

东北地区 11 种蒲公英 RP-HPLC 指纹图谱研究

朱丹, 赵鑫, 徐俏, 宁伟*

(东北野菜种质异位保存圃与鉴定中心 沈阳农业大学 园艺学院
设施园艺省部共建教育部重点实验室, 沈阳 110866)

[摘要] 目的: 运用 RP-HPLC 建立中药蒲公英指纹图谱, 为提高蒲公英的质量控制手段提供依据。方法: 采用 Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-水 (含 0.5% 冰乙酸) 系统梯度洗脱, 检测波长为 323 nm, 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL, 测定东北地区 11 种蒲公英指纹图谱。结果: 用梯度洗脱得到的色谱图中, 多数峰都可以达到较好分离。11 种蒲公英指纹图谱可检测出 25 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, 10 号峰 (1), 12 号峰 (2), 16 号峰 (3), 25 号峰 (4) 分别鉴定为绿原酸、咖啡酸、对香豆酸和木犀草素。该分析方法具有很好的精密性、重复性和稳定性, 符合指纹图谱相关要求。结论: 方法准确可靠, 可用于蒲公英药材的质量的控制。

[关键词] 蒲公英; 指纹图谱

蒲公英为菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* H and. Mazz.、碱地蒲公英 *T. sinicum* 或同属数种植物的干燥全草^[1]。已经被我国《药典》和《兽药典》收录, 目前国内外对蒲公英的研究主要集中在化学成分^[2-4]和药理活性^[5]方面, 包括单体化合物的提取分离、含量测定^[6]及利胆、消炎、促进胆汁分泌、抗癌、降血糖等药理活性^[7]研究。李喜凤^[8-9]等对河南蒲公英 HPLC 指纹图谱进行了初步研究。中药是一个多组分的化学库, 它的疗效不是来自单一的活性化学成分, 而是来自多种成分之间的协同作用。本研究利用 RP-HPLC 对东北地区 11 种蒲公英进行测定分析, 建立东北地区不同种蒲公英 HPLC 指纹图谱, 为蒲公英药材的综合质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (在线脱气、四元泵、柱温箱、自动进样器、二极管阵列检测器、HP-Chem station); 万分之一电子分析天平 (上海第二天平仪器厂 MA110 型); 指纹图谱相似度评价软件为

“中药色谱指纹图谱相似度评价系统” (中国药典委员会 2004A); 超声清洗器; 旋转蒸发器, 回流装置等。

1.2 试剂

1.2.1 试剂 蒸馏水, 乙醇 (分析纯, 沈阳化学试剂厂), 冰乙酸 (色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司), 甲醇 (色谱纯, 山东禹王化学试剂厂)

1.2.2 药材 11 种蒲公英采收于 2010 年 4 月份, 连根挖出, 去掉杂质, 洗净, 晒干即可。具体来源见表 1 均经中国科学院沈阳应用生态所李冀云研究员鉴定。

表 1 蒲公英样品来源

编号	种名	拉丁名	来源
1	丹东蒲公英	<i>Taraxacum antungense</i>	辽宁沈阳
2	辽东蒲公英	<i>T. liaotungense</i>	辽宁朝阳
3	戟片蒲公英	<i>T. asiaticum</i>	辽宁朝阳
4	兴安蒲公英	<i>T. falciatum</i>	辽宁朝阳
5	朝鲜蒲公英	<i>T. coreanum</i>	辽宁沈阳
6	光苞蒲公英	<i>T. lamprolepis</i>	辽宁朝阳
7	凸尖蒲公英	<i>T. sinomongolicum</i>	内蒙古赤峰
8	药用蒲公英	<i>T. officinale</i>	吉林磐石
9	蒙古蒲公英	<i>T. mongolicum</i>	辽宁朝阳
10	卷苞蒲公英	<i>T. urbanum</i>	辽宁本溪
11	东北蒲公英	<i>T. ohwianum</i>	辽宁丹东

1.2.3 对照品 咖啡酸、绿原酸对照品购于中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110885-200102, 110753-200413。对香豆酸、木犀草素对照品购于上海同田生物技术有限公司, 批号分别为

[稿件编号] 20100912007

[基金项目] 国家农业部项目 [农计函 (2010) 58 号]

