

## 双波长 RP-HPLC 同时测定骨刺膏渗漉液中 马钱子碱、土的宁和乌头碱的含量

李喜香<sup>1\*</sup>, 包强<sup>1</sup>, 毕映燕<sup>1</sup>, 郭敏<sup>2</sup>

(1. 甘肃省中医院 药学部, 兰州 730050; 2. 甘肃省中医药研究院, 兰州 730050)

**[摘要]** 目的:建立 RP-HPLC 同时测定骨刺膏渗漉液中马钱子碱、土的宁和乌头碱含量的方法。方法:Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-水(B) (含 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾溶液, 用磷酸调节 pH 3) 梯度洗脱(0~22 min, 11% A; 22~23 min, 11%~33% A; 23~36 min, 33% A; 36~37 min, 33%~11% A; 37~40 min, 11% A), 检测波长为乌头碱 235 nm, 马钱子碱和土的宁 260 nm。结果:马钱子碱、土的宁和乌头碱的线性范围分别为 0.026 4~0.264, 0.039 6~0.396, 0.016~0.160 μg; 平均加样回收率分别为 98.44%, 98.63%, 99.08%, RSD 分别为 1.84%, 1.66%, 0.97%; 样品中三者的平均质量浓度分别为 1.29, 1.92, 0.79 mg·L<sup>-1</sup>。结论:该方法操作简便、准确可靠、重复性好, 为完善骨刺膏的质量标准提供实验依据。

**[关键词]** 梯度洗脱; 马钱子碱; 土的宁; 乌头碱; 骨刺膏

**[中图分类号]** R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0081-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220081

## Simultaneous Determination of Brucine, Strychnine and Aconitine in Guci Pastes Leachate by Dual Wavelength RP-HPLC

LI Xi-xiang<sup>1\*</sup>, BAO Qiang<sup>1</sup>, BI Ying-yan<sup>1</sup>, GUO Min<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmacy, Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China;

2. Gansu Province Academy of Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for determining contents of brucine, strychnine and aconitine in Guci pastes leachate by RP-HPLC. **Method:** Symmetry C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), mobile phase was constituted by acetonitrile (A) -water (B) (containing 0.01 mol·L<sup>-1</sup> potassium dihydrogen phosphate solution, adjusted pH to 3 by phosphoric acid) for gradient elution (0-22 min, 11% A; 22-23 min, 11%-33% A; 23-36 min, 33% A; 36-37 min, 33%-11% A; 37-40 min, 11% A) at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, detection wavelength was set at 235 nm for aconitine, 260 nm for brucine and strychnine. **Result:** Linear ranges of brucine, strychnine and aconitine were 0.026 4-0.264, 0.039 6-0.396, 0.016-0.160 μg; their average recoveries were 98.44%, 98.63% and 99.08% with RSD of 1.84%, 1.66% and 0.97%; their average concentrations in samples were 1.29, 1.92, 0.79 mg·L<sup>-1</sup>, respectively. **Conclusion:** This method is simple, accurate and reproducible, it can be provide experimental basis for quality control of Guci pastes.

**[Key words]** gradient elution; brucine; strychnine; aconitine; Guci pastes

骨刺膏为甘肃省中医院医院制剂(批号甘药制字 Z11012102), 由制马钱子、制草乌、川芎及木瓜等

7 味中药组成, 外用具有活血化瘀、活利关节的功效, 用于治疗各类骨质增生性关节疼痛等<sup>[1]</sup>。骨刺

**[收稿日期]** 20140424(014)

**[通讯作者]** \* 李喜香, 硕士, 主任中药师, 硕士生导师, 从事中药新制剂及其质量评价研究, Tel: 0931-2687855, E-mail: lixixiang929@163.com

膏为中药外用膏剂,方中制马钱子和制草乌用酸溶液渗漉,浓缩后经其他工序研制而成。制马钱子具有通络止痛、散结消肿之功效,主要成分为生物碱类的马钱子碱和土的宁,二者均为具有竞争性的甘氨酸突触后膜抑制作用拮抗剂<sup>[2]</sup>。制草乌具有祛风除湿、温经止痛的功效,主要含二萜类乌头碱。乌头碱既是有效活性成分,也是毒性成分,在外用镇痛方面具有独到之处,镇痛作用强且连续用药不易产生耐受现象<sup>[3]</sup>。制马钱子和制草乌均为毒性药材,因此需对二者进行严格限量。制马钱子和制草乌中生物碱类成分的单测定方法已有较多报道<sup>[4-5]</sup>。但在同一色谱条件下同时测定两种药材中马钱子碱、土的宁和乌头碱含量的方法尚未见报道。故本实验拟建立 RP-HPLC 同时测定制马钱子和制草乌中马钱子碱、土的宁和乌头碱含量的方法,为提升骨刺膏的质量标准提供实验依据。

