

神香草水提物的主成分分析及含量测定[△]

戎晓娟^{1*}, 严欢¹, 韩阳², 康雨彤¹, 贺金华^{1#}, 蔡晓翠¹(1.新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004; 2.石河子大学药学院2010级临床药学班, 新疆石河子 832000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)06-0808-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.06.30

摘要 目的:研究神香草水提物中的主要成分,并测定其含量。方法:采用液相色谱-质谱联用技术分析神香草水提物中的主要成分。色谱柱为 Waters 5 C₁₈-DAQ,流动相为 0.2% 乙酸水溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为 1.0 ml/min,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μl,检测波长为 360 nm;离子源为电喷雾(ESI)离子源,采用负离子扫描模式,离子源温度为 400 ℃,质量扫描范围为 100~1 000 Da。选择迷迭香酸为指标成分,并采用反相高效液相色谱法对其含量进行测定。色谱柱为 Phenomenex C₁₈,流动相为 0.2% 甲酸水溶液-乙腈(75:25, V/V),检测波长为 330 nm,流速为 1.0 ml/min,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μl。结果:主成分(22.65 min)的离子质量数为 359.2,推测其为迷迭香酸。迷迭香酸的质量浓度在 4.52~22.60 μg/ml 范围内与峰面积呈良好线性关系($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的 RSD<2%;平均加样回收率为 99.91%,RSD 为 0.34%($n=9$)。结论:该方法可快速筛选出合适的含量测定指标;所建立的测定方法简便、准确,可作为神香草水提物中迷迭香酸的含量测定方法。

关键词 神香草水提物;迷迭香酸;液相色谱-质谱联用技术;反相高效液相色谱法;含量测定

Analysis of Main Components of *Hyssopus officinalis* Water Extract and Content Determination

RONG Xiao-juan¹, YAN Huan¹, HAN Yang², KANG Yu-tong¹, HE Jin-hua¹, CAI Xiao-cui¹(1.Xinjiang Institute of Material Medica, Urumqi 830004, China; 2. 2010 Grade Clinical Pharmacy Class, Pharmacy College of Shihezi University, Xinjiang Shihezi 832000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the main components of *Hyssopus officinalis* water extract, and determine the content. METHODS: LC-MS method was used to analysis the main components in *H. officinalis* water extract. LC-MS condition was as follows: the chromatographic column was waters 5 C₁₈-DAQ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% acetic acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min; the column temperature was 30 ℃ and detection wavelength was set at 360 nm; the sample size was 10 μl; the sample was analyzed by ESI in negative-ion mode; ion source temperature was 400 ℃ and m/z rang was from 100-1 000 Da. The rosmarinic acid was selected as indicator component and RP-HPLC was conducted to determine the content. RP-HPLC condition was as follows: the chromatographic column was Phenomenex C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% acetic acid (25:75, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min; the detection wavelength was 330 nm, and column temperature was 30 ℃; the sample size was 10 μl. RESULTS: LC-MS analysis showed that rosmarinic acid was the main component of *H. officinalis* water extract. The linear range of rosmarinic acid were 4.52-22.60 μg/ml($r=0.999\ 9$) with an average recovery of 99.91% (RSD=0.34%, $n=9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. CONCLUSIONS: The method can analyze *H. officinalis* water extract rapidly, and screen suitable content determination indicator. Established RP-HPLC method is simple, rapid, accurate and reproducible. It can be used for the content determination of *H. officinalis* water extract.

KEYWORDS *Hyssopus officinalis* water extract; Rosmarinic acid; LC-MS/MS; RP-HPLC; Content determination

神香草为唇形科植物硬尖神香草 *Hyssopus cuspidatus* 的干燥地上部分,是维吾尔族民间习用药材,其性质干热,有很强的香味,具有镇咳、祛痰、平喘等作用^[1-2]。神香草药用全草,全株主要含挥发油,具有“痉挛停”生物碱样作用,可缓解支气管痉挛^[3-5];其叶、花均可入药,也有镇咳祛痰的功用。神香草在维吾尔族用于治疗气管炎已有几百年的历史,其疗效确切、显著;以神香草为主药的寒喘祖帕颗粒,被收载于原卫生部药品标准《维吾尔药分册》中^[6]。一直以来,国内、外学者对神香

