

· 化学与分析 ·

马钱子总生物碱的定量分析及其 HPLC 指纹图谱

屈艳格^{1,3}, 陈军^{1,2}, 蔡宝昌^{4,5*}

- (1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2. 江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210029;
3. 南京中医药大学国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 南京 210029;
4. 国家中医药管理局中药炮制标准重点研究实验室, 南京 210029;
5. 南京海昌中药集团, 南京 210061)

[摘要] **目的:** 建立纯化马钱子总生物碱 HPLC 指纹图谱, 为其质量评价提供新方法。**方法:** 采用 HPLC 测定纯化马钱子总生物碱中主要生物碱的含量, 并考察其指纹图谱。含量测定的分析条件为 Superstar C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.01 mol·L⁻¹庚烷磺酸钠与 0.02 mol·L⁻¹磷酸二氢钾等量混合(用 10% 磷酸调 pH 2.8)(B)(24:76), 分析时间 20 min, 柱温 30 ℃, 检测波长 264 nm; 指纹图谱分析条件为 Superstar C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-[水-三乙胺-乙酸(100:0.2:0.2)](B)进行梯度洗脱(0~21 min, 10%~16% A; 21~55 min, 16%~40% A; 55~65 min, 10% A), 分析时间 65 min, 柱温 30 ℃, 检测波长 254 nm。**结果:** 马钱子总生物碱的含量测定和指纹图谱分析各项参数均符合《中国药典》2010 年版要求; 10 批纯化的马钱子总生物碱样品中含量分析显示, 马钱子碱质量分数 32.3%~37.5%, 土的宁质量分数 15.0%~18.4%, 马钱子碱氮氧化物质量分数 0.19%~0.23%; 各批次样品的指纹图谱分析都显示 10 个共有峰, 指纹图谱相似度均 >97%。**结论:** 含量测定与指纹图谱相结合的分析方法能很好地反映马钱子总生物碱的整体质量, 纯化马钱子总生物碱的制备工艺稳定、重复性好, 是一种有效的质量分析与评价方法。

[关键词] 马钱子; 纯化总生物碱; 含量测定; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0076-05

HPLC Fingerprint and Quantitative Analysis of Total Alkaloids from *Strychnos nux-vomica*

QU Yan-ge^{1,3}, CHEN Jun^{1,2}, CAI Bao-chang^{4,5*}

- (1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;
2. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210029, China;
3. Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;
4. Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210029, China;
5. Nanjing Haichang Chinese Medicine Group Corporation, Nanjing 210061, China)

[Abstract] **Objective:** To establish fingerprint of purified total alkaloids from processed *Strychnos nux-vomica* by HPLC-DAD, and provide a new method for quality control of *S. nux-vomica*. **Method:** The contents of brucine, strychnine and brucine *N*-oxide from purified total alkaloids of *S. nux-vomica* were determined by HPLC, and fingerprint was investigated. Analytical conditions of content determination were: Superstar C₁₈

[收稿日期] 20120705(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30701111)

[第一作者] 屈艳格, 硕士, 从事中药制剂学及新剂型研究, Tel:025-86798281, E-mail: ztquyangegg@126.com

[通讯作者] * 蔡宝昌, 教授, Tel:025-85811112, E-mail: becai@126.com

chromatographic column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase of acetonitrile (A) - 0.01 mol·L⁻¹ 1-heptane sulfonate and 0.02 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate mixed with equal amount (adjusted pH to 2.8 with 10% phosphonic acid) (24:76), analysis time 20 min, column temperature 30 °C, detection wavelength at 264 nm; Analysis conditions of fingerprints were on Superstar C₁₈ chromatographic column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), acetonitrile (A) - [water-acetic acid-triethylamine (100:0.2:0.2)] (B) as mobile phase with a method of gradient elution (0-21 min, 10%-16% A; 21-55 min, 16%-40% A; 55-65 min, 10% A), parsing time 65 min, column temperature 30 °C, UV detection wavelength at 254 nm. **Result:** Parameters of content determination and fingerprint analysis of total alkaloids from *S. nux-vomica* were in line with requirements of 2010 edition 'Chinese Pharmacopoeia'; Content analysis of 10 batches of purified total alkaloids samples from *S. nux-vomica* showed that mass fraction of brucine, strychnine and brucine N-oxide were 32.3% -37.5%, 15.0% -18.4% and 0.19% -0.23%, respectively; Fingerprint analysis of each batch of samples showed 10 common peaks and fingerprint similarity were all above 97.0%. **Conclusion:** Combination of content determination and fingerprint could well reflect the overall quality of total alkaloids from *S. nux-vomica*, preparation process of depurated total alkaloids from processed *S. nux-vomica* was stable, reproducible, reliable, so it was an effective quality analysis and evaluation method.

