

HPLC 法测定神农丸中土的宁与马钱子碱的含量

段存贤¹, 郭承军^{2*}

(1. 山东省肿瘤医院, 济南 250117; 2. 山东省运动康复研究中心, 济南 250101)

摘要 目的: 采用氨基键合硅胶为固定相的正相高效液相色谱法, 研究建立神农丸中土的宁与马钱子碱的含量测定方法, 并进行方法学研究。**方法:** 以 ZORBAX NH₂ 氨基键合硅胶柱为色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-异丙醇-3% 磷酸溶液 (80:10:10) 为流动相, 以 260 nm 为检测波长, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温: 40 °C。**结果:** 土的宁进样量在 0.051 2~0.512 μg 范围内线性关系良好, 回归方程: $Y=1\,989.6X+3.610$, $r=0.999\,9$; 马钱子碱进样量在 0.057 6~0.576 μg 范围内线性关系良好, 回归方程: $Y=1\,932.8X-2.569$, $r=1.000$, 土的宁与马钱子碱的平均回收率分别为 98.6%、96.7%。**结论:** 本方法操作简便, 供试品色谱图基线稳定, 主成分峰峰形对称, 分离度高, 方法的重复性好、准确度高, 可用于神农丸中土的宁与马钱子碱的含量测定。

关键词: 医院制剂; 肿瘤药物; 神农丸; 土的宁; 马钱子碱; 中药测定; 高效液相色谱法; 氨基柱

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2018) 02-0331-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.02.21

Determination of strychnine and brucine in Shennong pills by HPLC

DUAN Cun-xian¹, GUO Cheng-jun^{2*}

(1. Tumor Hospital of Shandong Province, Jinan 250117, China;

2. Athletic Rehabilitation Research Center of Shandong Province, Jinan 250101, China)

Abstract Objective: To establish a method for the determination of strychnine and brucine in Shennong pills by NP-HPLC of amino-bonded silica gel column, and study its methodology. **Method:** The stationary phase was amino-bonded silica gel column (ZORBAX NH₂, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile-isopropanol-3% sulphuric acid (80:10:10) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detecting wavelength was 260 nm. The column temperature was 40 °C. **Result:** The linear range of strychnine was 0.051 2~0.512 μg and the linear calibration curve was $Y=1\,989.6X+3.610$ ($r=0.999\,9$); The linear range of brucine was 0.057 6~0.576 μg and the linear calibration curve was $Y=1\,932.8X-2.569$ ($r=1.000$). The average recovery rates of strychnine and brucine were 98.6% and 96.7% respectively. **Conclusion:** This method is simple. The base line is straight. The main peaks' shape are symmetric and the degree of separation between the main peaks is high in the chromatogram. The method is repeatable and accurate, which can be applied to the determination of the contents of

* 通信作者 Tel: (0531) 89657634; E-mail: guochj28@126.com

第一作者 Tel: (0531) 67626755; E-mail: cunxianduan@163.com

strychnine and brucine in Shennong pills.

Keywords: hospital preparations; cancer drugs; Shennong pills; strychnine; brucine; traditional Chinese medicine (TCM) determination; HPLC; amino-bonded silica gel chromatographic column

神农丸是山东省肿瘤医院医院制剂(鲁药制字 ZBZ0034),已在临床上使用多年,具有通络散结、消肿定痛之功,用于胃癌、胃炎、胃溃疡等疾病的治疗,疗效确切,深得临床医生和患者的好评。本品是由制马钱子、薏苡仁、甘草 3 种药味经粉碎制成的糊丸。制马钱子为方中君药,土的宁与马钱子碱为其主要的药效成分,但也是主要的毒性成分,特别是土的宁的毒性较大,安全范围窄。原质量标准采用紫外分光光度法控制其含量,专属性较差,准确度低,难以满足目前对药物安全性控制的要求。本文采用氨基键合硅胶为填料的色谱柱,应用 HPLC 法对本品中的土的宁与马钱子碱进行了含量测定。流动相无需加入离子对试剂,操作简便,色谱图基线稳定,色谱峰对称、分离度好,方法学研究结果表明,本方法重复性好,准确度高,可作为神农丸中土的宁与马钱子碱的含量测定方法。现报告如下。

