

骨刺片中士的宁和马钱子碱含量测定方法的研究

王菲菲, 张聿梅, 郑笑为*, 戴忠, 马双成*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 拟建立骨刺片中士的宁和马钱子碱的高效液相色谱(HPLC)含量测定方法, 并考察马钱子生物碱对照提取物(简称对照提取物)和马钱子生物碱混合对照溶液(简称混合对照溶液)替代单体对照品, 测定骨刺片中士的宁和马钱子碱含量的可行性。方法: 采用 Symmetry Shield TM RP C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈 -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溶液(21:79)为流动相, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 260 nm, 柱温 30 °C。分别采用士的宁、马钱子碱的对照品, 对照提取物和混合对照溶液为对照, 测定骨刺片中士的宁和马钱子碱的含量。结果: 士的宁和马钱子碱进样量分别在 0.14~10.00 μg 和 0.10~10.00 μg 范围内线性关系良好; 以对照品、对照提取物和混合对照溶液为对照, 士的宁的平均回收率(n=6)分别为 95.7%、98.8% 和 97.5%, RSD 分别为 1.6%、1.2% 和 1.4%; 马钱子碱的平均回收率(n=6)分别为 97.7%、99.5% 和 96.9%, RSD 分别为 1.3%、0.92% 和 2.0%。采用建立的 HPLC 方法测定了 10 个厂家 22 批次骨刺片样品, 以对照品、对照提取物和混合对照溶液为对照, 士的宁含量范围分别为 0.09~0.69、0.10~0.68 和 0.10~0.69 mg·g⁻¹, 马钱子碱含量范围分别为 0.05~0.62、0.05~0.61 和 0.05~0.62 mg·g⁻¹。结论: 本研究建立的 HPLC 方法, 可快速、准确地测定骨刺片中士的宁和马钱子碱的含量。本文采用士的宁和马钱子碱单体对照品、对照提取物和混合对照溶液为对照, 测定骨刺片中士的宁和马钱子碱的含量, 结果无显著差异(P<0.05), 表明对照提取物和混合对照溶液可替代单体对照品测定骨刺片中士的宁和马钱子碱的含量。

关键词: 骨刺片; 马钱子; 马钱子碱; 士的宁; 对照提取物; 混合对照溶液; 质量标准; 高效液相色谱法

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2018)10-1824-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.10.24

Study on assay method of brucine and strychnine in Guci tablets

WANG Fei-fei, ZHANG Yu-mei, ZHENG Xiao-wei*, DAI Zhong, MA Shuang-cheng*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC assay method for the quality control of strychnine and brucine in Guci tablets and explore the suitability for the reference extracts of Strychni Semen (RE) and the mixture reference solution of Strychni alkaloids strychnine and brucine (MRS) to replace reference substances of strychnine and brucine (RS) for assay. **Methods:** The HPLC analysis was performed on a Waters Symmetry Shield TM RP C₁₈

