

HPLC法测定知柏地黄丸中芒果苷的含量

邓树强*,陈彩瑜(广东省惠东县人民医院,广东惠东 516300)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)32-3054-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.32.25

摘要 目的:建立测定知柏地黄丸中芒果苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent ODS C₁₈柱,流动相为乙腈-0.2%冰醋酸水溶液(15:85, V/V),流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,检测波长为258 nm,进样量为10 μl。结果:芒果苷的检测质量浓度在2.5~7.5 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 8$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD均 $\leq 0.96\%$;平均加样回收率为99.45%,RSD=0.75%($n=9$)。结论:该方法操作简便、快速、准确,适用于测定知柏地黄丸中芒果苷的含量。

关键词 知柏地黄丸;芒果苷;高效液相色谱法;含量测定

Content Determination of Mangiferin in Zhibai Dihuang Pills by HPLC

DENG Shu-qiang, CHEN Cai-yu (Huidong County People's Hospital, Guangdong Huidong 516300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of mangiferin in Zhibai dihuang pills. METHOD: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent ODS C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% glacial acetic acid (15:85, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 30 ℃, and the detection wavelength was set at 258 nm. The sample size was 10 μl. RESULTS: The linear range of mangiferin was 2.5-7.5 μg/ml ($r=0.999\ 8$) with an average recovery of 99.45% (RSD=0.75%, $n=9$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 0.96%. CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and accurate, which can be used for the content determination of mangiferin in Zhibai dihuang pills.

KEY WORDS Zhibai dihuang pills; Mangiferin; HPLC; Content determination

知柏地黄丸是由知母、黄柏、熟地黄、山茱萸(制)、牡丹皮、山药、泽泻和茯苓组成^[1]。该方载于《医学金鉴》,为传统的中药方剂,具有滋阴降火之功效,临床用于治疗阴虚火旺、潮热盗汗、口干咽痛、耳鸣遗精、小便短赤。知柏地黄丸(浓缩丸)收载于卫生部药品标准,原标准项下除了显微镜鉴别项和常规检查外,无其他检测项目。方中知母为君药,芒果苷是知母清热作用的有效成分,同时相关研究^[2-5]表明,芒果苷具有免疫活性、抗菌活性、抗单纯疱疹病毒活性,有抗氧化、抗糖尿病、抗肿瘤等作用。为进一步完善知柏地黄丸的质量标准,本研究建立了以高效液相色谱(HPLC)法测定该药中芒果苷含量的方法。

1 材料

Agilent 1100 HPLC仪及工作站(美国安捷伦公司);AB265-S型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);HHS112型恒温水浴箱(山东甄城华鲁电热仪器有限公司);AS20500A型超声波清洗器(天津Auto Science公司)。

芒果苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111607-200301);知柏地黄丸(浓缩丸,河南省宛西制药股份有限公司,批号:090912、100410、101110);知母、黄柏、熟地黄、山茱萸(制)、牡丹皮、山药、泽泻、茯苓药材(均购自广州市同健医药连锁有限公司);乙醇、冰醋酸、石油醚(分析纯,均购自广州化学试剂厂);乙腈(色谱纯,美国Sigma公司);水为纯化水。

2 方法与结果

* 主管药师,本科。研究方向:医院药学。E-mail: hdyaojike@163.com

2.1 色谱条件^[6-8]

色谱柱:Agilent ODS C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.2%冰醋酸水溶液(15:85, V/V);检测波长:258 nm;流速:1 ml/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取芒果苷对照品适量,置于250 ml量瓶中,用乙醇溶解并稀释至刻度,即得对照品溶液(质量浓度为5 μg/ml)。

2.2.2 供试品溶液 取知柏地黄丸样品适量,研细,取细粉约5 g,精密称定,置于100 ml锥形瓶中,加石油醚(60~90 ℃)40 ml,超声处理(功率:250 W,频率:50 kHz)20 min,放冷,滤过,弃去滤液,挥干,残渣精密加入乙醇50 ml,称定,水浴回流提取1 h,取出,放冷,再称定,用乙醇补足减失的质量,摇匀,取上清液,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 按处方比例称取除去知母外的其他药材适量,依照知柏地黄丸的制备工艺制备阴性样品,并按“2.2.2”项下制备方法进行处理,即得阴性对照溶液。

2.3 系统适用性和专属性试验

按“2.1”项下色谱条件,分别精密吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照溶液各10 μl,注入HPLC仪进样,记录色谱,详见图1。由图1可见,供试品色谱在与对照品色谱相应保留时间处有一相同的色谱峰,而阴性对照色谱在此处无干扰。

