

冷水花抗菌活性部位薄层指纹图谱

甘秀海¹, 梁志远^{1*}, 赵超², 姜金仲¹

(1. 贵州师范学院 药用植物研究所, 贵阳 550018;

2. 贵州师范大学 天然药物质量控制研究中心, 贵阳 550001)

[摘要] 目的:建立冷水花药材抗菌活性部位薄层色谱指纹图谱。方法:通过抗菌活性研究确定冷水花药材抗菌活性部位,进而采用薄层色谱法对贵州产 10 批冷水花药材抗菌活性部位进行薄层色谱比较分析。结果:冷水花药材乙酸乙酯部位具有抗菌活性。另外,贵州产 10 批冷水花药材的乙酸乙酯部位薄层色谱图十分相似,均有 8 个斑点和对应的 8 个峰,但峰强度上有差异。结论:该方法操作简单,稳定,可用于冷水花药材的鉴别及质量控制。

[关键词] 冷水花; 抗菌活性; 薄层色谱; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0079-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230079

TLC Fingerprint Analysis of *Pilea aquarum*

GAN Xiu-hai¹, LIANG Zhi-yuan^{1*}, ZHAO Chao², JIANG Jin-zhong¹

(1. The Research Institute of Medicinal Plant, Guizhou Normal College, Guiyang 550018, China;

2. The Research Center for Quality Control of Natural Medicine, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish TLC fingerprint of active antibacterial fraction of *Pilea aquarum*. **Method:** The activity fraction of *P. aquarum* was confirmed by antibacterial activity assay, and then the TLC fingerprint of 10 batches of *P. aquarum* from Guizhou was analyzed comparatively. **Result:** The EtOAc extraction of *P. aquarum* is antibacterial activity. The TLC chromatograms of 10 batches were very similar, which had 8 spots and 8 corresponding peaks, but the intensity of each peak was different. **Conclusion:** The method is simple and stabilized, and can be used for the quality control of *P. aquarum* Dunn.

[Key words] *Pilea aquarum*; antibacterial activity; TLC; fingerprint

冷水花为贵州苗族常用药材品种之一,全草入药,具有利湿、清热、退黄等功效,用于治疗黄疸、肺结核等疾病^[1-2]。目前有关冷水花的研究较少^[3-7],本课题组前期对冷水花药材的薄层指纹图谱进行了初步探讨^[8]。为了进一步完善并建立冷水花药材薄层色谱质量标准,在前期研究的基础上,本文通过抗菌活性研究确定冷水花药材乙酸乙酯部位具有抗菌活性,进而采用薄层色谱法对贵州产冷水花 10 批

药材的乙酸乙酯部位进行薄层色谱比较分析,并建立了该药材抗菌活性部位的薄层指纹图谱,为评价冷水花药材的品质和 GAP 规范化种植提供了科学依据。

1 材料

1.1 仪器 CAMAG TLC scanner 3 型薄层色谱成像系统(瑞士卡玛公司),双槽展开箱,硅胶 G 预制板(青岛海洋化工厂),EOS6D 型数码照相机(Canon

[收稿日期] 20140519(008)

[基金项目] 贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字[2010]2213 号);贵州师范学院自然科学基金重点项目(201006);贵州省重点支持建设学科项目(2011231)

[第一作者] 甘秀海,硕士,副教授,从事中药化学成分及质量控制研究,E-mail: gxx200719@163.com

[通讯作者] * 梁志远,教授,从事天然产物化学研究,E-mail: gzh24000@sina.com

公司),CHROMAP 1.5 色谱指纹图谱系统解决方案软件(珠海科曼中药研究有限公司),BS224 型精密天平(Sartorius 公司),RE-52AA 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),LB-50L 型高压灭菌锅(江阴滨江医疗设备厂),pHS-3C 型超菌工作台(天津医疗净化设备厂),DH600 型电热恒温培养箱(北京科伟仪器有限公司)。

1.2 菌种 枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、藤黄微球菌、金黄色葡萄球菌、伤寒沙门菌,以上菌种均由贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室提供。

1.3 培养基 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基的配制:称取牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 5 g、琼脂 18 g,用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 调节 pH 于 7.0 ~ 7.2,然后蒸馏水定容至 1 000 mL,加热溶解后分装,121 °C 灭菌 20 min,倒入已灭菌的培养皿中,制成平板,待冷却凝固后作无菌检查,备用。

1.4 试剂 石油醚、乙酸乙酯、三氯甲烷、丙酮等均为国产分析纯;豆甾醇对照品(自制,纯度 >98%)。

1.5 药材 不同产地冷水花全株见表 1,于 2011 年采自贵州省境内,经贵州师范学院朱富寿教授鉴定为荨麻科湿生冷水花 *Pilea aquarum* 的全草。