* 通信作者 马双成 Tel:(010)67095272; E-mail: masc@nifdc.org.cn

郑笑为 Tel:(010)67095282; E-mail: han44yao@163.com

第一作者 Tel: 18620600999; E-mail: sophice999@sina.com

column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mixture of acetonitrile and a mixture solution of equal quantities of 0.01 mol · L⁻¹ sodium heptanesulfonate solution and 0.02 mol · L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate solution (21:79) as the mobile phase at a flow rate of 1 mL · min⁻¹. The spectrophotometer was set at 260 nm and the column temperature was 30 °C. The contents of strychnine and brucine in Guci tablets were determined by RS, RE and MRS. **Results:** The results showed good linearity of strychnine and brucine in the ranges of 0.14–10.00 μg and 0.10–10.00 μg, respectively. Assay by using RS, RE and MRS, the average recoveries (*n*=6) of strychnine were 95.7%, 98.8% and 97.5% with RSDs of 1.6%, 1.2% and 1.4%. The average recoveries (*n*=6) of brucine were 97.7%, 99.5% and 96.9% with RSDs of 1.3%, 0.92% and 2.0%. The HPLC method was evaluated by 22 batches of Guci tablets from 10 manufacturers. The contents were determined by RS, RE and MRS. The contents of strychnine were 0.09–0.69, 0.10–0.68 and 0.10–0.69 mg · g⁻¹ and those of brucine were 0.05–0.62, 0.05–0.61 and 0.05–0.62 mg · g⁻¹. **Conclusion:** The proposed HPLC method can be used for the determination of strychnine and brucine in Guci tablets rapidly and accurately. The concentrations of strychnine and brucine in Guci tablets were detected with RS, RE and MRS. No obvious difference was observed between the detection results obtained with difference calibration methods (*P*<0.05), which suggested that RE or RMS can be used as the alternative for RS in the determination of strychnine and brucine in Guci tablets.

Keywords: Guci tablets; Strychni Semen; brucine; strychnine; reference extracts; mixture reference solution; quality standard; HPLC

骨刺片由昆布、骨碎补、党参、桂枝、威灵仙、牡蛎(煅)、杜仲叶、鸡血藤、附片、制川乌、制草乌、延胡索(制)、白芍、三七、马钱子粉共 15 味中药组成,具有散风邪、祛寒湿、舒筋活血、通络止痛的功效,临床上用于治疗颈椎等骨关节增生性疾病,对风湿、类风湿性关节炎有一定疗效^[1]。本品收载于《中华人民共和国卫生部药品标准 中药成方制剂》第十七册,原标准项下马钱子粉的含量测定是采用薄层扫描法(TLCS法)测定土的宁的含量^[2]。马钱子粉为马钱子药材粉碎成细粉,加适量淀粉混匀制得,其主要成分为土的宁和马钱子碱,它们既是有效成分也是毒性成分,其中土的宁对中枢系统的毒性较大,成人口服 5~10 mg 就会有中毒现象^[3-4]。马钱子碱的含量仅次于土的宁,可阻断神经肌肉传导,呈现箭毒性^[5]。

马钱子粉收载于《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2015 年版一部,其中含量测定项为高效液相色谱(HPLC)方法测定土的宁和马钱子碱的含量^[6]⁵¹。骨刺片现行标准采用 TLCS 方法仅测定土的宁的含量,方法误差较大,且缺乏对马钱子碱的含量控制。本文拟建立骨刺片中土的宁和马钱子碱的 HPLC 含量测定方法。目前对照提取物和混合对照溶液作为单体对照品的替代已得到广泛应用^[7-9]。鉴于土的宁和马钱子碱单体对照品毒性较大,本文拟采用马钱

子生物碱对照提取物(简称对照提取物)和马钱子生物碱混合对照溶液(简称混合对照溶液)替代单体对照品,测定骨刺片中土的宁和马钱子碱的含量。

本文采用建立的 HPLC 方法,测定了来源于 10 个厂家 22 批次的骨刺片样品。采用土的宁和马钱子碱单体对照品、对照提取物和混合对照溶液为对照,测定土的宁和马钱子碱的含量,探讨对照提取物和混合对照溶液替代单体对照品测定骨刺片中土的宁和马钱子碱含量的可行性。

1 仪器与试剂

Waters e2695 高效液相色谱仪(沃特世公司),Mettler Toledo MX5 十万分之一电子天平(梅特勒公司)。土的宁对照品(批号 110705-201307)、马钱子碱对照品(批号 110706-201306)、马钱子生物碱对照提取物(每支 50 mg,批号 112030-201601)和马钱子生物碱混合对照溶液(每支 1.5 mL,批号 112020-201601)均由中国食品药品检定研究院提供;实验用水为 Mini Q 纯水系统制备;乙腈、庚烷磺酸钠为色谱纯,其他试剂均为分析纯。骨刺片均为市售,10 个厂家共 22 批次样品。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 分别精密称取土的宁和马钱子碱的对照品适量(约 10 mg),置于 100 mL 量瓶中,加

