

SPE-HPLC 测定风湿马钱片中的马钱子碱

王泽童¹, 吴韶梅¹, 张亚莉², 冉云¹, 张珊¹, 哈婧^{1,3}

(1. 河北科技大学化学与制药工程学院, 河北石家庄 050018; 2. 河北科技大学理学院, 河北石家庄 050018; 3. 河北省药物化工工程技术研究中心, 河北石家庄 050018)

摘要:采用固相萃取进行样品前处理, 建立固相萃取-高效液相色谱法(SPE-HPLC)测定风湿马钱片中马钱子碱含量的分析方法。采用PXC阳离子交换固相萃取小柱净化, C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 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(用体积分数为10%的磷酸调节pH值为2.8), 二者体积比为21:79, 流速为1.0 mL/min, 检测波长为262 nm, 柱温为30 ℃。结果发现, 马钱子碱在40~60 μg/mL范围线性关系良好, 相关系数为0.999 3, 平均回收率为99.6%~101.0%, RSD值为1.04%。该方法操作简便、准确, 重现性好, 适用于风湿马钱片中马钱子碱的含量测定。

关键词:化学分析; 风湿马钱片; 固相萃取; 高效液相色谱法; 马钱子碱

中图分类号: TQ46; R283; R284.1 **文献标志码:** A

Determination of brucine in Fengshi Maqian tablet by SPE-HPLC

WANG Zetong¹, WU Shaomei¹, ZHANG Yali², RAN Yun¹, ZHANG Shan¹, HA Jing^{1,3}

(1. School of Chemistry and Pharmaceutical Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China; 2. School of Science, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China; 3. Hebei Research Center of Pharmaceutical and Chemical Engineering, Shijiazhuang, Hebei 050018, China)

Abstract: To establish the SPE-HPLC method for determining content of brucine in Fengshi Maqian tablet, the cation exchange solid phase extraction column is used to purify the samples. By using PXC cation exchange solid phase extraction (SPE), the HPLC column used in the experiment is C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase consists of acetonitrile-0.01 mol/L sodium heptanesulfonate and 0.02 mol/L KH₂PO₄ mixed half and half (adjusting pH to 2.8 with 10% phosphoric acid) (volume ratio of 21:79), the flow rate is 1.0 mL/min, the detection wavelength is 262 nm, and the column temperature is 30 ℃. The content of brucine determined by SPE-HPLC method has good linear relationship with the peak areas when their concentration is at 40~60 μg/mL ($r=0.999\ 3$). The range of recovery rates of Brucine are 99.6%~101.0% (RSD=1.04%). This method is simple and accurate with good reproducibility, and it can be used to determine the content of brucine in Fengshi Maqian tablet.

Keywords: chemical analysis; Fengshi Maqian tablet; SPE; HPLC; brucine

收稿日期:2014-10-10;修回日期:2014-11-29;责任编辑:张士莹

基金项目:国家重大新药创制课题(2014ZX09304-307-02)

作者简介:王泽童(1990—),女,河北石家庄人,硕士研究生,主要从事马钱子碱提取分析方面的研究。

通讯作者:哈婧教授。E-mail: hajing02@163.com

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):176-181.

WANG Zetong, WU Shaomei, ZHANG Yali, et al. Determination of Brucine in Fengshi Maqian tablet by SPE-HPLC[J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2015, 36(2):176-181.

风湿马钱片具有显著的祛风、除湿、镇痛作用,标本兼治,能迅速缓解和改善风湿、类风湿和坐骨神经痛症状^[1]。处方中马钱子粉为主要成分,马钱子中生物碱的种类较多,各类生物碱的理化性质差异较小,分离困难。马钱子的主要成分是马钱子碱和土的宁。《中华人民共和国药典》(2010 年版)采用高效液相色谱法测定土的宁的含量来控制风湿马钱片的含量^[2],并未测定马钱子碱含量。马钱子碱具有通络止痛、散结消肿的功效。近年来的研究表明,马钱子碱还有抗炎、抗心律失常、抗血小板聚集、免疫调节以及抗菌、镇痛、抗肿瘤等作用^[3-10]。建立药物制剂中马钱子碱的测定方法有重要意义,近年来药物制剂中的马钱子碱通常采用高效液相色谱法进行分析检测^[11-14]。

