

HPLC 法同时测定刺山柑果实正丁醇部位中 3 种成分及该部位抑菌活性

包晓玮¹, 赵文燕², 曾兰君¹, 魏晨业¹, 金渭荃¹

(1. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 新疆军区保障部药品仪器监督检验站, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定刺山柑 *Capparis spinosa* L. 果实正丁醇部位中 3 种成分的含量, 并评价该部位抑菌活性。**方法** 该药材正丁醇部位的分析采用岛津 Inertsil ODS-3 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (含 0.1% 甲酸)-乙酸铵 (含 0.1% 甲酸) (25 : 75); 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 40 ℃; 检测波长 280 nm。采用试管二倍稀释法, 测定该部位对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度和最低杀菌浓度。**结果** 芦丁、对羟基苯甲酸、异槲皮苷分别在 0.5~16 μg/mL ($r=0.999\ 4$)、1~32 μg/mL ($r=0.999\ 8$)、0.5~16 μg/mL ($r=0.998\ 1$) 范围线性关系良好, 平均加样回收率分别为 90.62%、100.84%、91.82%, RSD 分别为 3.45%、3.02%、4.62%。正丁醇部位对 3 种细菌的最小抑菌浓度分别为 25、25、6.25 mg/mL, 最小杀菌浓度分别为 50、50、12.5 mg/mL。**讨论** 该方法稳定可靠, 可用于刺山柑的质量控制, 而且其正丁醇部位对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌均有一定抑菌活性。

关键词: 刺山柑果实; 正丁醇部位; 芦丁; 对羟基苯甲酸; 异槲皮苷; 抑菌活性; HPLC; 试管二倍稀释法

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)09-2567-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.09.056

刺山柑 *Capparis spinosa* L. 为白花菜科山柑属植物, 属多年生藤本小半灌木^[1], 其药用部位为叶、果实、根皮, 性温, 味辛、苦, 具有祛风、通鼻窍、止淤消肿、止痛活血之功效, 维吾尔族民间常将其果实捣碎后贴敷, 用于治疗关节炎和肩周炎等疾病^[2]。Khanfar^[3]从刺山柑中分离得到 2 个新化合物, 经质谱分析鉴定均为生物碱; Sharaf 等^[4]对 3 种山柑属植物中的黄酮进行分析, 共发现 23 种, 其中果实含槲皮素-3-*O*-芸香糖苷、槲皮素-7-*O*-芸香糖苷等; Germanò 等^[5]从刺山柑地上部分中分离得到芦丁、异鼠李素-3-芸香苷。

研究表明, 芦丁^[6]、对羟基苯甲酸^[7]、异槲皮苷^[8]均具有良好的抗菌作用。因此, 本实验在前期基础上^[9-10]建立 HPLC 法同时测定刺山柑果实正丁醇部位中上述 3 种成分含量, 并评价该部位抑菌活性, 以期为该药材质量控制提供基础, 也为今后开发天然广谱抗菌成分提供依据。

1 材料

1.1 仪器 LC-20AB 高效液相色谱仪, 配置 SPD-20A 紫外检测器 (日本岛津公司); KQ-250DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); FA2004N 型电子天平 (上海菁海仪器有限公司)。

1.2 试剂与药物 刺山柑于 2019 年 5 月购于新疆乌鲁木齐市北园春批发市场, 经新疆农业大学食品科学与药学院药学系马生军副教授鉴定为正品。芦丁对照品 (批号 Y16M9S61523, 纯度≥98%)、对羟基苯甲酸 (批号 MKBK3576V, 纯度≥99%) (上海源叶生物科技有限公司); 异槲皮苷对照品 (成都曼思特生物科技有限公司, 批号 MMST-18051005, 纯度≥99.74%)。0.22 μm 有机相微孔滤膜 (美国 Thermo-Fisher 公司)。色谱纯甲醇、乙腈 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 色谱纯甲酸、分析纯乙酸铵 (国药集团化学试剂有限公司); 水为娃哈哈纯净水。

1.3 菌种 大肠杆菌 [CMCC (B) 44102]、金黄色葡萄球菌 [CMCC (B) 26003]、枯草芽孢杆菌 [CMCC (B) 63501], 均由新疆维吾尔自治区药检所提供。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取芦丁、异槲皮苷、对羟基苯甲酸对照品适量, 甲醇制成 1 mg/mL 贮备液, 吸取适量并混匀, 甲醇稀释, 即得 (三者质量浓度均为 10 μg/mL), 0.22 μm 微孔滤膜过滤。

