

# UPLC 法同时测定白鲜皮中三种活性成分的含量

刘 雷,马玉坤,孙 宇,刘 琦,张金玲,郭丽娜,刘吉成\*

齐齐哈尔医学院,齐齐哈尔 161006

**摘要:**建立 UPLC 法同时测定白鲜皮中白鲜碱、黄柏酮和梣酮的含有量。白鲜皮甲醇提取物的分析采用 Waters BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×50 mm,1.7 μm);流动相为乙腈-水,梯度洗脱;体积流量 0.4 mL/min;检测波长为 236 和 213 nm;柱温 35 ℃。白鲜碱、黄柏酮和梣酮分别在 0.501 6~20.06 μg/mL( $r=0.999 5$ )、4.496~179.8 μg/mL( $r=0.999 6$ )和 4.003~160.1 μg/mL( $r=0.999 7$ ) 范围内线性关系良好,平均加样回收率分别为 98.96%、99.63% 和 99.30%,RSD 分别为 1.25%、1.71% 和 1.34%。该方法简便准确,重复性好,可用于白鲜皮的质量控制。

**关键词:**白鲜皮;白鲜碱;黄柏酮;梣酮;UPLC

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)Suppl-0010-05

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.S.003

## Simultaneous determination of three compounds in Dictamni Cortex by UPLC

LIU Lei, MA Yu-kun, SUN Yu, LIU Qi, ZHANG Jin-ling, GUO Li-na, LIU Ji-cheng\*

Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China

**Abstract:**To establish a UPLC method for simultaneous determination of dictamnine, obacunone and fraxinellone in Dictamni Cortex. The analysis of methanol extract of Dictamni Cortex was performed on a 35 ℃ Waters BEH C<sub>18</sub> column (2.1 mm×50 mm,1.7 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-water flowing at 0.4 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 236 and 213 nm. Dictamnine, obacunone and fraxinellone showed good linear relationships within the ranges of 0.501 6-20.06 μg/mL ( $r=0.999 5$ ), 4.496-179.8 μg/mL ( $r=0.999 6$ ), 4.003-160.1 μg/mL ( $r=0.999 7$ ), whose average recoveries were 98.96%, 99.63%, 99.30% with the RSDs of 1.25%, 1.71%, 1.34%, respectively. This simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control of Dictamni Cortex.

**Key words:**Dictamni Cortex; dictamnine; obacunone; fraxinellone; UPLC

白鲜皮为芸香科白鲜属植物白鲜 *Dictamnus dasycarpus* Turcz. 的干燥根皮,始载于《神农本草经》,具有清热燥湿,祛风解毒之功效,中医临床现用于抗菌、抗炎、止血、抗肿瘤等症<sup>[1-3]</sup>。近年来的研究表明,由白鲜皮中分离得到的白鲜碱具有良好的抗炎活性,时东方等<sup>[4]</sup>研究发现,白鲜皮醇提物及白鲜碱单体具有很好的抗炎作用,不同抗炎模型对抗炎效果表现出一定的差异性;由白鲜皮中分离得到的梣酮具有良好的抗菌活性,张红晶等<sup>[5]</sup>采用滤纸片法研究了白鲜皮乙醇、甲醇、乙酸乙酯、正丁醇、石油醚、蒸馏水六种提取物及白鲜碱、黄柏酮、梣酮三种单体化合物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、普通

变形杆菌、枯草杆菌 4 种测试菌的抑菌活性,其结果表明:白鲜皮溶剂提取物、白鲜碱及梣酮单体都具有较好的抑菌活性;由白鲜皮中分离得到的黄柏酮具有良好的抗肿瘤活性,Roy 等<sup>[6]</sup>研究发现,黄柏酮能够抑制化学诱导的癌变和一系列的人癌症细胞系的增殖,如肺癌、结肠癌、口腔癌、皮肤癌以及乳腺癌细胞等。

本课题组一直致力于从白鲜皮中发现与评价具有临床应用价值的抗肿瘤、抗炎、抗菌及抗氧化等有效活性成分<sup>[7-9]</sup>,已成功分离得到 50 余种单体化合物,并建立质谱及核磁谱数据库。

