

HPLC 测定石韦配方颗粒中绿原酸、咖啡酸及芒果苷的含量

吴怀恩^{1,2}, 劳深¹, 王雯慧¹, 韦韬¹, 黄海燕¹, 林粒梅¹

(1. 广西中医学院药学院, 南宁 530001; 2. 成都中医药大学药学院, 成都 611137)

[摘要] 目的: 建立以高效液相色谱法同时测定石韦配方颗粒中绿原酸、咖啡酸及芒果苷含量的方法。方法: 色谱柱为 Shim-pack VP-ODS 柱(4.6 mm ×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸(9:91); 检测波长 0~30 min 为 323 nm, 30.1~45 min 为 258 nm; 流速为 1.0 mL·min⁻¹。结果: 绿原酸在 129.6~302.4 mg·L⁻¹ ($r=0.9998$) 线性关系良好, 平均回收率为 98.15%, RSD 1.69%; 咖啡酸在 13.8~32.2 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$) 线性关系良好, 平均回收率为 99.93%, RSD 2.98%; 芒果苷在 151.2~352.8 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$) 线性关系良好, 平均回收率为 101.43%, RSD 2.00%。结论: 本法简便、快速、重复性好, 可用于石韦配方颗粒的质量控制。

[关键词] 石韦配方颗粒; 绿原酸; 咖啡酸; 芒果苷; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0054-04

Determination of Chlorogenic Acid, Caffeic Acid and Mangiferin in Shiwei Dispensing Granule by HPLC

WU Huai-en^{1,2}, LAO Shen¹, WANG Wen-hui¹, WEI Tao¹, HUANG Hai-yan¹, LIN Li-mei¹

(1. College of Pharmacy, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China;

2. College of Pharmacy, Chengdu Traditional Chinese Medical University, Chengdu 611137, China)

[Abstract] Objective: To establish an HPLC method for the simultaneously determination of chlorogenic acid, caffeic acid and mangiferin in Shiwei Dispensing Granule. **Method:** Chlorogenic acid, caffeic acid and mangiferin were separated on Shim-pack VP-ODS (4.6 mm ×250 mm, 5 μm) column and detected at 323 nm (0~30 min) and 258 nm (30.1~45 min), with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (9:91) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** Chlorogenic acid, caffeic acid and mangiferin were linear within the range of 129.6~302.4 mg·L⁻¹ ($r=0.9998$), 13.8~32.2 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$) and 151.2~352.8 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$) respectively. The average recovery were 98.15% (RSD 1.69%), 99.93% (RSD 2.98%) and 101.43% (RSD 2.00%). **Conclusion:** The method is simple, reproducible, and it can be used for the quality control of Shiwei Dispensing Granule.

[Key words] Shiwei Dispensing Granule; chlorogenic acid; caffeic acid; mangiferin; HPLC

石韦为水龙骨科植物庐山石韦 *Pyrosia shearerii* (Bak.) Ching, 石韦 *P. lingua* (Thunb.) Farwell 或有柄石韦 *P. petiolosa* (Christ) Ching 的干燥叶, 味甘、苦, 性微寒, 具有利尿通淋、清热止血之功效, 中医临床多用于治疗热淋、血淋、石淋、小便不通、淋漓涩痛, 吐血、衄血、

尿血、崩漏、肺热喘咳等症^[1]。石韦配方颗粒是石韦饮片经水提、浓缩、干燥、制粒等工序制成的单味中药配方颗粒剂, 其性味、归经、功效、成分与原中药饮片基本一致^[2]。石韦药材含有多种活性成分^[3-8], 其中绿原酸、咖啡酸具有抗菌消炎、抗氧化作用; 芒果苷具有抗菌、抗单纯疱疹病毒作用。《中国药典》2005 年版一部仅收载石韦药材中绿原酸的测定方法^[1]。目前, 测定中药材及其制剂中咖啡酸、芒果苷的含量多采用高效液相色谱法^[9-11]。笔者采用高效液相色谱法同时测定石韦配

