

HPLC 法测定生知母和盐知母中芒果苷和菝葜皂苷元

党小平,毛春芹*,陆兔林,徐佳佳,王 静

(南京中医药大学,江苏 南京 210046)

摘要:目的 建立测定生知母和盐知母中芒果苷和菝葜皂苷元的方法。方法 分别采用 HPLC-UV 法和 HPLC-ELSD 法测定芒果苷和菝葜皂苷元。测定芒果苷的色谱条件:Kromasil 柱(250 mm ×4.6 mm,5 μm);水-乙腈-0.85%磷酸(100 25 5)为流动相;体积流量为 0.6 mL/min;柱温为 30 °C;检测波长为 258 nm。测定菝葜皂苷元的色谱条件:Kromasil 柱(250 mm ×4.6 mm,5 μm);甲醇-水(95 5)为流动相;体积流量为 1.0 mL/min;柱温 30 °C;用蒸发光散射检测器检测,漂移管温度 85 °C。结果 盐知母中芒果苷和菝葜皂苷元的量均有所升高。结论 本方法可用于生知母和盐知母中芒果苷和菝葜皂苷元的测定,并为其全面质量控制提供参考。

关键词:知母;盐知母;芒果苷;菝葜皂苷元;高效液相色谱

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)02-0236-03

知母具有清热泻火、生津润燥的功效,临床用于外感热病,高热烦渴,肺热燥咳,骨蒸潮热,内热消渴,肠燥便秘等症^[1]。知母中含菝葜皂苷元、芒果苷等成分。芒果苷是知母清热作用的有效成分^[2],同时具有免疫活性、抗菌活性、抗单纯疱疹病毒活性,有抗氧化、抗糖尿病、抗肿瘤作用,对脂质有抑制效应,有护肝、抗肥胖效应,在骨吸收方面有重要的抑制效应等^[3]。菝葜皂苷元是《中国药典》2005 年版一部规定的指标性成分。本实验采用高效液相法对生知母和盐知母中的菝葜皂苷元和芒果苷进行了测定,为筛选最佳炮制工艺、制定知母饮片的质量标准及其临床应用提供依据。

1 仪器与试剂

LC—10ATvp 型高效液相色谱仪(日本岛津);PL—ELSD1000 检测器(英国 Polymer Laboratories);2200 型超声波清洗机(淮阴汉邦科技);Mettler AG285 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多集团)。

菝葜皂苷元(批号 110744-20040)、芒果苷(批号 111607-200301)对照品由中国药品生物制品检定所提供。知母药材购自河北省,经本校鉴定教研室鉴定为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bunge 的干燥根茎。甲醇、乙腈为色谱纯,水为重蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 知母炮制品的制备^[4]

2.1.1 生知母的制备:取原药材,除去毛状物及杂

质,洗净,润透,切厚片,干燥,筛去毛屑。

2.1.2 盐知母的制备:取净知母片,用盐水润后,置炒制容器内,文火加热,炒干,取出晾凉,筛去碎屑。知母片每 100 kg 用食盐 2 kg。

2.2 芒果苷的 HPLC 法测定

2.2.1 色谱条件:Kromasil 柱(250 mm ×4.6 mm,5 μm);水-乙腈-0.85%磷酸(100 25 5)为流动相;体积流量为 0.6 mL/min;柱温为 30 °C;检测波长为 258 nm。

2.2.2 对照品溶液的制备:精密称取芒果苷对照品适量,加甲醇制成 0.354 mg/mL 的溶液,作为对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备:取生、盐知母饮片,分别打粉过 50 目筛,各取知母粉 0.1 g,精密称定,置离心管中,加入 50%乙醇 15 mL,超声 30 min,离心 20 min,用吸管吸取置蒸发皿中,如此操作 3 次,挥干溶剂,用 50%甲醇定容于 25 mL 量瓶中。过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.2.4 线性关系的考察:分别精取芒果苷对照品溶液 0.25、0.5、0.75、1.0、1.25 mL,加甲醇定容至 5 mL,在上述色谱条件下重复进样两次,每次 10 μL,测定峰面积值。以峰面积平均值和质量浓度进行回归处理,结果芒果苷在 17.7~88.5 μg/mL 线性良好,回归方程为 $Y = 6764.005.65X - 69421.2$, $r = 0.9999$ 。

2.2.5 精密度试验:取同一对照品溶液进行试验,

* 收稿日期:2008-04-26

基金项目:国家“十五”攻关课题(2001BA701A55)

作者简介:党小平(1983—),男,陕西渭南人,南京中医药大学 2006 级硕士研究生,主要研究方向为中药质量控制及新药开发研制工作。

Tel:13776665267 E-mail:dxp219@126.com

*通讯作者 毛春芹 Tel:(025)85811513 E-mail:mcq63@163.com

每次进样 10 μ L,连续进样 6 次,测定芒果苷峰面积值,计算得 RSD 为 0.336 %。

2.2.6 稳定性试验:取生知母供试品溶液,每次进样 10 μ L,在 0、2、4、6、8、10 h 各进样两次,测定芒果苷峰面积平均值,RSD 为 2.53 %。结果表明样品在 10 h 内稳定。