2.4 线性关系考察

精密称取芒果苷对照品适量,加乙醇制成每1 ml含25 μg的溶液,作为对照品贮备液。分别精密量取上述对照品贮备

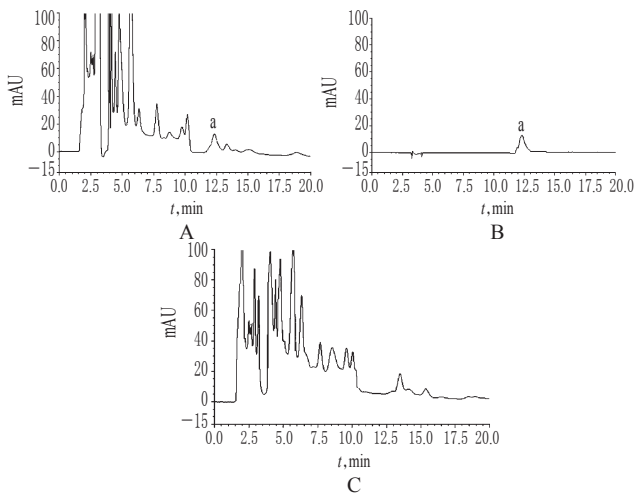


图1 高效液相色谱图

A. 供试品; B. 对照品; C. 阴性对照; a. 芒果苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. test samples; B. substance control; C. negative control; a. mangiferin

液1、1.2、1.6、2、2.5、3 ml,置于10 ml量瓶中,加乙醇稀释至刻度,摇匀,得系列质量浓度溶液,按照“2.1”项下色谱条件进样测定。以峰面积(y)为纵坐标,检测质量浓度(x)为横坐标,进行线性回归,得回归方程 $y=3.778 1x-7.622 8(r=0.999 8)$ 。结果表明,芒果苷检测质量浓度在2.5~7.5 $\mu\text{g/ml}$ 范围内与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“2.2.1”项下芒果苷对照品溶液10 μl ,按“2.1”项下色谱条件重复进样6次,测定。结果,RSD=0.13%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下同一供试品溶液适量,分别于0、1、2、6、12、24 h按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,RSD=0.79%,表明供试品溶液在24 h内质量稳定。

2.7 重复性试验

取知柏地黄丸样品(批号:101110)6份,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定和计算含量。结果,含芒果苷的量平均为0.614 mg/g,RSD=0.96%,表明本方法重复性较好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含芒果苷量(0.486 mg/g)的样品9份,每份1 g,分别按80%、100%、120%的比例精密加入对照品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表1。

2.9 样品含量测定

分别取知柏地黄丸3批样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算含量,结果见表2。

3 讨论

以芒果苷对照品溶液进样,在200~400 nm波长范围内扫描,发现在240、258 nm波长处均有较大吸收,但在240 nm波长处杂质成分的吸收也较强,故以258 nm波长作为芒果苷的检测波长。

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

编号	所含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
1	0.486 0	0.385 0	0.858 2	98.53		
2	0.486 0	0.385 0	0.863 3	99.12		
3	0.486 0	0.385 0	0.875 0	100.46		
4	0.486 0	0.481 0	0.956 0	98.86		
5	0.486 0	0.481 0	0.961 3	99.41	99.45	0.75
6	0.486 0	0.481 0	0.959 8	99.26		
7	0.486 0	0.577 0	1.072 0	100.87		
8	0.486 0	0.577 0	1.057 0	99.42		
9	0.486 0	0.577 0	1.054 0	99.17		

表2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of content determination of samples(n=3)

批号	含芒果苷的量,mg/g
090912	0.486
100410	0.543
101110	0.611

在选择流动相时,通过调节乙腈和水的比例无法实现芒果苷与相邻组分的基线分离。加入冰醋酸改善了峰形,且将相邻的两个峰的保留时间相对拉开,使分离度大于1.5,因此最终确定流动相为乙腈-0.2%冰醋酸水溶液(15:85, V/V)。

从本试验样品含量测定结果可知,产品中芒果苷含量变化较大。笔者认为,这可能主要是由药材的产地及采收季节不同所导致。建议生产厂家加强对原料药材的质量监控,并制定相应的质控指标。

综上所述,本研究采用HPLC法测定知柏地黄丸中芒果苷的含量,方法学验证结果表明,其精密度、稳定性、重复性等均能满足定量的要求,且方法简便、快速、准确,适用于测定知柏地黄丸及相关药材中芒果苷的含量。

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, 2010:821.
- [2] Yoshikawa M, Shimoda H, Nishida N, *et al.* Salacia reticulate and its polyphenolic constituents with lipase inhibitory and lipolytic activities have mild antiobesity effects in rats[J]. *J Nutr*, 2002, 132(7): 1 819.
- [3] Muruganandan S, Gupta S, Kataria M, *et al.* Mangiferin protects the streptozotocin-induced oxidative damage to cardiac and renal tissues in rats[J]. *Toxicology*, 2002, 176(3): 165.
- [4] 邱堃, 饶惠民, 孙羽, 等. 知柏地黄丸对甲状腺功能亢进症患者抗氧化指标的影响[J]. 医学综述, 2012, 18(21): 3 699.
- [5] 徐佩莉. 知柏地黄丸新用[J]. 新中医, 2005, 37(11): 76.
- [6] 刘亚华, 武一曼. 知柏地黄丸质量标准研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(11): 2 686.
- [7] 翁晓明, 李智林. 高效液相色谱法测定知柏地黄丸中盐酸小檗碱和丹皮酚含量[J]. 中国医院药学杂志, 2001, 21(1): 21.
- [8] 黄海滨, 李学坚, 梁秋云. RP-HPLC法测定芒果叶中芒果苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(9): 839.

(收稿日期:2013-03-06 修回日期:2013-07-05)