甲醇溶解并稀释至刻度,制成混合溶液,即得。

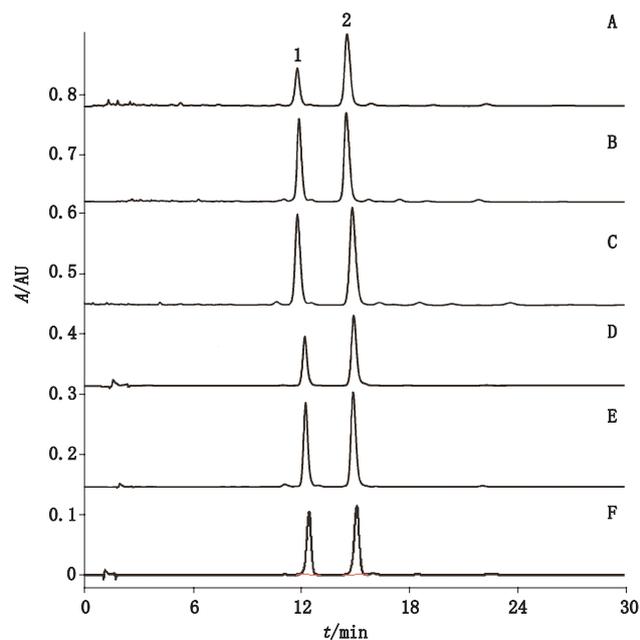
2.1.2 对照提取物溶液 精密称取对照提取物(约 20 mg,其中土的宁含量为 49.9%,马钱子碱含量为 45.4%)于 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 混合对照溶液 取混合对照溶液 1 支(含 0.14 mg·mL⁻¹ 土的宁,0.10 mg·mL⁻¹ 马钱子碱),即得。

2.1.4 供试品溶液 取骨刺片样品 50 片,去包衣,精密称定,研细,精密称取 6 g,置圆底烧瓶中,加三氯甲烷 20 mL,氨水 1 mL,水浴加热回流 1 h,放冷滤过,滤渣用三氯甲烷洗涤 3 次,合并滤液和洗液,置水浴蒸干,蒸干后固体加三氯甲烷溶解并定量转移置 5 mL 量瓶中,以三氯甲烷稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2 色谱条件

色谱柱: Waters Sunfire C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-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溶液(用 10% 磷酸调节 pH 至 2.8)(21:79); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 检测波长: 260 nm; 进样量: 10 μL。在上述条件下,3 批次不同厂家骨刺片样品及对照提取物、混合对照溶液、对照品的 HPLC 色谱图见图 1。



1. 马钱子碱 (brucine) 2. 土的宁 (strychnine)

A、B、C. 不同厂家样品 (samples from different manufacturers) D. 对照提取物 (reference extracts) E. 混合对照溶液 (mixture reference solution) F. 对照品 (reference substances of strychnine and brucine)

图 1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.3 线性关系考察

取对照品溶液、对照提取物溶液和混合对照溶液,分别进样 1、2、3、4 和 5 μL。以进样量 X (μg) 为横坐标,峰面积积分值 Y 为纵坐标,进行线性回归,计算回归方程。

采用对照品,土的宁及马钱子碱的回归方程分别为:

$$Y=2 \times 10^6 X - 365\ 652 \quad r=0.999\ 0$$

$$Y=2 \times 10^6 X + 25\ 740 \quad r=1.000$$

采用对照提取物,土的宁及马钱子碱的回归方程分别为:

$$Y=2 \times 10^6 X + 118\ 075 \quad r=1.000$$

$$Y=2 \times 10^6 X + 27\ 515 \quad r=0.999\ 9$$

采用混合对照溶液,土的宁及马钱子碱的回归方程分别为:

$$Y=2 \times 10^6 X + 118\ 069 \quad r=0.998\ 4$$

$$Y=2 \times 10^6 X + 24\ 576 \quad r=1.000$$

结果表明,土的宁进样量在 0.14~10.00 μg,马钱子碱进样量在 0.10~10.00 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

