

HPLC 测定知母-黄芪药对中芒果苷、 毛蕊异黄酮苷和毛蕊异黄酮

陈沛鑫¹, 李卫民^{1*}, 高英², 帅颖¹

(1. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006;

2. 广州中医药大学新药研究开发中心, 广州 510006)

[摘要] 目的: 建立知母-黄芪中芒果苷、毛蕊异黄酮苷和毛蕊异黄酮 3 种有效成分的含量测定方法。方法: 采用 HPLC, Phenomenex Luna C₁₈(4.8 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 加预柱(Security Guard, C₁₈, 3.0 mm × 4.0 mm, Phenomenex); 以乙腈-0.2% 磷酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 260 nm。结果: 芒果苷、毛蕊异黄酮苷和毛蕊异黄酮的线性范围分别为 36.733 ~ 550.999 ng, 33.376 ~ 166.88 ng, 44.544 ~ 222.72 ng, 相关系数(*R*²) 均 > 0.999, 平均加样回收率分别为 102.47%, 102.38%, 100.20%, 其 RSD 分别为 2.23%, 2.86%, 2.06%。结论: 方法简便快速, 重复性良好, 结果准确可靠, 可用于知母-黄芪中芒果苷、毛蕊异黄酮苷和毛蕊异黄酮的含量测定。

[关键词] 知母-黄芪; 有效成分; 黄酮; 高效液相色谱法; 药对

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0072-04

Simultaneous Determination of Mangiferin, Calycosin-7-O-β-D-glucoside and Calycosin in Anemarrhenae Rhizoma-Astragali Radix by HPLC

CHEN Pei-xin¹, LI Wei-min^{1*}, GAO Ying², SHUAI Ying¹

(1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. New Drug R & D Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** A reversed-phase high performance liquid chromatographic method (RP-HPLC) was developed for the simultaneous analysis of mangiferin, calycosin-7-O-β-D-glucoside and calycosin in Anemarrhenae Rhizoma-Astragali Radix. **Method:** HPLC determination was performed on a Phenomenex Luna C₁₈(4.8 mm × 250 mm, 5 μm) and detected at 250 nm. The mobile phase was consisted of acetonitrile and 0.2% phosphate solution with gradient elution. Flow-rate was 1.0 mL·min⁻¹, and column temperature was 30 °C. **Result:** The method was proved to be linear in the ranges of 36.733-550.999 ng, 33.376-166.88 ng and 44.544-222.72 ng for mangiferin, calycosin-7-O-β-D-glucoside and calycosin respectively. The average recoveries were 102.47%, 102.38% and 100.20% respectively. **Conclusion:** The results showed that the method is convenient, accurate and reliable for the simultaneous determination of mangiferin, calycosin-7-O-β-D-glucoside and calycosin in Anemarrhenae Rhizoma-Astragali Radix.

[Key words] Anemarrhenae Rhizoma-Astragali Radix; active constituents; flavonoids; HPLC; drug couple

[收稿日期] 20110511(005)

[第一作者] 陈沛鑫, 研究生, 专业方向: 中药新药研究与开发,
Tel: 13719128109, E-mail: cpxfighting2010@sina.com

[通讯作者] * 李卫民, 教授, 博导, 从事中药新药研究与开发,
Tel: 020-39358290, E-mail: 13925023915@139.com

知母与黄芪等配伍用, 最早出自金·李杲《兰室秘藏》生津甘露汤。近代医家张锡纯所著的《医学衷中参西录》中也记载着由两药配伍组成的方剂^[1]。在张锡纯之玉津汤、升陷汤、理郁升陷汤及速降糖煎II号^[2]中均含有此药对。知母黄芪二药配对, 寒热并

用,共奏益气养阴清热之功。临床可应用于糖尿病气阴两虚证,更可用于糖尿病性心脏病、心律失常、心衰^[3]等。目前,未见知母黄芪药对黄酮类有效成分含量测定的报道。本实验通过优化色谱条件和样品处理方法可以同时快速、准确测定知母-黄芪中芒果苷、毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷含量,为控制知母-黄芪及含有知母黄芪制剂的质量提供方法和依据。

