

RP-HPLC 测定仁青常觉中士的宁的含量

□黄志芳* 易进海* (四川省中药研究所 成都 610041)

德吉贡布 (西藏自治区藏医院 拉萨 850000)

摘要:目的:建立仁青常觉中士的宁的含量测定方法。方法:色谱柱:Diamonsil(TM) 钻石 C₁₈, (4.6 mm×200m, 5μm); 流动相:甲醇-0.01mol/L 磷酸二氢钾溶液(25:75)(用 10%磷酸溶液调节 pH 至 2.5); 检测波长为 254nm; 流速:0.8ml/min; 柱温:35℃。结果:士的宁色谱峰与其它色谱峰分离良好, 进样量在 0.03792~0.18960μg 范围内, 呈良好线性关系(r=0.9999), 平均回收率为 97.02% ,RSD=1.26%(n=6)。结论:本法简便快捷, 结果可靠, 为控制仁青常觉的质量提供一个参考方法。

关键词:仁青常觉 士的宁 RP-HPLC 含量测定

仁青常觉系藏族验方, 收载于中国药典 2005 年版一部, 由珍珠、朱砂、檀香、降香、沉香、诃子、牛黄、麝香、西红花、马钱子等药味加工制成的丸剂。具有清热解毒, 调和滋补之功效, 用于“龙、赤巴、培根”各病, 陈旧性胃肠炎、溃疡, “木布”病, 萎缩性胃炎, 各种中毒症; 梅毒, 麻风, 陈旧热病, 炭疽, 疔痛, 干黄水, 化脓等^[1]。中国药典未收载含量测定方法, 本品马钱子中士的宁既是有效成分, 又是毒性成分, 为了确保仁青常觉的安全性和有效性, 故采用 RP-HPLC 法测定士的宁的含量, 结果显示该方法简便可行, 重现性好, 为控制仁青常觉的质量提供一个参考方法。

一、实验方法与结果

1. 仪器与试剂

高效液相色谱仪: 包括 Waters 1525 泵, 2487 双通道紫外检测器, Waters 柱温箱, Breeze 液相色谱工

作站, Brasson 超声清洗仪, 雷磁 pHs-25 型 pH 计。

仁青常觉 (西藏自治区藏药厂提供), 大丸: 1g/丸, 小丸: 0.25g/丸; 士的宁对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 0705-200005); 甲醇为美国 Tedia 色谱纯, 水为超纯水, 其它试剂均为分析纯。

2. 方法与结果

(1) 色谱条件。

色谱柱: Diamonsil(TM) 钻石 C₁₈, 4.6×200mm, 5μ; 柱温: 35℃; 流动相: 甲醇-0.01mol/L 磷酸二氢钾溶液(25:75)(用 10%磷酸溶液调节 pH 至 2.5)^[2]; 检测波长: 254nm; 流速: 0.8mL/min。理论塔板数按士的宁峰计算, 应不低于 2000。在此色谱条件下, 士的宁对照品、仁青常觉样品、阴性对照品的色谱分别见图 1、图 2、图 3。供试品溶液中士的宁峰达到基线分离, 阴性对照品溶液无干扰, 基线稳定, 方法可行。

(2) 线性关系。

精密称取士的宁对照品 4.74mg, 置 25mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取

收稿日期: 2006-02-20

修回日期: 2006-08-15

* 联系人: 易进海, 研究员, 博士, 主要从事中药质量标准化研究; 黄志芳, 助理研究员, 从事中药新药研发工作, Tel: 028-85210843, Email: huangzlf74@163.com。

