

定难度,新版药典已准备采用 HPLC 法。

**4.3.2 注射液** 从表 4 可见,除日本武田制药生产的尼可林注射液采用标准品法,供试品的前处理采用强碱性阴离子交换树脂(CI 型,100~200 目)交换转型为胞磷胆碱后采用标准品法测定含量;部标采用 0.01mol/L 盐酸溶液制成每 1ml 中含 20 $\mu$ g 的溶液按原料的方法测定,测定结果表明,会出现结果偏低,应引起注意。

#### 参考文献:

- [1] 李良铸,李明.最新生化药物制备技术[M].北京:中国医药科技出版社,2002;251~253.  
[2] 河北省药品标准[S].1985 年版,1985;343~343.

- [3] 卫生部药品标准二部第六册(生化药品第一分册)[S].1998;101~104.  
[4] 日本药局方外医药品规格[S].1997 年版,1997.227.  
[5] 进口药品注册标准 JX20000126[S].(日本)  
[6] 进口药品注册标准 JX19990298[S].(日本)  
[7] 进口药品注册标准 JX19990319[S].(意大利)  
[8] 进口药品注册标准 JX19990212[S].(日本)  
[9] 佟爱东,邓兆勇.高效液相色谱法测定胞磷胆碱钠及有关物质的含量[J].中国生化药物杂志 2001,22(1):31.  
[10] 王晓慧,张咏梅,王晓洁.胞磷胆碱钠注射液检验方法的考察[J].黑龙江医药,1999,12(3):162.  
[11] 张伟,张培培,杨化新. HP-HPLC 法测定胞磷胆碱的含量[J].药物分析杂志 2000,20(6):394.

收稿日期:2004-05-18

## HPLC 法测定知母药材中芒果苷和新芒果苷的含量

周永刚<sup>1</sup>,黄晟<sup>2</sup>,谷莉<sup>2</sup>,王彬<sup>3</sup>,张国庆<sup>3</sup>,姜子洋<sup>2</sup>(1. 中国人民解放军 81 医院,江苏南京 210002;2. 第二军医大学药学院,上海 200433;3. 东方肝胆外科医院,上海 200433)

**摘要** 目的:测定知母药材中芒果苷和新芒果苷的含量。方法:采用 HPLC 法,色谱柱为 Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱(5 $\mu$ m,4.6 $\times$ 250mm,Agilent),流动相为乙腈和 25mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液,梯度洗脱;流速:1.0mL/min,运行时间 60min,检测波长 257nm。结果:芒果苷在 14.2~568.5 $\mu$ g/mL 范围内线性关系良好( $r=0.9999$ ),高中低浓度日内精密密度 RSD 在 2.4%~3.3%之间,日间精密密度 RSD 在 2.5%~4.5%之间;新芒果苷在 14.8~590.5 $\mu$ g/mL 范围内线性关系良好( $r=0.9999$ ),高中低浓度日内精密密度 RSD 在 1.9%~3.4%之间,日间精密密度 RSD 在 1.5%~3.9%之间。结论:本方法准确可靠,重现性好,可用作知母药材中芒果苷和新芒果苷的含量测定,为知母药材质量标准提供参考。

**关键词** 知母;芒果苷;新芒果苷;含量测定;高效液相色谱法

中图分类号:R917 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2005)02-0099-04

## Determination of mangiferin and neo-mangiferin in *Rhizoma Anemarrhenae* by HPLC

ZHOU Yong-gang<sup>1</sup>,HUANG Sheng<sup>2</sup>,GU Li<sup>2</sup>,WANG Bin<sup>3</sup>,ZHANG Guo-qing,LOU Zi-yang<sup>2</sup>(1. The 81th Hospital of Nanjing Military Region, Nanjing 210002,China;2. The Second Military Medical University, Shanghai 200433,China;3. The Eastern Institute of Hepatobiliary Surgery, Shanghai 200433,China)

**ABSTRACT Objective:** To establish the method for determination of mangiferin and neo-mangiferin in *Rhizoma Anemarrhenae*. **Method:** The content was determined by HPLC. A Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> column(4.6mm $\times$ 250mm,5 $\mu$ m) with a gradient mobile phase composed of 25 mmol/L dihydrophosphate potassium and acetonitrile were used. The detection wavelength was 257nm and the flow rate was 1.0mL/min. **Results:** The calibration curves of mangiferin were linear between 14.2~568.5 $\mu$ g/mL( $r=0.9999$ ), the neo-mangiferin were 14.8~590.5 $\mu$ g/mL. The within-day precision RSD was both less than 4.5% and the inter-day precision RSD was less than 3.9%. **Conclusion:** The method is simple,rapid,accurate and is suitable for the determination of mangiferin and neo-mangiferin.

