

# HPLC 法测定复方中风康复片中土的宁和马钱子碱

刘元<sup>1\*</sup>, 宋志钊<sup>1</sup>, 莫海涛<sup>2</sup>, 文志云<sup>1</sup>, 李星宇<sup>1</sup>

(1. 广西中医药研究院, 南宁 530022; 2. 南宁市冠峰制药有限公司, 南宁 530008)

**[摘要]** 目的: 建立复方中风康复片中土的宁和马钱子碱的质量分数测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, 以 ODS<sub>C<sub>18</sub></sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 为分离柱, 以乙腈-0.1% 磷酸与 0.1% 三乙胺等量混合溶液 (12:88) 为流动相, 260 nm 为检测波长, 柱温为室温。结果: 土的宁和马钱子碱的线性范围分别为 0.025 ~ 0.303 μg 和 0.012 ~ 0.200 μg, 平均回收率分别为 96.6% 和 96.4%, RSD 分别为 0.77% 和 0.73% (n=6)。结论: 该方法简便、准确、重复性好, 可作为该制剂含量测定方法。

**[关键词]** 复方中风康复片; 土的宁和马钱子碱; 含量测定; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R 284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0074-03

复方中风康复片是根据广西地方民族经验方, 经筛选后进行研制的中药制剂, 主要由麻黄、五味藤、地龙、马钱子粉等中药组成, 具有疏风活血, 化痰通络之功效。用于中风 (中经络) 恢复期风痰瘀阻证, 症见头晕目眩, 口舌歪斜, 言语蹇涩, 半身不遂, 肢体麻木, 舌质暗淡, 舌苔白腻, 脉弦滑。为了更好地控制其质量, 保证临床疗效及安全性, 该实验采用 HPLC 法测定了制剂中土的宁和马钱子碱的含量, 为本品质量标准的制订提供了依据。

## 1 仪器与试剂

日本岛津 LC-20ATVP 液相色谱仪; 检测器 SPD-20AVP; 威玛龙色谱工作站。土的宁对照品 (批号为 0705-9304) 和马钱子碱对照品 (批号为 110706-200505), 均购于中国药品生物制品检定所。水为高纯水; 乙腈为色谱纯。样品复方中风康复片, 南宁市冠峰制药有限公司提供 (批号 061104, 070104, 090215)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱大连依利特 ODS 柱 C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 检测波长为 260 nm; 流动相乙腈-0.1% 磷酸与 0.1% 三乙胺等量混合溶液 (12:88); 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温为室温。理论塔板数按土的宁和马钱子碱峰计算不低于 3000。见图 1。

**2.2 对照品溶液的制备** 分别精密称取土的宁 10

mg、马钱子碱对照品 5 mg 适量, 分别置 100 mL 棕色量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀。分别精密量取 2 mL, 至同一 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释置刻度, 摇匀, 即得。(每 1 mL 中含土的宁 10 μg、马钱子碱 5 μg)。

**2.3 供试品溶液的制备** 取本品 10 片, 除去包衣, 精密称定, 研细, 取细粉 0.3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加氨水 3 mL, 混匀, 放置 30 min, 加三氯甲烷 20 mL, 称定重量, 超声处理 (功率 80 W, 频率 45 kHz) 60 min, 放冷, 再称定重量, 用三氯甲烷补足减失的质量, 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, 弃去初滤液, 精密量取续滤液 4 mL 置蒸发皿中, 水浴蒸干, 残渣用甲醇分次溶解并转移置 10 mL 量瓶中, 加甲醇置刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

**2.4 标准曲线及线性范围考察** 分别精密称取土的宁对照品 10.1 mg、马钱子碱对照品 5.0 mg, 分别置 100 mL 量瓶中用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液 (质量浓度为 101 μg·mL<sup>-1</sup> 和 50 μg·mL<sup>-1</sup>)。精密吸取 101 μg·mL<sup>-1</sup> 土的宁对照品溶液 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0, 3.0 mL 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 进样 10 μL, 测定; 另取 50 μg·mL<sup>-1</sup> 马钱子碱对照品溶液 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 进样 10 μL, 测定。以土的宁和马钱子碱对照品进样量为横坐标 (X), 峰面积积分为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 得回归曲线土的宁为  $Y = 1.80 \times 10^6 X - 1.37 \times 10^3$ ,  $r = 0.9999$ ; 马钱子碱为  $Y = 2.44 \times 10^6 X - 2.24 \times 10^3$ ,  $r = 0.9993$ 。

