

狭基线纹香茶菜(溪黄草)咖啡酸 和迷迭香酸的薄层鉴别与含量测定

鲁芹飞¹, 唐海明¹, 陈玲玲¹, 冯泓瑞¹, 黄松^{1,2*}

(1. 广州中医药大学, 广州 510006;

2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808)

[摘要] 目的:建立狭基线纹香茶菜药材中咖啡酸和迷迭香酸的 TLC 鉴别及 HPLC 含量测定方法。方法:以正己烷-乙酸乙酯-甲酸(3:3:1)为展开剂,展开后取出晾干,于干燥器内放置过夜后于紫外灯(365 nm)下检视;Dikma Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.3% 磷酸,流速为 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 329 nm。结果:在 TLC 色谱中咖啡酸和迷迭香酸斑点清晰,分离效果好;咖啡酸和迷迭香酸分别在 0.045 4~0.908 0 μg($r=0.999\ 9$)和 0.219 2~4.384 0 μg($r=0.999\ 6$)具有良好的线性关系,平均回收率($n=6$)分别为 96.57% (RSD 1.32%) 和 99.48% (RSD 2.53%)。结论:该方法准确可靠,可用于狭基线纹香茶菜(溪黄草)药材质量控制。

[关键词] 狭基线纹香茶菜; 咖啡酸和迷迭香酸; 薄层色谱法; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0114-03

[doi] 10.11653/syfyj2013220114

Identification and Determination of Caffeic Acid and Rosmarinic Acid in *Rabdosia lophanthoides* var *gerardiana* by TLC and HPLC

LU Qin-fei¹, TANG Hai-ming¹, CHEN Ling-ling¹, FENG Hong-ru¹, HUANG Song^{1,2*}

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Dongguan Institution for Mathematics and Theoretics Engineering Research, Dongguan 523808, China)

[Abstract] **Objective:** To establish methods for identification and determination of caffeic acid and rosmarinic acid in *Rabdosia. lophanthoides* var *gerardiana* by TLC and HPLC. **Method:** The developing solvent for caffeic acid and rosmarinic acid in *R. lophanthoides* var *gerardiana* by TLC was *n*-hexane-ethylestate-formic acid (3:3:1), detected under the UV light (365 nm). HPLC method was performed on a Dikma Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with a mobile phase of methanol-0.3% phosphoric acid by gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was kept at 25 °C and detection wavelength was set at 329 nm. **Result:** Caffeic acid and rosmarinic acid could be detected with clear spots and good separated by TLC, caffeic acid and rosmarinic acid showed good linearity in the ranges of 0.045 4-0.908 0 μg ($r=0.999\ 9$) and 0.219 2-4.384 0 μg ($r=0.999\ 6$) with average recoveries of 96.57% (RSD 1.32%) and 99.48% (RSD 2.53%). **Conclusion:** The methods are accurate and can be used for the quality of *R. lophanthoides* var *gerardiana*.

[Key words] *Rabdosia lophanthoides* (Buch. -Ham ex D. Don) Hara var *gerardiana* (Benth.) Hara; caffeic acid and rosmarinic acid; TLC; HPLC

现作商品“溪黄草”入药的除线纹香茶菜外,还有同属植物狭基线纹香茶菜^[1-3]。现代药理研究表

[收稿日期] 20130228(023)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2010B030700001)

[第一作者] 鲁芹飞,在读硕士研究生,从事中药新药开发研究, Tel:020-39359731, E-mail:jiayouluqinfei@163.com

[通讯作者] *黄松,博士,副教授,硕士生导师,从事中药新药开发研究, Tel:020-32503212, E-mail:hsl318@yahoo.com.cn

明狭基线纹香茶菜对小鼠的各种类型的肝损伤有很好的作用^[4-6]。狭基线纹香茶菜(溪黄草)中所含的化学成分咖啡酸与迷迭香酸具有丰富的药理作用。迷迭香酸具有抗氧化及清除自由基作用以及抗菌、抗病毒、抗炎、抗血栓等活性^[7]。研究表明,其对实验动物脑、肝、肾微粒体的脂质过氧化有强抑制作用,有促纤维蛋白溶解活性,同时对单纯疱疹病毒还有一定的抑制作用^[8]。咖啡酸亦具有广泛的抑菌、抗病毒、抗氧化作用。两者与溪黄草的抗肝炎、抗氧化、抗菌、抗病毒等活性一致,其药理活性提示在溪黄草药材的质量控制中的重要意义。目前未有对狭基线纹香茶菜药材中的咖啡酸、迷迭香酸含量测定等的相关质量标准研究的文献。本文对狭基线纹香茶菜药材中的咖啡酸和迷迭香酸建立了 TLC 的薄层鉴别和含量测定方法,为狭基线纹香茶菜药材及其提取物的质量控制提供一定的科学依据。

