

反相高效液相色谱测定腰痛宁贴膏中土的宁及马钱子碱含量

秦婷, 李平, 郑艳春, 王春民, 张瑞华

(承德颈复康药业集团有限公司 河北省中药新辅料工程技术研究中心, 河北 承德 067000)

[摘要] 目的:建立反相高效液相色谱法同时测定腰痛宁贴膏中土的宁和马钱子碱含量。方法:色谱柱 Intersil C₈₋₃ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水-冰乙酸(20:96:7, 用三乙胺调 pH 为 3.10), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 30 °C。结果:土的宁在 0.020 6 ~ 0.123 4 μg 线性关系良好 ($r = 0.999 8$), 测得平均加样回收率 ($n = 9$) 为 100.28%, RSD 1.33%; 马钱子碱在 0.013 8 ~ 0.083 0 μg 线性关系良好, $r = 0.999 9$, 测得平均加样回收率 ($n = 9$) 为 99.82%, RSD 0.84%。结论:方法灵敏、准确、可用于腰痛宁贴膏中土的宁和马钱子碱的质量控制。

[关键词] 腰痛宁贴膏; 土的宁; 马钱子碱; 高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0078-03

Determination of Brucine and Strychnine in Yaotongning Patch by RP-HPLC

QIN Ting, LI Ping, ZHENG Yan-chun, WANG Chun-min, ZHANG Rui-hua

(Chengde Jingfukang Pharmaceutical Group, New Excipients of Traditional Chinese Medicine Engineering Research Center of Hebei Province, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the RP-HPLC method for the content determination of brucine and strychnine in Yaotongning Patch. **Method:** The Intersil C₈₋₃ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used; the mobile phase consisted of methanol-water-acetic acid (20:96:7), adjust pH to 3.10 with triethylamine. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was at 254 nm; the column temperature was at 30 °C. **Result:** The linear range of strychnine was between 0.020 56-0.123 36 μg ($r = 0.999 8$), the average recovery was 100.28% with a RSD of 1.33% ($n = 9$); the linear range of brucine was between 0.013 84-0.083 04 μg ($r = 0.999 9$); the average recovery was 99.82% with a RSD of 0.84% ($n = 9$). **Conclusion:** The method is fast, reliable and accurate, it can be used in the quality control of strychnine and brucine in Yaotongning Patch.

[Key words] Yaotongning Patch; RP-HPLC; strychnine; brucine; content determination

腰痛宁贴膏处方由马钱子, 苍术, 川牛膝, 乳香, 没药, 全蝎, 僵蚕及麻黄, 土鳖虫等 10 味中药组成。功能主治包括消肿止痛, 疏散寒邪, 温经通络。用于腰椎间盘突出, 腰椎增生症, 坐骨神经痛, 腰肌劳损, 腰肌纤维炎, 慢性风湿性关节炎, 症见腰腿痛、关节痛的治疗。方中药物多为辛温之品, 共起温经通脉、化痰消肿、止痛之效, 其中重用风湿要药马钱子以通

经络、利关节, 治顽痹拘挛疼痛。马钱子为方中君药, 有毒性, 应严格控制其用量, 其主要成份含有土的宁 (strychnine) 及马钱子碱 (brucine) 等生物碱, 2000 年版《中国药典》^[1] 马钱子的含量测定项下采用正相高效液相色谱法测定土的宁的含量, 在 2010 年版《中国药典》^[2] 中马钱子的含量测定采用了反向高效液相色谱法同时测定土的宁及马钱子碱的含量, 因为贴剂中马钱子有效成分含量测定方法少有报道, 故我们采用反相高效液相色谱法测定腰痛宁贴膏中土的宁和马钱子碱的含量, 结果显示本法简便、准确、重复性良好, 可用于腰痛宁贴膏的质量控制。

[收稿日期] 20110331(012)

[第一作者] 秦婷, 本科, 工程师, 从事专利管理和质量标准研究, Tel:0314-2292079, E-mail:dwtuyyps@sohu.com

1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津高效液相色谱仪(岛津 SCL-10AVP 工作站、岛津 SPD-10AVP 紫外检测器、岛津 LC-10ATVP 泵),METTLER AE 240-S 型电子天平(瑞典制造),KQ-700DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 土的宁对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110705-200306)、马钱子碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 0706-200104),甲醇、三乙胺、冰乙酸均为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为重蒸水,腰痛宁贴膏(承德颈复康药业集团有限公司,批号 040726,040727,040728)。

