

百合知母汤有效部位质量控制方法研究

夏红兰¹, 姜艳艳², 石任兵^{2*}

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] **目的:** 建立百合知母汤中知母黄酮类成分芒果苷、皂苷类成分知母皂苷 A3, 百合酚类成分咖啡酰基甘油酯、皂苷类成分麦冬皂苷 D' 质量控制方法。**方法:** 采用 HPLC-DAD 分析方法, 依利特 Hypersil ODS 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长芒果苷为 258 nm, 知母皂苷 A3 为 191 nm, 咖啡酰基甘油酯为 310 nm, 麦冬皂苷 D' 为 200 nm, 柱温 25 °C。**结果:** 芒果苷, 咖啡酰基甘油酯, 知母皂苷 A3, 麦冬皂苷 D' 分别在 0.228 ~ 1.14, 0.072 ~ 0.576, 0.069 25 ~ 0.554, 0.101 ~ 0.505 g·L⁻¹ 线性关系良好; 平均回收率分别为 98.97%, 99.32%, 97.65%, 96.67%。芒果苷的定量限为 0.912 mg·L⁻¹, 检测限为 0.456 mg·L⁻¹; 咖啡酰基甘油酯的定量限为 1.44 mg·L⁻¹, 检测限为 0.36 mg·L⁻¹; 知母皂苷 A3 的定量限为 5.54 mg·L⁻¹, 检测限为 1.85 mg·L⁻¹; 麦冬皂苷 D' 定量限为 3.16 mg·L⁻¹, 检测限为 1.06 mg·L⁻¹。**结论:** 3 批样品含量测定结果表明, 该方法简便、准确, 可用于百合知母汤中芒果苷、咖啡酰基甘油酯、知母皂苷 A3 和麦冬皂苷 D' 的含量测定, 亦可作为百合知母汤质量控制方法之一。

[关键词] 百合知母汤; 有效部位; 芒果苷; 咖啡酰基甘油酯; 知母皂苷 A3; 麦冬皂苷 D'; 质量控制

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0126-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121206.1029.007.html>

[网络出版时间] 2012-12-6 10:29

Quality Control of Effective Fraction in Baihe Zhimu Decoction

XIA Hong-lan¹, JIANG Yan-yan², SHI Ren-bing^{2*}

(1. Institute of Traditional Chinese Medicine (TCM), Capital Medical University, Beijing 100069, China;
2 School of Chinese Pharmacy, Beijing University of TCM, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To find a quality control method of mangiferin, anemarrhena saponin A3, caffeoyl glyceride and ophiopogonin D, which are flavones effective fraction, steroidal saponins effective fraction from Zhimu (Anemarrhena Rhizoma), the total phenylic effective fraction and steroidal saponins effective fraction from Baihe (*Lilium lancifolium*) in Baihe Zhimu decoction respectively. **Method:** The procedure of HPLC-DAD was performed on the chromatographic column of Yi li-te Hypersil ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at 25 °C. The mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution in gradient elution. The flow velocity was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was set at 258 nm for mangiferin, 191 nm for anemarrhena saponin A3, 310 nm for caffeoyl glyceride and 200 nm for ophiopogonin D'. **Result:** Mangiferin showed a good linear relationship in a range from 0.228-1.14 g·L⁻¹; caffeoyl glyceride from 0.072-0.576 g·L⁻¹, anemarrhena saponin A3 from 0.069 25-0.554 g·L⁻¹, ophiopogonin D' from 0.101-0.505 g·L⁻¹. The average recovery was 98.97%, 99.32%, 97.65% and 96.67% respectively. The limit of quantitation and detection about mangiferin was 0.912 mg·L⁻¹ and 0.456 mg·L⁻¹. The LOQ and LOD about caffeoyl glyceride was 1.44, 0.36 mg·L⁻¹. The LOQ and LOD about anemarrhena saponin A3 was 5.54, 1.85 mg·L⁻¹. The LOQ and LOD about ophiopogonin D' was

[收稿日期] 20120825(006)

[基金项目] 北京中医药大学自主选题项目(2011JYBZZJS-051);北京中医药大学创新团队项目(2011-CXTD-12);北京中医药大学科研基地建设基金项目(2011-JDJS-13)

[通讯作者] * 石任兵, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药(复方)有效物质基础研究与药物创新研究, E-mail: shirb@126.com

3.16, 1.06 mg·L⁻¹. **Conclusion:** The method was simple and reliable, which can be used for the quantitative determination of mangiferin, caffeoyl glyceride; anemarrhena saponin A3 and ophiopogonin D' as well as quantity control of Baihe Zhimu decoction.

