

蒲公英抑菌提取液氯仿萃取部位高效液相色谱指纹图谱的研究

黄景怡¹, 钟振声²

(1. 广东纺织职业技术学院, 广东佛山 528041) (2. 华南理工大学化学与化工学院, 广东广州 510640)

摘要:以咖啡酸作为对照物, 构建蒲公英抑菌提取液氯仿萃取部位的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。本实验方法采用HPLC方法: Diamonsil C₁₈ (5 μm, 4.6 mm×250 mm) 色谱柱, 流动相采用乙腈-水-10%乙酸溶液三相系统进行梯度洗脱, 流速0.7 mL/min, 检测波长323 nm, 柱温37 °C。指纹图谱得到12个共有色谱峰, 并可根据这些色谱峰来控制蒲公英抑菌提取液的质量。

关键词:蒲公英; 抑菌; 氯仿部位; 高效液相色谱; 指纹图谱

文章编号: 1673-9078(2010)1-46-3

HPLC Fingerprint of Extracts of *Taraxacum Bacteriostatic* by Chloroform

HUANG Jing-yi¹, ZHONG Zhen-sheng²

(1. Guangdong Institute of Textile technology, Foshan 528041, China)(2. School of chemistry and chemical technology, South China University of technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Caffeic acid was used as internal standard for the HPLC fingerprint establishment of chloroform extract from *Taraxacum bacteriostatic*. HPLC analysis was performed on a Diamonsil C₁₈ column (5 μm, 4.6 mm×250 mm) with the three-phase system of acetonitrile-water-10% acetic acid solution as the mobile phase for gradient elution. The flow rate, detection wavelength and column temperature were 0.7 mL/min, 323 nm and 37 °C, respectively. 12 Common peaks were showed in the fingerprint, which can be used to control the quantity of the *Taraxacum bacteriostatic* extraction.

Key words: Taraxacum; Bacteriostatic; chloroform part; HPLC; fingerprint

蒲公英为菊科植物蒲公英 (*Taraxacum mongolicum* Hand.Mazz)、碱地蒲公英 (*Taraxacum officinale* Kitag.) 或同属数种植物的干燥全草。味苦, 性寒, 归肝胃经。具清热解毒, 消肿散结, 利胆利尿功效^[1]; 除此以外, 还对霉菌、细菌有显著的抑制作用^[2]。目前对蒲公英指纹图谱的研究主要集中在药用上面, 其在抑菌方面指纹图谱的研究鲜见报道。鉴于植物药具有复杂的化学成分, 而其活性成分常常不很明确的状况, 色谱指纹图谱方法是评价植物药质量的有效方法之一^[3]。因为中药中大部分化学成分均可用HPLC得出较好的指纹图谱, HPLC法已成为广泛应用的指纹图谱技术^[4]。为了更好的对蒲公英提取液在抑菌方面的研究和质量控制, 本实验针对蒲公英提取液的指纹图谱, 力图用HPLC方法对其氯仿萃取部分进行研究。

1 实验仪器与材料

美国 Waters 高效液相色谱仪: Waters 996-光电二级管阵列检测器, 四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、

收稿日期: 2009-05-15

在线真空脱气机。0.45 μm 微孔滤膜(尼龙、纤维素, 江苏淮阴汉邦科技有限公司)。旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

甲醇、乙腈为色谱纯(进口), 其他试剂为分析纯。蒲公英(山西产, 购于广州五山仁仁堂药店)。黑曲霉 (*A. niger*), 宛氏拟青霉 (*Paecilomyces variotii*), 腊叶芽枝霉 (*Cladosporium herbarum*) 均购于广东微生物研究所。咖啡酸标准品由中国生物药品鉴定所提供。