1 材料

Shimadzu LC-20AT 型高效液相色谱仪 (SPD-M20A 二极管阵列检测器, CTO-20A 柱温箱, Shimadzu LC Solution 色谱工作站, 日本 Shimadzu 公司), Dikma Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 薄层硅胶预制板 (青岛海洋化工厂生产), AB204-N 型电子分析天平 (METTLER TOLEDO 公司), 甲醇、乙腈均为色谱纯 (Merck 公司), 其他试剂为分析纯。咖啡酸对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号为 110885-200102)、迷迭香酸对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号为 111871-201102)。狭基线纹香茶菜药材, 经广州中医药大学新药开发研究中心陈建南研究员鉴定为唇形科的狭基线纹香茶菜 *Rabdosia lophanthoides* (Buch.-Ham ex D. Don) Hara var. *gerardiana* (Benth.) Hara 的地上部分, 标本存放于广州中医药大学新药开发研究中心。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别 取本品粉末(过四号筛)1.0 g, 加甲醇 25 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液浓缩至干, 残渣加甲醇 2 mL 溶解, 作为供试品溶液。另取咖啡酸和迷迭香酸对照品, 加甲醇制成 0.2 g·L⁻¹ 的混合溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法试验, 吸取供试品溶液和对照品溶液各 2 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-乙酸乙酯-甲酸(3:3:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 干燥器内放置过夜后于紫外灯(365 nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显示相同的荧光斑点。

2.2 咖啡酸与迷迭香酸的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取咖啡酸、迷迭香酸对照品 2.27, 10.96 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释成 0.227, 1.096 g·L⁻¹ 的混标溶液, 作为对照品供试液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品(过四号筛)1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 乙醇 40 mL, 称定质量, 超声提取 40 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 色谱条件 Dikma Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 A-乙腈, B-0.3% 磷酸, 梯度洗脱 (0 ~ 17 min, 12% A; 17 ~ 20 min, 12% ~ 25% A; 20 ~ 50 min, 25% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 329 nm, 柱温 25 °C。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL 至 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。分别精密吸取上 5 个浓度水平的对照品各 20 μL, 注入高效液相色谱仪中, 按上述色谱条件测定色谱峰面积, 以进样量为横坐标 (X)、峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得回归方程分别为 $Y_{\text{咖啡酸}} = 4.0 \times 10^6 X - 101826$ ($r = 0.9999$), $Y_{\text{迷迭香酸}} = 2.0 \times 10^6 X - 134274$ ($r = 0.9996$), 咖啡酸在 0.0454 ~ 0.9080 μg, 迷迭香酸在 0.2192 ~ 4.3840 μg 与面积线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液, 进样 20 μL, 平行测定 6 次, 测得 2 种成分峰面积, RSD 分别为 0.96%, 0.53%。表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液, 在 0, 8, 12, 18, 24 h 各进样 20 μL, 测得 2 种成分峰面积, RSD 分别为 0.96%, 0.85%。表明供试品在 24 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 精密称取同一样品 6 份, 每份 1.0 g, 照 2.3 供试品溶液制备方法制得供试品溶液, 按上述色谱条件进样 20 μL, 测定 2 种成分的含量, RSD 分别为 1.96%, 1.76%。表明方法重复性较好。

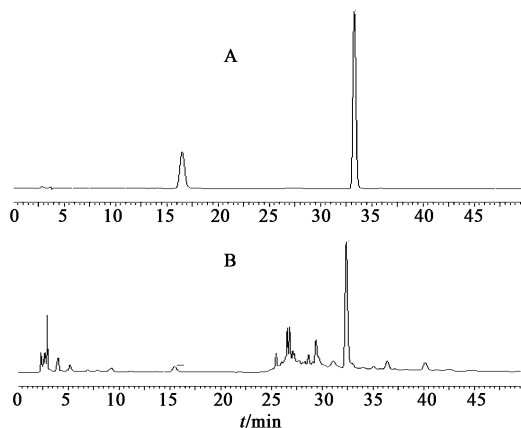
2.2.8 加样回收率测定 取已知含量的狭基线纹香茶菜药材粗粉(咖啡酸含量为 0.2476 g·L⁻¹, 迷迭香酸含量为 2.8903 g·L⁻¹)6 份, 精密称定, 分别精密加入咖啡酸(0.227 g·L⁻¹)和迷迭香酸对照品溶液(1.096 g·L⁻¹)0.40 mL, 按供试品溶液制备方法制备供试液, 计算其加样回收率和 RSD。结果见表 1。