中药样品基体复杂,前处理手段必不可少。固相萃取(solid phase extraction,简称 SPE)是一项结合了选择性保留、选择性洗脱等过程的分离技术,具有分离效率高、处理样品容量大、有机溶剂耗用量小等优点^[15],成为近年来应用较多的中药前处理方法^[16-19]。中药制剂中的马钱子碱具有一定的药理作用,但测定过程中其他成分干扰严重,不能准确对其进行定性定量分析。传统方法采用液液萃取法分离马钱子碱,步骤繁琐且条件不宜控制。本文选用固相萃取法,简单、精确、快速地分离风湿马钱片中的马钱子碱,采用氯仿对风湿马钱片进行回流提取,进而采用固相萃取进行纯化分离,确定了固相萃取条件,去除了干扰,纯化后采用高效液相色谱法测定其中马钱子碱的含量。结果表明,该方法准确、可靠,重现性好,干扰少,为风湿马钱片的含量测定提供了新的控制指标,提高了风湿马钱片的质量控制标准,同时也为其他制剂中马钱子碱的分离、检测提供了新方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-2010 高效液相色谱仪(日本岛津公司提供),LCsolution 工作站(日本岛津公司提供),SYZ550 石英亚沸水蒸馏器(江苏金坛有限公司提供),AL204 电子天平(梅特勒公司提供),KQ-250B 超声波清洗器(江苏昆山仪器公司提供),UV-2600 酸度计(梅特勒公司提供),DZF-6051 真空干燥箱(上海精宏公司提供)。

甲醇,乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司提供);庚烷磺酸钠,磷酸二氢钾(分析纯,天津市永大公司提供);浓磷酸,氨水,氯仿(石家庄试剂厂提供);冰醋酸(天津富宇精细化工公司提供);三乙胺(天津市博迪化工公司提供);石油醚(天津津东天正精细化学公司提供);风湿马钱片(太极集团四川绵阳制药有限公司提供);马钱子碱标准品(Serve 公司提供),马钱子碱分子印迹填料(Serve 公司提供)。

1.2 色谱条件

参考《中华人民共和国药典》中马钱子碱的测定方法^[19],色谱条件如下:色谱柱为 C₁₈ (250 mm×4.6 mm,5 μm);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%(体积分数,下同)的磷酸调节 pH 值为 2.8),二者体积比为 21:79,流速为 1.0 mL/min,检测波长为 262 nm,柱温为 30 °C,进样量为 20 μL。

1.3 标准溶液的配制

精密称取马钱子碱对照品 5 mg,放入 10 mL 量瓶中,加甲醇充分摇匀溶解,制成高浓度的标准品。精密量取 1 mL 高浓度的标准品,定容到 10 mL 量瓶中,得到 1 mL 含马钱子碱 50 μg 的溶液。

1.4 供试品的处理

1.4.1 提取

取风湿马钱片,用 50% 的乙醇除去包衣,研磨成粉。精密称重粉末 3 g,用滤纸包好放入 150 mL 的索氏提取器中。精密量取 70 mL 的石油醚置于圆底烧瓶中,加热回流 3 h,取出粉末真空烘干(30 °C,25 min)。放冷,置于索氏提取器中,精密量取 60 mL 氯仿置圆底烧瓶中,加热回流 3 h,重复 2 次。合并氯仿提取液,旋蒸,用纯甲醇溶解,转移到 100 mL 的容量瓶中,定容到刻度,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取滤液,即得粗提品。

1.4.2 净化

分别精密量取 2 mL 制备好的风湿马钱片供试品溶液,转移到预洗过的 PXC 柱上待净化,分别使用 5 mL 体积分数为 10% 的甲醇淋洗,真空抽干,用 5 mL 含 5% 氨水的 70% 的甲醇洗脱,烘干馏出液,用 2 mL 甲醇溶液定容,进样测定。

