

神香草抗哮喘有效部位定性定量研究*

戎晓娟¹, 康雨彤¹, 袁凤娟², 贺金华^{1**}, 李红英³

(1. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004; 2. 新疆维吾尔自治区食品药品检验所, 乌鲁木齐 830002;

3. 中国人民解放军 95788 部队卫生队, 成都 610041)

摘要 目的: 建立神香草抗哮喘有效部位的定性定量控制方法。**方法:** 采用高效液相色谱法测定神香草有效部位中的迷迭香酸, 并建立特征图谱; 采用紫外分光光度法测定神香草有效部位中的总黄酮和总多糖。**结果:** 神香草抗哮喘有效部位中迷迭香酸含量为 3.68%, 总黄酮含量为 35.10%, 总多糖含量为 17.12%, 建立了以 5 个共有峰为指标成分的神香草有效部位 HPLC 特征图谱。**结论:** 本研究所建立的定性定量控制方法, 能全面评价神香草抗哮喘有效部位的质量, 并可为研究新药奠定基础。

关键词: 神香草; 抗哮喘; 质量控制; 迷迭香酸; 特征图谱; 总黄酮; 总多糖

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2018) 08-1437-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.08.20

A qualitative and quantitative study on the effective parts of *Hyssopus cuspidatus* Boriss anti-asthmatic*

RONG Xiao-juan¹, KANG Yu-tong¹, YUAN Feng-juan²,
HE Jin-hua^{1**}, LI Hong-ying³

(1. Xinjiang Institute of Material Medica, Urumqi 830004, China;

2. Xinjiang Uygur Autonomous Region for Food and Drug Control, Urumqi 830002, China;

3. The Chinese People's Liberation Army Corps, Sichuan, Chengdu 610041, China)

Abstract Objective: To establish a qualitative and quantitative control method for the effective parts of *Hyssopus cuspidatus* Boriss anti-asthmatic. **Methods:** An HPLC was used to measure the contents of rosmarinic acid in the effective parts of *Hyssopus cuspidatus* Boriss anti-asthmatic and the HPLC specific chromatogram was also established. UV was used to measure the contents of total flavonoids and total polysaccharide of the effective parts of *Hyssopus cuspidatus* Boriss anti-asthmatic. **Results:** The contents of rosmarinic acid, total flavonoids and total polysaccharide were 3.68%, 35.10% and 17.12%, respectively; HPLC specific chromatogram consisted of five common peaks. **Conclusion:** The method established in this study can be applied in the quality control for qualitative study on and quantitative study on the effective parts of *Hyssopus cuspidatus* Boriss anti-asthmatic and can lay a foundation for the study of new drugs.

* 国家自然科学基金项目 (81560644); 新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研业务经费资助项目 (KGY2016167)

** 通信作者 Tel: (0991) 2326572; E-mail: hejh1216@163.com

第一作者 Tel: (0991) 2326572; E-mail: 109303620@qq.com

Keywords: *Hyssopus cuspidatus* Boriss; anti-asthma; quality control; rosmarinic acid; specific chromatogram; total flavonoids; total polysaccharide

神香草为唇形科植物硬尖神香草 *Hyssopus cuspidatus* Boriss 的干燥地上部分,是维吾尔族民间习用药材,性质干热,有很强的香味,具有镇咳、祛痰、平喘作用^[1],在维吾尔医和民间用于治疗气管炎已有几百年的历史,其疗效确切、显著^[2]。前期研究证实,神香草提取物具有明显的镇咳、平喘作用,进一步对神香草提取物进行制备工艺的系统性研究和优化,获得神香草有效部位,并进行了相关的药效学研究,证实神香草有效部位可通过抑制炎症因子的产生和抑制炎症介质的表达,促进免疫调节的平衡,从而达到防治支气管哮喘的作用^[3];并发现神香草有效部位对乙酰胆碱、磷酸组胺致豚鼠支气管平滑肌收缩具有舒张作用^[4]。

本研究在前期优化神香草有效部位制备工艺和药效作用显著的基础上,对其质量进行研究,采用高效液相色谱法对神香草有效部位中的主要成分迷迭香酸^[5]进行测定,并对其特征图谱进行研究;采用紫外分光光度法对神香草有效部位中的总黄酮和总多糖进行测定,建立了神香草抗哮喘有效部位的定性定量方法,为新药研发奠定基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