2.2.7 重现性试验:取生知母样品 5 份,制备供试品溶液,进样两次,每次进样 10 μ L,测定芒果苷峰面积平均值,计算求得平均质量分数为 0.77 %,RSD 为 2.65 %。

2.2.8 加样回收率试验:取含芒果苷 0.77 %的生知母切片,打粉过 50 目筛,取知母粉 0.05 g,平行 9 份,精密称定,分别精密加入 0.308 0、0.384 1、0.460 2 mg 芒果苷对照品,制备供试品溶液,进行测定,计算回收率,结果平均回收率为 97.55 %,RSD 为 1.62 % ($n=9$)。

2.2.9 芒果苷的测定:取生知母和盐知母样品,分别制备供试品溶液,进样测定芒果苷峰面积值,代入回归方程测定芒果苷的质量分数,结果分别为 0.7686 %,RSD 为 2.6 % ($n=3$);0.816 9, RSD 为 2.8 % ($n=3$),色谱图见图 1。

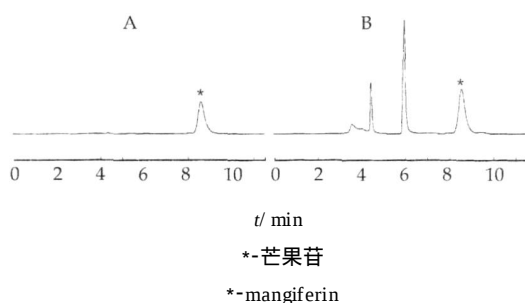


图 1 芒果苷对照品(A)和知母(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of mangiferin reference substance (A) and Rhizoma Anemarrhense (B)

2.3 蒺藜皂苷元的 HPLC 法测定

2.3.1 色谱条件:Kromasil 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);甲醇-水(95 : 5)为流动相;体积流量为 1.0 mL/min;柱温 30 $^{\circ}$ C;用蒸发光散色检测器检测,漂移管温度 85 $^{\circ}$ C。

2.3.2 对照品溶液的制备:精密称取蒺藜皂苷元对照品适量,加甲醇制成 1.96 mg/mL 的溶液,作为对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备:取生、盐知母饮片,分别打粉过 50 目筛,各取知母粉 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入乙醇 25 mL,称定质量,浸泡

过夜,超声处理(功率 200 W,频率 30 kHz)40 min,放冷,再称定质量,用乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 10 mL,蒸干,加水 10 mL,盐酸 1 mL,加热回流 2 h,取出,冷至室温,边振摇边滴加 40 %氢氧化钠溶液至溶液颜色由橙黄变为橙红,用三氯甲烷振摇提取 2 次,每次 30 mL,合并三氯甲烷液,蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 10 mL 量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.4 线性关系的考察:分别精取蒺藜皂苷元对照品溶液 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mL,加甲醇定容至 5 mL,在上述色谱条件下重复进样 2 次,每次 10 μ L,测定峰面积值。以峰面积平均值对数和质量浓度的对数进行回归处理,结果蒺藜皂苷元在 0.98 ~ 7.84 μ g 线性关系良好,其回归方程为 $Y = 1.604 9 X + 2.528 2$, $r = 0.999 5$ 。

2.3.5 精密度试验:取同一蒺藜皂苷元对照品溶液进行试验,每次进样 10 μ L,连续进样 6 次,测定蒺藜皂苷元峰面积值,计算得其 RSD 为 1.32 %。

2.3.6 稳定性试验:取生知母样品溶液进行试验,每次进样 10 μ L,在 0、2、4、6、8、10 h 各进样两次,测定蒺藜皂苷元峰面积,计算得其 RSD 为 2.92 %。结果表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.3.7 重现性试验:取生知母样品 5 份,制备供试品溶液,各进样两次,每次进样 10 μ L,测定蒺藜皂苷元峰面积,计算求得平均质量分数为 1.33 %,RSD 为 2.95 %。

2.3.8 加样回收率试验:取生知母饮片,打粉过 50 目筛,取知母粉 0.25 g,平行 9 份,精密称定,置具塞锥形瓶中,再加入 5.92、6.56、7.2 mg 蒺藜皂苷元对照品,制备供试品溶液,进行测定,计算回收率,结果平均回收率为 96.81 %,RSD 为 1.38 %。

2.3.9 蒺藜皂苷元的测定:取生知母和盐知母样品,分别制备供试品溶液,进样测定蒺藜皂苷元峰面积值,代入回归方程测定蒺藜皂苷元的质量分数,结果分别为 1.34 %,RSD 为 2.3 % ($n=3$);1.82 %,RSD 为 2.7 % ($n=3$),色谱图见图 2。

3 讨论

本实验采用 HPLC 法对知母中芒果苷进行了方法学考察,并考察了知母芒果苷的最佳提取溶剂,提取方式。从实验结果来看,用 50 %乙醇超声提取的方式提取的比较完全且简便易行,且快速准确,重现性好。

