

耿岩玲, 王 晓, 朱 姮, 等. 白鲜皮中黄柏酮标准样品的研制[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(4) : 933-937.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.04.031

白鲜皮中黄柏酮标准样品的研制

耿岩玲, 王 晓, 朱 姮, 闫慧娇, 宋祥云, 王岱杰

齐鲁工业大学/山东省科学院/山东省分析测试中心/山东省中药质量控制技术重点实验室, 山东 济南 250014)

摘要: 依据 GB/T 15000.3-2008 标准样品的工作导则, 研制黄柏酮标准样品。以白鲜皮为原料, 硅胶柱色谱结合重结晶的方法制备黄柏酮单体, 通过 UV、IR、MS 和 NMR 等技术进行结构表征, 同时进行了薄层色谱鉴别和热重分析, 通过 HPLC 检测分析技术, 进行了均匀性检验、稳定性检验和 8 家实验室联合定值。结果表明, 该样品均匀性良好, 在 0~4 ℃ 储存 24 个月稳定性良好, 定值结果确定其标准值为 98.94%, 置信度 95% 的不确定度为 0.12%。说明, 黄柏酮标准样品达到了 GB/T 15000.3-2008 规定的技术要求, 具有溯源性, 可用于黄柏酮及相关产品的质量控制和检测方法评定。

关键词: 黄柏酮; 标准样品; 均匀性; 稳定性; 定值

中图分类号: S567 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)04-0933-05

Preparation of certified reference materials of obacunone from bark of *Dictamnus dasycarpus* Turcz

GENG Yan-ling, WANG Xiao, ZHU Heng, YAN Hui-jiao, SONG Xiang-yun, WANG Dai-jie

(Qilu University of Technology/Shandong Academy of Sciences/Shandong Analysis and Test Center/Key Laboratory of TCM Quality Control, Jinan 250014, China)

Abstract: The certified reference material (CRM) of obacunone was researched according to the technical requirement of *general and statistical principle for certification* GB/T 15000.3-2008. Using bark of *Dictamnus dasycarpus* Turcz as material, the obacunone sample was obtained by the method of silica gel chromatography combined with the recrystallization, and the structure was identified by UV, IR, MS and NMR. The purity of obacunone was analyzed by thin-layer chromatography, thermogravimetric and HPLC technology. The samples were investigated by homogeneity test, stability test, and cooperative certification performed by eight laboratories. The results indicated that the obacunone sample had good homogeneity and good stability after storage at 0-4 ℃ for 24 months. The certified value of obacunone was 98.94% with a expanded uncertainty of 0.12% in confidence level of 95%. The reference material of obacunone was conformed to the technical requirement of GB/T 15000.3-2008 and could be traceable. So, the CRM of obacunone could be used for quality control and test method evaluation of obacunone and related products.

Key words: obacunone; certified reference material; homogeneity; stability; certified value

收稿日期: 2017-12-04

基金项目: 山东省重大科技创新工程项目(2017CXGC1308); 山东省重点研发计划项目(2017GSF216002、2017CXGC1209); 山东省泰山学者岗位专家支持项目; 山东省科学院先导项目

作者简介: 耿岩玲(1973-), 女, 内蒙古呼伦贝尔人, 硕士, 副研究员, 研究方向为天然产物化学及标准样品研制。(E-mail) gengyanling@126.com

通讯作者: 王岱杰, (Tel) 15965317581; (E-mail) wangdaijie@126.com

白鲜皮是中国常用大宗药材, 为芸香科植物白鲜(*Dictamnus dasycarpus* Turcz.) 的干燥根皮, 具有清热燥湿、祛风解毒、抗癌等功效, 广泛种植于黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古等地区^[1]。黄柏酮为《药典》中规定的白鲜皮质量控制指标, 药典规定不得少于 0.15% (按干燥品计), 黄柏酮还是白鲜碱和黄柏药