U3000 高效液相色谱仪 (Thermo Fisher Scientific); BP211D 电子天平 (Sartorius, 0.01 mg); UV-2501 型紫外分析仪; SK3300H 型超声清洗仪 (上海科导超声仪器有限公司); UPT-11-10T 优普特实验超纯水机 (成都超纯科技有限公司)。

1.2 试药

对照品迷迭香酸 (批号 111871-201102, 纯度 98.2%)、D-无水葡萄糖 (批号 0833-9501, 纯度 98.5%)、芦丁 (批号 100080-201409, 纯度 98.0%) 均购自中国食品药品检定研究院; 神香草有效部位 (批号: 20150816、20150830、20150914) 由新疆维吾尔自治区药物研究所分析室制备; 甲醇、乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 公司), 甲酸为色谱纯 (美国 Dikma Technologies), 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 HPLC 法测定神香草有效部位中迷迭香酸

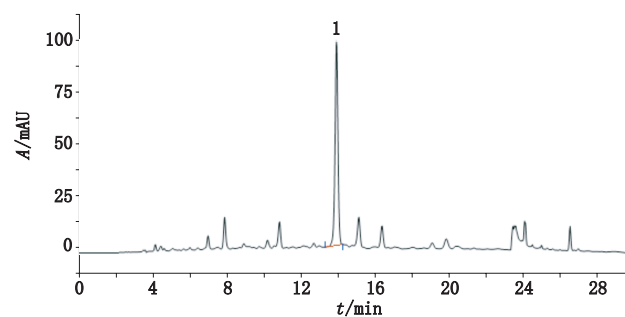
2.1.1 色谱条件

采用 Cosmosil Waters C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈为流动相 A, 0.2% 甲酸水溶液为流动相 B, 梯度洗脱 (0~20 min, 20%A → 35%A; 20~20.01 min, 35%A → 70%A; 20.01~25 min, 70%A; 25~25.01 min, 70%A → 20%A; 25.01~30 min, 20%A), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 330 nm, 进样体积 10 μL。

2.1.2 对照品溶液制备 取迷迭香酸对照品适量, 精密称定, 加 30% 乙腈制成每 1 mL 含 50 μg 的溶液, 即得。

2.1.3 供试品溶液制备 精密称定神香草有效部位约 15 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加 30% 乙腈适量, 超声 (频率 59 kHz, 功率 160 W) 15 min 使溶解, 放冷, 用 30% 乙腈稀释至刻度, 摇匀, 即得 (每 1 mL 约含 1.5 mg)。

2.1.4 含量测定方法 精密量取供试品溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。另取迷迭香酸对照品溶液, 同法测定。按外标法以峰面积计算样品中迷迭香酸的含量。见图 1。



1. 迷迭香酸 (rosmarinic acid)

图 1 神香草抗哮喘有效部位 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of the effective parts of *Hyssopus cuspidatus* Boriss anti-asthmatic

2.1.5 线性范围考察 取迷迭香酸对照品适量, 精密称定, 加 30% 乙腈制成 1.025 mg · mL⁻¹ 的对照品储备液, 再加 30% 乙腈稀释制成质量浓度分别为 5.125、25.625、51.250、76.875、102.5 μg · mL⁻¹ 的系列对照品溶液, 按“2.1.1”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⁻¹) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程:

$$Y=0.3453X-0.1863 \quad r=0.9999$$

结果表明,迷迭香酸的质量浓度在 5.125~102.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.6 重复性试验 取本品适量,按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,计算含量。结果平均含量为 3.75%, RSD=1.3% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.1.7 精密度试验 取“2.1.2”项下对照品溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,连续进样 6 次,记录峰面积。结果 RSD=0.35% ($n=6$),表明仪器精密度良好;不同日期、不同人员按“2.1”项下方法测定样品含量 6 次,结果 RSD=0.77% ($n=6$),表明本方法精密度良好。

2.1.8 回收率试验 精密称取已知含量的神香草有效部位适量,共 6 份,置于 10 mL 量瓶中,分别精密加入质量浓度为 1.025 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的迷迭香酸对照品溶液 0.3 mL,按“2.1.3”项下方法制备供试溶液。按“2.1.1”项下色谱条件进行测定,计算回收率,结果表明迷迭香酸的加样回收率为 99.1%, RSD=0.86% ($n=6$)。

2.1.9 稳定性考察 取“2.1.3”项下供试品溶液适量,分别于室温(25℃)下放置 0、4、8、12、24 h,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果 RSD=1.6% ($n=5$),表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定性良好。

