

HPLC 法同时测定芦根中对香豆酸和阿魏酸含量

潘春燕, 陈 静, 杭太俊, 宋 敏*

(中国药科大学药物分析学教研室, 南京 210009)

摘 要 采用 HPLC 法同时测定对香豆酸和阿魏酸的含量以评价芦根质量。芦根经碱性乙醇水溶液回流提取对香豆酸和阿魏酸, Diamonsil C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 乙腈-0.3% 醋酸水溶液流动相梯度洗脱分离, 紫外 310 nm 波长检测。对香豆酸和阿魏酸分别在 0.2~200 μg/mL 和 0.1~120 μg/mL 范围有良好线性, 平均回收率分别为 (96.9±2.91)% 和 (98.7±1.78)%。测得 15 批市售芦根饮片中对香豆酸和阿魏酸的含量 ($\bar{x} \pm s$, max~min) 分别为 (0.88±0.16, 1.21~0.70)% 和 (0.41±0.035, 0.49~0.36)%。所建立的对香豆酸和阿魏酸含量的同时测定方法可用于芦根质量的评价。

关键词 芦根; 对香豆酸; 阿魏酸; 含量测定; HPLC

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2015)02-0219-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150214

Simultaneous determination of *p*-coumaric acid and ferulic acid in *Rhizama Phragmitis* by HPLC

PAN Chunyan, CHEN Jing, HANG Taijun, SONG Min*

Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, China

Abstract To determine the contents of *p*-coumaric acid and ferulic acid in *Rhizama Phragmitis* by HPLC for quality evaluation. *Rhizama Phragmitis* alkaline alcoholic solution exact of *p*-coumaric acid and ferulic acid was refluxed. An HPLC method was developed by using a Diamonsil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) column, and the mobile phase of acetonitrile and 0.3% acetic acid with linear gradient elution at a flow of 1.0 mL/min and UV detection at 310 nm. Calibration curves of *p*-coumaric acid and ferulic acid were linear over the range of 0.2-200 μg/mL and 0.1-120 μg/mL respectively. Average recoveries were (96.9±2.91)% and (98.7±1.78)%, respectively. The average contents of *p*-coumaric acid and ferulic acid expressed as mean±sd (max-min) were (0.88±0.16)% (1.21%-0.70%) and (0.41±0.035)% (0.49%-0.36%) in 15 batches of *Rhizama Phragmitis*. The established method will be beneficial to the quality evaluation of *Rhizama Phragmitis*.

Key words *Rhizama Phragmitis*; *p*-coumaric acid; ferulic acid; determination of content; HPLC

芦根(*Phragmitis Rhizama*)为禾本科植物芦苇(*Phragmites communis Trin.*)的新鲜干燥根茎, 收载于《中华人民共和国药典:一部》^[1](2010版)。芦根性寒味甘, 具有清热除烦、止呕利尿之功效, 临床主要用于治疗发热、支气管炎、尿路感染、止呕等症^[2]。芦根所含化学成分主要有多糖、甾体类和酚酸类。目前芦根化学成分所进行的研究大部分都针对其多糖类成分及酚酸类成分阿魏酸的分离与测定^[3-9]。药理学实验表明, 酚酸类成分具有清

热、止呕、抗菌消炎的作用, 与芦根的治疗发热、止呕的功效相吻合^[10-13]。《中华人民共和国药典》(2010版)中未见有芦根的含量测定控制项。

本研究针对芦根中的酚酸类成分进行了 HPLC-MS 鉴定研究, 首次证明了芦根中同时含有阿魏酸和对香豆酸(图1), 研究建立了芦根中对香豆酸和阿魏酸含量的 HPLC 同时测定法, 并对市售不同产地芦根药材饮片进行测定分析, 可为芦根的质量控制提供参考。

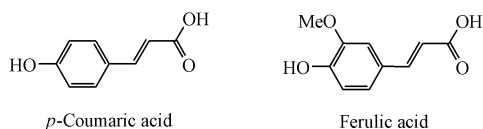


Figure 1 Chemical structures of *p*-coumaric acid and ferulic acid

1 材料

1.1 药品与试剂

芦根饮片 15 批,分别收集于福建、河北、江苏、新疆、四川、安徽和湖北药材产地,经鉴定均为芦根 (*Phragmitis Rhizama*)。

阿魏酸对照品(中国食品药品检定研究院,纯度 99.6%);对香豆酸对照品(Sigma Aldrich 公司,纯度 $\geq 98.0\%$);乙腈(分析纯,南京化学试剂公司);乙酸(分析纯,南京化学试剂公司);氢氧化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);盐酸(分析纯,南京化学试剂公司);重蒸水(自制)。