**KEY WORDS** *Rhizoma Anemarrhenae*; mangiferin; neo-mangiferin; HPLC

作者简介:周永刚(1965-)男,副主任药师。E-mail:mrzou@sina.com

基金项目:上海市科技发展基金项目,编号:01DJ19012.

知母 (*Rhizoma Anemarrhenae*) 为百合科植物知母 (*Anemarrhena asphadeloides* Bge) 的干燥根茎, 为常用中药, 具有滋阴降火、润燥滑肠之功效, 其主要成分有皂苷类, 黄酮类, 木脂素等。现代药理研究表明芒果苷是其清热作用的有效成分, 还具有免疫抑制用<sup>[1,2]</sup>。此外, 研究人员还发现了知母中的另一种新的双苯吡酮类化合物新芒果苷<sup>[3]</sup>。

目前文献报道中关于知母药材中皂苷类成分的含量测定方法较多, 而关于芒果苷的含量测定方法较少, 有薄层分离比色法<sup>[4]</sup>、薄层扫描法<sup>[5]</sup>以及 HPLC 法, 相比而言 HPLC 法更为简便准确和稳定。陈万生等<sup>[6]</sup>采用 HPLC 法考察测定了不同产地同一生长期知母不同部位中芒果苷等双苯吡酮类成分。研究证明, 不同产地的知母药材质量差异影响到其进一步的开发利用, 需要建立起一套能严格控制药材内在质量的技术手段。本文以知母药材中黄酮类成分芒果苷和新芒果苷为研究对象, 对其提取条件进行了优化, 建立其 HPLC 含量测定方法。

## 1 仪器与试剂

Agilent 100 高效液相色谱仪 (包括: 四元泵, 脱气机, 自动进样器, 柱温箱, 二极管阵列紫外检测器); 知母生药采自安徽亳州, 由第二军医大学药学院生药教研室陈万生副教授鉴定, 并按照《中国药典》2000 版一部规定进行干燥, 切片, 粉碎, 过 40 目筛等预处理。芒果苷、新芒果苷对照品均由生药教研室制备, 经面积归一化法检查, 纯度均在 98% 以上; 甲醇、乙腈均为色谱纯, Fisher 公司产品; 水为纯净水。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱: Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱 (5 $\mu$ m, 4.6  $\times$  250mm, Agilent); 流动相: 采用梯度洗脱, A 相为乙腈, B 相为 25mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液 (pH 3.0); 流速: 1.0mL/min, 运行时间 60min, 检测波长 257nm, 柱温为 25 $^{\circ}$ C。两次进样之间用流动相初始梯度条件平衡 15min, 流动相使用前减压抽滤脱气。进样量 20 $\mu$ L。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	% A (乙腈)	% B (缓冲液)
0	1.0	0	100
15	1.0	25	75
20	1.0	28	72
50	1.0	70	30

**2.2 供试品溶液的制备** 取知母药材粉末约 0.2g, 精密称定, 置 25mL 量瓶中, 加入 25mL 的 80% 甲醇溶液, 超声处理 20min, 过滤, 残渣再用 25mL 的 80% 甲醇溶液超声处理 20min, 过滤, 合并滤液, 用适量甲醇溶液洗涤容器及残渣, 滤过, 并入滤液, 氮气挥干甲醇, 用甲醇溶解, 置 25mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

**2.3 对照品溶液的配制** 取芦丁对照品适量, 加甲醇溶解并稀释制成每 1mL 中含 1.944mg 的溶液, 摇匀, 作为内标溶液。

精密称取新芒果苷对照品 36.91mg, 置 25mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为标准储备液。依次精密量取该溶液 4.0、3.0、2.0、1.0、0.5、0.1mL 与内标溶液 1mL, 置 10mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配成浓度分别为 590.6、442.9、259.3、147.6、73.8、14.8 $\mu$ g/mL 的新芒果苷对照品溶液。

精密称取芒果苷对照品 35.53mg, 置 25mL 量瓶中, 用甲醇-二氧六环 (50:50) 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为标准储备液。依次精密量取该溶液 4.0、3.0、2.0、1.0、0.5、0.1mL 与内标溶液 1mL, 置 10mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配成浓度分别为 568.5、426.4、284.2、142.1、71.1、14.2 $\mu$ g/mL 的芒果苷对照品溶液。

**2.4 标准曲线的建立** 取上述两种不同浓度对照品溶液 20 $\mu$ L, 分别依上述色谱条件进样测定, 以峰面积对浓度进行线性回归。新芒果苷, 线性回归方程:  $Y = 0.0031X - 0.0027$ ,  $r = 0.9999$ , 线性范围: 14.8 ~ 590.5 $\mu$ g/mL。芒果苷, 线性回归方程:  $Y = 0.0046X + 0.0086$ ,  $r = 0.9999$ , 线性范围: 14.2 ~ 568.5 $\mu$ g/mL。