1.5 色谱系统适用性试验

按照“1.2”条件下进样检测,马钱子碱的保留时间为 11.329 min,理论塔板数大于 5 000。与土的宁混合进样,分离度为 2.92,分离度良好。马钱子碱标准品及风湿马钱片的高效液相色谱图见图 1。

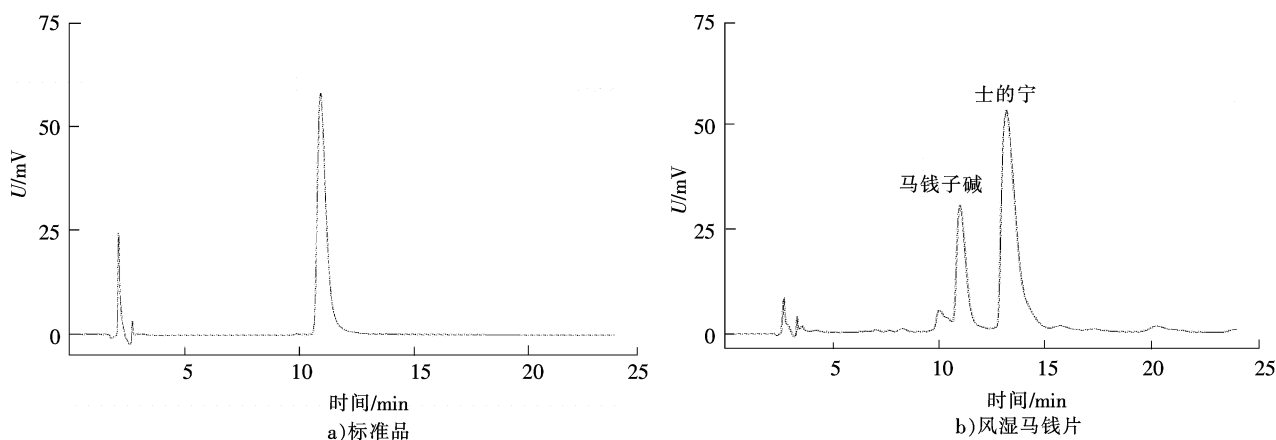


图 1 马钱子碱标准品及风湿马钱片的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC figures of chromatogram brucine standard and Fengshi Maqian tablet

2 实验结果与讨论

2.1 固相萃取条件的筛选

2.1.1 选择合适的 SPE 柱

分别精密量取 1 mL 制备好的风湿马钱片供试品溶液,转移到预洗过的 C_{18} 小柱、炭黑小柱、自制 MIP 分子印迹^[20] 填充小柱、PXC 小柱上待净化,分别使用 5 mL 的水淋洗,真空抽干,用 5 mL 含 5% 氨水的 70% 的甲醇洗脱,烘干流出液,用 2 mL 甲醇溶液定容,进样测定。对比回收率,结果见图 2。

由图 2 可知, C_{18} 小柱和炭黑小柱的回收率很低,由于在上样阶段大部分样品流出,所以舍弃;而 MIP 分子印迹填充小柱和 PXC 小柱的回收率都达到要求。

考察自制分子印迹填充柱与商品固相萃取柱放置一段时间后的萃取回收率,结果见图 3。由图 3 可见,自制的 MIP 分子印迹填料不能长时间放置,回收率波动很大,填料稳定性仍需改善。本实验中选用 PXC 固相萃取小柱。

2.1.2 上样量选择

通常情况下,对于正相、反相小柱,吸附容量不超过填料的 5%,离子交换小柱的吸附容量为 0.5~1.5 meq/g^[21]。本研究选用 PXC 小柱,规格为 60 mg, 3 mL,所以上样量应不超过 90 μ g。

2.1.3 SPE 淋洗液的选择

马钱子碱溶于甲醇、乙醇、二氯甲烷等有机溶剂,但是不溶于水。根据这些化学性质可以先选择水作为淋洗液,洗去多糖类等溶于水的杂质,同时添加一定量的甲醇淋洗其中的有机杂质。

