

> Co - HDME。

的结果见表 4。

3 种金属卟啉配合物仿 SOD 及 CAT 活性比较

表 3 锰卟啉配合物对 H₂O₂ 的分解率

Table 3 The decomposition rates of Mn - HDME on H₂O₂

C/μmol L ⁻¹	Absorbance (A) of reactive time					r	B	P/ %
	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min			
0. 0	0. 002	0. 002	0. 002	0. 002	0. 002			
5. 5	0. 034	0. 047	0. 060	0. 071	0. 083	0. 999	0. 0024	14. 4
11. 0	0. 052	0. 084	0. 121	0. 147	0. 176	0. 998	0. 0062	37. 2
16. 5	0. 069	0. 112	0. 139	0. 178	0. 213	0. 998	0. 0071	42. 6
22. 0	0. 092	0. 152	0. 193	0. 236	0. 273	0. 996	0. 0089	53. 4
27. 5	0. 101	0. 174	0. 238	0. 289	0. 328	0. 993	0. 0114	68. 4

表 4 金属卟啉配合物半数清除浓度和对 H₂O₂ 的半数分解浓度 (μmol L⁻¹)

Table 4 Concentration for 50 % inhibition rate and 50 % decomposition rate (μmol L⁻¹)

Compounds	50 % of amount required for scavenging O ₂	50 % of amount required for decomposing H ₂ O ₂
Cu - HDME	41. 21	23. 18
Co - HDME	46. 47	27. 38
Mn - HDME	27. 77	19. 50
SOD	0. 039	-
Cat	-	0. 331

可见 3 种配合物中 ,Mn - HDME 表现出了最大活性 ,其规律性及规律的机理还有待进一步研究。

3 讨论

配合物的分子量明显小于天然酶 ,且结构简单、性质稳定 ,并可模拟 SOD 与 Cat 两种功能 ,与天然酶只能催化专一反应相比 ,作用更加广泛 ,有望开发生

具有抗人体内多种有害氧自由基的模拟酶药物。

参考文献 :

[1] 张艳,廖晓全,袁勤生. 人锰超氧化物歧化酶(hMn - SOD) 研究进展[J]. 药物生物技术,2001,8:352

[2] 钟振起,万维勤,许德余. 血卟啉醚类光敏剂的合成新方法[J]. 中国医药工业杂志,2000,31(9):389

[3] Smith KM. Porphyrins and metalloporphyrins[M]. Amsterdam, Oxford, New York: Elsevier Scientific Publishing, 1975. 17

[4] Feng Qing, He Yong - Yan, Shi Ju - En. Synthesis and SOD activity of dicopper complexes with TTHB[J]. J. Tongji Medical University, 1995, 24(6):411

[5] Wang fang, Wu Yanzhang, Wu Xianwei, et al. Catalytic effects of peroxidase - like metalloporphyrins on the chromogenic reaction of 4 - aminoatipyrine and p - chlorophenic with hydrogen peroxide [J]. J Anal Chem, 1993, 346(10 - 11):101

收稿日期:2004 - 05

蒲公英的乙酸乙酯部位 HPLC 指纹图谱定性分析和咖啡酸的定量测定

晏 媛,许重远,刘世霆,金 星,陈志良
 (第一军医大学南方医院药学部,广东 广州 510515)

摘要:目的 运用指纹图谱技术建立蒲公英的色谱定性和定量方法。方法 采用 RP - HPLC 方法, Hypersil BDS C₁₈ 分析柱(5 μm, 250 mm ×4. 6 mm); 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为磷酸盐缓冲液(磷酸调 pH 为 3. 7); 梯度洗脱时间为 0、38、40 min 时, A(%) 分别为 5%、75%、75%; 柱温 35℃; 流速 0. 7 ml · min⁻¹; 检测波长 323 nm。对蒲公英的乙酸乙酯部位进行指纹图谱定性分析, 并对有效成分咖啡酸进行定量测定。结果 在色谱条件下, 11 份不同蒲公英药材中, 乙酸乙酯部位的色谱指纹图谱中可检出 11 个相对位置稳定的共有峰, 通过与标准品的保留时间及紫外光谱比较, 3 号峰和 6 号峰分别鉴定为咖啡酸和阿魏酸, 蒲公英药材中咖啡酸的含量为 0. 015 % ~ 0. 040 %。结论 蒲公英乙酸乙酯部位 HPLC 指纹图谱定性和咖啡酸的定量分析方法具有较强的针对性和准确性, 可用于蒲公英及其制剂的质量控制。

