

HPLC 法测定盐炙前后知母中新芒果苷、芒果苷和异芒果苷

宋泽璧^{1,2,3}, 吴莹^{1,2,3}, 高慧^{1,2,3*}

1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600

2. 国家中医药管理局中药炮制原理解析重点研究室, 辽宁 大连 116600

3. 辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁 大连 116600

摘要 目的 建立 HPLC 法同时测定盐炙前后知母中新芒果苷、芒果苷、异芒果苷, 并比较盐炙前后 3 种成分的差异。**方法** 采用 HPLC 法, Ecosil 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.2%冰醋酸, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 258 nm, 柱温室温, 进样量 10 μL。**结果** 新芒果苷、芒果苷、异芒果苷分别在 0.860 0~17.200 0 μg、0.806 5~16.130 0 μg、0.039 0~0.780 0 μg 与峰面积的线性关系良好; 平均回收率分别为 98.32%、98.30%、97.27%, RSD 值分别为 0.87%、0.74%、0.71% (n=6)。知母盐炙后新芒果苷、异芒果苷的量减少, 而芒果苷的量增加。**结论** 该方法准确、专属性强、灵敏度高, 可用于知母中新芒果苷、芒果苷、异芒果苷的质量控制方法。新芒果苷、芒果苷之间可能在炮制过程中发生了转化, 可为进一步研究盐炙炮制机制提供参考。

关键词: 知母; 盐炙; 芒果苷; 新芒果苷; 异芒果苷; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2015)02-0145-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.02.007

Determination of neomangiferin, mangiferin, and isomangiferin in *Anemarrhenae Rhizoma* before and after stir-frying with salt-water by HPLC

SONG Ze-bi^{1,2,3}, WU Ying^{1,2,3}, GAO Hui^{1,2,3}

1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

2. Key Laboratory of Processing Theory Analysis of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

3. Engineering Technology Research Center of Traditional Chinese Medicine processing of Liaoning Province, Dalian 116600, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of neomangiferin, mangiferin, and isomangiferin in *Anemarrhenae Rhizoma* before and after stir-frying with salt-water, and to compare the difference among three main components before and after stir-frying with salt-water. **Methods** The determination was performed on Ecosil column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile - 0.2% acetic acid solution with gradient elution by HPLC. The detective wavelength was set at 258 nm. The temperature of column was set at room temperature. The flow rate was 1.0 mL/min with injection volume of 10 μL. **Results** There was good linear relationship between peak areas and contents of neomangiferin, mangiferin, and isomangiferin in the range of 0.860 0 — 17.200 0 μg, 0.806 5 — 16.130 0 μg, and 0.039 0 — 0.780 0 μg. The average recovery was 98.32%, 98.30%, and 97.27% with RSD value of 0.87%, 0.74%, and 0.71% (n = 6), respectively. Contents of neomangiferin and isomangiferin decreased, but that of mangiferin increased in stir-fried products of *Anemarrhenae Rhizoma* with salt-water. **Conclusion** The method is accurate, specific, and highly sensitive for determination of neomangiferin, mangiferin, and isomangiferin in stir-fried products of *Anemarrhenae Rhizoma* with salt-water. Structure transformations between neomangiferin and mangiferin may occur during stir-frying with salt-water, which may provide further reference for procession mechanism of *Anemarrhenae Rhizoma*.

Key words: *Anemarrhenae Rhizoma*; stir-frying with salt-water; mangiferin; neomangiferin; isomangiferin; HPLC

收稿日期: 2014-05-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81102810); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20112133120009)

作者简介: 宋泽璧, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制原理研究。Tel: 15841160920 E-mail: 809678491@qq.com

*通信作者 高慧, 副教授, 博士, 研究方向为中药炮制原理研究。Tel: (0411) 5890146 E-mail: gaohutcm@163.com

知母为百合科知母属植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bunge 的干燥根茎, 具有清热泻火、生津润燥等功效^[1], 为我国传统的常用中药。盐知母是临床上常用的炮制品种, 被历版《中国药典》所收载。传统理论认为知母盐炙后能够引药入肾经, 增强滋阴降火的作用^[2]。知母中主要化学成分为皂苷类和双苯吡酮类。前期本课题组对知母盐炙前后皂苷类成分的量进行了比较, 结果表明, 盐炙使皂苷类成分的量发生变化, 不同皂苷之间可能发生了转化^[3-4]。本实验建立了高效液相色谱 (HPLC) 法同时测定知母中 3 种双苯吡酮类的方法, 并比较知母盐炙前后 3 种成分的变化, 为知母盐炙原理的深入解析提供参考依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪 (Waters e2695、Waters 2998 PDA、自动进样装置), KQ-250DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), FA10004B 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司), Mettler AE240 型十万分之一分析天平 (瑞士 Mettler 公司)。

