

# 白洋淀芦根药材中阿魏酸 UPLC 含量测定

李洪<sup>1</sup>, 张静<sup>1</sup>, 王麟<sup>1\*</sup>, 姚东云<sup>1</sup>, 高玉梅<sup>2</sup>

(1. 河北化工医药职业技术学院, 石家庄 050026; 2. 河北工程大学, 河北 邯郸 056002)

**[摘要]** 目的: 建立白洋淀芦根药材的 UPLC 含量测定方法。方法: 对 10 批白洋淀产的芦根药材采用 70% 甲醇为溶剂超声提取制备溶液, 应用 WATERS UPLC 超高效液相色谱仪, BEH C<sub>18</sub> 色谱柱, PDA 检测器进行测定。以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.1 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 25 ℃, 检测波长 320 nm。结果: 阿魏酸在 0.038 ~ 0.38 μg 呈良好的线性关系 ( $R^2 = 0.9999$ )。白洋淀产芦根中阿魏酸的含量在 0.051% ~ 0.169%。结论: 建立的白洋淀芦根药材中阿魏酸的 UPLC 含量测定方法快速、高效, 为白洋淀芦根药材的质量控制提供了有效手段。

**[关键词]** 超高效液相色谱; 含量测定; 阿魏酸; 芦根; 白洋淀

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0102-04

## Determination of Ferulic Acid in Phragmitis Rhizoma Produced in Baiyangdian by UPLC

LI Hong<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>1</sup>, WANG Lin<sup>1\*</sup>, YAO Dong-yun<sup>1</sup>, GAO Yu-mei<sup>2</sup>

(1. Hebei Chemical and Pharmaceutical College, Shijiazhuang 050026, China;

2. Hebei University of Engineering, Handan 056002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish UPLC determination method of Phragmitis Rhizoma in Baiyangdian. **Method:** Ten samples of Phragmitis Rhizoma in Baiyangdian from different place were extracted by 70% methanol with ultrasonic extractor. Sample solutions were determined by Waters UPLC equipped with BEH C<sub>18</sub> column and PDA detector, gradient eluted with acetonitrile-water as mobile phase. The flow rate was set to 0.1 mL·min<sup>-1</sup>, while the column temperature was set at 25 ℃, and the wavelength for detection was set to 320 nm. **Result:** The standard curve was in good linearity over the range of 0.038-0.38 μg ( $R^2 = 0.9999$ ). **Conclusion:** The method established is simple, accurate and can be used to control the quality of Phragmitis Rhizoma produced in Baiyangdian.

**[Key words]** UPLC; Phragmitis Rhizoma; content determination; ferulic acid

**[收稿日期]** 20120722(006)

**[基金项目]** 河北省中医药管理局科研计划项目(2008069)

**[第一作者]** 李洪, 教授, 硕士, 从事中药研究、药物新产品开发, Tel: 13373517398, E-mail: hzzj1981@163.com

**[通讯作者]** \* 王麟, 助教, 硕士, 从事中药药物分析研究, Tel: 15930110307, E-mail: wanglin8457@yahoo.com.cn

[5] 杨先炯, 王爱民, 李勇军, 等. 高效液相色谱法测定珍珠滴丸中甘草酸含量[J]. 中国药业, 2008, 17(3): 12.

[6] 孟蕾, 曹杰, 张海鸣, 等. HPLC 法测定铁笛丸中甘草酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 35.

[7] 谭燕珍. 益气维血颗粒的稳定性考察[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(5): 678.

[8] 张伟明, 李健和, 黎银波, 等. 甘草酸二铵注射液的研制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 35.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 199.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 59.

