

高效液相色谱法测定破布木果水提物中迷迭香酸的含量

哈丽娅·吐尔逊麦提¹, 米热阿依·亚力昆², 热娜古丽·艾则孜^{3*},
买吾拉尼江·依孜布拉^{4*}

(1. 新疆医科大学维医学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011;
3. 新疆医科大学第四附属医院, 乌鲁木齐 830011; 4. 新疆医科大学中心实验室, 乌鲁木齐 830011)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定破布木果水提物中迷迭香酸的含量。**方法** 用高效液相色谱法, 色谱条件: Kromasil C₁₈柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-1.5%乙酸水(38: 62), 流速为 1.0 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长为 330 nm, 检测破布木果水提物中迷迭香酸的含量。**结果** 迷迭香酸峰面积与进样量在 15.625~1000 μg/mL 范围内呈良好的线性关系($r = 0.9996$), 平均回收率为 98.68%, 相对标准偏差为 2.13%($n=6$)。 **结论** HPLC 法具有操作简便、结果准确可靠的优势, 可用于检测破布木果水提物中迷迭香酸含量。

关键词: 高效液相色谱法; 破布木果水提物; 迷迭香酸含量

Determination of rosmarinic acid in water extract of *Cordia dichotoma* fruits by high performance liquid chromatography

HALIYA Tu-Er-Xun-Mai-Mai-Ti¹, MIRAYI Ya-Li-Kun², RENAGULI Ai-Ze-Zi^{3*},
MAIWULANJIANG Yi-Zi-Bu-La^{4*}

(1. School of Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Pharmacy College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 3. The Fourth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 4. Central Laboratory, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of rosmarinic acid content in water extract of *Cordia dichotoma* fruits by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** HPLC was used to determine the content of rosmarinic acid in water extract of *Cordia dichotoma* fruits. Chromatographic conditions were as follow: chromatographic column was Kromasil C₁₈ column (4.6 mm×150 mm, 5 μm), mobile phase was methanol-1.5% acetic acid water (38:62), flow rate was 1.0 mL/min, column temperature was 25 °C, detection wavelength was at 330 nm. **Results** The peak area of rosmarinic acid and the injection volume showed a good linear relationship ($r=0.9996$) in the range of 15.625–1000 μg/mL, the average recovery was 98.68%, and the relative

基金项目: 新疆维吾尔自治区高校科研计划自然科学青年项目(XJEDU2017S024)

Fund: Supported by The Natural Science Youth Project of Xin Jiang Uygur Autonomous Regional University Research Program (XJEDU2017S024)

*通讯作者: 热娜古丽·艾则孜, 博士, 副教授, 研究生导师, 主要研究方向为恶性肿瘤的中西医结合诊治。E-mail: rena727@sina.com

买吾拉尼江·依孜布拉, 博士, 主要研究方向为老年性认知功能障碍中药干预研究。E-mail: mawlanjan624@163.com

*Corresponding author: RENAGULI·Ai-Ze-Zi, Ph.D, Associate Professor, the Fourth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China. E-mail: rena727@sina.com

MAIWULANJIANG·Yi-Zi-Bu-La, Ph.D, Central Laboratory, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China. E-mail: mawlanjan624@163.com

standard deviation was 2.13% ($n=6$). **Conclusion** This method is simple, accurate and reliable, and it is feasible for the determination of rosmarinic acid content in water extract of *Cordia dichotoma* fruits.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; water extract of *Cordia dichotoma* fruits; rosmarinic acid content

