

# HPLC法同时测定不同配伍比例三棱-莪术药对中P-香豆酸、阿魏酸的含量<sup>Δ</sup>

李 洋\*, 季方茹, 潘洪秀, 宗希明, 缪月英, 杨 铭, 丁立新<sup>#</sup>(佳木斯大学药学院/黑龙江省生物药制剂重点实验室, 黑龙江 佳木斯 154007)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)27-3859-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.27.32

**摘要** 目的:建立同时测定三棱-莪术药对中P-香豆酸、阿魏酸含量的方法,探讨不同比例药对中二者含量的变化。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent 20RBAX XDB-C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.1%冰醋酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为266 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:P-香豆酸、阿魏酸检测质量浓度线性范围分别为4.218 6~21.093 μg/mL( $r=0.999\ 8$ )、1.836 0~9.180 μg/mL( $r=0.999\ 9$ );精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为98.72%~100.30%(RSD=0.18%, $n=9$ )、99.11%~100.45%(RSD=0.46%, $n=9$ )。三棱-莪术药对4个配伍比例(1:1、2:1、1:2、1:0, $m/m$ )中,三棱-莪术比例( $m/m$ )为2:1时P-香豆酸、阿魏酸含量最高。结论:该方法操作简便,精密度、稳定性、重复性好,可用于三棱-莪术药对中P-香豆酸、阿魏酸含量的同时测定;该药对中三棱-莪术比例( $m/m$ )为2:1时主要有效成分含量最高。

**关键词** 高效液相色谱法;三棱-莪术;药对;P-香豆酸;阿魏酸;含量测定

## Simultaneous Determination of *P*-coumaric Acid and Ferulic Acid in Different Compatibility Proportions of the Couple of *Sparganium stolon*i and *Curcuma aeruginosa* by HPLC

LI Yang, JI Fangru, PAN Hongxiu, ZONG Ximing, MIAO Yueying, YANG Ming, DING Lixin (Pharmaceutical School of Jiamusi University/Heilongjiang Province Key Lab of Biological Medicine Preparation, Heilongjiang Jiamusi 154007, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of *P*-coumaric acid and ferulic acid in the couple of *Sparganium stolon*i and *Curcuma aeruginosa*, and to investigate rational proportion of the couple. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent 20RBAX XDB-C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 266 nm, and the column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges of *P*-coumaric acid and ferulic acid were 4.218 6-21.093 μg/mL ( $r=0.999\ 8$ ), 1.836 0-9.180 μg/mL ( $r=0.999\ 9$ ), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%. The recoveries were 98.72%-100.30% (RSD=0.18%,  $n=9$ ), 99.11%-100.45% (RSD=0.46%,  $n=9$ ). Among 4 compatibility proportions of the couple of *S. stolon*i and *C. aeruginosa* (1:1, 2:1, 1:2, 1:0,  $m/m$ ), the dissolution rate of *P*-coumaric acid and ferulic acid were the highest when the ratio of *S. stolon*i-*C. aeruginosa* ( $m/m$ ) was 2:1. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, stable and reproducible, and can be used for content determination of *P*-coumaric acid and ferulic acid in the couple of *S. stolon*i and *C. aeruginosa*. when the proportion of the couple of *S. stolon*i and *C. aeruginosa* is 2:1 and the contents of *P*-coumaric and ferulic acid are the highest, the contents of main effective components are the highest.