1 材料

1.1 仪器

1260 infinity 高效液相色谱仪,包括 G1329B 型自动进样器、G1315C 型 DAD 紫外检测器、Open LAB 工作站(美国 Agilent 公司);色谱柱(氨基键合硅胶柱, ZORBAX NH₂, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司);十万分之一电子天平(AUW220D, 日本 Shimadzu)。

1.2 药品与试剂

神农丸(每丸重约 0.16 g, 山东省肿瘤医院医院制剂,鲁药制字 ZBZ0034);乙腈(色谱纯,美国 ACS);异丙醇(色谱纯,科密欧试剂公司),土的宁对照品(供含量测定用,纯度 ≥ 98%,批号:150928,嘉世玉禾化工技术研究院);马钱子碱对照品(供含量测定用,纯度 ≥ 98%,批号:150619,嘉世玉禾化工技术研究院)。其他所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

以(ZORBAX NH₂, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Agilent)为色谱柱;以乙腈-异丙醇-3%磷酸溶液(80:10:10)为流动相;检测波长为 260 nm;柱温:40 ℃;

流速:1.0 mL · min⁻¹;进样量:5~10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取本品适量,研细,取约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加氢氧化钠试液 5 mL,混匀,放置 30 min,精密加入三氯甲烷 20 mL,密塞,称量,置水浴中回流提取 2 h 放冷,再称量,用三氯甲烷补足减失的量,摇匀,分取三氯甲烷液,滤过,精密量取续滤液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 对照品溶液 精密称取土的宁对照品 2.56 mg,马钱子碱对照品 2.88 mg,置同一 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,作为对照品储备液;精密量取上述对照品储备液 1 mL,加甲醇稀释成每 1 mL 分别含土的宁 25.6 μg,含马钱子碱 28.8 μg 的溶液,即得。

2.2.3 缺制马钱子阴性对照溶液 照处方比例称取除制马钱子外的其他各味,按照样品的制备工艺制得缺制马钱子阴性样品,取该阴性样品,照供试品溶液的制备方法制得缺制马钱子阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

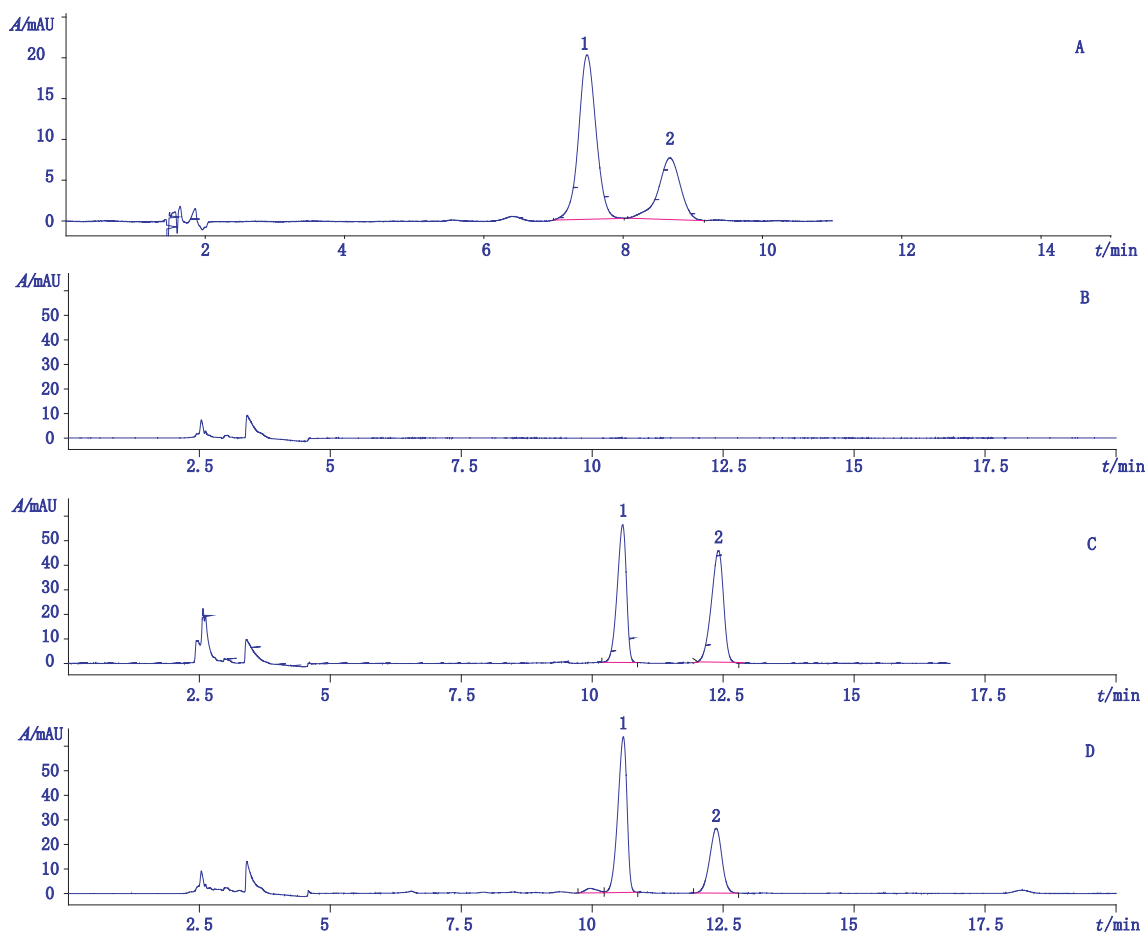
分别精密吸取“2.2”项下的对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,并记录色谱图,结果土的宁与马钱子碱峰形对称,与前后峰的分离度达 1.5 以上,理论板数分别达到 17 178 和 13 406。且阴性对照色谱在与对照品色谱相应的保留时间范围内无吸收峰干扰。色谱图见图 1。

