

UPLC法同时测定不同产地知母药材中新芒果苷和芒果苷的含量^Δ

钟可^{1,2*}, 王文全^{1,3,4#a}, 靳凤云^{2#b}, 侯俊玲¹, 刘进涛², 赵志刚¹(1.北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2.贵阳中医学院, 贵阳 550001; 3.中国医学科学院/北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 4.中药材规范化生产教育部工程研究中心, 北京 100102)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)15-1386-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.15.15

摘要 目的:建立同时测定知母药材中新芒果苷和芒果苷含量的方法,并测定不同产地知母中新芒果苷和芒果苷的含量,评价不同产地知母药材的质量。方法:采用超高效液相色谱(UPLC)法。色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),流动相为0.4%冰醋酸水-甲醇(梯度洗脱),流速为0.25 ml/min,柱温为35 ℃,检测波长为258 nm。结果:新芒果苷和芒果苷的进样量分别在0.030 0~0.480 0、0.028 5~0.456 0 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(r 均为0.999 9);精密性、重复性、稳定性试验的RSD均<3%;平均加样回收率分别为97.67%、100.17%,RSD分别为2.87%、2.78%(n 均为6)。结论:该方法快速、准确,可用于同时测定知母中新芒果苷和芒果苷的含量。不同产地的知母质量存在差异。

关键词 知母;超高效液相色谱法;芒果苷;新芒果苷;不同产地;含量测定

Simultaneous Determination of Neomangiferin and Mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides* from Different Habitats by UPLC

ZHONG Ke^{1,2}, WANG Wen-quan^{1,3,4}, JIN Feng-yun², HOU Jun-ling¹, LIU Jin-tao², ZHAO Zhi-gang¹(1.School of TCM, Beijing University of TCM, Beijing 100102, China; 2.Guiyang College of TCM, Guiyang 550001, China; 3.Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 4.Engineering Research Center of Good Agricultural Practice for Chinese Crude Drugs, Ministry of Education, Beijing 100102, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of neomangiferin and mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides* and determine the contents of two components in *A. asphodeloides* from different habitats, and to evaluate the quality of *A. asphodeloides* from different habitats. METHODS: UPLC method was adopted. The determination was performed on ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) column with mobile phase consisted of 0.4% acetic acid-methanol (gradient elution) at the flow rate of 0.25 ml/min. The column temperature was 35 ℃ and the detection wavelength was set at 258 nm. RESULTS: The linear ranges of neomangiferin and mangifer were 0.030 0-0.480 0 μg and 0.028 5-0.456 0 μg($r=0.999 9$).RSDs of precision test, reproducibility test and stability test were all lower than 3%. The average recoveries were 97.67% (RSD=2.87%, $n=6$) and 100.17% (RSD=0.78%, $n=6$), respectively. CONCLUSION: The method is rapid and accurate, and can be used for simultaneous determination of neomangiferin and mangiferin in *A. asphodeloides*. The qualities of *A. asphodeloides* from different habitats are different.

KEY WORDS *Anemarrhena asphodeloides*; UPLC; Mangiferin; Neomangiferin; Habitat; Content determination

知母(*Anemarrhena Rhizoma*)为常用的中药材,来源于百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge.的干燥根茎,在我国主要分布于河北、山西、内蒙古、辽宁、黑龙江、吉林等地。其药用历史悠久,始载于《神农本草经》,列为中品,具有清热泻火、润肠滑燥、止渴除烦等功效^[1]。随着知母化学活性

Δ 基金项目:国家公益性(中医药)行业科研专项资助项目(No. 2011107009-03)

* 博士研究生。研究方向:道地药材质量及其形成机制。电话:010-84739408。E-mail: lionzhongke@163.com

a 通信作者:教授,博士研究生导师,博士。研究方向:中药材质量评价及其产品开发、药用植物栽培和育种、中药资源保护及可持续利用等。电话:010-84738623。E-mail: wqw57@126.com

b 通信作者:教授。研究方向:中药及民族药的质量控制、新药研发。电话:0851-5615344。E-mail: jinfengyun01@163.com

成分研究的深入,双苯吡酮类成分作为知母中重要的化合物得到了肯定。芒果苷和新芒果苷是知母中主要的双苯吡酮类成分。药理研究证明,芒果苷是知母中主要的抗炎、抗病毒和抗氧化成分^[2-3];芒果苷和新芒果苷还有降血糖和改善2型糖尿病症状的作用^[4]。在以往的研究中,知母中芒果苷和新芒果苷的含量测定方法主要为高效液相色谱(HPLC)法^[5]。近年来,采用超高效液相色谱(UPLC)法测定单味中药及复方中有效成分的含量均有报道。UPLC法因其在检测分析时间和流动相使用量方面具有的优势,表现出广阔的应用前景,成为分析中药主要成分的有力工具之一^[6-9]。有文献报道,用于淫羊藿中黄酮类成分的测定,UPLC法比HPLC法灵敏度更高、分析时间更短、溶媒更节约,且不影响其分离效率;两种方法的精密度、重复性和加样回收率结果无显著性差异,样品含量测定

