

高效液相色谱法测定伤科缓释胶囊中土的宁和马钱子碱的含量*

吕佳, 袁子民**, 赵琳, 刘玉强

(辽宁中医药大学药学院, 大连 116600)

摘要 目的: 建立伤科缓释胶囊中土的宁和马钱子碱的含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, 使用迪马 ODS(5 μ m, 4.6 mm \times 200 mm) 色谱柱, 流动相为乙腈 - 含 0.2% 磷酸和 0.2% 三乙胺的水 (11: 89), 流速 1 mL \cdot min⁻¹, 检测波长 260 nm, 柱温为室温。结果: 土的宁的进样量在 0.29~1.74 μ g 范围内线性关系良好 ($r=0.9999$), 平均加样回收率为 98.4% (RSD=1.4%); 马钱子碱进样量在 0.245~1.47 μ g 范围内线性关系良好 ($r=0.9997$), 平均加样回收率为 99.0% (RSD=1.6%)。结论: 该方法简便、灵敏、准确, 可用于伤科缓释胶囊的质量控制。

关键词: 伤科缓释胶囊; 土的宁; 马钱子碱; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)05-0944-03

HPLC determination of strychnine and brucine in Shangke sustained release capsules*

LÜ Jia, YUAN Zi-min**, ZHAO Lin, LU Yu-qiang

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

Abstract Objective To establish a method for the determination of strychnine and brucine in Shangke sustained release capsules. **Methods** HPLC method was adopted. The analysis was performed with ODS(5 μ m, 4.6 mm \times 200 mm) column. The mobile phase was acetonitrile-water containing 0.2% phosphorous acid and 0.2% triethylamine (11: 89), at a flow rate of 1 mL \cdot min⁻¹; The wavelength of the detector was 260 nm, and the column temperature was room temperature. **Results** The linear ranges of strychnine, brucine were 0.29-1.74 μ g ($r=0.9999$), 0.245-1.47 μ g ($r=0.9997$); The average recoveries of strychnine, brucine was 98.4%, 99.0%, with the RSD of 1.4%, 1.6%, respectively. **Conclusion** The method is simple, rapid and accurate, and suitable for the quality control of Shangke sustained release capsules.

Key words Shangke sustained release capsules, strychnine, brucine, HPLC, assay

伤科缓释胶囊处方由三七、红花、冰片、马钱子、没药、自然铜组成, 具有活血化瘀、消肿止痛之功, 临床用于跌打损伤、伤筋动骨、瘀血肿痛、损伤红肿等症。本制剂胶囊为多年临床应用的经验方, 经采用现代制药技术制成缓释胶囊可延长药物作用时间, 减少服用次数, 减轻药物毒副作用, 方便患者使用。本制剂中马钱子含有土的宁、马钱子碱, 为有效成分, 同时又是毒剧成分, 需要严格控制制剂中含量。马钱子中土的宁、马钱子碱的含量测定方法主要有薄层扫描法、高效液相色谱法、毛细管区带电泳法^[1-6]等, 其中以采用高效液相色谱法进行测定报

道较多。为控制产品的质量, 本文参考相关文献报道^[5], 采用反相色谱系统, 以乙腈 - 磷酸 - 三乙胺为流动相, 建立了制剂中土的宁和马钱子碱含量测定方法, 制定本制剂含量的限度范围。本法样品预处理简便, 分离效果良好。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 液相色谱仪 (可见 - 紫外检测器); Agilent ChemStation 工作站; KQ3200 超声波清洗器 (江苏昆山)。

对照品土的宁 (批号: 110706-200306)、马钱子碱 (批号: 110706-200505) 购自中国药品生物制

* 辽宁省教育厅青年基金计划 A 课题资助, 课题编号: 05L257

** 通讯作者 Tel (0411) 87586010 E-mail: yuanzinir@163.com

品检定所;乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他所用试剂均为分析纯;伤科缓释胶囊,自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[1] 色谱柱:迪马 ODS(5 μm, 4.6 mm × 200 mm)色谱柱;流动相:乙腈-含 0.2% 磷酸和 0.2% 三乙胺的水(11:89);流速:1 mL·min⁻¹;检测波长:260 nm;柱温:室温。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取对照品土的宁及马钱子碱适量,分别加甲醇制成 0.116 mg·mL⁻¹ 的土的宁对照品溶液及 0.098 mg·mL⁻¹ 的马钱子碱对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品 20 粒,倾出内容物,研细,取粉末 3 g 精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加浓氨试液 2 mL 与氯仿 50 mL^[4],密塞,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 33 kHz) 20 min 放冷,再称定重量,用氯仿补足减失的重量,充分振摇,以铺适量无水硫酸钠的滤纸滤过,取续滤液 5 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,经微孔滤膜(0.45 μm)滤过,滤液作为供试品溶液。