关键词:蒲公英;咖啡酸;高效液相色谱;指纹图谱;乙酸乙酯部位

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:1006 - 0103(2004)05 - 0344 - 04

作者简介:晏媛(1972 -),女,湖南新化,主管药师,正攻读硕士学位,从事药物分析工作。

The analytical methods with qualitative fingerprint of ethyl acetate extract and quantitative measurement of caffeic acid in *Taraxacum mongolicum* Hand. Mazz.

YAN Yuan, XU Zhong-yuan, LIU Shi-ting, JIN Xing, CHEN Zhi-liang

(Division of Pharmaceutical Science, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract : OBJECTIVE To establish a qualitative and quantitative RP - HPLC method with fingerprinting technology to control the quality of *Taraxacum mongolicum* Hand. Mazz. **METHODS** The conditions of RP - HPLC method were as follows: Hypersil BDS C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the mixture of acetonitrile (A) and potassium phosphate solution (B) (pH 3.7) as mobile phase in gradient mode. The concentrations of solvent A were 5%, 75% and 75% at 0, 38 and 40 min, respectively. The column temperature was set at 35 °C, the flow rate was 0.7 ml · min⁻¹ and the detecting wavelength was set at 323 nm. The qualitative fingerprint of ethyl acetate extract and quantitative measurement of caffeic acid were performed above the chromatographic conditions. **RESULTS** Under the qualitative conditions, 11 common peaks in RP - HPLC fingerprinting of ethyl acetate extract from 11 different samples could be used as index peaks for qualitative identification. By comparison of the retention time and the on-line UV spectra of chemical standards, peak 3 and 6 were identified as caffeic acid and ferulic acid respectively. In RP - HPLC quantitative analysis, the contents of caffeic acid in *Taraxacum mongolicum* Hand. Mazz. were 0.015% - 0.040%. **CONCLUSION** The analytical method with qualitative fingerprint and quantitative measurement of caffeic acid can accurately be used to control the quality of *Taraxacum mongolicum* Hand. Mazz. and its preparations.

Key words: *Taraxacum mongolicum* Hand. Mazz.; Caffeic acid; RP - HPLC; Fingerprint; Ethyl acetate extract

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006 - 0103(2004)05 - 0344 - 04

蒲公英为菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand. Mazz.、碱地蒲公英 *T. sinicum* Kitag 或同属种植物的干燥全草。近年的研究表明,蒲公英具广谱抗菌作用,临床用于各种急性慢性感染的治疗,其化学成分咖啡酸具有广谱抗菌的作用^[1,2]。中国药典 2000 年版采用 HPLC 测定其主要成分咖啡酸的含量,并规定含咖啡酸不得少于 0.02%。由于产地和采集时间不同,蒲公英中有效成分如咖啡酸的含量差异较大^[3]。为此,通过对 11 批样品的研究,建立了以咖啡酸为指标峰的 HPLC 指纹图谱定性方法,确定了蒲公英指纹图谱的共有峰和指标峰以及咖啡酸的含量范围,为蒲公英的质量控制提供了有效的分析方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪,包括 515 型泵,996 二极管阵列检测器,Millennium32 工作站(Waters 公司);超纯水器(Mill - Qplus USA);SK5200LH 型超声波仪(上海科导超声仪器有限公司);TCL - 16B 离心机(上海安亭科学仪器厂)。咖啡酸、阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号:885 - 200001、0773 - 9910);蒲公英药材(市售),经鉴定为菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand. Mazz. 的干燥全草;乙腈为色谱纯(天津四友生物医学技术有限公司);磷酸二氢钾、磷酸等均为分析纯。