[通信作者] * 宁伟, 教授, 博士, 从事药用植物种质资源评价与创新研究, E-mail: synw_01@163.com

[作者简介] 朱丹, 在读硕士, 主要从事天然产物化学成分研究, E-mail: zhudan0222@163.com

10052131, 09060731,

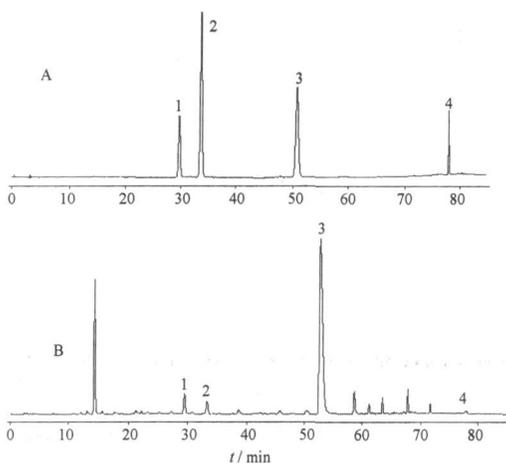
2 方法与结果

2.1 11种蒲公英药材指纹图谱建立

2.1.1 色谱条件及系统适用性实验 色谱柱 Kromasil 100-5 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 (A) - 0.5% 冰乙酸水 (B); 梯度洗脱条件见表 2; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 35 °C; 检测波长 323 nm; 取供试品溶液 10 μL, 在上述色谱条件下进样分析, 记录色谱图 85 min, 见图 1。以咖啡酸计算理论塔板数不小于 5 000, 咖啡酸色谱峰与相邻色谱峰之间分离度大于 1.5。

表 2 梯度洗脱条件

t/min	A/%	B/%
0	5	95
10	10	90
25	15	85
48	20	80
62	35	65
66	40	60
71	50	50
85	65	35



A. 对照品; B. 供试品; 1. 绿原酸 (chlorogenic acid); 2. 咖啡酸 (caffeic acid); 3. 对香豆酸 (p-coumaroy acid); 4. 木犀草素 (luteolin)。

图 1 对照品与供试品 HPLC 谱图

2.1.2 参照物选择 绿原酸为蒲公英中主要抗菌抗病毒成分, 且含量较高, 在色谱图中分离良好, 所以选择绿原酸为参照物。

2.1.3 测定方法 精密量取对照品溶液和供试品

溶液各 10 μL, 注入色谱仪, 记录色谱图, 见图 1。

2.2 对照品溶液制备

取咖啡酸对照品 2.20 mg, 绿原酸对照品 0.90 mg, 对香豆酸对照品 1.00 mg 和木犀草素对照品 1.75 mg 分别加甲醇配成 88, 36, 40, 70 mg · L⁻¹ 对照品溶液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.3 供试品溶液制备 取蒲公英药材 5 g 精密称定, 加 30 倍量 70% 乙醇, 加热回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 过滤, 蒸干, 加入适量甲醇溶解, 转移至 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液进样。

2.4 方法学考察

2.4.1 稳定性试验 取 2.3 项下制备的一份供试品 (S5) 溶液, 室温放置, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 进样分析, 记录色谱图。结果各峰相对保留时间 RSD 均小于 0.86%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2.5%, 结果表明样品在 24h 内稳定。

2.4.2 精密度的试验 取 2.3 项下制备的一份供试品 (S5) 溶液, 在上述色谱条件下连续进样 5 次, 记录色谱图。结果各峰相对保留时间 RSD 均小于 1.1%, 相对峰面积的 RSD 均小于 1.9%, 表明仪器精密度的良好。

2.4.3 重复性试验 取药用蒲公英粉末, 按 2.3 项下方法平行制备 5 份供试液, 在上述色谱条件下进行测定, 记录色谱图。结果各峰相对保留时间 RSD 均小于 0.94%, 相对峰面积的 RSD 均小于 1.7%, 结果表明方法重现性良好。

2.5 不同种蒲公英样品的测定

按 2.3 项下样品溶液制备方法及其 2.1.3 项下的测定方法, 对 11 批东北地区不同种蒲公英进行测定, 记录色谱图并积分。比较谱图, 有 25 个峰是 11 份供试液所共有的 (该 25 个峰的相对保留时间 RSD < 1.5%), 因此确定这 25 个峰为共有指纹峰, 相对保留时间分别是 1 (0.003), 2 (0.406), 3 (0.441), 4 (0.482), 5 (0.525), 6 (0.719), 7 (0.751), 8 (0.856), 9 (0.925), 10 (1), 11 (1.042), 12 (1.132), 13 (1.168), 14 (1.316), 15 (1.558), 16 (1.717), 17 (1.791), 18 (1.993), 19 (2.079), 20 (2.159), 21 (2.22), 22 (2.264), 23 (2.308), 24 (2.439), 25 (2.718), 11 种蒲公英指纹图谱见图 2。

