

溪黄草中迷迭香酸的含量测定研究

王清¹, 曹雨婷², 陈佩东²

作者单位:¹江苏省中医院药剂科, 江苏 南京 210029; ²南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046

通信作者: 陈佩东, 男, 副教授, 研究方向为中药化学成分及其活性研究, E-mail: chenpeidong1970@163.com

基金项目: 江苏省药学会课题(苏食药监法科[2014]337号)

摘要: **目的** 测定溪黄草中迷迭香酸的含量。 **方法** 采用高效液相色谱-质谱法(HPLC-MS)分析, 并应用高效液相色谱(HPLC)法测定溪黄草饮片中的迷迭香酸含量, 应用Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 以乙腈、0.1%磷酸(25:75)洗脱并进行方法学考察。 **结果** 迷迭香酸在0.063~1.012 μg/mL, $r=0.999\ 7$ 范围内呈良好的线性关系, 迷迭香酸的回收率为96.40%, 相对标准偏差(RSD)为2.46%。 **结论** 该研究所建立的测定方法简便、重现性好, 可用于溪黄草的质量控制。

关键词: 溪黄草/分析; 回收率; 色谱法, 高压液相; 含量测定; 迷迭香酸

Content determination of rosmarinic acid in *Isodon striatus*

WANG Qing¹, CAO Yudan², CHEN Peidong²

Author Affiliations: ¹Department of Pharmacy, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210029, China; ²College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210046, China

Abstract: **Objective** To determine the content of rosmarinic acid in *Isodon striatus*. **Methods** The content of rosmarinic acid was analyzed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS) and measured by high performance liquid chromatography (HPLC). A Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column was adopted. Acetonitrile and 0.1% phosphoric acid (25:75) was used for elution and a methodological investigation was conducted. **Results** Rosmarinic acid showed good linearity within the range of 0.063-1.012 μg/mL, $r=0.999\ 7$. The average recovery rate was 96.40% and relative standard deviation (RSD) was 2.46%. **Conclusion** The method is convenient and repeatable, which is suitable for the quality control of *Isodon striatus*.

Key words: *Isodon striatus* / analysis; Recovery rate; Chromatography, high pressure liquid; Content determination; Rosmarinic acid

溪黄草饮片为多年生草本植物唇形科香茶菜属 *Rabdosia lophanthoides* (Buch.-Ham. ex D. Don) Hara 的地上部分, 在华东及西南各省均有分布^[1]。《揭阳县民间常用草药简编》记载溪黄草性凉、味甘苦, 具有保肝利胆、清热退黄等功效, 临床上用于治疗急性胆囊炎、急性黄疸型肝炎以及食道炎等疾病^[2]。近年来的研究表明, 溪黄草提取物对由四氯化碳诱导的肝纤维化有保护作用^[3], 并可影响肝癌 HepG2 细胞基因的表达^[4]。溪黄草中化学成分类型主要有酚类、二萜类、三萜类、黄酮类、氨基酸以及木脂素类等^[5-6]。溪黄草在临床中较为常用, 在江苏、浙江、四川、湖南等省的中药饮片炮制规范中都收载有溪黄草饮片。近年来, 溪黄草的化学成分及质量标准控制研究有一定的进展, 对溪黄草中的二萜类、酚酸类等成分进行了定性及定量分析研究^[7-9]。为进一步

研究溪黄草中主要化学成分, 本研究于2016年1月至2018年6月应用高效液相色谱-质谱法(HPLC-MS)对溪黄草中化学成分进行了定性分析, 并对其中的迷迭香酸进行了含量测定, 为溪黄草的质量控制提供了科学依据。

1 材料

1.1 仪器 高效液相色谱(HPLC)分析采用 Waters 2695 色谱仪(美国 Waters 公司), 液质联用采用 AB SCIEX Triple TOF™ 5600 系统进行分析(美国 AB 公司), 配备岛津 LC-20A 快速液相系统(LC-20 ADXR 泵及 SIL20AXR 自动进样器, 日本岛津公司), 色谱柱为 Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。FA1104N 型分析天平。