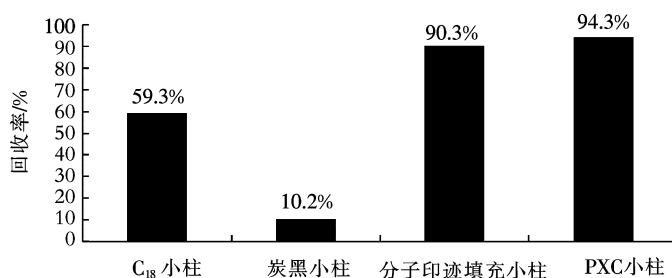


图 2 固相萃取小柱对比图

Fig. 2 Comparison chart of solid phase extraction column

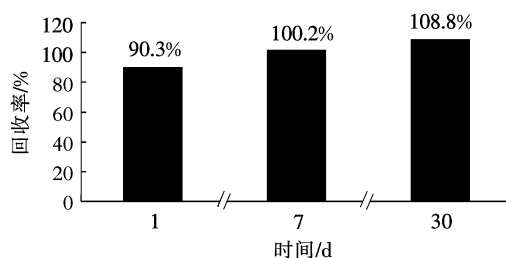


图 3 分子印迹填充小柱的稳定性

Fig. 3 Stability of MIP

精密量取 1 mL 供试品,转移到已活化好的 PXC 柱上,然后分别用 5%~100% 的甲醇水溶液淋洗,分析检测流出液中的马钱子碱。马钱子碱的淋洗曲线见图 4。由图 4 可以看出,甲醇水溶液体积分数为 30% 时,淋洗液会将马钱子碱洗出,而体积分数低于 10% 时,马钱子碱完全没有流出。将淋洗液设定为 10% 的甲醇水溶液,可以最大限度地去除弱于马钱子碱的干扰物。

2.1.4 洗脱液的选择

分别选用纯甲醇、氨水-甲醇(二者体积比为 5:95)、氨水-甲醇-水(三者体积比为 5:70:25)作为洗脱液,检测洗脱流出液中的马钱子碱,比较结果见图 5,回收率分别为 35.98%,65.89%,94.29%。

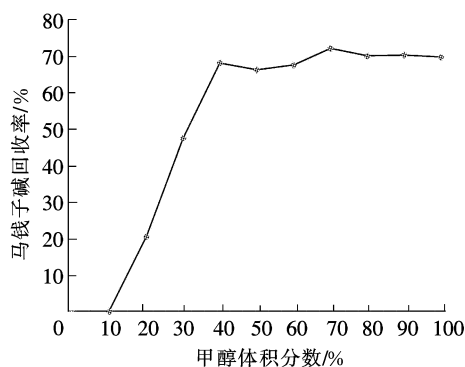


图 4 马钱子碱的淋洗曲线

Fig. 4 Brucine eluent curve

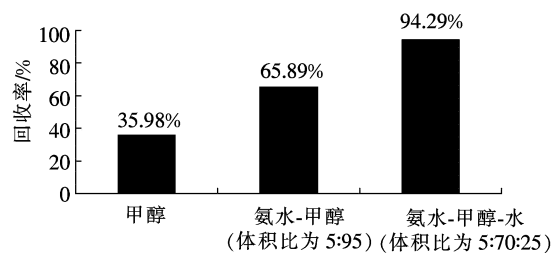


图 5 洗脱液回收率的比较

Fig. 5 Comparison chart of the eluted liquid recovery

生物碱在酸性条件下可溶于水,在碱性条件下溶于有机溶剂,PXC 为阳离子交换固相萃取小柱,马钱子碱显碱性,若用纯甲醇很难完全洗脱,选择 pH 值相对高一些的甲醇溶液进行替换,可将马钱子碱洗脱下来。所以采用氨水-甲醇-水(三者体积比为 5:70:25)洗脱。

2.1.5 固相萃取前后的区别

将供试品按照确定好的固相萃取条件净化后检测,净化前后风湿马钱片的提取图见图 6 和图 7。由图 6、图 7 可知,固相萃取净化前在马钱子碱主峰前有一个杂质峰严重干扰马钱子碱的准确测定,固相萃取后的样品有效消除了杂质干扰,且马钱子碱的回收率为 94%,符合要求。

