

不同产地知母药材中芒果苷和知母皂苷 B 的含量测定

梁雷¹, 边宝林^{2*}, 王宏洁²

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 测定不同产地知母中芒果苷和知母皂苷 B 的含量。方法: 分别采用 HPLC 和 HPLC-ELSD 法测定芒果苷和知母皂苷 B 的含量。测定芒果苷的流动相为乙腈:0.85% 磷酸水溶液(12:88), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35℃; 测定知母皂苷 B 的流动相为乙腈:水(25:75), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25℃, 蒸发光检测器漂移管温度 105℃, 载气流速 3.0 L·min⁻¹。结果: 不同产地知母药材中芒果苷含量为 0.99%~1.68%, 知母皂苷 B 含量为 3.90%~10.25%。结论: 本实验方法用以测定知母中的芒果苷和知母皂苷 B 含量准确、适合、重复性好, 方法学考察均符合要求, 可以用来控制知母药材质量。

[关键词] 知母; 高效液相; 芒果苷; 知母皂苷; 蒸发光散射

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0049-03

Determination of Mangiferin and Timosaponin B in Anemarrhenae Rhizoma from Different Areas

LIANG Lei¹, BIAN Bao-lin^{2*}, WANG Hong-jie²

(1. Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of TCM, Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective: To establish a method for the determination of mangiferin and timosaponin B in Anemarrhenae Rhizoma from different areas. **Method:** The mobile phase for the determination of mangiferin consisted of acetonitrile-0.85% phosphoric acid (12:88), with the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, at 35℃. The detection wavelength of mangiferin was set at 258 nm; And the mobile phase for the determination of timosaponin B consisted of acetonitrile-water (25:75), with the same flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, at 25℃. An evaporative light-scattering detector (ELSD) was used as detector to determine timosaponin B with the drift tube temperature at 105℃. **Result:** The content of mangiferin and timosaponin B in Anemarrhenae Rhizoma from different areas were 0.99%~1.68% and 3.90%~10.25% respectively. **Conclusion:** The method for determination of mangiferin and timosaponin B here proved to be accurate and suitable, which can be used for the quality control of Anemarrhenae Rhizoma from different areas.

[Key words] Anemarrhenae Rhizoma; HPLC; mangiferin; timosaponin B; ELSD

知母是百合科植物知母的干燥根茎, 具有清热泻火、滋阴润燥的功效, 用于烦热消渴、骨蒸痲热、肺热咳嗽、大便燥结、小便不利等症^[1]。知母的化学成分主要为甾体皂苷、双苯吡酮类、木脂素类、多糖类

等, 活性成分主要是甾体皂苷^[2], 如知母皂苷 A (timosaponin A)、B (timosaponin B)、芒果苷 (mangiferin) 等。临床药理研究表明, 知母皂苷 B、B A 均能抑制血小板聚集, 而芒果苷在抗氧化、抗糖尿病、抗肿瘤方面也具有显著作用, 同时对血脂质有抑制效应, 另外兼有护肝、减肥效应^[3]。本文收集不同产地的知母药材, 对其中具有广泛生理活性的芒果苷和知母皂苷 B 进行了含量测定, 为更好控制知母药材的质量提供依据。

[收稿日期] 20100617(008)

[第一作者] 梁雷, 硕士研究生, 主要从事中药化学方向研究

[通讯作者] * 边宝林, 男, 硕士生导师, 中药化学方向, Tel: 13901227822

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪; 1/万 LAC-214 电子分析天平; Alltech 2000ES ELSD 检测器; KQ-250B 超声波清洗仪。

1.2 试药 芒果苷(111607-200402), 由中国药品生物制品检定所提供, 纯度 > 98%; 知母皂苷 B (MD200903245), 由上海海灿生物科技有限公司提供, 纯度 > 98.5%。知母药材经中国中医科学院中药研究所何希荣老师鉴定为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎。乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂为分析纯。

2 方法和结果

2.1 芒果苷含量测定^[4-5]