2 方法与结果

2.1 抗菌活性测定

2.1.1 供试品的制备 取干燥冷水花药材全草,粉碎后用 80% 乙醇回流提取 3 次,2 h/次,合并提取液,减压回收溶剂得棕褐色固体浸膏。浸膏用适量水分散,分别用石油醚、乙酸乙酯萃取 3 次,浓缩得到石油醚、乙酸乙酯和水部位,真空干燥至恒重,即得供试品,置于 4 °C 冰箱中,备用。

表 1 冷水花样品采收地点、时间

No.	采集地	采集时间
1	贵州纳雍	2011-10
2	贵州盘县	2011-08
3	贵州玉屏	2011-09
4	贵州天柱	2011-09
5	贵州凯里	2011-08
6	贵州息烽	2011-10
7	贵州正安	2011-10
8	贵州遵义	2011-08
9	贵州威宁	2011-09
10	贵州贵阳	2011-10

2.1.2 菌悬液的制备 将供试菌种分别接种在 LB 培养基上,37 °C 活化培养 24 h,挑取活化后的菌落与无菌生理盐水混合,所得菌悬液中细菌数目为 $10^6 \sim 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.1.3 活性的测定 采用平板打孔法:将 102 型新华滤纸打成直径为 6 mm 的圆形滤纸片,灭菌、烘干后放入冷水花提取物中充分浸泡,取出后低温干燥,制成药敏纸片备用。

准确称取冷水花供试品,用 DMSO 配成质量浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,用微型移液器吸取 40 μL 的菌悬液加入到凝固的培养基上,涂布均匀,然后用镊子取药敏纸片均匀贴在平板上。挥干溶剂后,放入 37 °C 恒温培养箱中倒置培养 24 h。观察有无抑菌圈的产生,并用直尺测量抑菌圈大小,记录结果,求其平均值。实验共设 3 个实验组,每 3 个平板为 1 组,每组重复 3 次。用庆大霉素(8 万单位)作为阳性对照。

冷水花的石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物和水萃取物对 6 种供试菌的抑菌试验结果见表 2。

表 2 冷水花不同萃取部位的抑菌效果($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	抑菌圈直径/mm					
	枯草芽孢杆菌	铜绿假单胞菌	大肠埃希菌	藤黄微球菌	金黄色葡萄球菌	伤寒沙门菌
冷水花石油醚部位	-	-	-	-	-	-
冷水花乙酸乙酯部位	10.24 ± 1.32	-	-	-	-	-
冷水花水部位	-	-	-	-	-	-
空白	-	-	-	-	-	-
庆大霉素	31.38 ± 0.71	29.97 ± 0.76	27.04 ± 1.18	26.85 ± 1.40	26.45 ± 1.26	26.59 ± 1.48

注:“-”无抑菌圈。

表 2 显示,冷水花只有乙酸乙酯部位对枯草芽孢杆菌有抑菌作用,对其他菌株无抑制活性,其余部位对所试菌株均没有抑菌活性,冷水花的抑菌活性部位为乙酸乙酯部位。

2.2 薄层指纹图谱研究

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的豆甾醇对照品适量,用乙酸乙酯制成 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品储备液。精密吸取以上对照品储备液 1 mL,至

10 mL 量瓶中,用乙酸乙酯定容至刻度制成为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 分别精密称取干燥至恒重的不同批次冷水花药材粉末(过 40 目筛)约 1.0 g,按 2.1.1 项下的方法制成乙酸乙酯萃取物,挥干溶剂,用乙酸乙酯定容至 10 mL,作为供试品溶液。

2.2.3 薄层色谱条件 照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验,吸取以上供试品溶液、对照品溶液各 $3 \mu\text{L}$,分别点于同一硅胶薄层板上,以石油醚-三氯甲烷-乙酸乙酯(2:1:1)为展开系统上行展开,展距 8 cm,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105 °C 加热至斑点显色清晰,分别于可见光及 366 nm 荧光下检视,

2.2.4 薄层色谱指纹图谱的测定 将 10 批次冷水花供试品溶液按 2.2.3 项下薄层色谱条件进行展开,得到冷水花的薄层色谱指纹图谱(图 1)。图 1 为 366 nm 荧光下的薄层色谱指纹图谱,1~10 为不同产地冷水花的薄层色谱指纹图谱,s 为对照品豆甾醇的薄层色谱图,其 Rf 值为 0.54。