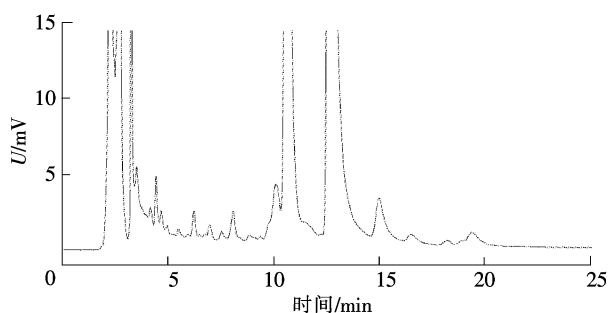


图 6 净化前风湿马钱片提取图

Fig. 6 Chromatogram of Fengshi Maqian tablet extract before purification

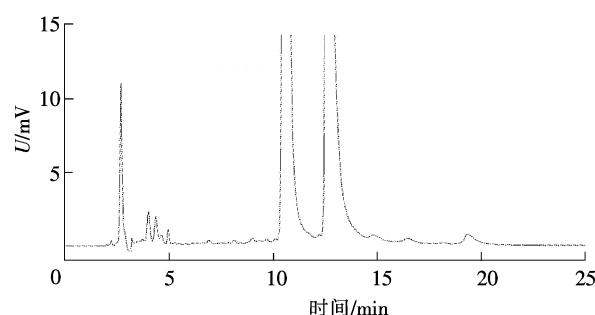


图 7 净化后的风湿马钱片提取图

Fig. 7 Chromatogram of Fengshi Maqian tablet extract after purification

2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系考察

精密称取马钱子碱对照品 5 份,加甲醇稀释配置成质量浓度为 40,45,50,55,60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准品。取 1 mL 转移到预洗过 PXC 柱上待净化,分别使用 3 mL 体积分数为 10% 的甲醇淋洗,真空抽干,用 3 mL 氨水-甲醇-水(三者体积比为 5:70:25)洗脱,烘干流出液,用 1 mL 甲醇溶液定容。分别以 20 μL 进样分析,记录峰面积,以质量浓度(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标,绘制标准曲线。马钱子碱回归方程为 $y=21\ 362x+468\ 018$, $r=0.999\ 3$ 。上述结果表明,马钱子碱在 40~60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。

2.2.2 精密度考察

分别精密吸取马钱子碱对照品溶液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)1 mL,转移到预洗过的PXC柱上待净化,用3 mL体积分数为10%的甲醇淋洗,真空抽干,用3 mL含5%氨水的70%的甲醇洗脱,烘干流出液。用1 mL甲醇溶液定容,进样20 μL ,连续重复进样6次,依次测定,记录色谱图峰面积,测得马钱子碱峰面积平均值为1 540 023,RSD值为1.4%。

2.2.3 重复性实验

取同一批供试品6份,按照“1.4”的提取和净化方法操作。按拟定的含量测定方法测定,记录峰面积,风湿马钱片中马钱子碱的平均峰面积为807 477,RSD值为1.1%。

2.2.4 加样回收率考察

取已知含量的供试品9份,每份含量约为32 μg ,精密加入24,30,36 μg 的对照品,制成供试品溶液,按照上述所确定的固相萃取条件净化,进行液相色谱测定,结果见表1。

表1 风湿马钱片加样回收率测定
Tab.1 Recovery of Fengshi Maqian tablet

本底值/ μg	加标量/ μg	测定值/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD值/%
32	24	56.16	100.5		
32	24	55.55	98.6	99.6	0.82
32	24	55.90	99.7		
32	30	62.70	102.2		
32	30	62.48	101.5	100.9	1.57
32	30	61.74	99.2		
32	36	68.42	101.3		
32	36	68.06	100.2	101.0	0.74
32	36	68.51	101.6		

2.3 样品测定

取3个批号的样品,每个批号的样品取3份,按照“1.4”的提取和净化方法操作,进行含量测定,结果见表2。

表2 风湿马钱片含量测定
Tab.2 Content determination of Fengshi Maqian tablet

批号	$w(\text{风湿马钱片})/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	RSD值/%
1210009	0.533	1.26
1210010	0.556	1.02
1210011	0.561	99.8