1 引言

破布木果(*Cordia dichotoma* Forst.f)是破布木的成熟果实,属紫草科植物,主要分布于我国云南、广西、广东、台湾、福建、新疆等地,国外多见澳大利亚东北部、越南、印度、菲律宾等国^[1]。破布木果功效颇多,主要为润肺润喉、止咳化痰、清音止渴、通便利尿,对治疗咽干喉燥、病毒性感冒、干咳顽痰、失音口渴、小便不利、大便不畅、高血压等效果显著^[2]。现代药理研究还发现,破布木果在抗炎镇痛、抗溃疡、抗菌、抗氧化、抗肿瘤和有助于创伤修复等方面^[3-7]也有一定的作用。破布木的果实、根和树皮在传统医学上都是作为药材使用的,其果实具有止咳化痰、解毒和治疗跌打损伤的作用,树皮可用于治疗子宫内膜炎,根则可以止汗、治疗高血压^[8]。将破布木果与天山堇菜、刺糖、黄河子皮、菊苣等药相配成复方制剂后,可治疗各种头痛与炎症。目前对破布木根、茎和果实等提取物的药理活性考察较为集中,除此之外三萜类^[9]、黄酮类、多糖^[10]类及酚酸^[11]、氨基酸等化学成分分离研究也比较多。通过薄层色谱定性实验可知破布木果中含有迷迭香酸,且其含量较高。迷迭香酸在抗炎、清除自由基、抗血栓、抗血小板凝集、免疫调节和抗菌、抗抑郁、抑制肾小球系膜细胞的增殖等^[12]方面具有显著药理作用。有实验结果显示迷迭香酸通过将抑郁大鼠海马星形胶质细胞中调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2)的磷酸化上调,从而达到促进其释放脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)进而发挥出抗抑郁效应^[13]。高效液相色谱具有效能高、应用范围广、分析速度快、色谱柱可反复使用、易回收等特点。鉴于迷迭香酸显著抗抑郁作用^[14,15],本研究以迷迭香酸为指标成分,采用高效液相色谱法测定其在破布木果水提取物中的含量,以期为提高破布木果的药品标准提供定量的数据支持。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

2.1.1 仪器

高效液相色谱仪 LC-20AB、CBM-20A3 色谱工作站、SPD-20A 型紫外检测器、SIL-20A 型自动进样器、CTO-10Svp 型柱温箱(日本岛津公司);XS1003S 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

2.1.2 样品与试剂

甲醇(色谱纯,赛默飞世尔科技有限公司);迷迭香酸对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:S03N8H47130);破布木果(新疆恩萨尔维吾尔医药片药业有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 破布木果水提取物的制备

将冷冻干燥的破布木果粉末(1 kg)与 2 L 超纯水在 80 °C 下搅拌 2 h。随后,在 1000 g 下离心 30 min 去除不溶性物质。最后,将上清液过滤并冷冻干燥,备用。

2.2.2 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈柱(4.6 nm×150 mm, 5 μm),流动相:甲醇-1.5%乙酸水(体积比 38:62),检测波长 330 nm,柱温 25 °C,流速 1.0 mL/min。

2.2.3 迷迭香酸对照品溶液的制备

将迷迭香酸对照品精密称取 10 mg,分别配制成 15.625、31.250、62.500、125.000、250.000、500.000、1000.000 μg/mL 浓度,并用甲醇在 10 mL 棕色容量瓶中定容。

2.2.4 破布木果供试品溶液的制备

精密称取 1.015 g 干燥破布木果药材粉末放入 50 mL 具塞锥形瓶中,并加入 25 mL 甲醇,称定重量后浸泡 30 min,超声提取(功率 150 W,频率 60 kHz) 30 min,取出冷却后再次称定重量,减失的重量用甲醇补足,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即可获得供试品溶液。

2.2.5 线性关系考察

精密吸取迷迭香酸 10 μL 对照品溶液进样分析,将对照品浓度(X, mg/mL)标为横坐标,以峰面积积分值(Y)为纵坐标,绘制标准曲线。

2.2.6 精密度实验

准确吸取 10 μL 破布木果供试品溶液,连续进样 6 次,记录峰面积。

2.2.7 稳定性试验

取同一批破布木果供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样,每次进样量为 10 μL,记录峰面积。

2.2.8 重复性试验

取 6 份破布木果药材粉末,按“2.2.4”项下方法制成供试液,并在上述色谱条件下进样 10 μL,测定迷迭香酸峰面积,计算含量。

2.2.9 加样回收率试验

量取 6 份已知含量破布木果药材粉末 1.015 g,分别置

于 50 mL 量瓶中,再称取 500 μg 迷迭香酸对照品放入 25 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度。6 个量瓶中分别准确称取对照品 4 mL 和甲醇 21 mL,按“供试品溶液的制备”项下方法制成供试液,在上述色谱条件下进样 10 μL 测定,计算含量。