2.3 阴性干扰试验 按处方配比,取除去马钱子以外的其他药材,按伤科缓释胶囊的制备工艺制得阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制成阴性供试品溶液。精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性供试品液各 10 μL,注入液相色谱仪中,绘制液相色谱图。由色谱图提示,在对照品色谱相应的位置上,样品色谱具有相同保留时间的色谱峰,阴性样品色谱在此峰位无吸收,表明样品中其他成分对土的宁、马钱子碱的含量测定无干扰,方法专属性良好,见图 1。

2.4 线性关系考察 精密称取“2.2.1”项下土的宁对照品溶液及马钱子碱对照品溶液均为 2.5 5.0 7.5 10.0 12.5 15.0 μL,分别注入液相色谱仪中,测定色谱峰面积。以进样量为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。经线性回归,土的宁、马钱子碱回归方程分别为:

$$Y = 204.3X - 53.35 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 156.2X - 33.22 \quad r = 0.9997$$

线性范围分别为 0.29~1.74 μg 和 0.245~1.47 μg

2.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,连续进样 6 次,测定色谱峰峰面积。结果表明,精密度良好,土的宁及马钱子碱 RSD(n=6) 分别为 1.0% 和 1.8%。

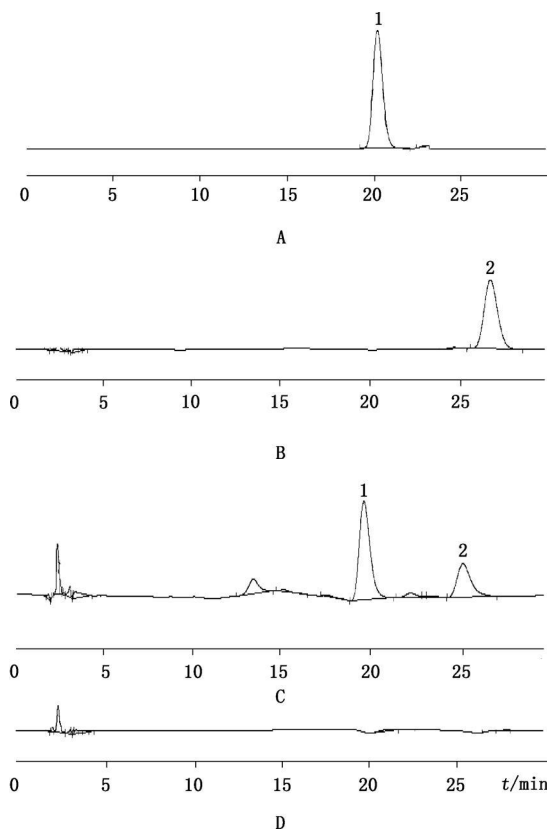


图 1 土的宁对照品(A)、马钱子碱对照品(B)、样品(C)及阴性样品(D) HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of strychnine reference substance(A), brucine reference substance(B), Shangke sustained release capsules(C), and negative sample without Semen Strychni(D)

1. 土的宁(stychnine) 2. 马钱子碱(brucine)

2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,分别于 0 2 4 6 8 h 进样,测定色谱峰面积。结果表明,供试品溶液在 8 h 内保持稳定,土的宁及马钱子碱 RSD(n=5) 分别为 2.0% 和 2.2%。

2.7 重复性试验 精密称取同一批样品(批号 080526)共 6 份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,精密吸取 10 μL 进样测定。结果样品中土的宁及马钱子碱平均含量(n=6) 分别为 0.243 mg·粒⁻¹ 和 0.118 mg·粒⁻¹, RSD 分别为 2.2% 和 2.1%。

2.8 回收率试验 取 5 份已测知含量的样品(批号 080526 土的宁含量 0.243 mg·粒⁻¹, 马钱子碱含量为 0.118 mg·粒⁻¹, 平均装量 0.42 g·粒⁻¹) 各 20 粒,倾出内容物,研细,取粉末各约 1.5 g 精密称定,分别精密加入土的宁对照品溶液(0.268 mg·mL⁻¹) 2.5 mL 和马钱子碱对照品溶液(0.180 mg·mL⁻¹) 2.5 mL,按“2.2.2”项下方法制备供试溶液,精密吸取 10 μL 进样测定。结果土的宁及马钱子碱

回收率分别在 96.4% ~ 100.4% 和 97.6% ~ 101.6% 之间, 平均回收率 ($n=5$) 分别为 98.4% 和 99.0%, RSD 分别为 1.4% 和 1.6%。

