

养高产草珊瑚黄酮的细胞株。但是通过细胞克隆培养的许多克隆系中,有些属于细胞突变产生的表型,有些可能仅是细胞间生理状态差异的表型,在草珊瑚细胞克隆系连续继代培养的早期,大部分处于生长和黄酮质量分数不稳定的状态,经过 10 代左右的连续继代培养并鉴定分析,才能确定真实的高产变异细胞株,这和大多数利用细胞克隆技术筛选高产系的报道是一致的。作为高产草珊瑚黄酮的细胞系必须同时满足两个条件:其一是在一定时间内,细胞相对增殖率高;其二是细胞代谢次生产物的有效成分黄酮质量分数高,只有这样,两者的积才表现高产。实验中 SG-130 符合这两个条件。因此,认为 SG130 确属高产草珊瑚黄酮细胞株系,对于其细胞大量培养工艺研究有待进一步深入探索。

References:

[1] Sata F, Yanmda Y. High berberine-producing cultures of *Coptis japonica* cells [J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(2): 281-285.
 [2] Tabata M, Hiaoka N. Variation of alkaloid production in *Nicotiana rustica* callus cultures [J]. *Physiol Plant*, 1976, 38: 19-23.
 [3] Tu Y S, Jiang H R, Wang B Q. Cultures of callus and cell suspension of *Sarcandra glabra* for the production of medicinal component [J]. *Nat Prod Res Deve* (天然产物研究与开发), 1995, 7(1): 35-41.
 [4] Tu Y S, Jiang H R, Wang B Q, et al. Study on different colour lights temperatures and pH values on callus growth and secondary metabolite accumulation of *Sarcandra glabra* [J]. *Jiangxi Sci* (江西科学), 1994, 12(2): 85-89.
 [5] Tu Y S, Jiang H R, Wang B Q. studies on the suspension cell cultures of *Sarcandra glabra* [J]. *Jiangxi Sci* (江西科学), 1994, 12(3): 162-165.
 [6] Tu Y S, Jiang H R. Plant culture of sigle cell clone from *Sarcandra glabra* [J]. *Jiangxi Sci* (江西科学), 1996, 14(2): 97-101.
 [7] Barz W. *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application* [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1977.

RP-HPLC 法测定黄柏中黄柏内酯

马学敏^{1,2}, 王力生¹, 赵 巍¹, 郭亚健¹, 郭树仁²

(1. 北京中医药大学, 北京 100102; 2. 北京大学, 北京 100083)

黄柏为常用中药,系芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 及黄柏树 *P. amurense* Rupr. 除去栓皮的干燥树皮,前者习惯称“川黄柏”,后者习惯称“关黄柏”。黄柏性味苦寒,具有清热燥湿、泻火解毒、退虚热等功效。主要含有生物碱,如小檗碱、药根碱、木兰花碱等。另含黄酮、白鲜交酯、黄柏内酯等。其中,黄柏内酯具有降血糖^[1]、驱虫、抗溃疡^[2]的作用,可作为黄柏及其制剂的指标性成分之一。

一直以来,《中国药典》及各种文献中大多单独以小檗碱作为黄柏药材及制剂定性定量的指标性成分,然而,小檗碱存在于黄连、三颗针、功劳木多种植物中,其专属性较差,黄柏内酯作为黄柏药材及其制剂的指标性成分更加具有科学性。

本实验建立了黄柏药材中黄柏内酯的测定方法,该方法操作简便、准确,重现性好,为改善黄柏中的指标性成分的专属问题提供参考。

1 仪器与试剂

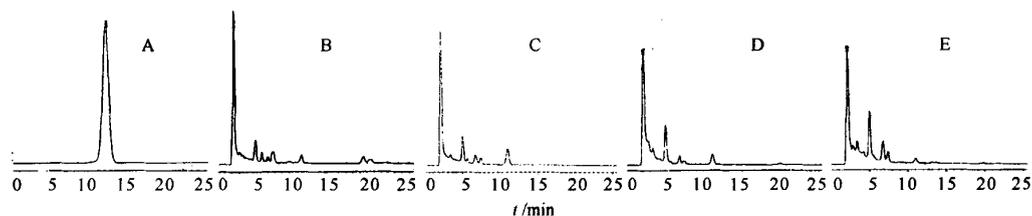
1.1 仪器:RE-52A 薄膜旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),Brucker AM-500 型核磁共振仪, APEX I FT-ICR 型质谱仪,SHZ-3 型水循环真空泵(河南巩义市英峪电子仪器厂),KQ-100 型超

声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),惠普 HP1050 高效液相色谱仪。

1.2 试剂:柱色谱硅胶和薄层色谱硅胶(青岛海洋化工厂);水为重蒸水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯;显色剂为对二甲基氨基苯甲醛;关黄柏 1 于 2003 年采自吉林,经本校生药系阎玉凝教授鉴定为黄柏树 *Phellodendron amurense* Rupr. 干燥树皮;关黄柏 2、川黄柏、山黄柏来自中药学院生药系标本馆;黄柏内酯对照品为自制,质量分数 >98%。