关于白鲜皮的质量控制方法,2015 版《中国药典》仅采用黄柏酮和梣酮为检测指标成分,未对白鲜皮中主要活性成分白鲜碱的含量进行测定<sup>[10]</sup>。UPLC(超高效液相色谱)法是 21 世纪以来新兴的分析方法,与传统的 HPLC 法相比较更加简便快捷,且

收稿日期:2018-12-07 接受日期:2019-01-18

基金项目:齐齐哈尔医学院院内基金(QY2016Z-03)

\* 通信作者 Tel:86-452-2663375; E-mail:qyblu@126.com

分析灵敏度高、溶剂消耗量少等优势,很大的提升实验效率。本文建立了 UPLC 法一测多评白鲜皮药材中的三种活性成分:白鲜碱、黄柏酮和枞酮的方法,该方法具有灵敏度高、操作简便、分析速度快、溶剂用量少、重复性好等特点,可用于对白鲜皮药材的质量控制。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Waters Acquity UPLC Class 超高效液相色谱仪,配 PDA 检测器及 Empower 3 色谱工作站(美国 Waters 公司);AB304-S 型分析天平(瑞士 Mettler 公司);Merck Millipore Synergy 制水系统(德国 Merck 公司);色谱级乙腈(德国 Merck 公司);自制纯净水。

### 1.2 试剂

白鲜碱、黄柏酮和枞酮对照品由本研究室自制,其<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR 和 MS 数据与文献报道的白鲜碱、黄柏酮和枞酮相一致<sup>[11]</sup>,含有量大于 98%。其化学结构如图 1。

### 1.3 样品

作者收集了不同产地白鲜皮药材共 12 批,经齐齐哈尔医学院中药教研室郭丽娜教授鉴定,为芸香

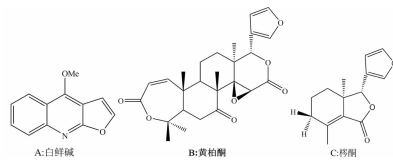


图 1 白鲜碱、黄柏酮和枞酮的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of dictamnine; obacunone; fraxinellone

科植物白鲜 *Dictamnus dasycarpus* Turcz. 的干燥根皮。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters Acquity BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm);流动相为乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~2 min, 20%~30% A; 2~3 min, 30% A; 3~5 min, 30%~40% A; 5~10 min, 40%~20% A),流速为 0.4 mL/min;检测波长(0~4.7 min 为 236 nm, 检测白鲜碱; 4.7~10 min 为 213 nm, 检测黄柏酮及枞酮);柱温 35 °C;进样量 1 μL。在上述色谱条件下,白鲜碱、黄柏酮和枞酮的保留时间分别为 4.243、5.164、7.541 min,无杂质干扰,三个峰分离度良好,结果见图 2。

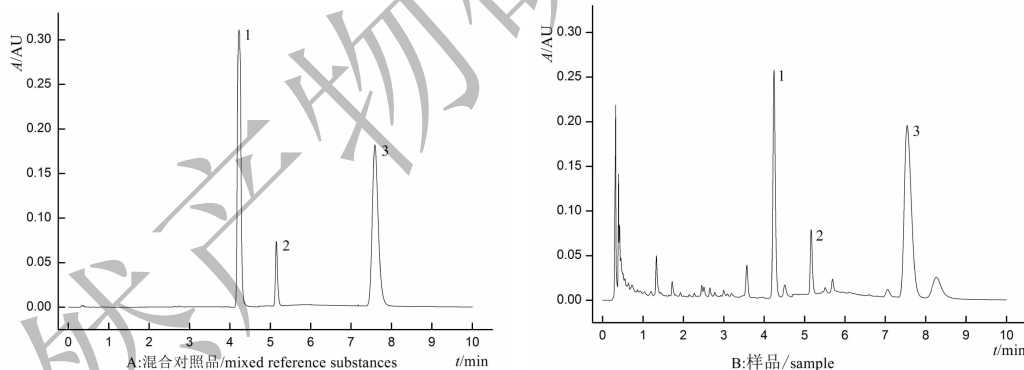


图 2 各成分 UPLC 色谱图

Fig. 2 UPLC chromatograms of various constituents

注:1. 白鲜碱;2. 黄柏酮;3. 枞酮

Note: 1. dictamnine; 2. obacunone; 3. fraxinellone

### 2.2 混合对照品溶液制备

分别精密称取对照品白鲜碱、黄柏酮和枞酮适量,置于 50 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制成每 1 mL 分别含白鲜碱 50.16 μg、黄柏酮 449.56 μg 和枞酮 400.28 μg 的混合对照品储备溶液,0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得。