1.2 仪器

Thermo-Finnigan TSQ Quantum Ultra AM 型液质联用仪(美国 Thermo Fisher 公司,Xcalibur1.2 数据处理系统);LC-2010HT 高效液相色谱仪(日本岛津公司);Agilent 6224 TOF/MS 液质联用仪(美国 Agilent 公司,MassHunter 数据处理系统);BS 21S、110S 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Diamonsil C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) 色谱柱,乙腈-0.3% 醋酸水溶液(5:95)流动相 A,乙腈-0.3% 醋酸水溶液(20:80)流动相 B,线性梯度洗脱(A:B):0 min(100:0) \rightarrow 30 min(0:100) \rightarrow 36 min(0:100) \rightarrow 38 min(100:0) \rightarrow 43 min(100:0),流速 1 mL/min,柱温 40 $^{\circ}$ C,紫外 310 nm 检测,进样量 10 μ L。在此条件下,供试品溶液中对香豆酸和阿魏酸分离度良好,不受其他成分干扰(图 2)。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取对香豆酸对照品约 20 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定量稀释至刻度,摇匀,作为对香豆酸储备液;精密量取该溶液 4 mL,置 10 mL 量瓶,加初始比例的流动相稀释至刻度,摇匀,制得对香豆酸对照溶液(80 μ g/mL)。取阿魏酸对照品约 12 mg,精密称

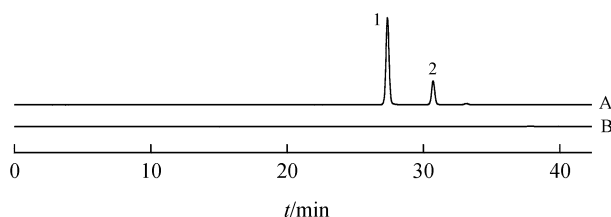
定,置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定量稀释至刻度,摇匀,作为阿魏酸储备液;精密量取该溶液 5 mL,置 10 mL 量瓶中,加初始比例的流动相稀释至刻度,摇匀,制得阿魏酸对照溶液(60 μ g/mL)。

2.2.2 供试品溶液 取药材粉末(过 40 目筛)约 0.25 g,精密称定,置 100 mL 圆底烧瓶中,精密加入含 0.3 mol/L 氢氧化钠的 70% 乙醇溶液 25 mL,精密称定总重量后,于沸水浴回流 1 h,取出,冷却至室温后,用 70% 乙醇溶液补足重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液与等量的含 0.3 mol/L 盐酸的 70% 乙醇溶液混合均匀后,经 0.22 μ m 有机微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取等量的对香豆酸与阿魏酸对照溶液,混合均匀,即得系统适用性试验溶液。

精密吸取系统适用性溶液 10 μ L,注入色谱仪,记录色谱图(图 2),对香豆酸和阿魏酸色谱峰之间的分离度应大于 5,以对香豆酸色谱峰计算理论塔板数应大于 5 000。



1: *p*-Coumaric acid; 2: Ferulic acid

Figure 2 HPLC chromatograms of system solution (A) and blank extract solution (B)

2.4 线性关系

精密吸取“2.2.1”项下的对照品储备液,分别加起始比例流动相依次定量稀释 4/5、3/5、1/5、1/20、1/50、1/100、1/200 和 1/1 000 倍,作为系列标准溶液,各精密吸取 10 μ L,注入液相色谱仪,记录色谱图。分别以对香豆酸与阿魏酸的峰面积(Y)为纵坐标,标准溶液的质量浓度(对香豆酸 0.2 ~ 200 μ g/mL,阿魏酸 0.12 ~ 120 μ g/mL)为横坐标进行线性回归。

结果表明,对香豆酸和阿魏酸分别在 0.2 ~ 200 μ g/mL 和 0.12 ~ 120 μ g/mL 范围内线性良好。对香豆酸的回归方程为 $Y = 87\,018X - 33\,117$ ($r = 0.999\,0$),阿魏酸的回归方程为 $Y = 53\,092X - 22\,703$ ($r = 0.999\,0$)。

2.5 精密度

取同一供试品溶液,依“2.1”项下条件连续测定 6 次,记录对香豆酸和阿魏酸的色谱峰面积。结果表明,对香豆酸峰面积的 RSD 为 0.45%,阿魏酸峰面积的 RSD 为 0.24%。本法测定精密度良好。