[责任编辑 顾雪竹]

芦根为禾本科植物芦苇新鲜或者干燥根茎<sup>[1]</sup>,为一种常用中药。据《本草纲目》记载,芦根性寒、味甘,入肺、胃经,具有清热泻火、生津止渴、除烦、止呕、利尿之功效,常用于热病烦渴,肺热咳嗽,肺痈吐痰,胃热呕吐,热淋涩痛。作为中国传统药物,芦根在中医临床治疗中有着广泛的应用<sup>[2-5]</sup>。

河北省保定市白洋淀地区的芦苇资源丰富,自古就有“芦苇之乡,甲于河北”的美誉。该地区出产的芦根产量大、质量好,作为河北省特色药材,是北方地区芦根药材的重要来源之一。

经查阅相关文献,发现目前关于芦根药材的质量控制研究较少,主要是以阿魏酸的高效液相含量测定和药材 HPLC 指纹图谱为主<sup>[6-9]</sup>,而关于白洋淀地区芦根的研究更是未见报道,缺乏白洋淀芦根相关的质量控制标准及方法。同时,传统的高效液相色谱含量测定方法由于所用液相色谱柱柱效较低,分离时间较长<sup>[9]</sup>,不能满足现今高通量分析的要求,严重制约着液相色谱含量测定方法在实际质量控制中的应用。而超高效液相色谱(UPLC)的出现解决了这一技术难题,它有着传统 HPLC 所不能比拟的超高柱效、分离能力和分离速度,在分离效果近似或更好的情况下,能大大缩短样品运行的时间<sup>[10-18]</sup>。

因此,笔者将 UPLC 技术引入到芦根的质量控制研究中,通过建立白洋淀芦根药材中阿魏酸的 UPLC 含量测定方法,为芦根的质量控制研究提供一定的参考。

## 1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC™ 超高效液相色谱仪系统(美国 Waters 公司),配备二元溶剂管理器、自动进样器和 PDA 二极管阵列检测器,二元高压泵,Empower 2 色谱工作站。舒美 KQ2200DE 型数控超声仪,AUTO SCIENCE 溶剂过滤装置,森信 DGG-9240A 型干燥箱,Millipore 公司 Milli-Q 型超纯水仪(Bedford, MA, USA)。

阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110773-200813,纯度在 98% 以上)。10 批芦根药材分别采自河北省保定市白洋淀地区不同地点,经河北化工医药职业技术学院李洪教授鉴定为禾本科植物芦苇 *Phragmites communis* Trin. 的新鲜根茎,切段,晒干,之后干燥、打粉,过 3 号筛(筛孔直径 0.355 mm, 50 目)备用。所有药材样本均保存在本实验室。10 批不同采集地的白洋淀芦根药材见表 1。

表 1 白洋淀芦根药材

No.	采收地点	采收时间
S1	留通村	2009-05-16
S2	赵北口镇	2009-05-16
S3	中七里庄村	2009-05-18
S4	西大坞	2009-05-18
S5	东淀头村	2009-05-18
S6	王家寨村	2009-05-19
S7	邸庄村	2009-05-27
S8	梁沟村	2009-05-27
S9	李广村四村	2009-05-30
S10	邵庄子村	2009-06-03

色谱乙腈(德国 Merck 公司),去离子水(采用超纯水仪自制)。其他用于样品制备的试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 UPLC 色谱条件** ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm, Waters 公司),PDA 检测器,流动相 A 为水,流动相 B 为乙腈,梯度洗脱,最适的线性梯度洗脱程序见表 2。流速 0.1 mL·min<sup>-1</sup>,色谱柱柱温和自动进样器样品室温度分别为 25,4 °C,检测波长为 320 nm,PDA 检测器波长扫描范围为 190 ~ 400 nm。

表 2 流动相梯度洗脱程序

t/min	A 水/%	B 乙腈/%
0	95	5
2	95	5
5	88	12
8	88	12

**2.2 对照品溶液与供试品溶液的制备** 对照品溶液的制备:精密称取阿魏酸对照品 7.60 mg,置 100 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶液定容至刻度,摇匀;从中精密吸取 5 mL 至 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶液定容至刻度,摇匀,作为阿魏酸对照品溶液。

供试品溶液的制备:取药材粉末 0.5 g,精密称定,加甲醇 15 mL,超声辅助提取 15 min,过滤,残渣重复提取 1 次,合并滤液;旋转蒸发近干,用 50% 甲醇定容至 5 mL,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液。

