

RP-HPLC 测定展筋丸中士的宁与马钱子碱的含量

鱼爱和,张兰华,杨玉英(中国人民解放军第261医院,北京100094)

摘要 目的: 建立自制中药制剂展筋丸中马钱子质量控制的方法。**方法:** 采用 RP-HPLC 法测定马钱子中士的宁与马钱子碱的含量。色谱柱为 XTerra™ RPC₁₈ 柱;以 10mmol/L 碳酸氢铵溶液(浓氨水调 pH 至 9.5) - 乙腈(75:25)为流动相,检测波长为 256nm,柱温 35℃;展筋丸样品采用碱化后,以三氯甲烷冷浸过夜、超声处理提取。**结果:** 线性范围士的宁为 0.432 ~ 2.160μg、马钱子碱为 0.388 ~ 1.940μg。士的宁回收率为 100.03%,RSD 为 2.06%,马钱子回收率为 99.41%,RSD 为 2.41%。**结论:** 本法快速、准确、重现性好,可用于展筋丸中马钱子的质量控制。

关键词 展筋丸;马钱子;士的宁;马钱子碱;反相高效液相色谱法

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:1006-0111(2006)06-0357-03

Determination of strychnine and brucine in Zhanjin pills by RP-HPLC

YU Ai-he, ZHANG Lan-hua, YANG Yu-ying(No. 261 Hospital of PLA, Beijing 100094, China)

ABSTRACT Objective: To establish a method for the quality control of *Semen Strychni* in Zhanjin pills. **Methods:** An RP-HPLC method for the quantitative determination of strychnine and brucine in *Semen Strychni* was built. A XTerra™ C₁₈ column (150mm × 3.9mm, 5μm) was used with a 10mmol/L ammonium bicarbonate solution (adjusted to pH 9.5 by ammonia solution) and acetonitrile (75:25) as the mobile phase. The detective wavelength was 256nm and the column temperature was 35℃. The basifying testing sample was extracted supersonically by chloroform in cold immersion. **Results:** The linear ranges were 0.432 ~ 2.160μg for strychnine and 0.388 ~ 1.940μg for brucine. The average recovery and RSD were 100.03% and 2.06% for strychnine, 99.41% and 2.41% for brucine, respectively. **Conclusion:** The method was specific, accurate and precise. It could be used for the quality control for *Semen Strychni* in Zhanjin pills.

KEY WORDS Zhanjin pills; *Semen Strychni*; strychnine; brucine; RP-HPLC

展筋丸是我院临床沿用 30 余年的自制蜜丸,由马钱子等数十味中药组成,有活血化瘀壮骨、驱风散寒止痛、扶正益肾通络之功效,适用于风寒湿侵袭经络、肌肉、筋骨、关节等痛症,疗效确切。为有效控制展筋丸质量,作者建立了以反相高效液相色谱测定制剂中马钱子碱与士的宁含量的方法,现报告如下。

1 仪器与材料

Waters Alliance HPLC 系统,组成: Waters 2695 分离单元, Waters 2996 二极管阵列检测器, Empower 色谱管理系统;士的宁、马钱子碱对照品(中国药品生物制品检定所,含量测定);展筋丸(0.6g/丸,本院中药制剂室,批号 050202, 050328, 050513);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与检测方法 色谱柱为 Waters 公司 XTerra™ RPC₁₈ (150mm × 3.9mm, 5μm) 柱;以 10mmol/L 碳酸氢铵溶液(浓氨水调 pH 至 9.5) - 乙腈(75:25)为流动相,检测波长为 256nm,柱温 35℃,进样 10μL。在此色谱条件下,供试品色谱中士的宁,马钱子碱与其他成分得到较好分离,其色谱峰保留时间与相应对照品一致(图中峰 1,峰 2)。采用二极管阵列检测器对士的宁与马钱子碱纯度进行检查,结果两者峰纯度均符合规定。理论板数按士的宁峰计算应不低于 3 000。

2.2 空白实验 依处方中药味的比例,自配不含马钱子粉的丸剂,按制备方法制成空白溶液,高效液相色谱表明,在与士的宁和马钱子碱对照品相同位置处无干扰。

2.3 对照品溶液的制备 分别精密称取士的宁对照品 6mg,马钱子碱对照品 5mg,分别置 10mL 量瓶

中,加三氯甲烷适量使溶解,加甲醇稀释至刻度,摇匀。分别精密量取 2mL,置同一 10mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