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Kromasil (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.85% 磷酸水溶液 (12:88); 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 35 °C; 检测波长 258 nm。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取芒果苷对照品适量, 加乙腈制成 0.230 g·L⁻¹ 的溶液, 作为对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 知母粉末 0.1 g, 加入 25 mL 的 50% 乙醇, 称重, 超声提取 30 min, 补足质量。过滤, 取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.1.4 线性关系考察 分别吸取对照品溶液 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.8 mL 至 5 mL 量瓶中, 稀释至刻度。在上述色谱条件下重复进样 2 次, 每次 10 μL, 芒果苷在 0.138 ~ 0.828 μg 线性良好。回归方程 $Y = 4.04 \times 10^3 X - 3.64 \times 10$, $r = 0.9995$ 。

2.1.5 稳定性实验 取同一供试品溶液进行实验, 每次进样 5 μL, 在 0, 2, 4, 8, 10 h 各进两针, 测定芒果苷峰面积平均值, RSD 0.835%。结果表明样品在 10 h 内稳定。

2.1.6 精密度实验 精密吸取供试品溶液 5 μL, 连续进样 5 次, 测定, 计算芒果苷色谱峰峰面积的 RSD 0.382%。

2.1.7 重复性实验 取同一批次的知母药材 5 份, 精密称定, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 进样 5 μL, 测定芒果苷峰面积平均值, 计算求得平均含量为 1.11%, RSD 2.48%。

2.1.8 加样回收实验 取芒果苷含量为 1.16% 知母药材粉末 0.1 g, 平行 6 份, 精密称定, 分别精密加入适量芒果苷对照品溶液, 按供试品溶液处理, 进行

含量测定, 计算回收率。结果见表 1。

表 1 芒果苷加样回收实验

样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1.183	1.117	2.345	104.0	99.97	2.14
1.230	1.082	2.308	99.60		
1.218	0.942	2.142	98.10		
1.195	1.234	2.436	100.5		
1.206	0.784	1.982	98.90		
1.206	1.207	2.397	98.70		

2.1.9 不同产地药材中芒果苷的含量测定 按照 2.1.3 项下方法制备样品, 按上述测定方法测定芒果苷的含量, 结果见表 3。HPLC 图谱见图 1 ~ 2。