2 方法与结果

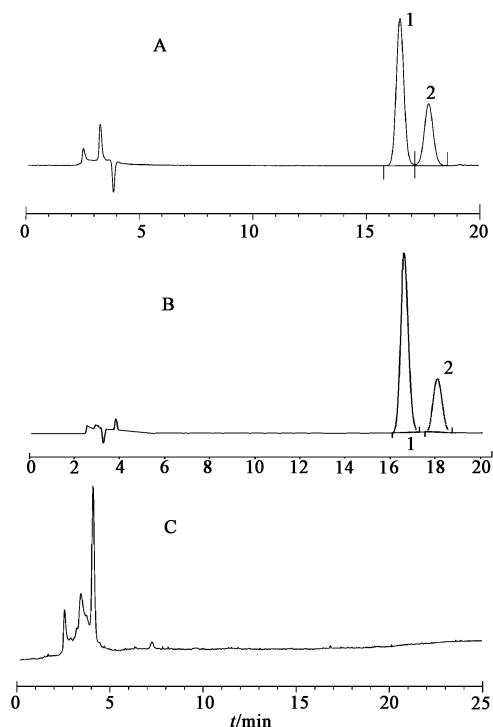
2.1 色谱条件 色谱柱 Intersil C₈₋₃(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 甲醇-水-冰乙酸(20:96:7, 三乙胺调 pH 3.10),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 254 nm,柱温 30 ℃,进样量 20 μL,在此条件下土的宁峰理论塔板数不低于 5 000,马钱子碱理论塔板数不低于 3 000,土的宁峰与马钱子碱峰分离度不低于 1.5。

2.2 供试品溶液及对照品溶液的制备 取腰痛宁贴膏 1/4 片,剪碎,置磨口三角瓶中,氯仿 20 mL,浓氨水 1.0 mL,密塞,超声(功率 700 W,频率 40 kHz)处理 10 min,摇匀,提取液移入分液漏斗中,用 30 mL 氯仿分次洗涤三角瓶,洗液并入分液漏斗中,用 0.5 mol·L⁻¹ 硫酸溶液提取 5 次,每次 10 mL,合并硫酸液,加浓氨试液调节 pH 9~10,用氯仿提取 5 次,每次 10 mL,合并氯仿液,蒸干,残渣加流动相溶解,转移至 50 mL 量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,滤过,精密量取续滤液 1 mL 置 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即为供试品溶液。精密称取土的宁约 3 mg 及马钱子碱约 2 mg,用甲醇定溶至 50 mL,精密吸取 1 mL,用流动相稀释至 10 mL,摇匀,供试。

2.3 线性关系考察 分别精密称取土的宁及马钱子碱对照品适量,加甲醇适量溶解并定量稀释成含土的宁 51.4 ng·L⁻¹ 及马钱子碱 34.6 mg·L⁻¹ 的储备液,分别精密量取此储备液 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mL 于 25 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,在上述色谱条件下进样分析,测定峰面积(A),并以 A 对样品的量(C)进行回归,绘制标准曲线。见图 1。土的宁回归方程 $A = -1.2898 \times 10^3 + 3.9225 \times 10^6 C$ ($r = 0.9998$),结果显示土的宁量在 0.0206 ~

0.1234 μg 线性关系良好。

马钱子碱回归方程 $A = 1.5052 \times 10^3 + 1.1991 \times 10^6 C$ ($r = 0.9999$) 结果显示马钱子碱在 0.0138 ~ 0.0830 μg 线性关系良好。



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性;

1. 土的宁;2. 马钱子

图 1 腰痛宁 HPLC

2.4 稳定性试验 取本品供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 24 h 进样,每次进样 20 μL,测定土的宁峰和马钱子碱峰的峰面积,峰面积基本不变,其中土的宁峰面积 RSD 0.64%,马钱子碱峰面积 RSD 0.68%。

2.5 精密度试验 取对照品溶液(含土的宁 2.053 mg·L⁻¹,马钱子碱 1.688 mg·L⁻¹),在上述色谱条件下重复进样 6 次,测定峰面积值,土的宁峰的 RSD 0.9%,马钱子碱峰的 RSD 0.62%。

