

# 不同品种、不同产地溪黄草咖啡酸与迷迭香酸的含量测定

朱德全<sup>1</sup>, 黄松<sup>1,2\*</sup>, 陈建南<sup>1,2</sup>, 谭玉莲<sup>1</sup>, 屈莹莹<sup>1</sup>, 庄妍劼<sup>1</sup>

(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: 测定不同品种、不同产地溪黄草咖啡酸与迷迭香酸的含量。方法: 采用 HPLC, Dikma Diamonsil (2) (C<sub>18</sub> 4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.3% 磷酸为流动相梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温室温, 检测波长 329 nm。结果: 咖啡酸和迷迭香酸的线性范围分别为 0.045 4 ~ 0.908 0 μg (r = 0.999 6) 和 0.219 2 ~ 4.384 0 μg (r = 0.999 9), 平均回收率 (n = 5) 分别为 97.33% (RSD 2.20%), 103.32% (RSD 1.84%)。不同品种、不同产地溪黄草药材中咖啡酸、迷迭香酸的含量差异较大, 其中纤花变种的溪黄草两者的平均含量最高。结论: 该方法简单快捷, 适合于溪黄草中酚酸成分的含量测定研究, 为溪黄草的质量控制提供了依据。

**[关键词]** 溪黄草; 咖啡酸; 迷迭香酸; HPLC

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0114-04

## Determination of Caffeic Acid and Rosmarinic Acid in *Rabdosia serra* from Different Species and Different Habitat

ZHU De-quan<sup>1</sup>, HUANG Song<sup>1,2\*</sup>, CHEN Jian-nan<sup>1,2</sup>, TAN Yu-lian<sup>1</sup>, QU Ying-ying<sup>1</sup>, ZHUANG Yan-jie<sup>1</sup>

(1. New Drug R&D Department in Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

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

**[Abstract]** **Objective:** To establish a HPLC method for the determination of caffeic acid and rosmarinic acid in *Rabdosia serra* from different species and different habitat. **Method:** HPLC method was performed on a Dikma Diamonsil (2) (C<sub>18</sub> 4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mobile phase of methanol-0.3% phosphoric acid as mobile phase by gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, column temperature was kept at 25 °C and detection wavelength was set at 329 nm. **Result:** Caffeic acid and rosmarinic acid showed good linearity in the ranges of 0.045 4-0.908 0 μg (r = 0.999 6) and 0.219 2-4.384 0 μg (r = 0.999 9 with average recoveries of 98.7% and 103.0%, respectively. The content of caffeic acid and rosmarinic acid in *Rabdosia serra* from different species and different habitat, and the content of both in *R. lophanthoides* was the highest. **Conclusion:** The method is simple, rapid for determination the content of caffeic acid and rosmarinic acid in *R. serra*, and can be used as the quality control of *I. lophanthoides*.

**[Key words]** *Rabdosia serra*; caffeic acid; rosmarinic acid; HPLC

溪黄草为唇形科香茶菜属植物线纹香茶菜  
*Isodon lophanthoides* (Buch.-Ham. ex D. Don).

Hara. 的干燥地上部分<sup>[1]</sup>, 性味苦、甘、寒, 归肝、胆经, 具有清热利湿、退黄、凉血散瘀的功效, 用于治疗湿热黄疸、湿热泻痢、跌打瘀痛、急性黄疸型肝炎、急性胆囊炎、痢疾、肠炎等疾病<sup>[2]</sup>。溪黄草在广东各地临床应用普遍, 并开发出多种以之为主要原料的保健品及中成药, 如溪黄草冲剂、溪黄草茶、溪黄八珍茶、消炎利胆片、复方胆通等<sup>[3]</sup>。

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 *R. lophanthoides*

**[收稿日期]** 20120804(006)

**[第一作者]** 朱德全, 在读硕士研究生, 从事中药新药开发研究, Tel: 020-39358183, E-mail: 531514471@qq.com

**[通讯作者]** \* 黄松, 副研究员, 博士, 从事中药制剂与质量标准研究, Tel: 020-39358103, E-mail: hsl318@yahoo.com.cn

(Buch.-Ham ex D. Don) Hara var. *gerardiana* (Benth.) Hara, 纤花香茶菜 *R. lophanthoides* (Buch.-Ham ex D. Don) Hara var. *graciliflora* (Benth.) Hara 和溪黄草 *R. serra* (Maxim.) Hara<sup>[1-3]</sup>。

