

RP-HPLC 法测定金线莲中活性成分阿魏酸

沈廷明¹, 刘知远², 吴仲玉¹, 施小华¹, 吴军军¹, 黄春情¹, 詹绪丹¹

1. 福建省宁德市中医院, 福建 宁德 352100

2. 福建省宁德市食品药品检验检测中心, 福建 宁德 352100

摘要: **目的** 建立测定金线莲中阿魏酸的定量方法, 为金线莲及其相关产品的质量控制在提供科学的方法。**方法** 采用 RP-HPLC 法, 选用 Lanbo-Kromasil-C₁₈ 色谱柱; 以甲醇-1%乙酸溶液 (32:68) 为流动相; 检测波长 321 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温为 25 °C。**结果** 阿魏酸在 36~1 080 ng 与峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.999\ 9$)。平均加样回收率为 99.7%, RSD=2.5%。**结论** 本法简便、快速、准确、重复性好, 可作为金线莲质量控制的方法。

关键词: 金线莲; 高效液相色谱法; 阿魏酸

中图分类号: R917.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2016)06-1003-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.06.016

Determination of active ingredient ferulic acid in *Anoectochilus roxburghii* by RP-HPLC

SHEN Ting-ming¹, LIU Zhi-yuan², WU Zhong-yu¹, SHI Xiao-hua¹, WU Jun-jun¹, HUANG Chun-qing¹, ZHAN Xu-dan¹

1. Ningde Hospital of Traditional Chinese Medicine of Fujian Province, Ningde 352100, China;

2. Fujian province food and drug inspection and Testing Center, Ningde 352100, China

Abstract: Objective To establish a method for determination of the content of ferulic acid in *Anoectochilus roxburghii*. and to provide a scientific method for quality control of *A. roxburghii* and related products. **Methods** The conditions were as follows: reverse phase HPLC and Lanbo-Kromasil-C₁₈ column, methanol-1% acetic acid solution (32 : 68) as mobile phase, detection wavelength of 321 nm, the volume flow rate of 1 mL/min, and column temperature of 25 °C. **Results** Ferulic acid showed good linear relationship in the range of 36 — 1 080 ng ($r = 0.999\ 9$). The average recovery was 99.7%, and the average rate of recovery was RSD = 2.5%. **Conclusion** This method is simple, rapid, accurate, and reproducible, and can be used as an ideal method for the quality control of *A. roxburghii*.

Keywords: *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl; RP-HPLC; ferulic acid

金线莲 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl 是兰科兰属多年生草本植物, 又名金线兰、金蚕、金不换等, 因其叶脉呈金黄色而得名^[1-2]。主要分布于我国广东、广西、福建、江西、四川省; 日本、斯里兰卡、印度、尼泊尔也有分布^[3]。民间有“药王”、“金草”之美誉, 其味甘、微苦, 性平、微寒, 具有清热凉血、祛风利湿、强心、固肾、利尿、平肝、降血压、解毒、止痛、镇咳等功效, 民间多用于治疗咯血、支气管炎、肾炎、膀胱炎、糖尿病、乳糜尿、血尿、风湿性关节炎、小儿急惊风、毒蛇咬伤等, 近年来临床主要用于治疗高血压、糖尿病、心

脏病、肺炎、急慢性肝炎、肾炎等症^[4]。

目前金线莲产业发展迅速, 市场需求量巨大, 福建省政府已将金线莲产业列为十大重点种业创新与产业示范推广工程之一^[5], 如何对金线莲及相关产品的质量进行有效控制已经成为关键问题。阿魏酸是金线莲重要的活性成分之一^[6], 本实验以阿魏酸为定量指标, 建立了含量测定的方法, 为金线莲及其相关产品的质量控制在提供科学依据。

1 材料

日本岛津 LC-2010AHT 高效液相色谱仪; 美国 Lanbo-Kromasil-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5

收稿日期: 2016-08-23

作者简介: 沈廷明 (1975-), 男, 副主任中药师。Tel:(0593)2315799 E-mail:yjk2827300@163.com

μm); KQ5200DB 型数控超声波清洗器 (江苏昆山市超声仪器有限公司); 美国 Millipore SIMS50000 超纯净水器; BP211D 电子分析天平 (北京赛多利斯仪器有限公司, 十万分之一); BS224S 电子分析天平 (北京赛多利斯仪器有限公司, 万分之一)。