[**Key words**] Baihe Zhimu decoction; effective fraction; mangiferin; caffeoyl glyceride; anemarrhena saponin A3; ophiopogonin D'; quality control

百合知母汤始见于张仲景《金匱要略》,原方由百合7枚、知母3两组成。百合宁心安神、润肺止咳;知母清热泻火,滋阴润燥;百合甘寒清润而不腻,知母苦寒降火而不燥,百合偏于补,知母偏于泻,二药配伍使用,一润一清,一补一泻,共达宁心安神之效。在中医临床,百合知母汤主治“百合病”,而“百合病”所描述的临床表现与现代临床的围绝经期综合征有明显的相似之处^[1]。本课题在相关文献和前期研究工作的基础上^[2-8],建立了HPLC-DAD法同时测定百合知母汤有效部位中芒果苷、咖啡酰基甘油酯、知母皂苷A3和麦冬皂苷D'含量的定量分析方法,为建立百合知母汤科学合理的质量控制方法提供依据。

1 仪器与试剂

Waters 1525-2996型高效液相色谱系统,Empower色谱工作站;Sartorius BT 25S型1/10万电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司);KQ-2500DE型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

知母药材3批,分别购自北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司,安国市祁澳中药饮片有限公司和河北光明饮片有限公司;百合3批,分别购于北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司和安国市祁澳中药饮片有限公司。经北京中医药大学中药学院陈玉婷教授鉴定,知母为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎,百合为百合科植物卷丹 *Lilium lancifolium* Thunb. 的干燥肉质鳞叶。药材标本现存于北京中医药大学中药化学系。

对照品:酚类咖啡酰基甘油酯为自制(实验室自制,经UV, NMR, MS, IR鉴定, HPLC纯度不低于98%),符合定量要求,芒果苷(天津一方科技有限公司,批号201109),知母皂苷A3(天津一方科技有限公司,批号201108),麦冬皂苷D'(成都普思生物科技有限公司,批号PS09060801)。分析样品:知母黄酮、皂苷有效部位,百合酚类和皂苷有效部位(实验室自制),乙腈(美国Fisher有限公司,色谱纯),水为哇哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯(北京北化精密化学品有限责任公司)。

2 方法与结果

2.1 对照品和供试品溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取芒果苷,咖啡酰基甘油酯,知母皂苷A3,麦冬皂苷D'对照品适量,加甲醇超声溶解,制得质量浓度分别为1.14, 0.576, 0.554, 0.505 g·L⁻¹的对照品溶液。

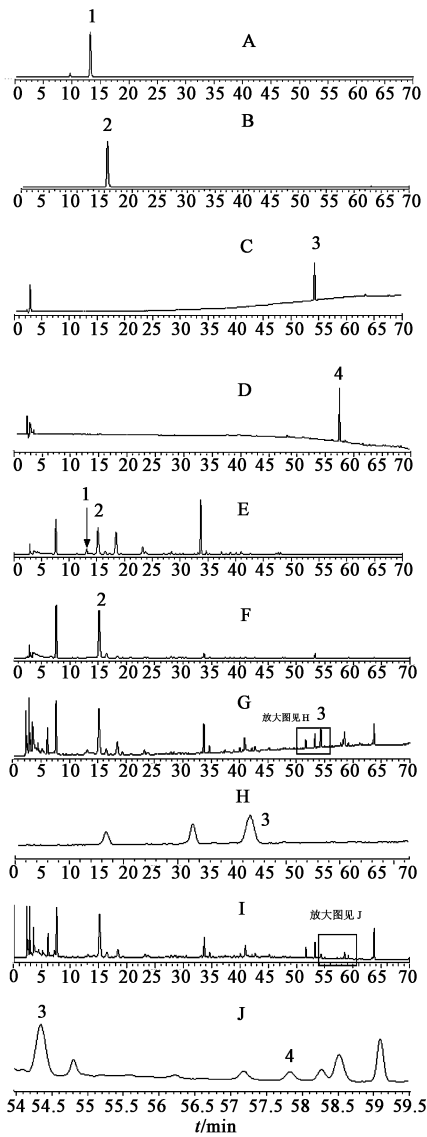
2.1.2 供试品溶液的制备 知母、百合有效组分的制备:知母醇提浓缩的药液、百合水提醇沉上清液分别经过大孔树脂柱色谱,知母和百合分别先用一定浓度的醇和水除杂,后二者均依次用低、高2种不同浓度的醇水洗脱,所得的醇水洗脱液回收溶剂后真空干燥即为知母、百合各2种有效部位。