1.2 溶液的制备

分别精密称取咖啡酸和阿魏酸对照品适量,分

别用甲醇溶解并稀释成 80、25 μg · ml⁻¹ 的对照品贮备液,对照品溶液由此稀释得到。

蒲公英药材 60 g 干燥后粉碎成细粉,过 100 目筛。精密称取生药粉末 1 g,用体积分数为 75% 的乙醇渗滤,收集渗滤液 200 ml,回收乙醇,浓缩物混悬于 10 ml 水中,置分液漏斗中,分别用石油醚(15 ml × 3)萃取,弃去醚液,再分别用乙酸乙酯(15 ml × 3)萃取,合并乙酸乙酯液,减压回收乙酸乙酯至干,残渣用甲醇溶解并定容至 10 ml,以 0.45 μm 滤膜过滤至样品小瓶中,作供试品液备用。

1.3 色谱条件的优化

1.3.1 流动相及洗脱方式的优化 分别用乙腈、甲醇与 pH 为 3.2、3.7、4.2 的磷酸二氢钾溶液组合成不同流动相体系进行洗脱,结果发现乙腈 - 磷酸二氢钾(pH 3.7)体系得到的色谱峰形较好,且较稳定。因等度洗脱时分离效果较差,经过多次摸索,以梯度洗脱法在 40 min 内可使全部色谱峰流出,且大部分得到基线分离。实验时以梯度洗脱程序运行 38 min,然后以终浓度等度洗脱。

1.3.2 检测波长的选择 在 210 ~ 400 nm 范围内,选定较有代表性的 254、280、323 nm 3 个波长,通过二极管阵列检测器对色谱图进行在线分析。结合峰形,咖啡酸和阿魏酸的最大吸收波长都在 323 nm 附近,故确定检测波长为 323 nm。

1.4 色谱条件

色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈ 分析柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),BDS 保护柱(大连依利特科学仪器有限

公司);流动相 A 为乙腈,流动相 B 为磷酸二氢钾(磷酸调 pH 3.7);梯度洗脱,流速 $0.7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长 323 nm;柱温 35°C ;进样量 $10 \mu\text{l}$ 。

1.5 分析方法学考察结果

1.5.1 线性关系考察 精密吸取 1、2、3、4、5 ml 咖啡酸对照品贮备液,分别置 5 个 10 ml 量瓶中,得 8、16、24、32、40、80 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的对照品溶液,分别精密吸取上述不同浓度的咖啡酸对照品溶液 $10 \mu\text{l}$,按“1.4”项条件分别进样,以咖啡酸浓度($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程: $Y = 6.916 \times 10^4 X - 3.397 \times 10^4$ ($r = 0.9990$, $n = 6$),在 $8.192 \sim 81.92 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 范围呈良好的线性关系。

1.5.2 仪器精密度和对照品溶液稳定性试验 精密吸取 $24 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的咖啡酸对照品溶液,在“1.4”项条件下重复进样 5 次,计算咖啡酸的峰面积, $RSD = 1.52\%$,表明仪器精密度良好。

精密吸取咖啡酸对照品溶液,于配制后的 0、2、4、8、12、24、48 h 测定,其峰面积 $RSD = 1.93\%$,表明咖啡酸对照品溶液在 48 h 内稳定。

1.5.3 精密度与重复性 分别精密吸取同一批号的供试品溶液 $10 \mu\text{l}$,在“1.4”项条件下,连续进样 5 次,检测指纹图谱,各色谱峰的相对保留时间基本一致, RSD 均小于 0.95% ,单峰面积占总峰面积 5% 以上的色谱峰与参照峰的峰面积比值也较稳定, RSD 均小于 2.5% ,说明同一样品在相同条件下,连续进样时,各成分保留时间和含量比较一致,仪器精密可靠。符合指纹图谱要求^[4]。

取同一批号的样品 5 份,分别按“1.2”项方法制备,在“1.4”项条件下,连续进样 5 次,检测指纹图谱,各色谱峰的相对保留时间基本一致, RSD 均小于 1.38% ,单峰面积占总峰面积 5% 以上的色谱峰与参照峰的峰面积比值也较稳定, RSD 均小于 2.82% ,符合指纹图谱要求^[5]。

1.5.4 样品溶液的稳定性考察 取同一批号的样

品,按“1.2”项方法制备后,在“1.4”项条件下,分别在 0、2、4、6、8、24 h 检测指纹图谱,各色谱峰的相对保留时间无明显变化,单峰面积占总峰面积 5% 以上的色谱峰与参照峰的峰面积比值也无显著变化。