**[收稿日期]** 2009-06-15

**[基金项目]** 广西科技攻关项目 (桂科攻 0537018-15)

**[通讯作者]** \* 刘元, Tel: (0771) 5868275; E-mail: liuyuan0821@vip.163.com

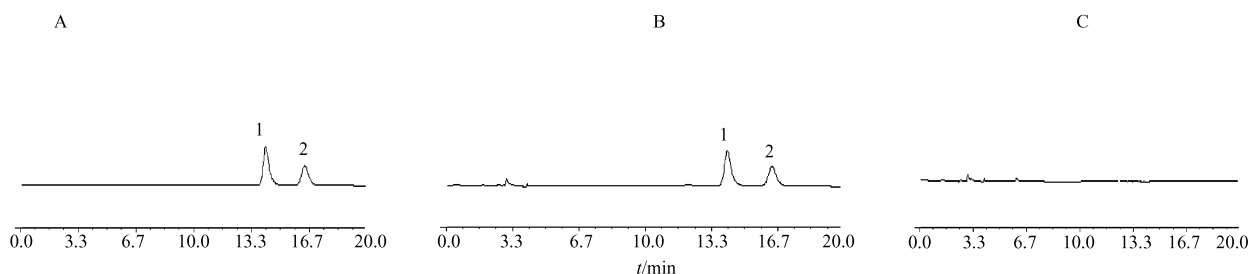


图 1 复方中风康复片 HPLC 图

A. 混合对照品; B. 样品; C. 阴性对照; 1. 土的宁; 2. 马钱子碱。

**2.5 精密度试验** 分别吸取混合对照品溶液(土的宁  $10.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、马钱子碱  $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )，和供试品溶液(批号 070104)，进样 5 次，依次测定，即得。测得对照品混合溶液土的宁和马钱子碱 RSD 为 0.37% 和 0.64%；供试品溶液土的宁和马钱子碱 RSD 为 0.20% 和 0.64%。

**2.6 重复性试验** 精密称取同一批号(070104)样品，按供试品溶液制备方法制备 6 份，分别进样，测定，即得。结果测得土的宁和马钱子碱含量分别为  $0.423 \text{ mg/片}$ ，RSD 为 0.50%；马钱子碱  $0.263 \text{ mg/片}$ ，RSD 为 0.95%。表明该方法重现性良好。

**2.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液分别于 0, 4, 8, 12, 16 h 进行测定，即得。结果供试品中土的宁和马钱子碱含量的 RSD 分别为 0.32% 和 0.62%，表明供试品溶液在 16 h 内保持稳定。

**2.8 加样回收试验** 取已测知含量的供试品  $0.15 \text{ g}$ (土的宁  $0.423 \text{ mg/片}$ ，马钱子碱  $0.263 \text{ mg/片}$ ，平均片重  $0.3052 \text{ g}$ ) 6 份，精密加入对照品，按供试液的制备方法测定。结果土的宁平均回收率为 96.6%，RSD 为 0.77% ( $n=6$ )；马钱子碱平均回收率为 96.4%，RSD 为 0.73% ( $n=6$ )，结果见表 1, 2。

表 1 土的宁加样回收试验 ( $n=6$ )

No.	称样量 /g	样品中含 量/ $\mu\text{g}$	加入量 / $\mu\text{g}$	测得量 / $\mu\text{g}$	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.151 7	210.2	202	405.5	96.7		
2	0.152 0	210.7	202	407.2	97.3		
3	0.151 4	209.8	202	403.3	95.8	96.6	0.77
4	0.150 2	208.2	202	405.2	97.5		
5	0.150 6	208.7	202	402.0	95.7		
6	0.151 1	209.4	202	404.1	96.4		

