

毛细管区带电泳测定伸筋丹胶囊中土的宁和马钱子碱的含量

浙江省药品检验所(杭州 310004) 姜舜尧 金 瓯 黄宗玉
中国药品生物制品检定所 田颂九

摘要 应用毛细管区带电泳法,对伸筋丹胶囊中的土的宁和马钱子碱成分进行了分离研究。采用 pH=6.0 的 0.2 mol/L tris-磷酸溶液作为缓冲液;运行电压 20 kV;检测波长为 260 nm,被测成分可得到较好分离。用内标法测定其含量,结果表明,在 0.02~0.15 mg/mL 范围内,土的宁和马钱子碱均与内标峰面积之比呈良好线性关系,平均回收率分别为 95.1%(RSD=2.8%)和 96.4%(RSD=3.0%)。

关键词 毛细管区带电泳 伸筋丹胶囊 土的宁 马钱子碱

伸筋丹胶囊由马钱子、地龙等 8 味中药组成,具舒筋通络、活血去瘀、消肿止痛的功效^[1]。其中的马钱子有剧毒,一般要求对马钱子中所含的有效成分土的宁和马钱子碱进行定量控制。报道土的宁和马钱子碱的含量测定方法有比色法、紫外分光光度法、薄层色谱扫描和高效液相色谱法等^[2],药品质量标准则多采用薄层色谱扫描法^[3]。我们运用毛细管区带电泳对伸筋丹胶囊中的土的宁和马钱子碱进行了分离研究,并采用内标法测定了其含量,为测定中药制剂中土的宁和马钱子碱的含量提供了一种新的方法。

1 仪器、试剂和药品

Beckman P/ACE 5500 型高效毛细管电泳仪(配备二极管阵列检测器),System Gold 软件。

对照品土的宁、马钱子碱由中国药品生物制品检定所提供;盐酸伊托必利(itopride hydrochloride);伸筋丹胶囊三批(山东 A 公司生产,批号:980301 980303,浙江 B 厂生产,批号:980426);三羟基甲基氨基甲烷(tris)为优级纯;甲醇、氯仿、氨水、磷酸均为分析醇;水为二次重蒸馏水。

2 实验方法和结果

2.1 测定条件:石英毛细管柱内径 50 μm ,总长度 47 cm,有效长度 40 cm,毛细管柱控温 23 C;波长 260 nm;运行缓冲液为 0.2 mol/L tris 溶液(用磷酸调节 pH 至 6.0);进样方式:压力进样,进样时间 10 s,进样后再用 50%的甲醇溶液进 1 s;运行电压 20 kV(运行电流约 59 μA);柱清洗:每次进样前分别用水、缓冲液各冲洗 3 min。

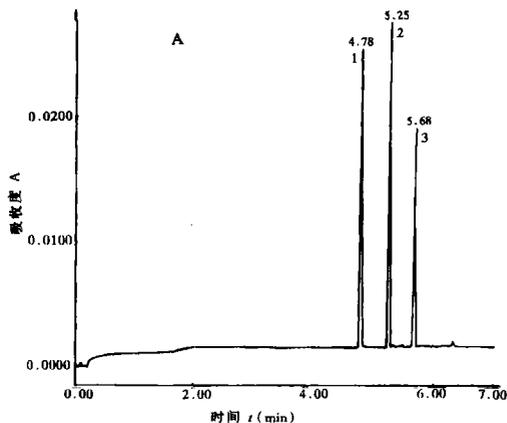
2.2 对照品溶液和内标溶液的配制和测定:精密称取对照品土的宁、马钱子碱适量,加甲醇制成每毫升各含 0.5 mg 的混合对照品溶液;另取内标盐酸伊托必利适量,加水制成每毫升含 0.5 mg 的内标溶液。使用时取混合对照品溶液 1 mL,内标溶液 1 mL,加 0.2 mol/L 磷酸溶液 0.5 mL,甲醇 1.5 mL,加水适量定容至 5 mL,进样测定,分离图谱见图 1。

2.3 供试品溶液的制备和测定:取本品内容物 1 g,精密称定,加浓氨试液 2 mL,氯仿-乙醇(10:1)溶液 40 mL,超声处理 10 min,静置 24 h,滤过,滤液蒸干,残渣用甲醇温热使溶解,定容于 5 mL 量瓶中。取溶液 2 mL,加内标溶液 1 mL,0.2 mol/L 磷酸溶液 0.5 mL,甲醇 0.5 mL,加水适量定容至 5 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,滤液进样测定,分离