2.6 不同种蒲公英指纹图谱相似性评价

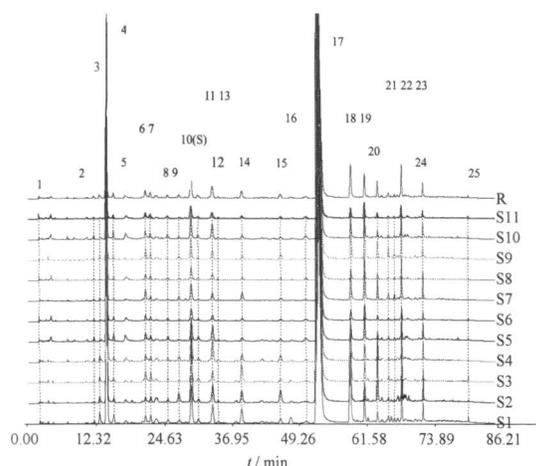


图 2 11 种蒲公英指纹图谱

不同种蒲公英相似度在 0.96 以上,表明相似度良好。

3 讨论

要建立合格的中药指纹图谱,要尽量将主要特征峰表现出来^[10],色谱条件的优化是关键。在色谱条件的确立上,考察了不同波长下的指纹图谱,在 350 nm 处,只有木犀草素吸收较强,但其它峰吸收较弱;在 323 nm 处,蒲公英中含有的主要成分绿原酸、咖啡酸及对香豆酸等均有较强吸收,出峰数量多,而且基线较平,多数峰可达到基线分离,综合考虑选择 323 nm 作为指纹图谱检测波长。

在选择流动相时,比较了甲醇-磷酸水溶液、甲醇-0.02 mol·L⁻¹磷酸二氢钠系统^[8]、甲醇-0.5% 冰乙酸水系统,前两个条件在 30 min 附近色谱峰分布密集,但出峰较少;选择 0.5% 冰乙酸甲醇-水系统条件时,出峰较多,出峰时间分布均匀,根据色谱峰分布情况改变不同时间段的比例进行梯度洗脱,使得各色谱峰较好地分离。最终选用的色谱条件为甲醇-0.5% 冰乙酸水系统梯度洗脱,2 h 图谱显示 85 min 后再没有其他特征峰出现。洗脱时间为 85 min。

建立指纹图谱的优势在于指纹图谱中每个峰具

体是何种物质尚不明确时,依然能够给出充分的、可靠的信息,用以控制药材质量。在 25 个共有峰中,其中 4 个经过指认分别为绿原酸、咖啡酸、对香豆酸和木犀草素。另外的 21 个峰尚不能确认,需要进一步进行研究。通过对 11 种蒲公英指纹图谱研究,结果表明:在本论文的研究条件下,不同种蒲公英指纹图谱之间相似度较高,但各成分的量存在差异,相对峰面积比值不尽相同,有的未知成分差别较大(4 号峰和 17 号峰)。有的已知成分相对峰面积比值较小(12 号峰,16 号峰,25 号峰)。因此在比较主要共有峰时,对于相对峰面积较小的共有峰应给予足够重视。

本文建立了东北地区 11 种蒲公英 70% 乙醇提取物的 RP-HPLC 指纹图谱,反应了蒲公英药材质量控制的特异性与整体性,可以为蒲公英质量控制提供参考。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2005:244.
- [2] 凌云,鲍燕燕,张永林,等.兴安蒲公英的化学成分研究[J].中草药,2000,31(1):10.
- [3] 许丹,候凤飞,吴立军,等.蒲公英的化学研究[J].中国中药杂志,2004,29(3):278.
- [4] 姚巍,林文艳,周长新,等.蒙古蒲公英的化学成分研究[J].中国中药杂志,2007,32(10):926.
- [5] Chun Hu, David D. Kitts. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress NOS and COX-2 in RAW264.7 cells[J]. Mol Cell Biochem, 2004, 265: 107.
- [6] 宗东升,沈忱,李丹,等. RP-HPLC 测定蒲公英中绿原酸与咖啡酸的含量[J]. 实用药物与临床, 2008, 11(4): 259.
- [7] Katrin Schütz Reinhold Carle Andreas Schieber. Taraxacum-A review on its phytochemical and pharmacological profile[J]. J Ethnopharmacol 2006 107: 313.
- [8] 李喜凤,师绘敏,万焱.河南蒲公英 RP-HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药, 2008, 30(9): 1252.
- [9] 李喜凤,师绘敏,许闯,等.河南不同蒲公英药材 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中成药, 2008, 31(10): 1470.
- [10] 周玉新. 中药指纹图谱研究技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 92.