阿魏酸对照品由中国食品药品检定研究院提供 (批号 100081-200406); 甲醇为色谱纯 (美国迪马公司), 乙酸、石油醚为分析纯; 水为超纯水。样品由福建各地金线莲种植基地收集, 并经宁德市食品药品检验检测中心刘知远主任中药师鉴定为金线莲 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl, 具体信息见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号	产地	编号	产地
JXL-1	周宁李墩	JXL-10	福鼎太姥山
JXL-2	周宁李墩	JXL-11	福安坂中
JXL-3	周宁李墩	JXL-12	三明永安
JXL-4	宁德古田	JXL-13	福安赛岐
JXL-5	宁德霍童	JXL-14	宁德七都
JXL-6	宁德屏南	JXL-15	福安白云山
JXL-7	宁德支提山	JXL-16	三明永安
JXL-8	寿宁斜滩	JXL-17	漳州南靖
JXL-9	宁德八都		

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Lanbo-Kromasil-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-1%乙酸溶液 (32:68); 体积流量为 1 mL/min; 检测波长为 321 nm^[6]; 进样量 10 μL; 柱温为 25 °C。理论板数按阿魏酸峰计算应不低于 10 000。色谱图见图 1。

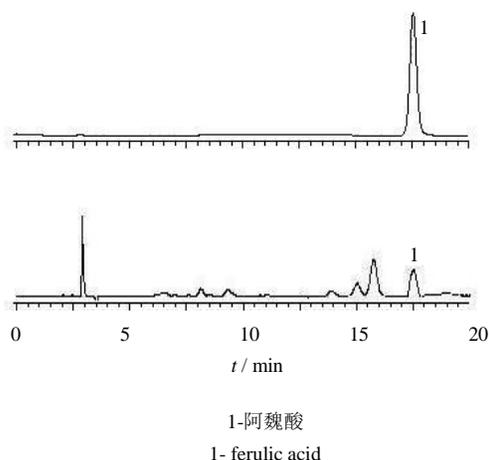


图 1 对照品 (A) 和样品 (B) 色谱图

Fig. 1 Chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

2.2 对照品溶液的制备

精密称取阿魏酸对照品 12 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 溶解摇匀; 精密吸取 3 mL, 置 10 mL 量瓶, 加甲醇至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为 36 μg/mL 的对照品溶液; 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

将金线莲干品粉碎, 过 3 号筛备用。精密称取 2 g, 加入石油醚 20 mL, 置水浴锅中加热回流 30 min, 过滤, 弃去滤液, 挥干残余的石油醚。精密加入 75% 乙醇溶液 25 mL, 称定质量, 静置 25 min。置 70 °C 水浴中超声 (200 W, 40 kHz) 60 min, 放置至室温, 补足损失的质量, 滤过, 再过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.4 线性关系考察

取对照品溶液按进量 1、5、10、15、20、30 μL 依次进样, 分别测定峰面积, 以峰面积为纵坐标 (Y), 进样量 (X) 为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程: $Y=94\ 224 X+190\ 554$, $r=0.999\ 9$; 表明阿魏酸在进样量 36~1 080 ng 与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取对照品溶液重复进样 6 次, 每次进样量 10 μL, 测定阿魏酸峰面积, 结果 RSD 为 0.6% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取样品 (JXL-1), 按照“2.3”项方法重复制备 6 份供试品溶液, 依次进样 10 μL, 依法测定阿魏酸的量, 结果 RSD 为 2.3% ($n=6$), 表明该法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取样品 (JXL-1), 按照“2.3”项方法制备供试品溶液, 分别于 0、3、6、9、12、15 h 进样 10 μL, 阿魏酸峰面积, 结果峰面积 RSD 为 2.5% ($n=6$), 表明供试品溶液在 15 h 内较稳定。

2.8 加样回收试验

精密称取样品 (JXL-1) 2 g, 共 9 份, 分成 3 组; 精密量取“2.2”项第一步稀释的对照品溶液 0.15、0.3、0.6 mL 分别加入样品中, 按照“2.3”项同法制备供试品溶液, 依次进样 10 μL, 分别测定阿魏酸的量, 结果回收率为 99.7%, RSD 为 2.5%。

2.9 样品测定

取不同产地的样品按照“2.3”项下方法制备供

试液, 分别进样 10 μL , 分别测定峰面积, 计算质量分数, 结果见表 2。

表 2 样品测定结果 ($n = 3$)

Table 2 Results of samples determination ($n = 3$)

编号	阿魏酸/%
JXL-1	0.018 1
JXL-2	0.019 5
JXL-3	0.018 4
JXL-4	0.017 7
JXL-5	0.019 4
JXL-6	0.022 6
JXL-7	0.015 7
JXL-8	0.014 6
JXL-9	0.013 9
JXL-10	0.019 6
JXL-11	0.018 7
JXL-12	0.014 0
JXL-13	0.013 8
JXL-14	0.012 3
JXL-15	0.016 7
JXL-16	0.013 3
JXL-17	0.019 5