分别精密称取知母黄酮有效部位约33 mg,知母皂苷有效部位约90 mg,百合酚类有效部位约45 mg,百合皂苷有效部位约24 mg,置于10 mL量瓶中,加70%甲醇超声溶解,并稀释至刻度,摇匀,0.45 μm微孔滤膜过滤,备用[取量根据各有效部位得率,按照原药材百合-知母(3:1)比例进行混合,相当于生药百合约为3.24 g,知母为1.08 g]。

2.2 色谱条件及系统适用性试验 依利特Hypersil ODS色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);芒果苷、咖啡酰基甘油酯,知母皂苷A3,麦冬皂苷D'检测波长分别为258, 310, 191, 200 nm;流速1 mL·min⁻¹,柱温25℃,进样量10 μL,采集时间70 min。流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱,10%~12% A(0~15 min),12%~12% A(15~18 min),12%~24% A(18~35 min),24%~50% A(35~50 min),50%~75% A(50~60 min),75%~75% A(60~65 min),75%~95% A(65~70 min)。

依上述色谱条件,分别精密吸取芒果苷(0.456 g·L⁻¹)、咖啡酰基甘油酯(0.288 g·L⁻¹)、知母皂苷A3(0.277 g·L⁻¹)、麦冬皂苷D'(0.202 g·L⁻¹)对照品溶液、供试品溶液各10 μL,分别进样。在对照品溶液和供试品溶液色谱图相应位置上,有相同保留时间的色谱峰,与其他成分分离度良好。色谱图见图1。

2.3 线性关系考察 分别精密量取芒果苷和麦冬皂苷D'对照品溶液2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL,咖



A. 咖啡酰基甘油酯(310 nm); B. 芒果苷(258 nm); C. 知母皂苷 A3(191 nm); D. 麦冬皂苷 D(200 nm); E. 有效部位(310 nm); F. 有效部位(258 nm); G. 有效部位(191 nm); H. 有效部位部分放大(191 nm); I. 有效部位(200 nm); J. 有效部位部分放大(200 nm);

1. 咖啡酰基甘油酯; 2. 芒果苷; 3. 知母皂苷 A3; 4. 麦冬皂苷 D'

图 1 百合知母有效部位 HPLC

啡酰基甘油酯和知母皂苷 A3 对照品溶液 1.25, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀。分别精密吸取 10 μ L, 注入液相色谱仪, 按 2.2 项色谱条件, 测定色谱峰峰面积。以对照品浓度为横坐标, 色谱峰峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 并分别进行线性回归, 得回归方程。 $Y_{\text{芒果苷}} = 4\,000\,000 X + 137\,780 (r = 0.999\,9)$; $Y_{\text{咖啡酰基甘油酯}} = 2\,000\,000 X - 111\,815 (r = 0.999\,6)$; $Y_{\text{知母皂苷 A3}} = 927\,560 X - 20\,215 (r = 0.999\,9)$; $Y_{\text{麦冬皂苷 D'}} = 392\,548 X + 4\,090.2 (r = 0.999\,9)$ 。

结果表明芒果苷、咖啡酰基甘油酯、知母皂苷 A3、麦冬皂苷 D' 分别在 0.228 ~ 1.14, 0.072 ~ 0.576, 0.069 25 ~ 0.554, 0.101 ~ 0.505 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 与色谱峰面积呈良好的线性关系。

2.4 精密度考察 精密吸取同一对照品溶液 10 μ L, 注入液相色谱仪, 连续测定 6 次, 测定芒果苷、咖啡酰基甘油酯、知母皂苷 A3、麦冬皂苷 D' 色谱峰峰面积, 计算 RSD 分别为 1.50%, 2.03%, 2.73%, 2.99%。表明该方法精密度良好, 符合定量分析要求。

2.5 稳定性考察 精密吸取同一百合知母汤溶液, 分别于制备后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 后进样, 每次进样 10 μ L, 测定芒果苷、咖啡酰基甘油酯、知母皂苷 A3、麦冬皂苷 D' 色谱峰峰面积, 计算 RSD 分别为 1.20%, 2.44%, 1.68%, 2.90%。表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.6 重复性考察 精密称取同一批百合知母混合有效部位 6 份, 按 2.1.2 项下方法, 制备供试品溶液。精密吸取各混合溶液 10 μ L, 注入液相色谱仪, 测定芒果苷、咖啡酰基甘油酯、知母皂苷 A3、麦冬皂苷 D' 色谱峰峰面积, 计算平均含量分别为 4.55%, 1.44%, 1.01%, 0.59%, RSD 分别为 0.72%, 2.14%, 3.16%, 2.45%。表明该方法重复性良好。