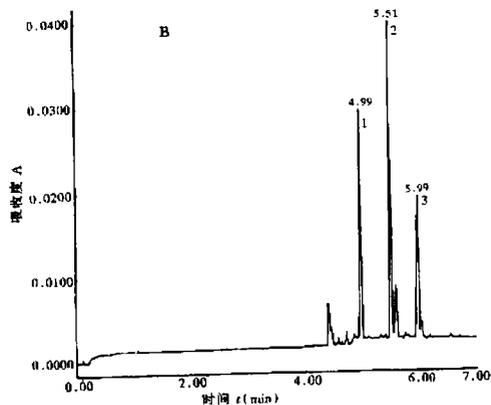
* Address: Jiang Shun Yao, Zhejiang Provincial Institute for Drug Control, Hangzhou

姜舜尧 男,30岁,主管药师,1991年毕业于中国药科大学中药专业,学士学位。在浙江省药品检验所从事中药检验及其质量标准起草工作。1998年5月开始研究运用高效毛细管电泳方法分析中药成分。

图谱见图 2。



1-内标 2-士的宁 3-马钱子碱
图 1 对照品和内标分离图谱



1-内标 2-士的宁 3-马钱子碱
图 2 供试品分离图谱

2.4 空白对照实验:模拟处方制得缺马钱子空白对照液,按供试品溶液的制备方法制备,测定,分离图谱见图 3,结果表明空白无干扰。

2.5 线性范围:分别量取混合对照品溶液 0.2、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5 mL 至 5 mL 量瓶中,各加入内标溶液 1 mL,加入 0.2 mol/L 磷酸溶液 0.5 mL,加水和甲醇适量稀释至刻度(甲醇浓度为 50%),按选定的方法测定,所得的士的宁峰面积与内标峰面积的比值(Y_1)、马钱子碱峰面积与内标峰面积的比值(Y_2),分别和混合对照品溶液中的士的宁浓度(X_1 , mg/mL)、马钱子碱浓度(X_2 , mg/mL)作回归处理,线性范围均为 0.020~0.15 mg/mL,回归方程分别为:

$$Y_1 = 11.49X_1 + 0.717 \times 10^{-1}, r = 0.9992$$

$$Y_2 = 7.66X_2 + 4.522 \times 10^{-1}, r = 0.9994$$

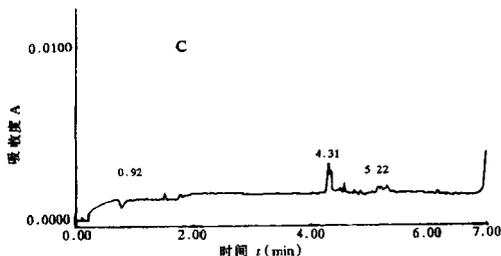


图 3 空白对照分离图谱

2.6 精密性及方法的重现性:对同一份对照品溶液重复进样 6 次,测定其士的宁、马钱子碱峰面积与内标峰面积的比值,计算 RSD 分别为 0.5% 和 1.0% ($n=6$);精密称取同批样品各 6 份,按选定的方法测定士的宁和马钱子碱含量,计算 RSD 分别为 2.4% 和 3.0% ($n=6$)。

2.7 回收实验:采用加样回收法,取已知含量的样品加入定量的士的宁和马钱子碱对照品各 6 份,测定,结果平均回收率分别为 95.1% 和 96.4%, RSD 分别为 2.85% 和 3.05% ($n=6$)。

2.8 样品测定结果:按上述选定方法测定 3 批伸筋丹胶囊中士的宁和马钱子碱的含量,结果见表 1。

表 1 伸筋丹胶囊中士的宁和马钱子碱含量测定结果

批号	士的宁含量(mg/g)	马钱子碱含量(mg/g)
980301	1.56	1.26
980303	1.29	1.13
980426	0.67	0.48

3 讨论

3.1 缓冲液:缓冲液的 pH 值、浓度对样品分离均有影响。考虑士的宁的 pK_a 为 8.26,马钱子碱的 pK_1 为 6.04 (pK_2 为 11.7)^[4],所以对 tris 缓冲液在 pH6~8 范围作了考察(0.2 mol/L tris 溶液用磷酸调节 pH 值),结果以缓冲液 pH 6.0 的分离效果最佳,缓冲液 pH 对士的宁、马钱子碱的 μ_{ep} (electrophoresis mobility)^[5] 的影响见图 4。对不同浓度的 tris 缓冲液进行比较,结果表明随着缓冲液浓度的增加,分离情况渐好,0.2 mol/L tris 缓冲

液可得到较为满意的分离。另用磷酸盐(80 mmol/L, pH=6.0)作为缓冲液进行了试验,结果分离效果差。tris 缓冲液不同浓度、磷酸缓冲液与运行电流值的关系及对土的宁、马钱子碱之间分离度(R)的影响见表 2。

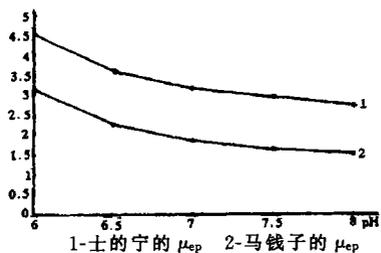


图 4 缓冲液 pH 对土的宁和马钱子碱 μ_{ep} 的影响

表 2 缓冲液(mmol/L)与电流的关系及对分离度(R)影响(电压=0.2 kV)

缓冲液 (pH=6.0)	50	100	150	200	80
	(mmol/L tris 磷酸)				
电流值(μ A)	19	34	48	59	56
分离度(R)	2.7	4.2	4.6	5.7	3.4

实验结果表明,采用 pH=6.0 的 0.2 mol/L tris 溶液可使内标峰、土的宁峰和马钱子碱峰之间及与邻近其它杂质峰得到比较好的分离。

3.2 电泳谱带展宽:沿出色谱的塔板高度概念,测得理论板数按土的宁峰计约为 28 万。

3.3 供试品的溶解溶媒:实验发现,在供试品的溶解溶媒中加一定浓度的磷酸,则土的宁和马钱子碱的峰形变好,而且回收率高,表明磷酸对土的宁和马钱子碱的溶解性及其峰形有影响;而对含不同甲醇浓度的溶解溶媒(甲醇浓度分别为 30%、50%、60%,均含有 20 mmol/L 磷酸)进行试验比较,则定量结果基本相同,分离的峰形均尚可。

3.4 供试品的提取和分离:实验发现样品直接用浓氨-氯仿提取则难以过滤,加入一定浓度的乙醇可使滤过顺利;因样品中含较多的脂溶性成分(乳香、没药等),所以用甲醇溶解的样品提取物加入水后会有不溶物产生,应用微孔滤膜可滤去不溶物。

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十六册,1998:57
- 2 阴 健主编. 中药现代研究与临床应用. 北京:学苑出版社 1995:118
- 3 中华人民共和国药典(1995 年版). 一部. 北京:人民卫生出版社,372
- 4 Merck Index. 12th ed. Merck, Rahway, NJ, 1996:1512、237
- 5 Weiberger R. Practical Capillary Electrophoresis. Academic press, New York, 1993:22

(1998-09-23 收稿)

Determination of Strychnine and Brucine in Shenjindan Capsule by Capillary Zone Electrophoresis

Jiang Shun Yao, Tian Songjiu, Jin Ou, et al. (Zhejiang Institute for Drug Control, Hangzhou 310004)

Abstract A capillary zone electrophoresis method was established for the determination of strychnine and brucine in Shenjindan capsule, a preparation composed of 8 different TCM including *Semen Strychni* and dried earthworm for relieving rigidity of muscles by promoting blood circulation to remove blood stasis. 0.2 mol/L tris- H_3PO_4 (pH=6.0) was used as running buffer, running voltage was 20 kV, and UV absorbance detection was set at 260 nm. This method can give a good separation for the determination of strychnine and brucine. By using internal standard the calibration curve showed good linearity for strychnine and brucine, average recovery was 95.1% for strychnine and 96.4% for brucine.

Key words capillary zone electrophoresis Shenjindan capsule strychnine brucine

《国外医药·植物药分册》1999 年征订启事

《国外医药·植物药分册》杂志是由国家药品监督管理局主管,中草药信息中心站和天津药物研究院主办,国内外公开发行的医药科技专业期刊。

本刊以综述、编译、文摘、信息、题录等形式向读者提供植物药有效成分的分离提取、结构鉴定;生产工艺和质量控制;生化药理活性与临床研究;组织培养与生物技术工程;各国民间药物的开发与植物药专利;市场贸易与各国的药政管理。

本刊为双月刊,全年 6 期;每期定价 9.50 元,全年 60 元(包括包装费与邮资)。自办发行,随时可以订阅。联系地址:天津市鞍山山西道 308 号。邮编:300193 电话:(022)27423636。