

4 讨论

本研究中的单核-巨噬细胞功能、体液免疫功能、细胞免疫功能测定结果阳性,NK 细胞活性测定阴性。根据卫生部《保健食品检验与评价技术规范》^[5]有关增强免疫力功能判定的标准,上述四个方面有任意两个结果阳性,可以判定受试物具有增强免疫功能作用,因此根据试验结果可以初步判定 MIP 具有一定的增强免疫功能的作用。

多糖不仅能有效地激活免疫细胞、提高机体的免疫能力,而且对正常宿主细胞无直接的不良反^[6]。多糖可以作用于机体免疫系统的很多环节,不仅能激活巨噬细胞,T 淋巴细胞,B 淋巴细胞、NK 细胞等免疫细胞,还能促进细胞因子生成,活化补体及调节神经-内分泌-免疫网络的平衡,从而在抗病毒和抗肿瘤方面具有独特的功效。其可能的机制为多糖作为信号传导分子和细胞间的识别分子参与机体免疫应答,促进机体对外来抗原的识别杀伤,同时还具有“宿主中介”作用,刺激网状内皮系统,提高

宿主对特异抗原免疫反应力,从而增强机体免疫能力^[7]。本研究显示,MIP 能增强小鼠机体的免疫功能,是一种良好的免疫调节剂,具有良好的应用前景,其免疫增强作用的机制仍有待进一步探索。

参考文献:

- [1] 李时珍.本草纲目(上下册校本)[M].2版.北京:人民卫生出版社 2004:10.
- [2] 王长云,邵长伦,傅秀眉,等.中国海洋药物资源及其药用研究调查[J].中国海洋大学学报 2009,39(4):669-675.
- [3] 向维,姜玉新,李朝品.海洋贝类多糖的抗病毒作用[J].国际流行病学传染病学杂志 2010,37(1):57-61.
- [4] 向维,姜玉新,李朝品.活性多糖类化合物抗乙型肝炎病毒的生物学功能研究[J].国际流行病学传染病学杂志 2010,37(6):455-459.
- [5] 中华人民共和国卫生部.保健食品检验与评价技术规范(2003年版)[S].2003:22-34.
- [6] 卞俊,储智勇,鲍蕾蕾,等.孔石莼多糖对小鼠免疫功能的影响[J].中国生化药物杂志 2006,27(5):276-279.
- [7] Varki A.糖生物学基础[M].张树政,译.北京:科学出版社,2003:522-537.

高效液相色谱法测定还原固精丸中马钱苷的含量

胡敏,金鸣,陈三理

(福建省药品检验所,福建福州 350001)

摘要:目的 建立还原固精丸中马钱苷的含量测定方法。方法 采用 Welch Materials XB-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm),四氢呋喃-乙腈-甲醇-0.05% 磷酸溶液(1:6:4:89)为流动相,检测波长 236 nm。结果 马钱苷在 0.040 52 ~ 4.052 μg 范围内与峰面积呈良好线性关系($r = 1.000 0$),平均加样回收率为 101.04%,RSD 为 1.60%($n = 9$)。结论 该法操作简便,结果准确,重复性好,可用于还原固经丸的质量控制。

关键词: 还原固精丸; 马钱苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1005-1678(2011)05-0395-03

Determination of loganin in Huanyuan Gujing Pill by HPLC

HU Min, JIN Ming, CHEN San-li

(Fujian Institute for Drug Control, Fuzhou 350001, China)

Abstract: Purpose To establish a method for determination of loganin in Huanyuan Gujing Pill. **Methods** The Welch Materials XB-C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm 5 μm) was used with tetrahydrofuran-acetonitrile-methanol-0.05% phosphoric acid(1:6:4:89) as mobile phase and detection wavelength at

收稿日期: 2010-05-21

作者简介: 胡敏,女,主管药师,主要从事中药质量分析, Tel:

236 nm. **Results** The linear range of loganin was 0.040 52~4.052 μg ($r = 1.000 0$), the average recovery was 101.04% with *RSD* of 1.60%. **Conclusion** The method is simple and accurate with good reproducibility and can be used for the quality control of Huanyuan Gujing Pill.

