

## 石膏-知母药对不同配伍比例中新芒果苷含量变化研究

杨素德<sup>1</sup>, 孙洪胜<sup>2\*</sup>, 傅春升<sup>2</sup>

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

**[摘要]** 目的: 建立测定中药药对石膏-知母中新芒果苷的方法, 探索不同配伍比例中该成分的变化规律。方法: 用 HPLC 法测定新芒果苷含量, 色谱条件 Waters C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm); 乙腈-0.2% 醋酸水(15:85) 为流动相; 流速为 1.0 mL • min<sup>-1</sup>; 检测波长为 258.0 nm。结果: 中药药对石膏-知母在配伍时, 新芒果苷含量变化规律随配伍比例增加其含量先增大后减小, 在 3:1 时含量最大。结论: 方法简便、准确、重复性好, 可用于中药药对石膏-知母中新芒果苷测定, 并印证了“中医不传之秘在于剂量”之说, 为进一步研究指明了方向。

**[关键词]** 药对; 石膏-知母; 配伍; 新芒果苷; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)23-0048-03

## Study on the Content Change of Neomangiferin in the Drug Couple about Different Compatibility Proportion in Anemarrhenae Rhizoma and Gypsum Fibrosum

YANG Su-de<sup>1</sup>, SUN Hong-sheng<sup>2\*</sup>, FU Chun-sheng<sup>2</sup>

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China;

2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for the determination about the contents of neomangiferin in the drug couple about Anemarrhenae Rhizoma and Gypsum Fibrosum, To explore the variation of the composition in the compatibility of different proportions. **Method:** High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the changes in different groups of Anemarrhenae Rhizoma compatible with Gypsum Fibrosum. Separation was performed on C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) analytical column. The mobile phase was ACN-0.2% CH<sub>3</sub>COOH (15:85). flow rate was 1.0 mL • min<sup>-1</sup>. detection wavelength was at 258.0 nm. **Result:** The contents of neomangiferin changed when Gypsum Fibrosum was added into the groups of Anemarrhenae Rhizoma. Some of ratios

**[收稿日期]** 20110630(005)

**[基金项目]** 山东省中医药发展计划项目(2009113)

**[通讯作者]** \* 孙洪胜, Tel: 13793188158, E-mail: shs7777@163.com

- [2] 丁立威. 东北三省赤芍货缺价扬[J]. 特种经济动植物, 2010, 3: 19.
- [3] Xu S, Yang L, Tian R, et al. Species differentiation and quality assessment of Radix Paeoniae Rubra (Chi-shao) by means of high-performance liquid chromatographic fingerprint[J]. J Chromatogr A. 2009, 1216(11): 2163.
- [4] Ren D Q. Significance and effect of quality control technology of TCM fingerprints [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2001, 24(4): 235.
- [5] Bi K S, Li Y T. Study on the Quality Control Method of Chinese
- Crude Drugs by Fingerprints(中药材指纹图谱质量控制方法研究) [C]. Guangzhou, 2001.
- [6] 张克荣, 毕开顺. 赤芍 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中草药, 2003, 34(11): 1048.
- [7] 王巧, 刘荣霞, 于海兰, 等. 白芍与赤芍 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药理学杂志, 2007, 42(8): 581.
- [8] 万德光. 中药品种品质与药效[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2007.

[责任编辑 蔡仲德]

of Gypsum Fibrosum can increase the content of neomangiferin at first then decrease when the proportion was 3:1 (Gypsum Fibrosum-Anemarrhenae Rhizoma). **Conclusion:** This method is simple, accurate and good repeatability. It can be used for the determination about the contents of neomangiferin in the drug couple about Anemarrhenae Rhizoma and Gypsum Fibrosum. The research proved the theory that 'the secret of Chinese medicine is due to the dose', which points out the direction for further research.

**[Key words]** drug couple; Anemarrhenae Rhizoma-Gypsum Fibrosum; compatibility; neomangiferin; HPLC

药对是临床上常用且相对固定的两味中药配伍使用的一种形式,是中药配伍中最小最基本的单位。药对研究是目前中药研究领域的热点,对中医药的发展革新起着推动作用和指导意义。知母和石膏作为临床常用药对,最早见于东汉张仲景《伤寒论》的白虎汤,二者配伍具有清热生津,润燥止渴的功效,尤其是退热效果明显;在宋元明清以及现在都有大量的应用,其配伍比例也不完全相同。新芒果苷是知母双苯吡酮类化合物的一种,在实验和研究时发现其含量变化较大,但相关研究较少,配伍以及药效学未见相关文献报道,故本文从中药药对石膏-知母物质基础着手重在研究新芒果苷的变化规律,为药效学研究和临床辨证用药提供实验依据。

