜碱和枞酮进行提取测定。作者以待测 3 种成分的含量为指标, 对这两种方法进行了考察, 结果表明

70 °C 回流提取效果较好。通过对比甲醇及 95% 乙醇的提取效果, 发现甲醇提取效果好于 95% 乙醇。关于提取溶剂的用量, 作者分别考察了甲醇分别为 5, 10, 15 mL 的提取效果, 结果表明溶剂用量对测定结果影响不大, 考虑到洗涤滤器和残渣的需要, 最后选择了 10 mL 甲醇作为提取溶剂。

上述测定结果表明, 黄柏酮在白鲜皮药材中的含量相对最高, 因此对其进行含量测定是非常必要的。通过对白鲜碱、枞酮和黄柏酮 3 种有效成分的同时测定, 可以对白鲜皮药材的质量进行有效控制。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005:72.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典. 上册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1998:737.
- [3] 朱丹妮,陈婷,余亚云. 高效液相色谱法测定白鲜皮中枞酮含量[J]. 中国药科大学学报,1998,29(4):319.
- [4] 朱丹妮,徐强,邱南生. 白鲜皮中白鲜碱含量测定[J]. 植物资源与环境,1998,7(2):61.
- [5] 李艳园,彭如习,陈桦,等. HPLC 法测定白鲜皮中白鲜碱的含量[J]. 中药材,2006,29(8):802.
- [6] 冉启琼,罗兰,朱丹妮. 白鲜皮质量标准研究[J]. 中医药学刊,2005,23(9):1585.
- [7] 杜程芳,屠鹏飞,常海涛. 白鲜皮的化学对照品研究[J]. 中国药品标准,2006,7(1):49.
- [8] 康胜利,王素贤,朱彦儒. 中药白鲜皮活性成分的研究[J]. 沈阳药科大学学报,1983,18(6):11.
- [9] Jung H,Sok D E,Kim Y,et al. Potentiating effect of obacunone from *Dictamnus dasycarpus* on cytotoxicity of microtubule inhibitors, vincristine, vinblastine and taxol[J]. *Planta Med*,2000,66(1):74.
- [10] Chidambara Murthy K N,Jayaprakasha G K,Patil Bhimanagouda S. Induction of apoptosis mediated cytotoxicity by citrus obacunone and its glucoside in human prostate carcinoma cells[C]. New Orleans: ACS National Meeting, April 6-10, 2008, AGFD-004.
- [11] 杜程芳,屠鹏飞. 白鲜皮药材指纹图谱研究[J]. 中国天然药物,2003,2:94.
- [12] 汤俊,宋卫,屠治本. 蚬壳花椒化学成分的研究[J]. 中草药,1995,26(11):563.
- [13] Brown N M D,Grundon M F,Harrison D M,et al. Quinoline alkaloids -XXI¹: The ¹³C-NMR spectra of hemiterpenoid quinoline alkaloids and related prenylquinolines[J]. *Tetrahedron*,1980,36:3579.
- [14] 赖作企,符雄. 沙田柚种子化学成分的研究[J]. 中山大学学报,1995,34(4):117.
- [15] 楼之岑,秦波. 常用中药材品种整理和质量研究[M]. 北京:北京医科大学 中国协和医科大学联合出版社,1996:340.



Simultaneous determination of three active compounds in root barks of *Dictamnus dasycarpus* by RP-HPLC

YANG Xiaojuan, LIU Yanfang, BAO Zhong, JIANG Yong*, TU Pengfei

(State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a RP-HPLC method for simultaneous determination of three active compounds, dictamnine, obacunone and fraxinellone in root bark of *Dictamnus dasycarpus* and supply a reference for the establishment of the quality standard of *D. dasycarpus*. **Method:** A Kromasil C₁₈ column was used with methanol-water (60:40) as the mobile phase, at the flow rate of 1 mL · min⁻¹. 236 nm was selected as the detected wavelength. **Result:** The determined three compounds were well separated with a linear range of 0.002 1-0.106 0, 0.020 1-0.920 0 and 0.010 2-1.020 g · L⁻¹, respectively. The recoveries of them were 100.5%, 99.2% and 100.2%, respectively. **Conclusion:** This method is simple, rapid and accurate, particularly suitable for the quality control of *D. dasycarpus*.

[Key words] *Dictamnus dasycarpus*; dictamnine; obacunone; fraxinellone; HPLC

doi: 10.4268/cjcm20100215

[责任编辑 王亚君]

封面图片简介

学名 *Cypripedium guttatum* Swartz

别名 紫点杓兰。

俗名 小囊兰。

生境 生于海拔 300 ~ 2 100 m 之间的林下、林间草甸、林缘及高山冻原带上。

分布 东北、内蒙古、华北、西南、云南、西藏东部至南部；朝鲜、日本、俄罗斯、蒙古、北美、欧洲。本地区的各市县。

入药部位 全草入药。

药用价值 主治全身浮肿、小便不利、癫痫、头痛、上腹痛及小儿高热引起的惊厥等，也可治疗癌症。

其他情况 数量稀少，十分珍稀。被《中国物种红色名录》定为近危种 (NT)。