1.5.5 主要色谱峰的鉴定 在同样色谱条件下,将咖啡酸和阿魏酸对照品与样品指纹图谱中相应色谱峰进行比较,发现样品指纹图谱中 3 号峰和 6 号峰的保留时间及紫外光谱分别与咖啡酸和阿魏酸相吻合,故样品指纹图谱中 3 号和 6 号峰分别鉴定为咖啡酸和阿魏酸。

1.6 共有峰的确定

在“1.4”项条件下,分别精密吸取对照品和供试品溶液各 $10 \mu\text{l}$,注入液相色谱仪中,记录 40 min 色谱图即得指纹图谱(图 1)。比较 11 批供试品的 HPLC 图谱,参考“中药注射剂指纹图谱研究的技术要求”,确定了 11 个共有指纹峰。其原则包括:每批样品中都含有这种成分;各色谱峰的相对保留时间具有一致性;较大面积峰的峰面积比值 $RSD \leq 30\%$ 。其中 3 号峰为咖啡酸,因为该峰的峰面积大且较稳定,所以选咖啡酸作为参照物,以其保留时间(t_R)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,结果 11 批样品测定中,11 个共有指纹峰的相对保留时间从 $0.089 \sim 2.161$, RSD 皆小于 2% 。说明在实际样品测定中,所得各峰相对保留时间的比值较为一致,所建立的方法精确及仪器运行稳定。在所测定的 11 批样品中,每批样品中占总峰面积 10% 以上的共有峰分别为 3、6、8 号峰。以咖啡酸峰的峰面积为标准,其余共有峰的峰面积与此相比,计算图谱中这些共有色谱峰的平均峰面积比值(表 1)。所确定的 11 个共有峰可作为蒲公英乙酸乙酯部位指纹图谱定性分析的指标峰。以此定性指标鉴定 11 个样本,结果均为蒲公英药材。

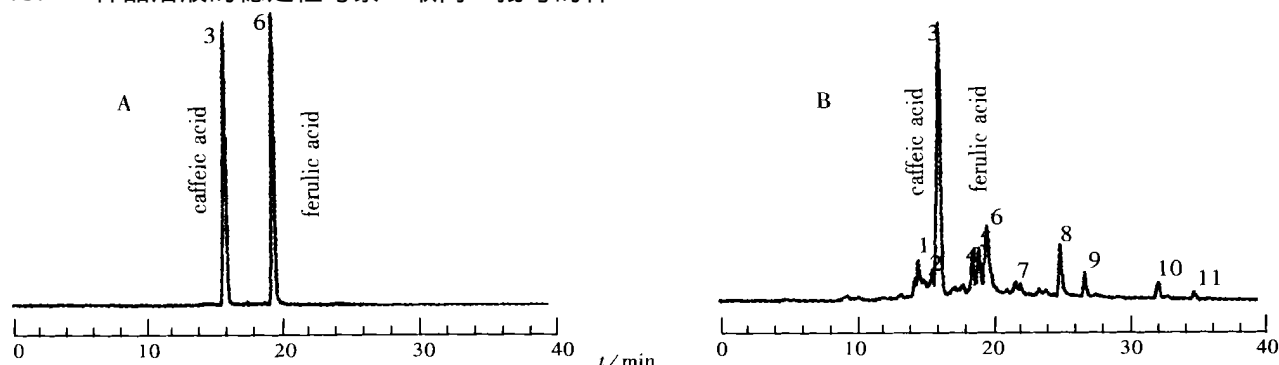


图 1 咖啡酸、阿魏酸对照品(A)和蒲公英供试品(B)的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of caffeic acid, ferulic acid standard(A) and sample(B)

表 1 不同样品 HPLC 图谱主要峰相对保留时间及峰面积比值比较
Table 1 Comparison of relative retention time and ratio of peak area of HPLC peaks from different samples

Peak No.	$t_R/\text{min}(\text{RSD}/\%)$	Ratio of peak area
1	0.905(0.28)	0.070
2	0.966(0.14)	0.040
3	1(0)	1
4	1.151(0.53)	0.105
5	1.180(0.79)	0.128
6	1.215(1.25)	0.283
7	1.344(0.89)	0.032
8	1.548(1.47)	0.155
9	1.661(0.86)	0.072
10	1.997(0.73)	0.050
11	2.161(0.49)	0.020