[**Key words**] *Strychnos nux-vomica*; depurated total alkaloids; content determination; fingerprint

马钱子总生物碱中至少有 16 种生物碱成分^[1], 主要成分是马钱子碱和土的宁。马钱子碱具有很强的镇痛抗炎等药理活性^[2-6], 临床上常用于镇咳、祛痰、抑菌和抗肿瘤; 土的宁含量约占总生物碱的一半, 但药理活性相对较低, 是马钱子的主要毒性成分^[7]。若除去总生物碱中部分土的宁, 既能降低其毒性, 又能基本保留其原有药理活性, 提高临床用药的安全性^[8]。纯化马钱子总生物碱是去除马钱子总生物碱中大部分土的宁后的总生物碱。前期研究发现, 与马钱子总生物碱相比, 纯化马钱子总生物碱在镇痛、抗炎、免疫、抗肿瘤等方面的药理作用显著提高, 且毒性显著下降。

本试验以纯化马钱子总生物碱为研究对象, 采用 HPLC 测定其主要有效成分, 并结合指纹图谱技术, 从主要有效成分和指纹图谱整体相似性 2 个层面考察纯化马钱子总生物碱的质量及批次间稳定性, 探讨能全面反映纯化马钱子总生物碱内在质量的质控方法。

1 材料

LC-2010A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司), AG-285 型电子天平(瑞典 METTLER 公司), DZF-6050 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司), TGL-16B 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂), 马钱子碱、土的宁、马钱子碱氮氧化物等对照品(中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110706-200505, 10705-200306, 11708-200507), 马钱子、制马钱子均购自浙江中医药大学饮片厂, 经南京中医药

大学蔡宝昌教授鉴定, 均符合《中国药典》2010 年版相关项下要求; 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

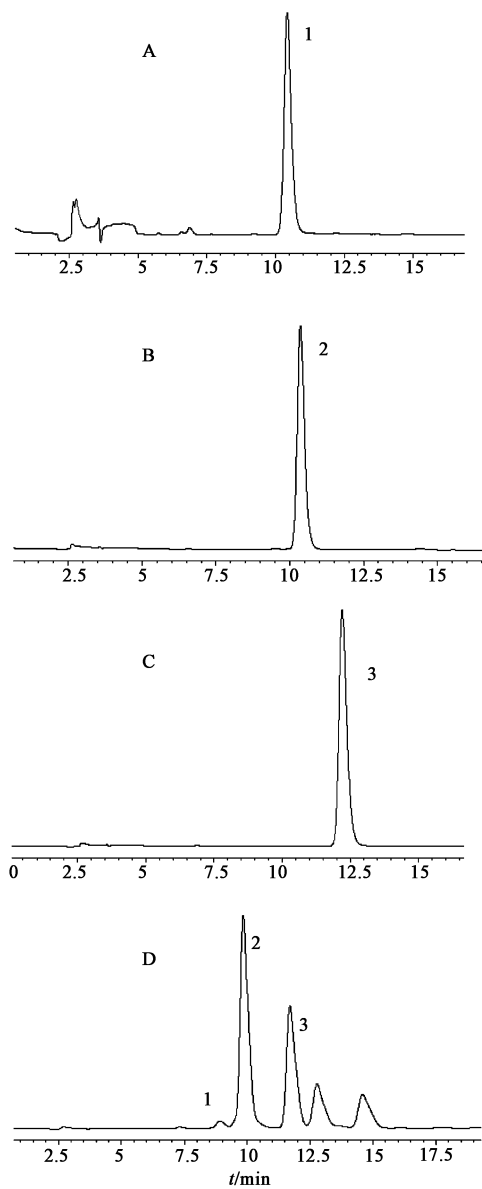
2.1 马钱子总生物碱的提取与精制^[9] 精密称取过 50 目筛的制马钱子粉末 50 g, 加 15 倍量 70% 乙醇加热回流提取 3 次, 每次 0.5 h, 过滤, 合并 3 次滤液, 浓缩至干, 用 1 mol·L⁻¹ 盐酸 100 mL 超声溶解, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 用 40% 氢氧化钠调节 pH 12.0, 二氯甲烷萃取, 50 °C 水浴干燥除去二氯甲烷, 精密称定质量, 即得马钱子总生物碱, 得率 2.63%。