## 1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪; 2996 PDA 检测器; SK5200H 型超声波清洗机(上海科导); AE200 型电子天平(美国), CP225 D 型电子天平(奥豪斯)。新芒果苷(批号 A0310)由成都药品生物制品检定所提供。甲醇、乙腈为色谱纯,重蒸水,去离子水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

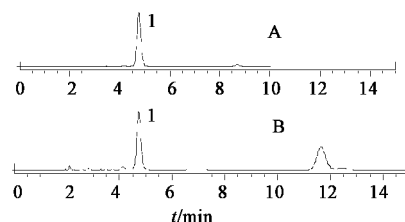
**2.1.1 对照品溶液的制备** 精密称取新芒果苷对照品适量,加甲醇制成  $0.03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液,作为对照品溶液。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 将不同比例配伍的样品(知母为 10 g)分别置于圆底烧瓶中,加去离子水回流提取,第 1 次加 300 mL,第 2 次加 240 mL,每次提取 1 h,合并 2 次提取液,过滤,将滤液浓缩并定容至 250 mL,作为储备液。取 1 mL 加水定容至 10 mL,摇匀,滤过,取滤液作为供试品溶液。

**2.2 色谱条件** Waters  $\text{C}_{18}$  柱(4.6 mm  $\times$  250 mm 5  $\mu\text{m}$ ),乙腈-0.2% 醋酸水(15:85)为流动相,流速为  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,检测波长 258 nm,柱温为室温。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 专属性试验** 在上述色谱条件下取对照品溶液( $0.0272 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )和供试品溶液各 10  $\mu\text{L}$  进样测定。结果在对照品色谱峰保留时间的相应位置上有一强峰,分离度良好,均  $>1.5$ ,见图 1。



1. 新芒果苷; A. 对照品; B. 供试品

图 1 石膏-知母药对 HPLC

**2.3.2 线性关系的考察** 分别精取新芒果苷对照品溶液( $0.136 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 mL, 加甲醇定容至 2 mL, 吸取上述溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 分别注入液相色谱仪, 测定峰面积值。以进样量和峰面积值进行回归处理, 结果芒果苷在进样量 0.027 2 ~ 0.435 2  $\mu\text{g}$  线性良好, 回归方程  $Y = 8245.4X - 76679$  ( $r = 1.0000$ )。

**2.3.3 精密度试验** 取同一对照品溶液( $0.0272 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )进行试验, 每次进样 10  $\mu\text{L}$ , 连续进样 6 次, 测定新芒果苷峰面积值, 计算得 RSD 0.45%。

**2.3.4 稳定性试验** 取同一配伍(3:1)供试品溶液在 0, 2, 4, 6, 8 h 分别进样, 每次进样 10  $\mu\text{L}$ , 测定芒果苷峰面积, 结果 RSD 为 1.24%。表明样品在 10 h 内稳定。

**2.3.5 重复性试验** 取同一配伍(3:1)制备 5 份供试品溶液, 进样 2 次, 每次进 10  $\mu\text{L}$ , 测定新芒果苷峰面积平均值, 计算求得新芒果苷含量为  $0.478 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , RSD 1.95%。

**2.3.6 加样回收率试验** 取同一配伍(3:1)储备液 6 份, 0.5 mL/份, 分别精密加入新芒果苷对照品溶液( $0.136 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 约 1.6 mL, 加水定容至 10 mL, 摇匀, 进行测定, 计算回收率, 结果平均回收率为 99.95%, RSD 1.69% ( $n = 6$ ), 见表 1。

表 1 新芒果苷加样回收试验

| No. | 取样量<br>/mL | 样品中<br>含量<br>/mg | 加入量<br>/mg | 测得量<br>/mg | 回收率<br>/% | 平均值<br>/% | RSD<br>/% |
|-----|------------|------------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 1   | 0.5        | 0.239            | 0.218      | 0.459      | 100.91    | 99.95     | 1.69      |
| 2   | 0.5        | 0.239            | 0.231      | 0.463      | 96.97     |           |           |
| 3   | 0.5        | 0.239            | 0.218      | 0.456      | 99.54     |           |           |
| 4   | 0.5        | 0.239            | 0.218      | 0.460      | 101.38    |           |           |
| 5   | 0.5        | 0.239            | 0.218      | 0.456      | 99.54     |           |           |
| 6   | 0.5        | 0.239            | 0.218      | 0.460      | 101.38    |           |           |

2.4 新芒果苷的测定 将不同比例配伍供试品储备液各取 2 份,分别按供试品溶液方法制备溶液,精密吸取供试品溶液 10  $\mu$ L,进样,依法测定,计算含量,见表 2。

表 2 样品中新芒果苷的含量  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

| 样品称量              | 新芒果苷   |
|-------------------|--------|
| 单煎                | 5.582  |
| 石膏 10 g + 知母 10 g | 6.179  |
| 石膏 20 g + 知母 10 g | 6.672  |
| 石膏 30 g + 知母 10 g | 12.899 |
| 石膏 40 g + 知母 40 g | 8.448  |

### 3 讨论

3.1 配伍比例的来源 石膏与知母配伍,最早见于东汉张仲景《伤寒论》的白虎汤,是治疗热在气分的重要药对,处方中用知母 6 两,石膏 1 斤(砵);《回春》卷二:白虎汤主治阳明经汗后脉洪大而渴,或身热有汗不解,处方中用石膏 5 钱,知母 2 钱;明·方贤着《奇效良方》:白虎汤主治伤寒脉浮滑者,表里有热,知母(三钱)石膏(五钱);《校注妇人良方》卷七:白虎汤主治胃热作渴,暑热尤效,用知母 2 钱,石膏 2 钱。临床上根据病人及病情需要,辨证调整其配伍比例,绝大多数在 1:1~4:1。综合考虑文献资料、实验研究及临床应用,本实验最终设计选择(石膏-知母) 1:1,2:1,3:1,4:1,同时选知母单煎作为对照。

3.2 提取方法的选择 本课题是为了印证“中医不传之秘在于剂量”之说,为全面质量控制提供参考,为临床应用提供依据,因此本实验主要考虑水煎的提取方法,同时为了更好的控制实验条件,故采取水回流方法提取。

3.3 色谱条件的选择 实验中曾经对流动相进行筛选,结果乙腈-0.2% 醋酸溶液(15:85)<sup>[1]</sup>时,新芒果苷分离度良好保留时间适宜,但芒果苷的分离效果较差;调节到乙腈-0.2% 醋酸水(20:80)时,芒果

苷分离度良好保留时间适宜,但新芒果苷的分离效果较差;调节到乙腈-0.2% 醋酸水(12:88)<sup>[2]</sup>时,芒果苷和新芒果苷不能达到基线分离且保留时间较长;也曾经采用梯度洗脱<sup>[3-5]</sup>,分离度不好,并且运行时间较长。经实验,决定分开测定芒果苷和新芒果苷,测定新芒果苷流动相为乙腈-0.2% 醋酸水(15:85),吸收波长 258 nm;柱温 28  $^{\circ}\text{C}$ 。此条件下样品峰形较好,分离度良好,保留时间适当。

3.4 测定成分的选择 知母和石膏作为临床常用药对,石膏组成主要为含水硫酸钙,此外还含有多种无机元素,如铜、铁、铝等。有报道石膏的解热作用与硫酸钙无关,可能与所含的微量元素有关<sup>[6]</sup>;知母化学成分主要为甾体皂苷、双苯吡酮类(芒果苷、新芒果苷),主要药理作用与上述成分关系密切,甾体皂苷和芒果苷的相关研究较多,新芒果苷的药效学研究未见报道;在实验中发现石膏与知母配伍变化时,微量元素变化趋势不明显,芒果苷含量变化也不大,但新芒果苷的含量变化较大,并且没有相关研究报道,故进行研究,为药效学研究打好基础。

3.5 新芒果苷变化原因探究 供试品溶液的制备采用水回流提取,其影响因素主要是配伍比例和回流时间,本文主要研究了配伍的影响,在多次对回流时间影响试验中发现,回流 60 min 时新芒果苷含量最高,但是每次含量都不相同,可能与药材以及外界条件有关,其原因需要进一步研究。

### 【参考文献】

- [1] 中国药典.一部[S].2010:198.
- [2] 翟红莉,孙连娜,来威. HPLC 法测定知母药材及其相关制剂中芒果苷和新芒果苷的含量[J]. 解放军药学学报,2007,23(6):472.
- [3] 周永刚,黄晟,谷莉. HPLC 法测定知母药材中芒果苷和新芒果苷的含量[J]. 药学实验杂志,2005,23(2):99.
- [4] 方前波,秦昆明,潘扬. RP-HPLC 法测定百合知母汤中芒果苷、新芒果苷的含量[J]. 现代中药研究与实践,2010,24(4):67.
- [5] 朱东亮. 知母药材多维色谱指纹图谱研究[D]. 上海:第二军医大学,2009.
- [6] 苏达世,万邦莉. 石膏中无机元素的研究概况[J]. 中国医院药学杂志,1989,9(4):166.

[责任编辑 蔡仲德]