2.4 精密度试验

吸取同一供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次,结果土的宁和马钱子碱峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 0.50% 和 1.2%。

2.5 稳定性试验

取同一供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 按上述色谱条件进样测定,结果土的宁和马钱子碱峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 1.4% 和 1.5%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6 重复性试验

取同一骨刺片样品,平行制备 6 份供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件分别测定土的宁和马钱子碱的含量,结果平均含量分别为 0.55 和 0.15 mg·g⁻¹, RSD 均为 1.5%,表明重复性可满足分析要求。

2.7 回收率试验

称取已知含量的骨刺片粉末 3 g 共 18 份,精密称定,再分别精密加入“2.1.1、2.1.2 和 2.1.3”项下溶液各 5 mL,按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件测定,以对照品、对照提取物和混合对照溶液计算,土的宁的平均回收率 ($n=6$) 分别为 95.7%、98.8%、97.5%, RSD 分别为 1.6%、1.2% 和 1.4%; 马钱子碱的平均回收率 ($n=6$) 分别为 97.7%、99.5% 和 96.9%, RSD 分别为 1.3%、0.92% 和 2.0%,见表 1 所示。

表 1 对照品、对照提取物和混合对照溶液回收率结果

Tab. 1 Results of the recovery rates of reference substance, reference extracts and mixture reference solution

成分 (component)	加标 (marked)	原始量 (original)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (found)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/%
士的宁 (strychnine)	对照品 (reference substance)	1.652 1	0.505 5	2.041 1	94.6	95.7	1.6
		1.678 2	0.508 5	2.042 4	93.4		
		1.659 9	0.515 2	2.075 0	95.4		
		1.649 7	0.503 7	2.073 7	96.3		
		1.646 7	0.504 8	2.097 7	97.5		
		1.653 6	0.510 3	2.096 8	96.9		
	对照提取物 (reference extracts)	1.652 1	0.502 2	2.130 6	98.9	98.8	1.2
		1.678 2	0.535 2	2.184 6	98.7		
		1.659 9	0.523 4	2.137 5	97.9		
		1.649 7	0.552 4	2.144 8	97.4		
		1.646 7	0.510 2	2.176 3	100.9		
		1.653 6	0.502 2	2.129 9	98.8		
	混合对照溶液 (mixture reference solution)	1.658 4	0.70	2.294 7	97.3	97.5	1.4
		1.653 3	0.70	2.278 0	96.8		
		1.659 0	0.70	2.363 7	100.2		
		1.670 1	0.70	2.310 8	97.5		
		1.677 0	0.70	2.310 4	97.2		
		1.649 1	0.70	2.259 8	96.2		
马钱子碱 (brucine)	对照品 (reference substance)	0.454 5	0.512 7	0.945 0	97.7	97.7	1.3
		0.463 8	0.522 6	0.955 8	96.9		
		0.449 4	0.520 4	0.941 7	97.1		
		0.466 2	0.492 3	0.947 0	98.8		
		0.445 5	0.509 8	0.950 5	99.5		
		0.439 5	0.502 1	0.904 9	96.1		
	对照提取物 (reference extracts)	0.460 8	0.457 0	0.914 1	99.6	99.5	0.92
		0.456 3	0.486 9	0.948 9	100.6		
		0.446 1	0.476 2	0.914 0	99.1		
		0.457 5	0.502 6	0.942 8	98.2		
		0.444 6	0.464 2	0.913 4	100.5		
		0.443 1	0.457 0	0.892 0	99.1		
	混合对照溶液 (mixture reference solution)	0.450 3	0.50	0.898 0	94.5	96.9	2.0
		0.448 8	0.50	0.918 4	96.8		
		0.444 3	0.50	0.933 3	98.8		
		0.459 0	0.50	0.937 9	97.8		
		0.464 7	0.50	0.954 1	98.9		
		0.476 1	0.50	0.925 3	94.8		

