

中图分类号: R932; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)21-0083-04  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.21.018



# 高效液相色谱法同时测定马兰中香草酸、阿魏酸和芹菜素含量\*

杨宇, 江忠敏, 倪玲, 王加虎, 杨泽荣, 刘淑琼, 张美<sup>△</sup>

(云南中医药大学中药学院, 云南昆明 650500)

**摘要:**目的 建立同时测定马兰中香草酸、阿魏酸和芹菜素含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Supersil ODS2 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 5 μL。结果 香草酸、阿魏酸和芹菜素质量浓度分别在 0.198~13.860 μg/mL、1.500~105.000 μg/mL、2.010~140.700 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好( $r=0.999\ 6, 0.999\ 6, 0.999\ 7, n=5$ ); 平均加样回收率分别为 97.53%, 101.30%, 101.82%, RSD 分别为 2.73%, 2.08%, 2.59% ( $n=6$ ); 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 4% ( $n=5$ )。结论 该方法操作简便、结果准确可靠, 可用于马兰中香草酸、阿魏酸和芹菜素的含量测定。

**关键词:** 高效液相色谱法; 马兰; 香草酸; 阿魏酸; 芹菜素; 含量测定

## Content Determination of Vanillic Acid, Ferulic Acid and Apigenin in *Kalimeris Indica* by HPLC

YANG Yu, JIANG Zhongmin, NI Ling, WANG Jiahu, YANG Zerong, LIU Shuqiong, ZHANG Mei

(College of Pharmaceutical Science, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming, Yunnan, China 650500)

**Abstract: Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of vanillic acid, ferulic acid, and apigenin in *Kalimeris indica*. **Methods** The chromatographic column was Supersil ODS2 column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.1% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 5 μL. **Results** The linear ranges of vanillic acid, ferulic acid, and apigenin were 0.198-13.860 μg/mL, 1.500-105.000 μg/mL, and 2.010-140.700 μg/mL ( $r=0.999\ 6, 0.999\ 6, 0.999\ 7, n=5$ ), respectively. The average recoveries of vanillic acid, ferulic acid, and apigenin were 97.53%, 101.30%, and 101.82%, with RSDs of 2.73%, 2.08%, and 2.59% ( $n=6$ ), respectively. The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 4% ( $n=5$ ). **Conclusion** The established method is simple, accurate and reliable, which can be used for the content determination of vanillic acid, ferulic acid, and apigenin in *Kalimeris indica*.

**Key words:** HPLC; *Kalimeris indica*; vanillic acid; ferulic acid; apigenin; content determination

马兰 *Kalimeris indica* (L.) Sch - Bip 为菊科马兰属植物的干燥带根全草, 广东、福建称为田边菊、路边菊, 四川、贵州、广西、湖北称为泥鳅菜、泥鳅串, 云南称为蓑衣莲, 具有清热解毒、消食积、利小便、散瘀止血功效。马兰营养价值丰富, 含多种维生素、氨基酸及矿物质, 幼叶通常作为蔬菜食用<sup>[1-3]</sup>; 含有黄酮类、三萜类、酚类、挥发油、生物碱等化学成分, 具有抗菌、抗炎、镇痛、抗肿瘤、抗氧化、保肝、镇咳、中枢抑制等多种药理学作用<sup>[4-7]</sup>。本研究中建立了同时测定不同产地马兰中香草酸、阿魏酸和芹菜素含量的高效液相色谱(HPLC)法, 以更好地控制马兰的质量, 为进一步合理开发和利用马兰提供科学依据。现报道如下。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪及 Waters 2998PDA 型检测器(沃特世科技 <上海> 有限公司); SK3300H 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司, 功率为 180W, 频率为 53 kHz); Sartorius BS224S 型电子天平(赛多利斯科学仪器 <北京> 有限公司, 精度为万分之一); Milli-Q 型超纯水制水机(美国 Millipore 公司)。

### 1.2 试剂

香草酸对照品(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司, 批号为 DRE-C17900500E, 含量不低于 98%); 阿魏酸对照品(成都普利斯生物科技有限公司, 批号为 2021092201, 含量不低于 98%); 芹菜素对照品(成都德思特生物技

\* 基金项目: 国家自然科学基金[82160748]; 云南省科技计划项目[202001AZ070001-043]; 云南省“兴滇英才支持计划”青年人才专项资助项目。