### 2.3 供试品溶液制备

精密称取白鲜皮中粉(过 18 目筛)约 2 g,置于

索氏提取器中,加甲醇 150 mL,加热回流 120 min,提取液回收溶剂并浓缩至干,残渣加甲醇 20 mL,加热使其溶解,转移至 25 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

### 2.4 线性关系的考察

精密量取混合对照品储备溶液 4.00、3.00、2.00、1.00、0.50、0.30、0.10 mL,分别置于 10 mL 容

量瓶中,加甲醇稀释至刻度,得到7个浓度的混合对照品溶液,各质量浓度溶液分别过0.22 μm 微孔滤膜,在“2.1”项色谱条件下进样。以峰面积为纵坐标( $Y$ ),质量浓度为横坐标( $X$ )进行线性回归,分别得到白鲜碱、黄柏酮和梣酮回归方程为 $Y = 22\ 740X + 1\ 085.4$  ( $r = 0.999\ 5$ )、 $Y = 553.04X + 150.58$  ( $r = 0.999\ 6$ )、 $Y = 5\ 494.6X - 438.76$  ( $r = 0.999\ 7$ ),分别在0.501 6 ~ 20.06、4.496 ~ 179.8、4.003 ~ 160.1 μg/mL 范围内线性关系良好。

## 2.5 精密度试验

取“2.4”项下配置得到的质量浓度分别为5.016、44.96、40.03 μg/mL 的白鲜碱、黄柏酮和梣酮的混合对照品溶液,在“2.1”项色谱条件下,连续进样6次,结果测得峰面积的RSD分别为0.32%、0.41%、0.37%,表明仪器精密度良好。

## 2.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(编号:6),在“2.1”项色谱条件下进样,分别于0、2、4、8、12、24 h 进样测定,结果测得白鲜碱、黄柏酮和梣酮峰面积RSD

分别为1.41%、1.07%、1.15%,表明供试品溶液在24 h 内稳定性良好。

## 2.7 重复性试验

取同一批白鲜皮药材粉末6份(编号:6),按“2.3”项方法平行制备6份供试品溶液,过0.22 μm 微孔滤膜,在“2.1”项色谱条件下进样,结果测得白鲜碱、黄柏酮和梣酮的峰面积RSD分别为1.39%、1.51%、1.17%,表明本方法重复性良好。

## 2.8 加样回收率试验

取已测得含量的白鲜皮样品(编号:6),精密称取2.000 0 g,平行6份,加入质量浓度分别为50.16、449.56、400.28 μg/mL 的白鲜碱、黄柏酮和梣酮的混合对照品溶液5.0 mL,按照“2.3”项方法制备加样供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定。结果测得白鲜碱、黄柏酮和梣酮的平均回收率分别为98.96%、99.63%、99.30%,RSD分别为1.25%、1.71%、1.34%(详细结果见表1),表明本方法回收率良好。

表1 各成分加样回收率试验结果( $n = 6$ )

Table 1 Results of recovery tests for various constituents ( $n = 6$ )

成分 Component	取样量 Sample (mg)	原有量 Original (mg)	加入量 Added (mg)	测得量 Found (mg)	回收率 Recovery (%)	平均值 Average (%)	RSD (%)
白鲜碱 Dictamnine	1.034 2	0.420 6	0.250 8	0.667 3	98.37	98.96	1.25
	1.054 4	0.428 8	0.250 8	0.680 4	100.29		
	1.012 1	0.411 6	0.250 8	0.658 4	98.41		
	1.076 7	0.437 9	0.250 8	0.690 6	100.76		
	1.032 5	0.419 9	0.250 8	0.666 4	98.28		
	1.032 3	0.419 8	0.250 8	0.665 0	97.74		
黄柏酮 Obacunone	1.028 1	3.923 2	2.247 8	6.206 5	101.58	99.63	1.71
	1.026 9	3.918 7	2.247 8	6.106 4	97.33		
	1.029 3	3.927 8	2.247 8	6.212 9	101.66		
	1.034 9	3.949 2	2.247 8	6.179 0	99.2		
	1.035 6	3.951 8	2.247 8	6.185 3	99.36		
	1.025 7	3.914 1	2.247 8	6.131 3	98.64		
梣酮 Fraxinellone	1.024 0	3.616 8	2.001 4	5.582 7	98.23	99.30	1.34
	1.022 3	3.610 8	2.001 4	5.578 3	98.31		
	1.018 8	3.598 4	2.001 4	5.627 8	101.4		
	1.038 7	3.668 7	2.001 4	5.631 5	98.07		
	1.048 1	3.701 9	2.001 4	5.697 1	99.69		
	1.036 4	3.660 6	2.001 4	5.663 6	100.08		