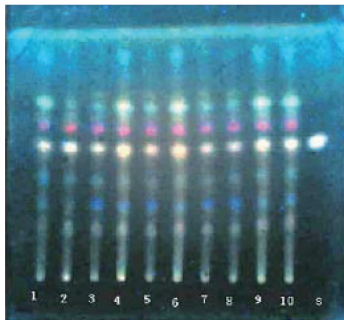


图 1 冷水花薄层色谱指纹谱

2.2.5 指纹图谱的建立 将 2.2.3 项下 366 nm 荧光检视所得的薄层色谱图谱导入 CHROMAP 1.5 色谱指纹图谱系统解决方案软件,生成灰度扫描图并积分。通过软件对不同产地冷水花样品的指纹图谱进行叠加得到相应的轮廓图(图 2);以采自贵州纳雍的冷水花作为参考药材,采用中位数法确定特征峰,均数法计算特征值,共指认了 8 个特征色谱峰,相对位移分别为 0.08,0.24,0.33,0.42,0.54,0.62,0.69,0.87,构成了冷水花薄层色谱指纹图谱共有模式(图 3),其中 5 号峰为豆甾醇。

2.2.6 聚类分析 对 10 批样本经标准化后的数据进行聚类分析,其结果见图 4。由图可知,样品聚为 3 类,不同样品间化学成分存在一定差异。第 I 类包括序号 1,2,6,10 的 4 个样品,其中 1 号与 2 号样品成分相似,6 号与 10 号样品成分相似;第 II 类包

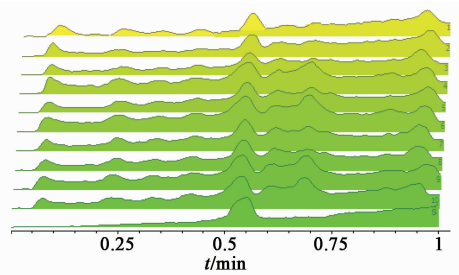


图 2 10 批冷水花药材薄层色谱谱叠加

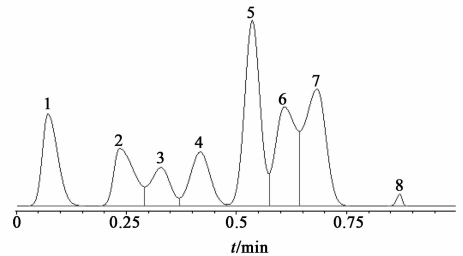


图 3 冷水花薄层色谱指纹谱共有模式

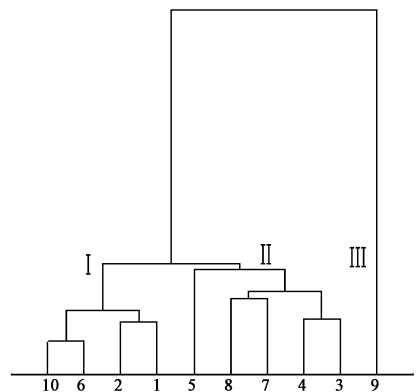


图 4 冷水花样品聚类分析树状

括序号 3,4,5,7,8 的 5 个样品,其中 3 号与 4 号相似,7 号与 8 号相似;第 III 类仅包括序号 9 的 1 个样品。由聚类分析可直观地区分出冷水花样品中的化学成分差异与不同地理环境存在较大的相关性。

2.2.7 主成分分析 对 10 批样本经标准化后的数据进行主成分分析,由 PC1-PC2 构成的投影图见图 5。由图可知,10 批样本聚为 3 类,各类分布效果明显,与聚类分析结果一致,其 PC1 的贡献率为 68.9%,图中 9 号样本与其他样本保存较远距离,与其他样本之间具有明显的差异。

3 讨论

3.1 抗菌活性研究 在抗菌活性研究中发现,湿生冷水花乙酸乙酯部位对枯草芽孢杆菌具有抑菌活性,其抑菌圈为 $(10.24 \pm 1.32) \text{ mm}$,其抑菌效果强于同属植物纤细冷水花^[3] (*Pilea notate*) 对枯草芽

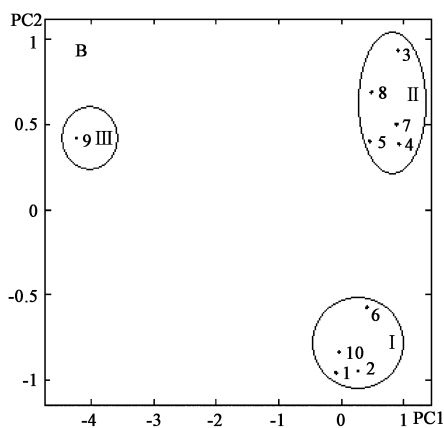


图 5 冷水花样品成分分析投影

孢杆菌的抑菌活性,其抑菌圈为 5.86 mm。但试验结果表明湿生冷水花的乙酸乙酯部位对其他菌株均没有明显的抑菌活性,而后者对所试菌株均有一定的抑菌活性,这说明冷水花属中不同冷水花品种之间的抗菌活性具有差异性。