2.6 重复性试验 取同一批样品 6 份(批号 040727),按供试品溶液的制备项下方法操作,按拟定的含量测定方法测定,腰痛宁贴膏中土的宁的平均含量为 5.1 mg/贴, RSD 1.42%,马钱子碱的平均含量为 2.92 mg/贴, RSD 1.85%。

2.7 加样回收率试验 取 9 份已知含量的样品(相当于供试品取样量的一半),精密加入一定量土的宁及马钱子碱对照品 0.8, 1.0, 1.2 mL,按供试品溶液

制备方法,按上述色谱条件下测定,结果见表 1。

表 1 士的宁加样回收率试验 (n=9)

No.	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.728 1	0.501 2	1.246 6	101.41		
2	0.739 2	0.501 2	1.265 3	102.01		
3	0.740 6	0.501 2	1.247 5	100.46		
4	0.670 9	0.626 5	1.276 4	98.38		
5	0.668 2	0.626 5	1.289 6	99.61	100.28	1.33
6	0.685 1	0.626 5	1.322 1	100.80		
7	0.697 2	0.751 8	1.474 9	101.79		
8	0.685 3	0.751 8	1.419 2	98.75		
9	0.701 4	0.751 8	1.443 0	99.30		

2.8 样品含量测定 取 3 批样品进行含量测定,结果见表 3。

表 2 马钱子碱加样回收率试验 (n=9)

No.	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.360 3	0.36	0.726 4	100.85		
2	0.356 8	0.36	0.721 7	100.68		
3	0.364 6	0.36	0.730 1	100.76		
4	0.389 0	0.45	0.837 5	99.82		
5	0.373 2	0.45	0.820 1	99.62	99.82	0.84
6	0.372 2	0.45	0.816 3	99.28		
7	0.465 3	0.54	1.000 1	99.48		
8	0.423 0	0.54	0.959 2	99.60		
9	0.418 6	0.54	0.942 0	98.27		

表 3 样品中生物碱的含量测定 (n=3)

批号	士的宁 /mg/贴	RSD /%	马钱子碱含量 /mg/贴	RSD /%
040726	5.18	1.2	3.06	0.9
040727	5.13	0.6	2.93	0.5
040728	5.02	0.8	2.87	1.0

2.9 样品的阴性对照实验 依处方比例称取除马钱子外的其他各药材,按工艺制成无马钱子的制剂,按供试品溶液制备方法制成阴性对照液,在上述色

谱条件下测定,见图 1。在阴性对照品中,未检出与已知 2 种对照品及样品保留时间相同的色谱峰,证明本法可以用于腰痛宁贴膏中士的宁和马钱子碱的质量控制。

3 讨论

制备供试品溶液时原采取用氯仿及氨水浸泡样品 24 h,再进行萃取的方法,但由于贴膏基质较粘,提取不完全,采取超声处理样品的方法,且对样品的超声提取时间进行考察,结果表明样品超声处理 10 min 含量测定结果与 15,20,25 min 含量测定结果一致,提取较完全,节省时间,方便快捷。

本实验采用岛津公司的 C₁₈柱和其他公司的 C₁₈柱、C₈柱,多种流动相^[1-6]及甲醇-水-冰乙酸,用三乙胺调不同 pH 范围的流动相条件进行比较,其中采用迪马公司的 C₈柱,甲醇-水-冰乙酸(20:96:7)用三乙胺调 pH 3.10 的流动相分离效果最佳,样品中士的宁与马钱子碱两峰分离度为 2.09,与其他杂质峰可以达到完全分离。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2000:37.
- [2] 中国药典.一部[S].2010:47.
- [3] 孙玉明,李建春,宋金春.反相高效液相色谱法同时测定马钱子酊中士的宁和二甲氧基士的宁的含量[J].中国医院药学杂志,2002,22(9):544.
- [4] 傅应华,韩伟东,徐宏祥.高效液相色谱法同时测定制马钱子中士的宁和马钱子碱的含量[J].中国药科大学学报,1998,29(4):281.
- [5] 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士的宁和马钱子碱的含量[J].中国医院药学杂志,2001,21(8):474.
- [6] 乔丽,王静,袁子民.RP-HPLC 法同时测定伤科接骨片中士的宁和马钱子碱的含量[J].中国医药导报,2009,6(31):38.

[责任编辑 蔡仲德]