草的研究主要集中在其挥发油的化学成分及药理活性方面^[7-9],而对其水溶性成分的报道较少。本课题组前期对神香草水提物的抗哮喘作用进行了研究,结果证实神香草水提物具有明显的镇咳、平喘作用,明确了神香草水提物对哮喘气道炎症具有抑制作用。

本研究是在对神香草水提物药效机制和化学成分研究的基础上,采用液相色谱-质谱(LC-MS)联用技术,选择合适的测定指标^[9],优化各种条件,最终建立了以反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定神香草水提物中主要成分含量的方法,可为神香草水提物有效成分的开发研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

2010 C型 HPLC 仪(日本岛津公司);1260 型 HPLC 仪(美

△ 基金项目:新疆维吾尔自治区科技计划项目(No.201417107)

* 助理研究员,硕士。研究方向:药物分析。电话:0991-2322941。E-mail:109303620@qq.com

通信作者:研究员,硕士。研究方向:维吾尔药活性成分筛选及质量标准研究。电话:0991-2326572。E-mail:3182410@qq.com

国 Agilent 公司); QTRAP 型四极杆-线性离子阱串联 MS 仪, 配有电喷雾 (ESI) 离子源 (美国 Applied Biosystems/MDS SCIEX 公司); BP211D 型电子天平 (德国赛多利斯公司, 精度: 0.01 mg); SK3300H 型超声波清洗机 (上海科导超声仪器有限公司, 功率: 180 W, 频率: 53 kHz)。

1.2 药品与试剂

神香草水提物 (新疆维吾尔自治区药物研究所分析室制备); 迷迭香酸对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号: 111871-201102); 甲醇、乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 公司); 乙酸为色谱纯 (美国 DIKMA Technologies 公司); 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 LC-MS 法确定含量测定指标

2.1.1 对照品溶液的制备 取迷迭香酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇适量, 制成质量浓度为 0.2 mg/ml 的溶液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取神香草水提物 10 mg, 置于 50 ml 量瓶中, 加 40% 甲醇 30 ml, 超声处理 30 min, 放冷, 加 40% 甲醇定容, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.3 LC 条件 色谱柱: Waters 5 C₁₈-PAQ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.2% 乙酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~40 min, 15%→40% B; 40~45 min, 40% B); 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μl; 检测波长: 360 nm; 分流比: 3:1。

2.1.4 MS 条件 在一个 MS 数据采集周期内同时进行高、低不同碰撞能量的两个电质谱 (EMS) 扫描, 采用负离子扫描模式, 离子源 ESI; ESI 电压: -4 500 V; 解簇电压 (DP): -80 V; 入口电压 (EP): -9 V; 碰撞电压 (CE): -5 V; 雾化气 (N₂) 压力: 60 bar; 干燥气 (N₂) 压力: 40 bar; 温度: 400 °C; 质量 (*m/z*) 扫描范围: 100~1 000 Da。

2.1.5 LC-MS 分析结果 取“2.2.2”项下供试品溶液 10 μl, 按上述条件进行 LC-MS 分析, HPLC 图见图 1, 总离子流图见图 2。对主成分的色谱峰 (22.65 min) 进行 LC-MS 解析, 其离子质量数为 359.2, 推测可能为迷迭香酸^[10]。进而将迷迭香酸对照品溶液同法进行试验, 并分析数据, MS 图见图 3。由图 3 可见, 供试品溶液中的主要成分与迷迭香酸的离子质量数相同, 且碎片离子基本一致, 故推定神香草水提物中的主要成分为迷迭香酸。

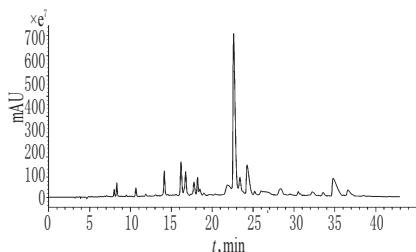


图 1 神香草水提物高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of *H. officinalis* water extract

2.2 迷迭香酸的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Phenomenex C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.2% 甲酸水溶液-乙腈 (75:25, V/V); 流速: 1.0

ml/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 330 nm; 进样量: 10 μl。色谱图见图 4。