### 1 材料

2695 型高效液相色谱仪(1525 型四元泵,2487 型紫外检测器,717 型自动进样器,美国 Waters 公司),NW 型超纯水处理器(上海力康生物医疗科技控股有限公司),AR124CN 型电子天平(美国奥豪斯公司)。

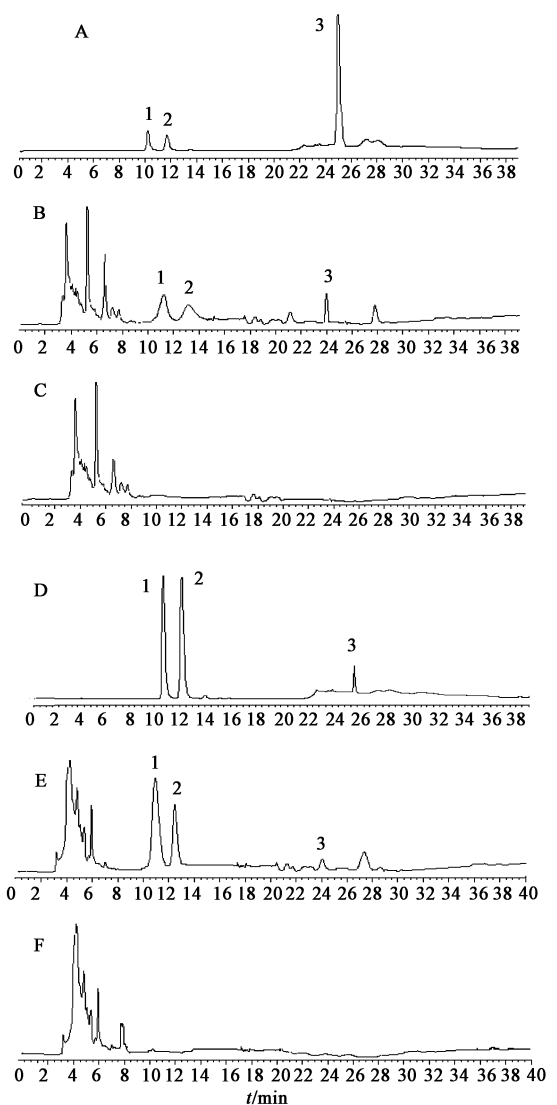
马钱子碱、土的宁、乌头碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110706-200505,110705-200306,110789-200404),骨刺膏渗漉液(批号 20130604,20130621,20130705,甘肃省中医院制剂室提供),乙腈为色谱醇,水为纯化水,其余试剂均为国产分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)(含 0.01 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾溶液,用磷酸调节 pH 3)梯度洗脱(0~22 min,11% A;22~23 min,11%~33% A;23~36 min,33% A;36~37 min,33%~11% A;37~40 min,11% A),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温室温,检测波长为乌头碱 235 nm,马钱子碱和土的宁 260 nm,进样量 20 μL,见图 1。

**2.2 混合对照品溶液的制备** 精密称取马钱子碱、土的宁和乌头碱对照品适量,分别加三氯甲烷配置成 0.110,0.165,0.200 g·L<sup>-1</sup>的对照品贮备液。依次精密吸取上述对照品贮备液 3,3,1 mL 置于 25 mL 量瓶中,加三氯甲烷稀释至刻度,摇匀,即得。

**2.3 供试品溶液的制备** 精密量取骨刺膏渗漉液 25 mL 置锥形瓶中,用 10% 氢氧化钠溶液调节渗漉



A, D. 混合对照品; B, E. 供试品; C, F. 阴性样品;  
1. 马钱子碱; 2. 土的宁; 3. 乌头碱;  
A, B, C. 235 nm; D, E, F. 260 nm

图 1 骨刺膏渗漉液 HPLC

液 pH 10, 转移至分液漏斗中, 分别用 25, 25, 15 mL 的乙醚萃取, 合并乙醚层, 挥干溶剂, 残渣用三氯甲烷溶解并转移至 5 mL 量瓶中, 加三氯甲烷稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

**2.4 阴性样品溶液的制备** 按骨刺膏的处方与制备方法制备不含制草乌和制马钱子药材的骨刺膏渗漉液, 作为阴性样品。取阴性样品 25 mL, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 即得。

**2.5 线性关系考察** 精密量取混合对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 20 μL, 按 2.1 项下色谱条件测定, 以峰面积积分值为纵坐标, 进样量为横坐标, 得马钱子碱、土的宁、乌头碱回归方程分别为  $Y = 3.726 \times 10^6 X + 2.700 \times 10^4$  ( $r = 0.9992$ ),  $Y = 8.038 \times 10^5 X +$

