

白鲜皮中白鲜碱的分离及抗炎活性

时东方¹, 郑梅竹¹, 赵立春², 张红晶³, 李丽¹, 刘春明^{1*}

(1. 长春师范学院, 长春 130032; 2. 广西中医学院附属瑞康医院, 南宁 530011;
3. 长春迪瑞医疗科技有限公司, 长春 130012)

[摘要] **目的:**提取分离白鲜碱单体,对白鲜皮醇提取物及白鲜碱单体进行抗炎效果检测。**方法:**采用高速逆流色谱分离的方法分离得到白鲜碱单体;利用小鼠耳廓肿胀及小鼠腹腔毛细血管渗透性实验确定待试物抗炎活性。**结果:**选择正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水(1:1:1:1)溶剂系统对白鲜皮醇提取物进行分离,经 HPLC 检测,所分离白鲜碱纯度达 98%。白鲜皮粗提物的各剂量组可显著抑制由二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀,抑制率分别为 44.26%,52.46%,44.26%,差异显著($P < 0.05$);白鲜碱中剂量组对小鼠耳廓肿胀亦有抑制作用,抑制率为 25.00%,且差异显著($P < 0.01$);但在抑制醋酸致小鼠腹腔毛细血管渗透性增高方面,低剂量组效果不明显。**结论:**高速逆流色谱分离白鲜碱,简单快速易于操作,且具有较好的分离效果;白鲜皮醇提取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。

[关键词] 白鲜皮;白鲜碱;高速逆流色谱;分离;抗炎

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0128-04

Isolation and Anti-inflammatory Effect of Dictamnine Extracted from Dictamni Cortex

SHI Dong-fang¹, ZHENG Mei-zhu¹, ZHAO Li-chun², ZHANG Hong-jing³, LI Li¹, LIU Chun-ming^{1*}

(1. Changchun Normal University, Changchun 130032, China;

2. Ruikang Hospital of Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530011, China;

3. Changchun Dirui Medical Technology Co., Ltd, Changchun 130012, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the anti-inflammatory effects of ethanol extracts and dictamnine extracted and isolated from Dictamni Cortex. **Method:** High performance centrifugal partition chromatography method was used for separation of the essential dictamnine, and anti-inflammatory effects of ethanol extracts and dictamnine were investigated by xylene-induced aruical swelling in mice and the abdominal capillary permeability in mice. **Result:** Separation was performed with a two-phase solvent system composed of hexane ethylacetate-ethanol-

[收稿日期] 20120309(002)

[基金项目] 吉林省发改委项目[吉发改高技(2010)362号];吉林省教育厅项目[吉教科合字(2012)第225号]

[第一作者] 时东方,讲师,从事微生物及天然产物研究,Tel:13944166212, E-mail:shidongfang3@163.com

[通讯作者] *刘春明,从事天然产物研究,Tel:0431-86168777, E-mail:chunmingliu2000@yahoo.com.cn

[3] 赵桂琴,董俊兴. 素馨花三萜皂苷类化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(1): 38.

[4] Wu Y B, Zheng C J, Qin L P, et al. Antiosteoporotic activity of anthraquinones from *Morinda officinalis* on osteoblasts and osteoclasts [J]. *Molecules*, 2009, 14 (1): 573.

[5] 尚小雅,李帅,石建功,等. 红绒毛羊蹄甲的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31 (23): 1953.

[6] Ma H Y, Wang C H, Yang L. Chemical constituents of

the bulbs of *Senecio cannabifolius* var. *integrifolius* [J]. *Chin J Nat Med*, 2009, 7 (1): 28.

[7] Harris T M, Hay J V, Quarterman E. Isolation of 2-(4-hydroxybenzyl) malic acid from *Petalostemon gattingeri* [J]. *J organic Chem*, 1973, 38 (26): 4457.

[8] 王金兰,华准,赵宝影,等. 牵牛全草的化学成分研究(II)[J]. 中成药, 2011, 33 (3): 489.