2.2 供试品溶液制备 取药材干燥果实, 粉碎后过 60 目筛, 称取 200 g, 按料液比 1 : 10 用 80%、50% 乙醇各超声

收稿日期: 2020-05-21

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (81860766); 新疆维吾尔自治区自然基金项目 (2017D01A30)

作者简介: 包晓玮 (1969—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为食品营养与安全。Tel: 13899988973, E-mail: 408531623@qq.com

网络出版日期: 2020-09-22

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20200922.1347.002.html>

提取 3 次，每次 50 min，提取液合并，减压浓缩得浸膏，混悬于等量蒸馏水中，按 1：2 比例依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇各萃取 3 次，合并正丁醇萃取液，减压浓缩，得相应部位浸膏 4.02 g，精密称取 10 mg，10 mL 甲醇溶解，即得，0.22 μm 微孔滤膜过滤。

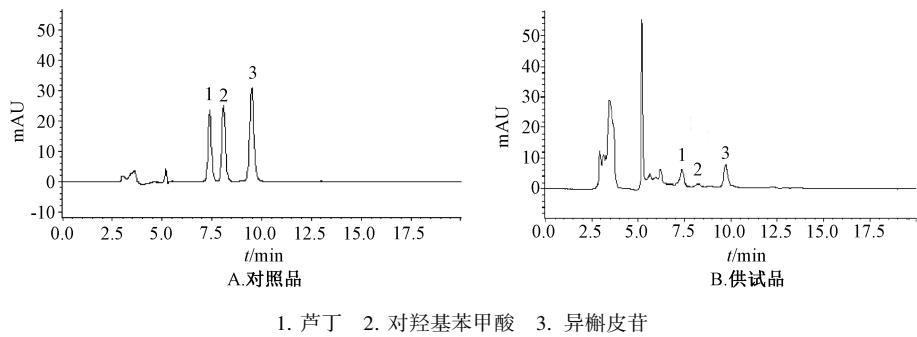


图 1 各成分 HPLC 色谱图

2.4 线性关系考察 将“2.1”项下贮备液用甲醇依次稀释成 32、16、8、4、2、1、0.5 μg/mL 对照品溶液，在“2.3”项色谱条件下各进样 20 μL 测定。以对照品质量浓

2.3 色谱条件 岛津 Inertsil ODS-3 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相乙腈（含 0.1% 甲酸）-乙酸铵（含 0.1% 甲酸）（25：75）；体积流量 0.8 mL/min；柱温 40 ℃；检测波长 280 nm；进样量 20 μL。色谱图见图 1。

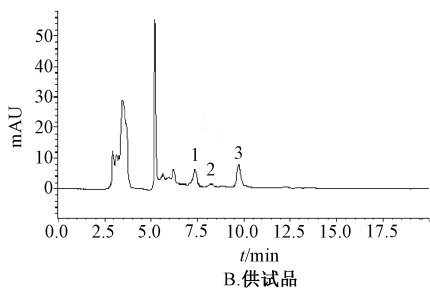


表 1 各成分线性关系

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	检出限/(μg·mL ⁻¹)	定量限/(μg·mL ⁻¹)
芦丁	$Y=45\ 344X-9\ 338.3$	0.999 6	0.5~16	0.004	2.679
对羟基苯甲酸	$Y=44\ 883X+2.756\ 2$	0.999 8	1~32	0.001	0.225
异槲皮苷	$Y=73\ 886X-11\ 631$	0.999 0	0.5~16	0.003	1.527

2.5 精密度试验 精密吸取“2.1”项下对照品溶液 20 μL，在“2.3”项色谱条件下进样测定 6 次，测得芦丁、对羟基苯甲酸、异槲皮苷峰面积 RSD 分别为 1.88%、1.85%、1.79%，表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取正丁醇部位适量，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、4、8、10、12、24 h 在“2.3”项色谱条件下各进样 20 μL 测定，测得芦丁、对羟基苯甲酸、异槲皮苷峰面积 RSD 分别为 1.24%、1.77%、1.35%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取正丁醇部位适量，按“2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.3”项色谱条件下各进样 20 μL 测定，测得芦丁、对羟基苯甲酸、异槲皮苷峰面积 RSD 分别为 1.60%、1.88%、1.81%，表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取各成分含量已知的正丁醇部位 9 份，分别 80%、100%、120% 水平加入对照品溶液^[11]，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项色谱条件下进样测定，计算回收率，结果见表 2。

2.9 样品含有量测定 取正丁醇部位 6 份，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项色谱条件下进样测定，计算含量，结果见表 3。