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2”项下的土的宁与马钱子碱混合对照品溶液 2、4、6、8、10、15、20 μL,注入高效液相色谱仪,依法测定峰面积。分别以对照品的进样量(μg)为横坐标(X),峰面积积分为纵坐标(Y)进行线性回归,结果土的宁、马钱子碱进样量分别在 0.051 2~0.512 μg、0.057 6~0.576 μg 范围内线性关系良好,回归方程:

$$Y=1\,989.6X+3.610 \quad r=0.999\,9$$

$$Y=1\,932.8X-2.569 \quad r=1.000$$



1. 土的宁 (strychnine) 2. 马钱子碱 (brucine)

A. 药典色谱条件得到的供试品 (sample chromatogram obtained by the method from the ChP) B. 缺制马钱子阴性对照 (negative control chromatogram without processed nux vomica) C. 土的宁与马钱子碱混合对照 (strychnine and brucine blended reference) D. 供试品 (sample)

图1 含量测定系统适用性 HPLC 图谱

Fig.1 HPLC chromatogram of system suitability of determination

2.5 精密度考察

精密吸取“2.2”项下的土的宁与马钱子碱混合对照品溶液 10 μL , 注入液相色谱仪, 连续进样 6 次, 依法测定峰面积, 结果土的宁峰面积积分值的 RSD 为 0.25%; 马钱子碱峰面积积分值的 RSD 为 0.21%。表明仪器的精密度良好。

2.6 稳定性考察

精密吸取“2.2”项下新制备的供试品溶液 10 μL , 分别在 0、2、4、6、8、24 h 时注入液相色谱仪, 依法测定, 结果供试品土的宁峰面积积分值的 RSD 为 0.18%; 马钱子碱峰面积积分值的 RSD 为 0.33%。表明供试品溶液制备后, 在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批 (20160911) 样品 6 份, 照“2.2”项下方

