

## 炮制前后知母中芒果苷和新芒果苷的含量变化

刘 敏<sup>1</sup>, 赵白云<sup>1</sup>, 赵 亮<sup>2</sup>, 姜子洋<sup>3</sup>, 柴逸峰<sup>1\*</sup>

(1. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433; 2. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438; 3. 第二军医大学药学院分析测试中心, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:** 考察炮制前后知母(*Anemarrhena asphodeioides* Bge.) 中黄酮类成分芒果苷和新芒果苷的含量变化。**方法:** 采用 HPLC 法测定知母、炒知母中芒果苷和新芒果苷的含量, 流动相为乙腈-25 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾缓冲液 (pH 3.0) 梯度洗脱。应用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 A 版(国家药典委员会)对 3 个批号的知母炮制前后的色谱图进行评价。**结果:** 3 个批号的知母炮制前后芒果苷的含量升高, 而新芒果苷的含量下降; 炮制前后图谱的相似度均有所下降 (<1)。**结论:** 炮制后知母中黄酮类成分芒果苷和新芒果苷的含量发生了变化。

**[关键词]** 炮制; 知母; 芒果苷; 新芒果苷**[中图分类号]** R 283.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)05-0528-03Changes of mangiferin and neomangiferin contents in *Rhizoma Anemarrhenae* before and after processingLIU Min<sup>1</sup>, ZHAO Bai-yun<sup>1</sup>, ZHAO Liang<sup>2</sup>, LOU Zi-yang<sup>3</sup>, CHAI Yi-feng<sup>1\*</sup> (1. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438; 3. Analysis and Testing Center, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To determine the changes of mangiferin and neomangiferin contents in *Rhizoma Anemarrhenae* before and after processing. **Methods:** High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the changes of mangiferin and neomangiferin contents in *Rhizoma Anemarrhenae* before and after processing. The mobile phase was ACN; 25 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3.0), gradient elution. The Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM (2004 A edition) was used to evaluate the similarity of the 3 batches of *Rhizoma Anemarrhenae* before and after processing. **Results:** Mangiferin in the 3 batches was upregulated and neomangiferin was downregulated after processing. The similarity of the 3 batches was all decreased (<1). **Conclusion:** Processing changes the contents of mangiferin and neomangiferin in *Rhizoma Anemarrhenae*.

**[KEY WORDS]** processing; anemarrhenae; mangiferin; neomangiferin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(5): 528-530]

知母为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeioides* Bge. 的根茎, 具有清热泻火, 生津润燥的功效, 用于高热烦渴, 肠燥便秘等<sup>[1]</sup>。知母含有皂苷、黄酮及木脂素等多种成分<sup>[2]</sup>; 黄酮类有效成分新芒果苷、芒果苷是知母清热作用的有效成分, 还有抗炎、抗病毒、抗抑郁等药理作用<sup>[3]</sup>。知母的含量测定方法有高效液相法<sup>[4]</sup>、蒸发光散射法<sup>[5]</sup>、薄层扫描法<sup>[6]</sup>等。

知母目前临床上常用药材为知母肉和炒知母两种, 炒知母是将生知母清炒至微具焦斑, 筛去灰屑而得。为探讨知母药材炮制的合理性, 科学指导临床应用, 本研究选择芒果苷和新芒果苷为测定成分, 以高效液相色谱法测定知母炮制前后芒果苷和新芒果苷含量的变化。

## 1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 Agilent1100 高效液相色谱仪

(四元泵, 脱气机, 自动进样器, 柱温箱, 二极管阵列紫外检测器)。芒果苷、新芒果苷对照品由本院生药学教研室制备, 采用面积归一化检查, 纯度均在 98% 以上; 甲醇、乙腈购自 Fisher 公司, 色谱纯; 水为纯净水, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 为分析纯。3 批知母药材为市售 (批号为 20041127 购自上海, 20040816 购自河北, 20040305 购自安徽), 经本院生药学教研室陈万生副教授鉴定为知母 *Anemarrhena asphodeioides* Bge. 的干燥根及根茎。炒知母 (批号同上) 由上海青

**[基金项目]** 上海市科委科技攻关(02419125); 上海市科委重大项目(2403DZ19548)。Supported by Grants for Tackling Key Program of Shanghai Science and Technology Committee(02419125) and Key Program of Shanghai Science and Technology Committee(2403DZ19548)。

**[作者简介]** 刘 敏, 硕士生。

\* Corresponding author. E-mail: yfchai2003c@163.com

浦中药饮片有限公司根据上海市中药炮制规范(1994 年版及企业质量标准)炮制。

1.2 含量测定方法的建立<sup>[4]</sup>

1.2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);柱温为 25℃,流速:1.0 ml/min,采用梯度洗脱,A 相为乙腈,B 相为 25 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾缓冲液(pH 3.0),梯度程序如下:0~2 min,95%B;2~5 min,95%~92%B;5~20 min,92%B;20~32 min,92%~85%B,32~50 min,85%~30%B。进样量为 10 μl,运行 60 min,检测波长为 257 nm。每次进样前采用起始梯度平衡 15 min。