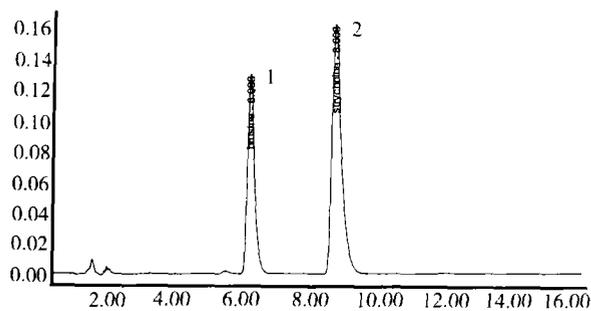


图1 对照品 HPLC 色谱

1 - 马钱子碱; 2 - 土的宁

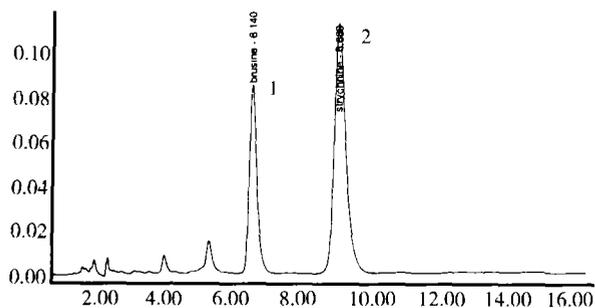


图2 展筋丸 HPLC 色谱图

1 - 马钱子碱; 2 - 土的宁

2.4 供试品溶液的制备 取本品适量,加等量硅藻土,研细研匀,取约 4g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加氢氧化钠试液 8mL,混匀,放置 30min,精密加入三氯甲烷 20mL,密塞,称定重量,冷浸 12~24h,超声处理 30min,再称定重量,用三氯甲烷补足减失的重量,摇匀,分取三氯甲烷提取液,用铺有少量无水硫酸钠的滤纸滤过,弃取初滤液,精密量取续滤液 3mL,置 10mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.5 线性关系考察 精密称取土的宁对照品 10.8mg 与马钱子碱 9.7mg,分别置 25mL 容量瓶中,

加适量三氯甲烷溶解,并稀释至刻度。再分别精密吸取 1、2、3、4、5mL 置 10mL 量瓶中,加甲醇定容。分别吸取各对照品溶液 10 μ L 注入高效液相色谱仪,依法测定峰面积,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。土的宁的回归方程为: $Y = 2.527913 \times 10^6 X - 1.999599 \times 10^4$, 相关系数 $r = 0.9999$; 马钱子碱的回归方程为 $Y = 1.65395 \times 10^6 X - 3.276452 \times 10^4$, 相关系数 $r = 0.9999$ 。上述结果表明,土的宁在 0.432~2.160 μ g 范围内、马钱子碱在 0.388~1.940 μ g 范围内线性关系良好。

2.6 精密度试验 分别精密吸取同一供试品溶液,进样 10 μ L,连续重复进样 6 次,土的宁峰面积平均值为 2421345.7, RSD 为 1.31%; 马钱子碱峰面积平均值为 1152163.2, RSD 为 1.27% (见表 1)。

表1 展筋丸精密度试验结果

成分	峰面积	平均峰面积	RSD (%)
土的宁	2460986, 2391138, 2412258	2421345.7	1.31
	2410347, 2393023, 2460322		
马钱子碱	1172282, 1133068, 1144082	1152163.2	1.27
	1160061, 1142485, 1161001		

2.7 稳定性试验 取供试品溶液分别于配制后 1、6、48、72h 依法测定,土的宁峰面积平均值为 2472424, RSD 为 1.82%; 马钱子碱峰面积平均值为 1205725.8, RSD 为 1.65% (见表 2)。结果表明,供试品溶液在 72h 内基本稳定。

2.8 重复性试验 分别精密称取同一批样品 5 份,按前述方法测定,土的宁 5 份测定结果分别为: 1.94mg/丸, 1.88mg/丸, 1.87mg/丸, 1.93mg/丸, 1.88mg/丸, 求得其平均含量为 1.90mg/丸, RSD 为 1.71%; 马钱子碱 5 份测定结果分别为: 1.42mg/丸, 1.36mg/丸, 1.36mg/丸, 1.39mg/丸, 1.37mg/丸, 求得其平均含量为 1.38mg/丸, RSD 为 1.85%。

表2 展筋丸稳定性试验结果峰面积

成分	峰面积				平均峰面积	RSD (%)
	1h	6h	48h	72h		
土的宁	2529940	2482898	2450976	2425882	2472424	1.82
马钱子碱	1234800	1200153	1198326	1189624	1205725.8	1.65