2.10 抑菌活性研究 精密称取正丁醇部位浸膏 1 g，加入 1 mL DMSO 充分溶解，得到 1 g/mL 供试液。将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌在无菌条件下接种于新鲜斜面固体培养基，置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养过夜进行活

度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标（*Y*）进行回归，分别以 *S*/*N*=3、*S*/*N*=10 为检出限、定量限，结果见表 1，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 2 各成分加样回收率试验结果（*n*=9）

成分	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
芦丁	4.11	3.37	6.88	85.46	90.62	3.45
	4.11	3.37	6.96	87.53		
	4.11	3.37	7.28	95.21		
	4.11	4.11	7.86	91.46		
	4.11	4.11	7.82	90.38		
	4.11	4.11	7.89	92.00		
	4.11	4.85	8.64	92.37		
	4.11	4.85	8.68	93.34		
	4.11	4.85	8.45	87.86		
	0.72	0.58	1.31	101.61		100.84
	0.72	0.58	1.29	97.63		
	0.72	0.58	1.33	103.87		
	0.72	0.72	1.45	99.76		
	0.72	0.72	1.45	99.96		
	0.72	0.72	1.47	102.72		
	0.72	0.87	1.60	101.13		
	0.72	0.87	1.64	105.33		
	0.72	0.87	1.55	95.49		
异槲皮苷	8.33	6.83	14.16	85.42	91.82	4.62
	8.33	6.83	14.16	85.32		
	8.33	6.83	14.64	92.38		
	8.33	8.34	16.34	96.02		
	8.33	8.34	15.99	91.87		
	8.33	8.34	16.34	96.02		
	8.33	9.84	17.69	95.05		
	8.33	9.84	17.14	89.47		
	8.33	9.84	17.67	94.88		

化，再接种于液体无菌 LB 培养基振荡培养。

表 3 各成分含量测定结果 (mg/g, n=6)			
编号	芦丁	对羟基苯甲酸	异槲皮苷
1	4.07	0.72	8.27
2	4.04	0.71	8.14
3	4.10	0.73	8.27
4	4.09	0.71	8.34
5	4.20	0.75	8.51
6	4.16	0.73	8.46

取编号 1-7 的无菌离心管, 无菌条件下在 1 号试管中加入 5.4 mL LB 液体培养基, 其余各管加入 3 mL。再于 1 号试管中加入 0.6 mL 供试液, 充分混匀至 100 mg/mL, 吸取 3 mL 药液加到 2 号管中, 振荡混匀后倍比稀释, 吸取 3 mL 药液加到 3 号管中, 以此类推, 2~7 号管中供试液质量浓度依次为 50、25、12.5、6.25、3.125 mg/mL。在各离心管中加入 200 μ L 金黄色葡萄球菌的菌悬液, 充分混匀后封口, 37 $^{\circ}$ C 下恒温振荡培养 18~24 h。采用活菌计数法测定细菌浓度^[12], 以 LB 液体培养基将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌浓度调至 1×10^6 CFU/mL, 取 0.2 mL 加到各离心管中。同时, 另设只含 LB 液体培养基的空白对照及未加入细菌的阴性对照。

供试液在培养箱中培养 24 h 后, 各取 200 μ L 至无菌固体培养基平皿中涂板, 置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 24 h。以平板上无细菌生长或生长菌落数小于 3 个时对应的稀释度为最小抑菌浓度, 平板上完全无细菌生长时对应的稀释度为最小杀菌浓度, 平行 3 次, 取平均值。结果, 正丁醇部位对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度分别 25、25、6.25 mg/mL, 最小杀菌浓度分别为 50、32.5、12.5 mg/mL, 即对三者抑制作用大小依次为枯草芽孢杆菌>金黄色葡萄球菌>大肠杆菌。

