

痹痛宁胶囊中土的宁的快速提取与高效液相色谱法定量检测*

徐 伟

(贵阳医学院 公共卫生学院, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 建立痹痛宁胶囊中土的宁的快速提取与高效液相色谱法定量检测的方法。方法: 样品用甲醇-水-浓盐酸(50:50:1)溶液超声提取30 min, 提取液稀释处理后, 应用高效液相色谱法, 采用Eclipse XDB C₁₈柱(150 mm×4.6 mm×5 μm), 柱温25℃, 0.01 mol/L庚烷磺酸钠与0.02 mol/L磷酸二氢钾等量混合, 用10%磷酸调节pH 2.8后, 与乙腈按79:21比例混合作为流动相, 流速1.0 mL/min, 在260 nm波长下进行测定。结果: 土的宁峰与相邻峰完全分离, 进样量在0.02~1.00 μg与峰面积呈良好的线性关系($r=1.000\ 0$), 方法检测限为0.002 μg, 平均回收率为 $(101.8\pm2.9)\%$ ($n=9$), 相对标准偏差RSD小于3%。结论: 高效液相色谱法定量检测痹痛宁胶囊中土的宁含量具有快速、准确、灵敏度高、操作简便等优点。

[关键词] 土的宁; 痹痛宁胶囊; 色谱法, 高压液相

[中图分类号] R286 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)02-0142-04

Rapid Extraction of Strychnine from Bitongning Capsule and Quantitative Detection by HPLC

XU Wei

(School of Public Health, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method to rapidly extract strychnine from Bitongning capsule and using high performance liquid chromatography (HPLC) for quantitative detection. **Methods:** The extraction sample was ultrasonically extracted for 30 min by methanol-H₂O-HCL(50:50:1), the diluted extracting solution was determined by HPLC, Eclipse XDB C₁₈ column(150 mm × 4.6 mm × 5 μm) was used, the column temperature was 25℃, with mobile phase a mixed solution of equal amount of acetonitrile -0.01 mol/L sodium heptanesulfonate and 0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate (pH was adjusted to 2.8 by 10% phosphoric acid) (21:79), the flow rate was 1.0 mL/min and detected under the wave length of 260 nm. **Results:** The strychnine peak and the adjacent peak were separated fully, the injection volume was in the range of 0.02~1.00 μg, shared good linear relationship with the peak area, $r=1.000\ 0$, the method detection limit was 0.002 μg, the average recovery rate was $(101.8\pm2.9)\%$ ($n=9$), the RSD was less than 3%. **Conclusions:** This method was rapid, accurate, sensitive and simple.

[Key words] strychnine; bitongning capsule; chromatography, high pressure liquid

痹痛宁胶囊方中马钱子毒性较大, 马钱子中所含土的宁既是有效成分, 也是有毒成分, 为保证痹痛宁胶囊用药的安全性和有效性, 应对药物中土的宁含量进行准确测定与控制。目前土的宁的检测

方法主要有高效毛细管电泳法、分光光度法、薄层扫描法、气相色谱/质谱法和高效液相色谱法^[1-11]等。薄层扫描法测定土的宁含量^[4], 操作繁琐, 引入误差的几率较大。中成药制剂中土的宁的提取

*[基金项目] 贵阳医学院科研基金(K2009-31)

网络出版时间:2015-02-12 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150212.1619.007.html>

方法主要分为碱性提取和酸性提取两大类,但碱性提取操作较为繁琐且提取剂毒性较大^[12-13]。本文采用酸性甲醇水溶液超声提取方法,应用高效液相色谱分析技术检测痹痛宁胶囊中土的宁含量,为完善痹痛宁胶囊的质量标准提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪,紫外检测器(Agilent 公司);SB-800DTS 台式数控超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司),Mettler Toledo AB265-S 型电子天平(Mettler Toledo 公司),TGL-16C 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂),Millipore 超纯水机。

1.2 药物与试剂

痹痛宁胶囊(贵州恒霸药业有限责任公司,0.2 g/粒),阴性对照样品(贵州恒霸药业有限责任公司,20130507),土的宁对照品(以 97% 计,中国药品生物制品检定所,批号 110705-200306);乙腈、甲醇为色谱纯,实验用水为 Milli-Q 超纯水($>18\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$),其他试剂为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱为 Eclipse XDB C₁₈(150 mm \times 4.6 mm \times 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,用 10% 磷酸调节 pH 2.8 后,与乙腈以 79:21 的比例混合,流速 1.0 mL/min,检测波长 260 nm,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,进样量 10 μL ;理论塔板数按土的宁峰计算应不低于 5 000。