### 2.3 色谱条件的优化

**2.3.1 流动相的优化** 通过考察不同比例的甲醇-水、乙腈-水作为流动相,发现以乙腈-水作为流动相

梯度洗脱时的分离效果最好,故确定以乙腈-水作为流动相进行梯度洗脱。

**2.3.2 检测波长的优化** 采用 PDA 检测器在 190 ~ 400 nm 对对照品和样品进行全波长扫描,比较不同波长下的色谱图,发现 320 nm 下的色谱图中阿魏酸峰型较好,基线较平。最终确定检测波长为 320 nm。

**2.4 线性关系考察** 精密吸取阿魏酸对照品溶液 1, 2, 5, 8, 10  $\mu\text{L}$  分别注入 UPLC 色谱仪中,按上述色谱条件测定。以峰面积积分为纵坐标,对照品含量为横坐标绘制标准曲线。计算阿魏酸的回归方程为  $Y = 7.73 \times 10^4 X - 1.84 \times 10^4$  ( $R^2 = 0.9999$ )。线性范围为 0.038 ~ 0.38  $\mu\text{g}$ 。

**2.5 方法学考察**

**2.5.1 精密度实验** 取对照品溶液 1  $\mu\text{L}$ , 注入 UPLC 色谱仪中,连续进样 5 次,测定峰面积积分值,计算阿魏酸峰面积的 RSD% 0.62%。表明阿魏酸的精密度良好。

**2.5.2 稳定性实验** 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 进一样品溶液 1  $\mu\text{L}$ , 测定峰面积积分值,计算阿魏酸峰面积的 RSD% 0.84%。表明阿魏酸在 12 h 内稳定性良好。

**2.5.3 重复性实验** 取同一样品粉末 5 份,每份约 0.5 g,精密称定,按照上述供试品溶液的制备方法制备。取供试品溶液 1  $\mu\text{L}$  注入高效液相色谱仪,测定阿魏酸峰面积积分值,计算 RSD 1.93%。表明阿魏酸重复性良好。

**2.5.4 加样回收率实验** 取已知含量的芦根药材粉末 6 份,每份约 0.25 g,精密称定,分别加入阿魏酸对照品适量,按供试品溶液的制备方法制备。分别取样品供试液 1  $\mu\text{L}$ , 注入 UPLC 色谱仪,测定峰面积积分值,计算阿魏酸的平均回收率为 98.87%, RSD% 1.94%。表明本方法加样回收率良好。

表 3 阿魏酸加样回收率

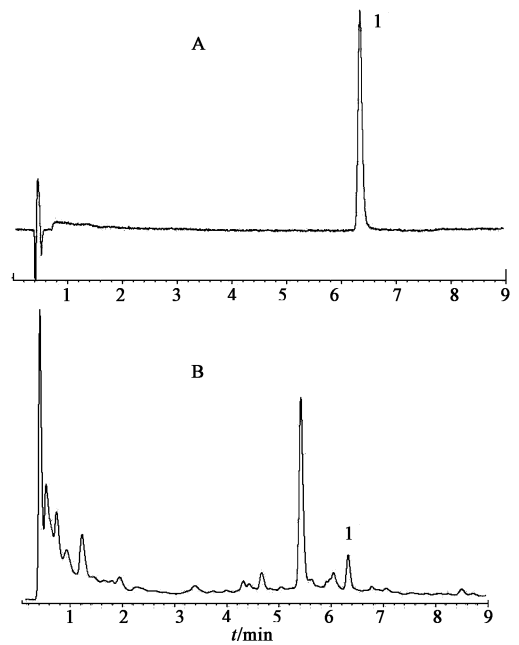
样品粉末 质量 /g	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
0.249 5	0.296 4	98.80	99.87	1.94
0.249 8	0.285 9	95.30		
0.250 2	0.300 4	100.13		
0.250 4	0.295 5	98.50		
0.249 9	0.301 1	100.37		
0.250 0	0.300 4	100.13		