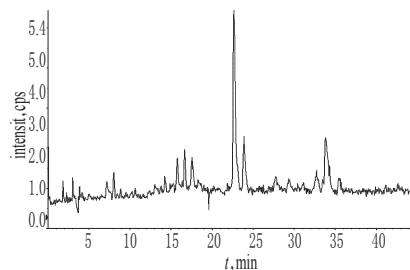


图 2 神香草水提物总离子流图

Fig 2 TIC of *H. officinalis* water extract

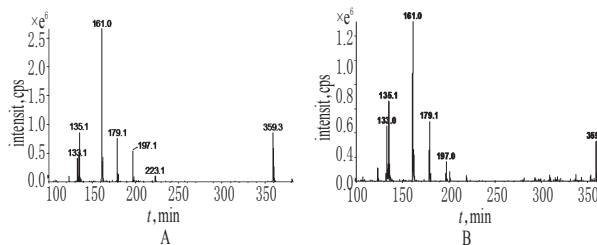


图 3 质谱图

A. 供试品; B. 迷迭香酸对照品

Fig 3 MS spectrum

A. test sample; B. rosmarinic acid control

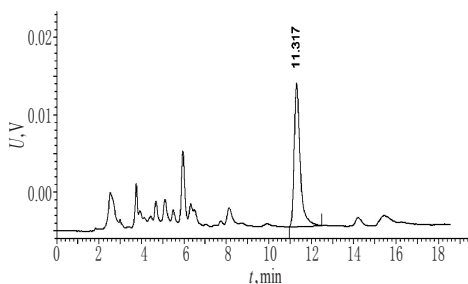


图 4 迷迭香酸高效液相色谱图

Fig 4 HPLC chromatograms of rosmarinic acid

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取迷迭香酸对照品适量, 加甲醇制成每 1 ml 含 12 μg 的对照品溶液, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取神香草水提物约 10 mg, 置于 50 ml 量瓶中, 加 40% 甲醇超声处理 10 min, 放冷, 加 40% 甲醇定容, 即得。

2.2.4 线性关系考察 精密称取迷迭香酸对照品适量, 加甲醇制成质量浓度为 0.565 mg/ml 的对照品贮备液, 再加甲醇稀释成质量浓度分别为 4.52、9.04、13.56、18.08、22.60 μg/ml 的系列对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以对照品的质量浓度 (*x*, μg/ml) 为横坐标、峰面积 (*y*) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $y = 28\ 889x - 8\ 182.2$ ($r = 0.999\ 9$)。结果表明, 迷迭香酸的质量浓度在 4.52~22.60 μg/ml 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 取“2.2.2”项下对照品溶液适量, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 重复 6 次, 记录峰面积。结果, RSD = 1.06% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取本品适量, 按“2.2.3”项下方法平行制

备6份供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,RSD=0.94%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液适量,分别于放置0、2、4、6、8、10、12、24、36、48 h时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,RSD=0.97%(n=10),表明供试品溶液在48 h内稳定性良好。

2.2.8 检测限和定量限 分别配制质量浓度为0.001 13、0.002 26 mg/ml的迷迭香酸对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,结果符合信噪比3:1和10:1的要求。因此,迷迭香酸检测限为11.3 ng,定量限为22.6 ng。

2.2.9 加样回收率试验 精密称取已知含量的神香草水提取物适量,共9份,每3份分别精密加入低、中、高不同质量浓度的迷迭香酸对照品溶液适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

称样量,mg	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
4.93	0.305 7	0.262 0	0.566 2	99.44		
4.84	0.300 1	0.262 0	0.560 8	99.52		
4.97	0.308 1	0.262 0	0.569 8	99.86		
5.00	0.310 0	0.328 0	0.637 3	99.80		
5.02	0.311 2	0.328 0	0.638 3	99.72	99.91	0.34
5.05	0.313 1	0.328 0	0.641 8	100.20		
5.24	0.324 9	0.393 6	0.718 6	100.02		
5.23	0.324 3	0.393 6	0.718 4	100.13		
5.20	0.322 4	0.393 6	0.717 9	100.49		