[责任编辑 邹晓翠]

water (1:1:1:1). The purity of dictamnine obtained was 98% determined by high performance liquid chromatograph. The results showed that each dosage of ethanol extracts could significantly ($P < 0.05$) suppress the mouse auricle which caused by the xylene swelling (being 44.26%, 52.46%, 44.26%, respectively), as compared with the control group. The medium-dosage group of dictamnine could obviously ($P < 0.01$) suppress the mouse auricle but the dosage was not increased significantly in abdominal capillary permeability in mice compared with control group. **Conclusion:** HPCPC is a recommendable method to prepare and purify the dictamnine with good separation and the method is simple, accurate and easy to operate. The results showed that ethanol extracts and dictamnine showed different anti-inflammatory effect in variety of animal models of anti-inflammatory.

[**Key words**] Didamni Cortex; dictamnine; high performance centrifugal partition chromatography; separation; anti-inflammatory

白鲜碱为芸香科白鲜属植物白鲜 *Dictamnus dasycarpus* Turcz. 和狭叶白鲜 *D. angus tifolius* G. Doc 所含的生物碱类成分^[1],白鲜皮具有清热燥湿、祛风解毒、止痒的功效^[2],现代药理研究发现其具有抗炎、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤等多种活性^[3-4],但目前国内尚未见其抗炎有效成分的确切报道。作者利用高速逆流色谱技术分离纯化白鲜皮中白鲜碱单体成分,利用 HPLC 技术对所分离成分进行纯度检测,并采用二甲苯致小鼠耳廓肿胀动物模型及冰醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增高实验,对不同浓度白鲜皮醇提物、白鲜碱单体成分抗炎活性进行初步研究,以探讨白鲜皮粗提物、白鲜碱单体的抗炎药理作用,为开发以白鲜皮为原材料的抗炎类新药提供依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 白鲜皮购于北京同仁堂药店(长春分店),白鲜碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111654-200301),正己烷、乙酸乙酯、无水乙醇及 95% 乙醇(分析纯,北京化工厂),甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司),超纯水为实验室自制(18.2 Ω Pa),二甲苯(分析纯,北京北化),冰醋酸(分析纯,北京北化),生理盐水(浙江济民制药有限公司),吡啶美辛肠溶片(山西云鹏制药有限公司)。

1.2 仪器 HPCPC-80 型高速逆流色谱仪(日本),UV 检测器;Waters 2695-2998 型高效液相色谱仪(美国),PDA 检测器,C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm,5 μ m,美国 Waters 公司)和 C₁₈ 保护柱;S180H 型超声波提取仪(德国 Elma 公司);Sanorius BSH10S 型分析天平(北京赛多利斯有限公司,1/10 万);HS-Z11-II 型电热蒸馏水器(上海跃进医疗器械厂);纯水器(法国 Milli Q 公司);752 型紫外光栅分光光度计(上海精科实业有限公司)。

1.3 动物 昆明种小鼠,18 ~ 22 g,雄性。购自吉

林大学实验动物中心,质量合格证号 SCXK-(吉)2008-0005。

2 方法

2.1 受试药物的制备

2.1.1 白鲜皮粗提物的制备 精确称取 50.002 g 药材粉末,以 85% 乙醇溶液为提取溶剂,料液比为 1:20,80 $^{\circ}$ C 水浴回流提取 2 次,提取时间为 1 h,合并滤液并用旋转蒸发器减压浓缩至干,真空干燥器中干燥,保存。

2.1.2 白鲜碱单体的制备 高速逆流色谱分离并用高效液相色谱检测,得到白鲜碱单体。高速逆流色谱分离条件为:溶剂系统为正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水(1:1:1:1),上相作为固定相,下相作为流动相,检测波长 228 nm,流速 1.3 mL·min⁻¹,转速 1 200 r·min⁻¹,运行时间 180 min。柱温 25 $^{\circ}$ C,流动相甲醇-水(58:42),流速 0.8 mL·min⁻¹,进样量 10 μ L;检测波长 228 nm^[5]。

2.2 抗炎活性检测

2.2.1 白鲜皮粗提物及白鲜碱小鼠耳廓肿胀实验 取小鼠 50 只,随机分为 5 组(正常对照组、阳性对照组及 3 个剂量组)。分别如表 1 所示不同梯度剂量灌胃给药,每日 1 次,连续 3 d,末次药后 1 h,各鼠左耳前后两面涂 0.1 mL 的二甲苯(100%),右耳作为自身对照,4 h 后颈椎脱臼处死动物,用直径 9 mm 打孔器,在各鼠左右耳相同部位打下圆耳片,用电子分析天平精密称质量,左右耳片质量差为肿胀程度,计算肿胀程度及肿胀抑制率。