注:加入量均为  $202 \mu\text{g}$ 。

**2.9 阴性对照实验** 按复方中风康复片处方和方法制备缺制马钱子粉的阴性样品，精密称取  $0.3 \text{ g}$ ，

按供试品溶液制备方法制备缺马钱子粉阴性样品供试液，测定。阴性样品溶液在土的宁和马钱子碱峰位置无吸收峰出现，即阴性无干扰，进一步说明土的宁和马钱子碱来源于制马钱子粉。

表 2 马钱子碱加样回收试验 ( $n=6$ )

No.	称样量 /g	样品中含 量/ $\mu\text{g}$	加入量 / $\mu\text{g}$	测得量 / $\mu\text{g}$	回收率 /%	平均回收 率/%	RSD /%
1	0.1517	130.7	130	257.1	97.2		
2	0.1520	131.0	130	256.7	96.7		
3	0.1514	130.5	130	256.9	97.2	96.4	0.73
4	0.1502	129.4	130	253.7	95.6		
5	0.1506	129.8	130	254.7	96.1		
6	0.1511	130.2	130	254.7	95.8		

**2.10 样品测定** 按供试液的制备及检测方法，分别测定 9 个批号的样品，土的宁质量分数在  $0.423 \sim 0.526 \text{ mg/片}$ ，马钱子碱质量分数在  $0.189 \sim 0.403 \text{ mg/片}$ 。结果见表 3。

表 3 样品中土的宁、马钱子碱含量

No.	土的宁 /mg/片	RSD /%	马钱子碱 /mg/片	RSD /%
060309	0.481	0.42	0.189	1.06
060310	0.526	1.14	0.224	1.12
060311	0.447	0.67	0.195	0.26
061101	0.425	1.18	0.273	0.73
061102	0.487	1.23	0.234	1.07
061103	0.456	0.11	0.255	1.57
061104	0.464	0.75	0.247	0.40
070104	0.423	0.32	0.263	1.53
090215	0.517	0.97	0.403	1.49

### 3 讨论

马钱子又名苦实、番木鳖，味苦有大毒，一般需炮制后入药，临床上常于成药、复方中配伍应用，治疗风湿和类风湿性关节炎、中风偏瘫、痴呆、视网膜

病变以及骨伤科、外科等疾病。但近年来有关马钱子毒性的病例报道不断增多<sup>[1]</sup>。目前公认的马钱子毒性成分主要是土的宁(strychnine)和马钱子碱(brucine),同时土的宁和马钱子碱也是马钱子中主要的有效成分,成人口服 5~10 mg 土的宁就会有中毒现象,30 mg 可致死亡<sup>[2]</sup>,因此必须测定马钱子中有效成分土的宁的限量和马钱子碱的含量。笔者参考《中国药典》2005 年版一部有关马钱子的含量测定方法<sup>[3]</sup>,根据所测定 9 个批号的样品中土的宁和马钱子碱的含量,制定限度为“本品每片含马钱子粉以土的宁(C<sub>21</sub>H<sub>55</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)计,应为 0.40~0.56 mg,以马钱子碱(C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)计,不得少于 0.15 mg”,从而保证了本品的质量及临床的安全使用。

从实验结果看,本分析方法精密度高,准确度、重复性都比较好,并且操作简便、快捷,可有效地控制复方中风康复片的质量。

#### [参考文献]

- [1] 王琦玮,刘良,黄光照. 马钱子的毒理学研究进展[J]. 法医学杂志,2004,20(3):183.
- [2] 赵珍东,黄兆胜. 马钱子的毒副作用研究进展[J]. 国医论坛,2003,18(1):50.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:化学工业出版社,2005. 34.

[责任编辑 顾雪竹]

## 欢迎订阅 2010 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》是经中国科技部批准,由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物。已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊);“中国中文核心期刊”、“中国学术期刊综合评价数据库”来源期刊;“中国期刊网、中国学术期刊(光盘版)”全文收录期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊(光盘版)优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月。本着以提高与普及相结合的办刊方针。主要设置:制剂工艺、化学与分析、药理、临床、综述、基层园地、消息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量分析、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。

《中国实验方剂学杂志》现为月刊,16 开本,130 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价 10 元,全年 120 元。国内外公开发售,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:BM4655。欢迎订阅。本编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部。邮编:100700,联系人:何希荣,联系电话:(010)84076882 或 64014411 转 2849;E-mail:czd@vip.sina.com