法制得供试品溶液, 依法测定土的宁与马钱子碱的含量, 结果土的宁的平均含量为 $7.121 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 其 RSD 为 1.5%; 马钱子碱的平均含量为 $4.162 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 其 RSD 为 1.4%。表明本方法的重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取同一批 (20160911) 样品 0.5 g, 精密称定, 共取 6 份, 分别加入氢氧化钠试液 5 mL, 混匀, 放置 30 min, 先精密加入用三氯甲烷配制好的混合对照品溶液 (每 1 mL 含土的宁 2.470 mg, 马钱子碱 2.554 mg) 1 mL, 余按供试品溶液的制备方法制得回收率试验供试溶液。依法测定土的宁与马钱子碱的含量, 并计算回收率。结果土的宁的平均回收率为 98.6%, RSD 为 1.2%; 马钱子碱的平均回收率为 96.7%, RSD 为 0.30%。表明本品土的宁与马钱子碱的测定方法准确度高。结果见表 1。

表 1 回收率试验结果 ($n=6$)

Tab. 1 Results of recovery test

成分 (component)	编号 (No.)	样品量 (sample size)/g	含量 (content)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (measured)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
土的宁 (strychnine)	1	0.566 4	4.033 3	2.470	6.458	98.2	98.6	1.2
	2	0.539 4	3.841 1	2.470	6.303	99.7		
	3	0.556 4	3.962 1	2.470	6.418	99.4		
	4	0.567 4	4.040 5	2.470	6.486	99.0		
	5	0.550 8	3.922 2	2.470	6.306	96.5		
	6	0.559 2	3.982 1	2.470	6.415	98.5		
马钱子碱 (brucine)	1	0.566 4	2.357 4	2.554 0	4.824	96.6	96.7	0.30
	2	0.539 4	2.245 0	2.554 0	4.710	96.5		
	3	0.556 4	2.315 7	2.554 0	4.791	96.9		
	4	0.567 4	2.361 5	2.554 0	4.823	96.4		
	5	0.550 8	2.292 4	2.554 0	4.757	96.5		
	6	0.559 2	2.327 4	2.554 0	4.808	97.1		

2.9 样品的含量测定

分别精密吸取对照品溶液与神农丸样品的供试品溶液各 5 μL , 注入液相色谱仪, 依法测定, 计算各批样品中土的宁与马钱子碱的含量。结果见表 2。

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

Tab. 2 Results of sample content determination

批号 (lot No.)	土的宁 (strychnine)	马钱子碱 (brucine)
160920	8.37	5.17
160921	8.07	4.95
160922	8.30	5.13

3 讨论

3.1 土的宁与马钱子碱含量测定方法变迁

土的宁与马钱子碱的含量测定方法, 20 世纪 90 年代基本以紫外分光光度法和双波长扫描法为主^[1-4], 并有了应用高效液相色谱法进行土的宁含量测定的报道^[5-7]。徐丽华等^[8]应用色谱柱 Platinum silica (Alltech 3 μm , 4.6 mm \times 150 mm), 流动相: 正己烷-二氯甲烷-甲醇-浓氨试液 (47.5:47.5:5:0.35), 检测波长: 254 nm, 同时测定土的宁与马钱子碱 2 种成分含量, 得到了较满意的结果; 2000 年版中国药典一部马钱子项下含量测定正是采用其方法^[9]。金红宇等^[10]发表以十八烷基硅合硅胶为固定相, 以磷酸缓冲盐加入离子对试剂为流动相的 HPLC 测定方法, 2005 年版及以后的中国药典马钱子含量测定均采纳了其方法^[11]。近些年的文献报道中, 以十八烷基硅合硅胶为固定相, 流动相有采用乙腈加磷酸缓冲盐的^[12], 也有乙腈加冰

醋酸三乙胺缓冲水溶液的^[13], 但大多数还是沿用了现行版中国药典中的色谱条件^[14-21]。

3.2 色谱条件优选

经试验, 现行版药典马钱子含量测定色谱条件中, 离子对试剂配制方法复杂、要求高, 难以得到稳定平直的基线, 成分峰的峰形常有前后拖尾现象, 分离度较差 (图 1-A)。本文以氨基键合硅胶为固定相, 以乙腈-异丙醇-3% 磷酸溶液 (80:10:10) 为流动相, 得到了基线稳定、主成分峰峰形对称、分离度高的色谱图, 此色谱条件用于土的宁与马钱子碱的含量测定尚未见报道。在后续生物碱含量测定方法研究中, 我们将进一步扩展氨基色谱柱适用范围, 以期生物碱的含量测定提供更佳的方法。