## 2.9 不同产地样品含量测定

取不同产地白鲜皮样品,按“2.3”项下的方法

制备供试品溶液,平行3份,按“2.1”项下的色谱条件,注入超高效液相色谱仪进行测定,结果见表2。

表2 各成分含有量测定结果(mg/g, n=3)

Table 2 Results of content determination of various constituents (mg/g, n=3)

编号 No.	产地 Sources	批号 Batch	白鲜碱 Dictamnine	黄柏酮 Obacunone	梲酮 Fraxinellone
1	黑龙江齐齐哈尔	170328	0.400 7	2.921 9	2.091 5
2	黑龙江齐齐哈尔	170417	0.592 9	3.285 1	2.171 7
3	黑龙江加格达奇	161220	0.254 2	2.457 9	1.916 2
4	黑龙江加格达奇	170519	0.163 2	3.836 1	0.935 8
5	黑龙江大庆	171009	0.289 0	2.241 8	2.038 6
6	黑龙江大庆	171227	0.406 7	3.816 4	3.531 8
7	内蒙古赤峰	171116	0.195 5	4.099 1	0.734 3
8	内蒙古赤峰	180319	0.518 3	3.419 2	2.002 7
9	吉林白城	170421	0.819 3	2.219 7	0.476 5
10	吉林白城	170309	0.602 4	1.695 5	0.353 0
11	辽宁本溪	171025	0.407 5	1.830 1	0.976 5
12	辽宁本溪	170322	0.454 0	2.004 4	1.051 8

不同产地白鲜皮的质量存在差异,在“2.1”项的色谱条件下,白鲜碱、黄柏酮和梲酮三个指标成分的线性关系、分离度、重复性及回收率等均符合要求,12个批次的白鲜皮样品均是黄柏酮的含量较高,最高可达到4.099 1 mg/g,最低为1.695 5 mg/g;白鲜碱的含量较低,最高含量为0.819 3 mg/g,最低为0.163 2 mg/g。其中梲酮含量在各产地间差异较大,白鲜碱含量在各产地间差异不明显。

## 3 讨论与结论

### 3.1 供试品制备方法的考察

本文考察了索氏提取、热回流提取及超声提取三种不同提取方法,结果发现索氏提取对供试品的三种指标成分提取量优于超声法提取法和热回流提取法,故选用索氏提取法进行实验;考察了不同提取时间(60、120、180 min)对提取率的影响,发现120和180 min的提取率相近,但高于60 min,故选择提取时间为120 min;之后又考察了不同提取溶剂(50%甲醇、70%甲醇、甲醇、70%乙醇、乙醇、乙酸乙酯、三氯甲烷)对提取率的影响,结果发现甲醇的提取率最高,故选择甲醇作为提取溶剂<sup>[12,13]</sup>。

### 3.2 检测波长的选择

作者分别对白鲜碱、黄柏酮和梲酮对照品的甲醇溶液进行紫外扫描,以确定其最大吸收波长,结果

得三个化合物的最大吸收波长分别为236、213和215 nm。黄柏酮和梲酮在213 nm处均有较强吸收,但白鲜碱仅在236至238 nm处有较强吸收,为保证检测灵敏度,依据三个化合物的不同保留时间将检测波长设为0~4.7 min段236 nm,4.7~10 min段213 nm。该方法下各色谱峰分离良好,基线平稳,故选用此检测波长设置方法<sup>[14,15]</sup>。

### 3.3 流动相的优化

本文分别考察了乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水、乙腈-0.1%磷酸水、甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸水、甲醇-0.1%磷酸水共6种流动相系统。结果表明,采用乙腈-水作为流动相时各色谱峰分离度良好,且基线平稳,各成分峰形对称,故选用该流动相系统进行实验<sup>[16,17]</sup>。