1 仪器与试剂

SHIMADZU LC 10AT vp plus 高效液相色谱仪, SHIMADZU SPD 10A vp plus 紫外检测器, SHIMADZU CBM 10A vp plus 化学工作站, Sartorius 电子分析天平(德国, $d = 0.01$ mg), 乙腈为色谱纯, 水为制备纯水, 其他试剂为分析纯; 芒果苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110704-200509), 毛蕊异黄酮对照品(上海同田生物技术有限公司, 批号 09052621), 毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷对照品(上海中药化学对照品有限公司)。药材购自广州中医药大学大药房有限公司(黄芪产地山西, 知母产地湖南), 由本院黄海波教授鉴定, 黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *A. membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥根, 知母为百合科知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎; 知母-黄芪药对为知母与黄芪药材按 1:1 的配比自制。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量, 分别用甲醇制成对照品溶液。精密吸取各对照品溶液适量, 用起始比例的流动相制成每 1 mL 中含芒果苷 0.036 73 mg、毛蕊异黄酮苷 0.275 8 mg、毛蕊异黄酮 0.498 2 mg 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液制备 取知母药材、黄芪药材和知母-黄芪药材(1:1)各 2 g, 加入乙醇 25 mL, 超声提取 0.45 h, 提取 2 次, 滤过, 合并滤液, 合并定容于 50 mL 量瓶中, 摇匀, 滤过, 即得。

2.3 色谱条件及系统适用性 Phenomenex Luna C₁₈ (4.8 mm × 250 mm, 5 μ m) 色谱柱, 加预柱 (Security Guard, C₁₈, 3.0 mm × 4.0 mm, Phenomenex); 以乙腈为流动相 A, 以 0.2% 磷酸溶液为流动相 B, 按表 1 进行梯度洗脱; 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 260 nm, 进样量为 20 μ L。供试品溶液色谱中与各对照品对应的吸收峰的理论塔板数均不低于 5 000 对应的色谱峰的分度度均 > 2.0。

表 1 流动相梯度洗脱程序

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0 ~ 10	10	90
10 ~ 25	10 ~ 20	90 ~ 80
25 ~ 40	20 ~ 35	80 ~ 65
40 ~ 50	35 ~ 60	65 ~ 40

2.4 方法学考察

2.4.1 检测限及定量限 将各对照品色谱峰测出的信号与空白样品测出的信号进行比较, 分别以信噪比为 3:1 及 10:1 时注入仪器的量确定检测限和定量限, 结果见表 2。

2.4.2 线性关系考察 分别精密吸取上述对照溶液适量, 进样分析, 分析结果以峰面积 (Y) 对对照品的进样质量 (X, ng) 进行回归, 得回归方程、相关系数 (R^2) 及线性范围, 结果见表 2。

表 2 3 种黄酮类成分线性关系考察

成分	$Y = aX + b$ ($Y =$ 峰面积, $X =$ 进样质量, μ g)			线性范围/ng	检测限/ng	定量限/ng
	a	b	R^2			
1 芒果苷	4 985.6	-13 282	0.999 2	36.733 ~ 550.999	9.18	40.05
2 毛蕊异黄酮苷	3 088.2	-16 236.7	0.999 5	33.376 ~ 166.88	13.79	25.72
8 毛蕊异黄酮	2 898.3	3 075.1	0.999 3	44.544 ~ 222.72	9.96	30.52

2.4.3 精密度试验 精密吸取上述混合对照品溶液(含芒果苷、毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮), 注入液相色谱仪, 重复 6 次, 所得峰面积 RSD 分别为 0.77%、0.68%、1.58%。表明仪器精密度良好。

2.4.4 重复性试验 取同一产地组合(河北-内蒙)

知母-黄芪药材, 制备成供试品溶液, 精密吸取, 注入液相色谱仪, 重复 6 次, 进样测定, 计算芒果苷、毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮的质量分数, 其 RSD 分别为 1.16%、1.30%、1.68%。表明本法重复性良好。