注:加入量均为 0.3000 mg。

**2.6 样品测定** 依次进各供试品溶液 1  $\mu\text{L}$ , 注入 UPLC 色谱仪中,按照前述色谱条件测定峰面积积分值,计算各供试品溶液中阿魏酸的含量,结果见表 4,对照品及样品色谱图见图 1。

表 4 不同采集地芦根样品中阿魏酸含量

No.	采收地点	阿魏酸/%
S1	留通村	0.061 3
S2	赵北口镇	0.049 8
S3	中七里庄村	0.064 9
S4	西大坞	0.168 8
S5	东淀头村	0.121 1
S6	王家寨村	0.169 4
S7	邸庄村	0.132 3
S8	梁沟村	0.053 8
S9	李广村四村	0.055 7
S10	邵庄子村	0.051 0



A. 对照品; B. 样品; 1. 阿魏酸

图 1 芦根 HPLC

**3 讨论**

测定结果的比较发现,不同采集地的芦根中阿魏酸的含量差异较大,其中赵北口镇的芦根样品含量最低,为 0.049 8%,王家寨村的芦根样品含量最高,为 0.168 8%。本地区芦根人工种植较少,多为野生环境下自然生长,生长年限难以确定,推测其原因,可能由于不同采集地点的芦根样品水分、光照等

生长环境不同,以及生长年限的差异造成样品中阿魏酸含量差异较大,提示芦根药材应用过程中应注意有效成分含量的差别,对临床疗效所产生的影响。

本文所建立的芦根中有效成分阿魏酸的含量测定方法快速、准确,与传统的高效液相含量测定方法相比,样品运行时间大大缩短,峰形与分离度均较好。

#### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010: 152.

[2] 张福生,陈学玉. 芦根冲剂防治感冒效果观察 [J]. 长治医学院学报, 1994,5(1): 86.

[3] 毛伟松. 芦根贝母汤治疗小儿急性支气管炎 [J]. 现代中西医结合杂志, 2004,13(11): 1442.

[4] 曾立昆. 大剂干芦根治疗肺脓疡 [J]. 浙江中医杂志, 1995, (2): 87.

[5] 杨秀春. 大黄加芦根治疗急性扁桃腺炎 53 例 [J]. 中国航天医药杂志, 2002,4(2): 32.

[6] 曾志,杨东晖,陶敬奇,等. 高效液相色谱指纹图谱在中药芦根上的应用 [J]. 分析化学, 2004, 32(8): 1035.

[7] 陈纯,康志英. 不同产地芦根 hplc 指纹图谱研究 [J]. 湖南中医杂志, 2008,24(4): 102.

[8] 曾志,张艳萍,李核,等. 芦根液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中成药, 2005,27(4): 373.

[9] 代雪平,宋汉敏,李振国. HPLC 法测定不同产地芦根中阿魏酸的含量 [J]. 中医研究, 2010, 23(9): 26.

[10] ZHOU D-Y, ZHANG X-L, XU Q, et al. UPLC/Q-TOFMS/MS as a powerful technique for rapid identification of polymethoxylated flavones in *Fructus aurantii* [J]. *J Pharm Biomed Ana*, 2009,50(1): 2.

[11] LI L, XU L, PENG Y, et al. Simultaneous determination of five phenylethanoid glycosides in small-leaved *Kudingcha* from the *Ligustrum genus* by UPLC/PDA [J]. *Food Chem*, 2012,131(4): 1583.

[12] NOV KOV L, MATYSOV L, SOLICH P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis [J]. *Talanta*, 2006,68(3): 908.

[13] JIN Y, XUE X, SHI H, et al. HPLC and UPLC switch for TCM analysis [J]. *World Science and Technology*, 2008,10(1): 80.

[14] 杨义芳. 中药有效成分提取分离新技术的研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2008,4(7): 29.

[15] 甘宾宾,蔡卓,蒋世琼,等. 超高效液相色谱在现代分析检验中的应用进展 [J]. 中国卫生检验杂志, 2008,18(5): 955.

[16] 程再兴,严通萌,陈红,等. UPLC 测定半夏中胡芦巴碱的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 85.

[17] 卢林,吴君金,马强,等. UPLC 研究白虎汤不同配伍对芒果苷含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(9): 21.

[18] 单玲玲,靳光乾,刘善新. UPLC、RRLC 及 UFLC 在中药质量控制中的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2011,26(10): 2340.

[责任编辑 顾雪竹]