2.2.9 样品的测定 取狭基线纹香茶菜药材粉末, 按 2.2.3 项下操作, 所得样品溶液经 0.45 μm 微孔

表 1 溪黄草咖啡酸和迷迭香酸加样回收率试验

成分	称样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
咖啡酸	0.302 9	0.075 0	0.090 8	0.164 2	98.24	96.57	1.32
	0.300 4	0.074 4	0.090 8	0.161 9	96.39		
	0.302 2	0.074 8	0.090 8	0.160 5	94.36		
	0.301 2	0.074 6	0.090 8	0.162 1	96.39		
	0.300 8	0.074 5	0.090 8	0.162 5	96.94		
	0.301 5	0.074 7	0.090 8	0.162 8	97.08		
	0.202 7	0.585 9	0.427 6	0.996 9	96.13		
	0.202 7	0.585 9	0.427 6	0.996 9	96.13		
迷迭香酸	0.201 1	0.581 2	0.427 6	1.021 1	102.87	99.48	2.53
	0.201 3	0.581 8	0.427 6	0.998 1	97.35		
	0.201 5	0.582 4	0.427 6	1.007 2	99.35		
	0.202 6	0.585 6	0.427 6	1.020 0	101.60		
	0.202	0.583 8	0.427 6	1.009 8	99.62		

滤膜滤过,按 2.2.1 项色谱条件进样 20 μL ,测定并计算咖啡酸和迷迭香酸的含量。对照品及样品色谱图见图 1,结果见表 2。



A. 对照品; B. 样品; 1. 咖啡酸; 2. 迷迭香酸

图 1 溪黄草对照品及样品的 HPLC

从表 2 可以看出上述 5 种不同来源的狭基线纹香茶菜中的咖啡酸和迷迭香酸的含量相差很大,其中咖啡酸的含量范围在 0.10 ~ 0.30 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,迷迭香酸的含量范围在 2.61 ~ 5.93 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,并且迷迭香酸的含量高于咖啡酸的含量。

表 2 不同来源的狭基线纹香茶菜中的咖啡酸和迷迭香酸的含量

No. 来源	咖啡酸		迷迭香酸	
	含量 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	$\bar{x} \pm s$	含量 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	$\bar{x} \pm s$
1 广东饶平	0.20	0.19 \pm 0.08	2.83	3.74 \pm 1.44
2 广东广州	0.30		5.93	
3 广东广州	0.21		4.49	
4 广东潮州	0.10		2.83	
5 广东汕头	0.11		2.61	

3 讨论

咖啡酸、迷迭香酸在紫外光灯 (365 nm) 下检视均可见亮紫色荧光,该方法主斑点清晰,易于检出,

重复性好。本实验中对咖啡酸和迷迭香酸进行分离鉴别时,首先参考了 2010 年版《中国药典》^[9],以正己烷-乙酸乙酯-甲酸(3:3:0.2)为展开系统,进行鉴别。将展开系统分别调整为正己烷-乙酸乙酯-甲酸(4:2:0.2)、正己烷-乙酸乙酯-甲酸(2:4:0.2)、正己烷-乙酸乙酯-甲酸(5:3:1)和正己烷-乙酸乙酯-甲酸(3:3:1)进行实验,前 3 种配比的展开剂,仍未能将咖啡酸很好地鉴别出来;用正己烷-乙酸乙酯-甲酸(3:3:1)展开后,完全挥干展开溶剂,在紫外光灯(365 nm)下检视,溪黄草药材咖啡酸和迷迭香酸斑点清晰,同时被完全鉴别。实验中对影响薄层鉴别的主要因素如饱和时间、展开温度、相对湿度等进行了考察,发现展开温度、相对湿度对分离效果影响较小,而饱和时间对展开效果影响较大,故建议展开前最好饱和 20 min 以上。

在测定咖啡酸和迷迭香酸含量时,对于供试品溶液的制备,考察了提取溶媒、溶媒倍量和提取时间,得出最佳提取方法,采用 40 倍量的 50% 乙醇超声提取 40 min;分别对咖啡酸、迷迭香酸在 200-800 nm 进行全波长扫描,根据扫描结果,选择 329 nm 为测定波长。流动相尝试使用了乙腈配比不同浓度的磷酸、甲醇配比不同浓度的磷酸进行洗脱,并且分别考察了等度洗脱和梯度洗脱方法,最终选用乙腈-0.3% 磷酸进行梯度洗脱。

[参考文献]

- [1] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准. 第 1 册[M]. 广州:广东科技出版社,2004:204.
- [2] 陈建南,赖小平,刘念. 广东溪黄草的基源植物调查及商品鉴定[J]. 中药材,1996,19(2):73.
- [3] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编. 上册[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,1996:886.
- [4] 侯少贞,长尾由纪子,叶木荣,等. 狭基线纹香茶菜对 D-半乳糖胺所致大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中药材,2008,31(2):248.
- [5] 胡英杰,赖小平,刘中秋,等. 狭基线纹香茶菜(溪黄草)的化学成分与抗乙型肝炎病毒作用研究[J]. 中草药,2005,36(11):1612.
- [6] 桂蜀华,张言,方春平,等. 狭基线纹香茶菜对免疫肝损伤小鼠 ICAM-1mRNA 和蛋白表达的影响[J]. 中药药理与临床,2011,27(2):86.
- [7] 谢兴亮,盛艳梅. 溪黄草的研究进展[J]. 医药导报,2011,30(4):494.
- [8] 孙文基,绳金房. 天然活性成分简明手册[M]. 北京:中国医药科技出版社,1998:488.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:319.

[责任编辑 顾雪竹]