1.2 材料

新芒果苷 (批号 20131214)、异芒果苷 (批号 20121221) 对照品购自上海源叶生物科技有限公司, 质量分数 $\geq 98\%$; 芒果苷对照品 (批号 111607-200402) 购自中国食品药品检定研究院, 质量分数 $\geq 98\%$ 。知母饮片 (批号 1204167) 购于四川新荷花中药饮片股份有限公司 (简称新荷花), 知母药材采自河北省易县西陵镇太和庄、龙泉庄, 经辽宁中医药大学药学院王冰教授鉴定为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bunge 的干燥根茎。乙腈为色谱纯 (瑞典 Oceanpak 公司)、水为娃哈哈纯净水, 其余试剂均为分析纯。

盐知母按前期优选的工艺自行炮制^[5], 即知母饮片 100 g 加入 30 mL 盐水 (含 3 g 食盐) 拌匀润透, 150~160 °C 炒制 8 min。得率为 99.12%。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Ecosil 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相乙腈 (A) - 0.2% 冰醋酸 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 10%A; 10~25 min, 15%A), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 258 nm, 柱温室温, 进样量 10 μ L。

2.2 对照品溶液制备

精密称取新芒果苷、芒果苷、异芒果苷对照品适量, 用甲醇溶解, 配制成质量浓度分别为 0.860 0 mg/mL、0.806 5 mg/mL、0.039 0 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

称取知母样品 (过三号筛) 约 0.25 g, 精密称定, 置于 250 mL 具塞锥形瓶中, 加稀乙醇约 100 mL, 称定质量, 超声提取 1 h (功率 100 W, 频率 40 kHz), 放冷后补足失去的质量, 滤过, 滤液蒸干, 置 10 mL 量瓶中, 用少许稀乙醇溶解, 加稀乙醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液 1、5、10、15、20 μ L, 分别注入 HPLC 仪, 测定峰面积值。以峰面积为纵坐标, 进样质量为横坐标, 进行回归分析, 得回归方程。新芒果苷: $Y=1.221 \times 10^9 X+1.361 \times 10^6$ ($r=0.999\ 5$); 芒果苷: $Y=3.774 \times 10^9 X+5.313 \times 10^5$ ($r=0.999\ 7$); 异芒果苷: $Y=4.016 \times 10^9 X-2.078 \times 10^4$ ($r=0.999\ 6$), 表明新芒果苷、芒果苷、异芒果苷分别在 0.860 0~17.200 0 μ g、0.806 5~16.130 0 μ g、0.039 0~0.780 0 μ g 与峰面积的线性关系良好。

2.5 精密度试验

取混合对照品溶液, 重复进样 6 次, 测定新芒果苷、芒果苷、异芒果苷峰面积, 计算得其 RSD 值分别为 1.45%、1.67%、1.23%。

2.6 稳定性试验

取新荷花生品样品, 制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样测定。结果供试品溶液中新芒果苷、芒果苷、异芒果苷峰面积的 RSD 值分别为 1.37%、1.42%、1.39%。表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取新荷花知母生品样品 6 份, 制备供试品溶液, 进样测定峰面积, 计算质量分数, 结果新芒果苷、芒果苷、异芒果苷质量分数的 RSD 值分别为 1.29%、1.42%、1.56%。

2.8 加样回收率试验

取新荷花知母生品 (含新芒果苷 2.340%、芒果苷 0.900%、异芒果苷 0.067%) 的知母样品粉末 6 份, 每份约 0.125 g, 精密称定, 分别加入 0.990 2 mg/mL 新芒果苷对照品溶液 3 mL, 0.556 4 mg/mL

芒果苷对照品溶液 2 mL, 0.174 8 mg/mL 异芒果苷对照品溶液 50 μ L, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算回收率, 结果新芒果苷、芒果苷、异芒果苷的平均回收率分别为 98.32%、98.30%、97.27%, RSD 值分别为 0.87%、0.74%、0.71% ($n=6$)。

2.9 样品测定

取生知母、盐知母样品适量, 制备供试品溶液, 进样测定, 采用外标法计算质量分数, 色谱图见图 1, 结果见表 1。

知母盐炙后, 新芒果苷、异芒果苷的量降低, 而芒果苷的量升高, 因盐知母的得率为 99.12%, 质量变化微小, 故新芒果苷、异芒果苷的量变化的原因不是由盐炙过程中失重造成的。推测可能在盐炙加热过程中, 新芒果苷结构中的糖苷基 (O-glc) 发生断裂, 转化成芒果苷 (图 2), 从而出现新芒果苷的量降低, 而芒果苷的量升高。