1.2 试剂 溪黄草饮片采购于安徽益生源中药饮片科技有限公司(生产批号 160113), 安徽普仁中药

饮片有限公司(生产批号 A151101, 160101), 亳州市京皖中药饮片厂(生产批号 151203)。经南京中医药大学中药鉴定教研室刘圣金副教授鉴定为唇形科植物溪黄草 *Rabdosia lophanthoides* (Buch.-Ham. ex D. Don) Hara。对照品: 迷迭香酸(生产批号 MUST-15082904)及槲皮素(生产批号 MUST-15090717)购于成都曼斯特科技有限公司, 咖啡酸(生产批号 110885-200102)购于中国中药药品生物制品检定所, 芦丁(生产批号 YN1103SA14)购于上海源叶生物科技有限公司。乙腈为色谱纯, 其它试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溪黄草中化学成分定性分析

2.1.1 供试品及混合对照品溶液的制备 取溪黄草饮片粉末过四号筛(250 μm , 65 目), 称取约 1 g, 以 95% 乙醇 25 mL 水浴回流 1 h, 放冷后过滤并取续滤液, 即得供试品溶液。精密称取迷迭香酸 0.93 mg, 槲皮素 0.52 mg 及咖啡酸 0.48 mg 对照品置于 5 mL 容量瓶中, 分别加甲醇定容。取芦丁 2.50 mg 置于 25 mL 容量瓶中, 加 50% 乙醇定容。分别吸取上述溶液 100 μL 制成混合对照品溶液。

2.1.2 色谱条件及质谱条件 色谱柱为 ACQUITY

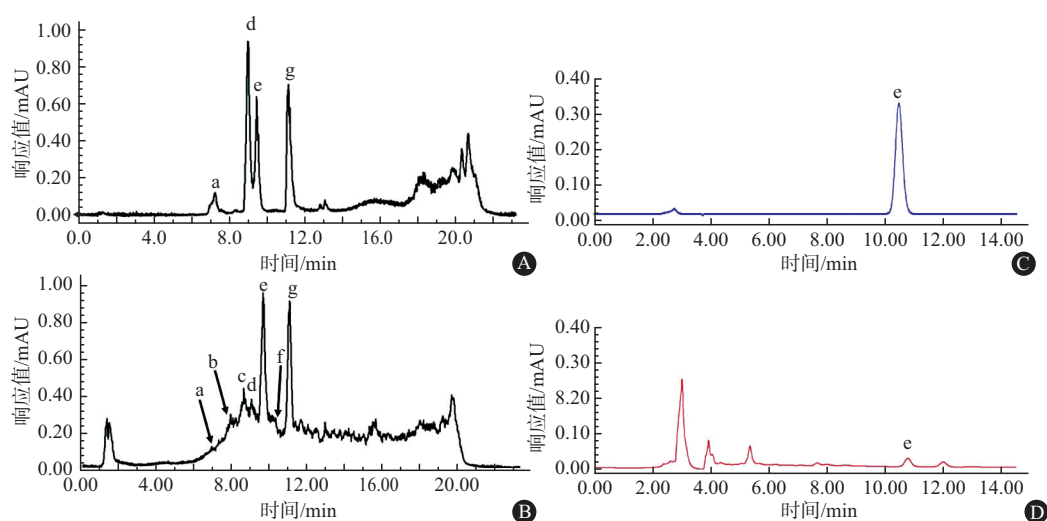
UPLC C_{18} 1.7 μm (2.1 $\times$ 100 mm); 流动相: A 为 0.2% 甲酸, B 为甲醇, 梯度洗脱。0 min, 92A; 0~1 min: 92~88 A; 1~2 min, 88~82A; 2~3 min, 82~77 A; 3~6 min, 77~50 A; 6~14 min, 50~30 A; 14~18 min, 30~10 A; 18~19 min, 10~92 A; 19~20 min, 92 A。流速为 0.2 mL/min, 柱温设置为 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 254 nm, 进样量 5 μL 。质谱条件设定为电喷雾离子源, 以负离子模式扫描。干燥气温度设置为 550 $^{\circ}\text{C}$, 干燥气流量为 10 L/min, 离子源温度设置为 550 $^{\circ}\text{C}$, 雾化气电压为 40 psi (1 psi = 6.895 $\times 10^3$ Pa), 毛细管电压为 4 500 V。对照品 HPLC-MS 图见图 1A, 样品 HPLC-MS 图见图 1B, 分析结果见表 1。

2.2 溪黄草中迷迭香酸的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Kromasil C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈和 0.1% 磷酸 (25:75), 检测波设定为 330 nm, 流速为 1 mL/min, 柱温设定为 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 20 μL 。

2.2.2 溶液制备

2.2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取迷迭香酸 50.60 mg 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释置刻度, 摇匀, 配置成浓度为 5.06 mg/mL 的溶液, 即得。