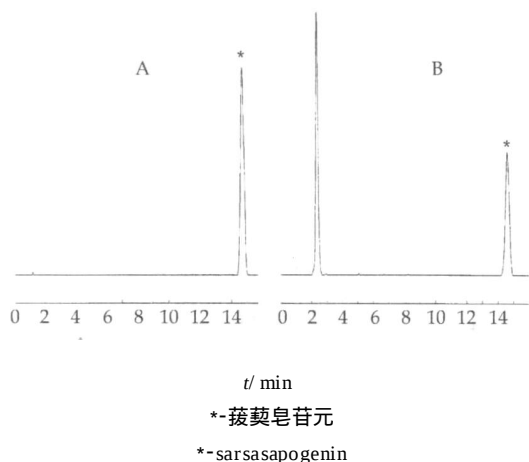


图2 菝葜皂苷元对照品(A)和知母(B) HPLC图谱

Fig. 2 HPLC Chromatograms of sarsapogenin reference substance (A) and Rhizoma Anemarrhenae (B)

知母为临床常用药,文献报道其有效成分大多为皂苷类成分。为寻找与临床功效相对应的活性成分已进行了许多基础研究。本实验选择知母中的代表性成分菝葜皂苷元、芒果苷为指标,比较可知炮制后知母中芒果苷和菝葜皂苷元的量均有不同程度的升高,但至于其炮制机制目前还不是很清楚,其炮制后量的改变机制及其与功效的关系需要进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 郑民实,陆仲毅. 芒果苷与异芒果苷的抗单纯疱疹病毒作用[J]. 中国药理学报, 1989, 10(1): 85.
- [3] 李好文,邓家刚,邓静. 芒果苷国外研究进展[J]. 广西中医学院学报, 2003, 6(4): 62.
- [4] 叶定江. 中药炮制学[M]. 北京: 人民卫生出版社 1999.

多指标正交试验优选复方五仁醇胶囊含药血清的制备方法

罗琳¹, 窦志华², 丁安伟³, 黄金华¹, 陈洁¹, 徐济良^{1*}

(1. 南通大学, 江苏 南通 226001; 2. 南通大学附属南通第三医院, 江苏 南通 226006;

3. 南京中医药大学, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 药效与化学指标相结合优选复方五仁醇胶囊含药血清制备方法。方法 建立 CCl_4 诱导的大鼠肝细胞损伤模型, 采用 $\text{L}_8(2^7)$ 正交设计给药和取血方案, 制备大鼠含药血清或血浆, 考察含药血清或血浆对损伤肝细胞增值(MTT)和培养上清液中丙氨酸氨基转移酶(ALT)的影响, 高效液相法测定含药血清或血浆中五味子乙素含量, 并对结果综合加权评分和方差分析。结果 给药方式及采血时间对结果有显著影响, 且两者之间有交互作用, 血浆优于血清, 但综合加权评分无统计学意义, 动物是否造模无明显影响。结论 复方五仁醇胶囊含药血清较优的制备方法为正常大鼠连续 ig 给药 3 d, 上、下午各 1 次, 末次给药后 2 h 采血分离血浆。

关键词: 复方五仁醇胶囊; 含药血清; 五味子乙素; 正交试验

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)02-0238-04

中药血清药理学是指在动物灌胃给药一段时间内采血分离血清, 用此含药物成分的血清(含药血清)进行体外药理试验的实验方法。该方法能反映中药经胃肠道消化吸收, 再经生物转化, 最后产生药理效应的过程, 不仅反映药物中可吸收部分的直接作用, 且能反映药物成分在机体作用下形成的代谢产物和药物诱生的机体内同源物质的间接效果, 体现了体外和体内实验较好的结合^[1]。近年来中药血清药理学研究取得的成果表明, 该方法值得推广应用, 但也存在一些问题与局限性, 其中含药血清制备技术的规范化亟待解决, 包括供体动物的选择、给药

方案、采血时间、含药血清的处理、体系中含药血清的加入量等^[2], 若忽视这些问题或处理不当, 都会影响研究的真实性和可信性, 从而使研究的重复性降低^[3]。复方五仁醇胶囊是以五味子为主的中药复方制剂, 治疗急慢性肝炎疗效确切^[4]。笔者拟以该制剂为对象, 探讨采用血清药理学与血清药化学方法相结合研究中药复方药效物质基础的可行性。本实验将药效与化学指标相结合, 采用正交设计综合考察动物是否造模、给药方案、采血时间和取血成分 4 个因素, 优选含药血清的制备方法, 为该制剂血清药理学和血清药化学研究提供参考。

* 收稿日期: 2008-03-16

基金项目: 江苏省中医药局科研项目(H05173); 江苏省高校研究生科技创新计划项目(140)

作者简介: 罗琳(1976-), 女, 江苏南京人, 讲师, 硕士, 从事药理学研究。Tel: (0513) 85051726 E-mail: luolin@ntu.edu.cn

*通讯作者 徐济良 Tel: (0513) 85051727 E-mail: jlxu@ntu.edu.cn