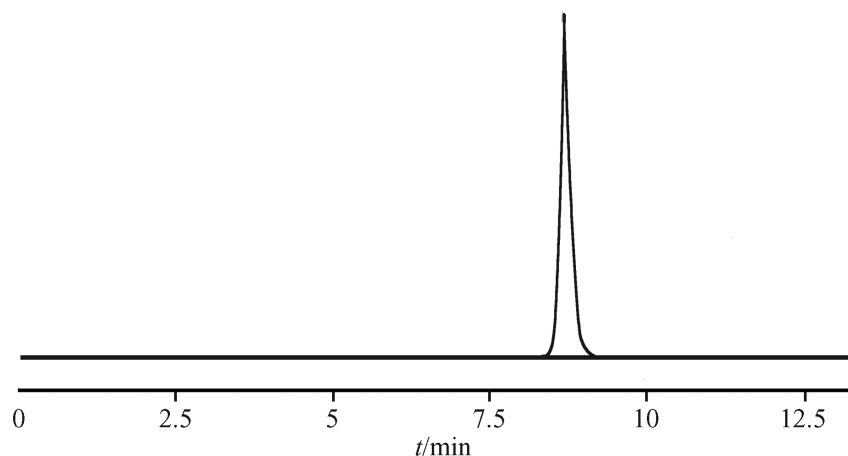


图 1 芒果苷对照品 HPLC 图谱

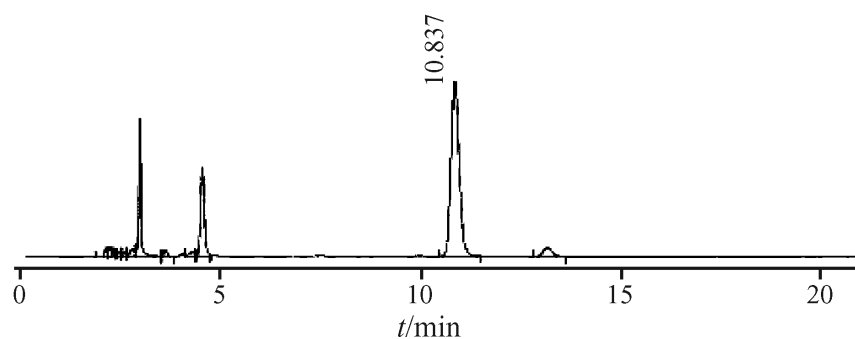


图 2 芒果苷知母样品 HPLC 图谱

2.2 知母皂苷 B 含量测定^[6]

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 色谱条件为乙腈-水 (25:75); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 25 °C; 蒸发光检测器漂移管温度 105 °C, 载气流速 3.0 L·min⁻¹。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取知母皂苷 B 对照品适量, 加 30% 乙腈制成 0.421 g·L⁻¹ 的溶液作为对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 知母粉末 0.2 g, 加入 25 mL 的 30% 乙腈, 称重, 超声提取 30 min, 补足质量。过滤, 取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.2.4 线性关系考察 分别吸取对照品溶液 10, 15, 20, 25, 30 μL 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积, 以进样量的自然对数为横坐标, 色谱峰面积的自然对数为纵坐标, 绘制标准曲线。结果表

明知母皂苷 B 在 4.21 ~12.62 μg 线性良好。回归方程为 $Y=9.30 \times 10^2 X - 2.57 \times 10^3$, 相关系数 $r=0.9995$ 。

2.2.5 稳定性实验 取同一供试品溶液进行实验, 每次进样 10 μL, 在 0, 2, 4, 8, 10 h 各进两针, 测定知母皂苷 B 峰面积平均值 RSD 3.74%。结果表明样品在 10 h 内稳定。

2.2.6 精密度实验 精密吸取供试品溶液 10 μL, 连续进样 5 次, 测定, 计算知母皂苷 B 色谱峰峰面积的 RSD 1.12%。

2.2.7 重复性实验 取同一批次的知母药材 5 份, 精密称定, 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 进样 15 μL, 测定知母皂苷 B 峰面积平均值, 计算求得平均含量为 4.34%, RSD 3.51%。

2.2.8 加样回收实验 取知母皂苷 B 含量为 4.34% 知母药材粉末 0.1 g, 平行 5 份, 精密称定, 分别精密加入适量知母皂苷 B 对照品溶液, 按供试品溶液处理, 进行含量测定, 计算回收率。结果见表 2。

表 2 知母皂苷 B 加样回收实验

样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
4.557	3.594	8.150	99.97		
4.600	5.117	9.785	101.31		
4.383	3.786	8.288	103.13	101.64	2.08
4.557	3.378	8.084	104.41		
4.470	3.983	8.429	99.39		

2.2.9 不同产地药材中知母皂苷 B 的含量测定

按照 2.2.3 项下方法制备样品, 按上述测定方法测定知母皂苷 B 的含量, 结果见表 3。HPLC 图谱见图 3~4。

3 小结与讨论

河南林州、内蒙古赤峰药材中芒果苷的含量略高于其他产地, 但整体上区别不大; 内蒙古赤峰、河南林州的知母皂苷 B 含量明显高于其他产地, 安徽省和河北省的药材含量偏低。各产地药材中的芒果苷和知母皂苷 B 含量均分别符合 2010 年版药典 0.70% 和 3.0% 的标准。

来自同一省份的知母, 购于药店的药材中 2 种指标的含量相对较低, 可能与其贮藏方式、采收年限等因素有关。

文献报道关于知母含量测定的内容中, 集中以芒果苷、菝葜皂苷元或总皂苷为指标, 但未见以芒果苷和知母皂苷 B 双指标比较的报道。从含量测定结果可以看出, 以这 2 种成分作为双重指标, 更合