1.2.2 线性关系 取不同浓度芒果苷和新芒果苷对照品溶液各 10 μl,分别依 1.2.1 项下色谱条件测定,以峰面积 Y 对浓度 X 进行线性回归,计算回归方程。

1.2.3 精密度 在上述色谱条件下,分别取高、中、低三种浓度的新芒果苷和芒果苷对照品溶液(101.8、50.9、20.4 μg·ml<sup>-1</sup>和 86.6、43.3、17.4 μg·ml<sup>-1</sup>)各 10 μl,在 1 d 之内连续进样 5 次,考察日内精密度,以及连续 5 d 分别进样考察日间精密度。

1.2.4 最低检测限 测定当信噪比为 3:1 时新芒果苷和芒果苷的浓度。

1.2.5 加样回收率 精密称取已测定含量的知母药材(批号:20041127)3 份,分别定量加入高、中、低三种芒果苷、新芒果苷对照溶液(101.8、50.9、20.4 μg·ml<sup>-1</sup>和 86.6、43.3、17.4 μg·ml<sup>-1</sup>)各 1.0 ml,按 1.2.1 项下色谱条件测定。

1.3 知母、炒知母中芒果苷和新芒果苷的含量测定 取知母、炒知母药材粉末各约 0.2 g,精密称定,置 50 ml 锥形瓶中,加入 20 ml 的 80% 甲醇溶液,超声处理 20 min,过滤,残渣再用 20 ml 的 80% 甲醇溶液超声处理 20 min,过滤,合并滤液,用少量甲醇溶液洗涤容器及残渣,滤过,并入滤液,挥干甲醇溶液。残渣用适量甲醇溶解,移入 25 ml 量瓶中,加甲醇至刻度,经 0.45 μm 滤膜过滤后,按照 1.2.1 项下色谱条件测定。

1.4 相似度评价 运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 A 版(国家药典委员会)<sup>[7]</sup>处理炮制前和炮制后的知母图谱,分别生成知母和炒知母的对照图谱,再对对照图谱进行相似度评价。该软件根据保留时间对色谱峰进行匹配,通过比较色谱图的相似性,确定药材中成分和含量的接近程度。

2 结 果

新芒果苷和芒果苷的回归方程及线性范围分别

为  $Y=13.06X+2.84(r=0.999), 5.09\sim 509.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ;  $Y=16.64X-33.92(r=0.999), 4.33\sim 433.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。新芒果苷和芒果苷的日内精密度和日间精密度分别为 2.31%、3.41%、1.93% 和 3.88%、2.99%、1.49%;0.11%、0.15%、0.32% 和 0.31%、0.19%、0.41%,表明方法的精密度良好。新芒果苷和芒果苷的最低检测限分别为 0.27 μg/ml 和 0.26 μg/ml。新芒果苷和芒果苷的平均回收率分别为 97.14%,RSD=2.72%(n=3); 97.45%,RSD=3.17%(n=3)。色谱图见图 1,知母炮制前后新芒果苷和芒果苷的含量变化见表 1。

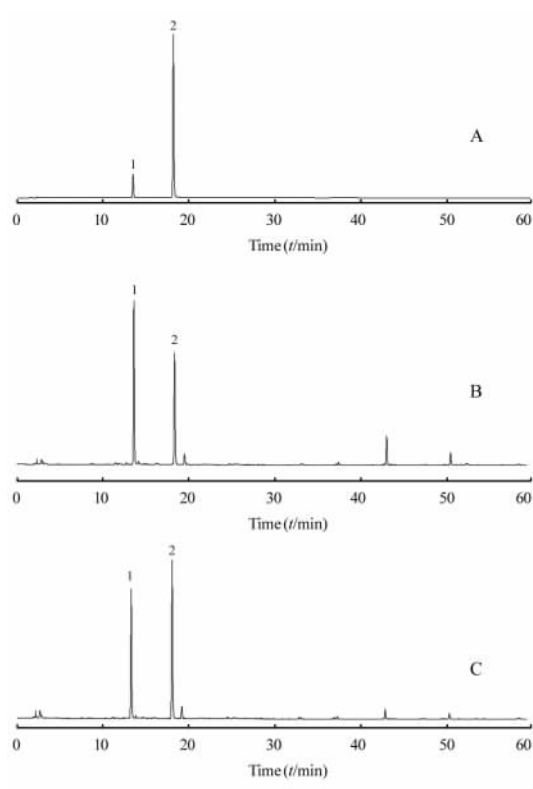


图 1 对照品及样品的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances and samples

A: Standard; B: Sample before processing; C: Sample after processing; 1: Neomangiferin; 2: Mangiferin