2.2.2 白鲜皮粗提物及白鲜碱小鼠毛细血管渗透性试验 取雄性小鼠 50 只,随机分为 5 组(分组剂量同上),每组 10 只,按表 2 所示剂量灌胃给药,每日 1 次,连续 7 d。于末次给药后 30 min,小鼠依次尾静脉注射 0.5% 伊文思蓝生理盐水溶液(0.01 mL·g⁻¹),随即依次腹腔注射 0.6% 醋酸(0.2 mL/只),20 min

表 1 白鲜皮乙醇提取物、白鲜碱对二甲苯引起小鼠耳廓肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	耳肿胀程度 /mg	肿胀抑制率 /%
空白对照	-	6.10 ± 2.42	-
吡嗪美辛片	10	3.70 ± 0.82 ¹⁾	39.34
白鲜皮乙醇提取物	14.04	3.40 ± 0.70 ¹⁾	44.26
	7.02	2.90 ± 0.99 ¹⁾	52.46
	3.51	3.40 ± 1.26	44.26
白鲜碱	4.8	3.20 ± 0.63	0
	2.4	2.40 ± 0.52 ²⁾	25.00
	1.2	3.20 ± 0.92	0

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

后脱臼处死,腹腔注射生理盐水 6 mL,轻按小鼠腹部,抽取腹腔液 3 mL,3 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液置 752 型紫外光栅分光光度计上,590 nm 处测吸光度(A)。

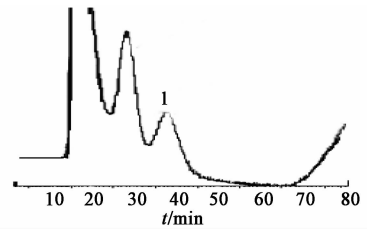
表 2 白鲜皮乙醇提取物、白鲜碱对醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增加的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	A
对照	-	0.11 ± 0.043
吡嗪美辛片	10	0.08 ± 0.025
白鲜皮乙醇提取物	14.04	0.11 ± 0.068
	7.02	0.10 ± 0.030 ²⁾
	3.51	0.11 ± 0.057
白鲜碱	4.8	0.10 ± 0.131
	2.4	0.10 ± 0.137
	1.2	0.08 ± 0.042

2.3 统计学处理 数据采用 SPSS 软件分析,结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

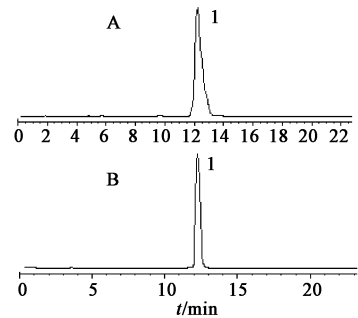
3.1 应用高速逆流色谱分离白鲜皮中白鲜碱 将上相(固定相)以 3.0 mL·min⁻¹的流速泵入并确定充满分离螺旋管后暂停泵的工作,同时按选定的转速启动主机、开启检测器,在 228 nm 波长下进行检测。等待主机转动稳定后将下相(流动相)以选定的流速泵入,待流动相从管柱出口流出且基线稳定后将样品溶液由进样圈注入(样品为白鲜皮乙醇提取物用溶剂系统的上下层溶剂各 1 mL 溶解)。管柱出口处的流出物经紫外检测器检测,根据 HPCPC 色谱峰接收 A 段流份,蒸干,待测。见图 1。



A. 白鲜碱

图 1 粗提物的高速逆流色谱分离

3.2 白鲜碱单体成分的纯度检测 按图 2 中 HPCPC 色谱峰接收图中的流份 1,减压浓缩后用甲醇溶解,过 0.45 μm 微孔滤膜,利用 HPLC 检测并与白鲜碱对照品比对,粗提物经 HPCPC 分离得到单体化合物 1 为白鲜碱,用峰面积归一法测得峰 1 接收液纯度达到 98% 以上。



A. 流份 1; B. 对照品; 1. 白鲜碱

图 2 白鲜皮粗提物 HPLC

3.3 白鲜皮粗提物及白鲜碱对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 结果表明,白鲜皮醇提物的高、中、低 3 个剂量组对由二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀有明显的抑制作用,差异显著($P < 0.05$)。白鲜碱中剂量组对由二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀有抑制作用,且差异显著($P < 0.01$),但是低剂量组及高剂量组无明显抑制作用。见表 1。