注: a 为咖啡酸, b 为新西兰牡荆苷-2, c 为牡荆苷, d 为芦丁, e 为迷迭香酸, f 为胡麻黄素, g 为槲皮素

图1 溪黄草高效液相色谱-质谱法(HPLC-MS)及HPLC色谱图: A为混合对照溶液总离子流图, B为溪黄草饮片总离子流图, C为迷迭香酸对照溶液HPLC色谱图, D为供试品溶液HPLC色谱图

表1 溪黄草中的化学成分分析结果

峰号	保留时间/min	化合物	分子式	离子质量	分子量	误差/ $\times 10^{-6}$	离子碎片
a	7.12	Caffeic acid, 咖啡酸	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	179.036 6	180.042 3	4.0	135.047 6
b	7.48	Vicenin-2, 新西兰牡荆苷-2	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	593.148 0	594.158 5	-2.4	573.253 6, 87.164 2, 116.930 9
c	8.38	Vitexin, 牡荆苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	431.096 5	432.105 6	-2.0	361.164 6, 328.117 8, 207.013 3, 134.867 1
d	8.82	Rutin, 芦丁	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	609.145 3	610.153 4	-1.5	151.002 1, 299.017 3, 463.095 9
e	9.35	Rosmarinic acid, 迷迭香酸	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$	359.076 3	360.084 5	0.4	161.026 0, 197.045 6
f	10.27	Pedalitin, 胡麻黄素	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$	315.050 7	316.058 3	2.1	187.098 1, 125.099 2
g	11.91	Quercetin, 槲皮素	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	301.035 9	302.042 7	2.4	243.027 5, 145.034 0

2.2.2.2 供试品溶液的制备 取溪黄草饮片粉末约1 g,精密称定后置具塞锥形瓶中,精密加入25 mL 50%乙醇,称定质量,水浴回流1 h,放冷后以50%乙醇补足质量。精密吸取续滤液1 mL至10 mL容量瓶中,以50%乙醇定容至刻度,即得(HPLC色谱图见图1C,1D)。

2.2.3 系统适用性试验 分别取供试品及对照品溶液,按色谱条件进行测定。实验结果表明供试品与对照品溶液在相同的位置出峰,且未见与其它组分相互干扰。色谱图见图1C,1D。取供试品溶液,按色谱条件进样,迷迭香酸理论板数按色谱峰计不低于3 000。

2.2.4 线性关系考察 精密量取1 mL迷迭香酸对照品溶液置10 mL量瓶中,以甲醇定溶,作为母液。精密量取1 mL母液置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。依次按上述操作,得到一定浓度的稀释溶液。分别吸取上述溶液20 μ L,按2.2.1中色谱条件,测定迷迭香酸峰面积,再以峰面积对其相应的进样量进行回归,得到线性方程 $Y=65\,718\,018.83X-3\,868.35$, $r=0.999\,7$,迷迭香酸在0.063~1.012 μ g范围内呈良好的线性关系,检测限为0.437 1 μ g/mL,定量限为0.131 9 μ g。

2.2.5 精密度试验 取同一供试品溶液,按照上述色谱条件连续测定6次,计算迷迭香酸的峰面积,结果迷迭香酸的相对标准偏差(RSD)为1.32%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取同一批样品,按照上述供试品溶液的制备方法制备溪黄草供试品溶液,进样,重复测定6次,计算迷迭香酸的峰面积,结果迷迭香酸平均含量为0.028 5%,RSD为2.98%,测定结果重复性较好。

2.2.7 稳定性试验 在室温条件下,按上述色谱条件,分别于0、2、4、6、8、12、24 h测定同一样品溶液,计算迷迭香酸的峰面积,结果迷迭香酸峰面积RSD为0.39%,表明迷迭香酸24 h内稳定性较好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取6份已知含量的同一样品0.5 g,按照上述供试品溶液的制备方法,然后加入一定量的对照品溶液,平行制备6份供试品溶液,按上述色谱条件进样,测定各成分的回收率,测定结果见表2。

2.2.9 样品含量测定 精密称取各批次样品,按上述供试品溶液的制备方法及色谱条件测定,每批样品平行测定2次,计算溪黄草饮片中迷迭香酸的含量,结果见表3。

表2 迷迭香酸加样回收率结果

取样量/g	含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
0.501 8	0.142 9	0.126 5	0.263 6	95.41		
0.501 3	0.142 8	0.126 5	0.270 6	101.0		
0.501 8	0.142 9	0.126 5	0.262 6	94.62		
0.500 8	0.142 6	0.126 5	0.262 4	94.70	96.40	2.46
0.500 7	0.142 6	0.126 5	0.264 4	96.28		
0.501 4	0.142 8	0.126 5	0.264 7	96.36		