2.6 重复性

取同一批(LG-2011-S-4,第 6 批)芦根药材 6 份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按外标法,以峰面积计算含量。结果,对香豆酸含量平均值为 0.68% ($n=6$,RSD 0.47%),阿魏酸含量平均值为 0.41% ($n=6$,RSD 1.8%)。结果表明,该测定法重复性良好。

2.7 稳定性

取供试品溶液,分别在 0~24 h 放置不同时间后进样分析。测得对香豆酸峰面积的 RSD 为 1.13%,阿魏酸峰面积的 RSD 为 1.98%。说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 回收率

取已测定含量的芦根药材粉末约 0.125 g,精密称定 9 份,分别加入相当于已知含量的 80%、100%、120% 的对香豆酸和阿魏酸对照品溶液,配制低、中、高水平的加样溶液各 3 份。按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法进行制备,按“2.1”项下色谱方法进样分析,计算加样回收率。结果,对香豆酸平均回收率为 $(96.9 \pm 2.91)\%$,阿魏酸平均回收率为 $(98.7 \pm 1.78)\%$ 。

2.9 样品测定

取芦根药材按上述方法制备供试品溶液,每批样品制备两份,各份溶液在上述色谱条件下分别进样 2 次,按外标法以峰面积计算含量。结果(表 1)表明,市售芦根饮片中 对香豆酸和阿魏酸的含量 ($\bar{x} \pm s$, max ~ min) 分别为 $(0.88 \pm 0.16, 1.21 \sim 0.70)\%$ 和 $(0.41 \pm 0.035, 0.49 \sim 0.36)\%$,芦根酚酸类成分中对香豆酸的含量明显高于阿魏酸的含量(约为 2 倍)。

Table 1 Contents of *p*-coumaric acid and ferulic acid in *Phragmitis Rhizama* from different origins ($\bar{x} \pm s, n=2$)

No.	Batch No.	Origin	Variety	Harvesting time	<i>p</i> -Coumaric acid/%	Ferulic acid/%
1	LG-2010-A-1	Fujian	Big	Autumn, 2010	1.21 ± 0.04	0.42 ± 0.01
2	LG-2010-A-2	Fujian	Big	Autumn, 2010	1.17 ± 0.05	0.41 ± 0.00
3	LG-2011-S-1	Fujian	Big	Spring, 2011	0.87 ± 0.02	0.40 ± 0.02
4	LG-2011-S-2	Fujian	Big	Spring, 2011	1.00 ± 0.02	0.39 ± 0.01
5	LG-2011-S-3	Fujian	Big	Spring, 2011	0.92 ± 0.04	0.37 ± 0.00
6	LG-2011-S-4	Fujian	Big	Spring, 2011	0.70 ± 0.00	0.40 ± 0.01
7	LG-2011-S-5	Fujian	Big	Spring, 2011	0.72 ± 0.02	0.36 ± 0.00
8	LG-2011-S-6	Fujian	Big	Spring, 2011	0.71 ± 0.02	0.39 ± 0.01
9	140528	Hebei	Big	Spring, 2014	0.93 ± 0.00	0.42 ± 0.00
10	140528	Hebei	Small	Spring, 2014	0.87 ± 0.01	0.49 ± 0.04
11	140502	Jiangsu	Small	Spring, 2014	0.70 ± 0.01	0.46 ± 0.00
12	20140615	Xinjiang	Small	Spring, 2014	0.78 ± 0.00	0.38 ± 0.01
13	140608	Sichuan	Small	Spring, 2014	0.83 ± 0.02	0.43 ± 0.00
14	140621	Anhui	Small	Spring, 2014	0.94 ± 0.02	0.39 ± 0.03
15	140608	Hubei	Small	Spring, 2014	0.84 ± 0.00	0.37 ± 0.01

3 讨论

3.1 对香豆酸的确定

参照文献[3]对芦根药材中的阿魏酸进行测定,结果发现,阿魏酸色谱峰前存在含量较高的未知特征成分峰,并且未有相关文献对此成分进行鉴定或含量测定。

经 LC-TOF/MS 分析可知,此成分 $[M+H]^+$ 为 165.060 3, $[M+Na]^+$ 为 187.045 4, $[M-H]^-$ 为 163.010 1,此成分的质量数应为 164。经 LC-

ESI⁺-MS/MS 分析得特征碎片离子峰有:91、119、147。结合此化合物是经含氢氧化钠的乙醇溶液提取产生,且极性与阿魏酸相近,证明为酚酸类成分。同时根据 MS/MS 碎片的裂解(图 3)分析,推定为对香豆酸。