**KEYWORDS** HPLC; *Sparganium stolon*i-*Curcuma aeruginosa*; Couple; *P*-coumaric acid; Ferulic acid; Content determination

三棱、莪术为活血化瘀中药配伍中最常用的药对<sup>[1-3]</sup>。二者配伍最早出自《经验良方》三棱丸,两药以等量配伍,气血兼顾,活血祛瘀、行气止痛、化积消癥之力增强<sup>[4-7]</sup>;现两味药材常用配伍比例( $m/m$ )为1:1~4:1<sup>[8]</sup>。目前两味药材作为单味药进行化学成分研究和药理毒理研究较多<sup>[9-10]</sup>,而不同配伍比例后的物质基础研究则相对薄弱,尤其是建立药对的质量控制方法方面<sup>[11-12]</sup>。

Δ 基金项目:佳木斯大学基础研究类项目(No.JMSUJCMS2016-035)

\* 硕士研究生。研究方向:中药分析。电话:0454-8610758

# 通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:天然产物分离、分析。E-mail:DLX200475@163.com

2015年版《中国药典》(一部)未见三棱含量的测定<sup>[13]</sup>,根据文献资料显示,三棱中P-香豆酸、阿魏酸为其主要活性成分<sup>[14-15]</sup>;同时,也未见不同配伍比例三棱-莪术药对含量测定的报道。为此,本试验建立了采用高效液相色谱法(HPLC)测定三棱-莪术药对中P-香豆酸、阿魏酸的含量,通过优化色谱条件和样品处理的方法,快速、准确地测定不同配伍比例三棱-莪术药对中P-香豆酸、阿魏酸的含量变化,为三棱-莪术药对质量控制提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1100型HPLC仪,包括G1311A四元泵、G1379A真空再线脱气机、G1315DAD检测器、G1316A柱温箱(美国Agilent公司);FW177型中药粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司)。

## 1.2 试剂

*P*-香豆酸对照品(批号:50198436,纯度:>99.8%)、阿魏酸对照品(批号:07739910,纯度:>99.8%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

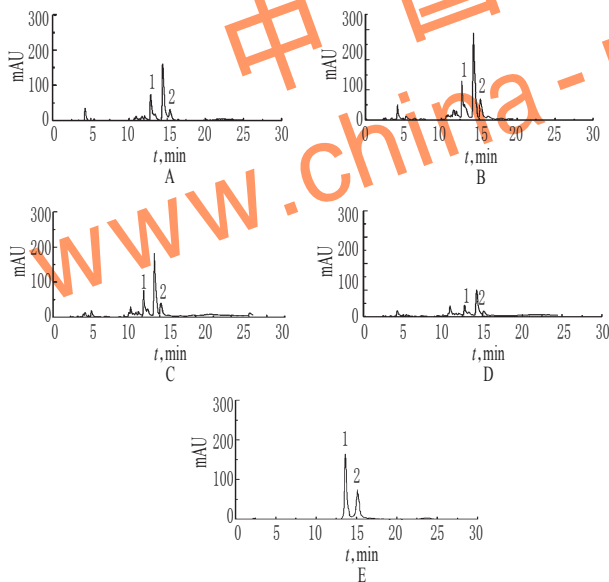
## 1.3 药材

莪术、三棱药材购于佳木斯市金天药店,经佳木斯大学药学院药学实验中心宗希明高级实验师鉴定为真品。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性考察

色谱柱:Agilent 20RBAX XDB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%冰醋酸溶液(B),梯度洗脱(0~5 min,5% A;5~15 min,20% A;15~35 min,100% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:266 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。在上述色谱条件下,理论板数以*P*-香豆酸、阿魏酸峰计均>3 000;对称因子均在0.95~1.05之间;各成分基线分离良好,分离度均>1.5,详见图1。



A.供试品1[三棱-莪术(1:1,m/m)];B.供试品2[三棱-莪术(2:1,m/m)];C.供试品3[三棱-莪术(1:2,m/m)];D.供试品4[三棱-莪术(1:0,m/m)];E.混合对照品;1.*P*-香豆酸;2.阿魏酸

A.test sample 1[*S. stoloni-C. aeruginosa*(1:1,m/m)]; B.test sample 2[*S. stoloni-C. aeruginosa*(2:1,m/m)]; C.test sample 3[*S. stoloni-C. aeruginosa*(1:2,m/m)];D.test sample 4[*S. stoloni-C. aeruginosa*(1:0,m/m)];E.mixed control; 1.*P*-coumaric acid; 2.ferulic acid