表 1 炮制前后知母中芒果苷和新芒果苷的含量  
Tab 1 Contents of mangiferin and neomangiferin in *Rhizoma Anemarrhenae* before and after processing  
(%, n=5,  $\bar{x}\pm s$ )

Batch	Neomangiferin		Mangiferin	
	Before processing	After processing	Before processing	After processing
20041127	2.97±0.42	2.74±0.34	2.16±0.48	2.82±0.83
20040816	0.36±0.03	0.30±0.04	3.83±0.32	4.24±0.22
20040305	1.12±0.03	0.65±0.06	3.56±0.41	4.42±0.23

由表可知,炮制后3个批号知母中总黄酮的增加量分别为8.46%、8.63%、8.27%。相似度比较发现,3个批号(20041127、20040816、20040305)的相似度分别为0.961、0.988、0.969,炮制前后的相似度均<1。

### 3 讨论

知母中芒果苷和新芒果苷的分子结构式为:



从知母炮制前后芒果苷和新芒果苷的含量变化可以看出,3个批号的知母炮制后新芒果苷的含量下降,而芒果苷的含量上升,根据分子式和炮制方法分析,可能是新芒果苷上的糖苷基(Glc-O)对热不稳定,炒制过程中容易断裂转化为芒果苷。芒果苷和

新芒果苷是知母清热的主要成分,研究表明,炮制后其他有紫外吸收的成分其含量也有所下降,所以,目前临床上混用知母和炒知母有一定的不合理性。

3批药材的产地不相同,新芒果苷和芒果苷的含量最多相差10倍左右,提示临床应用需考虑药材是否地道的问题。

3批药材炮制前后总黄酮类成分变化的幅度比较接近,表明该炮制工艺能保持药材质量的稳定性,如能在炒制时间和温度上量化统一,保持药材质量的同时节省炮制时间,则更加科学合理。

### [参考文献]

[1] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005. 148.

[2] 杨丽蓉, 徐小玉. 知母的化学成分及药理作用研究进展[J]. 国外医学·中医中药分册, 2002, 24: 207-210.

[3] 郑民实, 陆仲毅. 芒果甙与异芒果甙的抗单纯疱疹病毒作用[J]. 中国药理学报, 1989, 10: 85.

[4] 周永刚, 黄 晟. HPLC法测定知母药材中芒果苷和新芒果苷的含量[J]. 药学实践杂志, 2005, 23: 99-102.

[5] 沈 巍, 来沪平. RP-HPLC-ELSD法测定知母药材及含知母制剂中菝葜皂苷元的含量[J]. 中草药, 2001, 32: 889-991.

[6] 王志安, 冯开东. 薄层扫描法测定知母总皂苷元中菝葜皂苷元的含量[J]. 广东药学, 2001, 11: 14-16.

[7] 聂 磊, 曹 进, 罗国安. 中药指纹图谱相似度评价方法的比较[J]. 中成药, 2005, 27: 249-252.

[收稿日期] 2005-10-10

[修回日期] 2006-02-22

[本文编辑] 尹 茶

## Expression of aspartyl beta-hydroxylase and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma

Xian ZH, Zhang SH, Cong WM, Yan HX, Wang K, Wu MC (Department of Pathology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[ABSTRACT] The human aspartyl beta-hydroxylase is a highly conserved enzyme that hydroxylates epidermal growth factor-like domains in transformation-associated proteins. The aspartyl beta-hydroxylase gene is upregulated in many human malignancies. The purpose of this study was to investigate the expression of aspartyl beta-hydroxylase in hepatocellular carcinoma. Aspartyl beta-hydroxylase mRNA levels were measured in 161 hepatocellular carcinomas and paired nontumorous liver tissues by conventional and real-time RT-PCR. Immunohistochemical staining of aspartyl beta-hydroxylase was performed using EnVision Plus system. The results showed that aspartyl beta-hydroxylase was overexpressed in 150 of 161 hepatocellular carcinomas (93%), including 45 of 48 unifocal small hepatocellular carcinomas (94%). Aspartyl beta-hydroxylase was highly expressed in hepatocellular carcinoma cells in contrast to its low level of expression in non-neoplastic liver cells. The protein expression level of aspartyl beta-hydroxylase in the hepatocellular carcinoma was parallel with the mRNA expression level ( $r=0.6594, P<0.0001$ ). A significantly higher tumor aspartyl beta-hydroxylase overexpression level was associated with the presence of intrahepatic metastasis and the progression of histological grades. In conclusion, aspartyl beta-hydroxylase is overexpressed frequently in hepatocellular carcinoma, including early-stage small hepatocellular carcinoma, indicating that overexpression of aspartyl beta-hydroxylase plays a role in the development and progression of hepatocellular carcinoma.

[Mod Pathol, 2006, 19: 280-286]