2.2 马钱子总生物碱的纯化^[9] 精密称取 2.1 项下制得的制马钱子总生物碱粉末 100 mg, 超声溶解于 50 mL 50% 乙醇中, 浓缩至原体积 0.08 倍(通过控制质量), 取出浓缩液, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 置于 4 °C 冰箱, 静置过夜, 取上清液, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃去沉淀, 真空干燥, 即得纯化马钱子总生物碱, 得率 31.16%。经 HPLC 测定, 纯化前马钱子碱和土的宁质量分数分别为 20.76%, 42.54%; 纯化后分别占 34.54%, 16.05% (马钱子碱与土的宁的质量比 2.1:1)。

2.3 纯化马钱子总生物碱中有效成分的含量测定

2.3.1 色谱条件^[10] Superstar C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 磺酸钠与 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾等量混合(用 10% 磷酸调 pH 2.8) (24:76), 检测波长 264 nm, 柱

温 30 ℃, 分析时间 20 min, 流速 1 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL。见图 1。



A, B, C. 对照品; D. 供试品;

1. 马钱子碱氮氧化物; 2. 马钱子碱; 3. 土的宁

图 1 纯化马钱子碱 HPLC

2.3.2 对照品溶液的制备 分别称取马钱子碱、土的宁和马钱子碱氮氧化物对照品适量, 精密称定, 用甲醇溶解并配制成质量浓度分别为 0.105 3, 0.105, 0.010 7 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取纯化马钱子总生物碱适量, 精密称定, 用甲醇溶解并定容, 过滤, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3.4 线性关系的考察 精密吸取马钱子碱对照品溶液, 分别用甲醇稀释至 0.01, 0.02, 0.05, 0.1,

0.15, 0.2 g·L⁻¹ 系列对照品溶液, 进样, 测定峰面积。以质量浓度 (X) 对峰面积 (Y) 作线性回归, 得马钱子碱的回归方程 $Y = 156\ 964X - 6\ 315.5$ ($r = 0.999\ 6$), 线性范围 0.01 ~ 0.5 g·L⁻¹。同法得到土的宁回归方程 $Y = 242\ 666X - 6\ 191.2$ ($r = 0.999\ 8$), 线性范围 0.01 ~ 0.5 g·L⁻¹。马钱子碱氮氧化物的回归方程 $Y = 12\ 498X - 558.09$ ($r = 0.999\ 1$), 线性范围 1 ~ 20 mg·L⁻¹。

2.3.5 精密度试验 分别精密吸取同一供试品溶液, 进样 10 μL, 连续重复进样 6 次, 结果马钱子碱 RSD 0.82%; 土的宁 RSD 1.01%; 马钱子碱氮氧化物 RSD 0.49%。说明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性试验 精密称取 6 份纯化马钱子总生物碱样品 (20110517), 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 依上述条件测定, 结果马钱子碱 RSD 1.12%, 土的宁 RSD 1.68%。马钱子碱氮氧化物 RSD 1.99%。

2.3.7 稳定性试验 取纯化马钱子总生物碱供试品溶液, 室温下放置, 分别在 0, 1, 4, 8, 12, 24 h 测定有效成分峰面积, 结果马钱子碱 RSD 0.79%, 土的宁 RSD 0.96%, 马钱子碱氮氧化物 RSD 0.58%, 说明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.3.8 加样回收率试验 取已知含量的纯化马钱子总生物碱样品 (20110627), 精密称定, 分别加入一定量的马钱子碱、土的宁和马钱子碱氮氧化物的对照品, 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 依法测定。结果见表 1~3。

2.3.9 样品测定 按 2.3.3 项下方法制备样品, 按上述色谱条件进行测定, 测定 10 批纯化马钱子总生物碱样品中马钱子碱质量分数 32.3% ~ 37.5%, 土的宁质量分数 15.0% ~ 18.4%, 马钱子碱氮氧化物质量分数 0.19% ~ 0.23%, 三者之和 > 50%。图 1。