结果接近^[10]。鉴于此,本试验拟建立同时测定知母中新芒果苷和芒果苷含量的UPLC法,用于知母药材的质量评价,并通过比较分析不同产地知母中新芒果苷和芒果苷的含量特征,为知母药材质量的研究提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY Ultra Performance LC UPLC系统,配有二元超高压溶剂系统、自动进样恒温箱样本管理器、柱温箱、光电二极管阵列检测器(PDA)和Empower色谱工作站(美国Waters公司);台式系列数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);CP225D十万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司)。

1.2 试剂

芒果苷、新芒果苷对照品(上海融禾生物科技有限公司,批号分别为110910、110920,含量均>98%);甲醇(色谱纯,德国Merck公司);冰醋酸为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

1.3 药材

知母于2011年9月采自各个产地,均经北京中医药大学王文全教授鉴定为百合科植物知母 *A. asphodeloides* Bge. 的干燥根茎。

野生知母样品取样方法:在取样地多点随机挖取,去掉地上部分、须根及泥沙,根茎总鲜质量一般不少于1 kg,最少不低于500 g。

栽培知母样品取样方法:在不同地块平行取样。每份随机在多点分别挖取数株知母,去掉地上部分、须根及泥沙,根茎总鲜质量不少于1~2 kg。

均于50℃低温烘干,粉碎,混合均匀,备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:0.4%冰醋酸水(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~7 min, 86% A; >7~10 min, 78% A);流速:0.25 ml/min;检测波长:258 nm;柱温:35℃。色谱见图1。

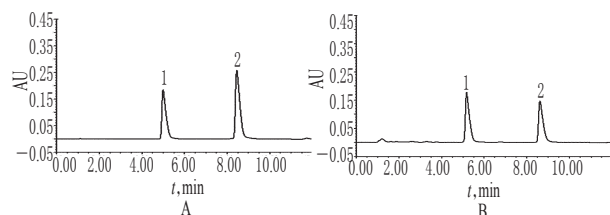


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;1.新芒果苷;2.芒果苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. test samples; 1. neomangiferin; 2. mangiferin

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取新芒果苷和芒果苷对照品各适量,置于同一10 ml量瓶中,以30%甲醇溶解并定容,制成芒果苷、新芒果苷的质量浓度分别为0.057、0.060 mg/ml的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

知母药材干燥粉碎后过五号筛,混匀,称取粉末约0.15 g,

置具塞锥形瓶中,精密加入30%甲醇25 ml,称定质量,超声提取(功率:400 W,频率:40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用30%甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.2 μm针头微孔过滤器滤过后作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液(芒果苷:0.057 mg/ml;新芒果苷:0.060 mg/ml)0.5、2、4、6、8 μl,注入UPLC仪测定。以峰面积积分值(y)为纵坐标,进样量(x)为横坐标,绘制标准曲线,计算得芒果苷和新芒果苷的回归方程分别为 $y = 2E+07X - 72\ 898$ ($r = 0.999\ 9, n = 5$)、 $y = 1E+07X - 42\ 964$ ($r = 0.999\ 9, n = 5$)。结果表明,芒果苷和新芒果苷的进样量分别在0.028 5~0.456 0、0.030 0~0.480 0 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液3 μl,按“2.1”项下色谱条件重复进样6次,测定峰面积。结果,芒果苷和新芒果苷的RSD分别为0.085%、0.092% (n 均为6),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一样品药材粉末(河北安国市)制备的供试品溶液适量,分别于1、2、4、6、8、12 h注入UPLC仪,按“2.1”项下色谱条件测定峰面积。结果,芒果苷和新芒果苷的RSD分别为1.18%、2.93% (n 均为6),表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.7 重复性试验

取同一样品药材粉末(河北安国市)适量,共6份,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,照“2.1”项下色谱条件进样3 μl,测定峰面积,并计算芒果苷和新芒果苷的质量分数。结果,样品中新芒果苷和芒果苷的平均质量分数分别为0.705 3%和1.073 3%,RSD分别为2.95%、1.23% (n 均为6),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取0.075 g已知含量的样品药材粉末(河北安国市)适量,共6份,分别精密加入新芒果苷和芒果苷对照品溶液适量,照“2.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests ($n=6$)

成分	称样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
芒果苷	0.075 0	0.805 0	0.801 0	1.596 5	98.82	100.17	2.78
	0.074 9	0.803 9	0.801 0	1.630 5	103.19		
	0.075 2	0.807 1	0.801 0	1.595 2	98.39		
	0.075 0	0.805 0	0.801 0	1.632 8	103.35		
	0.075 0	0.805 0	0.801 0	1.584 6	97.33		
	0.075 2	0.807 1	0.801 0	1.625 9	102.22		
新芒果苷	0.075 0	0.529 0	0.500 0	1.020 6	98.32	97.67	2.87
	0.074 9	0.528 3	0.500 0	1.013 9	97.13		
	0.075 2	0.530 4	0.500 0	1.049 1	103.74		
	0.075 0	0.529 0	0.500 0	1.009 5	96.11		
	0.075 0	0.529 0	0.500 0	1.006 2	95.45		
	0.075 2	0.530 4	0.500 0	1.015 5	97.02		