材及相关产品重要的鉴别指标。药理研究结果表明,黄柏酮具有抑菌、治疗血管疾病及抗癌等多种药理功效^[2-5],在抑制结肠癌、胰腺癌、乳腺癌和前列腺癌等方面具有潜在开发价值^[6-9]。标准样品是具有一种或多种足够均匀的并能很好确定特性值的材料或物质,可以用来校准仪器,评价测量方法和给材料赋值^[10],目前市场上黄柏酮以对照品为主,纯度也参差不齐,未按照国家标准进行均匀性、稳定性和定值试验,最终结果没有不确定度评估,不具有溯源性。因此,为了满足黄柏酮及相关产品的检测需求,保证检测结果的准确性、可比性和溯源性,本研究参照 ISO Guide 35 和 GB/T 15000.3-2008 的工作导则^[11],研制黄柏酮(图 1)国家标准样品。

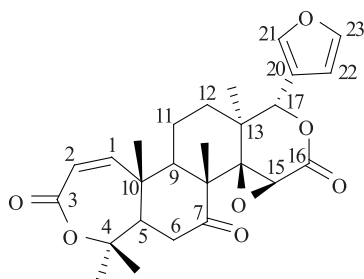


图 1 黄柏酮化学结构式

Fig.1 The chemical structure of obacunone

1 材料与方法

1.1 试验仪器

R-3 型旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司产品), SCIENTZ-10N 型冷冻干燥仪(宁波新芝生物科技股份有限公司产品), 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司产品), WRS-1B 型数字熔点仪(上海精密科学仪器有限公司产品), UV-2550 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司产品), INOVA 600 MHz 核磁共振波谱仪(美国瓦里安公司产品), 6520 Q-ToF 型液相色谱质谱联用仪(美国安捷伦公司产品), STA 449FC 型同步热分析仪(德国耐驰公司产品)。

1.2 试验材料

柱层析硅胶、GF254 薄层硅胶板(青岛海洋化工厂产品),黄柏酮对照品(成都德思特生物技术有限公司产品),甲醇(色谱纯,美国天地公司产品),水为重蒸水,其他试剂为分析纯。白鲜皮药材购自济南建联中药店,经山东中医药大学李佳教授鉴定为芸香科植物白鲜(*Dictamnus dasycarpus* Turcz.)的干

燥根皮,样本存放于山东省分析测试中心。

1.3 试验方法

1.3.1 样品制备 黄柏酮粗提物的制备:白鲜皮药材粉碎,过 40 目筛,95%乙醇加热回流提取 3 次,每次 3 h,抽滤,减压浓缩至无醇味,加水分散,用乙酸乙酯萃取 3 次,萃取液减压浓缩,得到乙酸乙酯浸膏,4℃冰箱保存备用。

黄柏酮单体的纯化:将乙酸乙酯浸膏进行硅胶柱色谱分离,采用溶剂体系(石油醚-乙酸乙酯)进行梯度洗脱,分瓶收集,用黄柏酮对照品做比对,进行薄层色谱和 HPLC 监测分析,收集黄柏酮含量较高的组分,减压浓缩,氯仿溶解,放置于室温进行结晶,得到白色针状晶体,即黄柏酮单体。

1.3.2 纯度分析方法

1.3.2.1 高效液相色谱分析 将制备的黄柏酮单体溶于甲醇配制成 0.5 mg/ml 的溶液,经 HPLC 检测。柱温 30℃,运行时间 30 min,检测波长 284 nm。等度色谱条件:shim-pack C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250.0 mm, 5 μm);流动相为甲醇:水=62:38(体积比);流速 1.0 ml/min。梯度色谱条件:YMC C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250.0 mm, 5 μm),流动相为甲醇(A)/水(B):0~20 min,62% A;20~40 min,62%~100% A;40~50 min,100% A;流速 1.0 ml/min。