2 实验方法

2.1 色谱条件

Diamonsil C₁₈ (5 μm, 4.6 mm×250 mm) 色谱柱, 流动相采用乙腈-水-10%乙酸溶液三相系统进行梯度洗脱, 流动相: 乙腈(A)、10%乙酸溶液(B)、双蒸水(C), 梯度洗脱程序: 时间为 0、38、40、42 min 时, C(%) 为 88%、18%、18%、88%; B(%) 在洗脱时始终保持 1%。流速 0.7 mL/min, 检测波长 323 nm, 柱温 37 °C, 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取咖啡酸标准品适量,用甲醇溶解,制成0.2 mg/mL 的标准品溶液。

2.3 供试液的制备

称取25.0 g蒲公英供试品粗粉(过18目筛),加250 mL 50%乙醇溶液进行50 °C水浴回流,真空抽滤,然后减压浓缩至25 mL。先后以石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取,获得5个不同极性部位,各萃取部位于旋转蒸发器中蒸干。残渣用甲醇溶解并定容至10 mL,以0.45 μm微孔滤膜过滤至样品小瓶中备用。

2.4 抑菌实验方法^[5]

上述方法制备的各萃取部位对黑曲霉、宛氏拟青霉、腊叶芽枝霉三种霉菌进行抑菌实验,实验结果以抑菌物质的最小抑菌浓度值(MIC)来评价。MIC越小,说明抑菌效果越好。

2.5 方法学考察

2.5.1 重现性试验

取同一批蒲公英药材粗粉,按样品制备方法平行制备6份供试溶液,分别进样测定,其共有峰的相对保留时间的RSD<1%,相对峰面积的RSD<3%,表明样品重复性实验良好。

2.5.2 稳定性和精密度试验

按“2.1”制备蒲公英供试液,分别在配制后0、2、4、6、10、24 h检测HPLC指纹图谱,测得各共有峰的相对保留时间的RSD<1%,相对峰面积的RSD<3%,结果表明样品在24 h内稳定,仪器精密度符合要求。

3 结果

3.1 蒲公英提取液不同萃取部位的MIC

表1 蒲公英提取液不同萃取部位的最小抑菌浓度值/(g/mL)

Table 1 MIC of different parts of extracts from *Taraxacum* / (g/mL)

| 萃取部位 | 黑曲霉 | 宛氏拟青霉 | 蜡叶芽枝霉 |
|-------|-------|-------|-------|
| 石油醚层 | >1.0 | >1.0 | >1.0 |
| 氯仿层 | 0.125 | 0.25 | 0.125 |
| 乙酸乙酯层 | 0.25 | 0.25 | 0.5 |
| 正丁醇层 | >1.0 | 0.75 | 1.0 |

实验结果表明蒲公英50%乙醇提取液的氯仿部位对选用霉菌的抑制作用最强(如表1),说明了蒲公英的抑菌物质在氯仿萃取部位最为集中且有效,后面的指纹图谱主要研究氯仿萃取部位。

3.2 蒲公英提取液氯仿部位指纹图谱的建立及共有峰的确立

比较10批蒲公英提取液氯仿萃取部位谱图的相关参数,其中12个峰是各批供试品共有的,因此确定这

12个峰为其共有指纹峰。以咖啡酸为参照物,其峰选作为s峰(见图1),以其相对保留时间为标准,其余各共有峰的保留时间与此相比,计算图谱中各共有色谱峰的相对保留时间(见表2)。结果10批样品测定中,12个共有指纹峰相对保留时间的RSD皆小于2%,说明在实际样品测定中,所得各峰的相对保留时间较为一致,建立的方法可靠,仪器运行稳定。在所测定的10批样品中,12个共有指纹峰总峰面积的RSD为1.75%。以咖啡酸的峰面积为标准,各共有色谱峰的峰面积与此相比,计算其相对峰面积(见表3),结果其峰面积比值的RSD均不超过25%,说明样品的质量相对稳定。

