

HPLC 法测定益肾灵颗粒中淫羊藿苷的含量

朱山寅 薛磊冰

(浙江省嘉兴市药品检验所#嘉兴 314001)

摘要 目的:建立测定益肾灵颗粒中淫羊藿苷含量的测定方法。方法:采用 C₁₈柱,流动相为乙腈-水(20B80),流速为 110mPmin,检测波长为 270nm。结果:淫羊藿苷线性范围 0l15~115Lg,相关系数 r=0.9991,平均加样回收率为 99l45%,相对标准偏差 RSD 为 0l88%(n=6)。结论:本法操作简便,准确,重复性好,可作为该制剂的定量分析方法。
主题词 益肾灵颗粒P分析 淫羊藿苷

益肾灵颗粒由淫羊藿、女贞子、枸杞子、补骨脂、沙苑子、金樱子、芡实等 13 味中药组成,具有温阳补肾功能。用于肾气亏虚、阳气不足所致的阳痿、早泄、遗精或弱精症。收载于 5 中国药典62005 年版一部^[1],现标准中尚无含量测定项目,淫羊藿苷是淫羊藿的活性成分,是本方有效成分之一。为了有效地控制益肾灵颗粒的质量,本文采用高效液相色谱法测定该制剂中淫羊藿苷的含量。现报道如下。

1 仪器与试药 高效液相色谱仪:Waters 510/484 色谱系统及 N2000 工作站。淫羊藿苷对照品:中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号 0737-9908。益肾灵颗粒:市售品。制备阴性样品所需药材由浙江嘉兴东方国药饮片有限公司提供。乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯;水为重蒸馏水。
2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈(4.6mm@150mm, 5Lm)分析柱;流动相:乙腈-水(20B80),流速 1.0ml#min⁻¹;测定波长 270nm;柱温:室温。理论板数按淫羊藿苷计应不低于 2500。
2.2 对照品溶液的制备 精密称取在 105e 干燥至恒重的淫羊藿苷对照品适量,加甲醇制成 0.15003mg/ml 的溶液,即得。

2.3 样品溶液的制备 取样品 10g,碎细,精密称取 0.5g。加水 20.0ml,置 65e 水浴中保温 1 小时,并时时振摇,取出,放冷,滤过。将滤液通过预先处理好的聚酰胺柱(2g,100~200 目,内径 1.8cm)先用水 50ml 洗脱,再用 20%乙醇 30ml 洗脱,弃去。继用 60%乙醇 50ml 洗脱,收集洗脱液,蒸干,用 50%乙醇溶解残渣并定容于 25ml 量瓶中,摇匀,滤过,取续滤液用 0.45Lm 的微孔滤膜滤过,即得。

2.4 阴性对照溶液的制备 按处方量制备不含淫羊藿药材的阴性样品,按样品溶液制备方法制成阴性对照溶液。
2.5 干扰试验 照上述色谱条件,量取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照液各 20Ll,分别注入色谱仪。供试品色谱图中,在与对照品色谱图相应的位置上,有一相同的色谱峰,而阴性液在此保留时间无干扰。见图 1。

2.6 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液(0.15003mg#ml⁻¹)1.0,2.0,4.0,6.0,8.0,10.0ml,分别置 20ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,即得,分别进样 20Ll,以峰面积积分值 Y 为

纵坐标,淫羊藿苷进样量 X(Lg)为横坐标,绘制标准曲线。得回归方程:Y=2638937X+4234, r=0.9991,表明淫羊藿苷在 0.15~1.5Lg 范围内呈良好的线性关系。

2.7 精密度试验 准确吸取对照品溶液 20Ll,重复进样 5 次,测定淫羊藿苷对照品峰面积的 RSD 为 0.97%。表明仪器精密度符合要求。

2.8 稳定性试验 精密吸取新配制的同一样品溶液,分别在 0、4、8、16、24 小时进样,测定淫羊藿苷峰面积, RSD=1.46%(n=6),表明供试品溶液在 24 小时内稳定。