3 结果与分析

3.1 高效液相色谱条件

在上述高效液相色谱条件下检测到迷迭香酸与供试品中其他组分色谱峰在以上色谱条件下可以达到基线分离,分离度良好,迷迭香酸峰理论塔板数均在 2000 以上。迷迭香酸及破布木果供试样品色谱图见图 1。

3.2 线性关系

根据线性关系考察后得到 $Y=30024X-403593$ ($r=0.9996$)的迷迭香酸线性回归方程,结果表明,当迷迭香酸进样量在 15.625~1000 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,峰面积与进样量呈现良好的线性关系。

3.3 精密度考察

精密度考察结果显示其 RSD 值为 0.35%,表明本实验仪器精密度较好。

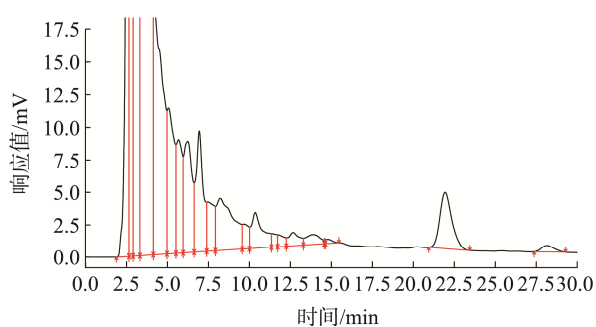
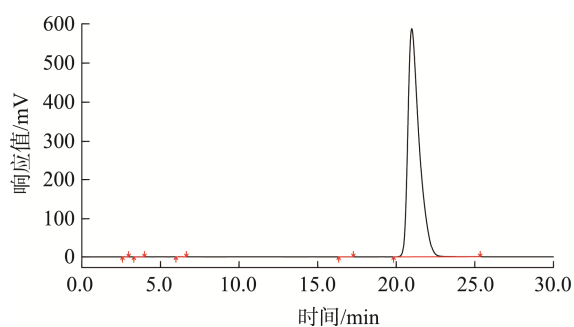


图 1 迷迭香酸对照品及破布木果供试样品的高效液相色谱图

Fig.1 High performance liquid chromatograms of rosmarinic acid reference substance and test samples of *Cordia dichotoma* Forst

3.4 稳定性考察

稳定性考察结果显示 8 个时间点进样后迷迭香酸峰面积的 RSD 值为 1.71%,表明破布木果供试品溶液在 24 h 内呈稳定状态,考察时间内峰面积未出现下降。

3.5 重复性实验

重复性试验结果中供试品中迷迭香酸含量的 RSD 值为 1.34%,见表 1,表明本实验方法的重复性较好。

表 1 重复性试验结果
Table 1 Repeatable test results

编号	样品称量/g	样品含量/ $(\mu\text{g/mL})$	峰面积	RSD/%
1	1.007	140.7943	223617	
2	1.024	140.9778	229123	
3	1.008	140.9040	226909	1.34%
4	1.031	140.9505	228304	
5	1.075	140.7872	223402	
6	1.011	141.0403	231001	

3.6 加样回收率

加样回收率试验结果中平均回收率为 98.68%,RSD 为 2.13%,见表 2。

表 2 加样回收率试验结果

Table 2 Loading recovery test results

编号	样品重量/g	峰面积/%	样品浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	样品含量/ μg	平均回收率/%	RSD/%
1	1.007	223617	20.8903	522.26		
2	1.024	229123	21.0737	526.8419		
3	1.008	226909	21.0000	524.99839	98.68%	2.13%
4	1.031	228304	21.0464	526.1560		
5	1.025	223402	20.8831	522.0782		
6	1.011	231001	21.3622	528.4056		