2.7 加样回收率考察 精密称取同一批知母、百合混合有效部位(芒果苷、咖啡酰基甘油酯、知母皂苷 A3、麦冬皂苷 D' 平均含量分别为 4.55%, 1.44%, 1.01%, 0.59%) 6 份, 每份约 96 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加入芒果苷对照品(0.456 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 2.5 mL, 知母皂苷 A3(0.277 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 3.4 mL, 咖啡酰基甘油酯对照品溶液(0.288 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 4.0 mL, 麦冬皂苷 D' 对照品溶液(0.202 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 2.3 mL, 挥干甲醇按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液。

分别精密吸取上述各供试品溶液 10 μ L, 注入液相色谱仪, 测定芒果苷, 咖啡酰基甘油酯, 知母皂苷 A3 和麦冬皂苷 D' 的色谱峰面积, 并分别计算回收率。结果四者平均加样回收率分别为 98.97%, 99.32%, 97.65%, 96.67%, 表明该方法的加样回收率合格, 符合定量分析的要求。结果见表 1。

2.8 定量限和检测限 将各对照品溶液分别稀释至一定浓度, 使信噪比为 10:3, 以得出相应对照品的定量限和检测限, 芒果苷的定量限 0.912 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测限 0.456 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 知母皂苷 A3 的定量限 5.54 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测限 1.85 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 咖啡酰基甘油酯的定量限 1.44 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测限 0.36 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 麦冬皂苷 D' 定量

表 1 4种成分加样回收率试验

成分	称样量/mg	样品中含量/mg	加入量/mg	检出量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
芒果苷	96.54	4.393	4.104	8.429	98.36	98.97	1.45
	95.55	4.348	4.104	8.393	98.58		
	96.46	4.389	4.104	8.473	99.50		
	95.33	4.338	4.104	8.437	99.88		
	96.31	4.382	4.104	8.35	96.68		
	96.63	4.397	4.104	8.535	100.84		
咖啡酰基甘油酯	96.54	1.388	1.152	1.961	104.74	99.32	3.40
	95.55	1.374	1.152	1.866	95.73		
	96.46	1.387	1.152	1.910	99.49		
	95.33	1.371	1.152	1.907	100.40		
	96.31	1.385	1.152	1.912	99.88		
	96.63	1.390	1.152	1.876	95.69		
知母皂苷 A3	96.54	0.974	0.941 8	2.474	94.27	97.65	3.64
	95.55	0.964	0.941 8	2.540	101.25		
	96.46	0.973	0.941 8	2.571	102.75		
	95.33	0.962	0.941 8	2.487	96.88		
	96.31	0.972	0.941 8	2.495	96.34		
	96.63	0.975	0.941 8	2.477	94.42		
麦冬皂苷 D'	96.54	0.569	0.464 6	1.030	99.31	96.67	3.31
	95.55	0.563	0.464 6	1.002	94.57		
	96.46	0.568	0.464 6	1.018	96.73		
	95.33	0.561	0.464 6	0.989	92.03		
	96.31	0.567	0.464 6	1.015	96.45		
	96.63	0.569	0.464 6	1.038	100.93		

限 $3.16 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 检测限 $1.06 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

每批 3 份,按供试品方法制备溶液,按上述色谱条件

2.9 样品含量测定 精密称取 3 批混合部位粉末,

测定样品含量。见表 2。

表 2 样品中 4 种成分含量测定 ($n=3$)

%

批次	芒果苷		咖啡酰基甘油酯		知母皂苷 A3		麦冬皂苷 D'	
	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD
1	4.56	0.67	1.45	2.33	0.95	1.76	0.58	2.49
2	3.48	1.45	1.05	1.84	1.02	1.55	0.54	1.63
3	4.39	1.68	1.32	2.17	0.99	2.53	0.56	1.98

3 讨论

流动相考察了乙腈-水,乙腈-0.1% 醋酸水,乙腈-0.1% 甲酸水,乙腈-0.05% 甲酸水,乙腈-磷酸水。流动相中性条件下芒果苷拖尾很严重,故选择酸水系统。因对照品有末端吸收,且为梯度洗脱,醋酸水和甲酸水条件会使溶剂峰部分在 0 以下,基线不平,故选择紫外吸收较小的乙腈-0.1% 磷酸水作为流动相。