2.9 重现性试验 取同一批号样品 6 份,按样品溶液制备方法制备及测试条件测定,结果淫羊藿苷平均含量的 RSD=1.43%(n=6),表明本法重现性良好。

2.10 加样回收率试验

精密称取已知含量样品(批号)6 份,精密加入淫羊藿苷对照品适量,照 2.3 项下样品溶液的制备并按上述色谱条件进行测定,经计算,平均加样回收率为 99.45%, RSD=0.88%(n=6),结果见表 1。

表 1 加样回收率实验结果

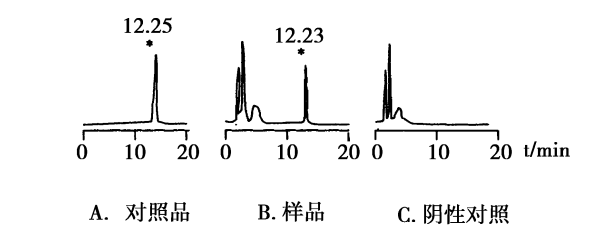
原含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率(%)	RSD (%)
0.6783	0.15232	1.12001	99.173	99.145	0.188
0.6695	0.15232	1.11895	99.139		
0.6524	0.16502	1.13087	100.194		
0.6712	0.16502	1.13103	98.129		
0.6861	0.17813	1.14597	99.101		
0.6797	0.17813	1.14558	99.133		

2.11 样品测定

分别精密称取不同批号的益肾灵颗粒粉末约 1g。按样品溶液制备法制备。分别精密吸取 20Ll,按上述色谱条件测定,3 批样品中淫羊藿苷的含量测定结果见表 2 和附图。

表 2 样品中淫羊藿苷的含量(n=5)

样品批次	淫羊藿苷含量(mg#g ⁻¹)	RSD%
1	0.16783	11.56
2	0.16524	11.03
3	0.16861	11.24



附图 益肾灵颗粒HPLC图谱

3 讨论

该制剂中有女贞子、枸杞子、补骨脂、沙苑子、金樱子等药材,在水或乙醇提取淫羊藿苷的同时,也提取出大量的杂质和其它成分,无法直接进行色谱测定,必须对提取物进行净化去杂处理。在确定提取条件时,曾对提取溶媒、提取及除杂方法进行了对比实验。通过对乙醇、水、50%乙醇3种

溶媒、超声波处理及热回流提取、聚酰胺小柱及D101大孔树脂小柱除杂的对比实验,确定了以聚酰胺柱进行净化处理,收集60%洗脱部分进行HPLC测定,在该净化条件下,可去除大量杂质,淫羊藿苷洗脱完全,并能达到基线分离,无杂质峰干扰。

淫羊藿苷对照品溶液与益肾灵颗粒的醇提液在270nm波长处均有最大吸收,故选择270nm作为检测波长。

本法经方法学验证,重现性及回收率良好,可作为益肾灵颗粒的质量控制方法,亦为中药大复方中淫羊藿苷的测定提供参考。

参考文献

1 中国药典 2005 年版 1 一部 12005:577
(收稿:2006- 03- 29)

益寿永真合剂对衰老小鼠钙稳态影响的实验研究

陈金秀 王 迪 李国峰 余海滨¹

(河南省人民医院#郑州 450003 ¹北京中医药大学 2003 级博士研究生#北京 100029)

1 实验材料 药物:益寿永真合剂(YSYZ)由生地、人参、白茯苓、天冬、麦冬、枸杞子等中药组成,水煎煮2次,合并煎液,70%乙醇醇沉,回收乙醇,浓缩,4e 放置,除去沉淀。合并提取液,进一步浓缩,制成含1g生药ml的提取液,备用。动物:昆明种雄性小白鼠40只,月龄,体重20~30g,郑州大学实验动物中心提供。

2 实验方法 小鼠随机分为4组,每组10只。分为空白对照组(A组)、衰老模型组(B组)、YSYZ低剂量组(C组)、YSYZ高剂量组(D组)。除A组外,其余3组分别皮下注射D-半乳糖(购于上海试剂二厂)1g/kg·d⁻¹,另外C组和D组分别灌胃YSYZ415、910g/kg·d⁻¹,A组给予等量生理盐水颈部皮下注射及灌胃,B组同时给予等量生理盐水灌胃。连续给药8周,给药结束后,小鼠断头处死,取血1ml,3000Pmin离心5分钟,分离血细胞及血清,测胰岛素(试剂盒购于解放军总医院科技开发中心放射研究所)含量及Ca²⁺-ATP酶、Na⁺-ATP酶活性(试剂盒购于南京建成生物制品研究所),检测方法参照试剂盒说明。4e 下将脑组织以生理盐水制成10%组织匀浆,取匀浆1ml加等量高氯酸-浓盐酸(1B1)硝化,加0.12%氯化锶作为释放剂,用原子吸收光谱法测定Ca²⁺含量。统计学处理:实验数据均以x±s表示,进行组间t检验。

3 结果 见附表。

附表 各组小鼠血清胰岛素含量、Ca²⁺-ATP酶、Na⁺-ATP酶活性及脑组织Ca²⁺含量的变化(x±s)

组别	n	胰岛素 (LmolPL)	Ca ²⁺ -ATP酶 (Lmolp10 ⁷ RBGp)	Na ⁺ -ATP酶 (Lmolp10 ⁷ RBGp)	Ca ²⁺ (LgPml)
A	10	181.37±91.17	0.0053±0.0006	0.0057±0.0004	11.12±0.33
B	10	111.08±41.03 ^v	0.0005±0.0003 ^v	0.0008±0.0004 ^v	11.53±0.62 ^v
C	10	231.98±81.83 ^{**}	0.0038±0.0006 [*]	0.0019±0.0005 [*]	11.09±0.43 ^{**}
D	10	301.27±121.74 ^{**}	0.0061±0.0007 ^{**}	0.0034±0.0008 ^{**}	11.33±0.58 ^{**}

与A组比较^v P<0.01;与B组比较^{*} P<0.05,^{**} P<0.01

4 讨论 机体正常代谢过程中,细胞外Ca²⁺浓度是细胞内Ca²⁺浓

度的2万倍,这种钙稳态是维持细胞正常生命活动的基础^[1]。随着年龄的增长,体内多种酶活性下降,细胞内Ca²⁺浓度升高,引起Ca²⁺超载,导致钙稳态失调,最终使细胞死亡^[2]。研究发现^[3],胰岛素可通过增加钙调蛋白的含量、磷酸化及其与Ca²⁺的亲合力来提高Ca²⁺-ATP酶活性,后者分解1分子ATP可将1~2个Ca²⁺跨膜转移到细胞外,从而降低细胞内Ca²⁺浓度。同时胰岛素可通过增加Na⁺-ATP酶新生A基因表达,提高Na⁺-ATP酶对Na⁺-K⁺-ATP的亲合力,从而导致Na⁺内流减少,Na⁺-Ca²⁺交换增加,最终使Ca²⁺内流减少^[4]。

本实验结果显示,YSYZ各剂量组可显著提高衰老模型小鼠血清胰岛素水平,同时明显增强血清Ca²⁺-ATP酶、Na⁺-ATP酶的活性,显著降低脑组织中Ca²⁺的浓度,起到了维持衰老小鼠钙稳态的作用。研究结果提示提高血清胰岛素水平,增强Ca²⁺-ATP酶、Na⁺-ATP酶活性,降低细胞内Ca²⁺超载,可能是益寿永真合剂抗衰老的作用机制。

参考文献

1 Nicotera P, Bellomo G, Orenius S. Influs of calcium through a redox sensitive plasma membrane in thymocytes causes early necrotic cell death induced by the epipoidioxopiperazine toxins. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 1992; 32:449
2 Dominguez L J, Barbagallo M, Jacober SJ, et al. Bisoprolol and captopril effects on insulin receptor tyrosine kinase activity in essential hypertension. Am JHypertens, 1997; 10(1): 1349
3 龚国清1 小鼠衰老模型研究1 中国药科大学学报, 1992; 22(2): 101
4 丁怡1 胰岛素和IGF-1对血管平滑肌细胞离子和糖代谢的影响. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 1998; 18(4): 341

(收稿:2006- 03- 21)