Key words: Huanyuan Gujing Pill; loganin; HPLC

还原固精丸由山茱萸、黄柏、知母、牡丹皮等十四味药材经一定工艺加工制成,具有滋阴、补肾、涩精之功效。方中山茱萸具有补益肝肾、涩精固脱等作用^[1]。据文献报道,山茱萸中有效成分马钱苷测定的方法有高效液相色谱法^[2-3]、胶束电动毛细管色谱法^[4]。本文采用高效液相色谱法,对还原固精丸中山茱萸所含马钱苷进行含量测定,并进行方法学考察。

1 仪器和试剂

岛津 LC-2010AHT 高效液相色谱系统(自动进样器、二级管阵列检测器、Solution 色谱工作站); Nicolet Evolution 紫外检测仪。

马钱苷对照品(批号:11640-200502,中国药品生物制品检定所);还原固精丸及还原固精丸缺山茱萸阴性样品(泉州中侨(集团)股份有限公司药业有限公司提供);四氢呋喃、甲醇、乙腈为色谱纯;水为超纯水;磷酸为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Welch Materials XB C_{18} 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 四氢呋喃-乙腈-甲醇-

0.05% 磷酸溶液(1:6:4:89); 检测波长: 236 nm; 流速: 1 mL/min; 进样量: 10 μL 。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取马钱苷对照品适量,加 80% 甲醇制成每 1 mL 含马钱苷 30 μg 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液制备

取本品适量,研细,取约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇 25 mL,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 20 min,放冷,再称定重量,用 80% 甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性样品溶液的制备

取缺山茱萸的阴性样品适量,按供试品溶液的制备方法制备,即得。

2.5 专属性试验

分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液各 10 μL ,按上述色谱条件,对还原固精丸以及缺山茱萸阴性样品进行了测定,结果阴性样品在与马钱苷对照品保留时间(约 20.7 min)相应处无色谱峰出现(见图 1),表明方中其他药味对供试品中马钱苷的测定无干扰。

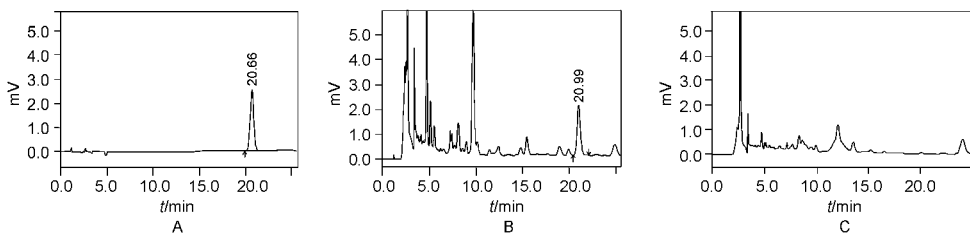


图 1 对照品(A)、样品(B)和阴性样品(C)高效液相色谱图

Fig. 1 The HPLC chromatograms of reference substance(A), sample(B) and blank(C)

2.6 线性关系考察

精密称取马钱苷对照品 11.13 mg,至 25 mL 量瓶中,加 80% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成浓度为 0.405 2 mg/mL 的对照品储备液。分别吸取对照品储备液 0.1、0.5、1、2、5 mL 至 10 mL 量瓶中,加 80% 甲醇稀释至刻度,摇匀,制成不同浓度的对照品溶液。吸取上述各浓度溶液 10 μL 注入液相色谱仪中,测定峰面积,以峰面积为纵坐标,相应的进样量为横坐标,绘制标准曲线,线性回归方程为: $Y = 164 482.6 X + 5 664$, $r = 1.000 0$,表明马钱苷在

0.040 52 ~ 4.052 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.7 精密度试验

取同一供试品溶液(批号:050501),照上述色谱条件重复进样 6 次,记录马钱苷峰面积,结果 $RSD = 0.55\%$ 。

2.8 重复性试验

取同一批还原固经丸样品(批号:050501),按 2.3 方法制备 6 份供试品溶液,照上述色谱条件进行测定,结果马钱苷平均含量为 0.773 mg/g, $RSD = 0.56\%$ 。