2.4 纯化马钱子总生物碱指纹图谱

2.4.1 色谱条件 Superstar C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈 (A)-[水-乙酸-三乙胺 (100:0.2:0.2)] (B) 进行梯度洗脱 (0 ~ 21 min, 10% ~ 16% A; 21 ~ 55 min, 16% ~ 40% A; 55 ~ 65 min, 10% A), 检测波长 254 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL。见图 2。

2.4.2 对照品溶液、供试品溶液的制备方法 同 2.3.2, 2.3.3 项下方法。

2.4.3 精密度试验 取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 依次测定, 结果各共有峰的相对保留时间和相

表 1 马钱子碱加样回收率试验

No.	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收 率/%	RSD /%
1	1.062 6	99.00		
2	1.090 5	101.60		
3	1.032 0	96.15	99.44	1.24
4	1.032 1	96.98		
5	1.121 4	104.48		

注:样品量及加入量均为0.536 7 mg。

表 2 土的宁加样回收率试验

No.	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收 率/%	RSD /%
1	1.013 5	99.36		
2	1.002 8	98.31		
3	1.023 1	100.30	99.77	2.35
4	1.036 1	101.58		
5	1.013 1	99.32		

注:样品量及加入量均为0.510 mg。

表 3 马钱子碱氮氧化物加样回收率试验

No.	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收 率/%	RSD /%
1	0.168 1	103.76		
2	0.156 8	96.79		
3	0.158 0	97.53	98.59	1.97
4	0.159 9	100.01		
5	0.158 9	98.08		

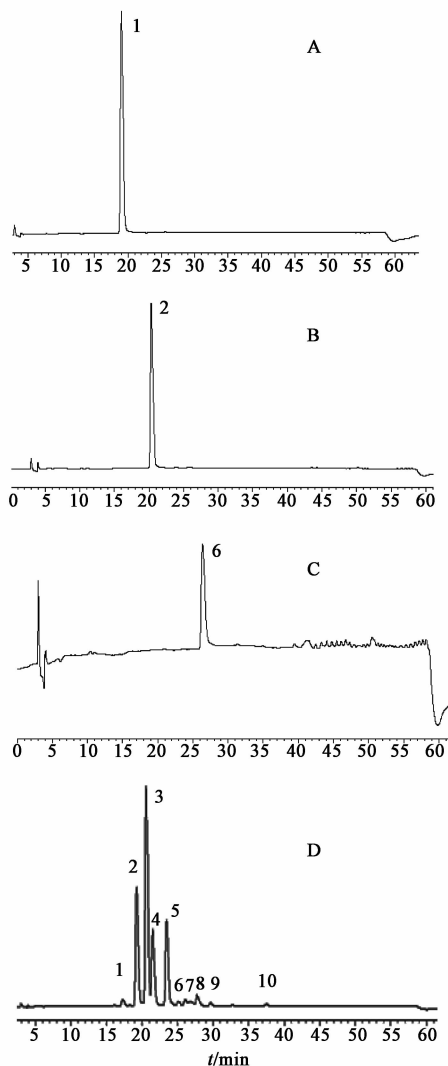
注:样品量及加入量均为0.081 mg。

对峰面积 RSD 分别为 0.10% ~ 0.59% , 0.06% ~ 0.73% , 表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一样品供试品溶液,分别在 0,2,4,8,12,24 h 进样,结果各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 分别为 0.10% ~ 0.68% , 0.12% ~ 0.79% ,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 取同一样品,按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液 6 份,依次进样测定,结果显示各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 分别为 0.15% ~ 0.54% , 0.13% ~ 1.49% ,表明方法重复性良好。

2.4.6 指纹图谱的建立及相似度评价 取 10 批纯化马钱子总生物碱制备供试品溶液,进样 10 μ L,记录色谱图(图 3)。将试验数据导入中药色谱指纹图



A, B, C. 对照品; D. 供试品;

1. 土的宁; 2. 马钱子碱; 6. 马钱子碱氮氧化物

图 2 纯化马钱总生物碱样品 HPLC

谱相似度评价系统软件 2004 A 版,于保留时间 0 ~ 65 min 的色谱峰进行多点校正,自动匹配得到 10 个共有峰,生成对照指纹图谱见图 3,经计算分析,10 批样品指纹图谱相似度均 > 97% ,说明样品整体质量具有较好的一致性;纯化马钱子总生物碱制备工艺稳定,重复性好。

