

文章编号:1000-5471(2011)02-0104-04

# HPLC 法同时测定石韦药材中绿原酸、芒果苷和木犀草素的质量浓度<sup>①</sup>

李玉华<sup>1</sup>, 彭敬东<sup>2</sup>, 郑敏<sup>2</sup>, 张珍元<sup>2</sup>

1. 毕节学院 化学系, 贵州 毕节 551700; 2. 西南大学 化学化工学院, 重庆 400715

**摘要:** 建立了一种反相高效液相色谱法, 同时分离石韦药材中绿原酸、芒果苷和木犀草素, 并测定其质量浓度. 采用超声优化提取石韦的有效成分: Phenomenex Gemini 5  $\mu\text{m}$  C<sub>18</sub> (150 $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱, 甲醇-冰乙酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速为 0.8 mL/min; 并用波长程序进行检测, 柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ , 外标法定量. 结果表明, 绿原酸、芒果苷、木犀草素的线性范围分别为 0.084~40.00, 0.084~40.00, 0.084~13.33  $\mu\text{g/mL}$  ( $R>0.999$ ), 平均回收率为 96.3%~97.8%, 相对标准偏差小于 2.16%.

**关键词:** 反相高效液相色谱法; 石韦; 绿原酸; 芒果苷; 木犀草素

**中图分类号:** O657.7<sup>+</sup>2

**文献标志码:** A

石韦(*Pyrrhosia lingua*)为水龙骨科植物, 别名为石兰、石剑; 主要分布于长江以南各省, 普遍野生于林木下岩石或净泥土中; 其味苦、甘, 性微寒, 有利尿通淋, 清肺止血的功能<sup>[1]</sup>, 常用于小便不利、血淋、尿血等<sup>[2]</sup>, 民间用于治疗急慢性肾炎、肾盂肾炎、支气管炎<sup>[3]</sup>. 药理研究表明, 石韦水煎浓缩液及提取物经动物实验均有镇咳及祛痰作用, 对于因化学疗法及放射疗法引起的白细胞下降, 有使其升高的作用, 并有抗单纯性疱疹病毒作用<sup>[4-5]</sup>. 石韦含有多种生物活性物质, 已有的研究报道了石韦含有香草酸、原儿茶酸、芒果苷、延胡索酸、木犀草素、绿原酸等多种化学成分<sup>[6-7]</sup>. 其中, 有文献报道芒果苷具有良好的止咳、化痰平喘、抗炎、抗病毒、调节免疫、退热作用<sup>[8]</sup>, 能抑制肝癌细胞、结肠癌细胞、白血病 K562 细胞等肿瘤细胞的生长<sup>[9-11]</sup>, 亦能抑制白血病 HJ-60 细胞的增殖, 诱导细胞凋亡<sup>[12]</sup>; 而绿原酸具有广泛的生物活性, 可以有效清除体内的自由基, 具有较强的抑制突变能力, 被认为是癌症的有效防护剂, 也具有较强的抑菌作用, 能利胆、降压、显著增加胃肠蠕动和促进胃液分泌<sup>[13-14]</sup>; 木犀草素具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗突变性、抗病毒和细胞保护作用<sup>[15-16]</sup>, 对白血病细胞、肿瘤细胞和神经元细胞生物学功能有影响<sup>[17]</sup>. 文献<sup>[7, 18]</sup>报道了石韦中单组份含量的测定, 但其测定结果线性范围窄, 灵敏度低. 而采用高效液相色谱法同时测定石韦中绿原酸、芒果苷和木犀草素苷的含量未见报道. 本文采用超声优化条件提取石韦的有效成分, 建立了一种反相高效液相色谱法同时对石韦中绿原酸、芒果苷和木犀草素的质量浓度进行测定, 简化了程序, 节约了时间和试剂, 提高了检测的效率.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Agilent1100 高效液相色谱仪(美国, Agilent 公司), KH-3200B 型超声波清洗器(中国, 昆山禾创超声仪器有限公司), SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(中国, 上海亚荣生化仪器厂), Acculab 电子天平(德国, 赛多利斯股份公司), 涡旋仪 QL-901(中国, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司), pH5-3C 型精密 pH 计(中国,

① 收稿日期: 2010-07-11

作者简介: 李玉华(1966-), 男, 本科, 毕节学院化学系高级实验师, 主要从事天然产物的化学成分分析和方法研究.