注:RSD为相对标准偏差

表3 迷迭香酸含量高效液相色谱法测定结果

生产批号	称样量/g	干重/g	平均峰面积	含量/%	平均含量/%
151203	1.001 0	0.999 89	854 949	0.032 7	0.032 3
	1.001 1	0.999 99	835 784	0.031 9	
160101	1.001 2	1.000 31	801 820	0.030 6	0.029 2
	1.001 5	1.000 61	724 382	0.027 7	
160113	1.001 9	1.000 85	878 586	0.033 5	0.033 2
	1.001 7	1.000 65	857 976	0.032 7	
A151101	1.001 3	1.000 21	817 826	0.031 3	0.031 8
	1.001 2	1.000 11	848 214	0.032 4	

3 讨论

香茶菜属植物基源植物较多,常易混淆^[10]。其中常见化合物有酚酸类^[11]、黄酮类及萜类物质^[12-13],结合以往文献,本研究以芦丁、槲皮素、咖啡酸及迷迭香酸为对照溶液对溪黄草进行了HPLC-MS分析。根据负离子模式下分子离子及碎片离子峰,对照文献^[14],鉴定了其中7个化合物。综合考虑实验结果后选用迷迭香酸进行含量测定。

迷迭香酸可对小鼠急性肝损伤有保护作用^[15],有助于改善与胆汁淤积相关的肝损伤^[16],而且具有抗炎^[17]、神经保护^[18]等作用,与溪黄草的功效相吻合。同时,迷迭香酸是中药饮片及其复方制剂常用的检测指标成分^[19]。本研究分别考察了30%、50%、70%及95%的乙醇提取;水浴和超声提取;30、45、60、75、90 min的提取时间;最终确定以50%乙醇作为溶剂,90 $^{\circ}$ C水浴提取30 min。实验结果表明,各批次溪黄草中迷迭香酸含量在0.028%~0.035%之间,重现性较好,为溪黄草饮片质量控制提供了依据。

参考文献

- [1] 孟爽爽,刘军民,罗登花,等.溪黄草和线纹香茶菜的ISSR反应体系的建立与优化[J].中药新药与临床药理,2018,29(5):652-656.
- [2] 莫小路,邱蔚芬,黄珊珊,等.溪黄草不同基原植物的抗菌和抗真菌活性研究[J].中国现代中药,2016,18(8):980-984.

- [3] 许琼梅,李跃龙,曹后康,等.溪黄草水提物对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的保护作用及机制研究[J].中国药房,2018,29(20):2791-2796.
- [4] 罗莹,廖长秀,贺珊,等.溪黄草对肝癌HepG2细胞基因表达谱的影响[J].重庆医学,2018,47(6):728-732.
- [5] 陈文飞,陈晨,夏凡,等.纤花线纹香茶菜化学成分的研究[J].云南中医学院学报,2017,40(2):76-80.
- [6] LIN CZ, ZHAO W, FENG XL, et al. Cytotoxic diterpenoids from *rabdosia lophanthoides* var. *gerardianus* [J]. *Fitoterapia*, 2016, 109: 14-19.
- [7] 邹盛勤,姜琼.RP-HPLC法同时测定线纹香茶菜不同生长部位中三萜酸成分[J].中成药,2015,37(3):570-573.
- [8] 唐海明,陈建南,张扬,等.HPLC法同时测定不同来源溪黄草药材中8个水溶性成分的含量[J].药物分析杂志,2015,35(2):228-234.
- [9] 王婴,廖远忠,林玉婷,等.溪黄草的定性定量方法研究[J].中药新药与临床药理,2014,25(2):212-215.
- [10] 谭瑞湘,黄娟,徐文,等.溪黄草及其混淆品的DNA分子鉴定研究[J].中药材,2017,40(2):320-324.
- [11] WANG WQ, XUAN LJ. ent-6, 7-Secokaurane diterpenoids from *rabdosia serra* and their cytotoxic activities [J]. *Phytochemistry*, 2016, 122:119-125.
- [12] 黄韬,吴冲,陈德金,等.一测多评法测定溪黄草中5个二萜类成分的含量[J].中药材,2019,42(2):344-347.
- [13] 龚先玲,何银妹,陈志红,等.正交试验法优选超声提取溪黄草中齐墩果酸的工艺研究[J].天津药学,2018,30(4):1-4.
- [14] LIN LZ, ZHAO HF, DONG Y, et al. Macroporous resin purification behavior of phenolics and rosmarinic acid from *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA leaf [J]. *Food Chemistry*, 2012, 130(2):417-424.
- [15] LI Z, FENG H, WANG Y, et al. Rosmarinic acid protects mice from lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver injury by inhibiting MAPKs/NF- κ B and activating Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67:465-472.
- [16] LIN SY, WANG YY, CHEN WY, et al. Hepatoprotective activities of rosmarinic acid against extrahepatic cholestasis in rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 108(Pt A):214-223.
- [17] COLICA C, DI RL, AIELLO V, et al. Rosmarinic acid as potential anti-inflammatory agent [J]. *Rev Recent Clin Trials*, 2018, 13(4):240-242.
- [18] CUI HY, ZHANG XJ, YANG Y, et al. Rosmarinic acid elicits neuroprotection in ischemic stroke via Nrf2 and heme oxygenase 1 signaling [J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(12):2119-2128.
- [19] 赵荣,肖会敏,何悦,等.调经益母片的高效液相色谱指纹图谱及成分定量研究[J].安徽医药,2018,22(7):1263-1267.