4 讨论

色谱条件的选择是在考察了使用两个流动相的甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸盐缓冲溶液(磷酸调pH为3.7)、乙腈-磷酸盐缓冲溶液(磷酸调pH为3.7)、乙腈-10%乙酸溶液等流动相系统及不同的检测波长后发现,这些流动相系统对样品的分离效果不好,最后使用三个流动相的流动相系统,即乙腈-水-10%乙酸溶液系统,在检测波长为323 nm得到的分离效果较好,系统压力较小,分析时间较短。在此基础上对有机相和水相、缓冲溶液的比例进行考察,最终选择色谱峰个数多、峰形较好、分离度大、基线平稳及分析时间合适的梯度洗脱条件。

基于中药指纹图谱的基本属性应是“整体性”和“模糊性”,绝对的指纹图谱的重现性不可能,也无必要^[6],实验中对这一区域的色谱峰只求形似,不再做进一步要求。考虑到咖啡酸是《中国药典》中评价蒲公英药效及已证明具有抑菌功效的成分,因此选取咖啡酸作为对照物来建立蒲公英提取液氯仿部位的抑菌指纹图谱;该指纹图谱的建立,为以后的中草药抑菌指纹图谱的研究提供了方便可行的方法,并为建立工业生产中蒲公英提取抑菌成分的质量标准打下基础。

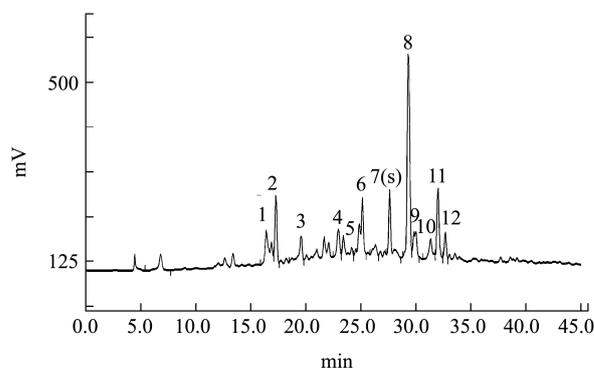


图1 蒲公英提取液氯仿部位的HPLC图

Fig.1 HPLC figure of extracts of *Taraxacum* by chloroform

表2 10 批蒲公英提取液氯仿部位抑菌指纹图谱共有峰的相对保留时间

Table 2 Relative reserve time of common peaks in fingerprints of extracts from ten *Taraxacum* samples by chloroform

| 样品号 | 共有峰序号 | | | | | | | | | | | |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 (s) | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 1# | 0.595 | 0.626 | 0.709 | 0.831 | 0.880 | 0.911 | 1.0 | 1.060 | 1.079 | 1.135 | 1.159 | 1.222 |
| 2# | 0.591 | 0.625 | 0.710 | 0.829 | 0.878 | 0.909 | 1.0 | 1.062 | 1.078 | 1.133 | 1.158 | 1.222 |
| 3# | 0.596 | 0.626 | 0.712 | 0.832 | 0.881 | 0.910 | 1.0 | 1.056 | 1.078 | 1.135 | 1.159 | 1.224 |
| 4# | 0.595 | 0.625 | 0.708 | 0.831 | 0.884 | 0.911 | 1.0 | 1.059 | 1.080 | 1.141 | 1.159 | 1.219 |
| 5# | 0.598 | 0.626 | 0.709 | 0.826 | 0.889 | 0.913 | 1.0 | 1.065 | 1.079 | 1.135 | 1.159 | 1.220 |
| 6# | 0.594 | 0.628 | 0.709 | 0.835 | 0.880 | 0.911 | 1.0 | 1.058 | 1.082 | 1.132 | 1.162 | 1.222 |
| 7# | 0.595 | 0.627 | 0.708 | 0.831 | 0.878 | 0.908 | 1.0 | 1.059 | 1.078 | 1.133 | 1.158 | 1.223 |
| 8# | 0.616 | 0.623 | 0.708 | 0.830 | 0.883 | 0.917 | 1.0 | 1.060 | 1.078 | 1.135 | 1.161 | 1.220 |
| 9# | 0.592 | 0.629 | 0.709 | 0.831 | 0.882 | 0.906 | 1.0 | 1.055 | 1.080 | 1.137 | 1.159 | 1.221 |
| 10# | 0.593 | 0.617 | 0.709 | 0.832 | 0.876 | 0.909 | 1.0 | 1.068 | 1.083 | 1.135 | 1.160 | 1.224 |
| 平均值 | 0.597 | 0.625 | 0.709 | 0.832 | 0.881 | 0.911 | 1.0 | 1.059 | 1.080 | 1.135 | 1.159 | 1.222 |
| RSD(%) | 1.29 | 2.0 | 0.72 | 0.92 | 0.42 | 0.33 | 0 | 0.37 | 0.17 | 0.22 | 0.13 | 0.13 |