对照品溶液采用甲醇做溶剂,而供试品溶液,因为是将 4 种不同极性的有效部位混合溶解,用甲醇

做溶剂,溶解不能很完全,尤其会影响酚类成分咖啡酰基甘油酯的充分溶解,实验表明 70% 甲醇溶解较充分,且酚类成分咖啡酰基甘油酯峰型较好,较明显,故选用 70% 甲醇作为供试品的溶剂。

4 种指标性成分,芒果苷与咖啡酰基甘油酯,知母皂苷 A3 与麦冬皂苷 D' 极性相近,后两者是末端吸收;药材的比例为原方百合-知母(3:1),但知母中 2 种有效部位的得率较高,所以称样量较大,又指标性成分含量也相对较高,故而知母、百合两药材中 4 种指标性成分含量相差较大,本实验供试品称样量

诃子草乌配伍与诃子制草乌水煎液中生物碱含量的比较 ——诃子制草乌炮制原理探讨 II

刘畅, 李飞, 侯跃飞, 刘帅, 谭鹏, 李向日, 杜红*
(北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的:对生草乌、诃子制草乌水煎液及草乌诃子共煎液中生物碱含量进行比较验证蒙医理论“诃子可解乌头毒”。方法:采用 HPLC 测定生草乌水煎液、诃子制草乌水煎液及诃子草乌共煎液中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱以及苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头碱、苯甲酰次乌头碱的含量。色谱条件以乙腈-四氢呋喃(25:15)为流动相 A,以 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液(每 1 000 mL 加冰醋酸 0.5 mL)为流动相 B。结果:双酯型生物碱的含量为诃子草乌共煎液 > 诃子汤制草乌煎液 > 生草乌煎液;单酯型生物碱的含量为生草乌煎液 > 诃子草乌共煎液 > 诃子汤制草乌煎液。结论:诃子可以使草乌中双酯型生物碱缓慢水解,诃子制草乌的毒性低于诃子草乌配伍。

[关键词] 诃子; 草乌; 水煎液; 炮制; 生物碱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0130-03

Comparison of Contents of Aconitum Alkaloids between the Decoctions of Aconitum Processed with Myrobalan and Co-decoctions of Aconitum and Myrobalan ——Principal of Aconitum Processed with Myrobalan II

YANG Chang, LI Fei, HOU Yue-fei, LIU Shuai, TAN Peng, LI Xiang-ri, DU Hong*
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[收稿日期] 20121120(019)

[基金项目] 北京中医药大学自主选题(2011-MZYY-07);中医药行业科研专项项目(201107008);国家自然科学基金项目(81102807)

[通讯作者] * 杜红, 博士, 副教授, 从事中药炮制研究, Tel: 010-84738616, E-mail: duhong@vip.163.com

以指标性成分含量最低的且得率也是最低的百合皂苷有效部位为基准,使其质量浓度不低于 2 g·L⁻¹ 的基础上进行混合配制,否则色谱图的峰则相对不明显。这也是导致加样回收率实验中对照品的添加量较高的原因。

[参考文献]

- [1] 王华富,许惠琴,陈敏敏,等. 百合知母汤不同配比对去势围绝经期综合征肾阴虚证大鼠子宫系数及血清性激素的影响[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(4):531.
- [2] 王迪,姜艳艳,石任兵. 中药知母质量控制方法研究[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(4):263.
- [3] 秦昆明. 百合知母汤质量控制及药效物质基础研究

[D]. 南京:南京中医药大学, 2010:14.

- [4] 杨秀伟,吴云山,崔育新,等. 卷丹中新甾体皂苷的分离和鉴定[J]. 药学学报, 2002, 37(11):863.
- [5] 周中流,石任兵,刘斌. HPLC 法测定卷丹有效部位中 3 种甾体皂苷的含量[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(4):277.
- [6] 陈沛鑫,李卫民,帅颖. HPLC 测定知母-黄芪药对中芒果苷毛蕊异黄酮苷和毛蕊异黄酮[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22):72.
- [7] 黄江剑,李卫民,叶雪兰. HPLC-ELSD 测定不同产地百合中薯蓣皂苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5):110.
- [8] 王可人. 知母百合药对的化学成分分析及药动学研究[D]. 上海:第二军医大学, 2011:17.

[责任编辑 邹晓翠]