8 488.84 ( $r=0.999\ 0$ ),  $Y=9.655 \times 10^5 X + 2\ 009.22$  ( $r=0.999\ 5$ ), 线性范围依次为 0.026 4 ~ 0.264, 0.039 6 ~ 0.396, 0.016 ~ 0.160  $\mu\text{g}$ 。

**2.6 精密度试验** 精密量取同一混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,计算马钱子碱、土的宁和乌头碱峰面积值的 RSD 分别为 1.5%, 0.94%, 2.0%, 表明仪器精密度良好。

**2.7 重复性试验** 取骨刺膏渗漉液(批号 20130705)6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算马钱子碱、土的宁和乌头碱平均质量浓度分别为 1.26, 1.90, 0.76  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , RSD 分别为 1.3%, 0.9%, 2.2%。

**2.8 稳定性试验** 取同一供试品溶液,室温放置,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 按 2.1 项下色谱条件测定,计算马钱子碱、土的宁和乌头碱峰面积的 RSD 分别为 1.8%, 1.5%, 2.1%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

**2.9 加样回收率试验** 精密量取已知含量的样品溶液(批号 20130705)6 份,每份 25 mL,置具塞锥形瓶中,各精密加入 2.2 项下混合对照品溶液 2.50 mL,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 骨刺膏渗漉液中指标成分含量测定的加样回收率试验

成分	样品中 量/ $\mu\text{g}$	加入量 / $\mu\text{g}$	测得量 / $\mu\text{g}$	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
马钱子碱	32.5	33.0	64.90	98.18	98.44	1.84
	32.4	33.0	64.10	96.06		
	33.0	33.0	65.70	99.09		
	32.4	33.0	64.40	96.97		
	32.5	33.0	65.01	98.52		
	32.1	33.0	65.70	101.82		
土的宁	47.8	49.5	96.70	98.79	98.63	1.66
	48.1	49.5	96.10	96.97		
	47.8	49.5	98.04	101.49		
	48.5	49.5	96.98	97.94		
	48.0	49.5	97.11	99.21		
	48.3	49.5	96.50	97.37		
乌头碱	20.20	20.0	39.76	97.80	99.08	0.97
	19.02	20.0	38.91	99.45		
	19.05	20.0	38.95	99.50		
	19.92	20.0	39.97	100.25		
	19.80	20.0	39.70	99.50		
	19.82	20.0	39.42	98.00		

**2.10 样品测定** 取 3 批骨刺膏渗漉液,每批平行

3 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,采用外标法计算样品中马钱子碱、土的宁和乌头碱的平均质量浓度分别为 1.29, 1.92, 0.79  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , RSD 依次为 1.6%, 1.0%, 1.9%。

### 3 讨论

检测波长考察时,将马钱子、土的宁、乌头碱对照品溶液和混合对照品溶液在 200 ~ 760 nm 进行全波长扫描,结果显示马钱子碱、土的宁的  $\lambda_{\text{max}}$  依次为 260, 254 nm, 混合对照品溶液在 260 nm 处呈强吸收,乌头碱在 260 nm 亦有吸收,但吸收强度较弱且吸收值低,在 235 nm 附近有最大吸收,故选择马钱子和土的宁的检测波长 260 nm,乌头碱的检测波长 235 nm。

文献报道马钱子碱和土的宁的含量测定采用乙腈-0.01  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  庚烷磺酸钠与 0.02  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾等量混合溶液(用 10% 磷酸调节 pH 2.8)为流动相,检测波长 260 nm<sup>[6-8]</sup>。乌头碱类常选择乙腈-0.2% 冰乙酸(加三乙胺调节 pH 6.25) (29: 71), 40  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸铵溶液-乙腈梯度洗脱及甲醇-0.05% 磷酸溶液(含 0.04% 三乙胺) (68: 32) 为流动相<sup>[9-10]</sup>。结合预试验分析,本文采用乙腈-0.01  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾溶液在 pH 3 的弱酸性条件下梯度洗脱,结果显示样品中 3 种成分可同时检出,峰型对称,干扰组分少,分离度好。

制草乌中乌头碱、次乌头碱和新乌头碱等为有效成分,但也是毒性成分,治疗剂量与中毒剂量接近,安全范围小。中药的临床疗效是多组分协同作用的结果,尽可能多地测定其所含成分是实现中药复方有效质控的有效途径<sup>[11]</sup>。李智勇等<sup>[12]</sup>对癌痛巴布剂进行含量测定时,以君药草乌中乌头碱、次乌头碱和新乌头碱为检测指标,采用 HPLC 同时对这 3 种成分进行测定。本文将马钱子和草乌中主要成分在同一色谱条件下同时检出,可为全面提升骨刺膏的质量水平提供参考。

### [参考文献]

- [1] 冯康虎, 张晓文. 骨刺膏镇痛作用的药理研究[J]. 甘肃中医, 2008, 21(6): 61.
- [2] 鲁燕侠, 崔佳, 刘鹰. 反相高效液相色谱法同时测定祛痹丹胶囊中土的宁和马钱子碱的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2001, 21(8): 474.
- [3] 刘志敏, 牛欣, 杨学智, 等. 草乌提取物乌头碱和新乌头碱的透皮速率测定[J]. 中西医结合学报, 2006, 4(1): 68.