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<sup>[4]</sup>。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<sup>[5]</sup>。溪黄草治疗肝炎的物质基础,即涉及抑制乙肝病毒的有效部位和活性成分,又可能与高效抗氧化物质对细胞的保护作用有关。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。其药理活性提示其在溪黄草药材的质量控制中的重要意义。目前文献未有对溪黄草中对咖啡酸、迷迭香酸含量测定的相关质量标准研究。本研究采用超声波技术从溪黄草中提取咖啡酸、迷迭香酸,并建立两者在溪黄草的含量测定方法<sup>[6]</sup>,可为溪黄草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 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 (2)  $C_{18}$  (4.6 mm × 250 mm,

5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱, METTLER TOLEDO AB204-N 型电子分析天平, 甲醇、乙腈均为色谱纯 (Merck), 其他试剂为分析纯。咖啡酸对照品 (供含量测定用), 中国药品生物制品检定所, 批号 110885-200102。迷迭香酸对照品 (供含量测定用), 中国药品生物制品检定所, 批号 111871-201102。

收集的各地溪黄草药材, 经广州中医药大学新药开发研究中心陈建南研究员鉴定。标本存放于广州中医药大学新药开发研究中心, 见表 1。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Dikma Diamonsil (2) ( $C_{18}$  250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱, 流动相 A 乙腈-B 0.3% 磷酸, 梯度洗脱 (0 ~ 17 min, 12% A; 17 ~ 20 min, 12% A ~ 25% A; 20 ~ 50 min, 25% A); 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长 329 nm, 柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ 。

**2.2 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浓度分别为 0.227, 1.096 g · L<sup>-1</sup> 的混标溶液, 作为对照品供试液。

**2.3 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 60 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。

**2.4 标准曲线的制作** 精密吸取混合对照品溶液

表 1 不同品种、不同产地溪黄草中咖啡酸、迷迭香酸的含量测定 ( $n=3$ )

样品	标号	来源	咖啡酸含量		迷迭香酸含量	
			/mg · g <sup>-1</sup>	$\bar{x} \pm s$	/mg · g <sup>-1</sup>	$\bar{x} \pm s$
纤花线纹 香茶菜	1	采于广州中医药大学(大学城校区2号山)25	0.26	0.25 ± 0.04	5.57	4.65 ± 1.16
	2	采于广东平远基地	0.23		5.09	
	3	采于白云山和记黄埔神农轩	0.31		2.63	
	4	采于广东英德基地	0.20		5.05	
	5	采于广州华南植物园	0.26		4.94	
狭基线纹 香茶菜	6	采于广东饶平基地	0.20	0.19 ± 0.08	2.83	3.74 ± 1.44
	7	采于广州中医药大学(大学城校区2号山)	0.30		5.93	
	8	购于广州中医药大学大药房丽影分店	0.21		4.49	
	9	购于潮州永安药房	0.10		2.85	
	10	购于汕头南轩药房	0.11		2.61	
溪黄草	11	购于广西景药业(产地广西)	0.16	0.16 ± 0.04	0.94	1.21 ± 0.41
	12	购于采芝林 广州中医药大学分店(产地湖北)	0.17		1.75	
	13	购于大翔药业(产地 广东)	0.14		1.21	
	14	购于三九药业(产地 广东)	0.10		0.69	
	15	购于致信药业(产地 江苏)	0.22		1.45	

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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{L}$ , 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:  $Y_{\text{咖啡酸}} = 4.0 \times 10^6 X - 101\ 826$  ( $r = 0.999\ 9$ );  $Y_{\text{迷迭香酸}} = 2.0 \times 10^6 X - 134\ 274$  ( $r = 0.999\ 6$ ), 咖啡酸在 0.045 4 ~ 0.908 0  $\mu\text{g}$ , 迷迭香酸在 0.219 2 ~ 4.384 0  $\mu\text{g}$  与面积线性关系良好。