2.1.10 迷迭香酸含量测定结果 按“2.1.4”项下含量测定法,测得神香草有效部位中迷迭香酸含量($n=3$)为 3.68%。

2.2 特征图谱

2.2.1 色谱条件 同“2.1.1”项下色谱条件,理论塔板数按迷迭香酸峰计算应不低于 8 000。

2.2.2 参照物溶液及供试品溶液的制备 取“2.1.2”项下对照品溶液作为参照物溶液;取“2.1.3”项下供试品溶液作为供试品溶液。

2.2.3 测定法 分别精密吸取参照溶液与供试品溶液各 10 μL ,注入液相色谱仪,测定,记录 30 min 的色谱图,即得。

2.2.4 结果 样品的特征图谱中应有 5 个特征峰,与参照物峰相对应的峰为 S 峰,计算特征峰 1~4 的相对保留时间,其相对保留时间应在规定值的 $\pm 5\%$ 之内,规定值为:0.56(峰 1)、0.76(峰 2)、1.09(峰 3)、1.18(峰 4),结果见图 2。

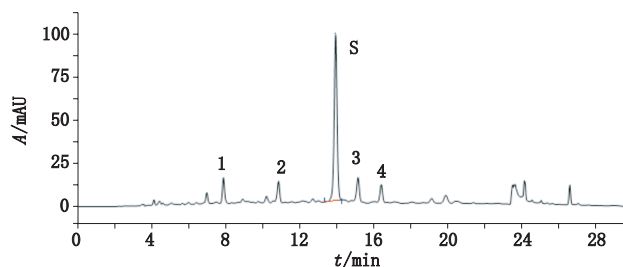


图 2 神香草抗哮喘有效部位特征图谱

Fig. 2 HPLC specific chromatogram of the effective parts of *Hyssopus cuspidatus* Boriss anti-asthmatic

2.3 UV 法测定神香草有效部位中总黄酮

2.3.1 对照品溶液的制备 取芦丁对照品适量,精密称定,加 40% 乙醇制成每 1 mL 含 0.6 mg 的溶液,即得。

2.3.2 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL,分别置 25 mL 量瓶中,各加水 6 mL,加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,使混匀,放置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加氢氧化钠试液 10 mL,再加 40% 乙醇稀释至刻度,摇匀,放置 15 min,以相应的试剂为空白,照紫外-可见分光光度法(《中华人民共和国药典》2015 年版四部通则 0401),在 510 nm 的波长处测定吸收度,以吸收度(A)为纵坐标,浓度(X , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程:

$$A=0.0122X-0.0134 \quad r=0.9997$$

结果表明,芦丁的质量浓度在 12~96 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内与吸收度呈良好的线性关系。

2.3.3 供试品溶液的制备 取神香草有效部位约 12 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加 40% 乙醇适量,超声(频率 59 kHz,功率 160 W)10 min 使溶解,放冷,用 40% 乙醇稀释至刻度,即得。

2.3.4 测定法 精密量取 40% 乙醇、对照品溶液和供试品溶液各 2 mL,分别置 25 mL 量瓶中,自“2.3.2”项下“加水 6 mL”起,依法测定吸收度。从标准曲线上读出供试品溶液中芦丁的量,计算,即得。

2.3.5 重复性试验 按“2.3.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,再按“2.3.4”项下方法测定,计算含量。结果平均含量为 34.89%, RSD=1.6% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.3.6 精密度试验 取“2.3.1”项下对照品溶液,按“2.3.4”项下方法测定吸收度。结果 RSD=0.022% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.7 回收率试验 取已知含量的神香草有效部位6份,每份约6.0 mg,精密称定,分别置于10 mL量瓶中,精密加入芦丁对照品溶液($0.602 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3.75 mL,加40%乙醇适量,超声(160 W, 59 kHz) 15 min,放冷,用40%乙醇稀释至刻度,摇匀,精密量取2 mL于25 mL量瓶中,按“2.3.4”项下方法,自“加水6 mL”起同法操作并测定,计算回收率,结果平均回收率为100.2%,RSD=1.1% ($n=6$)。

2.3.8 稳定性试验 取“2.3.3”项下供试品溶液适量,在室温(25 °C)下放置,分别于0、10、30、40 min测定吸收度,结果吸收度随放置时间的延长而降低,故应及时测定。

2.3.9 总黄酮含量测定结果 按“2.3.4”项下方法,测定神香草有效部位中总黄酮含量($n=3$)为35.10%。

2.4 UV法测定神香草有效部位中总多糖

2.4.1 对照品溶液的制备 取D-无水葡萄糖对照品适量,精密称定,加40%乙醇制成每1 mL含0.1 mg的溶液,即得。

2.4.2 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL,分别置10 mL量瓶中,加40%乙醇至刻度,摇匀。分别精密量取上述溶液各1 mL,置具塞试管中,加水1 mL,迅速精密加入硫酸蒽酮溶液(精密称取蒽酮0.05 g,加80%硫酸100 mL使溶解,摇匀)6 mL,立即摇匀,置水浴加热15 min,立即置冰浴中冷却15 min,取出,以相应的试剂为空白,照紫外-可见分光光度法(《中华人民共和国药典》2015年版四部通则0401),在620 nm波长处测定吸收度,以对照品的质量浓度($X, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,吸收度(A)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程:

$$A=0.0041X+0.0251 \quad r=0.9994$$

结果表明,D-无水葡萄糖的质量浓度在20.44 ~ 204.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与吸收度呈良好的线性关系。

2.4.3 供试品溶液的制备 取神香草有效部位约17 mg,精密称定,置25 mL量瓶中,加40%乙醇,超声(160 W, 59 kHz) 15 min使溶解,放冷,用40%乙醇溶液稀释至刻度,即得。

2.4.4 测定法 精密量取40%乙醇、对照品溶液和供试品溶液各1 mL,分别置具塞试管中,自“2.4.2”项下“加水1 mL”起,依法测定吸收度。从标准曲

线上读出供试品溶液中D-无水葡萄糖的量,计算,即得。

2.4.5 重复性试验 按“2.4.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.4.4”项下方法测定,计算含量。结果平均含量为17.32%,RSD=1.4% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.4.6 精密度试验 取“2.4.1”项下对照品溶液适量,按“2.4.4”项下方法测定吸收度。结果RSD=0.11% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.4.7 回收率试验 取已知含量的神香草有效部位6份,每份约9.0 mg,精密称定,分别置25 mL量瓶中,精密加入D-无水葡萄糖对照品溶液($1.022 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1.3 mL,加40%乙醇适量,超声(160 W, 59 kHz) 15 min,放冷,用40%乙醇稀释至刻度,摇匀。精密量取1 mL于具塞试管中,按“2.4.4”项下测定法,自“加水1 mL”起测定,计算回收率,结果平均回收率为103.0%,RSD=1.1% ($n=6$)。

2.4.8 稳定性试验 取“2.4.3”项下供试品溶液适量,在室温(25 °C)下放置,分别于0、10、30、40 min测定吸收度,结果吸收度随放置时间的延长变化不大,但建议30 min内测定完毕。

2.4.9 总多糖含量测定结果 按“2.4.4”项下方法,测定神香草有效部位中总多糖含量,结果($n=3$)为17.12%。

3 结论与讨论

本研究所用的神香草有效部位经药效试验,证实具有很强的抗哮喘活性,是此类药物的候选药物,对其质量控制进行深入研究意义较大。黄酮类化合物具有抗氧化、抗过敏、抗炎、免疫调节的作用,其对于防治哮喘的作用明确^[6-8];神香草多糖可调节哮喘HPA轴的功能,通过改善内源性抗炎机制和抑制炎症细胞因子的释放来改善哮喘的炎症^[9]。故本研究将总黄酮和总多糖作为测定指标。

本研究不仅建立HPLC方法测定了主要成分迷迭香酸的含量,结果为3.68%,并建立了特征图谱,从部分到整体化学成分的角度都对其进行控制^[10-12],经测定主要成分黄酮(35.10%)和多糖(17.12%)的含量之和大于50%,具有一定的成药性^[13],为进一步研究新药提供数据支持。