2.4.5 稳定性试验 于 0, 1, 2, 4, 8 h 分别精密吸

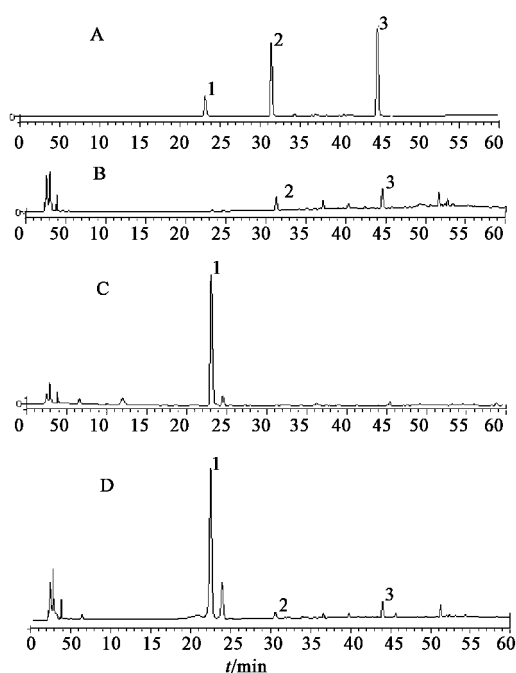
取供试品溶液,注入液相色谱仪,所得峰面积 RSD 分别为 0.56%、1.96%、1.85%,表明在 8 h 内稳定。

2.4.6 加样回收率试验 精密称取 5 份同一产地组合(河北-内蒙)知母-黄芪药材 1g,分别精密加入相当量的对照品溶液,挥干溶剂,同 2.1.2 方法处理,测定,计算加样回收率,结果各对照品的平均加样回收率分别为 102.47%、102.38%、100.20%,其 RSD 分别为 2.23%、2.86%、2.06%。

2.5 样品含量测定 分别精密称取不同产地知母药材、黄芪药材及不同产地组合知母-黄芪药材(1:1)各 3 份,同 2.2 方法处理,进样测定,以外标一点法计算样品中芒果苷、毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷的质量分数,结果见图 1、表 3。

3 结论与讨论

本文采用 HPLC 同时测定了知母-黄芪药材中芒果苷、毛蕊异黄酮苷及毛蕊异黄酮的含量,该法灵敏度高,专属性强,所用流动相系统和样品预处理方法简便、快速,能准确有效地测定,为控制知母黄芪药对及含有知母黄芪制剂的质量提供方法和依据。



1. 芒果苷; 2. 毛蕊异黄酮苷; 3. 毛蕊异黄酮
图 1 混合对照品(A)、黄芪药材(B)、知母药材(C)和知母-黄芪药材(D)的 HPLC

表 3 样品中有效成分的测定 (n=3)

样品	产地	芒果苷		毛蕊异黄酮苷		毛蕊异黄酮	
		质量分数	RSD	质量分数	RSD	质量分数	RSD
知母药材	河北	0.194	1.1	-	-	-	-
	安徽	0.175	2.4	-	-	-	-
黄芪药材	内蒙	-	-	0.012 0	2.0	0.015 6	2.8
	山西	-	-	0.013 1	2.2	0.014 5	2.0
知母黄芪药材	河北-内蒙	0.177	2.0	0.012 5	1.9	0.022 4	1.4
	河北-山西	0.171	1.4	0.014 1	0.97	0.020 2	1.6

参考文献报道^[4-6]多成分含量测定的检测波长,精密吸取供试品溶液,注入高效液相色谱仪,分别在 250、260、310 nm 波长处检测,根据各吸收峰的对称因子、分离度及理论塔板数等综合考虑,选择在 260 nm 波长处测定知母-黄芪中多成分的含量。

比较甲醇-水、乙腈-0.2% 磷酸溶液、乙腈-1% 冰醋酸溶液 3 种梯度洗脱条件,发现以 0.2% 磷酸与乙腈的组合相邻峰的分度好,出峰的重复性好。采用梯度洗脱,保留时间恰当,分离效果理想。选择了优化的乙腈-0.2% 磷酸溶剂系统。