上海精密仪器科技有限公司)。

甲醇(色谱纯,中国,天津光复精细化工研究所),冰乙酸(分析纯,中国,重庆博艺化学试剂有限公司),绿原酸、芒果苷和木犀草素对照品(中国,中国药品生物制品检定)。水为二次重蒸馏水,石韦药材购于重庆市北碚心连心大药房(中国,重庆)。

## 1.2 绿原酸、芒果苷和木犀草素的质量浓度的测定

### 1.2.1 对照品溶液的制备

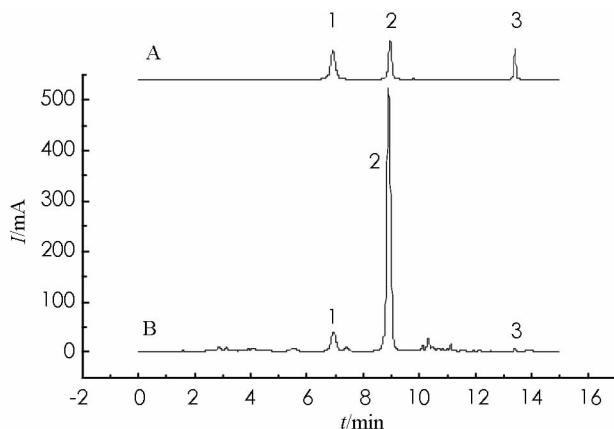
精密称取绿原酸、芒果苷和木犀草素对照品各1 mg,分别置于10 mL容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,配制成100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液,过0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜(中国,天津津腾科技有限公司),置于4  $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱内保存备用。

### 1.2.2 供试品溶液的制备

取石韦药材于45  $^{\circ}\text{C}$ 条件下干燥至恒重,粉碎,过40目筛。精密称取1.000 g,加入10 mL 55%的甲醇,称质量,超声提取40 min,倾出提取液,加入55%的甲醇补充质量。重复提取2次,合并3次滤液,用甲醇定容至50 mL,摇匀,过0.45  $\mu\text{m}$ 滤膜后作为供试品溶液,并置于4  $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱内保存备用。

### 1.2.3 测定色谱条件

测量采用Phenomenex Gemini 5 $\mu\text{m}$  C18 (150 $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )色谱柱,流动相为甲醇-水(冰乙酸调pH值至3.0)。采用梯度洗脱:0~5 min时二者的体积比恒定为30:70;5~12 min时,其体积比线性变化至85:15;12~14 min时,其体积比线性变化至二者的体积比30:70。流速为0.8 mL/min,检测波长在0~10 min时为325 nm,10 min以后为350 nm。柱温为35  $^{\circ}\text{C}$ ,进样量为20  $\mu\text{L}$ 。色谱图见图1。



1. 芒果苷; 2. 绿原酸; 3. 木犀草素。  
A. 对照品色谱图; B. 石韦色谱图。

图1 色谱图

## 2 结果与分析

### 2.1 线性关系试验

精密量取绿原酸、芒果苷和木犀草素对照品储备液(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )来制备不同质量浓度的对照品溶液;精密吸取各溶液20  $\mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,按1.2.3的色谱条件进行试验;以各组分峰面积Y对其质量浓度X( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )进行线性回归分析,得到的回归方程、相关系数、线性范围及其检测限(3 $\sigma$ )(表1)。

表1 3种化合物校正曲线的回归分析

对照品	线性回归方程	相关系数 R	线性范围 $/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	检测下限 $/(\mu\text{g} \cdot \text{L})$
芒果苷	$Y=97.24X-3.33$	0.999 9	0.084~40.00	2.1
绿原酸	$Y=4\,505.70X-72.41$	0.999 9	0.084~40.00	3.4
木犀草素	$Y=1\,798.00X-37.43$	0.999 8	0.084~13.33	5.8

### 2.2 石韦药材中绿原酸、芒果苷和木犀草素的质量浓度

平行测定5次药材供试品。记录其峰面积,由线性方程计算得到绿原酸、芒果苷和木犀草素质量浓度。测定结果见表2。

表2 样品测定结果

组分	质量浓度( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )
芒果苷	2.16
绿原酸	21.92
木犀草素	0.18

