

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.04.017

高效液相色谱法测定万应跌打酒中土的宁含量

陈继英, 蓬展鹏, 吴 谋, 莫楚铭

(广东省东莞市中医院, 广东 东莞 523000)

摘要:目的 建立测定万应跌打酒中土的宁含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.01 mol/L 庚烷磺酸钠与 0.02 mol/L 磷酸二氢钾等量混合溶液(用 10% 磷酸调 pH 至 2.8)-乙腈(79:21, V/V), 检测波长为 260 nm; 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 25 ℃, 进样量为 10 μL。结果 土的宁质量浓度在 13.92~114.02 μg/mL($r=0.9997$, $n=5$)范围内与峰面积线性关系良好; 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2%; 平均加样回收率为 91.48%, RSD 为 1.88% ($n=6$); 样品中土的宁的最高限度应为每 1 mL 不得超过 100 μg。结论 该方法简便, 专属性强, 重复性好, 可用于测定万应跌打酒中土的宁的含量。

关键词: 万应跌打酒; 马钱子碱; 土的宁; 马钱子总生物碱; 含量

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)04-0063-03

Content Determination of Strychnine in Wanying Dieda Wine by HPLC

CHEN Jiyong, PENG Zhanpeng, WU Mou, MO Chuming

(Dongguan Traditional Chinese Medicine Hospital, Dongguan, Guangdong, China 523000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography(HPLC) method for the content determination of strychnine in Wanying Dieda Wine. **Methods** The Agilent TC-C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted, the mobile phase was 0.01 mol/L sodium heptane sulfonate mixed with 0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate in equal volume(adjusted pH to 2.8 with 10% phosphoric acid)-acetonitrile(79:21, V/V), the detection wavelength was 260 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 25 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** Strychnine had good linearity in the range of 13.92~114.02 μg/mL($r=0.9997$, $n=5$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2%, the average recovery rate was 91.48% with RSD of 1.88% ($n=6$). The maximum limit of strychnine in Wanying Dieda Wine should not exceed 100 μg/mL. **Conclusion** The method is simple, specific and reproducible, which can be used for the content determination of strychnine in Wanying Dieda Wine.

Key words: Wanying Dieda Wine; brucine; strychnine; total alkaloids of *Strychnos nux-vomica*; content

万应跌打酒由醋乳香、醋没药、当归尾、制马钱子、骨碎补、梔子等 22 味中药经现代工艺提取制成, 用于治疗跌打损伤、气滞血瘀痹症, 疗效确切。该酒剂 2017 年再注册批件中的审评意见为“申报单位应继续对土的宁的限度检查方法进行研究, 并列入标准”。但目前土的宁含量测定中的对照品为土的宁^[1], 中国食品药品检定研究院网站中国家药品标准物质特殊标准物质显示, 乌头碱、土的宁、马钱子碱均属剧毒类危险化学品, 应暂时停止供应。为保证用药安全, 本研究中以马钱子总生物碱对照品为对照, 参照《中国药典》标准, 采用高效液相色谱(HPLC)法对万应跌打酒处方中有毒药味制马钱子进行土的宁的限量检测, 并拟订样品中土的宁毒性限度的检查范围。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 Infinity 型高效液相色谱仪, 包括紫外检测器(美国安捷伦科技公司); AUW120D 型电子分析天平(日本岛津公司, 精度为十万分之一); PL-S30T 型

超声波清洗仪(东莞康士洁超声波科技有限公司)。

1.2 试剂

万应跌打酒(东莞市中医院制剂室, 批号分别为 20190102, 20190408, 20190601); 马钱子总生物碱对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 112030-201601, 含马钱子碱 45.40%、土的宁 49.90%); 乙腈、磷酸二氢钾、庚烷磺酸钠、磷酸(色谱纯, 德国 Merck 公司); 三氯甲烷(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

参照 2015 年版《中国药典(一部)》“马钱子含量测定”项, 马钱子碱、土的宁的检测波长为 260 nm^[1]; 马钱子碱、土的宁的流动相为乙腈-0.01 mol/L 庚烷磺酸钠与 0.02 mol/L 磷酸二氢钾等量混合溶液(用 10% 磷酸调 pH 至 2.8)(21:79, V/V)^[2-5]; 理论板数按土的宁峰计应不低于 5 000; 预试验中色谱柱 Agilent SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)分离度尚可, 但理论板数

不足 5000,后更换为 Agilent TC-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),符合要求;流速为 1.0 mL/min;柱温为 250 ℃;进样量为 10 μL。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:取马钱子总生物碱对照品 3.0 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,加三氯甲烷溶解,并用甲醇定容,摇匀,即得每 1 mL 含马钱子碱 0.136 2 mg、土的宁 0.149 7 mg 的混合对照品溶液。

供试品溶液:取样品 10 mL,置具塞锥形瓶中,加入 0.5% 盐酸溶液 10 mL,混匀,超声(功率 250 W,频率 40 kHz)处理 30 min,移至分液漏斗中,锥形瓶用 0.5% 盐酸溶液 10 mL 反复洗涤,合并洗液,加浓氨试液调 pH 至 9~10,用三氯甲烷振摇提取 3 次,每次 20 mL;合并三氯甲烷提取液,蒸干,残渣加甲醇 10 mL 溶解,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液:取不含制马钱子的样品 10 mL,按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

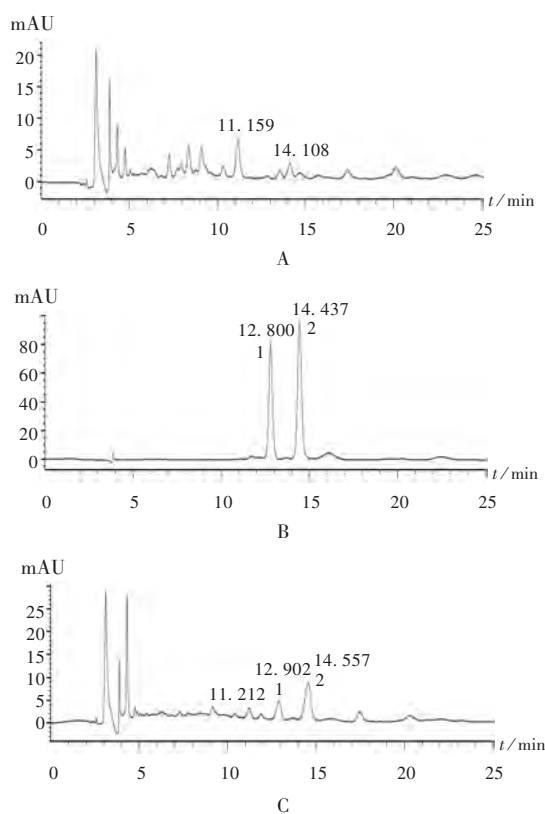
2.3 方法学考察^[6-9]

专属性考察:按 2.1 项下色谱条件,取阴性对照品溶液、混合对照品溶液、供试品溶液各适量,进样测定,色谱图见图 1。结果阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。

线性关系考察:取马钱子总生物碱对照品 3.0 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,加三氯甲烷适量溶解,并用甲醇定容,摇匀,即得每 1 mL 含马钱子碱 0.101 3 mg、土的宁 0.114 0 mg 的溶液,依次稀释,得马钱子碱质量浓度为 81.04, 60.78, 50.67, 25.33, 12.66 μg/mL 和土的宁质量浓度为 91.21, 68.41, 55.70, 27.85, 13.92 μg/mL 的系列混合对照品溶液,精密量取上述系列混合对照品溶液各 10 μL,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以峰面积为纵坐标(Y)、土的宁质量浓度为横坐标(X)进行线性回归,得回归方程 $Y = 19.394X + 2.9418$ ($r = 0.9997$, $n = 5$)。结果表明,土的宁质量浓度在 13.92~114.02 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取 2.2 项下混合对照品溶液适量,按 2.1 项下色谱条件进样测定 6 次,记录峰面积。结果的 RSD 为 0.17% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为 20190102)适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液 6 份,再按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算土的宁含量。结果的 RSD 为 1.58% ($n = 6$),表明方法重复性良好。



1. 马钱子碱 2. 土的宁
A. 阴性对照品溶液 B. 混合对照品溶液 C. 供试品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. brucine 2. strychnine

A. Negative reference solution B. Mixed reference solution
C. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

稳定性试验:取 2.2 项下供试品溶液(批号为 20190102)适量,分别于室温下放置 0, 2, 4, 8, 12, 16, 22, 24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 为 1.20% ($n = 8$),表明室温下供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

加样回收试验:取样品(批号为 20190102,土的宁含量为 32.55 μg/mL)6 份,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入马钱子总生物碱对照品溶液(每 1 mL 含马钱子碱 0.202 7 mg/mL、土的宁 0.222 8 mg/mL) 1 mL,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表 1。

耐用性试验^[10]:取样品(批号为 20190102)适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,并按 2.1 项下色谱条件分别设置色谱柱,包括卡赛帕克 MGII 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);迪马 Diamonsil 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);Waters RP18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。结果的 RSD 为 0.90%,显示色谱柱发生一定程度变化时,本方法能满足试验要求,耐用性良好。

表1 士的宁加样回收试验测定结果($n=6$)
Tab. 1 Results of recovery tests of strychnine($n=6$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.325 5	0.202 7	0.516 9	94.43	91.48	1.88
0.325 5	0.202 7	0.508 2	90.13		
0.325 5	0.202 7	0.510 3	91.17		
0.325 5	0.202 7	0.512 2	92.11		
0.325 5	0.202 7	0.510 9	91.47		
0.325 5	0.202 7	0.507 0	89.54		