第一作者: 杨宇, 女, 博士研究生在读, 研究方向为中药材质量、药效评价, (电子信箱)1508115692@qq.com。

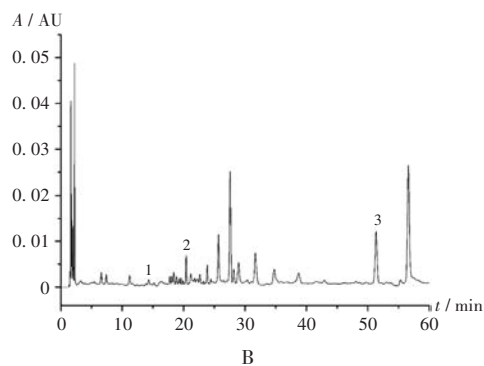
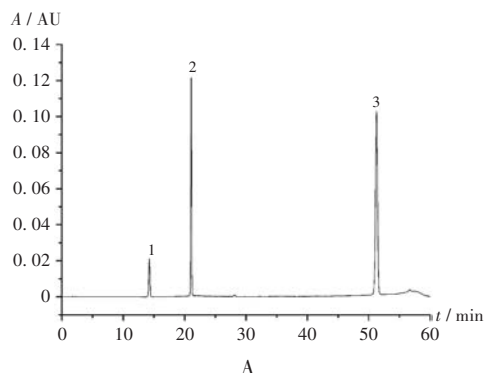
<sup>△</sup>通信作者: 张美, 女, 博士研究生, 副教授, 研究方向为中药材质量、药效评价, (电子信箱)meizhang213@163.com。

术有限公司,批号为DSTDQ002602,含量不低于98%);甲醇(BCR International Trading Inc.,批号为0212190802);磷酸(分析纯,天津市风船化学试剂有限公司,批号为20100606);水为超纯水;马兰采自云南保山、云南昭通、云南昆明、云南丽江、云南楚雄、云南曲靖、四川泸州、贵州安顺、江西吉安,批号分别为202008A1-202008A9),经云南中医药大学李学芳教授鉴定均为正品,干燥后置密封袋中于阴凉干燥处保存,备用。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Supersil ODS2柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A) - 0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min时85%B → 80%B, 10~20 min时80%B → 60%B, 20~40 min时60% → 55%B, 40~55 min时55%B → 45%B, 55~60 min时45%B → 80%B);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:30℃;进样量:5 μL。理论板数以香草酸、阿魏酸、芹菜素计均不低于4 000。在此色谱条件下的色谱图见图1。



1. 香草酸 2. 阿魏酸 3. 芹菜素  
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Vanillic acid 2. Ferulic acid 3. Apigenin  
A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

### 2.2 溶液制备

取香草酸、阿魏酸、芹菜素对照品各适量,精密称定,置100 mL干燥洁净的容量瓶中,加甲醇溶解并定容,充分摇匀,得香草酸、阿魏酸、芹菜素质量浓度分别

为19.8, 150, 201 μg/mL的混合对照品溶液。

分别取不同产地马兰的干燥药材粉碎,过250 μm药筛,取样品粉末1 g,精密称定,置100 mL锥形瓶中,加甲醇30 mL,超声提取40 min,取出,放冷,充分摇匀,抽滤,在滤渣中加甲醇20 mL,再次超声提取20 min,充分摇匀,抽滤,合并2次滤液,浓缩,干燥,加甲醇充分溶解并定容至5 mL,0.22 μm微孔有机滤膜滤过,取滤液,即得供试品溶液。

### 2.3 方法学考察

线性关系考察:分别精密吸取2.2项下混合对照品溶液0.1, 0.5, 1, 2, 7 mL,分别转移至10 mL容量瓶中,加甲醇定容,制成香草酸质量浓度分别为0.198, 0.990, 1.980, 3.960, 13.860 μg/mL,阿魏酸质量浓度分别为1.500, 7.500, 15.000, 30.000, 105.000 μg/mL,芹菜素质量浓度分别为2.010, 10.050, 20.100, 40.200, 140.700 μg/mL的系列混合对照品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,以香草酸、阿魏酸、芹菜素的质量浓度( $X$ , μg/mL)为横坐标、峰面积为纵坐标( $Y$ )进行线性回归,得回归方程 $Y_{香} = 15\ 649X_{香} + 3\ 348.3$  ( $r = 0.999\ 6, n = 5$ ),  $Y_{阿} = 7\ 648.7X_{阿} + 3\ 499.3$  ( $r = 0.999\ 6, n = 5$ ),  $Y_{芹} = 10\ 322X_{芹} + 3\ 652.1$  ( $r = 0.999\ 7, n = 5$ )。结果表明,香草酸、阿魏酸、芹菜素的质量浓度分别在0.198~13.860 μg/mL、1.500~105.000 μg/mL、2.010~140.700 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取2.2项下混合对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定5次,记录峰面积和保留时间。结果香草酸、阿魏酸、芹菜素峰面积的RSD分别为1.22%, 0.11%, 0.12% ( $n = 5$ ),保留时间的RSD分别为0.02%, 0.03%, 0.02% ( $n = 5$ ),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批(批号为202008A1)样品1 g,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,于室温条件下放置0, 6, 12, 18, 24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积和保留时间。结果香草酸、阿魏酸、芹菜素峰面积的RSD分别为2.65%, 1.28%, 0.95% ( $n = 5$ ),保留时间的RSD分别为0.11%, 0.10%, 0.04% ( $n = 5$ ),表明供试品溶液在室温放置24 h内稳定性良好。

重复性试验:取同一批(批号为202008A1)样品1 g,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,平行5份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积和保留时间,并计算含量。结果香草酸、阿魏酸、芹菜素的平均含量分别为0.191, 0.890, 15.219 μg/mL,含量RSD分别为3.94%, 3.70%, 1.86% ( $n = 5$ ),保留时间的RSD分别为0.43%, 0.20%, 0.21% ( $n = 5$ ),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为202008A1) 1 g,精密称定,分别加入2.2项下混合对照品溶液适量,平行6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表1。