2.8 样品测定

取骨刺片样品 22 批次,分别按“2.1.4”项下方法平行制备 2 份供试品溶液,依据上述 HPLC 色谱条件

进行样品测定,采用外标法计算骨刺片中士的宁和马钱子碱的含量,结果见表 2。

表 2 骨刺片中士的宁和马钱子碱含量测定结果

Tab. 2 Content of strychnine and brucine in Guci tablets

生产厂家 (manufacturer)	批号 (lot No.)	士的宁 (content of strychnine) / (mg · g ⁻¹)			马钱子碱 (content of brucine) / (mg · g ⁻¹)		
		对照品 (reference substance)	对照提取物 (reference extracts)	混合对照溶液 (mixture reference solution)	对照品 (reference substance)	对照提取物 (reference extracts)	混合对照溶液 (mixture reference solution)
1	160803	0.55	0.55	0.55	0.15	0.15	0.15
	160504	0.52	0.53	0.53	0.10	0.10	0.11
	160802	0.54	0.54	0.54	0.07	0.07	0.07
2	16092221	0.20	0.21	0.21	0.33	0.33	0.33
	16062821	0.17	0.17	0.17	0.13	0.14	0.14
	16022321	0.21	0.21	0.20	0.17	0.17	0.17
	16062721	0.09	0.10	0.10	0.16	0.16	0.16
3	160802	0.19	0.19	0.18	0.11	0.11	0.11
	160801	0.27	0.26	0.26	0.10	0.10	0.10
4	150906	0.13	0.13	0.14	0.16	0.16	0.15
	1607020	0.26	0.26	0.26	0.13	0.13	0.13
5	013512	0.31	0.31	0.31	0.05	0.05	0.05
	001601062	0.30	0.30	0.30	0.21	0.21	0.21
	013611	0.41	0.40	0.42	0.15	0.15	0.15
6	20160902	0.34	0.34	0.34	0.40	0.40	0.40
	20160901	0.40	0.41	0.41	0.18	0.18	0.18
7	20150701	0.44	0.44	0.44	0.62	0.61	0.62
	20161001	0.42	0.42	0.42	0.20	0.20	0.20
8	150701003	0.41	0.41	0.42	0.15	0.15	0.15
9	15110101	0.45	0.45	0.45	0.17	0.17	0.17
	15050103	0.69	0.68	0.69	0.21	0.21	0.21
10	150409	0.52	0.52	0.52	0.10	0.10	0.10

3 结论

本文参考了《中国药典》2015年版一部马钱子项下方法^{[6]50}及文献[10-11]方法,建立了骨刺片中士的宁和马钱子碱的HPLC含量测定方法,并对10个厂家22批次骨刺片样品进行测定。本文同时采用骨刺片现行标准方法TLCS测定上述样品中士的宁含量,结果在0.09~0.52 mg · g⁻¹之间,与HPLC方法测得的士的宁含量结果(0.09~0.69 mg · g⁻¹之间)较为一致。但由于HPLC方法灵敏度高,建议将骨刺片中士的宁含量测定方法修订为HPLC方法。