2.4 样品含量测定

取3批样品(批号分别为20190102, 20190408, 20190601)各适量,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,并平行测定3次,记录峰面积,并计算样品含量。结果3批样品中士的宁含量分别为31.8, 32.1, 33.0 $\mu\text{g/mL}$, 平均32.3 $\mu\text{g/mL}$, RSD分别为1.30%, 1.50%, 2.20%。

2.5 样品中士的宁毒性限度检查范围确定

依据2015年版《中国药典(一部)》马钱子粉项下规定,士的宁含量限度不得过0.82%,其“用法用量”项下规定,马钱子的服用量为0.6 g,折算后士的宁每天服用量约为4.92 mg,为每天最大安全服用量^[11-12]。用马钱子粉中士的宁的每天最大安全服用量除以万应跌打酒的平均含量,得出万应跌打酒每天最大使用量不能超过152 mL。

根据样品的用法用量,每天使用3次,每次常用量为10 mL,每天的常规使用量为30 mL。按马钱子粉的理论安全服用量的最大值计算,万应跌打酒每1 mL含士的宁应不得超过164 μg 。为保证临床用药安全,减少不良反应,按2015年版《中国药典(一部)》马钱子粉项下士的宁含量限度计算,并结合实际的试验结果,初步拟订万应跌打酒士的宁最高限度范围为每1 mL含士的宁不得超过100 μg 。

3 讨论

中医把凡因外力作用于人体而引起的筋骨伤损、瘀血肿痛、气血不和、经络不通以至脏器受损等统称为跌打损伤^[13]。万应跌打酒用于治疗跌打损伤(现代医学又称急性软组织损伤)。处方中的制马钱子味辛、性温,可散寒温通经络,消肿散结止痛;主要有效成分为生物碱,生物碱中含量较高的为士的宁和马钱子碱,既是有效成分又是有毒成分,故需对含制马钱子制剂的毒性成分进行限度检查,以确保临床用药的安全性。制马钱子的毒性反应主要由超安全剂量口服引起,口服马钱子碱中毒

剂量为15~100 mg(平均50 mg)。马钱子中毒剂量与治疗剂量非常接近,须合理应用,以避免中毒反应及确保疗效^[14],尤其是应规范此类含有大毒药味的中药制剂的临床用药^[15]。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 50-51.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 59-61.
- [3] 韦立志, 李发娟, 巫丽丽. UPLC-MS/MS快速测定4种抗风湿类中成药中马钱子碱与士的宁的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(2): 178-183.
- [4] 刘满军, 崔小敏, 石会丽, 等. 马海治瘫胶囊的HPLC指纹图谱及其5个成分含量测定研究[J]. 中国药房, 2019, 30(21): 2980-2986.
- [5] 霍彬科, 彭蕊, 朱利利, 等. HPLC法测定强筋健骨丸中马钱子碱和士的宁的含量[J]. 西北药学杂志, 2019, 34(2): 186-188.
- [6] 李阿荣, 刘若轩, 邓志军, 等. 人尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶参与马钱子碱和士的宁体外代谢研究[J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(6): 780-784.
- [7] 金芝兰, 潘金火, 周娟娟. HPLC法测定不同产地制马钱子中士的宁和马钱子碱的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2010, 24(1): 57-59.
- [8] 刘春河, 张国跃. 安痛舒贴质量标准研究[J]. 中国药业, 2017, 26(18): 17-21.
- [9] 任桦, 赵建平, 赵怡蕊, 等. Box-Behnken响应面法优化马钱子提取工艺[J]. 中国药物与临床, 2018, 18(8): 1395-1397.
- [10] 沈亚芬, 孙彩华. 反相高效液相色谱法测定马钱子不同炮制品中士的宁含量[J]. 中国药业, 2009, 18(10): 29-30.
- [11] 广东省食品药品监督管理局. 广东省医疗机构制剂规范(第二册)[M]. 广州: 广东科技出版社, 2015: 202-204.
- [12] 冯小映, 林静吟, 李丽月. 续骨油的质量标准研究[J]. 新中医, 2016, 48(12): 207-210.
- [13] 钟海森, 夏中尚, 赵芳慧, 等. 《中国药典》治疗跌打损伤中药及中成药组方规律分析[J]. 中国民族民间医药, 2019, 28(13): 5-12.
- [14] 马密霞, 胡文祥, 刘接卿, 等. 马钱子属植物的药理毒理作用及临床应用进展[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(12): 1725-1728.
- [15] 中国中医药信息学会外治分会. 大毒中药临床外用技术规范(草案)[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(24): 3112-3115.

(收稿日期: 2020-05-19; 修回日期: 2020-07-23)