注:  $n=5$ 。

### 2.3 精密度试验

取绿原酸、芒果苷和木犀草素对照品混合溶液进行试验,重复5次,每次进样20  $\mu\text{L}$ 。试验结果:芒果

苷的平均峰面积为 153.9, 相对标准偏差(RSD)为 1.68%; 绿原酸的平均峰面积为 196.8, RSD 为 0.62%; 木犀草素的平均峰面积为 127.5, RSD 为 0.11%。结果表明, 绿原酸、芒果苷和木犀草素的峰面积的 RSD 均小于 2%, 方法的精密度良好。

## 2.4 重复性试验

按 1.2.2 方法制备石韦药材供试品溶液 5 份, 分别进样 20  $\mu\text{L}$  进行分析, 记录各组分的峰面积。结果显示, 绿原酸、芒果苷和木犀草素的峰面积的 RSD 分别为 1.06%, 2.93%, 4.03%。表明方法的重复性良好。

## 2.5 稳定性试验

将供试品溶液置室温下放置, 分别在 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 吸取 20  $\mu\text{L}$  进样测定, 各组分的峰面积见表 3。从表 3 可以看出: 各组分的峰面积的 RSD 均小于 5%, 说明在室温下样品在 24 h 内具有良好的稳定性。

表 3 稳定性试验结果

组 分	峰面积						RSD/%
	0 h	2 h	4 h	8 h	16 h	24 h	
芒果苷	573.6	569.5	560.7	575.9	580.2	576.9	1.21
绿原酸	11 393.5	11 432.8	11 475.8	11 486.9	11 452.1	11 534.5	0.42
木犀草素	34.7	34.2	35.1	36.8	35.9	37.1	4.65

注:  $n=5$ 。

## 2.6 加样回收率试验

精密量取已知质量浓度的对照品混合液 5 份, 分别精密地加入适量的绿原酸、芒果苷和木犀草素对照品, 测定样品的平均加样回收率(表 4)。

表 4 方法的回收率试验结果

组 分	原有量的质量浓度	加入量的质量浓度	测得的质量浓度	回收率	RSD
	/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	/%	/%
芒果苷	16.67	4.17	20.15	96.7	1.58
绿原酸	16.67	4.17	20.38	97.8	0.65
木犀草素	16.67	4.17	20.06	96.3	0.23

注:  $n=5$ 。

# 3 结论与讨论

## 3.1 流动相的选择

多数天然化合物成分在 HPLC 测定中易出现拖尾现象, 故在流动相中加入酸, 抑制其拖尾, 以提高峰形对称性。通过对不同比例的有机相及乙酸浓度的实验选择, 发现甲醇-水(用乙酸调节 pH 值至 3.0)系统的分离效果比乙腈-水系统的分离效果好, 故选择甲醇-水(用乙酸调节 pH 值至 3.0)为流动相。并根据这 3 种物质的极性和分离情况, 调整流动相的配比, 采用梯度洗脱。

## 3.2 实验测定波长的选择

扫描各对照品在 200~700 nm 范围内的紫外吸收光谱, 并分析结果。实验选择在 254, 325, 340, 350, 360 nm 处对混合样进行测定, 比较发现在 325 nm 处所测定的绿原酸和芒果苷的峰面积相对较大, 灵敏度较高, 而木犀草素在 350 nm 处所测定的峰面积相对较大。因此本实验采用在 0~10 min 时波长为 325 nm, 在 10 min 以后波长为 350 nm 的程序进行检测。

## 3.3 样品处理方法的选择

目前中药提取方法主要有加热水浴回流提取、索氏提取与超声提取, 其中超声提取具有快速、方便、不需加热、节省时间、提取有效成分含量高等优点<sup>[19]</sup>。故本文采用文献[20]中 10 倍体积的 55% 甲醇作为提取溶剂, 超声提取 40 min, 重复 3 次, 结果发现, 该方法简便, 提取效率高。

## 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: 化学工业出版社, 2005: 61.
- [2] 肖培根. 新编中药志(第 3 卷) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 441.