参考 2010 年版《中国药典》对黄芪中毛蕊异黄酮苷及知母^[7]中芒果苷的含量测定方法,采用乙醇与甲醇对样品进行处理,发现两者提取效果相当,

鉴于甲醇具有一定毒性,故采用乙醇为提取溶剂。

预试验时,采用超声、回流对样品进行处理。结果表明,回流和超声对知母黄芪中 3 种黄酮含量无明显影响,根据实际操作情况,故采用超声法。

结果显示,用商品药材自制不同产地组合的药对间芒果苷、毛蕊异黄酮苷及毛蕊异黄酮存在一定的差异,主要与商品药材的质量差异、干燥程度相关。但从不同产地组合的药对提取与单味药材提取来看,两药材按 1:1 组合成药对用乙醇超声提取在一定程度上有利于毛蕊异黄酮苷的溶出,但芒果苷的提取率却有所降低,可能与黄芪配伍后抑制该成分的溶出或者配伍后该成分发生转化有关。知母-黄

醒脑静注射液质量分析

赵希贤¹, 方颖², 赵鸣舒¹, 王庆纲¹, 孟大钧¹

(1. 北京市东城区药品检验所, 北京 100027; 2. 北京市药品检验所, 北京 100036)

[摘要] 目的: 分析醒脑静注射液检验结果, 比较各厂产品质量。方法: 根据检验数据, 进行相关分析、工艺试验, 分析不合格原因; 计算均值及 RSD, 进行聚类分析, 比较各厂产品生产质量的稳定性及差异。结果: 相关分析表明樟脑含量与异龙脑含量 ($P < 0.01$)、渗透压值 ($P < 0.05$) 成正相关, 与龙脑含量 ($P < 0.01$) 成负相关, pH 与异龙脑含量 ($P < 0.05$) 成负相关; pH 不合格与工艺控制有关; 均值、RSD 表明 W 厂产品质量控制稳定; 各厂产品可通过聚类分析进行区分。结论: 3 家醒脑静注射液的物料、工艺控制各有特点, 可根据需要选用。

[关键词] 醒脑静注射液; 质量分析; 气相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0075-05

Quality Analysis of Xinaojing Injection

ZHAO Xi-xian^{1*}, FANG Ying², ZHAO Ming-shu¹, WANG Qing-gang¹, MENG Da-jun¹

(1. Dongcheng District Institute of Drug Control, Beijing 100027, China;

2. Beijing District Institute of Drug Control, Beijing 100036, China)

[Abstract] **Objective:** Analyzing the testing result of Xingnaojing injection and comparing and appraising the quality of different products. **Method:** Technical test and correlation analysis were used to analyze the unqualified cause and calculating mean and relative standard deviation with testing data. Cluster analysis was applied to compare the stability of different products quality and differences. **Result:** Correlation analysis indicated that camphor was closely positive correlated to isoborneol ($P < 0.01$) and osmotic pressure ($P < 0.05$), and negative correlated to borneol ($P < 0.01$). pH was negative correlated to isoborneol ($P < 0.05$). The cause of pH unqualified is related to technical control. Mean and relative standard deviation indicated that the product of W enterprise is better than the others. Cluster analysis indicated the products can be identified. **Conclusion:** Each of

[收稿日期] 20110424(001)

[通讯作者] * 赵希贤, 副主任药师, 从事药品检验及其质量分析研究, Tel: 010-64618709, E-mail: zxx68@126.com

芪在配伍后有效成分的溶出发生了变化, 这为更深入的研究药理配伍机制提供数据。

[参考文献]

- [1] 张锡纯. 医学衷中参西录: 第 1 册. [M]. 石家庄: 河北人民出版社, 1957.
- [2] 刘晓汉, 张韬玉. 速降糖煎剂治疗糖尿病 30 例临床观察[J]. 吉林中医药, 1980, 1(5): 9.
- [3] 胡宇驰, 侯家玉. 知母合黄芪改善肾高血压大鼠心功能的研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(11): 858.
- [4] 石子仪, 鲍忠, 姜勇, 等. 不同来源黄芪药材中毛蕊异黄

酮葡萄糖苷和芒柄花素的定量分析[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(9): 779.

- [5] 王晓辉, 刘涛, 李清, 等. 高效液相色谱法同时测定黄芪中的五种异黄酮类成分[J]. 色谱, 2006, 24(5): 486.
- [6] 梁雷, 边宝林, 王宏洁. 不同产地知母药材中芒果苷和知母皂苷 B II 的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16): 49.
- [7] 中国药典. 一部[S]. 2010: 283, 197.

[责任编辑 蔡仲德]