本实验共收集了 17 批不同产地的样品, 含量测定结果表明: 金线莲中阿魏酸质量分数范围为 0.012 3%~0.022 6%, 平均为 0.016 9%。质量分数最高的是 JXL-6 号样品, 为 0.022 6%; 最低的是 JXL-14 号样品, 为 0.012 3%。不同地域的金线莲阿魏酸含量存在差异, 造成含量高低不同的原因尚有待进一步研究。

3 讨论

3.1 指标性成分的选择

金线莲主要含有多糖、挥发油、黄酮、三萜、甾体、有机酸及其配糖体等成分^[7]。杨秀伟等^[8]采用柱色谱法对金线莲化学成分进行分离、纯化, 用 IR、NMR 和 MS 等方法进行结构鉴定, 证明金线莲含阿魏酸等 10 个化合物。王振等^[9]研究发现阿魏酸具有抑制血小板聚集、抑制 5-羟色胺从血小板中释放、阻止静脉旁路血栓形成、抗动脉粥样硬化、清除自由基、增强免疫功能等多方面药理活性。张娟等^[10]研究发现阿魏酸具有抗血小板凝聚和血栓形成、清除亚硝酸盐、氧自由基、过氧化亚硝基、抗菌消炎、抗肿瘤、抗突变、增强免疫功能、增强精子活力和运动性等。另外, 阿魏酸具有核心结构——对羟基苯丙烯酸, 以其为先导化合物设计合成新型阿魏酸衍生物, 已经初步研究证明了其抗炎活性及心血管安全性^[11]。因此本实验以阿魏酸为定量成分。

3.2 提取方法的选择

阿魏酸易溶于乙醇, 难溶于石油醚^[12]。通常植物体细胞表面都含有脂质^[13], 因此先用石油醚加热回流, 去除细胞表面的脂质, 以便于下一步的提取。提取方法采用正交法进行优选, 分别用 50%、75%、95% 的乙醇, 提取温度分别为 50、70、90 $^{\circ}\text{C}$, 时间分别为 30、45、60 min, 选用 $L_9(3^4)$ 正交表格, 结果最佳提取方法为: 提取溶剂为 75% 乙醇溶液, 温度 70 $^{\circ}\text{C}$, 时间 60 min。

3.3 流动相的选择

阿魏酸的化学结构为 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸, 是桂皮酸的衍生物之一, 呈酸性, 因此应使用酸性的流动相。通过对甲醇和不同浓度的乙酸及磷酸进行比较, 发现甲醇-1% 乙酸溶液 (32:68) 流动相系统色谱峰峰形最好, 且保留时间较为理想。

质量控制是中药开发利用的关键, 本方法简便、快速、准确、重复性好, 可作为金线莲及其相关产品质量控制的理想方法。

参考文献

- [1] 杨春勇, 李 戈, 王艳芳, 等. 福建金线莲 DALP 遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2014, 45(19): 2824-2828.
- [2] 沈廷明, 刘知远, 吴仲玉, 等. ICP-MS 法测定金线莲中 5 种重金属元素 [J]. 中草药, 2016, 47(8): 1405-1408.
- [3] 中国科学院北京植物研究所. 中国高等植物图鉴 (第 5 册) [M]. 北京: 科学出版社, 1976.
- [4] 关 景, 王春兰, 郭顺星. 福建产金线莲中黄酮苷成分的研究 [J]. 中草药, 2005, 36(10): 1450-1453.
- [5] 林晓红. 福建南靖金线莲产业发展的优势、问题及对策 [J]. 亚热带植物科学, 2013, 42(1): 82-85.
- [6] 中国药典 [S]. 2015 年版. 一部. 40.
- [7] 吴丽丽, 梁 燕, 许光辉. 金线莲化学成分、药理作用及临床应用研究概述 [J]. 海峡药学, 2014, 26(10): 34-36.
- [8] 杨秀伟, 韩关华, 靳颜平, 等. 金线莲化学成分的研究 [J]. 中药材, 2007, 30(7): 797-800.
- [9] 王 振, 刘新永, 王 静, 等. 川芎嗪阿魏酸类化合物药理作用的研究进展 [J]. 齐鲁药事, 2011, 30(11): 665.
- [10] 张 娟, 金青哲, 王兴国. 阿魏酸及其衍生物合成及药理研究进展 [J]. 粮食与油脂, 2007, 20(1): 43-45.
- [11] 毛近隆, 林翠霞, 周洪雷, 等. 新型阿魏酸衍生物的合成及药理活性研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2014, 38(3): 260-269.
- [12] 齐 文, 王莉莉, 温 浩, 等. 辽细辛根及根茎化学成分的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(9): 144-146.
- [13] 种 康, 王 台, 钱 前, 等. 2014 年中国植物科学若干领域重要研究进展 [J]. 植物学报, 2015, 50(4): 412-415.