- [3] 吴金英,孙建宁. 复方石韦片主要药效学试验研究 [J]. 中成药, 2000, 22(6): 428.
- [4] 马晨,周圆,刘爱茹. 高效液相色谱法测定中药石韦2种成分的含量 [J]. 药学学报, 2003, 38(4): 286-289.
- [5] 王自军,杨红兵,齐誉,等. 正交设计石韦总黄酮和鞣质提取工艺 [J]. 时珍国药, 2007, 18(2): 463-464.
- [6] 王楠,王金辉,程杰,等. 有柄石韦的化学成分 [J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(6): 425-427.
- [7] 张亚宁,吴博,杨吉刚,等. HPLC法测定石韦中木犀草素的含量 [J]. 药学实践杂志, 2006, 24(6): 359-361.
- [8] 邓家刚,郑作文,郝二伟,等. 芒果苷片治疗急性支气管炎的药效学研究 [J]. 中成药, 2010, 32(2): 300.
- [9] YOSHIMI N, MATSUNAGA K, KATAYAMA M, et al. The Inhibitory Effects of Mangiferin Anaturally Occurring Glucosylxanthone. In Bowel Carcinogenesis of Male F344 Rats [J]. Cancer Lett, 2001, 163(2): 163-170.
- [10] 黄华艺,农朝赞,郭凌霄,等. 芒果甙对肝癌细胞增殖的抑制和凋亡的诱导 [J]. 中华消化杂志, 2002, 22(6): 341-343.
- [11] 彭志刚,罗军,夏凌辉,等. 芒果甙对白血病 K562 细胞增殖抑制作用的研究 [J]. 广西医科大学学报, 2004, 21(1): 168-170.
- [12] 姚奕斌,彭志刚,刘振芳,等. 芒果苷对白血病 HL-60 细胞周期及 CDC2/CyclinB1 表达的影响 [J]. 中药材, 2010, 33(1): 81-85.
- [13] 马挺军,吕飞杰,台建详,等. 亚贡叶中营养成分和功能性化学成分分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(1): 56-57.
- [14] 谭成玉,胡建恩,王焕弟,等. 植物雅龙果的化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2005, 40(24): 1859-1861.
- [15] FORMICA J V, REGELSON W. Review of the Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids [J]. Food Chem. Toxicol, 1995, 33(12): 1061-1080.
- [16] FOTSIS T, PEPPER M S, AKATAS E, et al. Flavonoids, Dietary-derived Inhibitors of Cell Proliferation and in Vitro Angiogenesis [J]. Cancer Res, 1997, 57(14): 2916-2921.
- [17] LEUNG H W, KUO C L, YANGW H, et al. Antioxidant Enzymes Activity Involvement in Luteolin-induced Human Lung Squamous Carcinoma CH27 Cell Apoptosis [J]. Eur J Pharmacol, 2006, 534(1-3): 12-18.
- [18] 崔岚,李肖玲,祝德水,等. RP-HPLC法测定生物药材中绿原酸的含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(12): 31-32.
- [19] 胡燕,王明亮,邱国福,等. 高效液相色谱法测定茯苓皮的指纹图谱 [J]. 分析科学学报, 2006, 24(6): 636-640.
- [20] 王丽峰. 石韦高效液相指纹图谱研究 [D]. 重庆: 西南大学化学化工学院, 2009: 37-44.

## Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Mangiferin and Luteolin in Pyrrosia Lingua Leaves

LI Yu-hua<sup>1</sup>, PENG Jing-dong<sup>2</sup>, ZHENG Min<sup>2</sup>, ZHANG Zhen-yuan<sup>2</sup>

1. School of Chemistry, College of Bijie, Bijie Guizhou 551700, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** Objective: To separate and determinate chlorogenic acid, mangiferin and luteolin by a reversed-phase high performance liquid chromatography method. Method: Ultrasonic extraction was used to extract the active ingredients of pyrrosia lingua. The column was Phenomenex Gemini 5  $\mu\text{m}$  C18 (150 $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). The mobile phase was a mixture of MeOH-water (adjust to pH 3.0 with CH<sub>3</sub>COOH), and the velocity of flow was 0.8 mL/min, gradient elution. A wavelength program was performed, column temperature was 35  $^{\circ}\text{C}$ . External standard was used. Results: The linearity range was 0.084~40.00, 0.084~40.00, 0.084~13.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $R > 0.999$ ) respectively. The recoveries were 96.3%~97.8%, (RSD < 2.16%). Conclusion: This method was sensitive, accurate, rapid and reproducible. It could be applied to determine the quality of pyrrosia lingua.

**Key words:** reversed-phase high performance liquid chromatography method; pyrrosia lingua; chlorogenic acid; mangiferin; luteolin