3 结 语

中药制剂往往成分复杂,提取纯化难度大,样品前处理方法的选择成为决定测量结果准确性及可操作性的关键。采用固相萃取法对样品进行前处理,要保证尽量在不损失待测组分的前提下去除杂质干扰。通过改变选择萃取柱类型、淋洗和洗脱条件等影响回收率的因素,确定了风湿马钱片中马钱子碱的固相萃取条件,并采用高效液相色谱法检测,方法的线性、精密度和回收率均符合要求,适用于风湿马钱片中马钱子碱的检测。所采用的方法也可作为其他制剂中马钱子碱的净化手段。

参考文献/References:

- [1] 李云霞,刘玺,郭艳玲,等.近红外光谱法测定腰痛宁胶囊中土的宁、马钱子碱和麻黄碱[J].现代药物与临床,2012,27(3):232-235.
LI Yunxia,LIU Xi,GUO Yanling,et al. Determination of strychnine, brucine, and ephedrine in Yaotongning Capsule by near-infrared spectroscopy [J]. Drugs & Clinik,2012,27(3):232-235.
- [2] 牛晓峰,李维凤,歧林,等.用薄层色谱法测定骨康片中土的宁和马钱子碱含量[J].西安医科大学学报,2000,21(5):476-477.
NIU Xiaofeng,LI Weifeng,QI Lin,et al. Simultaneous determination of strychnine and brucine in Gukang tablet by TLC [J]. Journal of Xi'an Medical University,2000,21(5):476-477.
- [3] YANG Xiumin,ZHANG Shuaihua,WANG Juntao,et al. On-line two-step stacking in capillary zone electrophoresis for the preconcentration of strychnine and brucine[J]. Analytica Chimica Acta,2014(3):63-68.