[收稿日期] 20100613(002)

[第一作者] 吴怀恩, 副教授, 博士研究生, 主要研究方向中药药效物质基础与质量标准化研究, Tel: 0771-3137585, E-mail: wuhe0001@yahoo.com.cn

方颗粒中绿原酸、咖啡酸及芒果苷含量, 为其制剂的质量控制提供一定的科学依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司); LG16-W 型高速离心机(北京医用离心机厂); B3500S-MT 超声清洗仪(上海必能信超声有限公司); 电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂); BP211D 电子分析天平(德国赛多利斯); SHZ-D 循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限公司)。

1.2 试药 石韦配方颗粒(江阴天江药业有限公司, 批号 0902018, 0904015, 0905242); 绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110753-200413); 咖啡酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110885-200102); 芒果苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 111607-200402); 乙腈为色谱纯, 水为高纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Shim-pack VP-ODS(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸(9

91); 检测波长 0 ~ 30 min 为 323 nm, 30.1 ~ 45 min 为 258 nm; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 35 。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取绿原酸对照品、咖啡酸对照品、芒果苷对照品适量, 加 50% 甲醇溶解分别制成 0.215 2, 0.022 96, 0.252 0 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取石韦配方颗粒 0.5 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加 50% 甲醇 10 mL, 密塞, 称定质量, 超声提取 40 min, 放冷, 称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液离心即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 取石韦配方颗粒中所用辅料即药用糊精适量, 按 2.2.2 项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 专属性试验 分别精密吸取上述绿原酸对照品溶液、咖啡酸对照品溶液、芒果苷对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL 进样分析。结果见图 1。