采用 DAD 检测器扫描得 3D 总吸收图,HPLC 纯度分析结果表明,扣除溶剂峰后未见明显杂质峰存在,显示样品纯度较高。

1.3.2.2 薄层(TLC)鉴别 精密称取样品 5 mg,溶于甲醇中,配制成 0.2 mg/ml 的对照品溶液,使用定量毛细点样管进行点样,于 GF254 硅胶板上分别点样 20 μg、40 μg、60 μg、80 μg、100 μg。薄层展开剂为正己烷:乙酸乙酯(1:1,体积比)和氯仿:丙酮:甲酸:水(40:40:5:2,体积比),硅胶板上样品经展开剂展开,取出晾干,分别用 10%硫酸乙醇和茚三酮法显色,105℃下加热 3 min,至斑点显色清晰。结果表明,样品呈现深棕色斑点,*R_f*值分别为 0.48 和 0.61,未见明显杂质斑点存在。

1.3.2.3 液质联用(LC-MS)纯度分析 色谱柱为 shim-pack C₁₈ 柱(4.6 mm×250.0 mm, 5.0 μm),流动相为甲醇:水(62:38,体积比),流速 1.0 ml/min,柱温 30℃,运行时间 30 min。MS 条件:ESI 电喷雾离子源,毛细管电压 4.0 kV,载气为普通氮气,流速为 10 L/min,载气温度 300℃,扫描范围 *m/z* 100~

1 000。液质联用分析结果表明,MS 总离子流图未见明显杂质峰存在。

1.3.2.4 热重分析 精密称取样品 5 mg,置于热重分析专用坩埚中,设置热重条件:初温 30.0 ℃,最终温度 600.0 ℃,升温速率 10 ℃/min, N₂为载气,流量为 100 ml/min。结果表明,在 24.7~185.0 ℃,TG 曲线为一条水平线,即测试样品中吸附水和结晶水含量均很低,热稳定性良好。当温度增加超过 280.1 ℃时,样品开始分解,DTA 曲线显示温度升高到 295.4 ℃,样品迅速分解。

2 结果

2.1 结构表征

黄柏酮单体的结构分别采用紫外光谱法(UV)、红外光谱法(IR)、质谱法(MS)和核磁共振技术(NMR)等方法进行表征。UV 法测试溶剂为甲醇,扫描范围为 200~400 nm;IR 法采用 KBr 压片,扫描波数范围为 400~4 000 cm⁻¹;MS 分析采用电喷雾离子源,载气温度为 300 ℃,载气流速为 10 L/min,载气为普通氮气,毛细管电压为 4.0 kV,扫描范围为 m/z 100~1 000,氙代试剂为 CDCl₃。

结果表明,测试样品的最大紫外吸收波长 $UV\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ 为 218 nm,熔点为 233~234 ℃, $IR_{V_{\max}}^{\text{cm}^{-1}}$ 为 2 988, 2 947 (m, ν_{CH}), 1 736, 1 708 (s, $\nu_{\text{C=O}}$), 1 627 (w, $\nu_{\text{C=C}}$), 1 466, 1 449 (m, δ_{CH}), 1 281, 1 029 (s, ν_{CO})。ESI-MS 结果为: m/z 477.180 7 [M+Na]⁺, 931.366 9 [2M+Na]⁺, 453.166 5 [M-H]⁻。核磁共振检测结果为:¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.48 (1H, overlapped, H-21), 7.40 (1H, overlapped, H-23), 6.52 (1H, d, J =12.0 Hz, H-2), 6.37 (1H, br s, H-22), 5.96 (1H, d, J =12.0 Hz, H-1), 5.46 (1H, s, H-17), 3.66 (1H, s, H-15)。¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 207.4 (C-7), 166.9 (C-3), 166.6 (C-16), 156.8 (C-1), 143.2 (C-23), 141.0 (C-21), 122.9 (C-2), 120.1 (C-20), 109.8 (C-22), 84.0 (C-4), 78.0 (C-17), 65.1 (C-14), 57.3 (C-5), 53.3 (C-15), 52.9 (C-8), 49.2 (C-9), 43.1 (C-10), 39.9 (C-6), 37.4 (C-13), 32.74 (C-12), 17.0 (C-11), 32.0, 26.8, 21.1, 19.4, 16.4 (CH₃×5)。通过对比文献分析,以上数据与文献[12]基本一致,确定该化合物为黄柏酮。