**2.5 精密度考察** 在上述色谱条件下, 分别取高、中、低 3 种浓度的对照品液各 20 $\mu$ L 于同一天内和不同日间 (5 日内, 每日测定 1 次) 分别测定 5 次, 考察日内精密度和日间精密度。结果新芒果苷日内精密度 RSD 在 1.9% ~ 3.4% 之间, 日间精密度 RSD 在 1.5% ~ 3.9% 之间; 芒果苷日内精密度 RSD 在 2.4% ~ 3.3% 之间, 日间精密度 RSD 在 2.5% ~ 4.5% 之间。

**2.6 重复性试验** 取知母药材粉末 5 份, 精密称定, 按上述操作测定其中新芒果苷和芒果苷含量, 结果见表 2。

表2 方法重复性考察(n=5)

编号	新芒果苷			芒果苷		
	测得含量(%)	平均含量(%)	RSD(%)	测得含量(%)	平均含量(%)	RSD(%)
1	0.77			0.81		
2	0.78			0.80		
3	0.75	0.77	2.19	0.79	0.80	1.35
4	0.79			0.81		
5	0.78			0.79		

2.7 稳定性考察 取同一份供试品溶液,分别在0、1.5、3、8、16、24、48h检测。结果表明,新芒果苷和芒果苷色谱峰的相对保留时间的峰面积比值的RSD均在2%以内,样品溶液稳定。

2.8 加样回收率试验 取知母药材粉末0.2g,精

密称定,按样品测定下方法测定其中新芒果苷和芒果苷含量。另取同批药材粉末0.2g,精密称定,加入新芒果苷对照品和芒果苷对照品标准溶液各1.0mL,测定其中新芒果苷和芒果苷含量。计算回收率,结果见表3。

表3 新芒果苷和芒果苷加样回收率试验(n=3)

成分	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
新芒果苷	43.6	40.3	92.4	93.0	1.2
	43.6	40.3	92.4		
	43.6	41.1	94.3		
芒果苷	40.8	39.5	96.8	100.3	3.5
	40.8	42.4	103.9		
	40.8	40.9	100.2		

2.9 系统适应性 理论塔板数以新芒果苷计算为70 146,以芒果苷计算为71 155;新芒果苷与相邻峰的分度大于5.0,芒果苷与相邻峰的分度大于5.0;新芒果苷的峰对称因子为1.10,芒果苷的峰对称因子为1.06。

2.10 含量测定 取知母药材,照测定方法中供试

品溶液制备项下方法处理,得到待测样品溶液,进样前用0.45μm滤膜过滤,取续滤液进样测定,每个产地样品制备3份供试品溶液,每份供试品溶液重复测量3次,取其平均值作为各产地药材的成分含量。结果芒果苷(0.81%),新芒果苷(0.78%),HPLC图谱见图1。