取市售对香豆酸对照品进行对比分析确证。结果表明,色谱保留时间、质谱准分子离子峰和二级碎片离子,均与此未知成分一致。因此,首次证明,芦根药材中同时含有对香豆酸和阿魏酸。

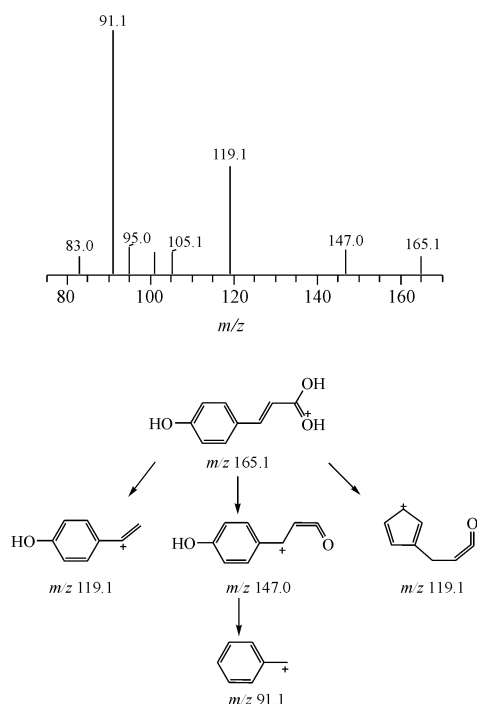


Figure 3 LC-MS/MS spectrum and proposed fragmentation pathway of *p*-coumaric acid

3.2 测定波长的选择

分别取对香豆酸和阿魏酸对照品适量,用甲醇溶解,在 200 ~ 400 nm 波长范围内扫描。结果对香豆酸和阿魏酸分别在 310 和 316 nm 处有最大吸收,两者的最大吸收波长接近,故实验选择 310 nm 为测定波长。

3.3 提取方法的优化

对香豆酸和阿魏酸溶于热水和乙醇、乙醚、甲醇等有机溶剂,几乎不溶于苯和石油醚。《中华人民共和国药典》(2010 版)中银翘伤风胶囊和维 C 银翘片均含有芦根药材,均以水提制得的浸膏入药。本研究曾尝试用水、甲醇溶液、乙醇溶液对芦根药材进行提取,发现阿魏酸和对香豆酸均为响应最大的物质。《中华人民共和国药典》(2010 版)未见有芦根的含量测定控制项。

结合阿魏酸和对香豆酸的性质和相关文献^[3,14–19],用含碱的乙醇或甲醇溶液对芦根药材进行回流提取,考察了甲醇、乙醇的比例以及氢氧化钠的加入量。结果发现,乙醇提取能解决芦根药材中淀粉水解的黏性问题,且较好地除去鞣质等不溶物质,提取效果优于甲醇和水,而含碱的乙醇-水溶液的提取效果要优于乙醇-水溶液。经优化最终选定含 0.3 mol/L NaOH 的 70% 乙醇溶液作为提取

溶剂。

3.4 含量差异分析

芦根在中国有两个品种及一个变种^[20],试验所收集到的芦根药材主要为大、小芦根两个品种。不同产地、不同采收时间及不同品种的芦根^[21–23]中,所含阿魏酸量均约在 0.4%,含量波动较小,大芦根中所含对香豆酸的含量均并明显高于小芦根中对香豆酸的含量。试验还发现不论是何种提取剂,芦根药材中对香豆酸的含量均比阿魏酸含量高。

阿魏酸有顺反异构体,在药材同时存在。反式阿魏酸更稳定,高浓度的反式阿魏酸在存放过程中仅有少部分(约 1%)转换为顺式^[24]。在色谱图中,顺式阿魏酸紧邻反式阿魏酸后出峰,芦根药材酚酸的定量分析中,均以反式阿魏酸作为对照品进行测定。

4 小 结

对香豆酸与阿魏酸结构相似,同属于芳香族酚酸类物质,具有抗高血脂、抗菌、抗真菌、抗肝毒等作用^[11],药理活性良好。

国内外文献均未见芦根药材中对香豆酸含量测定的报道。本研究采用联用技术鉴定确证芦根药材中含有对香豆酸,并建立了适用于芦根中对香豆酸与阿魏酸同时测定的 HPLC 法,可为芦根药材的开发研究与质量控制提供参考。