3 讨论

在指纹图谱考察过程中,分别考察了 220,254,264 nm 的色谱图,结果在 264 nm 处各色谱峰均有较好的紫外吸收,指纹图谱流动相检测条件下 254 nm 处各色谱峰均有较好的紫外吸收,色谱信息最为丰富,生物碱成分在此波长下大多有吸收,并能充分反映样品组分全貌,因此选择该波长作为指纹图谱检测波长。

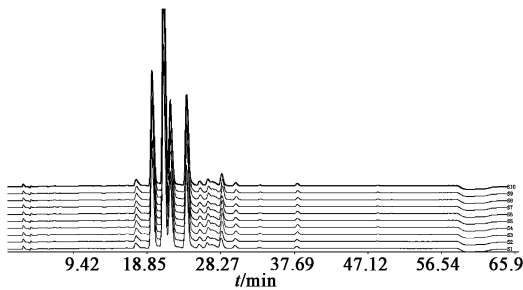


图 3 10 批纯化马钱子总生物碱 HPLC 指纹图谱

由于纯化马钱子总生物碱由乙醇提取并经过相应方法纯化制得,纯化后的马钱子总生物碱易溶于醇,故选用甲醇溶解,制得供试品溶液。马钱子总生物碱在纯化过程中受较多因素影响,主要有效成分含量具有一定波动性。指纹图谱作为评价药材质量的研究报道较多,如将其用于药物制剂工艺和中间产物的质量标准研究^[11-12]。对于纯化马钱子总生物碱的质量控制,不但应对其主要有效成分进行含量测定,同时与指纹图谱分析相结合,建立纯化马钱子总生物碱质量控制体系。本研究表明,纯化马钱子总生物碱主要有效成分(马钱子碱、土的宁和马钱子碱氮氧化物)的含量具有一定波动,指纹图谱相似度表明各批次样品具有良好的整体一致性。故在实际应用中,可结合生产实际、临床需要设定相应成分的含量限度范围和指纹图谱相似度水平,有助于制备工艺稳定性及产品质量考察,全面控制纯化马钱子总生物碱的质量。

[参考文献]

[1] 蔡宝昌,吴皓,杨秀伟,等. 马钱子中 16 个生物碱类

化合物¹³C-NMR 谱的数据分析[J]. 药学学报,1994,29(1):44.

[2] Deng X K, Yin W, Li W D, et al. The anti-tumor effects of alkaloids from the seeds of *Strychnos nux-vomica* on HepG2 cells and its possible mechanism [J]. J Ethnopharmacol, 2006,106(2):179.

[3] 徐丽君,魏世超,陆付耳,等. 马钱子若干组分治疗实验性关节炎的比较研究[J]. 同济医科大学学报,2001,30(6):564.

[4] 徐睿,吕晓宇,蔡宝昌,等. 马钱子碱对人肝癌细胞 HepG2 细胞膜电位和通透性的影响[J]. 中草药,2008,39(11):1692.

[5] 邓旭坤,蔡宝昌,吕晓宇,等. 马钱子碱及其脂质体对移植性荷瘤小鼠抗肿瘤作用的对比研究[J]. 中草药,2006,37(3):389.

[6] 魏世超,徐丽君,张秀桥,等. 马钱子总生物碱对大鼠佐剂性关节炎的作用[J]. 中国药理学通报,2001,17(4):479.

[7] 林明侠,张浩,徐涛. 马钱子的毒理学研究[J]. 中医药信息,2002,19(1):25.

[8] 蔡宝昌,陈军,陈志鹏. 一种提取纯化马钱子总生物碱的方法及其在制药中的应用,中国:CN 101804096 A[P]. 2010-08-18.

[9] 高颖. 优化马钱子总生物碱的制备及药效学研究[D]. 南京:南京中医药大学,2010.

[10] 中国药典. 一部[S]. 2010:46.

[11] 张萍,杨燕,鄢丹,等. 多指标成分含量测定与指纹图谱分析在中药制备工艺与质量控制中的应用[J]. 中国中医药杂志,2010,25(1):120.

[12] 李磊,陈军,蔡宝昌. 马钱子总生物碱复合磷脂脂质体 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药新药与临床药理,2010,216(6):637.

[责任编辑 仝燕]