2 方法与结果

2.1 黄柏内酯的提取分离与结构鉴定:将关黄柏 1 依次用石油醚、醋酸乙酯提取。将醋酸乙酯提取物进行硅胶柱色谱分离,以氯仿-醋酸乙酯(50:1~8:1)进行梯度洗脱,将氯仿-醋酸乙酯(10:1)部分进行反复柱色谱分离,得到白色针状结晶(CHCl₃-MeOH)。经结构鉴定为黄柏内酯(obaculactone)^[3]。
 2.2 色谱条件:Diamondsil-C₁₈ 分析柱(250 mm × 4.6 mm, 5μm),流动相:乙腈-水-磷酸(50:50:0.2),体积流量:1.0 mL/min,柱温:室温,检测波长 210 nm。在此条件下,样品中黄柏内酯与相邻成分达到良好基线分离,见图 1。



A-黄柏内酯对照品 B-关黄柏 1 C-关黄柏 2 D-川黄柏 E-山黄柏

A-obaculactone B-*P. amurense* 1 C-*P. amurense* 2 D-*P. chinense* S E-*P. amurense* produced in Hebei and Henan

图 1 对照品和样品 HPLC 色谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substance and samples

2.3 对照品溶液的制备:取黄柏内酯对照品适量,精密称定,加乙腈溶液制成 0.206 mg/mL 的对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备:取关黄柏 1 粗粉(过 40 目筛)1 g,精密称定,置索氏提取器中,以石油醚加热回流提取 3 h,弃去石油醚提取液;残渣加氯仿加热回流提取 5 h,提取液回收氯仿,用乙腈转溶至 10 mL 量瓶中,定容,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

2.5 线性关系考察:分别取上述对照品溶液 3、6、9、12、15 μL ,注入液相色谱仪,以黄柏内酯的峰面积为纵坐标、进样量为横坐标,得到回归方程: $Y = 719.83 X + 80.5, r = 0.999 4$,结果表明黄柏内酯进样量在 0.618~3.090 μg 时线性关系良好。

2.6 精密度试验:精密吸取黄柏内酯对照品溶液(0.206 mg/mL)12 μL ,连续进样 5 次,计算得峰面积的 RSD 为 0.82%。

2.7 稳定性试验:取同一关黄柏 1 供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8 h 进样,每次 20 μL ,计算得峰面积的 RSD 为 0.75%。结果表明,供试品溶液中的黄柏内酯至少在 8 h 内稳定。

2.8 重现性试验:按照前述供试品溶液制备方法,精密称取同一批关黄柏 1,分别制备 5 份供试品溶液,每次进样 20 μL ,按上述色谱条件测定黄柏内酯的质量分数,结果平均为 0.112%,RSD=1.26%。

2.9 加样回收率试验:称取 0.5 g 样品 5 份,分别加入黄柏内酯对照品 0.618 mg,依供试品溶液制备方法操作,结果平均回收率为 96.43%,RSD=1.15%。

2.10 样品测定:按照关黄柏 1 的供试品溶液制备方法,分别制备关黄柏 2、川黄柏和山黄柏样品溶

液,在所述色谱条件下,每次进样 20 μL ,样品获得良好分离,测得各样品中黄柏内酯,结果见表 1。

表 1 样品的测定结果 ($n=5$)Table 1 Determination of samples ($n=5$)

样 品	黄柏内酯/%
关黄柏 2	0.269
川黄柏	0.154
山黄柏	0.057

3 讨论

3.1 流动相系统的选择:黄柏内酯与黄柏酮均属于柠檬苦素类化合物,参考柑桔中黄柏酮的测定方法^[4]:流动相条件为乙腈-水-三氟乙酸(20:80:0.03),在本试验的色谱条件下样品分离度不好,经过筛选最终确定了流动相为乙腈-水-磷酸(50:50:0.2),该条件能够保障黄柏内酯在反相柱上达到良好的分离。

3.2 供试品溶液制备的条件:选择比较了甲醇、氯仿、醋酸乙酯 3 种提取溶剂,并考察了回流提取时间,最终确定以氯仿回流提取 5 h。

3.3 由于样品来源有限,测定份数较少,如果确定将黄柏内酯作为黄柏的指标性成分之一,还需要进一步的积累数据。

References:

- [1] Editorial Office of National Chinese Herbal Medicine Collection. *Collection of National Chinese Herbal Medicine* (全国中草药汇编) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1975.
- [2] Information Center of Chinese Herbal Medicine, State Pharmaceutical Administration of China. *Handbook of Active Constituents in Phytomedicine* (植物有效成分手册) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1986.
- [3] Yu D Q, Yang J S, Xie J X. *Handbook of Analysis Chemistry* (分析化学手册) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1999.
- [4] Tian Q C, Dai J, Ding X L. Screening for limonoid glucosides in *Citrus grandis* L. Osbeck by HPLC-EI/MS [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2000, 18(4): 291.