

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2012.05.028

## 桂林产白花丹茎不同月份白花丹醌含量测定

杜泽乡

(桂林医学院, 广西 桂林 541004)

**摘要:** 采用高效液相色谱法(HPLC),对桂林产的白花丹茎中不同月份的白花丹醌含量进行了测定。结果表明:在流动相为甲醇-水(70:30),检测波长为254 nm的条件下,白花丹醌在0.00048~0.0240 mg·mL<sup>-1</sup>之间线性关系良好;回收率为96.9%~100.0%,白花丹茎中白花丹醌含量10月份最高,这时也是白花丹茎生物产量的高峰期,说明10月份是白花丹茎的最佳采收期。

**关键词:** 白花丹; 白花丹醌; 含量; 高效液相

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2012)03-0424-03

## Determination of the plumbagin content in the stems of *Plumbago zeylanica* during different months in Guilin

DU Ze-Xiang

(Guilin Medical College, Guilin 541004, China)

**Abstract:** The plumbagin content in stems of *Plumbago zeylanica* was determined during different months in Guilin, China, using RP-HPLC, methanol and H<sub>2</sub>O (70:30) as mobile phase and UV detection at 254 nm. Linear range over 0.00048-0.0240 mg·mL<sup>-1</sup> of plumbagin was obtained. Recovery rate was within 96.9%-100.0%. The content in stems of *P. zeylanica* was the highest in October when the plant was the most thriving and biggest in size. It was therefore considered that October was the best time for collecting stems.

**Key words:** *Plumbago zeylanica*; plumbagin; content; HPLC

白花丹(*Plumbago zeylanica*)为蓝雪科(Plumbaginaceae)植物,主要分布在东南亚和我国的华南、西南地区,为东南亚及中国多民族药材。白花丹味辛、苦、性温、微毒,临床上用于治疗风湿性关节炎、跌打损伤、痛经、癩癧、癩疔、蛇伤、疟疾等。其根、茎、叶、花均可作药用。现代药理实验研究表明,其提取物具有抑菌、抗氧化、抑制葡萄糖酵解、抗肝损害、抗生育、抗肿瘤等作用(毛绍春等,2007;甘炳青等,2005;Tilak,2002)。白花丹醌是该药材的主要活性成分,具有抗生育、抗菌、抗白血病等作用,能抑制P388淋巴细胞白血病、宫颈癌、肝癌等多种肿

瘤细胞增值、诱导细胞凋亡及阻滞细胞周期进程(杜泽乡等,2011;刘圆等,2007;赵艳丽等,2006;秦贻强等,2001;颜晓燕等,2006)。

植物在不同生长发育阶段,其有效成分积累会有差异。目前有关白花丹茎中不同月份的白花丹醌含量变化尚未见相关文献报道。本研究以不同月份采收的桂林产白花丹的茎为材料,考察其2010年1~12月份白花丹醌含量变化,找出白花丹茎中白花丹醌含量高峰期,为确定白花丹茎的最佳采收期提供科学依据,并为白花丹茎质量标准的制定及其临床用药量的确定提供参考。

\* 收稿日期: 2011-12-13 修回日期: 2012-04-18

基金项目: 广西教育厅科研基金(200626)[Supported by Science Research Fund of Education Department of Guangxi(200626)]

作者简介: 杜泽乡(1958-),女,湖北武汉人,副教授,研究方向为天然药物开发利用,(E-mail)zexiangdu@126.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和仪器

药材采于桂林医学院药用植物园,由桂林医学院植物分类学副教授王育生鉴定为白花丹(*Plumbago zeylanica*);对照品白花丹醌(plumbagin), Lot:034K0960 购自美国 Sigma 公司;甲醇,分析纯,天津大茂化学试剂厂,批号:20080528;甲醇,色谱纯,成都市科龙化工试剂厂,批号:20100302;水为超纯水。