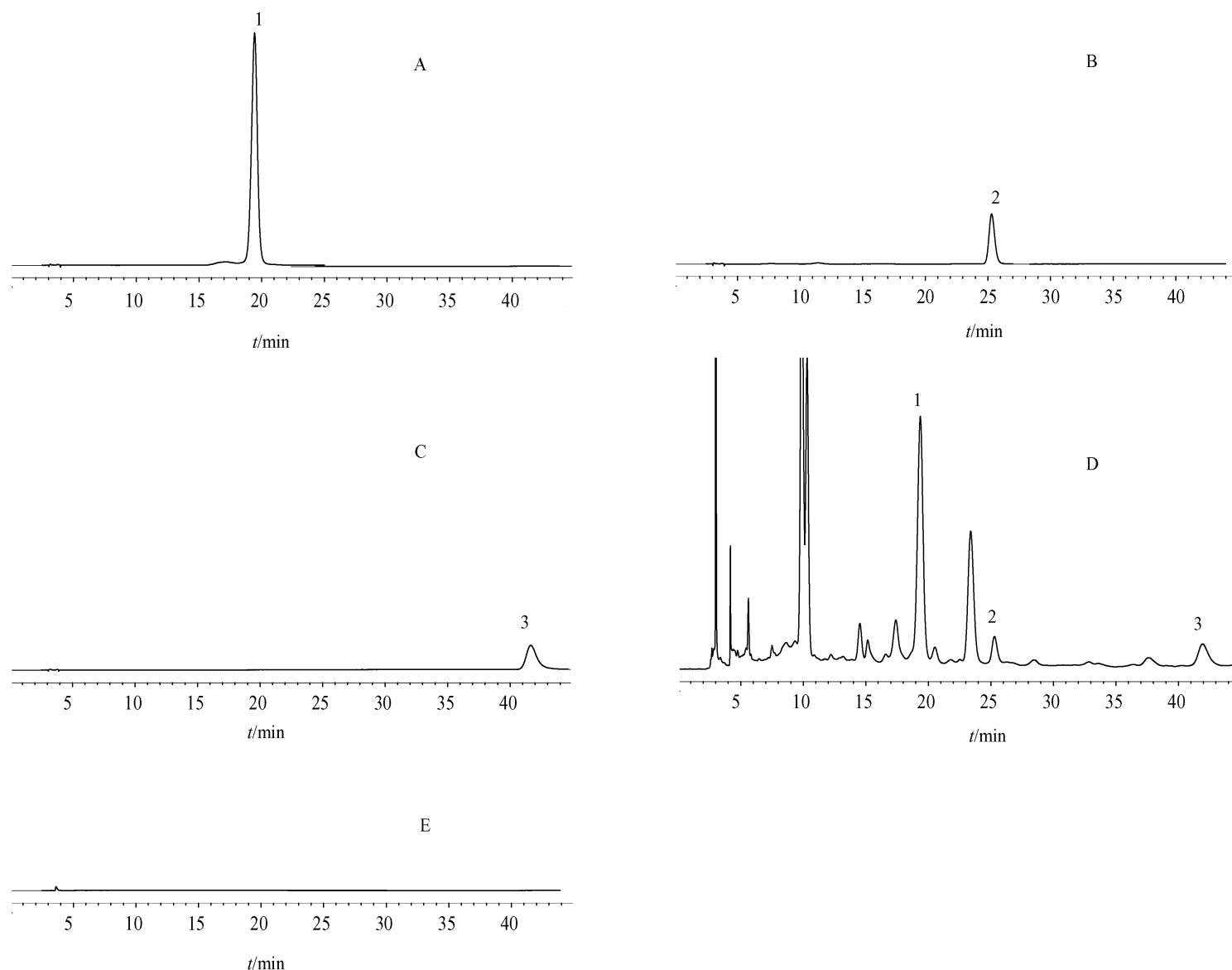


图 1 石韦配方颗粒高效液相色谱图

A. 绿原酸对照品; B. 咖啡酸对照品; C. 芒果苷对照品 D. 供试品; E. 阴性对照样品; 1. 绿原酸; 2. 咖啡酸; 3. 芒果苷

2.4 线性关系考察 精密称定绿原酸对照品适量, 分别加 50% 甲醇分别制成 129.6, 172.8, 216, 259.2, 302.4 mg·L⁻¹ 的溶液; 精密称定咖啡酸对照品适量, 分别加 50% 甲醇分别制成 13.8, 18.4, 23.0, 27.6, 32.2 mg·L⁻¹ 的溶液; 精密称定芒果苷对照品适量, 分别加 50% 甲醇分别制成 151.2, 201.6, 252, 302.4, 352.8 mg·L⁻¹ 的溶液; 再分别精密吸取以上溶液 10 μL 注入液相色谱仪进行分析, 以检测浓度 $X(\mu\text{g})$ 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线, 得到绿原酸回归方程为 $Y = 2.90 \times 10^4 X - 1.18 \times 10^3$, $r = 0.9998$; 咖啡酸回归方程为 $Y = 5.36 \times 10^3 X - 1.6850$, $r = 0.9999$; 芒果苷回归方程为 $Y = 3.68 \times 10^3 X - 0.3100$, $r = 0.9999$ 。结果表明, 绿原酸、咖啡酸、芒果苷的检测浓度分别在 129.6 ~ 302.4, 13.8 ~ 32.2, 151.2 ~ 352.8 mg·L⁻¹, 与峰面积呈良好线性关系。

2.5 精密度试验 分别精密吸取 2.2.1 项下绿原酸对照品溶液、咖啡酸对照品溶液、芒果苷对照品溶液各 10 μL, 连续进样 6 次, 计算峰面积 RSD 分别为 0.33%, 0.38%, 0.50%。表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 按 2.2.2 项下方法制备, 以 2.1 项下色谱条件分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样 10 μL, 测定绿原酸、咖啡酸和芒果苷的峰面积, RSD 分别为 1.67%, 2.22%, 2.71%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一批 (0902018) 供试品 6 份, 分别按 2.2.2 项下方法制备, 以 2.1 项下色谱条件进样 10 μL, 结果绿原酸平均含量为 2.1096 mg·g⁻¹, RSD 2.06%; 咖啡酸平均含量为 0.1305 mg·g⁻¹, RSD 2.94%; 芒果苷平均含量为 0.2591 mg·g⁻¹, RSD 2.59%。表明本法重复性良好。

2.8 加样回收试验 取同一批 (0902018) 已知含量的供试品 6 份, 分别精密加入一定量的绿原酸、咖啡酸对照品, 按 2.2.2 项下方法制备, 以 2.1 项下色谱条件进样 10 μL, 测定绿原酸、咖啡酸、芒果苷的含量。结果表明, 本法准确度较好。见表 1。

2.9 样品测定 取不同批号的样品, 分别按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 结果见表 2。

3 讨论

3.1 检测波长的选择 取对照品溶液进行紫外扫描, 结果绿原酸在 327 nm 处有最大吸收, 咖啡酸在

表 1 石韦配方颗粒加样回收结果 ($n=6$)

化合物	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
绿原酸	0.5285	0.4611	0.9770	97.28	98.15	1.69
	0.5278	0.4611	0.9773	97.48		
	0.5270	0.4611	0.9914	100.72		
	0.5276	0.4611	0.9733	96.64		
	0.5287	0.4611	0.9886	99.74		
	0.5280	0.4611	0.9755	97.05		
咖啡酸	0.0327	0.0276	0.0613	103.71	99.93	2.98
	0.0327	0.0276	0.0602	100.05		
	0.0326	0.0276	0.0587	94.57		
	0.0326	0.0276	0.0602	99.94		
	0.0327	0.0276	0.0605	100.98		
	0.0327	0.0276	0.0603	100.33		
芒果苷	0.0649	0.0655	0.1317	101.94	101.43	2.00
	0.0648	0.0655	0.1321	102.62		
	0.0647	0.0655	0.1307	100.76		
	0.0648	0.0655	0.1301	99.69		
	0.0649	0.0655	0.1300	99.33		
	0.0649	0.0655	0.1335	104.74		

表 2 石韦配方颗粒样品测定 ($n=3$)

批号	绿原酸含量 /mg·g ⁻¹	RSD /%	咖啡酸含量 /mg·g ⁻¹	RSD /%	芒果苷含量 /mg·g ⁻¹	RSD /%
0902018	2.1089	2.29	0.1312	2.34	0.2598	2.06
0904015	2.9838	2.38	0.2431	2.76	0.3755	2.32
0905242	2.5376	2.21	0.1845	2.66	0.3164	2.18

323 nm 处有最大吸收, 芒果苷在 258 nm 处有最大吸收波长。因样品中绿原酸 ($t_R = 19.4$ min) 的含量远高于咖啡酸 ($t_R = 25.3$ min), 且二者保留时间接近, 故选择 0 ~ 30 min 以 323 nm 作为检测波长, 30.1 ~ 45 min 转换波长为 258 nm 检测芒果苷 ($t_R = 41.6$ min)。

3.2 流动相的选择 因绿原酸、咖啡酸均为有机酸, 水相易电离, 峰形不稳定, 分离度差; 而酸性流动相可抑制其电离, 出峰时间早, 峰形稳定, 分离度好。根据预试结果, 最终采用乙腈-0.1% 磷酸溶液 (9:91) 为流动相。

(下转第 61 页)

复方半边莲生物活性研究

石磊^{1,2}, 王俊霞¹, 李园园¹, 康文艺^{1*}

(1. 河南大学中药研究所, 河南 开封 475004; 2. 解放军第 155 中心医院, 河南 开封 475003)