2.9 回收率试验 精取已知含量的样品(批号 050202 的展筋丸土的宁含量为 1.90mg/丸, 马钱子

碱含量为 1.38mg/丸)约 1g, 分别精密加入土的宁、马钱子碱对照品一定量,依供试品制备方法制备样

品溶液。依法测定,计算回收率,结果见表3,4。

表3 展筋丸中士的宁回收率试验结果

试验号	取样量(g)	样品中含量(mg)	加入量(%)	实测值(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD%
1	1.032 0	3.268 0	3.150 1	6.417 0	99.97		
2	1.022 5	3.237 9	3.150 1	6.398 2	96.57		
3	1.034 5	3.275 9	3.150 1	6.452 0	100.83	100.03	2.06
4	1.040 1	3.293 7	3.150 1	6.468 9	100.80		
5	1.025 5	3.247 4	3.150 1	6.500 1	101.99		

表4 展筋丸中马钱子碱回收率试验结果

试验号	取样量(g)	样品中含量(mg)	加入量(%)	实测值(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD%
1	1.032 0	3.268 0	2.311 5	4.675 7	99.59		
2	1.022 5	3.237 9	2.311 5	4.555 1	95.32		
3	1.034 5	3.275 9	2.311 5	4.719 0	101.22	99.41	2.41
4	1.040 1	3.293 7	2.311 5	4.727 2	101.02		
5	1.025 5	3.247 4	2.311 5	4.668 3	99.92		

2.10 样品测定结果 对三批展筋丸(050202, 050328, 050513)样品,按正文所述方法进行含量测定,结果见表5。

表5 展筋丸含量测定结果

批号	士的宁(mg/丸)			马钱子碱(mg/丸)		
	含量	平均值	平均值	含量	平均值	平均值
050202	1.88	1.92	1.90	1.37	1.39	1.38
050328	2.06	2.10	2.08	1.58	1.56	1.57
050513	2.05	2.07	2.06	1.56	1.53	1.55

3 讨论

展筋丸中含有马钱子,其主要成分为士的宁与马钱子碱,二者均为典型的、竞争性的甘氨酸突触后膜抑制作用的拮抗剂,安全使用范围小,必须严格控制每日剂量。为了保证药品质量,保证临床用药安全,我们选用反相高效液相色谱法同时测定制剂中士的宁与马钱子碱的含量,达到了预期效果。

2005版中国药典一部对含马钱子成方均以反相高效液相色谱法测定士的宁含量(例如舒筋丸)^[1]。一般C₁₈柱pH耐受范围为2~8,所以药典均以离子对色谱法对pKa较大的生物碱(例如士的宁,马钱子

碱等)进行分离,通过离子对试剂与生物碱形成中性络合物达到分离的目的。但含有离子对试剂的流动相组成复杂,配制麻烦,柱子上的离子对试剂不易洗净,故不易操作。我们在此试验中使用了一种新填料,其pH耐受范围为1~12,对于pKa值较大的生物碱只需调节缓冲液的pH值,使生物碱完全处于游离状态,进而通过样品在固定相与流动相之间的分配系数不同达到彼此分离的目的^[2]。我们的试验也证实,此柱分离度好,流动相配制简单,出峰快速(两种生物碱的出峰时间分别为:马钱子碱6min左右,士的宁8min左右),色谱柱易清洗。升高柱温则能降低流动相缓冲液比例过大造成柱压过高。

对于供试品的制备,我们曾比较了回流加热提取2h与冷浸过夜、超声处理30min两种提取方法,结果二者无显著差别。由于后者操作简单易行,故选择了冷浸超声法。

参考文献:

- [1] 中国药典2005版,一部[S]. 2005: 636.
- [2] 薛燕,袁汉成. RP-HPLC用于碱性生物碱的分离[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(2): 94.

收稿日期:2005-11-29

HPLC法测定石韦中木犀草素的含量

张亚宁¹,吴博¹,杨吉刚¹,胥秀英^{2*},郑一敏²(1. 重庆工学院生物工程学院2003级本科,重庆400050;2. 重庆工学院生物工程学院天然药物实验室,重庆400050)

通讯作者:胥秀英, Tel: (023)68662335, E-mail: yxx651116@cqit.edu.cn

摘要 目的:用高效液相色谱法测定石韦中木犀草素的含量。方法:采用 Shimadzu C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm,