

# RP-HPLC 测定中风康复片中土的宁含量

## Determination of Strychnine in Zhongfeng Kangfu Tablet by RP-HPLC

覃兰芳<sup>1</sup>, 赖茂祥<sup>2</sup>, 梁 威<sup>1</sup>

QIN Lan-fang<sup>1</sup>, LAI Mao-xiang<sup>2</sup>, LIANG Wei<sup>1</sup>

(1. 广西天然药物研究中心, 广西南宁 530022; 2. 广西中医药研究所, 广西南宁 530022)

(1. Guangxi Research Center of Natural Medicine, Nanning, Guangxi, 530022, China; 2. Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Science, Nanning, Guangxi, 530022, China)

**摘要:**采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC),以 Kromasil C<sub>18</sub>柱(250×4.6mm, 5μm)为色谱柱,甲醇-0.05M 磷酸二氢钾(25:75)为流动相,在 254nm 检测波长,1.0ml/min 流速的条件下建立中风康复片中土的宁的含量测定方法。结果表明,中风康复片中土的宁与其它成分分离良好,土的宁在 0.072~0.648μg 范围内呈良好的线性关系( $r = 0.9999$ ),测量方法的平均回收率为 95.51%,  $RSD = 0.7\%$  ( $n = 6$ )。该方法灵敏度高、操作简单、结果准确,可用于本制剂的质量控制。

**关键词:**中风康复片 土的宁 反相高效液相色谱法

中图分类号:R284.1 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2006)03-0219-03

**Abstract:** To establish a RP-HPLC method for determination of strychnine in Zhongfeng Kangfu Tablet. The sample were analyzed by RP-HPLC using Kromasil (250×4.6mm, 5μm) column; methanol - 0.05M potassium dihydrogen phosphate (25:75) as mobile phase; UV detector at 245nm and the flow rate was at 1.0ml/min. The result was the content of strychnine had a good linearity in the range of 0.072~0.648(μg), the correlation was 0.9999, the Average recovery was 95.51%,  $RSD = 0.7\%$  ( $n = 6$ ). The method was sensitive, simple, accurate and suitable for quality control of strychnine in Zhongfeng Kangfu tablet.

**Key words:** Zhongfeng Kangfu tablet, strychnine, RP-HPLC

中风康复片是由制马钱子、麻黄、当归、羌活等八味中药组成的纯中药制剂,具有疏风、活血、除痰、通络功效。临床上用于治疗中风络脉空虚、风邪入中证及中风后遗症主风痰阻络症。方中马钱子主要含有吲哚类生物碱,其中土的宁是马钱子的主要活性成分<sup>[1,2]</sup>。土的宁有毒,为了保证用药的有效性和安全性,必须控制其含量在一定范围内。本文以土的宁为对照品,建立反相高效液相色谱法测定该药中土的宁的含量。

## 1 试验部分

### 1.1 仪器

日本岛津 LC-10ATVP 高效液相色谱仪、SPD-10AVP 紫外检测器;溶剂输送泵;威玛龙色谱工作站;HH-S 数显恒温水浴锅;FA1004 型电子天平;B2200S 型超声清洗器。

### 1.2 试药

土的宁(Strychnine)对照品,批号 705-8702,由中国药品生物制品检定所提供。用于流动相的甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。中风康复片、缺马钱子的阴性样品均由厂家提供。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C<sub>18</sub>柱(250×4.6mm, 5μm);流动相:甲醇-0.05M 磷酸二氢钾(25:75);波长

收稿日期:2005-12-22

修回日期:2006-03-15

作者简介:覃兰芳(1967-),女,广西环江人,研究实习员,主要从事中药化学分析工作。

254nm; 流速 1.0ml/min; 进样量 10 $\mu$ l; 灵敏度 0.0100AUFS; 柱温为室温。在该条件下, 土的宁峰与杂质峰分离度 > 1.5 (见图 1)。

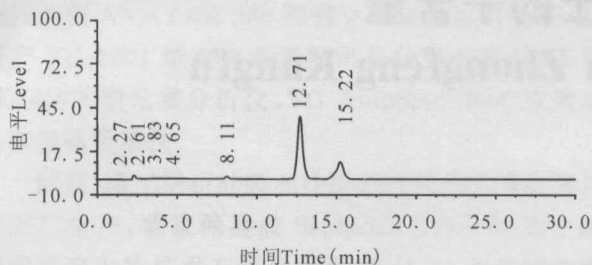


图 1 中风康复片供试品 RP-HPLC 色谱

Fig.1 RP-HPLC chromatogram map of zhongfeng kangfu tablets sample

### 1.3.2 对照品溶液制备

取土的宁对照品 10mg, 精密称定, 置于 10ml 量瓶中, 加入氯仿适量使其溶解并稀释至刻度处, 摇匀, 制成每 1ml 含土的宁 1.0mg 的土的宁对照品储液 I。精密吸取 0.9ml 土的宁对照品储液 I 置于 25ml 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度处, 摇匀, 制成每 1ml 含土的宁 36 $\mu$ g 的土的宁对照品溶液 (见图 2)。

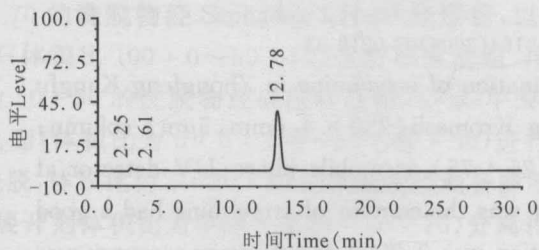


图 2 土的宁对照品 RP-HPLC 色谱

Fig.2 RP-HPLC chromatogram map of Strychnine

### 1.3.3 供试品溶液制备

取中风康复片适量, 除去包衣, 研细, 取约 0.5g, 精密称定, 用 3ml 的 10% 氢氧化钠溶液浸润 30min, 精密加入 25ml 氯仿, 塞密, 称重, 水浴回流 2h, 冷却至室温, 再称重, 用氯仿补足损失的重量, 摇匀, 用铺有无水硫酸钠的滤纸滤过, 精密吸取续滤液 10ml 置于分液漏斗中, 加入 10% 硫酸摇洗 5 次 (20ml, 20ml, 15ml, 15ml, 15ml), 合并酸水层, 再用 30% 氢氧化钠调 pH 值为 10~11, 用氯仿萃取 5 次 (20ml, 20ml, 15ml, 15ml, 15ml), 合并氯仿层, 挥干, 用流动相溶解并定容 25ml, 摇匀, 用 0.45 $\mu$ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液作供试品溶液。

### 1.3.4 阴性对照试验

取缺马钱子的阴性样品按供试品溶液的制备方法配制, 得阴性对照溶液。精密吸取阴性对照溶液 10 $\mu$ l 进样检测。结果在土的宁色谱峰处无干扰峰出现, 说明被测成分无干扰, 土的宁含量测定方法可行 (见图 3)。

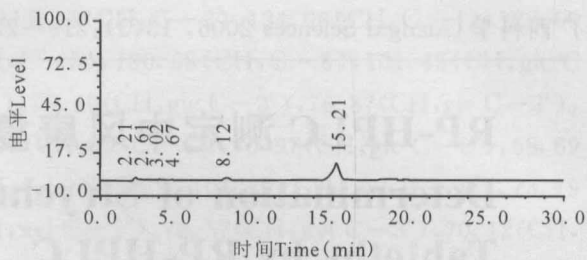


图 3 阴性样品 RP-HPLC 色谱

Fig.3 RP-HPLC chromatogram map of non-Strychnos control test sample

## 1.4 方法学考察

### 1.4.1 标准曲线试验

分别精密吸取土的宁对照品 ( $C = 36\mu\text{g/ml}$ ) 2 $\mu$ l, 6 $\mu$ l, 10 $\mu$ l, 14 $\mu$ l, 18 $\mu$ l 注入色谱仪中, 测定, 记录土的宁峰面积值。以对照品进样量 ( $X$ ) 为横坐标, 峰面积值 ( $Y$ ) 为纵坐标绘制标准曲线, 计算得土的宁回归方程为  $Y = 2.50 \times 10^6 X - 2.044$ ,  $r = 0.9999$ , 土的宁在 0.072~0.648 $\mu$ g 的范围内线性关系良好 (详见表 1 和图 4)。

表 1 标准曲线测定数据

Table 1 Data of standard curve

序号 No.	进样量 Sample ( $\mu\text{g}$ ) (X)	峰面积值 Peak area (Y)
1	0.072	177128
2	0.216	538665
3	0.360	895642
4	0.504	1269899
5	0.648	1613556

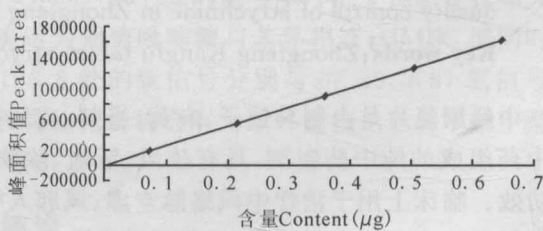


图 4 标准曲线

Fig.4 The Standard curve of the control sample of Strychnine

### 1.4.2 精密度试验

取同一供试品溶液 (批号为 051011, 按供试品溶液的制备方法制备) 10 $\mu$ l, 连续进样 5 次, 依上述方法测定。5 次测定土的宁含量依次为 0.4503%, 0.4535%, 0.4515%, 0.4522%, 0.4532%,  $RSD$  为 0.29% ( $n = 5$ )。说明进样精密度良好, 符合 HPLC 定量分析的要求。