2.9 样品含量测定 取 3 批伤科缓释胶囊各 2 份, 按“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液和对照品溶液各 10 μ L, 分别进样测定, 结果见表 1。按照处方量计算, 每粒胶囊(标示装量 0.40 g \cdot 粒 $^{-1}$)含马钱子原粉为 15 mg, 参照中国药典 2005 年版一部马钱子含土的宁应为 1.20% ~ 2.20%, 含马钱子碱不得低于 0.8%^[4], 折合计算本品每粒含土的宁理论上应为 0.18 ~ 0.33 mg, 含马钱子碱理论上应不低于 0.12 mg。考虑到本品处方含马钱子量较小, 故按照理论含量的 $\pm 20\%$ 做为含量限度, 确定本品每粒含土的宁应为 0.144 ~ 0.396 mg, 含马钱子碱应不低于 0.096 mg。

表 1 样品含量测定结果 (mg \cdot 粒 $^{-1}$, $n=2$)

Tab 1 Results of samples determination (mg per capsule $n=2$)

批号 (Lot No.)	土的宁 (strychnine)	马钱子碱 (bucine)
080515	0.218	0.112
080520	0.216	0.126
080526	0.243	0.118

3 讨论

3.1 供试品溶液制备时, 曾对提取溶剂的种类、提取方法进行了考察。分别采用甲醇、氯仿作溶剂, 采用超声处理、加热回流进行提取方法比较, 结果表明, 以氯仿作溶剂, 采用超声处理方法提取含量最高; 以氯仿作溶剂, 分别超声处理 10 min, 20 min, 30 min, 结果超声处理 20 min 含量不再增加, 故确定超声处理时间为 20 min, 分别采用氯仿 50 mL 与 100 mL 超声提取 20 min 测定, 结果二者测定结果一致, 表明采用氯仿 50 mL 即可提取完全, 由此可确定“2.2.2”项下的供试品溶液制备方法。

3.2 中国药典 2005 年版一部马钱子项下马钱子中土的宁和马钱子含量测定 选用乙腈 - 0.01 mol \cdot L $^{-1}$ 庚烷磺酸钠与 0.02 mol \cdot L $^{-1}$ 磷酸二氢钾等量混

合溶液 (用 10% 磷酸调 pH 为 2.8) 为流动相, 试验中曾将本实验中使用的流动相与 2005 年版中国药典中的流动相比较。测定结果提示, 使用 2 种流动相, 供试样品中待测组分分离度均良好, 含量测定结果相同。

3.3 在样品提取过程中, 须将样品用适量的浓氨试液润湿, 然后再加入氯仿提取。而加入浓氨试液后, 样品细粉易于沾挂在提取容器壁上。故加完提取溶剂后, 应避免振摇, 防止供试品粉末沾挂在提取容器壁上, 超出提取溶剂液面, 从而影响测定结果的准确性。

3.4 本实验采用 HPLC 法测定伤科缓释胶囊中土的宁、马钱子碱的含量, 其提取方法简单, 分析快速, 精密度高, 重现性好, 且空白无干扰, 可用于控制伤科缓释胶囊的质量。

参考文献

- CHEN Xiao-bin (陈晓斌), JIANG Jian-dun (蒋建春), ZHANG Shu-fang (张淑芳). Determination of strychnine, bucinine, aconitine in Fengshibing pills by Double wavelength TLCs (双波长薄层扫描法测定风湿痹痛丸土的宁、马钱子碱、乌头碱的含量). *Chin J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 1994, 19(8): 482
- JIANG Shun-yao (姜舜尧), JIN Ou (金瓯), HUANG Zong-yu (黄宗玉), et al. Determination of strychnine and bucinine in shenjin-dan capsule by capillary zone electrophoresis (毛细管区带电泳测定伸筋彤胶囊中土的宁和马钱子碱的含量). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(5): 341
- ChP (中国药典). 2000. Vol 1 (一部): 38
- ChP (中国药典). 2005. Vol 1 (一部): 37
- ZOU Jing (邹晶), WU Qing (伍庆), YI Yin (乙引). HPLC determination of strychnine and bucinine in Fengshi Gukang capsules (高效液相色谱法测定风湿骨康胶囊中土的宁和马钱子碱含量). *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2009, 20(3): 653
- XU Li-hua (徐丽华), LU Jing (鲁静). HPLC determination of strychnine and bucinine in Semen Strychni and its preparations (HPLC 法测定马钱子及其制剂中土的宁与马钱子碱的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1998, 18(6): 383

(本文于 2010 年 6 月 26 日收到)