大连伊利特高效液相色谱仪,依利特 Hypersil BDS C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm);AS5150A 超声器(180W 40Hz,天津奥特赛恩斯仪器有限公司);BT224S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);Ak-400A 摇摆式中药粉碎机(温岭市奥力中药机械有限公司)NW-20 超纯水系统(上海康雷分析仪器有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 色谱条件 依利特 Hypersil BDS C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm);流动相为甲醇-水(70:30);检测波长为 254 nm;柱温为 26 °C;流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;进样量:10 μL。

1.2.2 白花丹枝条的预处理 按罗娅君等(2011)的方法,将不同月份采收的白花丹枝条去叶,阴干后置塑料袋中,注明采集时间,封袋口,置冰箱中冷藏,备用。

1.2.3 对照品溶液的制备 精密称取白花丹醌对照品 4.8 mg,置 100 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,充分摇匀,即得对照品储备液,待测。

1.2.4 供试品溶液的制备 取阴干的白花丹茎,经 55 °C 干燥至恒重,粉碎(过 3 号筛),取粉末 5.0 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇溶液 50 mL,冷浸 24 h,再经超声提取 40 min,过滤,滤液移入 50 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜后,即得样品测试液。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱系统适用性试验

白花丹醌对照品溶液及白花丹供试品溶液在上述色谱条件下进样测定,得色谱图(图 1、图 2)。从图 1 和图 2 可以看出,白花丹醌峰形对称、尖锐,供试品中共存成分对白花丹醌测定无干扰。

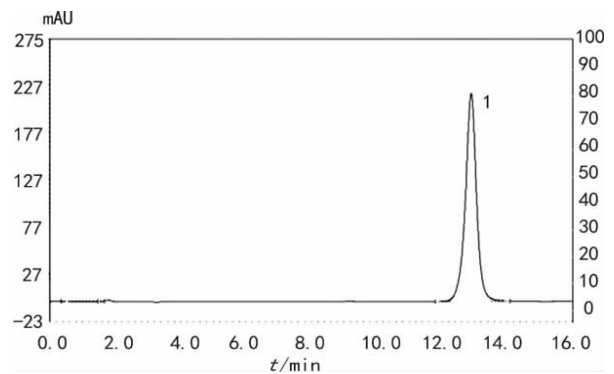


图 1 白花丹醌对照品的色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of plumbagin reference standard

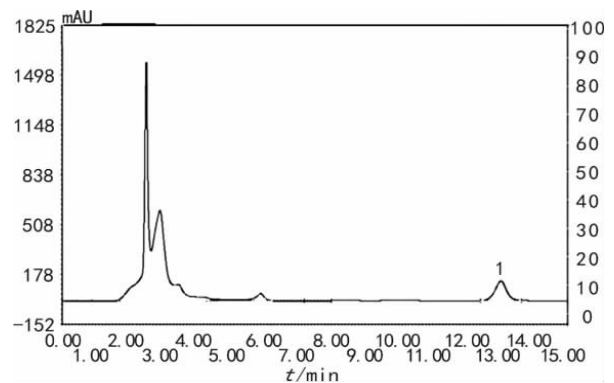


图 2 供试品的色谱图 1:白花丹醌

Fig. 2 HPLC chromatogram of plumbagin sample 1:plumbagin

### 2.2 线性关系考察

精密吸取浓度为 0.048 mg·mL<sup>-1</sup>的对照品溶液 0.1、0.5、1.5、3.0、5.0 mL 将其稀释 10 倍后,分别进样 10 μL,重复测定 2 次,以白花丹醌浓度(mg·mL<sup>-1</sup>)为横坐标,两次进样峰面积平均值为纵坐标绘制标准曲线并计算回归方程,得白花丹醌对照品的回归方程为:Y=89952X-1.3234;相关系数为:r=0.9999。结果表明白花丹醌在 0.00048~0.0240 mg·mL<sup>-1</sup>范围内与峰面积之间呈良好的线性关系。

### 2.3 精密度试验

精密吸取白花丹醌对照品溶液稀释液(7.2 μg·mL<sup>-1</sup>)10 μL,按 1.2.1 所述色谱条件注入高效液相色谱仪中,平行测定 5 次,测得峰面积的 RSD=1.1%(n=5)。

### 2.4 稳定性考察

取同一供试品溶液,按 1.2.1 中色谱条件,分别在 0,3,6,9,12 h 平行进样分析。结果显示,白花丹

醌峰面积的  $RSD=0.7\%$ ,说明测定溶液配制好后,放置 12 h 内测定均可。

### 2.5 重现性试验

精密称取白花丹茎粉末 5.0 g 共 6 份,按 1.2.1 所述色谱条件平行测定 6 次,计算白花丹醌的质量分数, $RSD=1.5\%$ ,表明该方法重现性良好。

### 2.6 加样回收试验

精密称取已知含量的白花丹茎粉末 2.5 g 共 6 份,按照 1.2.4 项制备,在 1.2.1 项色谱条件下测定。计算回收率,结果见表 1。

表 1 回收率试验结果

Table 1 The result of recovery experiments

取样量 Sample (g)	含量 Content (mg)	测得量 Result (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery rate(%)	RSD (%)
2.5125	0.0128	0.0249	96.9		
2.5120		0.0247	99.2		
2.5126		0.0254	100.0	98.7	1.1
2.5122		0.0248	98.4		
2.5127		0.0253	98.4		
2.5124		0.0251	99.2		

### 2.7 白花丹茎不同月份白花丹醌含量测定

按 1.2.4 项制备供试品溶液,分别取 1~12 月采收的白花丹茎制备的供试品溶液  $10\ \mu\text{L}$  及对照品溶液  $10\ \mu\text{L}$  注入高效液相色谱仪中,按 1.2.1 项色谱条件进行白花丹醌的含量测定,结果见表 2。表 2 结果表明,桂林产白花丹茎中白花丹醌含量 10 月份最高,达  $0.0429\%$ ,3 月份最低,仅  $0.0213\%$ 。

## 3 结论与讨论

### 3.1 白花丹茎的最佳采收期

目前国内尚未有统一的白花丹醌含量测定标准。刘圆等(2006,2007)的研究结果表明,不同产地、不同药用部位、不同采收期的白花丹药材中白花丹醌的含量差异较大。本研究所采用的不同月份桂林产的白花丹茎样品,均是在每个月的下旬采于同一丛白花丹的不同枝条(去叶),排除了随机取样造成土壤、水分、肥料、海拔等环境因素的影响,且采集的间隔时间较一致,实验结果可比性强。本研究结果表明,桂林产白花丹茎不同月份白花丹醌的含量从 3~10 月呈上升趋势,10~12 月及次年的 1~2 月呈下降趋势,其中 10 月份的含量最高,这和白花丹茎的生物产量,春天 3 月到秋天 10 月呈上升趋势

是一致的。而 10 月开花结果后,白花丹茎不再生长。故 10 月为最佳采收期。

表 2 样品测定结果

Table 2 Sample test result

样品号 No.	药材采收期(年-月) Gather date	白花丹醌 Plumbagin (%)
1	2010-01	0.0272
2	2010-02	0.0236
3	2010-03	0.0213
4	2010-04	0.0220
5	2010-05	0.0257
6	2010-06	0.0317
7	2010-07	0.0329
8	2010-08	0.0341
9	2010-09	0.0361
10	2010-10	0.0429
11	2010-11	0.0371
12	2010-12	0.0338

### 3.2 白花丹药材的合理利用

白花丹根、茎、叶、花均可药用。广西壮医用其叶治疗跌打损伤、肝脾肿大;云南傣医用其干根以祛风除湿、散瘀消肿,治风湿疼痛、肝区疼痛;新疆维吾尔医用其茎枝主治白癜风、偏瘫、胃腹胀痛及牛皮癣等症(霍仕霞等,2010),但药用部位不同,白花丹醌含量差异较大,其中根含白花丹醌达千分之几,而茎只含万分之几(刘圆等,2006)。因此,用茎入药比用根入药应当适当提高用药量,建议通过药理实验找出适当的根和茎的用药量,在制定质量标准时,应考虑根和茎中白花丹醌含量的差别,分别制定。