2.9 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:050501),分别于供试品溶液制备完成后的 0, 4, 8, 12 h 进样,测定马钱苷的峰面积。结果 $RSD = 0.52\%$,表明供试品溶液中的马钱苷放置 12 h 内稳定。

2.10 回收率试验

取已知马钱苷含量的同一批供试品(批号:050501)适量,研细,各精密称取约 0.5 g,平行 9 份,置具塞锥形瓶中,分别精密加入 0.401 6 mg/mL 马钱苷对照品溶液 0.8, 1.0, 1.2 mL 各 3 份,挥干溶剂,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,并测定马钱苷含量,计算回收率,结果见表 1,平均回收率为 101.04% $RSD(n=9)$ 为 1.60%。

表 1 回收率试验结果($n=9$)

Tab. 1 The result of recoveries($n=9$)

称样量	原有量	加入量	测得量	回收率
/g	/mg	/mg	/mg	/%
0.507 8	0.392 53	0.321 28	0.725 14	103.53
0.505 7	0.390 91	0.321 28	0.717 25	101.58
0.501 7	0.387 81	0.321 28	0.717 25	102.54
0.512 1	0.395 85	0.401 60	0.801 96	101.12
0.510 1	0.394 31	0.401 60	0.803 61	101.92
0.512 1	0.395 85	0.401 60	0.802 82	101.34
0.504 4	0.389 90	0.481 92	0.866 31	98.86
0.504 7	0.390 13	0.481 92	0.867 89	99.14
0.502 4	0.388 36	0.481 92	0.867 10	99.34

2.11 样品测定

取还原固精丸样品 3 批,照 2.3 项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件测定样品含量,结果见表 2。

表 2 样品测定结果($n=3$)

Tab. 2 Determination results of sample($n=3$)

批号	马钱苷含量/(mg/g)	$RSD/\%$
050501	0.773	0.56
050502	0.775	0.01
050503	0.778	0.19

3 讨论

3.1 指标成分的选择

有关山茱萸含量测定方法的研究颇多,主要是以熊果酸、齐墩果酸和马钱苷等为含量检测指标。山茱萸中熊果酸含量测定的文献报道虽比较多,但熊果酸存在于许多药材如山楂、马鞭草、车前草、紫珠、女贞子、怀牛膝等,非山茱萸的特有成分。马钱苷为山茱萸主要有效成分,测定其含量,可为山茱萸及其制剂提供质量控制的有效手段。

3.2 提取溶剂的选择

取样品 1 g,3 份,精密称定,分别精密加入甲醇、80% 甲醇、50% 甲醇 25 mL,超声 30 min,测定马钱苷含量。结果表明采用 80% 甲醇为溶剂提取最完全,故选用 80% 甲醇为供试品的提取溶剂。

3.3 提取时间的选择

取样品 1 g,3 份,精密称定,精密加入 80% 甲醇 25 mL,超声时间分别为 20, 30, 40 min,其他条件相同,测定马钱苷含量。结果表明超声 20 min 时,供试品中的马钱苷能提取完全,故采用超声 20 min。

3.4 流动相的选择

曾采用甲醇-水、乙腈-水、四氢呋喃-乙腈-甲醇-0.05% 磷酸溶液等流动相系统进行色谱分析。结果以四氢呋喃-乙腈-甲醇-0.05% 磷酸溶液(1:6:4:89)作为流动相能够将马钱苷峰与杂质峰较好的分离,且峰形理想。

参考文献:

- [1] 刘洪,许惠琴.山茱萸及其主要成分的药理学研究进展[J].南京中医药大学学报,2003,19(4):254.
- [2] 唐益华,肖凯华.RP-HPLC 法测定浓缩六味地黄丸中马钱苷的含量[J].中国药事,2007,21(10):834-835.
- [3] 张先瑞.HPLC 法测定耳聾左慈丸中马钱苷的含量[J].国际医药卫生导报,2007,13(16):113-115.
- [4] 赵新峰,孙毓.胶束电动毛细管色谱法测定山茱萸中莫罗苷和番木鳖苷的含量[J].药物分析杂志,2007,27(8):1154-1157.

欢迎订阅 欢迎投稿