参考文献

- [1] 丁剑冰,武新华,王亚男,等.神香草的实验研究[J].新疆中医药,2002,2(3):10

- DING JB, WU XH, WANG YN, *et al.* Study on *Hyssopus cuspidatus* Boriss [J]. *Xinjiang J Tradit Chin Med*, 2002, 2(3): 10
- [2] 国家药典委员会. 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
Chinese Pharmacopoeia Commission. Drug Standard of the Ministry of Health of People's Republic of China·Uighur Medicine Fascicule [S]. Urumqi: Xinjiang Scientific and Technical Publisher, 1999
- [3] 袁凤娟, 胡梦颖, 哈木拉提·哈斯木, 等. 神香草提取物防治支气管哮喘作用机制研究[J]. *中成药*, 2017, 39(5): 1042
YUAN FJ, HU MY, HAMULATI HSM, *et al.* The research of the mechanism of *Hyssopus cuspidatus* Boriss in the prevention and treatment of bronchial asthma [J]. *Chin J Pat Med*, 2017, 39(5): 1042
- [4] 袁凤娟, 孙玉华, 哈木拉提·哈斯木, 等. 神香草洗脱物对豚鼠离体气管平滑肌收缩作用的影响[J]. *中国药房*, 2017, 28(13): 1790
YAN FJ, SUN YH, HAMULATI Hsimu, *et al.* Effect of tracheal smooth muscle contraction by *Hyssopus cuspidatus* extract on isolated guinea pig [J]. *China Pharm*, 2017, 28(13): 1790
- [5] 戎晓娟, 严欢, 韩阳 等. 神香草水提物的主成分分析及含量测定[J]. *中国药房*, 2015, 26(6): 808
RONG XJ, YAN H, HAN Y, *et al.* Analysis of main components of *Hyssopus officinalis* water extract and content determination [J]. *China Pharm*, 2015, 26(6): 808
- [6] 王天明, 尚云晓. 黄酮类化合物防治哮喘的研究进展[J]. *国际儿科学杂志*, 2016, 43(5): 389
WANG TM, SHANG YX. Progress of flavonoids in prevention and treatment of asthma [J]. *Int J Pediatr*, 2016, 43(5): 389
- [7] 麦合苏木·艾克木, 努尔江·肉孜, 阿布都热依木·玉素甫. 维药神香草总黄酮抗炎、止咳、祛痰及平喘作用研究[J]. *新疆医科大学学报*, 2014, 37(4): 403
MAHSUM Ekim, NURJAN Rozi, ABDIRYIM Yusup. On anti-inflammatory, antitussive, expectorant, and anti-asthmatic effects of total flavonoids from Uyghur medicine *Hyssopus officinalis* L. [J]. *J Xinjiang Med Univ*, 2014, 37(4): 403
- [8] 阿依先木·他西. 维药神香草总黄酮对哮喘大鼠气道炎症和气道重塑的影响及其作用机制研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2015
AYXAM Tax. The Effect and Mechanism of Traditional Uyghur Medicinal Herb *Hyssopus officinalis* L. Total Flavonoids on Airway Inflammation and Remodeling in Rats Model of Chronic Asthma [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2015
- [9] 马雪萍. 神香草多糖对哮喘大鼠细胞因子和神经内分泌免疫网络的实验研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2011
MA XP. The Effects of Polysaccharide from *Hyssopus officinalis* L. on Cytokine and Neuro-endocrine-immuno in Asthma Model of Asthmatic Rats [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2011
- [10] 管珂, 苏蕊, 滕爱君, 等. 新疆紫草 HPLC 特征图谱和紫草类药材 6 种蒽醌类成分含量测定[J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(9): 5126
ZAN K, SU R, TENG AJ, *et al.* HPLC specific chromatogram of *Arnebia euchroma* and determination of six naphthoquinones in *Boraginaceae* herbs [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(9): 5126
- [11] 赵喜玲, 张宏, 李小云, 等. 黑骨藤超高效液相色谱特征图谱的研究[J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(11): 1963
ZHAO XL, ZHANG H, LI XY, *et al.* Studies on ultra performance liquid chromatography characteristic chromatogram of *Periploca forrestii* Schltr. [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(11): 1963
- [12] 陈佳, 钱琛, 陈桂良. 《中华人民共和国药典(2015年版)》中中药部分的增、修订情况简介[J]. *上海医药*, 2016, 37(7): 3
CHEN J, QIAN C, CHEN GL. A brief introduction to quality standards of traditional Chinese medicines in the Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2015 version) [J]. *Shanghai Med*, 2016, 37(7): 3
- [13] 王永刚, 李沛波, 吴忠, 等. 岭南特色中药活性成分的发现与成药性研究[J]. *中南药学*, 2015, 13(8): 789
WANG YG, LI PB, WU Z, *et al.* Discovery of the bioactive components and further druggability research of traditional Chinese herbs from Lingnan region in China [J]. *Cent South Pharm*, 2015, 13(8): 789

(本文于 2017 年 4 月 14 日收到)