[摘要] 目的: 研究复方半边莲对 α -葡萄糖苷酶抑制、抗氧化及抗菌活性。方法: 采用大孔吸附树脂柱色谱法, 以不同体积分数甲醇水溶液洗脱, 利用 96 微孔板法检测 α -葡萄糖苷酶抑制活性; 采用 DPPH、ABTS 和 FRAP 方法评价抗氧化活性; 采用 K-B 法和倍比稀释法, 测定其抗菌活性。结果: 活性成分主要集中在 100%, 60% 和 40% 甲醇洗脱部位。100% 甲醇洗脱部位 F ($IC_{50} = 411.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 G ($IC_{50} = 543.70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 抑制 α -葡萄糖苷酶的活性高于阳性对照 Acarbose ($IC_{50} = 1081.27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); 100% 甲醇洗脱部位 F 清除 ABTS 自由基的能力 ($IC_{50} = 11.23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 G ($IC_{50} = 10.81 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 略低于阳性对照 BHT ($IC_{50} = 7.47 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); 100% 甲醇洗脱部位 G 和 60% 甲醇洗脱部位 E 对金黄色葡萄球菌 (SA) 的抑制能力最强, MIC 均为 $62.5 \mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$ 。结论: 首次对复方半边莲进行生物活性研究, 发现其有较好的 α -葡萄糖苷酶抑制、抗氧化和抗菌活性。

[关键词] 复方半边莲; α -葡萄糖苷酶; 抗氧化; 抗菌; 生物活性

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0057-05

Studies on Biological Activity of Compound Recipe of *Lobelia Chinensis*

SHI Lei^{1,2}, WANG Jun-xia¹, LI Yuan-yuan¹, KANG Wen-yi^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, Henan University, Kaifeng 475004, China;

2. The 155th Central Hospital of PLA, Kaifeng 475003, China)

[Abstract] Objective: To investigate the α -glucosidase inhibitory, antioxidant and antibacterial activity of compound recipe of *Lobeliae chinese* (CRLC). **Method:** Fractions were eluted by methanol-water in macroporous resin. All the fractions were assayed for the inhibitory activity of α -glucosidase, antioxidant activity and antibacterial activity by the method of 96-microplates, DPPH, ABTS and FRAP, K-B and dilution method respectively. **Result:** Active fractions were mainly concentrated in the 100%, 60% and 40% methanol-water eluent. 100% methanol eluent F ($IC_{50} = 411.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and G ($IC_{50} = 543.70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) were higher than that of Acarbose ($IC_{50} = 1081.27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) which was used as positive control on inhibitory activity of α -glucosidase. 100% methanol eluent F ($IC_{50} = 11.23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and G ($IC_{50} = 10.81 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) had good ABTS free radical scavenging activity, which was slightly lower than that of BHT ($IC_{50} = 7.47 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) as positive control. 100% methanol eluent G and 60% methanol eluent E had the highest antibacterial of SA, both of MIC were $62.5 \mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$. **Conclusion:** Bioactivity on CRLC was assayed for the first time, and it had good α -glucosidase inhibitory activity, antioxidant activity and antibacterial activity.

[Key words] CRLC; α -glucosidase inhibitory activity; antioxidant activity; antibacterial activity

[收稿日期] 20100626(003)

[第一作者] 石磊, 主任药师, 主要从事天然药物活性与安全性评价, Tel: 13503780421, E-mail: 155sl@163.com

[通讯作者] * 康文艺, 教授, 研究方向为中药活性成分及新药研究, Tel: 0378-3880680, E-mail: kangwenyi@hotmail.com

复方半边莲由半边莲、半枝莲、白花蛇舌草组成^[1], 临床应用广泛, 广谱抗菌、抗病毒, 对金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌、肺炎双球菌以及多种肠道杆菌有明显抑作用, 对流感病毒 A、腺病毒、呼吸道合胞病毒也有抑制作用, 对耐药菌高度敏感, 并能抑制网状内皮细胞增生, 增强白细胞和单核巨噬细胞的