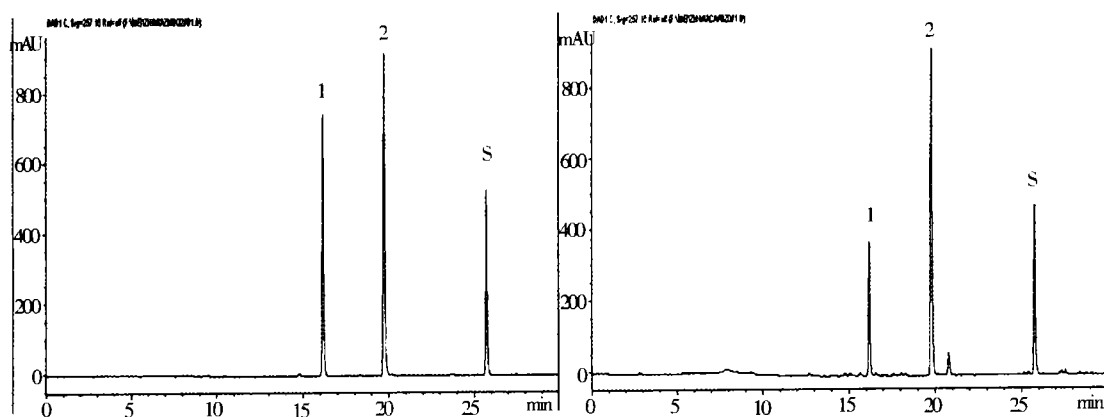


图1 对照品(A)及样品(B)HPLC 色谱图  
1-新芒果苷;2-芒果苷;S-芦丁

### 3 讨论

3.1 检测波长的选择 从新芒果苷对照品溶液和

芒果苷对照品溶液的紫外吸收光谱图可知,二者在波长为257nm处均有最大吸收峰,故测定含量时选取257nm作为检测波长。

**3.2 分离条件的考察** 实验中我们还考察了不同 pH 值和浓度的缓冲液对分离的影响,结果表明缓冲液的 pH 值为 3.0,3.5,4.0 时对分离度无明显影响;缓冲液浓度为 25mmol/L,30mmol/L,35mmol/L,40mmol/L 时对分离度也无明显影响,但考虑到使用的梯度洗脱,在梯度后段流动相中乙腈的比例比较高,因此缓冲液浓度不宜过高,而缓冲液浓度过低时色谱峰前延,影响柱效和分离度。综合比较,最后选择缓冲液浓度为 25mmol/L,pH 值 3.0 时作为分离条件,峰形尖锐,对称性较好,各主要成分都能达到基线分离。

**3.3 前处理方法考察** 考察了索氏提取及超声波提取两种方法,分别对索氏提取的时间以及超声波提取方法的提取溶剂提取时间和提取次数进行了考察。

综合比较两种提取方法,按超声提取最佳条件测得的新芒果苷和芒果苷含量高于索氏提取 4h 测得的含量,故最终确定的量取条件为:提取溶剂为 80% 甲醇,超声提取 20min,共提取两次。

**3.4 通过方法学考察,相关数据和结果达到药物分析的要求,所建立方法简便、快速、准确可靠,为知母药材中两种活性成分的含量测定提供一种有效的分析方法。**

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] 孟强骅,叶天星. 体外抗体应答系统用于研究中药及化学合成药的免疫调节效用[J]. 第二军医大学学报,1983,4(增刊):75.
- [3] 洪永福,韩公羽,郭学敏. 西陵知母中新芒果苷的分离与结构鉴定[J]. 药学学报,1997,32(6):473.
- [4] 洪永福,韩公羽. 不同采集期知母根茎中芒果苷含量变化的初步研究[J]. 中草药,1985,16(4):31.
- [5] 王强,孙有略. 知母中芒果苷的含量测定[J]. 中国药科大学学报,1991,22(6):383.
- [6] 陈万生,李力,乔传卓. 不同产地知母中芒果苷、新芒果苷的含量测定[J]. 中国中药杂志,2000,25(2):87.

收稿日期:2004-09-31

(上接第 92 页)

表 1 回收率试验结果 (n = 5)

编号	加入量 (g/mL)	测得量 (g/mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	1.00	0.995	99.50		
2	1.50	1.504	100.26		
3	2.00	1.988	99.40	99.68	0.34
4	2.50	2.492	99.68		
5	3.00	2.987	99.57		

### 3 临床应用

**3.1 一般资料** 常见门诊皮肤科各类皮炎患者 126 例作为观察对象,其中男性 79 例,女性 47 例,年龄 8~62 岁,随机选择 75 例为治疗观察组,用复方新炉甘石洗剂治疗;其余 51 例为对照组,用炉甘石洗剂治疗。

**3.2 用法与用量** 将洗剂充分摇匀后涂抹皮炎局部,每日 3~4 次,每天观察 1 次,连续观察 5d,1 周后随访 1 次。

**3.3 疗效判断** 以皮炎局部瘙痒消失、炎症、红斑、丘疹皮肤损害消退为标准,用药 2d 内上述皮肤症状消失为显效;5d 内消失为有效;1 周以上未消失为无效。

**3.4 治疗结果** 见表 2。经统计学处理,两组疗效有显著性差异 ( $P < 0.01$ )

表 2 两组治疗结果

组别	例数	显效	有效	无效	治愈率%
治疗组	75	60	13	2	97.3
对照组	51	11	24	16	68.6

### 4 讨论

复方新炉甘石洗剂是在炉甘石洗剂组方的基础上,通过皮肤科临床实践经验,加入具有药理作用的药物配制而成。处方组成中,液化苯酚具有消炎、止痒、防腐作用,氯霉素为广谱抗生素,配用地塞米松糖皮质激素药能更有效的控制皮炎感染范围和抗过敏作用,从而提高本制剂的抗菌、消炎、收敛、止痒效果,本制剂在临床应用中,尚无发现不良反应,疗效明显,可作为皮肤科治疗皮炎、湿疹常用制剂。

#### 参考文献:

- [1] 浙江省卫生厅编. 浙江医院制剂规范[S]. 杭州浙江科学技术出版社,1988:173.
- [2] 中国医院制剂规范[S](西药制剂). 第 2 版,北京:中国医药科技出版社,1995:96.

收稿日期:2004-09-26