1.3.2 对照品溶液的制备 精密称取土的宁对照品 5.16 mg(含土的宁 5.01 mg)置 50 mL 容量瓶中,加甲醇溶液溶解并稀释至刻度,精密量取 1 mL 置 10 mL 容量瓶中,加甲醇溶液稀释至刻度,摇匀(每 1 mL 含土的宁 0.01 mg)。

1.3.3 供试品溶液的制备 取痹痛宁胶囊 4 粒内容物研磨混匀,取约 0.2 g,置具塞塑料离心管中,精密加入甲醇-水-浓盐酸(50:50:1)溶液 10 mL,密塞,超声提取 30 min(功率 800 W,频率 40 kHz),每 10 min 振摇混匀 1 次,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液 1 mL 置 10 mL 容量瓶中,加甲醇-水-浓盐酸(50:50:1)溶液至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过。

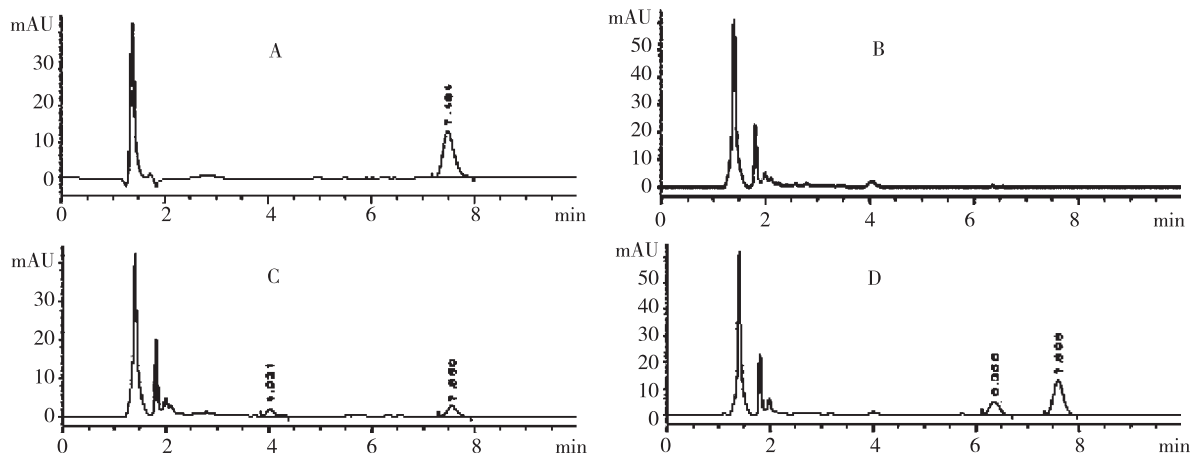
1.3.4 阴性对照品溶液的制备 按处方工艺制成缺马钱子粉的阴性对照样品,取约 0.2 g 阴性对照样品,按 1.3.3 项下方法制备阴性对照品溶液。

1.3.5 阴性对照品加标溶液的制备 按处方工艺制成缺马钱子粉的阴性对照样品,取约 0.2 g 阴性对照样品,加入 0.2 mg 土的宁,按 1.3.3 项下方法制备阴性对照品加标溶液。

2 结果

2.1 专属性试验

按 1.3.1 色谱条件,分别取土的宁对照品溶液、阴性对照品溶液、阴性对照品加标溶液和供试品溶液 10 μL 进样,土的宁在 7.5 min 处出峰,阴性对照品溶液在相应时间及附近则无峰出现;土的宁峰与相邻峰分离良好,分离度均 >1.5 ;理论塔板数按土的宁峰计算均 $>5\,000$;表明本研究所使用的检测方法具有较强专属性。见图 1。



注:A. 土的宁对照品,B. 阴性对照,C. 阴性对照加标,D. 供试品

图 1 专属性试验色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of the specificity test

2.2 线性关系与方法检测限试验

配制浓度为 2、4、8、10、20 和 100 mg/L 的标准系列,分别取 10 μL 进样,按 1.3.1 色谱条件测定峰面积,以浓度为横坐标,相应峰面积为纵坐标,进行线性回归;另取阴性对照品加标溶液,逐级稀释,根据 3 倍信噪比原则,10 μL 进样测定士的宁的方法检测限。结果表明,士的宁的进样质量在 0.02 ~ 1.00 μg 范围成良好的线性关系, $y = 20.783x - 5.3020$, r 为 1.000 0;士的宁的方法检测限为 0.002 μg,见图 2。