**2.5 精密度试验** 精密吸取同一供试品 (购于广西景昌药业, 产地广西) 溶液, 进样 20  $\mu\text{L}$ , 平行测定 6 次, 测得各次 2 种成分峰面积, RSD 值分别为 0.86%, 0.43%。表明仪器精密度良好。

**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  $\mu\text{L}$ , 测得 2 种成分峰面积, RSD 分别为 0.98%, 0.75%。表明仪器在 24 h 内稳定。

**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  $\mu\text{L}$ , 测定 2 种成分的含量, RSD 分别为 1.89%, 1.65%。表明方法重复性较好。

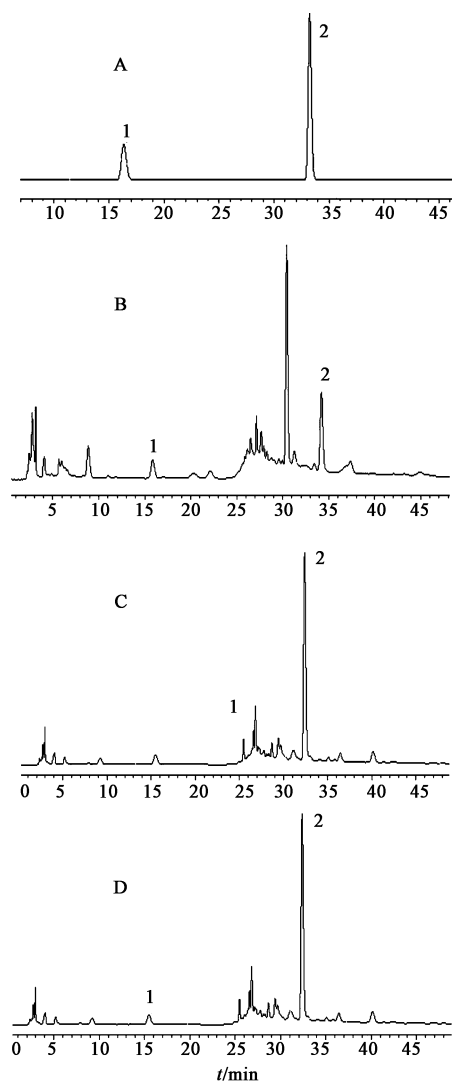
**2.8 加样回收率测定** 取已知含量的同一溪黄草药材粗粉 (咖啡酸含量为 0.168 5  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 迷迭香酸含量为 0.959 8  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 6 份, 各约 0.70 g, 精密称定, 分别精密加入咖啡酸 (0.227  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和迷迭香酸对照品溶液 (1.096  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.70 mL, 按供试品溶液制备方法制备供试液, 计算其加样回收率和 PSD。咖啡酸平均回收率为 97.33%, RSD 2.20%; 迷迭香酸平均回收率为 103.32%, RSD 1.84%。

**2.9 样品的测定** 取各品种、产地的溪黄草粉末, 按 2.2 项下操作, 所得样品溶液经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过, 按 2.1 项色谱条件进样 20  $\mu\text{L}$ , 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 1。

### 3 讨论

**3.1 提取方法的考察** 采用了正交设计超声提取方法, 考察了溶媒 (30%, 50%, 70% 乙醇), 溶媒倍数 (30, 40, 50 倍) 和提取时间 (20, 40, 60 min), 得出最佳提取方法: 采用 40 BV 50% 乙醇超声提取 60 min。

**3.2 检测波长的选择** 在 200 ~ 800 nm, 分别对咖啡酸、迷迭香酸进行全波长扫描, 咖啡酸最大吸收波



A. 对照品; B. 溪黄草; C. 纤花线纹香茶菜;  
D. 狭基线纹香茶菜; 1. 咖啡酸; 2. 迷迭香酸

图 1 溪黄草对照品及样品的色谱

长为 323 nm, 迷迭香酸为 329 nm。329 nm 亦在咖啡酸的较大吸收, 故选择 329 nm 为测定波长。

**3.3 液相条件的考察** 尝试使用了 15% 乙腈-0.3% 磷酸, 18% 乙腈-0.3% 磷酸, 20% 乙腈-0.3% 磷酸以及 40% 甲醇-0.3% 磷酸, 35% 甲醇-0.3% 磷酸的流动相进行等度洗脱, 发现等度洗脱对分离溪黄草的中咖啡酸和迷迭香酸的分离效果不是非常理想, 故选用乙腈-0.3% 磷酸进行梯度洗脱。