理、全面的反映出各产地知母药材的优劣, 有利于准确评价知母药材的质量。

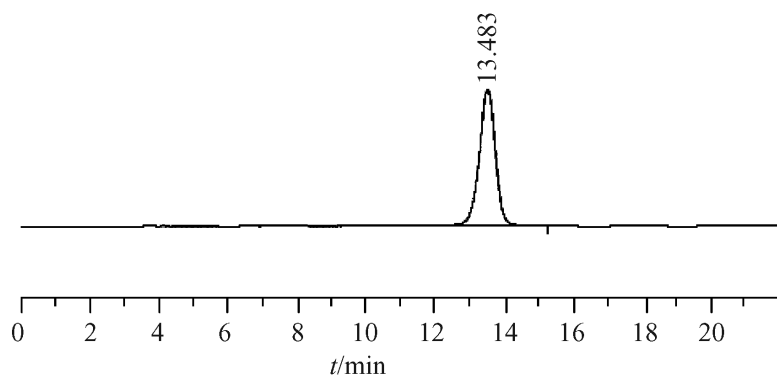


图 3 知母皂苷 B 对照品 HPLC 图谱

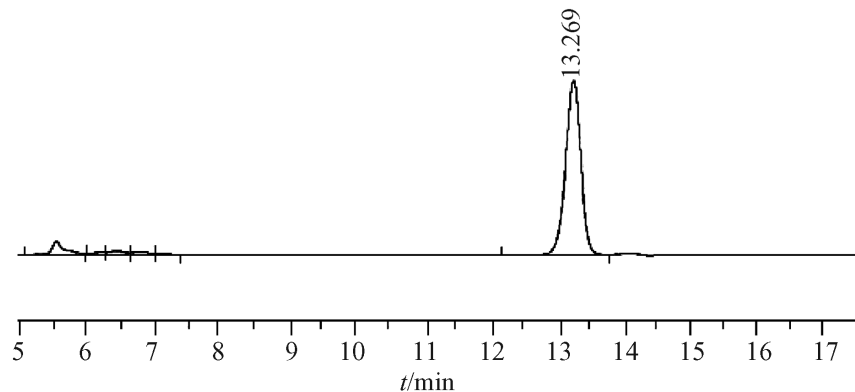


图 4 知母皂苷 B 样品 HPLC 图谱

表 3 不同知母药材芒果苷和知母皂苷 B 含量 %

产地	芒果苷含量	知母皂苷 B 含量
安徽亳州 ¹⁾	1.27	6.55
安徽药店 ³⁾	1.19	4.34
内蒙赤峰 ²⁾	1.59	10.25
河南林州 ¹⁾	1.7	7.21
山西药店 ³⁾	1.1	5.08
山东药店 ³⁾	0.99	5.29
河北博野 ²⁾	1.16	5.87
河北药店 ³⁾	1	3.9

注: ¹⁾ 购于药农, ²⁾ 购于种植基地, ³⁾ 购于市内药店。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 198.
- [2] 徐爱娟, 韩丽萍, 蒋琳兰. 知母的研究进展[J]. 中药材, 2008, 31(4): 624.
- [3] Zhang J Y, Meng Z Y, Zhang M Y, et al. Effect of six steroidal saponins isolated from Anemarrhena Rhizome on platelet aggregation and hemolysis in human blood [J]. Clin Chim Acta, 1999, 289(1/2): 79.
- [4] 沈中琴. HPLC 测定不同产地知母中芒果苷的含量[J]. 中医研究, 2007, 20(1): 20.
- [5] 侯秀清, 毛春芹, 陆兔林, 等. 河北不同产地知母药材中芒果苷及菝葜皂苷元的含量测定[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(11): 2368.
- [6] 沙东旭, 刘兆妍, 张满来, 等. HPLC-ELSD 测定知母中知母皂苷 B 的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(12): 2106.

[责任编辑 顾雪竹]