- [4] CORDELL G A, QUINN B M L, FARNSWORTH N R. The potential of alkaloids in drug discovery[J]. *Phyther Res*, 2001, 15(3): 183-205.
- [5] 李明,张弦,潘扬. RP-HPLC 法测定平消片中马钱子碱和土的宁的含量[J]. *中国中医药信息杂志*, 2007(1):47-48.
LI Ming, ZHANG Xian, PAN Yang. Determination the contents of bruchine and strychnine in pingxiao tablet by RP-HPLC [J]. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine*, 2007(1):47-48.
- [6] 孔文,王栋,林燕. 高效液相色谱法测定蒙药顺气安神丸中马钱子碱和土的宁含量[J]. *北方药学*, 2010, 7(6):7-8.
KONG Wen, WANG Dong, LIN Yan. HPLC method for determination of brucine and strychnine in Mongolia Shunqi Anshen pill[J]. *Journal of North Pharmacy*, 2010, 7(6):7-8.
- [7] 吕佳,袁子民,赵琳,等. 高效液相色谱法测定伤科缓释胶囊中土的宁和马钱子碱的含量[J]. *药物分析杂志*, 2011(5):944-946.
LYU Jia, YUAN Zimin, ZHAO Lin, et al. HPLC determination of strychnine and brucine in Shangke sustained release capsule[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2011(5):944-946.
- [8] KENNETH T, JOHANSEN J, SARAH J, et al. Alkaloid analysis by high-performance liquid chromatography-solid phase extraction-nuclear magnetic resonance: New strategies going beyond the standard [J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1270:171-177.
- [9] 冉卫兵. 反向高效液相色谱法测定痹痛消丸中土的宁和马钱子碱的含量[J]. *中国药事*, 2006, 20(3):160-162.
RAN Weibing. Determination of strychnine and brucine in Bitongxiao pills by RP-HPLC [J]. *Chinese Pharmaceutical Affairs*, 2006, 20(3):160-162.
- [10] 金红宇,田金改,张莉,等. 反相 HPLC 法测定马钱子中的土的宁和马钱子碱的含量[J]. *中国药事*, 2005, 19(4):219-221.
JIN Hongyu, TIAN Jingai, ZHANG Li, et al. Determination of strychnine and brucine in semen strychni by RP-HPLC [J]. *Chinese Pharmaceutical Affairs*, 2005, 19(4):219-221.
- [11] 金郁,关多芬. 马钱子碱的高效液相色谱测定[J]. *辽宁师范大学学报(自然科学版)*, 1995, 18(1):57-58.
JIN Yu, GUAN Duofen. HPLC method for determination of brucine[J]. *Journal of Liaoning Normal University(Natural Science Edition)*, 1995, 18(1):57-58.
- [12] 徐涛,张颖,于佳. 高效液相色谱法测定马钱子散中土的宁的含量[J]. *黑龙江医药*, 2012(1):11-12.
XU Tao, ZHANG Ying, YU Jia. HPLC determination of strychnine in nux vomica powder [J]. *Heilongjiang Medicine Journal*, 2012(1):11-12.
- [13] 王丹丹,李俊松,蔡宝昌. HPLC 法同时测定制马钱子中 4 种生物碱类成分的含量[J]. *药学与临床研究*, 2008(6):523-524.
WANG Dandan, LI Junsong, CAI Baochang. Simultaneous determination of four alkaloids in processed semen strychni[J]. *Pharmaceutical and Clinical Research*, 2008(6):523-524.
- [14] 张萃民,杨凯. 固相萃取技术在我国环境化学分析中的应用[J]. *中国环境监测*, 2000, 16(6):53-57.
ZHANG Cuimin, YANG Kai. Application of solid-phase extraction in chinese environment chemical analysis[J]. *Environmental Monitoring of China*, 2000, 16(6):53-57.
- [15] 朱炳辉,梁艺英,方继辉. 消炎利胆片中脱水穿心莲内酯的 SPE-HPLC 法测定[J]. *中成药*, 2006, 28(2):191-194.
ZHU Binghui, LIANG Yiyang, FANG Jihui. SPE-HPLC method for the determination of dehydro andrographolide of Xiaoyanlidan tablets [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2006, 28(2):191-194.
- [16] 李玲,张大伟,王琳琳,等. 全自动在线固相萃取-高效液相色谱快速测定中药复方中小檗碱的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012(18):88-90.
LI Ling, ZHANG Dawei, WANG Linlin, et al. Automated online-SPE-HPLC for rapid determination of the content of berberine in the Chinese traditional medicine compound [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2012(18):88-90.
- [17] 苏友新,郑良朴,章芬,等. HPLC 法测定复方马钱子总碱凝胶液中土的宁和马钱子碱含量[J]. *福建中医药*, 2012(5):51-52.
SU Youxin, ZHENG Liangpu, ZHANG Fen, et al. Determination of compound strychnos alkaloid gel serum HPLC method of strychnine and brucine content[J]. *Fujian Journal of TCM*, 2012(5):51-52.
- [18] 张玉,李金明,刘波,等. 高效液相色谱法测定盐酸咪唑苯胺的含量[J]. *河北工业科技*, 2012, 29(2):69-70.
ZHANG Yu, LI Jinming, LIU Bo, et al. Determination of imidocarb hydrochloride by HPLC[J]. *Hebei Journal of Industrial Science and Technology*, 2012, 29(2):69-70.
- [19] 楼蔓藤,商振华. 固相萃取技术的发展与应用[J]. *分析仪器*, 1998(1):1-6.
LOU Manteng, SHANG Zhenhua. Development and application of solid phase extraction technology[J]. *Analytical Instrumentation*, 1998(1):1-6.
- [20] 刘博,尹航,高文惠. 虚拟模拟分子印迹固相萃取-高效液相色谱法检测果蔬中三唑类杀菌剂[J]. *河北科技大学学报*, 2013, 34(5):417-421.
LIU Bo, YIN Hang, GAO Wenhui. Detection of triazole fungicides in fruit and vegetable by virtual-template molecularly imprinted solid phase extraction-high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Hebei University of Science and Technology*, 2013, 34(5):417-421.
- [21] 林洁,鲁寿芳. 固相萃取 GC/MS 定性定量分析种毒酒中的马钱子碱[J]. *中国卫生检验杂志*, 2003, 13(3):299-300.
LIN Ji, LU Shoufang. The solid phase extraction & GC/MS qualitative and quantitative analysis of brucine in the toxic wine [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2003, 13(3):299-300.