2.2 均匀性检验

依据标准样品导则要求,顺序重复随机测量,随机抽取分装好的黄柏酮样品 10 瓶($>1.5\sqrt[3]{N}$),采用 3 种抽样程序(第 1 次:1-3-5-7-9-2-4-6-8-10;第 2 次:10-9-8-7-6-5-4-3-2-1;第 3 次:2-4-6-8-10-1-3-5-7-9),按方法 1.3.2.1 中的 HPLC 等度方法进行样品分析,峰面积归一化法读取纯度,数据进行方差分析,进行 F 检验,以确定黄柏酮样品的均匀性,结果见表 1 和表 2。

表 1 均匀性检验结果

Table 1 Results of homogeneity test

| 瓶号 | 样品纯度(%) | | | | |
|----|---------|-------|-------|-------|-------|
| | 第 1 组 | 第 2 组 | 第 3 组 | 平均值 | 总平均值 |
| 1 | 98.91 | 98.90 | 98.92 | 98.91 | 98.92 |
| 2 | 98.93 | 98.91 | 98.90 | 98.91 | |
| 3 | 98.92 | 98.92 | 98.91 | 98.92 | |
| 4 | 98.93 | 98.91 | 98.90 | 98.91 | |
| 5 | 98.90 | 98.91 | 98.91 | 98.90 | |
| 6 | 98.92 | 98.93 | 98.94 | 98.93 | |
| 7 | 98.92 | 98.93 | 98.91 | 98.92 | |
| 8 | 98.90 | 98.91 | 98.91 | 98.91 | |
| 9 | 98.91 | 98.92 | 98.90 | 98.91 | |
| 10 | 98.92 | 98.93 | 98.94 | 98.93 | |

表 2 方差分析结果

Table 2 Results of variance analysis

| 变差源 | 方差(SS) | 自由度(DF) | 均方(MS) |
|-----|-----------------------|---------|-----------------------|
| 组间 | 2.00×10^{-3} | 9 | 2.23×10^{-4} |
| 组内 | 2.13×10^{-3} | 20 | 1.07×10^{-4} |
| 总和 | 4.14×10^{-3} | 29 | |

以组间自由度 $\nu_1=9$ 及组内自由度 $\nu_2=20$ 为变量查询 F 界值表,可知 $F_{0.05}(9,20)=2.94$,由于 $F < F_{0.05}(9,20)$,证明黄柏酮样品均匀性良好。

2.3 稳定性检验

样品储存于 0~4 ℃,监测考察期为 2 年,在此期间选择 5 个时间点对样品进行取样分析,按方法 1.3.2.1 的 HPLC 等度方法检测,纯度计算采用峰面积归一化法,每份样品重复测定 5 次,采用 t 检验法对检测结果进行统计分析,通过线性模型观察直线斜率值变化趋势,进行预测^[13],分析结果见表 3。

表 3 稳定性检验数据

Table 3 Result of stability test

| 时间(月) | 样品纯度(%) | | | | | | 标准偏差 (%) |
|-------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| | 重复 1 | 重复 2 | 重复 3 | 重复 4 | 重复 5 | 平均值 | |
| 0 | 98.96 | 98.93 | 98.96 | 98.93 | 98.95 | 98.95 | 0.02 |
| 6 | 98.90 | 98.91 | 98.92 | 98.91 | 98.91 | 98.91 | 0.01 |
| 12 | 98.94 | 98.95 | 98.93 | 98.96 | 98.95 | 98.95 | 0.02 |
| 18 | 98.92 | 98.92 | 98.90 | 98.93 | 98.92 | 98.92 | 0.02 |
| 24 | 98.91 | 98.90 | 98.91 | 98.92 | 98.93 | 98.90 | 0.02 |

斜率为:

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} = \frac{-0.54}{360} = -0.0015$$

式中, $\bar{Y} = 98.93$; $\bar{X} = 12$

截距为:

$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X} = 98.93 + (0.0015 \times 12) = 98.94$$

直线模型的标准偏差为:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1 X_i)^2}{n-2} = \frac{0.00139}{3} = 0.00046$$

则 $s = 0.03$

斜率相关不确定度为:

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} = \frac{0.03}{\sqrt{360}} = 0.002$$

查表得自由度为 $n-2$ 和 95% 置信水平 ($p=0.95$) 分布的 t 因子为 3.182。

由于斜率变化的绝对值 $|b_1| < t_{0.95, n-2} \cdot s(b_1) = 3.182 \times 0.002 = 0.0064$, 即:

$|b_1| < 0.0064$ 。斜率变化不显著, 即黄柏酮标准样品在 2 年内稳定性良好。

稳定性的不确定度为: $u_{\text{稳}} = S_b \cdot t = 0.002 \times 24 = 0.05$

2.4 定值

根据标准样品工作导则, 采用 8 家实验室协作定值方法。24 瓶样品中随机抽取, 每家定值实验室寄送样品 3 瓶, 每瓶测定 2 次, 以峰面积归一化法读取样品纯度, 每家实验室得到 6 个检测结果。根据协作实验室检测结果, 进行数据统计分析, 最终确定黄柏酮标准样品的标准值和定值不确定度, 结果如表 4。

表 4 协作定值数据

Table 4 Results of certified value

| 协作定值 实验室序号 | 样品纯度(%) | | | | | | 平均值 | 标准偏差 | 总平均值 |
|---------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| | I | II | III | IV | V | VI | | | |
| 1 | 99.03 | 99.05 | 99.06 | 99.10 | 99.10 | 99.10 | 99.07 | 0.03 | 98.94 |
| 2 | 99.01 | 99.03 | 99.03 | 99.06 | 98.95 | 98.94 | 99.00 | 0.05 | |
| 3 | 98.87 | 98.84 | 98.85 | 98.88 | 98.86 | 98.83 | 98.86 | 0.02 | |
| 4 | 98.96 | 98.91 | 98.94 | 98.95 | 98.93 | 98.92 | 98.94 | 0.02 | |
| 5 | 98.89 | 98.86 | 98.87 | 98.87 | 98.86 | 98.82 | 98.86 | 0.03 | |
| 6 | 98.84 | 98.85 | 98.84 | 98.91 | 98.90 | 98.87 | 98.87 | 0.04 | |
| 7 | 99.01 | 99.05 | 98.96 | 98.99 | 99.04 | 99.02 | 99.01 | 0.04 | |
| 8 | 98.90 | 98.91 | 98.89 | 98.88 | 98.91 | 98.90 | 98.90 | 0.02 | |

表中 I ~ VI 为协作定值实验室所测的 6 个重复。

测定结果总平均值为:

$$\bar{X}_{\text{总}} = \frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} X_{ij}}{N} = 98.94$$

实验室平均值的标准偏差为:

$$S_{\bar{X}} = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X}_{\text{总}})^2}{n-1}} = 0.08$$

总平均值标准偏差为:

$$S_{\bar{X}_{\text{总}}} = \frac{\overline{SX}}{\sqrt{n}} = 0.03$$

多家定值引入的不确定度为:

$$u_{\text{定}} = S_{\bar{X}} = 0.03$$

黄柏酮标准样品的不确定度由如下 3 部分组成:(1)均匀性检验不确定度;(2)稳定性检验不确定度;(3)定值不确定度,这 3 部分不确定度分量互不相关,需将 3 种不确定度合成,即合成不确定度($U_{\text{合成}}$)为:

$$U_{\text{合成2}} = u_{\text{均2}} + u_{\text{稳2}} + u_{\text{定2}}$$

代入数据计算得 $U_{\text{合成}} = 0.06\%$

置信区间 95%时, $k=2$

则黄柏酮标准样品的扩展不确定度为: $U_{\text{扩展}} = 2U_{\text{合成}} = 0.06\% \times 2 = 0.12\%$ 。

3 结 论

本研究针对黄柏酮及相关产品缺乏国家标准样品的现状,严格按照国标规定的标样样品研制规则,成功地研制出黄柏酮标准样品。研制过程中对标准样品的均匀性进行考察,并进行了方差分析;稳定性检验采用直线模型,进行 t 检验法考察;定值采用多家实验室协作,对定值结果进行统计分析。根据 3 个方面引入的不确定度,进行不确定度的合成和扩展,获得标准值为 98.94%,置信度 95%的不确定度为 0.12%的黄柏酮国家标准样品,该产品填补了黄柏酮标准样品的国内外空白,具有样品溯源性,可用于相关产品的检测方法评定和含量测定。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [2] ZHAO W, WOLFENDER J L, HOSTETTMANN K, et al. Anti-fungal alkaloids and limonoid derivatives from *Dictamnus dasycarpus* [J]. Phytochemistry, 1998, 47(1): 7-11.

- [3] YOON J, PARK M, LEE J H, et al. Endothelial nitric oxide synthase activation through obacunone-dependent arginase inhibition restored impaired endothelial function in ApoE-null mice [J]. Vascular Pharmacology, 2014, 60(3): 102-109.
- [4] TANAKA T, MAEDA M, KOHNO H, et al. Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats by the citrus limonoids obacunone and limonin [J]. Carcinogenesis, 2001, 22(1): 193-198.
- [5] TANAKA T, KOHNO H, TSUKIO Y, et al. Citrus limonoids obacunone and limonin inhibit azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats [J]. Bio Factors, 2000, 13(1-4): 213-218.
- [6] MURTHY K N C, JAYAPRAKASHA G K, PATIL B S. Obacunone and obacunone glucoside inhibit human colon cancer (SW480) cells by the induction of apoptosis [J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49: 1616-1625.
- [7] MURTHY K N C, JAYAPRAKASHA G K, PATIL B S. Apoptosis mediated cytotoxicity of citrus obacunone in human pancreatic cancer cells [J]. Toxicology in Vitro, 2011, 25(4): 859-867.
- [8] KIM J, JAYAPRAKASHA G K, PATIL B S. Obacunone exhibits anti-proliferative and anti-aromatase activity *in vitro* by inhibiting the p38 MAPK signaling pathway in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells [J]. Biochimie, 2014, 105: 36-44.
- [9] MURTHY K N C, JAYAPRAKASHA G K, PATIL B S. Cytotoxicity of obacunone and obacunone glucoside in human prostate cancer cells involves Akt-mediated programmed cell death [J]. Toxicology, 2015, 329(2): 88-97.
- [10] 中国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 标准样品工作导则(2) 标准样品常用术语及定义: GB/T 15000.2-94[S]. 北京: 中国标准出版社, 1994.
- [11] 中国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 标准样品工作导则(3) 标准样品定值的一般原则和统计方法: GB/T 15000.3-2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [12] SUGIMOTO T, MIYASE T, KUROYANAGI M, et al. Limonoids and quinolone alkaloids from *Evodia rutaecarpa* Benth [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1988, 36 (11): 4453-4461.
- [13] 中国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 数值修约与极限数值的表示和判定: GB/T 8170-2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

(责任编辑:陈海霞)