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

## 2.2 溶液的准备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取待测成分适量,置于同一5 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成*P*-香豆酸、阿魏酸质量浓度分别为0.703 1、0.306 0 g/L的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 按三棱-莪术比例(*m/m*)为1:1、2:1、1:2、1:0分别取莪术、三棱共200 g,置于2 000 mL圆底烧瓶中,加8倍量60%乙醇溶液,回流提取2次,每次2 h,合并提取液,滤过,浓缩,冷冻,干燥得提取物粉末;取粉末适量,置于10 mL量瓶中,加甲醇定容,溶液经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

## 2.3 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.3、0.6、0.9、1.2、1.5 mL,分别置于5 mL量瓶中,加甲醇定容,制成系列对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(*x*,μg/mL)为横坐标、峰面积(*y*)为纵坐标进行线性回归,得*P*-香豆酸、阿魏酸回归方程分别为 $y=1\ 764.2x+231.65$ ( $r=0.999\ 8$ )、 $y=416.43x+86.53$ ( $r=0.999\ 9$ )。结果表明,*P*-香豆酸、阿魏酸检测质量浓度线性范围为4.218 6~21.093、1.836 0~9.180 μg/mL。

## 2.4 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,*P*-香豆酸、阿魏酸峰面积的RSD均为1.1%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

## 2.5 稳定性试验

取“2.2.2”项下混合供试品溶液[三棱-莪术(2:1,m/m)]适量,分别于室温下放置0、2、4、8、16、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,*P*-香豆酸、阿魏酸峰面积的RSD分别为1.0%、1.3%( $n=6$ ),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

## 2.6 重复性试验

精密称取同一批样品[三棱-莪术(2:1,m/m)]适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,*P*-香豆酸、阿魏酸峰面积的RSD分别为0.21%、0.26%( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

## 2.7 加样回收率试验

取已知含量样品[三棱-莪术(2:1,m/m)]适量,共9份,分别加入低、中、高质量的待测成分对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

## 2.8 样品含量测定

表1 加样回收率试验结果( $n=9$ )Tab 1 Results of recovery tests( $n=9$ )

待测成分	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
P-香豆酸	0.102 6	0.218 1	0.169 6	0.382 7	98.72	99.44	0.18
	0.102 8	0.218 5	0.169 6	0.384 8	99.15		
	0.103 0	0.218 9	0.169 6	0.385 9	99.33		
	0.103 4	0.219 8	0.212 6	0.433 8	100.30		
	0.103 5	0.220 0	0.212 6	0.427 5	98.82		
	0.103 4	0.219 8	0.212 6	0.433 2	99.82		
	0.103 2	0.219 4	0.255 2	0.474 4	99.97		
	0.103 3	0.219 6	0.255 2	0.476 5	99.91		
	0.103 4	0.219 7	0.255 2	0.475 8	98.98		
	阿魏酸	0.102 6	0.103 6	0.080 7	0.184 1		
0.102 8		0.103 8	0.080 7	0.184 5	99.11		
0.103 0		0.104 0	0.080 7	0.184 9	100.10		
0.103 4		0.104 4	0.101 0	0.206 4	100.45		
0.103 5		0.104 5	0.101 0	0.205 1	99.78		
0.103 4		0.105 0	0.101 0	0.209 8	100.10		
0.103 2		0.104 2	0.121 2	0.224 8	99.47		
0.103 3		0.104 8	0.121 2	0.225 1	99.40		
0.103 4		0.105 0	0.121 2	0.225 3	99.31		

取药材样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果( $n=6$ , mg/g)Tab 2 Results of content determination of samples ( $n=6$ , mg/g)

三棱-莪术( $m/m$ )	P-香豆酸	阿魏酸
1:1	2.262 7	0.575 7
2:1	2.126 9	1.009 8
1:2	1.731 0	0.793 3
1:0	0.518 1	0.116 4