2.2.10 样品含量测定 取神香草水提取物适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量。结果,神香草水提取物中迷迭香酸的质量分数为6.2%(以干燥品计)。

3 讨论

3.1 流动相的选择

笔者考察了不同有机相(甲醇、乙腈)的出峰效果。结果显示,甲醇作为有机相的峰形较宽,且主峰与其前、后的杂质峰分离较差;而将乙腈作为有机相时,峰形尖锐、对称性良好。进而选择不同的乙腈比例(20%、25%、30%、40%)进行试验。结果,30%、40%的乙腈作为有机相时出峰时间较短,主峰与其相邻的杂质峰分离度较差;而20%的乙腈作为有机相时其主峰保留时间较长、峰形较宽。综合考虑分离度及峰形,选择25%有机相配比的条件较适宜。

笔者还考察了不同的水相(水、甲酸水溶液、乙酸水溶液)。结果显示,水或乙酸水溶液作为流动相时峰形较宽、不对称;而甲酸水溶液峰形较好。进而又筛选了不同体积分数(0.2%、0.5%、0.8%)的甲酸水溶液,结果显示其峰形及分离效果基本一致。为延长色谱柱寿命,最终选择0.2%甲酸水溶液为水相。

3.2 供试品溶液制备方法的选择

由于本研究所采用的样品是神香草的水提取物,再经过大

孔吸附树脂用30%乙醇洗脱获得的,为使本品能完全溶解且稳定性良好,笔者选择不同体积分数(30%、40%、50%、80%、100%)的甲醇进行试验,并采用超声助溶,结果发现本品在50%甲醇、80%甲醇及纯甲醇中均不能完全溶解;后又测定了经30%甲醇和40%甲醇溶解后本品中迷迭香酸的含量,结果显示40%甲醇作为溶剂时的含量较高,且在室温下48 h内稳定性良好。故最终选择40%甲醇作为制备供试品溶液所用溶剂。同时,笔者还考察了不同的超声助溶时间(5、10、15、20、30 min)对样品含量的影响,结果显示,超声10 min时样品可全部溶解且含量较高,故最终确定超声时间为10 min。

综上所述,本研究所采用的方法,可以快速对神香草水提取物进行成分分析,并能够获得大量化合物的结构信息,及时识别已知化合物,有助于快速筛选出合适的含量测定指标,方法操作简单,结果准确、可靠。本研究所建立的含量测定指标及方法可为神香草水提取物的质量控制提供参考。

参考文献

- [1] 丁剑冰,武新华,王亚男.神香草的实验研究[J].新疆中医药,2002,2(3):10.
- [2] 朱焱.维吾尔药神香草化学成分及平喘作用的研究[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2009.
- [3] Letessier MP, Svoboda KP, Waiters DR. Antifungal activity of the essential oil of Hyssop: *Hyssopus officinalis* L. [J]. *Phytopathology*, 2001, 149(11): 673.
- [4] Fraternali D, Ricci D, Epifano F, et al. Composition and antifungal activity of two essential oils of Hyssop[J]. *J Essent Oil Res*, 2004, 16(6): 617.
- [5] 帕丽达·阿不力孜,朱焱.维吾尔药神香草挥发油化学成分的研究[J].中药与天然药物,2008,20(5):61.
- [6] 卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准:维吾尔药分册[S].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:78.
- [7] Mazzanti G, Lu M, Salvatore G. Spasmolytic action of the essential oil from *Hyssopus officinalis* L. var. *decumbens* and its major components[J]. *Phytotherapy Research*, 1998, 12(1):92.
- [8] Lu M, Battinelle L, Daneile C, et al. Muscle relaxing activity of *Hyssopus officinalis* essential oil on isolated intestinal preparations[J]. *Planta Medica*, 2002, 68(3): 213.
- [9] 戎晓娟,张瑞萍,贺金华,等.应用LC-MS/MS法筛选艾维西木口服液质量控制中的含量测定指标[J].中国药房,2014,25(23):2157.
- [10] 林丽美,许招懂,闫积彪.苦夏草中活性成分迷迭香酸的提取分离、结构鉴定与富集[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(8):35.

(收稿日期:2014-05-24 修回日期:2014-09-30)

(编辑:孙冰)