2.9 样品含量测定

分别取不同产地的知母药材样品各适量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品中芒果苷和新芒果苷的质量分数,结果见表2。再采用SPSS17.0统计软件对不同产地知母药材中新芒果苷和芒果苷的质量分数进行比较。

表2 不同产地知母中芒果苷和新芒果苷的含量测定结果
(%, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 2 Content determination of neomangiferin and mangiferin in *A. asphodeloides* from different habitats (% , $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

产地	芒果苷	新芒果苷
河北易县西陵镇	1.41±0.06	0.38±0.06
河北涞源县团圆村	1.12±0.04	0.79±0.04
山西灵丘县三山村	0.71±0.02	0.60±0.01
山西榆社县段家庄村	0.81±0.02	0.49±0.01
山西榆社县银郊村	0.91±0.01	1.10±0.02
山西和顺县红堡沟村	1.27±0.02	0.46±0.01
山西孟县中北村	0.95±0.03	1.05±0.04
山西寿阳县司家沟村	1.21±0.03	0.95±0.03
内蒙古通辽市科尔沁区	1.46±0.06	0.71±0.07
黑龙江大庆市红岗区	0.44±0.02	0.72±0.02
黑龙江杜尔伯特县	0.76±0.05	1.03±0.04
河北安国市	1.08±0.04	0.70±0.01

3 讨论

试验中考察了不同提取溶剂和不同超声提取时间。分别以30%、50%、70%、100%甲醇和30%、50%、70%、100%乙醇为溶剂,测定同一份样品(河北安国市),结果发现以30%甲醇对芒果苷和新芒果苷提取较完全,且峰形最好。选择超声15、30、45 min提取同一份样品(河北安国市),结果表明随着提取时间的增加,提取率也不断提高,但提取45 min时的提取率与30 min相差不大,综合考虑,最终选择提取时间为30 min。

试验考察了乙腈-甲醇与0.1%、0.2%、0.3%、0.4%冰醋酸水和0.1%、0.2%磷酸水的不同配比流动相系统。结果显示,采用0.4%冰醋酸水-甲醇系统为流动相,样品中2种成分分离效果最好。

本试验建立的UPLC法快速、准确、高效,可同时测定知母药材中新芒果苷和芒果苷的含量。比较文献报道的方法^[9],其分析时间短、溶剂消耗少、分离效果和分析效率大幅度提高,适合大样本量分析。

对不同产地知母药材中新芒果苷和芒果苷的质量分数数据经单因素方差分析表明:不同产地知母中新芒果苷和芒果苷的质量分数存在显著性差异($P<0.01$)。2010年版《中国药

典》(一部)规定知母中芒果苷的质量分数不得低于0.7%,由表2可知黑龙江大庆市红岗区样品中芒果苷的质量分数未达到《中国药典》标准,而河北易县西陵镇和内蒙古通辽市科尔沁区样品中芒果苷的质量分数最高,分别为1.41%和1.46%。河北易县西陵镇是“西陵知母”的道地产地,所产知母质量最优,提示临床用药时应考虑知母药材的产地。另外,不同产地知母药材中化学成分的差异是受到环境作用的影响还是遗传因素的影响,尚需要进一步研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:197.
- [2] Li X, Cui X, Sun X, et al. Mangiferin prevents diabetic nephropathy progression in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(6): 893.
- [3] Miura T, Ichiki H, Hashimoto I, et al. Antidiabetic activity of a xanthone compound, mangiferin [J]. *Phytomedicine*, 2001, 8(2): 85.
- [4] 王颖异, 郭宝林, 张立军. 知母化学成分的药理研究进展[J]. 科技导报, 2010, 28(12): 110.
- [5] 陈万生, 李力, 乔传卓, 等. 不同产地知母中芒果甙、新芒果甙的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(2): 87.
- [6] Avula B, Wang YH, Rumalla CS, et al. Analytical methods for determination of magnoflorine and saponins from roots of *Caulophyllum thalictroides* (L.) Michx. Using UPLC, HPLC and HPTLC[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 56(5): 895.
- [7] Guan J, Lai CM, Li SP. A rapid method for the simultaneous determination of 11 saponins in *Panax notoginseng* using ultra performance liquid chromatography[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(4): 996.
- [8] Li SP, Zhao J, Yang B. Strategies for quality control of Chinese medicines[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55(4): 802.
- [9] 朱红, 周旭, 袁海龙, 等. UPLC法测定连翘中连翘苷的含量[J]. 中国药房, 2012, 23(31): 2922.
- [10] 陈肖家, 李绍平, 王一涛, 等. HPLC、UPLC、CZE测定淫羊藿中黄酮类成分含量的比较研究[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(8): 624.

(收稿日期:2012-09-25 修回日期:2012-11-29)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊, 欢迎投稿、订阅