2.3 精密度试验

2.3.1 仪器精密度 分别取 5 μg/mL、10 μg/mL 和 20 μg/mL 士的宁对照品溶液 10 μL 进样,按 1.3.1 色谱条件连续测定 6 次,分别计算各浓度峰

面积的相对标准偏差(RSD)。结果表明,检测结果精密度较好,峰面积的 RSD 均 < 0.5%,结果见表 1。

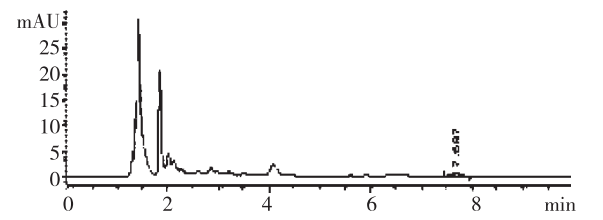


图 2 士的宁方法检测限色谱
Fig. 2 HPLC Chromatogram of detection limit of the method examining strychnine

表 1 对照品溶液精密度试验
Tab. 1 The precision test of the reference solution

士的宁对照品 浓度(mg/L)	峰面积						平均值	RSD(%)
	1	2	3	4	5	6		
5	98.1	98.8	98.6	99.6	98.0	97.6	98.4 ± 0.7	0.3
10	199.4	198.5	198.8	198.4	199.0	199.1	198.9 ± 0.4	0.2
20	407.0	406.8	406.6	405.6	405.3	405.4	406.1 ± 0.8	0.2

2.3.2 方法重复性 取批号为 20120501 样品,按 1.3.3 供试品溶液的制备方法制成 6 份供试品溶液,分别按 1.3.1 色谱条件取 10 μL 进样测定,计算士的宁含量及其 RSD。结果表明,痹痛宁胶囊中士的宁的检测结果重复性较好,RSD < 3%。见表 2。

表 2 士的宁测定方法的重复性试验
Tab. 2 The repeatability test of method for determining strychnine

样品批号	编号	称样量 (g)	峰面积	士的宁 (mg/g)	均值 (mg/g)	RSD%
20120501	1	0.216 4	176.3	4.09	4.08 ± 0.05	1.2
	2	0.203 5	161.8	3.99		
	3	0.221 2	180.8	4.10		
	4	0.212 3	173.3	4.09		
	5	0.219 5	180.1	4.11		
	6	0.210 8	172.7	4.11		

2.4 准确度试验

精密称取 9 份已知士的宁含量的批号为 20120501 样品各 0.2 g,均分为 3 组,各组分别加入 2、3、4 mL 士的宁对照品溶液(0.100 g/L),按 1.3.3 供试品溶液的制备方法制成供试品溶液,分

别按 1.3.1 色谱条件 10 μL 进样测定,计算回收率及其 RSD。结果表明,痹痛宁胶囊中士的宁的检测结果准确度较高,平均回收率为 (101.8 ± 2.9)%,RSD < 3%。见表 3。

2.5 稳定性试验

2.5.1 对照品溶液稳定性试验 取 10 mg/L 对照品溶液,考察室温存放条件下 10 d 内对照品溶液的稳定性。结果表明,对照品溶液室温存放 10 d,稳定性良好。见表 4。

2.5.2 供试品溶液稳定性试验 取批号为 20120501 的样品,按 1.3.3 供试品溶液制备方法制成 1 份供试品溶液,称样量为 0.221 5 g,考察室温存放条件下 7 d 内供试品溶液的稳定性。结果表明,供试品溶液室温存放 7 d,稳定性良好。见表 5。

2.6 样品中士的宁含量测定

取 3 批痹痛宁胶囊,分别按 1.3.3 供试品溶液制备方法各制成 3 份供试品溶液,与 0.010 g/L 对照品溶液分别按 1.3.1 色谱条件 10 μL 进样测定,计算样品中士的宁含量及其 RSD。结果显示,3 批痹痛宁胶囊中士的宁含量均在 0.78 ~ 0.82 mg/粒范围,符合现行标准规定限值^[4]。见表 6。