Study on HPLC fingerprint of 11 *Taraxacum* species in northeast of China

ZHU Dan, ZHAO Xin, XU Qiao, NING Wei¹

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University; Key Laboratory of Protected Horticulture, Ministry of Education, College of Animal Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

[Abstract] **Objective** To study the RP-HPLC fingerprints of 11 plants in the genus *Taraxacum* for their quality control. **Method** The fingerprints were determined using an Agilent 1100 series instrument system. Chromatographic analyses were performed on a Kromasil 100-5 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) analytical column, eluted with methanol and water containing 0.5% acetic acid as the mobile phases in gradient elution at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 323 nm. The temperature of column was 35 °C. Eleven species of *Taraxacum* in northeast of China were detected respectively. **Result** Twenty-five common peaks existed in 11 RP-HPLC fingerprints. By comparing the retention time and the online UV spectra, peaks No. 10, No. 12, No. 16 and No. 25 were identified as chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid and luteolin respectively. **Conclusion** The analytical method with good precision and reproducibility can be useful in the quality control of *Taraxacum* plants.

[Keywords] *Taraxacum*; HPLC fingerprint

doi 10.4268/cjmm20110717

[责任编辑 丁广治]

《中国中药杂志》现状简介

国际检索和收录: SCIE 总被引频次达到 443(285 篇文献); 被美国《医学索引》(Medline/PubMed)收录, 在被 Medline 收录的中国期刊中排名第 4 位, 居我国药学和中医药学期刊首位; 被美国《化学文摘(网络版)》(CA, Chemical Abstracts Web), 在千刊表中排名第 232 位。同时, 还被荷兰爱思唯尔公司《斯高帕斯数据库》(Scopus), 美国《生物学文摘(预评)》(BAP, BIOSIS Previews), 俄罗斯《文摘杂志》(AJ Abstracts Journal VNI), 英国《国际农业与生物科学研究文摘》(CABI, Centre for Agriculture and Bioscience Abstracts), 美国《国际药学文摘》(IPA, International Pharmaceutical Abstracts), 美国《乌利希期刊指南》(Ulrich PD, Ulrich's Periodicals Directory), 《日本科学技术振兴机构中国文献数据库》[JSTChina, Japan Science & Technology Agency(Chinese Bibliographic Database)], 《英国皇家化学学会系列文摘》(RSC, Royal Society of Chemistry), 英国《全球健康》(GH, Global Health), 荷兰《医学文摘》(EM, Excerpta Medica), 菲律宾《西太平洋地区医学索引》(WPRM, Western Pacific Region Index Medicus) 等 14 家权威性专业文摘或数据库收录。

国内收录: 为“中国科学引文数据库”、“中国学术期刊综合评价数据库”来源期刊, 中国自然科学核心期刊, 中国中文核心期刊, 中国科技核心期刊, 并被《中国学术期刊文摘》中、英文版收录。

据中国知网(CNKI)“中国科技期刊影响因子年报”公布:《中国中药杂志》目前总被引频次达到 17036, 影响因子 1.421, 基金论文比例 0.72, 下载量达到 39.69 万次, 国内外发行达到机构用户 3192 个, 分布在 15 个国家和地区, 个人读者分布在 23 个国家和地区。

据中国科学技术信息研究所最新发布的《中国科技期刊引证报告》(核心版)期刊检索统计结果表明:《中国中药杂志》总被引频次为 5544, 影响因子 0.707, 基金论文比 0.68, 全年发表文章达 800 余篇。期刊综合总排名从 2010 年的第 52 位跃居第 39 位, 在药学类以及中医药学类期刊中位居第一, 全部指标保持多年持续上升, 在我国药学以及中医药学等学科领域科技期刊中均名列前茅。