研究了 3 个不同品种和多个不同产地溪黄草 15 批的两者成分含量。由表 1 结果可知, 咖啡酸、迷迭香酸在纤花线纹香茶菜中的平均含量最高, 其次为狭基线纹香茶菜, 溪黄草则在三者中含量最低。由含量比较和色谱图可看出, 溪黄草中这 3 个品种之间成分和含量是有差别的, 临床疗效也应有差别, 因此临床上应区别使用。

# 高效毛细管电泳测定中药地龙中氨基酸含量

丁红梅\*, 葛尔宁, 许家栋

(浙江中医药大学分析测试中心, 杭州 310053)

**[摘要]** **目的:**建立用柱前衍生和高效毛细管电泳测定地龙中水解氨基酸含量的方法。**方法:**地龙药材经水煎煮后,先用盐酸水解处理地龙样品,再用 Waters AccQ-Fluor 衍生试剂对水解氨基酸进行柱前衍生,采用高效毛细管电泳方法测定地龙中氨基酸的含量。**结果:**在 pH 2 浓度  $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{H}_3\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  电泳缓冲液,进样量为  $0.5 \text{ psi} \times 4 \text{ s}$ ,分离电压 20 kV 电泳条件下,在 16 min 内 14 种常规氨基酸分离效果较好,氨基酸浓度  $15.625 \sim 250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  线性关系良好,成功测定地龙水煎液中氨基酸的含量。结果显示地龙药材中 Glu, Ile/Leu, Gly, Ala 含量相对较高, His, Tyr 含量较低, Asp 未检测到。**结论:**采用高效毛细管电泳进行 AQC 衍生后地龙氨基酸的分析,操作简单、分析时间短,测定结果可靠,可适用于动物类中药材中氨基酸的快速检测。

**[关键词]** 地龙; 氨基酸; 含量; 毛细管电泳

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0117-04

## High Performance Capillary Electrophoresis Determination of Amino Acids in *Pheretima*

DIND Hong-mei\*, GE Er-ning, XU Jia-dong

(Analytical Testing Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a method using pre-column derivation and high-performance capillary electrophoresis for determining amino acids content in *pheretima*. **Method:** *Pheretima*, a kind of Chinese medicinal material was firstly treated with water boiling, and then hydrolyzed by hydrochloride acid. The hydrolysate of amino acids in *pheretima* was derived by Waters AccQ-Fluor reagent. The amino acids in *pheretima* were identified and quantified with the method of high-performance capillary electrophoresis. **Result:** The optimized CZE conditions were as follows: a running buffer composed of  $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 2), separation voltage at 20 kV, temperature at 25 centigrade, injection time for 4 sec with 0.5 psi pressure. 15 kinds of amino acids in *pheretima* were determined within 16 minutes. The separation effect of amino acids was perfect and the linear

**[收稿日期]** 20120428(008)

**[基金项目]** 浙江省教育厅科研项目(Y200908742)

**[通讯作者]** \* 丁红梅, 副研究员, 研究生学历, 从事中药资源药物分析研究, Tel: 0571-86613589, E-mail: littlebaby@zjtcn.net

### [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] 谢兴亮, 盛艳梅. 溪黄草的研究进展[J]. 医药导报,

2011, 30(4): 494.

- [5] Sun W J, Sheng J F. Concise H and book for Natural Active Products (天然活性成分简明手册) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Sciences and Technology Publishing House, 1998.
- [6] 王琿, 张振伙. HPLC 波长切换法同时测定迷迭香中咖啡酸、阿魏酸和迷迭香酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 116.

[责任编辑 顾雪竹]