由表2可知,三棱中的主要成分并未随三棱药材量的增加而增加;当三棱-莪术比例( $m/m$ )为2:1时,P-香豆酸和阿魏酸的含量最高。

### 3 讨论

预试验中,笔者比较了超声和回流提取方法制备供试品溶液的差别,结果显示回流提取结果优于超声提取结果,故采用回流提取方法。笔者分别采用了甲醇-水、乙腈-水作为流动相,结果显示甲醇-水作为流动相时出峰较慢且分离度不理想,乙腈-水作为流动相虽然能全部分离,但是组分峰有拖尾现象,故分别在水相中加入甲酸、磷酸、冰醋酸作为改性剂,通过比较发现加入冰醋酸后峰形较好;并进一步考查冰醋酸的用量,结果显示乙腈-0.1%冰醋酸溶液作为流动相,组分完全分离,且峰形好,出峰快。由于中药药对成分复杂,因此试验采用梯度洗脱。

本研究药对不同配伍比例中的含量变化结果表明,

三棱中主要成分并未随三棱药材量的增加而增加,同时与传统方剂三棱丸中三棱-莪术比例( $m/m$ )为1:1比较,三棱-莪术比例( $m/m$ )为2:1时,P-香豆酸和阿魏酸的总含量最高。但三棱-莪术不同配伍比例时其他成分含量的考察及药效学研究有待进一步探讨。

### 参考文献

- [1] 杨亚, 盛元. 方剂配伍影响复方化学成分的研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2012, 12(5): 699-706.
- [2] 朱凤妹, 杜彬, 李军, 等. 利用GC-MS技术分析三棱莪术挥发油化学成分[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(2): 53-256.
- [3] 余成浩, 彭腾, 杜浩, 等. “三棱-莪术”组分配伍对大鼠子宫肌瘤的影响[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(3): 104-107.
- [4] 余成浩, 孙涛, 冯业琼, 等. 三棱-莪术关联子宫肌瘤的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(6): 1493-1494.
- [5] 李冀, 晓琳. 药对与方剂配伍的关系[J]. 中医药信息, 2005, 22(1): 30-31.
- [6] 袁柱婷, 长民, 姜学连, 等. 三棱-莪术抗大鼠免疫性肝纤维化研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(12): 929-932.
- [7] 赵晓威, 尚尔寿. 三棱莪术汤为主治疗肝硬化腔水40例[J]. 中医药导报, 2001, 7(12): 590-600.
- [8] 商洪才, 张伯礼, 高秀梅. 方剂配伍研究探讨[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(7): 6-9.
- [9] 刘珊, 蒋琳兰, 谢新民, 等. HPLC法同时测定氯苯醇溶液中氯霉素和盐酸苯海拉明的含量[J]. 中国药房, 2016, 27(27): 3847-3849.
- [10] 段金殿, 宿树兰, 唐于平, 等. 中药药对配伍组合的现代认识[J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25(5): 330-333.
- [11] 孔丽娟, 梁侨丽, 吴启南, 等. 黑三棱的化学成分研究[J]. 中草药, 2011, 42(3): 440-442.
- [12] 谢永忠, 夏泉. 高效液相色谱法测定莪术中吉马酮的含量[J]. 中国药房, 2005, 16(6): 461-462.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 13.
- [14] 董学, 姚庆强. 中药三棱的化学成分及药理研究进展[J]. 齐鲁药事, 2005, 24(10): 612-614.
- [15] Wu H, Feng RH, Guan SG, et al. Rapid preparative isolation of a new phenylpropanoid glycoside and four minor compounds from Sparganium stoloniferum using high-speed counter-current chromatography as a fractionation tool[J]. J Sep Sci, 2012, 35(9): 1160-1166.

(收稿日期: 2016-10-05 修回日期: 2016-12-01)

(编辑: 张 静)