3.2 影响因素的考察与优化

3.2.1 供试品制备方法的确定 为了真实反映冷水花抗菌活性部位指纹图谱,指纹图谱研究与抗菌活性研究为同一供试品的制备方法。

3.2.2 薄层色谱条件的优化及稳定性考察^[9] 考察了供试品溶液点样量为 1,3,5 μL 时,薄层色谱图的呈点性及成像的清晰度,结果点样量为 3 μL 时的成像清晰且薄层色谱图未见明显的拖尾显现,呈点性好;点样量为 1 μL 时,斑点不清晰,成像过程中未能达到与基线分离;而 5 μL 时具有明显的拖尾,成像不清晰。

考察了石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$)-乙酸乙酯、石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$)-丙酮、石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$)-三氯甲烷及石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$)-三氯甲烷-乙酸乙酯等展开剂系统,结果显示石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$)-三氯甲烷-乙酸乙酯(2:1:1)时斑点分离度及清晰度上均比其他展开系统好。另外,以调节展开剂比例考察了展开系统的稳定性,分别考察了石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$)-三氯甲烷-乙酸乙酯(1.5:1:1),(2.5:1:1),(2:0.5:1),(2:1:0.5)时样品的薄层展开效果,以上系统均能有效的分离各点,且均较清晰,因此石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$)-三氯甲烷-乙酸乙酯的上述系统均能用于冷水花药材的薄层鉴别。

3.2.3 显色方法的考察 分别用 5% 硫酸乙醇溶液、10% 硫酸乙醇溶液、1% 香草醛硫酸溶液及碘熏 4 种显色剂进行显色。结果显示,采用 10% 硫酸乙

醇溶液为显色剂时,置日光下检视,豆甾醇有清晰的斑点,但斑点数目较少,而置于 366 nm 下检视,薄层色谱图中出现 8 个清晰的荧光斑点,因此确定其显色方法为展开后在薄层板上喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}\text{C}$ 加热 3 min 后,于 366 nm 下检视。

3.2.4 温度湿度的考察 为了考察温度湿度对所建立的薄层指纹图谱研究方法的影响,试验中分别在 10,20,30,40 $^{\circ}\text{C}$ 4 种温度及 30%,40%,50%,60%,70% 5 种湿度的情况下进行薄层展开,发现 10~30 $^{\circ}\text{C}$ 的温度,湿度在 30%~60% 时,均可以得到分离度较好、呈点清晰的薄层色谱图;但温度大于 40 $^{\circ}\text{C}$,湿度超过 60% 后,环境条件会明显影响到薄层展开效果。

4 结论

通过冷水花不同提取物对所试枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、藤黄微球菌、金黄色葡萄球菌、伤寒沙门菌 5 种菌株的抗菌活性实验可知冷水花的抗菌活性部位是乙酸乙酯部位;10 个不同来源的冷水花样本中均含有豆甾醇,但含量有一定的差异,主要化学成分的含量与地域存在较大的相关性。

建立的薄层指纹图谱鉴别方法操作简单、稳定性好、适应性强,可用于冷水花药材品种的鉴别,为冷水花药材的质量控制提供了科学依据。

[参考文献]

- [1] 邱德文,杜江. 中华本草. 苗药卷[M]. 贵阳: 贵州科技出版社,2005: 311.
- [2] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳:贵州科技出版社,2003: 202.
- [3] 孙春龙,杜文,李洪庆. 苗药冷水花提取物的抑菌作用[J]. 山地农业生物学报,2009, 28(5): 468.
- [4] 孙春龙,郑庆霞,李洪庆,等. 苗药冷水花提取物抗炎镇痛活性的研究[J]. 贵州大学学报,2009, 26(6): 67.
- [5] 梁志远,冉晓燕,甘秀海. 冷水花挥发油化学成分 GC-MS 分析[J]. 贵州师范学院学报,2009, 8(12): 36.
- [6] 甘秀海,梁志远,王瑞,等. SPME/GC-MS 分析冷水花的挥发性成分[J]. 光谱实验室,2011, 28(6): 3008.
- [7] 甘秀海,梁志远,杨小生,等. 冷水花化学成分研究[J]. 中成药,2012, 34(4): 689.
- [8] 甘秀海,梁志远,王婕. 冷水花的薄层指纹图谱研究[J]. 贵州师范学院学报,2010, 26(3): 34.
- [9] 苏星,李相坤,吴弢,等. 北沙参药材的薄层色谱指纹图谱研究[J]. 中药材,2012, 35(2): 210.

[责任编辑 顾雪竹]