4 结论与讨论

传统医学古籍中记载破布木果的功效有清热止咳、润肺润喉、宽胸软喉、生湿止渴、健胃消食和止痢等, 主治热咳伤风、胸痛咽硬、口渴咽干、食欲不振和大便干结、便秘腹胀^[1]。国内外对破布木的研究限于对其药效成分及相关药理作用。2016 年 El-Newary 等^[16]研究发现破布木果提取物具有降血脂作用, 包括降低总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇以及增加高密度脂蛋白胆固醇。后在 2018 年发现破布木果水提物可降低进食量, 并使粪便呈现干燥新鲜的状态, 其对高脂血症的保护作用可归因于大鼠对脂肪和胆固醇的摄取和吸收能力降低, 以及在排便过程中清除脂肪和胆固醇的能力增强^[17]; Abeer 等^[18]对小鼠腹腔接种艾氏腹水癌细胞后第 2 d 起连续 10 d 口服破布木果提取物, 结果显示其在清除超氧自由基和螯合金属离子方面表现出强有力的作用, 并且具有较高的还原能力和总抗氧化能力、剂量依赖性。另一方面, 给予破布木果提取物后显著降低了存活的 Ehrlich 细胞计数和实体肿瘤重量。破布木果提取物还改善了所有血液学参数, 这种改善反映了中位生存时间和寿命的显著增加。研究表明破布木果提取物具有抗氧化和抗肿瘤活性, 其活性可归因于酚类、黄酮类、单宁酸和葡萄糖醛酸的含量, 这些成分被证明可作为抗氧化剂、抗炎剂和抗肿瘤剂。

迷迭香酸是一种天然存在的羟基化化合物, 存在于许多植物中, 例如, 破布木果、金盏花、蜜蜂花、丹参和其他几种植物科中。迷迭香酸是一种天然的抗氧化剂, 具有较强的抗氧化活性, 有助于预防自由基造成的细胞受损, 它还具有较强的抗炎、抗菌、抗病毒、抗肿瘤的活性。通过晋翔等^[13,19]对迷迭香酸抗抑郁样作用机制的实验研究, 体外实验中发现迷迭香酸具有促进新生大鼠星形胶质细胞增殖的作用, 体内实验中发现其可改善慢性不可预见应激抑郁模型大鼠的抑郁样行为; Pereira 等^[20]发现低剂量的迷迭香酸(2 mg/kg 和 4 mg/kg)能够在十字迷宫和跳台等抗焦虑实验中发挥抗焦虑作用而不会在脑组织中造成运动改变或 DNA 损伤。

本实验测定的样品均产自新疆, 在所有批次样品中均有检出有机酸类成分迷迭香酸, 且显示具有生物活性, 故将迷迭香酸选为定量检测指标。高效液相色谱法测定破布木果水提物中的迷迭香酸, 样品处理简易操作方便, 有较高的分离度, 可迅速测定获得结果, 为破布木果药材的开发提供依据。

参考文献

[1] 曾新亮, 刘朦朦, 戴志鹏, 等. 破布木果基原考证、功效及复方的研究[J]. 中国药房, 2018, 29(15): 2140–2151.