### 3.3 高效液相色谱法测定药材白花丹中的白花丹醌含量的优点

高效液相色谱法测定药材白花丹茎中的白花丹醌,方法简便、准确,有助于白花丹茎质量标准制定。

### 参考文献:

- 颜晓燕,盛艳梅,辛志伟. 2006. 民族药材白花丹体外抗肿瘤活性研究[J]. 成都医学院学报,1(2):106-108
- Du ZX(杜泽乡),Sun Q(孙倩),Qiao W(乔伟),et al. 2011. Effect of plumbagin on cell proliferation and apoptosis in tongue cancer cell line(白花丹素对人舌癌 Tca 细胞增殖及凋亡作用的探讨)[J]. Lishizhen Med & Mat Med Res(时珍国医国药), (4):942-944
- Gan BQ(甘炳青),Yang XQ(杨新全),Li RT(李榕涛). 2005. Collect and put in order the Li nationality folk of treat traumatological medicinal crop(黎族民间治疗外伤药用植物的收集整理)[J]. Chin J Ethnomed & Ethnopharm(中国民族民间医药杂志), 77:357-360
- Huo SX(霍仕霞),Yan M(闫明),Liu XD(刘晓东),et al. (下转第 349 页 Continue on page 349)

当  $P_n$  和  $C_i$  变化方向相同, 两者都降低, 才可认为光合速率的下降主要由气孔导度引起的; 如  $P_n$  和  $C_i$  变化方向相反, 则  $P_n$  下降应归因于叶肉细胞同化能力的降低。11:30~14:30, 100%  $RI$  下吴茱萸  $P_n$  与  $C_i$  均下降, 且此时的  $G_s$  也下降, 表明此时的光合午休现象是由气孔部分关闭, 气孔导度下降造成的。各遮荫处理下, 吴茱萸的  $P_n$  日变化均呈“单峰型”, 并无第二峰的出现, 可能与遮荫条件下, 16:00 左右光强较弱, 环境温度较高, 空气相对湿度较低有关。

2008 年 9 月下旬, 我们对吴茱萸的幼苗进行了光合日变化测定, 发现吴茱萸的光合日变化也呈“双峰型”, 但导致光合午休现象的主要原因为非气孔限制因素, 因为中午前后环境光强均在  $1\ 500\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  以上, 最高达  $1\ 800\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (孙世荣等, 2009)。10 月下旬, 光合有效辐射降低 (最高光强为  $1\ 340\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), 空气湿度低, 全日光下虽仍然有光合午休现象发生, 但主要原因为气孔限制因素。10 月下旬, 100%  $RI$  下吴茱萸的  $P_n$  最大, 该时间段 (10 月 14 日~11 月 13 日) 吴茱萸的株高和地径增长量均达整个生长季较高水平 (图 2: A, B)。6~9 月, 环境光合有效辐射强, 100%  $RI$  下吴茱萸受非气孔限制因素影响, 其  $P_n$  受到抑制,  $P_n$  值低于其它遮荫处理, 推测这是至一年生长季末, 100%  $RI$  下吴茱萸的株高、地径和冠面积最小的原因。