# 鸦胆子油乳注射剂 HPLC-ELSD 指纹图谱分析

李炳东<sup>1</sup>, 田金苗<sup>2\*</sup>, 郭汉文<sup>2</sup>, 王怡君<sup>2</sup>, 孔令锋<sup>2</sup>

(1. 辽河油田总医院, 辽宁 盘锦 124000; 2. 辽宁省药品检验检测院, 沈阳 110023)

**[摘要]** 目的:建立鸦胆子油乳注射剂的 HPLC-ELSD 指纹图谱,为科学评价其质量提供依据。方法:运用岛津 2010C 高效液相色谱仪和奥泰 2000 蒸发光检测器,采用 Waters C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-二氯甲烷(65:35),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测温度 70 °C,柱温 30 °C,进样量 10 μL。结果:在 10 批鸦胆子油乳注射剂基础上,建立了有 8 个共有峰的鸦胆子油乳注射剂的 HPLC-ELSD 色谱图,方法的精密度、重复性与稳定性良好,相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,相似度均 > 0.99,各峰分离度良好,指纹信息完整,符合指纹图谱技术规范。结论:所建方法简单、可靠,可作为鸦胆子油乳注射剂质量控制的重要依据之一。

**[关键词]** 指纹图谱; 鸦胆子油乳注射剂; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0084-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220084

## HPLC-ELSD Fingerprint of Bruceae Fructus Oil Latex Injection

LI Bing-dong<sup>1</sup>, TIAN Jin-miao<sup>2\*</sup>, GUO Han-wen<sup>2</sup>, WANG Yi-jun<sup>2</sup>, KONG Ling-feng<sup>2</sup>

(1. Liaohe Oilfield General Hospital, Panjin 124000, China;

2. Liaoning Provincial Institute for Control of Drug, Shenyang 110023, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method of fingerprint analysis on Brucea Javanica oil latex Injection by HPLC-ELSD and provide a reference for the quality evaluation of Brucea Javanica oil latex Injection. **Method:** The sample were determined by shimadzu 2010C HPLC and Alltech 2000 ESLD with Waters C<sub>18</sub> analytical column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), by using acetonitrile-dichloromethane (65:35) as the mobile phase at the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and the detection temperature of 70 °C, column temperature 30 °C, inject volume 10 μL. **Result:** Its fingerprint exhibited better separation for each peak, revealing amount of finger information, based on the ten batches

**[收稿日期]** 20140806(020)

**[第一作者]** 李炳东,从事医院制剂的制备与分析研究,Tel:0427-7650589,E-mail:libingdong@sina.com

**[通讯作者]** \* 田金苗,主管药师,从事药品检验及中药质量标准研究,Tel:024-25425645,E-mail:tianjinmiao@sina.com

[4] 王彧丽,戴德雄,朱莹. 高效液相色谱法测定骨刺胶囊中土的宁[J]. 中草药,2010,41(9):1482.

[5] 李丽敏,王欣美,王柯,等. RP-HPLC 测定镇痛活络酊中 3 种乌头类生物碱含量[J]. 中成药,2008,30(12):1785.

[6] 翟小燕,梁基智,邓洁芳,等. 反相高效液相色谱法测定马红丸中马钱子碱和土的宁的含量[J]. 中药材,2010,33(7):1179.

[7] 陈军,肖寒露,蔡宝昌,等. 磷脂组成对马钱子总生物碱脂质体药动学的影响[J]. 中国药学杂志,2010,45(24):1944.

[8] 于蓓蓓,闫雪生,高雅. 马钱子缓释片的制备及其释

放度研究[J]. 中成药,2011,33(8):1333.

[9] 简晖,董宁霞,郑晗,等. 附子中 3 种双酯型生物碱的定量分析[J]. 中草药,2008,39(9):1413.

[10] 李明梅. 高效液相色谱法测定麝香风湿片中乌头碱的含量[J]. 中国生物药物杂志,2012,33(6):836.

[11] 安益强,汤道权,印晓星,等. HPLC 法同时测定双黄连颗粒中 9 种成分[J]. 中草药,2012,43(1):91.

[12] 李智勇,邓亚利,孙冬梅. HPLC 法测定癌痛巴布剂中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱[J]. 中成药,2011,33(6):988.

[责任编辑 刘德文]