3.4 白鲜皮粗提物及白鲜碱对小鼠毛细血管通透性的影响 白鲜皮粗提物高剂量可抑制醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性的增高,但是作用效果与给药剂量未见明显的量效关系。与对照组相比,白鲜碱中、高剂量可抑制醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性的增高,但是随着给药剂量的下降,其效果不是很明显,且出现了剂量与通透性结果负相关的现象。见表 2。

4 讨论

高速逆流色谱技术是起源于 20 世纪 50 年代的多级萃取分离技术,具有高效且快速的特点^[6]。采用 HPCPC 制备白鲜碱单体,分离时间较短(约 70

柴芩水提液退热有效部位的研究

杨江萍, 高增平, 谢鸣*

(北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] **目的:**比较分离的柴胡-黄芩水提液各有效部位对脂多糖诱导的发热小鼠模型的退热影响。**方法:**柴胡-黄芩水提液经 AB-8 型大孔树脂柱净化,依次用水,20%,40%,60%和90%乙醇梯度洗脱,通过化学反应检识,合并组成相近的流份得到4个部位;观察各部位对脂多糖诱导的小鼠发热模型的退热作用。**结果:**柴胡-黄芩水提液经分离得到的4个部位分别为糖类(A)、皂苷类(B)、皂苷及黄酮苷类(C)、黄酮苷元及皂苷元(D);4个部位均具有不同程度的退热作用($P < 0.05$),其中以D部位的退热作用最好($P < 0.01$)。**结论:**柴胡-黄芩水提液退热作用涉及多个部位。

[关键词] 柴胡-黄芩; 水提液; 退热; 有效部位

[中图分类号] R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0131-04

Study on Antifebrile Parts for Chaiqin Decoction

YANG Jiang-ping, GAO Zeng-ping, XIE Ming*

(Beijing university of Chinese medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** This study was designed to evaluate the effect of the antipyretic effective fraction from the decoction of *Bupleurum chinese* and *Scutellaria baicalensis* in fever model mice induced by lipopolysaccharide (LPS). **Method:** Four fractions were obtained by using AB-8 macroporous resin column to purify the decoction of *B. chinese* and *S. baicalensis*. Through chemical reactions to identify the major types of components, the flow of a merger similar gain four parts. Then the anus temperature of mice was tested to observe

[收稿日期] 20120309(005)

[第一作者] 杨江萍, 讲师, 在读博士, 从事方剂效应及物质基础的研究

[通讯作者] * 谢鸣, 教授, 博士生导师, 从事方剂学基础与运用研究, Tel: 010-64286992, E-mail: xieming603@263.net

min),且纯度相对较高(98%),从HPLC鉴定结果看,流动相选择甲醇-水(58:42)亦可以达到分离要求,高速逆流色谱技术的应用为白鲜皮中单体成分的高效分离制备提供了一条新的技术路线。

二甲苯致小鼠耳廓肿胀及小鼠腹腔毛细血管渗透是常用的急性炎症模型,主要表现为局部的充血、水肿及毛细血管通透性等病理反应,是研究药物抗炎的常见模型。对于待试物的抗炎活性的动物模型效果显示,白鲜皮粗提物、白鲜碱能够显著降低二甲苯致小鼠耳廓肿胀程度,说明其具有明显的抗炎作用,但是在抑制醋酸致小鼠腹腔毛细血管渗透性增高方面,高剂量有抑制的趋势,低剂量效果不明显,需要进一步重复及验证,以确定抗炎效果。

[参考文献]

- [1] 李翔, 汤华钊, 苟小军, 等. 白鲜皮的化学成分研究[J]. 中药材, 2008, 32(12): 1816.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2005: 265.
- [3] 王蓉, 徐强, 徐丽华. 白鲜皮的免疫药理研究[J]. 中国药科大学学报, 1992, 23(4): 234.
- [4] 李静晖, 睢大策, 马文丽, 等. 白鲜皮粗多糖对大鼠LPO和SOD的影响[J]. 长春医学院学报, 1995, 11(5): 72.
- [5] 张玲, 李云涛, 王丽娜, 等. HPLC法测定白鲜皮中白鲜碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(9): 8.
- [6] Ito Y, Conway W D. High speed countercurrent chromatography[M]. New York: John Wiley, 1996.

[责任编辑 邹晓翠]