#### 参考文献:

- 典[M]. 北京: 北京人民卫生出版社
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. 2000. Biochemistry and molecular biology of plants[M]. Rockville: The American Society of Plant Physiologist; 2-50, 260-310, 568-628
- Zhang WX(张往祥), Wu JS(吴家胜), Cao FY(曹福亮). 2002. Influence of photosynthetically active radiation on photosynthesis and photochemistry efficiency in leaves of Ginkgo(光强对银杏光合作用和光化学效率的影响)[J]. *J Nanjing Fore Univ*(南京林业大学学报), 26(6): 5-9
- He KJ(何科佳), Wang ZY(王中炎), Wang RC(王仁才). 2007. Effects of overhead shading in summer on ecological factors and photosynthesis of kiwifruit orchard(夏季遮阴对猕猴桃园生态因子和光合作用的影响)[J]. *J Fruit Sci*(果树学报), 24(5): 616-619
- Gregoriou K, Pontikis K, Vemmos S. 2007. Effects of reduced irradiance on leaf morphology, photosynthetic capacity, and fruit yield in olive(*Olea europaea*)[J]. *Photosynthetica*, 45(2): 172-181
- Wang QZ(王奇志), Liang JY(梁敬钰). 2004. Survey on chemical constituents and physiological activities of *Evodia* Forst. Plants(吴茱萸属植物化学成分和生理活性的研究近况)[J]. *Chin Trad & Herb Drug*(中草药), 35(8): 7-10
- Wang SY(王世永), Li XD(李小定). 2008. Study on the extraction methods and quantity determination of evodiamine and rutaecarpine in *Evodia Rutaecarpa*(吴茱萸中吴茱萸碱和次碱的提取及测定)[J]. *Hubei Agric Sci*(湖北农业科学), 47(3): 41-343
- Zhou HZ(周红祖), Yu H(余惠), Peng QX(彭求贤). 2008. Progress in chemical composition, pharmacology and the natures for different ratios of *Coptis chinensis* and *Fructus evodiae*(黄连与吴茱萸及其不同配伍的化学成分、药理及药性研究进展)[J]. *Chin J Exp Trad Med Form*(中国实验方剂学杂志), 14(9): 75-77
- Farquhar GD, Shakey TD. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis[J]. *Ann Rev Plant Physiol*, 33: 317-345
- Sun SR(孙世荣), Jiang YS(蒋运生), Li H(李虹), et al. 2009. Study on diurnal changes of photosynthesis in *Evodia rutaecarpa*(吴茱萸光合日变化研究)[J]. *J Fujian Fore Sci & Tech*(福建林业科技), 36(4): 104-107
- 中华人民共和国卫生部药典委员会. 1995. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 人民卫生出版社
2010. Determination of trace elements in *Plumbago zeylanica* (白花丹中微量元素的测定)[J]. *Chin Pharm*(中国药房), 21(11): 1 008-1 009
- Luo YJ(罗娅君), Bian QQ(边清泉), Chen J(陈佳), et al. 2011. Determination of vitexin in *Vitex negund* var. *camabifolia* by HPLC(HPLC 法测定牡荆中牡荆素的含量)[J]. *Guihaia*(广西植物), 31(3): 418-421
- Liu Y(刘圆), LC(刘超). 2007. RP-HPLC measurement plumbagin contents in different place of production of *Plumbago zeylanica*(RP-HPLC 测定不同产地白花丹中白花丹醌的含量)[J]. *Chin J Pharm*(中国药理学杂志), 42(8): 1 429-1 430
- Liu Y(刘圆), Deng C(邓超), Deng F(邓放), et al. 2006. RP-HPLC measurement plumbagin contents in different part of *Plumbago zeylanica* of national crude drugs((RP-HPLC 法测定民族药材白花丹不同药用部位中白花丹醌的含量)[J]. *Chin J Chin Mat Med*(中国中药杂志), 31(20): 1 684-1 685
- Mao SC(毛绍春), Li ZY(李竹英), Li C(李聪). 2007. Study on antioxidant activity of extract object from *Plumbago zeylanica* (白花丹提取物抗氧化活性研究)[J]. *Appl Tech*(应用科技), 34(1): 63-65
- Qin YQ(秦贻强), Cai XL(蔡小玲). 2011. The recent studing developments of *Plumbago zeylanica* (白花丹的研究近况)[J]. *Chin Nat Folk Med*(中国民族民间医药), 18(10): 30-31
- Zhao YL(赵艳丽), Lu DP(陆道培). 2006. Effects of plumbagin on the human acute promyelocytic leukemia cells *in vitro* (白花丹醌对人急性早幼粒细胞白血病细胞的体外效应)[J]. *J Exper Hematol*(中国实验血液学杂志), 14(2): 208-211
- Tilak JC, Devasagayam TPA, Banerjee. 2002. Differential antioxidant effects of plumbagin in rat tissues[J]. *Barc Newsl*, 225: 117-129

(上接第 426 页 Continue from page 426)