表1 加样回收试验结果(n=6)

Tab.1 Results of the recovery test(n=6)

成分	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
香草酸	1.157	1.140	2.241	95.09	97.53	2.73
	1.191	1.140	2.276	95.18		
	1.224	1.140	2.354	99.12		
	1.213	1.140	2.341	98.95		
	1.229	1.140	2.317	95.44		
	1.201	1.140	2.357	101.40		
阿魏酸	4.629	4.700	9.444	102.45	101.30	2.08
	4.899	4.700	9.492	97.72		
	4.974	4.700	9.778	102.21		
	4.824	4.700	9.517	99.85		
	4.892	4.700	9.693	102.15		
	4.798	4.700	9.659	103.43		
芹菜素	75.894	75.000	151.311	100.56	101.82	2.59
	76.965	75.000	154.506	103.39		
	77.071	75.000	155.071	104.00		
	77.475	75.000	153.964	101.99		
	78.370	75.000	156.234	103.82		
78.259	75.000	151.112	97.14			

## 2.4 样品含量测定

取9批样品各1 g,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,各3份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果见表2。

表2 样品中香草酸、阿魏酸、芹菜素含量测定结果(% ,n=3)

Tab.2 Results of content determination of vanillic acid, ferulic acid, and apigenin in samples (% ,n=3)

批号	香草酸	阿魏酸	芹菜素
202008A1	1.681	5.399	85.348
202008A2	1.646	11.203	26.950
202008A3	2.663	46.416	-
202008A4	2.775	22.246	12.235
202008A5	3.849	9.769	31.107
202008A6	1.666	25.693	402.352
202008A7	-	9.983	-
202008A8	0.975	16.177	28.715
202008A9	3.888	62.108	-

注: - 为未检出。

Note: - refers to not detected.

## 3 讨论

### 3.1 流动相选择<sup>[8-16]</sup>

为使待测成分均匀流出色谱柱,本研究中采用梯

度洗脱的方式,比较了甲醇-水和甲醇-0.1%磷酸水溶液作为流动相时的色谱图,结果采用甲醇-0.1%磷酸水溶液作为流动相时的色谱峰分离较好,3种待测成分与其他干扰色谱峰分离良好,峰形较好。故选择此流动相进行梯度洗脱。

### 3.2 指标性成分选择

马兰化学成分丰富,其中黄酮类化合物是马兰的活性成分之一,具有止咳、祛痰、平喘、抗菌等作用,芹菜素是马兰主要的黄酮类成分之一。马兰还含有酚酸类成分阿魏酸和香草酸,阿魏酸具有抗氧化、抗炎、抗凝、解毒、肝脏保护、免疫调节等作用;香草酸在体内具有改善血糖、血压及保护肝脏、肾脏、心脏功能等生物活性<sup>[15-19]</sup>。故选择芹菜素、香草酸和阿魏酸作为含量测定的指标性成分。马兰中香草酸、阿魏酸、芹菜素的含量受产地影响较大,这可能与药材的生长地理位置、环境气候等因素有关。

### 3.3 方法评价

本研究所建立的方法操作简便、结果准确可靠,可用于同时测定马兰中香草酸、阿魏酸、芹菜素的含量。

### 参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(第七册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:886-889.
- [2] 刘跃钧,姜根平,兰冬香,等. 野生马兰研究开发现状概述[J]. 中药材,2011,34(6):992-996.
- [3] 邓 曦,王 林,杨海涛. 马兰的研究进展[J]. 广东化工,2016,43(9):132-133.
- [4] 周小伟. 马兰和绣毛千斤拔的化学成分研究[D]. 昆明:云南中医学院,2017.
- [5] 张 美,周小伟,张雨馨,等. 中药马兰化学成分与药理作用的研究进展[J]. 中国医药导报,2018,15(31):47-52.
- [6] 黄兴龙,刘 珏,熊 峰,等. 菊科植物马兰草化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国药物化学杂志,2022,32(6):477-493.
- [7] 李 嘉,高 玲,陈晓兰,等. 基于AQP8和线粒体细胞凋亡途径相关性探讨马兰草乙醇提取物对活化的大鼠肝星细胞HSC-T6体外增殖和凋亡的影响[J]. 中华中医药学刊,2021,39(4):145-150.
- [8] 张聪俾,钟文武,吴培云,等. 高效液相色谱法测定马兰中大黄酸、大黄素及大黄酚的含量[J]. 安徽中医学院学报,2012,31(5):65-68.
- [9] 汪跃峰,刘劲松,钟文武,等. 高效液相色谱法测定马兰中大黄素的含量[J]. 安徽医药,2013,17(3):393-394.
- [10] 谢 浪,李 嘉,陈晓兰,等. 紫外分光光度法测定贵州马兰总蒽醌含量[J]. 贵州科学,2018,36(2):16-20.
- [11] 王国凯,刘劲松,朱莉莉,等. 马兰多糖的含量测定[J]. 安徽中医学院学报,2013,32(6):84-85.