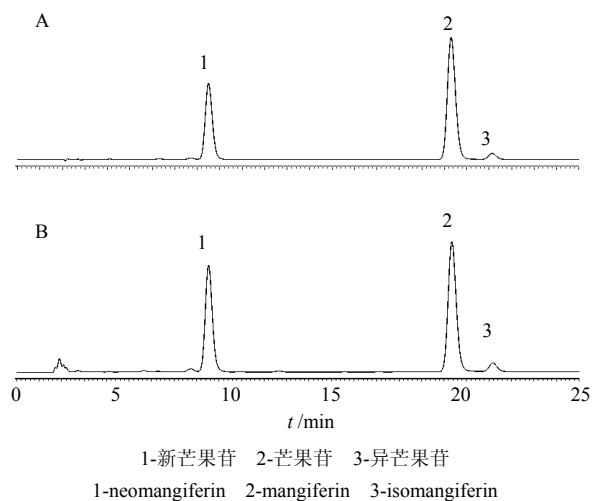


图 1 混合对照品 (A) 和盐炙知母 (B) 的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixture reference substance (A) and *Anemarrhenae Rhizoma* stir-frying with salt-water (B)

表 1 知母炮制前后新芒果苷、芒果苷、异芒果苷的测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of neomangiferin, mangiferin, and isomangiferin in *Anemarrhenae Rhizoma* before and after processed with salt ($n=3$)

样品	产地	质量分数/%		
		新芒果苷	芒果苷	异芒果苷
生品	龙泉庄	2.580	0.780	0.077
	太和庄	2.720	0.710	0.074
	新荷花	2.340	0.900	0.067
盐炙品	龙泉庄	1.910	0.860	0.061
	太和庄	2.180	0.800	0.063
	新荷花	1.450	1.230	0.057

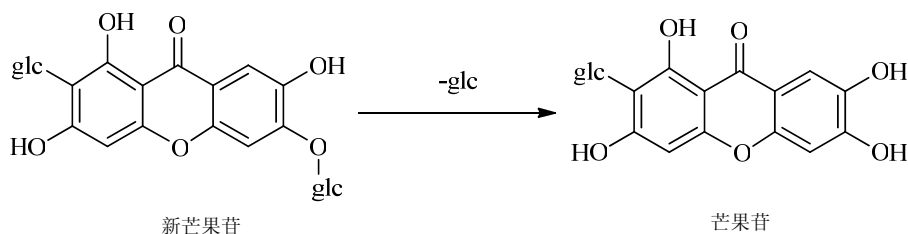


图 2 新芒果苷转化为芒果苷的过程
Fig. 2 Process of neomangiferin transformed into mangiferin

3 讨论

实验中分别考察了超声提取和回流提取, 提取溶剂选用了稀乙醇、70%乙醇、50%甲醇、甲醇, 提取溶剂的用量比较了 50、100、150 mL, 提取时

间选取了 0.5、1、2、3 h, 根据实验结果及综合考虑操作简单、快速等方面, 最终选用 100 mL 稀乙醇超声提取 1 h 的方法。实验中对这 3 种成分进行了全波长扫描, 结果在 258 nm 下测定最佳。实验

中分别考察了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.2%冰醋酸溶液等流动相系统,结果显示,乙腈-水,甲醇-水系统测定结果有拖尾现象,乙腈-0.2%冰醋酸溶液的分离、峰型都较好,故选用乙腈-0.2%冰醋酸溶液作为流动相。

芒果苷、芒果苷、异芒果苷均为知母中主要的双苯吡酮成分。本实验建立了HPLC法同时测定盐炙前后知母中新芒果苷、芒果苷、异芒果苷的方法,通过考察知母中主要的双苯吡酮类成分盐炙前后的变化,为盐知母炮制原理的解析寻找实验依据。芒果苷具有抗炎解热、降血糖等功效^[6-8],炮制后的量增加,是盐知母滋阴降火作用增强的物质基础之一,可为进一步研究盐知母炮制机制提供参考依据。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 197-198.

[2] 贾天柱. 中药炮制学 [M]. 上海: 上海科学技术出版

社, 2008: 196.

[3] 吴莹, 高慧, 宋泽璧. HPLC-CAD法测定盐制前后知母中知母皂苷BⅡ和菝葜皂苷元 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(7): 737-741.

[4] 吉星, 冯毅凡. 知母中皂苷类成分研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 附12-附15.

[5] 高慧. 盐知母炮制原理研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2010.

[6] 邓家刚, 郭力城, 郑作文. 芒果苷对豚鼠肺组织释放慢反应物质的影响 [J]. 广西中医药, 2008, 31(3): 58-59.

[7] Prabhu S, Jainu M, Sabitha K E, *et al.* Role of mangiferin on biochemical alterations and antioxidant status in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 107(1): 126-133.

[8] Miura T, Iwamoto N, Kato M, *et al.* The suppressive effect of mangiferin with exercise on blood lipids in type 2 diabetes [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(9): 1091-1092.