(收稿日期:2019-02-12,修回日期:2019-04-17)

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2020.06.010

◇临床医学◇

血浆淀粉样蛋白 A 和硫化氢水平对脓毒症休克病人诊断及预后价值

王玉华¹,张国秀¹,胡莹莹¹,张红华²作者单位:¹河南科技大学第一附属医院急诊科,河南 洛阳 471000;²河南科技大学第二附属医院急诊科,河南 洛阳 471000

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(2018020283)

摘要:目的 探讨血浆淀粉样蛋白 A(SAA)和硫化氢水平对脓毒症休克病人诊断及预后的评估价值。方法 选取2015年3月至2017年4月在河南科技大学第一附属医院经医学确诊的124例脓毒症休克病人作为研究组,同时选取在该院体检正常者124例作为对照组。采用酶联免疫双抗体夹心法检测研究组和对照组血浆SAA水平;利用分光光度法检测所有研究对象血浆硫化氢水平;术后1个月,对脓毒症休克病人进行随访,根据病人生存情况分为预后良好组和预后不良组,比较两组血浆SAA、硫化氢水平;绘制受试者工作特征曲线(ROC)评估血浆SAA、硫化氢水平对脓毒症休克病人治疗预后不良的诊断价值;对不同预后脓毒症休克病人的临床资料进行比较;logistic回归分析脓毒症休克预后的影响因素。结果 脓毒症休克组病人血浆SAA、硫化氢水平明显高于对照组[(128.35±41.23)μmol/L比(7.82±2.24)μmol/L, $t=32.505$, $P<0.001$; (104.47±31.98)μmol/L比(45.15±14.27)μmol/L, $t=18.863$, $P<0.001$];预后不良组血浆SAA、硫化氢水平明显高于预后良好组[(158.97±42.23)μmol/L比(107.83±33.59)μmol/L, $t=7.465$, $P<0.001$; (127.35±34.99)μmol/L比(89.62±26.52)μmol/L, $t=6.399$, $P<0.001$];血浆SAA、硫化氢水平预测病人系统治疗1个月后不良预后的曲线下面积(AUC)分别为0.812、0.788,其对应截断值分别为132.45 μmol/L、110.03 μmol/L,其对应灵敏度分别为75.0%、72.9%,对应特异度分别为78.9%、81.6%;两者联合评估脓毒症休克的AUC为0.913,其灵敏度、特异度分别为82.3%、93.4%;预后不良组脓毒症休克病人中具有肝硬化史、糖尿病史、白血病史、吸烟史者比例,急性生理学及慢性健康状况评分系统Ⅱ(APACHEⅡ)评分,序贯器官功能衰竭评分(SOFA),及乳酸含量均明显高于预后良好组($P<0.05$);肝硬化、白血病、APACHEⅡ评分、SOFA评分、SAA、硫化氢为脓毒症休克预后的危险因素($P<0.05$)。结论 血浆SAA、硫化氢水平在脓毒症休克病人中呈高表达,两者可能对脓毒症休克病人的早期诊断及预后有一定的评估价值。

关键词:休克,脓毒性; 血清淀粉样蛋白A; 硫化氢; 预后