3 讨论

本实验考察了流动相甲醇-0.1% 磷酸 (10 : 90、20 : 80、30 : 70、40 : 60、50 : 50)、乙腈 (含 0.1% 甲酸) -7.5 mmol/L 乙酸铵 (含 0.1% 甲酸) (15 : 85、25 : 75、30 : 70、35 : 65、50 : 50) 及其等度、梯度洗脱方式^[13-14], 发现与甲醇相比, 乙腈洗脱能力、分离效果较好, 最终确定为乙腈 (含 0.1% 甲酸) -7.5 mmol/L 乙酸铵 (含 0.1% 甲酸) 等度洗脱 (25 : 75)。再考察了体积流量 0.8、1.0 mL/min, 发现在 0.8 mL/min 时芦丁、对羟基苯甲酸、异槲皮苷均能基线分离, 分离度均大于 1.5, 理论塔板数以芦丁计均大于 7 000。黄酮紫外光谱在 240~400 nm 波长范围内有 2 个吸收带, 处于 290~380 nm 之间的为带 I, 处于 240~280 nm 之间的为带 II, 本实验通过 SPD-20 紫外检测器得到 280、360 nm 波长处对照品溶液色谱图^[15-17], 发现芦丁、异槲皮苷均有较大吸收峰, 而且色谱峰峰形良好, 分离度理想, 但对羟基苯甲酸在 360 nm 处无吸收峰, 故选择 280 nm 作为检测波长。

综上所述, 刺山柑果实正丁醇部位对革兰氏阳性菌 (枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌) 的抑制作用大于革兰氏阴性菌 (大肠杆菌); 从形态结构分析, 革兰氏阳性菌

中肽聚糖含量较高, 而革兰氏阴性菌中其含量较低, 并且后者最外层外膜为脂多糖, 表明活性成分可通过破坏肽聚糖结构来抑制细菌, 但对脂多糖结构的作用较弱。

参考文献:

[1] 张立运, 杨 春. 保护风蚀地的刺山柑[J]. 植物杂志, 2004(1): 3-4.

[2] 单文俊, 丁玉庆, 谢举锋. 外用野西瓜致接触性皮炎 1 例[J]. 实用医学杂志, 2005, 21(9): 982.

[3] Khanfar M A, Sabri S S, Abu Zarga M H, *et al.* The chemical constituents of *Capparis Spinosa* of Jordanian origin[J]. *Nat Prod Res*, 2003, 17(1): 9-14.

[4] Sharaf M, El-Ansari M A, Saleh N A M. Flavonoids of four *Cleome* and three *Capparis* species[J]. *Biochem Syst Ecol*, 1997, 25(2): 161-166.

[5] Germanò M P, De Pasquale R, D'Angelo V, *et al.* Evaluation of extracts and isolated fraction from *Capparis spinosa* L. buds as an antioxidant source[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(5): 1168-1171.

[6] Adhithya R, Lokesh R. Potential antibacterial drug targets for Quercetin and Rutin: An *in silico* study using Auto Dock[J]. *Der Pharmacia Lettre*, 2015, 7(11): 68-72.

[7] Heleno S A, Ferreira I C F R, Esteves A P, *et al.* Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, *p*-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 58: 95-100.

[8] Wang L J, Yang X S, Qin P Y, *et al.* Flavonoid composition, antibacterial and antioxidant properties of tartary buckwheat bran extract[J]. *Ind Crops and Prod*, 2013, 49: 312-317.

[9] 包晓玮, 韩海霞, 张青梅, 等. 刺山柑总黄酮对大鼠佐剂性关节炎的药效学研究[J]. 华西药学杂志, 2012, 27(4): 458-460.

[10] 包晓玮, 阎晓菲, 常永志, 等. 刺山柑提取物对正常小鼠耳廓微循环的作用[J]. 中国农学通报, 2015, 31(2): 62-66.

[11] 王 冰, 陈 洋, 李宝丽, 等. 蜂胶乙酸乙酯提取物的反相高效液相色谱-质谱分离鉴定[J]. 食品科学, 2014, 35(2): 186-190.

[12] 栾祖香, 徐子恒, 董秀凯, 等. HPLC 检测甘草颗粒中甘草酸及其抗菌活性[J]. 中国兽医学报, 2018, 38(5): 974-977.

[13] 吴 笛, 王峥涛, 张 勉. 高效液相色谱法同时测定款冬花中芦丁、异槲皮苷、绿原酸的含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(20): 2722-2725.

[14] 吴 笛, 雷 昌, 唐 林. HPLC 法同时测定款冬花中 7 种成分[J]. 中成药, 2019, 41(5): 1080-1084.

[15] 王伟玲, 刘剑桥, 王晓玲. HPLC 法同时测定藏药双花千里光中 6 个化学成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(5): 787-790.

[16] 郑毓珍, 卢静华, 孙玉琦. HPLC 法同时测定白梅花中 6 种黄酮类成分[J]. 中成药, 2018, 40(9): 2007-2010.

[17] 林珠灿, 黄安玉, 房英娟, 等. HPLC 法同时测定景天三七中没食子酸、没食子酸甲酯和对羟基苯甲酸的含量[J]. 福建中医药大学学报, 2014, 24(2): 27-30.