参 考 文 献

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia*: part 1 (中华人民共和国药典:一部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2010: 152.
- [2] Chen JR, Li PL. Chinese traditional herbals in common use—Reed rhizome/Bamboo leaves/gypsum [J]. *J TCM* (中兽医医药杂志), 2000(1): 46–47.
- [3] Dai XP, Song HM, Li ZG. Determination of ferulic acid in different origins of Reed Rhizome by HPLC [J]. *TCM Res* (中医研究), 2010, 23(9): 26–27.
- [4] Chao RY, Yang JY, Cai XY, et al. Extraction, purification and anti-tumor activity of Reed Rhizome polysaccharide [J]. *Sci Tech Food Indus* (食品工业科技), 2011, 32(12): 284–286.
- [5] Zhang GS, Fan MY, Zhang JM, et al. Extraction and determination of Reed Rhizome polysaccharide [J]. *J Anhui TCM College* (安徽中医学院学报), 2002, 21(1): 51–52.
- [6] Geng ZH. Technique study of extracting polyose from *Rhizome*

- Phragmitis*[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 1990,10(10):738.
- [7] Wang MF. Extraction, separation and determination of ferulic acid in Reed Rhizome[J]. *J Chizhou Teach College*(池州师专学报), 2007,21(3):51-52.
- [8] Yu WJ, Jiang TF, Wang YH, et al. Determination of the monosaccharide composition of polysaccharides from rhizome *Phragmitis* and pollen typhae by capillary zone electrophoresis[J]. *Trans Ocean Limn*(海洋湖沼通报), 2010,2:162-168.
- [9] Zhang GS, Li QR, Yin H, et al. Rapid determination of ferulic acid and identification of its structure in rhizome of *Phragmitis communis* by GC-TOF/MS[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2005,36(3):333-335.
- [10] Liu HY, Qiu NX, Ding HH, et al. Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses[J]. *Food Res Int*, 2008(41):363-370.
- [11] Zhou JJ, Xie GR, Yan XJ. *Traditional Chinese Medicines molecular Structures, Natural Sources and Applications*(中药原植物化学成分手册)[M]. Chemical Industry Press, 2004:181.
- [12] Ou SY. Function and application of ferulic acid[J]. *Guangzhou Food Sci Tech*(广州食品工业科技), 2002,18(4):50-53.
- [13] Pragasam SJ, Murunikara V, Sabina EP, et al. Antiperoxidative potential of *p*-coumaric acid, a common dietary phenol, in adjuvant-induced arthritis in rats[J]. *Chin J Integr Med*(中西医结合学报), 2012,10(8):932-938.
- [14] Liu SS, Jin XQ, Gao D. Study on extraction methods of *p*-coumaric acid in *Oldenlandia diffusa* (willd.) roxb and determine the content by HPLC[J]. *Spel Wild Eco Plant Res*(特产研究), 2006,1:21-24.
- [15] Yang GD, Liang MJ, He LC, et al. Solvent extraction methods of ferulic acid in *Ligusticum Chuangxiong* hort. [J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2002,24(6):418-420.
- [16] Jin RC, Li GW, Ma SL, et al. Ferulic acid in *Angelica sinensis* extracting technology[J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2008,30(4):516-519.
- [17] Zheng YM, Liu P. Determination of *p*-coumaric acid in *Yanning* capsule by HPLC[J]. *Tech Innov Appl*(科技创新与应用), 2014,12:29-30.
- [18] Yao GC, Zhao MJ, Pan YY, et al. Determination of *p*-coumaric acid in *Houshuning* tablets by HPLC[J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2007,32(14):1470-1471.
- [19] Luo CY, Yin YL, Ruan Z, et al. Simultaneous determination of phenolic acids in potato tuber by RP-HPLC[J]. *Food Sci*(食品科学), 20011,32(18):300-303.
- [20] Luo F. Study of chemical constituents of rhizoma *Phragmitis* and the fingerprint of *Ixeris sonchifolia* (Bge.) (芦根的化学成分研究及苦碟子药材的指纹图谱研究)[D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2008.
- [21] Mu HF, Li HJ, Chen J, et al. Simultaneous determination of three sterones in *Achyranthis bidentatae* Radix by RP-HPLC[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2014,45(2):210-212.
- [22] Sun D, Liu WY, Liang C. Simultaneous quantitative determination of four active components in *Salvia miltiorrhiza* tablets by HPLC[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2007,38(1):51-54.
- [23] Chen MW, Xu DR, Wang ZT, et al. Quantitative determination of andrographolide and neoandrographolide in *Andrographis paniculata* Nees from different origins and harvesting time by RP-HPLC[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 1999,30(4):291-294.
- [24] Ding MY, Ma SW, Liu DL. Stability of ferulic acid and its existing form in *Ligusticum chuaxiong* and *Angelica sinensis*[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2004,35(1):28-30.