3.3 供试品制备方法优选

本品供试品溶液的制备方法是参考现行版药典马钱子药材含量测定项下供试品溶液的制备方法并经实验改进所得。实际操作中, 本品按 1 g 取样量, 曾对氢氧化钠试液的加入量进行了考察。设计了 3、4、5、6 mL 4 个不同的用量, 以土的宁与马钱子碱的含量为指标进行考察, 结果表明以加入 5 mL 氢氧化钠试液制得的供试品测得的含量较高, 再增加用量含量不再增加。故确定氢氧化钠试液的用量为 5 mL。

综上所述, 本文报道的土的宁与马钱子碱的含量测定方法操作简便, 重复性好, 准确度高, 可用于神农丸中土的宁与马钱子碱的含量测定, 也为下一版中国药典马钱子中土的宁与马钱子碱含量测定方法的改进提供参考。

参考文献

- [1] 舒毕琼, 陈立新. 两种测定土的宁含量的方法比较[J]. 湖南中医药导报, 1998, 4(3): 22
SHU BQ, CHEN LX. Comparison of two methods for the determination of strychnine[J]. Hunan Guid J Tradit Chin Med Pharmacol, 1998, 4(3): 22
- [2] 李静, 杨翊, 郝青春, 等. 含制马钱子冲剂中土的宁的含量测定[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(4): 225
LI J, YANG X, HAO QC, *et al.* The determination of the strychnine in granule includeprocessed nux vomica[J]. Chin J Chin Mater Med, 1995, 20(4): 225
- [3] 陆敏仪, 李梅, 赵素荣. 双波长法测定马钱子中马钱子碱和土的宁含量及马钱子炮制原理探讨[J]. 中国中药杂志, 1990, 15(12): 18
LU MY, LI M, ZHAO SR. Determination of brucine and strychnine from nux vomica and discussion of processing principle of nux vomica by dual-wavelength spectrophotometry[J]. Chin J Chin Mater Med, 1990, 15(12): 18
- [4] 祁明馥, 胡奎三. 双波长分光光度法测定马钱子中土的宁的含量[J]. 药物分析杂志, 1983, 3(3): 170
QI MF, HU KS. The determination of strychnine in nux vomica by dual-wavelength spectrophotometry[J]. Chin J Pharm Anal, 1983, 3(3): 170
- [5] 顾志平, 连文琰, 刘慧灵. 中药马钱子商品中土的宁和马钱子碱的含量测定[J]. 中国药理学杂志, 1996, 32(12): 747
GU ZP, LIAN WY, LIU HL. Quantitative determination of strychnine and brucine in seeds of commercial Semen Nux-vomica by RP HPLC[J]. Chin Pharm J, 1996, 32(12): 747
- [6] 梁宏晔, 于如暇, 杨清华, 等. HPLC 测定九分散中麻黄碱、伪麻黄碱和土的宁的含量[J]. 药学学报, 1990, 25(11): 849
LIANG HX, YU RX, YANG QH, *et al.* Determination of ephedrine, pseudoephedrine and strychnine in Jiufen San by HPLC[J]. Acta Pharm Sin, 1990, 25(11): 849
- [7] 陈发奎, 郭允珍, 鹿野美弘. 用高效液相色谱法同时测定九分散中麻黄碱和土的宁的含量[J]. 中草药, 1994, 25(11): 571
CHEN FK, GUO YZ, KANO Y. Determination of the ephedrine and strychnine in Jiufen San by HPLC[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 1994, 25(11): 571
- [8] 徐丽华, 鲁静. HPLC 法测定马钱子及其制剂中土的宁与马钱子碱的含量[J]. 药物分析杂志, 1998, 18(6): 383
XU LH, LU J. Determination of strychnine and brucine in nux vomica and its preparations[J]. Chin J Pharm Anal, 1998, 18(6): 383
- [9] 中国药典 2000 年版. 一部[S]. 2000: 37
ChP 2000. Vol I [S]. 2000: 37
- [10] 金红宇, 田金改, 张莉, 等. 反相 HPLC 法测定马钱子中土的宁和马钱子碱的含量[J]. 中国药事, 2005, 19(4): 219
JIN HY, TIAN JG, ZHANG L, *et al.* Determination of strychnine and brucine in Semen Strychni by RP-HPLC[J]. Chin Pharm Aff, 2005, 19(4): 219