表3 10 批蒲公英提取液氯仿部位抑菌指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 3 Relative reserve peak area of public peaks in fingerprints of extracts from ten *Taraxacum* samples by chloroform

| 样品号 | 共有峰序号 | | | | | | | | | | | |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7(s) | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 1 # | 1.036 | 0.924 | 0.515 | 0.500 | 0.466 | 1.297 | 1.0 | 3.462 | 0.539 | 0.457 | 0.983 | 0.343 |
| 2 # | 0.945 | 1.031 | 0.562 | 0.458 | 0.415 | 1.357 | 1.0 | 3.178 | 0.499 | 0.610 | 0.853 | 0.468 |
| 3 # | 1.104 | 0.722 | 0.621 | 0.412 | 0.598 | 1.201 | 1.0 | 3.498 | 0.424 | 0.521 | 0.995 | 0.317 |
| 4 # | 1.020 | 0.855 | 0.398 | 0.814 | 0.708 | 1.108 | 1.0 | 3.245 | 0.531 | 0.437 | 1.145 | 0.263 |
| 5 # | 0.925 | 0.978 | 0.584 | 0.545 | 0.432 | 1.089 | 1.0 | 3.856 | 0.582 | 0.288 | 1.247 | 0.334 |
| 6 # | 1.056 | 0.569 | 0.489 | 0.315 | 0.342 | 1.213 | 1.0 | 4.082 | 0.447 | 0.393 | 0.810 | 0.548 |
| 7 # | 1.256 | 0.998 | 0.762 | 0.481 | 0.411 | 1.312 | 1.0 | 3.612 | 0.398 | 0.447 | 0.943 | 0.237 |
| 8 # | 1.221 | 0.915 | 0.601 | 0.527 | 0.433 | 1.017 | 1.0 | 3.814 | 0.521 | 0.389 | 0.962 | 0.308 |
| 9 # | 1.105 | 0.921 | 0.531 | 0.596 | 0.527 | 1.252 | 1.0 | 3.134 | 0.638 | 0.438 | 0.841 | 0.387 |
| 10 # | 1.028 | 0.844 | 0.512 | 0.613 | 0.498 | 1.222 | 1.0 | 4.083 | 0.461 | 0.422 | 0.976 | 0.298 |
| 平均值 | 1.070 | 0.876 | 0.558 | 0.526 | 0.483 | 1.207 | 1.0 | 3.596 | 0.504 | 0.440 | 0.976 | 0.350 |
| RSD(%) | 9.95 | 15.90 | 17.22 | 23.21 | 21.95 | 8.90 | 0 | 9.844 | 14.66 | 19.18 | 13.85 | 24.06 |

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 244-245

[2] 姜宁, 宋新波. 蒲公英的药理研究进展[J]. 中国中医药杂志, 2008, 6(12): 19-23

[3] 李亦蕾, 晏媛等. 复方蒲公英灌肠液指纹图谱定性和有效成分定量分析方法研究[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(10):

1503- 1505

[4] 晏媛, 许重远, 刘世霆. 中药及其制剂指纹图谱质量标准的研究[J]. Herald of Medicine, 2005, 24(12): 1160-1162

[5] 钟振声, 黄景怡. 蒲公英等五种常见中草药抑菌试验[J]. 现代食品科技, 2007, 23(6): 15-16

[6] 谢培山. 色谱指纹图谱分析是中草药质量控制的可行策略[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 41-51