### 3.4 小结

本研究建立了基于UPLC法同时测定白鲜皮药材中白鲜碱、黄柏酮及梲酮含量的方法,该法较常规的HPLC法具有分离速度更快、柱效和灵敏度更高等特点,在各色谱峰分离度、分析时间、溶剂使用量等方面均具有显著优势。实验中采用UPLC方法完成样品测定仅需10 min,而采用常规的HPLC方法则需要用时近40 min。利用本研究建立的方法分别测定了不同产地、不同批次的多个白鲜皮样品,测定

结果表明,不同产地的白鲜皮药材三种指标成分含量存在差异,但黄柏酮和栲酮含量均符合 2015 版《中国药典》规定。本文建立的同时测定白鲜皮中 3 种活性成分含量的方法,丰富了白鲜皮的质控指标,经过方法学考察,具有良好的精密度、准确度和重复性,简便易行,可为白鲜皮药材及含有白鲜皮的复方药物的质量控制和综合评价提供参考依据。

## 参考文献

- 1 Zhang MF, Shen YQ. Research advances on pharmacology of Dictamni Cortex [J]. *Anti Infect Pharm (抗感染药学)*, 2012, 9:95-99.
- 2 Liu L, Guo LN, Yu CL, et al. Research progress on chemical components and pharmacological effects of Dictamni Cortex [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2016, 12:2657-2665.
- 3 Zhou XY, Chen J, Jin L, et al. Pharmacologic action and anti-inflammation compounds of root of *Dictamnus Dasycarpus* Turcz. [J]. *J Changzhou Univ (常州大学学报)*, 2018, 1: 82-85.
- 4 Shi DF, Zheng MZ, Zhao LC, et al. Isolation and anti-inflammatory effect of dictamnine extracted from Dictamni Cortex [J]. *Chin J Expe Tradit Med For (中国实验方剂学杂志)*, 2012, 14:128-131.
- 5 Zhang HJ. Study on extraction and activity of the chemical constituents from *Dictamnus Dasycarpus* Turcz. [D]. Changchun: Jilin Agricultural University (吉林农业大学), 2011.
- 6 Roy A, Saraf S. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 2:191-201.
- 7 Guo LN, Pei YH, Chen G, et al. Three new compounds from *Dictamnus dasycarpus* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2012, 3: 210-215.
- 8 Guo LN, Pei YH, Chen G, et al. Two new compounds from *Dictamnus dasycarpus* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2012, 2: 105-110.
- 9 Guo LN, Pei YH, Xie FX. Identification of antioxidant activity of two new aromatic ring butyrolactone derivatives from *Dictamnus dasycarpus* Turcz. [J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 11: 0876-0880.
- 10 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- 11 Bai YY, Tang WZ, Wang XJ. Chemical constituents from root bark of *Dictamnus dasycarpus* [J]. *J Chin Med Mat (中药材)*, 2016, 2:263-265.
- 12 Wang CS, Liu YL, Duan JP, et al. Simultaneous quantification of six components in Zhibai Dihuang pills by dual-wavelength UPLC [J]. *J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2018, 2: 256-262.
- 13 Luo Y, Pan PP, Zhang JH, et al. Simultaneous determination of seven components in Radix Salviae Miltiorrhizae-Radix Angelicae Sinensis drug pair by HPLC [J]. *J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2018, 10:1689-1696.
- 14 Xiao CX, Yang WX, Tu JT, et al. Determination analysis of six bioactive constituents different parts in different habitats of baphicacanthus cusia (Nees) bremek by RP-HPLC [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2018, 30:1188-1194.
- 15 Zhang LJ, Zhou ZM, Tu WQ, et al. Simultaneous determination of five glycosides in Rehmanniae Radix by HPLC [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2017, 29: 87-90.
- 16 Deng Y, Jin X, Zhang X, et al. Determination of chrysoferanol and aurantio obtusin in different tissues of cassia tora using HPLC [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2017, 29:1900-1904.
- 17 Chen C, Wu Y, Li B, et al. Contents determination for 6 main compounds from ligusticum chuanxiong during growing period by UPLC [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2018, 30:997-1001.