表 3 痹痛宁胶囊中土的宁测定方法的回收率
Tab. 3 The recoveries of strychnine in Bitongning capsule

样品批号	编号	称样量 (g)	本底含量 (mg)	加标量 (mg)	测得含量 (mg)	回收率 (%)	均值 (%)	RSD(%)
20120501	1	0.214 4	0.875	0.200	1.084	104.5	101.8 ± 2.9	2.8
	2	0.215 5	0.879	0.200	1.085	103.0		
	3	0.213 5	0.871	0.200	1.078	103.5		
	4	0.223 6	0.912	0.300	1.217	101.7		
	5	0.227 8	0.929	0.300	1.243	104.7		
	6	0.223 1	0.910	0.300	1.214	101.3		
	7	0.200 9	0.820	0.400	1.204	96.0		
	8	0.222 1	0.906	0.400	1.319	103.2		
	9	0.223 6	0.912	0.400	1.305	98.2		

表 4 对照品溶液稳定性试验
Tab. 4 The stability test of the reference solution

室温存放时间(d)	峰面积	平均值	RSD(%)
0	202.9	202.0 ± 2.8	1.4
3	199.4		
6	200.1		
9	205.5		

表 5 供试品溶液稳定性试验
Tab. 5 The stability test of the sample solution

室温存放时间(d)	峰面积	平均值	RSD(%)
0	180.6	181.6 ± 1.2	0.7
2	180.4		
4	182.7		
7	182.6		

表 6 痹痛宁胶囊中的土的宁含量测定
Tab. 6 Determination of strychnine contents in Bitongning capsule

批号	编号	称样量(g)	峰面积	含量(mg/g)	均值 (mg/g)	RSD(%)	0.2g/粒计, 含量(mg/粒)
20120501	1	0.232 9	189.7	4.07	4.06 ± 0.02	0.5	0.81
	2	0.228 9	186.2	4.07			
	3	0.221 6	179.2	4.04			
20120601	1	0.218 8	176.3	4.03	4.00 ± 0.03	0.8	0.80
	2	0.226 4	180.3	3.98			
	3	0.204 5	163.5	4.00			
20120701	1	0.221 0	180.1	4.07	4.07 ± 0.01	0.2	0.81
	2	0.222 5	180.6	4.06			
	3	0.210 8	171.5	4.07			

3 讨论

痹痛宁胶囊现行质量标准采用薄层扫描法测定土的宁含量,操作较为繁琐,对结果的准确性影响因素较多。本研究采用高效液相色谱法对痹痛宁胶囊中土的宁含量进行测定,经方法学考察,结果良好。关于土的宁的提取,文献报道以碱化有机溶剂提取方法居多^[2-9],净化效果虽好,但操作较为复杂,容易引入误差。土的宁在药材中常以盐的形式存在,较难溶于中性有机溶剂,在酸性条件下容易提取出来。本研究采用甲醇-水-浓盐酸(50:50:1)超声提取痹痛宁胶囊中的土的宁,经方

法学考察,土的宁的提取较为完全,谱图基线平稳,主峰无基体干扰,出峰时间快,供试品溶液稳定,检测结果的准确度和精密度较高,加标平均回收率为(101.8 ± 2.9)%(n = 9),RSD < 3%,能满足实际检测工作需要。

与近几年来文献报道的中成药制剂中土的宁的检测方法比较^[2-10],本研究所使用的方法简化了样品前处理过程,检测成本低,易于操作,可满足痹痛宁胶囊中土的宁含量快速测定和实际生产中质量控制需要,能为进一步完善痹痛宁胶囊的质量标准提供科学依据。

(下转第 158 页)

5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼组插管时心血管反应无明显变化,但在切皮、拔管中,该组血流动力学稳定性明显优于 3、7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼组。