- [11] 中国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 51
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 51
- [12] 王雪, 金朗, 王炳强. HPLC 法测定接骨丸中马钱子土的宁含量[J]. 河南中医, 2016, 36(6): 1102
WANG X, JIN L, WANG BQ. Content of strychnine in Bone-Setting pills determined by HPLC[J]. Henan Tradit Chin Med, 2016, 36(6): 1102
- [13] 王明昭, 齐武强. 炮制对不同产地马钱子中马钱子碱含量的影响[J]. 中医学报, 2017, 32(7): 1236
WANG MZ, QI WQ. Effect of processing techniques on strychnine content in nux vomica with different origins[J]. Acta Chin Med, 2017, 32(7): 1236
- [14] 陈卫平, 王伟影, 毛菊华. HPLC 法测定追风舒筋活血片中马钱子碱、土的宁的含量[J]. 中国药师, 2016, 19(1): 191
CHEN WP, WANG WY, MAO JH. Determination of vauqueline and strychnine in Zhuifeng Shujing Huoxue tablets by HPLC[J]. China Pharm, 2016, 19(1): 191
- [15] 王泽童, 吴韶梅, 张亚莉, 等. SPE-HPLC 测定风湿马钱片中的马钱子碱[J]. 河北科技大学学报, 2015, 36(2): 176
WANG ZT, WU SM, ZHANG YL, *et al.* Determination of brucine in Fengshi Maqian tablet by SPE-HPLC[J]. J Hebei Univ Sci Technol, 2015, 36(2): 176
- [16] 娄玉霞. 反相高效液相色谱法测定桂枝马钱片中土的宁和马钱子碱的含量[J]. 风湿病与关节炎, 2016, 5(12): 42
LOU YX. Determination of the contents of strychnine and brucine in Guizhi Maqian tablets with RP-HPLC[J]. Rheumat Arthr, 2016, 5(12): 42
- [17] 岑淑姬. 马钱子制剂中土的宁含量测定方法研究进展[J]. 华夏医学, 2008, 21(3): 600
CEN SJ. Research progress in the determination of strychnine in preparation of strychni semen[J]. Huaxia Med, 2008, 21(3): 600
- [18] 刁国兰, 张贵华, 马云淑, 等. HPLC 测定马钱子及其提取物中马钱子碱和土的宁含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(12): 51
DIAO GL, ZHANG GH, MA YS, *et al.* Determination of brucine and strychnine in strychni semen and its exact by HPLC[J]. Chin J TCM Inf, 2013, 20(12): 51
- [19] 陈天朝, 梁启超, 李丽, 等. 通脉丸溶出液中土的宁和马钱子碱的含量测定[J]. 中医学报, 2016, 31(215): 563
CHEN TC, LIANG QC, LI L, *et al.* Determination of brucine and strychnine in leach liquor of Tongmai pills[J]. China J Chin Med, 2016, 31(215): 563
- [20] 梁晓东, 唐迎雪, 王加锋, 等. HPLC 测定马钱子配伍生地黄前后马钱子碱和土的宁的含量[J]. 中药材, 2012, 35(1): 79
LIANG XD, TANG YX, WANG JF, *et al.* Determination of strychnine and brucine in nux vomica with or without radix rehmanniae[J]. J Chin Med Mater, 2012, 35(1): 79
- [21] 杨希雄, 陈军, 胡君寅, 等. 高效液相色谱法同时测定马钱子总生物碱脂质体中土的宁和马钱子碱的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(19): 1641
YANG XX, CHEN J, HU JY, *et al.* Simultaneous determination of strychnine and brucine in liposomes containing total alkaloids from nux-vomica by HPLC[J]. Chin Hosp Pharm J, 2008, 28(19): 1641

(本文于 2017 年 3 月 17 日收到)