- Zeng XL, Liu MM, Dai ZP, *et al.* Research on the original research, efficacy and compound prescription of *Cordia dichotoma* Forst base [J]. *China Pharm*, 2018, 29(15): 2140–2151.
- [2] 刘勇民. 维吾尔药志: 下册[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999.
- Liu YM. Uyghur medicine journal: Lower volume [M]. Urumqi: Xinjiang Science and Technology and Health Publishing House, 1999.
- [3] Sharma US, Sharma UK, Sutar N, *et al.* Anti-inflammatory activity of *Cordia dichotoma* Forst. f. seeds extracts [J]. *Int J Pharm Anal*, 2010, 2(1): 1–4.
- [4] Ganhare AB, Nirmal SA, Rub RA, *et al.* Use of *Cordia dichotoma* bark in the treatment of ulcerative colitis [J]. *Pharm Biol*, 2011, 49(8): 850–855.
- [5] Nariya PB, Bhalodia NR, Shukla VJ, *et al.* *In vitro* evaluation of antioxidant activity of *Cordia dichotoma* Forst f. bark [J]. *AYU*, 2013, 34(1): 124–128.
- [6] Rahman MA, Hussain A. Anticancer activity and apoptosis inducing effect of methanolic extract of *Cordia dichotoma* against human cancer cell line [J]. *Bangl J Pharmacol*, 2015, 10(1): 27–34.
- [7] Kuppatt IJ, Nayak PV. Wound healing activity of *Cordia dichotoma* Forst. f. fruits [J]. *Nat Pro Rad*, 2006, 5(2): 99–102.
- [8] 龙春林, 宋洪川. 中国柴油植物[M]. 北京: 科学出版社, 2012.
- Long CL, Song HC. China diesel plant [M]. Beijing: Science Press, 2012.
- [9] Tian S, Liu F, Zhang X, *et al.* Phytochemical composition and antioxidant capacity of *Cordia dichotoma* seeds [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2014, 27(5): 1123–1129.
- [10] Basu NG, Ghosal PK, Thakur S. Structural studies on a polysaccharide fraction from the fruits of *Cordia dichotoma* forst [J]. *Carbohydr Res*, 1984, 131(1): 149–155.
- [11] Wang Y, Ohtani K, Kasai R, *et al.* Flavonol glycosides and phenolics from leaves of *Cordia dichotoma* [J]. *Nat Med*, 1996, 50(5): 367.
- [12] 吴建章, 郁建平, 赵东亮, 等. 迷迭香酸的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(3): 383–388.
- Wu JZ, Yu JP, Zhao DL, *et al.* Research progress of rosmarinic acid [J]. *Res Dev Nat Prod*, 2005, 17(3): 383–388.
- [13] 晋翔, 刘鹏, 张雅红. 迷迭香酸对大鼠抑郁样行为的作用及其机制研究[J]. 解放军医药杂志, 2014, 26(5): 14–18.
- Jin X, Liu P, Zhang YH. Effect of rosmarinic acid on depression-like behavior in rats and its mechanism [J]. *PLA Med J*, 2014, 26(5): 14–18.
- [14] 方颖, 刘焱文. 高效液相色谱法测定不同产地牛至药材中对-聚伞花素的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(4): 428–430.
- Fang Y, Liu YW. Determination of para-cymene in oregano herbs from different places by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Hospital Pharm*, 2006, 26(4): 428–430.
- [15] 关新莉, 李洁, 王东东, 等. HPLC 法测定异叶青兰中迷迭香酸的含量[J]. 新疆医科大学学报, 2013, 36(9): 1284–1286.
- Guan XL, Li J, Wang DD, *et al.* Determination of rosmarinic acid in isophyllum by HPLC [J]. *J Xinjiang Med Univ*, 2013, 36(9): 1284–1286.
- [16] El-Newary, Samah A, Sulieman, AM, *et al.* Hypolipidemic and antioxidant activity of the aqueous extract from the uneaten pulp of the fruit from *Cordia dichotoma* healthy and hyperlipidemic Wistar albino rats [J]. *J*

Nat Med, 70(3): 539–553.

- [17] El-Newary SA, Ibrahim AY, Osman SM, *et al.* Evaluation of possible mechanisms of *Cordia dichotoma* fruits for hyperlipidemia controlling in Wistar albino rats [J]. *Asian Pacific J Tropical Biomed*, 2018, (6): 302–312.
- [18] Abeer Y, Ibrahim, Samah A, *et al.* Antioxidant, cytotoxicity and anti-tumor activity of *Cordia dichotoma* fruits accompanied with its volatile and sugar composition [J]. *Annals Agric Sci*, 2019, 5(8): 29–37.
- [19] 晋翔, 刘鹏, 张雅红, 等. 迷迭香酸对新生大鼠海马星形胶质细胞增殖的影响及其机制探讨[J]. *山东医药*, 2014, 54(8): 25–26.
Jin X, Liu P, Zhang YH, *et al.* Effect of rosmarinic acid on hippocampal astrocyte proliferation in neonatal rats and its mechanism [J]. *Shandong Med*, 2014, 54(8): 25–26.
- [20] Pereira P, Tysca D, Oliveira P, *et al.* Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid [J]. *Pharmacol Res*, 2005, 52(3): 199–203.

(责任编辑: 王欣)

作者简介



哈丽娅·吐尔逊麦提, 硕士研究生, 主要研究方向为老年性认知功能障碍中药干预研究。

E-mail: 932701574@qq.com



热娜古丽·艾则孜, 博士, 副教授, 研究生导师, 主要研究方向为恶性肿瘤的中西医结合诊治。

E-mail: rena727@sina.com



买吾拉尼江·依孜布拉, 博士, 主要研究方向为老年性认知功能障碍中药干预研究。

E-mail: mawlanjan624@163.com