其次,本文采用士的宁、马钱子碱对照品,与

混合对照溶液和对照提取物对骨刺片中士的宁和马钱子碱含量进行比较。结果表明,采用对照品溶液、对照提取物和混合对照溶液检测,以One-Way ANOVA对测定结果进行统计,骨刺片中士的宁和马钱子碱含量无显著性差异($P < 0.05$)。鉴于士的宁和马钱子碱为剧毒化学品,发放和使用具有严格的限制^[12],而混合对照溶液和对照提取物中士的宁和马钱子碱含量较低,且对照提取物价格也更为低廉,更易获得^[13-14],因此对照提取物和混合对照溶液可替代单体对照品测定骨刺片中士的宁和马钱子碱的含量,为今后毒性对照品发放和替代提供数据支持。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准. 中药成方制剂. 第十七册 [S]. 1998: 202
Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health, P. R. China. Chinese Patent Medicine. Vol 17 [S]. 1998: 202
- [2] 曹玲, 冯有龙, 王亚超, 等. 骨刺片的质量标准研究 [J]. 中国药品标准, 2011, 12(3): 191
CAO L, FENG YL, WANG YC, *et al.* Study on quality control of Guci tablets [J]. Drug Stand China, 2011, 12(3): 191
- [3] 王伟. 马钱子的炮制质量研究 [J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(3): 98
WANG W. Preparation research of *Strychnos nux-vomica* L. [J]. Nei Mongol J Tradit Chin Med, 2017, 36(3): 98
- [4] 邹龙, 桂卉, 黄世超, 等. 不同粒径马钱子粉体中土的宁在大鼠体内的药代动力学研究 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(12): 1568
ZOU L, GUI H, HUANG SC, *et al.* Study on pharmacokinetics of brucine from normal and ultra-micro powder of Semen Strychni in rats [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2009, 24(12): 1568
- [5] 黄喜茹, 曹冬. 马钱子研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2005, 39(1): 62
HUANG XR, CAO D. Research advancement of Strychni Semen [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2005, 39(1): 62
- [6] 中华人民共和国药典 2015 年版. 一部 [S]. 2015: 50, 51
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 51
- [7] 陈沛, 金红宇, 孙磊, 等. 对照提取物在中药整体质量控制中的应用 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(2): 185
CHEN P, JIN HY, SUN L, *et al.* Application of extractive reference substance in holistic quality control of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(2): 185
- [8] 何风艳, 戴忠, 何轶, 等. 西红花苷对照提取物的研究及其在西红花饮片质量控制中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(12): 2378
HE FY, DAI Z, HE Y, *et al.* Study on crocins refergence extract and application on assay of Croci Stigma [J]. China J Chin Mater Med, 2015, 40(12): 2378
- [9] 孙琳琳, 王海亮, 张静, 等. 津力糖平片对照品溶液稳定性的研究 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2014(10): 873
SUN LL, WANG HL, ZHANG J, *et al.* Stability of the reference solution of Jinlitingping tablets [J]. Eval Anal Drug Use Hosp China, 2014(10): 873
- [10] 周娟娟. 马钱子粉质量标准及马钱子指纹图谱研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2009
ZHOU JJ. Study on Semen Strychni and Fingerprint Chromatograms [D]. Nanjing: Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2009
- [11] 袁晓芳, 张舒. 骨刺片制剂的 HPLC 指纹图谱 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(4): 314
YUAN XF, ZHANG S. Research on HPLC fingerprint of Guci tablets [J]. Chin J Hosp Pharm, 2015, 35(4): 314
- [12] 邢跃文. 马钱子炮制与毒性关系的研究 [J]. 中国民间疗法, 2005, 13(2): 57
XING YW. Study on concoct and toxicity in Strychni Semen [J]. China Naturopathy, 2005, 13(2): 57
- [13] 王菲菲, 吴寿海, 王明娟, 等. 马钱子生物碱混合对照溶液稳定性研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35(2): 328
WANG FF, WU SH, WANG MJ, *et al.* Study on stability of mixture reference solution of Strychni alkaloids [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2018, 35(2): 328
- [14] 王菲菲, 吴寿海, 张聿梅, 等. 马钱子对照提取物的研究及其在马钱子药材及复方制剂质量控制中的应用 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(7): 1228
WANG FF, WU SH, ZHANG YM, *et al.* Study on reference extracts of Strychni Semen and application on assay of crude drug and compound preparation [J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38(7): 1228

(本文于 2018 年 7 月 27 日修改回)