### 1.4.3 样品重现性试验

取同一样品 (批号: 051011) 5 份, 按供试品制备方法分别制成供试品溶液, 依法测定 5 次。5 次测定

士的宁含量依次为 0.4481%, 0.4532%, 0.4325%, 0.4528%, 0.4517%, *RSD* 为 1.95% ( $n=5$ )。本法重现性好,符合 HPLC 定量分析的要求。

#### 1.4.4 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号为 051011,按供试品溶液的制备方法制备),在 0、2h、4h、6h、8h 分别依法进样测定 1 次。结果士的宁含量依次为 0.4493%, 0.4508%, 0.4515%, 0.4489%, 0.4392%; *RSD* 为 1.88% ( $n=5$ )。说明供试品溶液在 8h 内稳定,可以满足 HPLC 的分析要求。

表 2 回收率试验数据

Table 2 Recovery of sample

编号 No.	样品重量 Sample Quantity(g)	供试品中的含量 Original Quantity(mg)	加入对照品量 Added Quantity(mg)	测得量 Observation (mg)	回收率 Recovery(%)	平均回收率 Average Recovery(%)	<i>RSD</i> (%)
1	0.2503	1.1339	1.3	2.3823	96.03		
2	0.2501	1.1330	1.3	2.3806	95.97		
3	0.2501	1.1330	1.3	2.3846	96.28	95.51	0.7
4	0.2500	1.1325	1.3	2.3643	94.75		
5	0.2505	1.1348	1.3	2.3712	95.11		
6	0.2501	1.1330	1.3	2.3667	94.90		

#### 1.4.6 样品测定

取 3 个批号的中风康复片,依法制备供试品溶液,分别精密吸取对照品溶液 ( $C=36\mu\text{g/ml}$ ) 与供试品溶液各 10 $\mu\text{l}$  注入色谱仪,各进样 2 次,依法测定,按峰面积值用外标法计算的含量见表 3。

表 3 3 个批号中风康复片中士的宁的含量测定数据 ( $n=2$ )

Table 3 The content of the Strychnine of three batches sample ( $n=2$ )

样品批号 Batche sample	士的宁含量 Content(mg/piece)			<i>RSD</i> (%)
	1	2	平均值 Average	
051011	1.3031	1.3109	1.3070	0.4
051030	1.3657	1.3584	1.3621	0.4
051123	1.2693	1.2618	1.2656	0.6

## 2 结果

本品每片含士的宁( $C_{21}H_{22}O_2N_2$ )的量为 1.27 ~ 1.36mg。考虑到药材来源有季节和产地不同的差异,所以暂定本品每片含马钱子以士的宁( $C_{21}H_{22}O_2N_2$ )计,每片含士的宁为 1.1~1.5mg。用本法测定中风康复片中士的宁含量具有灵敏、准确、专属性强,重现性好等特点。

## 3 结束语

本品中的马钱子有较强的毒性,尤其以其中的士的宁毒性最强,成人每次服用士的宁 5~10mg 可致

#### 1.4.5 回收率试验

取中风康复片(批号为 051011,已知含士的宁 0.4532%),除去包衣,研细,取 0.25g(共 6 份),精密称定,分别精密加入 1.3.2 项下的士的宁对照品储液 I ( $C=1.0\text{mg/ml}$ )1.3ml,按供试品的制备方法制成供回收率试验用的供试品溶液,依法进行测定,记录士的宁峰面积值,计算含量和加样回收率。回收率在 94.75%~96.28%之间, *RSD* < 1.5% ( $n=6$ ),加样回收率良好,可满足测定要求(详见表 2)。

中毒,30mg 可致死亡<sup>[3]</sup>,因此必须要严格控制临床用量。本品的服用量暂定为每日 1 次,每次 2 片,仍属于安全范围之内。

士的宁易溶于氯仿,可溶于甲醇、乙醇,士的宁的硫酸盐易溶于水<sup>[4]</sup>。我们曾直接用氯仿和甲醇-氨分别处理样品,但制得的供试品溶液极性低的杂质较多,干扰分析,改用硫酸溶液酸化,将所需成分转化成易溶于水的硫酸盐,然后再用氯仿洗去极性低的杂质,弃去氯仿层,酸水层用碱液碱化,使生物碱游离出来,最后用氯仿萃取出士的宁。经过这些处理后,士的宁损失不大,供试品溶液中杂质减少很多,达到了分析的要求,能较真实反映目标成分的含量,同时还能有效保护色谱柱。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2005 版第 1 部 [M]. 北京:化学工业出版社,2005:34.
- [2] 宋金春,扬芑,张立. 复方马钱子片中士的宁和马钱子含量的测定[J]. 医药导报,2002,21(2):110.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草:第 6 册第 17 卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1995:6224.
- [4] 杨云,张晶,陈玉婷. 天然药物化学成分提取分离手册 [M]. 北京:中国中医药出版社,2003:97.

(责任编辑:邓大玉)