1.7 咖啡酸的含量测定

收集不同产地或不同批号的蒲公英药材 11 批,按“1.2”项下方法处理,在“1.4”项条件下进样分析,用外标法计算蒲公英药材中咖啡酸的含量,11 批样品中咖啡酸的含量在 0.0153 % ~ 0.0402 % 之间。

2 讨论

指纹图谱的流动相多用梯度洗脱以求得到更多的特征指标峰,实验中对流动相的组成及洗脱方式分别进行了优化考察。结果发现乙腈-水(含乙酸)体系也可使大多数色谱峰峰形较好,但基线分离、稳定性等情况不如乙腈-磷酸盐缓冲液(含磷酸)体系,所以 HPLC 指纹图谱的流动相选用后者。实验比较了 pH 为 3.2、3.7、4.2 的磷酸二氢钾溶液,结果发现 pH 3.7 时基线平稳,峰形尖锐、对称并达到基线分离。梯度洗脱增大了仪器的系统误差,实验中发现,柱压对实验的重复性影响较大,为确保分析时色谱峰的峰形及分离度,每次运行后,柱平衡时间至少

需要 10 min,柱压稳定后才进行下次分析。

在色谱条件下,蒲公英乙酸乙酯部分的 HPLC 图谱中可以检出 11 个共有峰,通过对 11 份样品的 HPLC 图谱中共有峰的相对保留时间的分析表明,共有峰的相对位置较稳定,可作为定性的依据。

中国药典规定,蒲公英中咖啡酸含量不得少于 0.02 %。本实验中,11 个样本中的 9 个蒲公英药材符合药典规定。因蒲公英药材的来源和产地不同,其所含咖啡酸的含量也有很大差异。就同一产地而言,批号不同的蒲公英,其咖啡酸的含量也有明显不同。这表明生长环境、药材采挖时间和贮藏时间等因素对有效成分影响很大。同时比较各样本中咖啡酸的峰面积与峰总面积比,也可以反映出咖啡酸在蒲公英乙酸乙酯部位中的相对含量。复杂的中药成分使得现代中药的质量控制多采用指纹图谱技术。因为咖啡酸是药效和成分都比较明确的指标成分,而阿魏酸的峰面积小,且分离效果较差,所以本实验将蒲公英乙酸乙酯部位的组分群的指纹图谱定性和指标成分咖啡酸的定量研究相结合,建立了有较强特异性表征的中药材指纹图谱。

参考文献:

- [1] 赵守训,杭秉倩. 蒲公英的化学成分和药理作用[J]. 中国野生植物资源,2001,20(3):1
- [2] 凌云,鲍燕燕,张永林,等. 兴安蒲公英的化学研究[J]. 中草药,2000,31(1):10
- [3] 凌云,范国强,肖樾,等. 中药蒲公英的质量标准研究[J]. 中草药,1999,30(12):897
- [4] 国家药监局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求《暂行》的通知[J]. 中成药,2000,22(10):671

收稿日期:2004-04

《中国民族医药杂志》和《内蒙古中医药杂志》征订启事

《中国民族医药杂志》系由国家中医药管理局主管的我国惟一反映 55 个少数民族医药的国家级综合性学术期刊,设有理论探讨、临床报道、诊治经验、方药纵横、疗法简介、实验研究、医苑琐谈、文献综述、教学探讨、书刊评价等栏目。本刊理论与实践并举,科研与教学兼顾,涉及面广,信息量大,是广大医药卫生工作者了解、研究、交流我国少数民族医药学的必备期刊。从 2005 年改为双月刊。大 16 开,每册定价 5.50 元,全年价 33.00 元。CN15-1175/R,ISSN1006-6810,国内邮发代号 16-94,全国各地邮局订阅,国外发行代号 6501/Q。

《内蒙古中医药杂志》系综合性中医药学术期刊,立足本区,服务全国,面向基层,注重临床,适宜各级中医、中西医结合工作者阅读和交流。本刊从 2002 年起改为双月刊,大 16 开,每册定价 4.50 元,全年定价 27.00 元。CN 15-1101/R,ISSN 1006-0979,邮发代号 16-78,国外发行代号 6367/Q,欢迎订阅。

两刊若有脱订者可直接向编辑部办理邮购。地址:呼和浩特市健康路 15 号(010020) 电话:0471-6920167