芬太尼具有清除快,输注半衰期短,长时间应用无蓄积作用的特点,血中芬太尼浓度过低导致的术后疼痛是苏醒期躁动的主要原因^[4-6]。因此本研究中术后出现苏醒延迟、烦躁、再入睡均考虑为芬太尼的作用。芬太尼作用时间约 30 min,注药后 20~90 min 血药浓度可出现第二个较低的峰值,与药物从周边室转移到血浆有关^[7]。本实验中所有手术均在 90 min 内完成。术后疼痛是苏醒期躁动的主要原因^[7]。A 组患儿出现烦躁、不配合的病例数多于 B、C 两组。C 组中有 9 例患儿出现再入睡现象,该现象会增加苏醒期呼吸系统意外的风险。C 组中出现恶心呕吐病例 5 例,可能与大剂量芬太尼的使用有关。另外,C 组中 1 例患儿苏醒时间长达 41 min,原因除了与芬太尼诱导剂量过大有关外,还与患儿本身严重的营养不良有关。由此可见,对于小儿唇腭裂手术患者,麻醉诱导给予 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的芬太尼可以在保证生命指针平稳的前提下减少不良反应的出现,并且苏醒后状态平稳无呼吸抑制,是值得推荐的临床用量,这与 Milic M 等^[8]研究芬太尼的用量相同。但由于各方条件的限制,此次研究的病例数量较少,有待今后加大样本量进一步深入研究。

4 参考文献

- [1] 范有勤,代红梅. 瑞芬尼在小儿唇腭裂修补术中的应用[J]. 中国美容医学, 2010(11):1625-1626.
- [2] 丁耀茂,林红,丁伟. 舒芬太尼、瑞芬太尼、芬太尼对全麻患者气管插管时心血管反应的影响[J]. 现代医院, 2010(10):28-30.
- [3] 刘鲲鹏,薛富善. 小剂量芬太尼、瑞芬太尼和舒芬太尼预防儿童经口气管插管心血管反应的比较[J]. 实用儿科临床杂志, 2007(22):391-394.
- [4] 庄心良,陈伯玺,曾因明. 现代麻醉学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2003:522-523.
- [5] Claeys MA, Gepts E, Camu F. Haemodynamic changes during anaesthesia induced and maintained with propofol[J]. Br J Anaesth, 1988(60):3.
- [6] 高峰,杨辉. 不同药物治疗全麻患者苏醒期躁动的疗效比较[J]. 临床麻醉学杂志, 2011(2):109-111.
- [7] Reves JG. Educational considerations for the clinical introduction and use of remifentanyl[J]. Anesth Analg, 1999(89):7-14.
- [8] Milic M, Goranovic T, Knezevic P. complications of sevoflurane-fentanyl versus midazolam-fentanyl anesthesia in pediatric cleft lip and palate surgery: a randomized comparison study[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2010(39):5-9.

(2014-11-24 收稿, 2014-12-31 修回)

中文编辑: 文箫颖; 英文编辑: 周 凌

(上接第 145 页)

4 参考文献

- [1] 李阳,薛丰,王媛,等. 高效毛细管电泳法同时测定减肥类功能食品中 7 种违禁成分[J]. 分析化学, 2011(11):1716-1720.
- [2] 陆小洁,段玺,宋道. 紫外分光光度法测定平消胶囊中土的宁含量[J]. 陕西中医学院学报, 2009(1):72-73.
- [3] 林昱,李新田,邱财荣,等. 薄层扫描法测定接骨丹胶囊中土的宁[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010(7):53-54.
- [4] YBZ11142005. 国家食品药品监督管理局标准(试行)[S].
- [5] 吕霞,郭青,钟文英. GC-MS 法测定疏风活络丸中伪麻黄碱、麻黄碱、土的宁和马钱子碱的含量[J]. 中国药科大学学报, 2008(6):519-522.
- [6] 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, 2010:48.

- [7] 王蕾. RP-HPLC 测定痹痛宁胶囊中土的宁和马钱子碱的含量[J]. 药学与临床研究, 2012(4):377-378.
- [8] 孙笑曼,高鹏. 高效液相色谱法测定痹痛宁胶囊中土的宁的含量[J]. 时珍国医国药, 2006(3):359-360.
- [9] 王东平. 高效液相色谱法测定风湿痹康胶囊中土的宁含量[J]. 长春中医药大学学报, 2011(5):847-848.
- [10] 刘建,韩凤梅,陈勇. 高效液相色谱法测定痹祺胶囊中马钱子碱、土的宁和丹酚酸 B[J]. 分析化学, 2009(4):609-612.
- [11] GB/T 24800.7-2009. 化妆品中马钱子碱和土的宁的测定-高效液相色谱法[S].
- [12] 魏秀德,杨波,范里,等. 马钱子生物碱提取工艺的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2011(2):195-198.
- [13] 汤淮波,张令君,李湘玲,等. 不同溶剂提取马钱子中土的宁与马钱子碱的实验研究[J]. 中医药导报, 2009(11):52-53.

(2014-10-14 收稿, 2014-12-07 修回)

中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 赵 毅