[World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 71

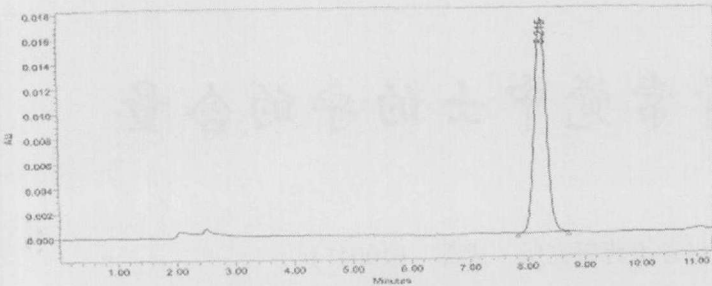


图1 士的宁对照品 HPLC 图谱

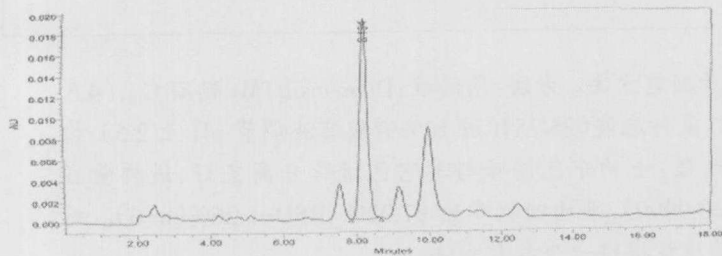


图2 仁青常觉 HPLC 图谱

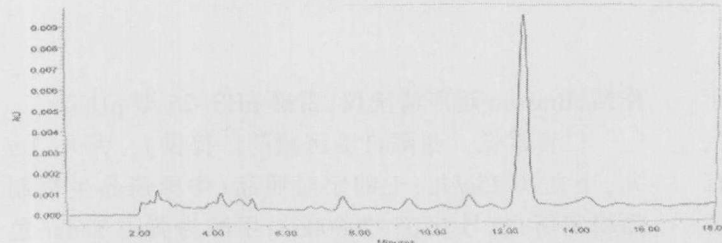


图3 阴性对照品 HPLC 图谱

1.0mL,置 10mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,即得。分别精密吸取上述对照品溶液(0.01896mg/mL)2,4,6,8,10 μ L,注入液相色谱仪中测定。结果士的宁在 0.03792–0.18960 μ g 范围内呈良好线性关系,以进样量(μ g)为横坐标,峰面积为纵坐标作回归曲线, $Y=2888132.9X-33438.4$, $r=0.9999$ 。

(3) 检测限与定量限。

在选定的色谱条件下,当信噪比为 3 时,测得士的宁的最低检测限为 0.4ng;当信噪比为 10 时,测得士的宁的定量限为 1.4ng。

(4) 供试品溶液的制备。

取本品粉末(过三号筛)约 1g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加氯仿 50mL 与浓氨试液 2mL,密塞,轻轻振摇,称定重量,放置 24h,再称定重量,用氯仿补足减失的重量,充分振摇,滤过,精密量取滤液 20mL,置分液漏斗中,用硫酸溶液 (3 $\rightarrow$ 100) 提取 5 次,每次 20mL,合并硫酸液,加浓氨试液调至 pH9–10,用氯仿提取 5 次,每次 20mL,合并氯仿液,减压蒸干,残渣用流动相溶解,转移至 10mL 量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

(5) 精密度实验。

取供试品溶液(批号:030113),重复测定 5 次;结果精密度好,RSD 为 0.83%($n=5$)。

(6) 重现性实验。

取样品粉末(批号:030113)照(4)项下方法分别制成供试品溶液 5 份,依法测定,结果重现性好,士的宁的含量为 0.0256%,RSD 为 1.48%($n=5$)。

(7) 稳定性实验。

取供试品溶液(批号:030113),于室温放置 24h 后依法测定,结果稳定,RSD 为 0.56%($n=5$)。

(8) 加样回收率实验。

分别取已知士的宁含量的样品(批号:030113,0.0256%)0.5g,精密称定,分别准确加入 0.7,0.9,1.1mL 的士的宁对照品溶液(0.144mg/mL),照(4)项下方法制成供试品溶液。依法测定,结果见表 1。

表 1 加样回收率测定结果($n=6$)

取样量 (mg)	样品中士的 宁量(mg)	添加对照 品(mL)	相当于士 的宁量(mg)	测出士的 宁总量(mg)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
535.2	0.13701	0.7	0.1008	0.23410	96.32		
493.7	0.12639	0.7	0.1008	0.22550	98.32		
528.1	0.13519	0.9	0.1296	0.26021	96.47	97.02	1.26
524.8	0.13435	0.9	0.1296	0.25774	95.21		
519.9	0.13309	1.1	0.1584	0.28767	97.59		
494.6	0.12662	1.1	0.1584	0.28219	98.21		

表2 仁青常觉中土的宁含量测定(n=3)

批号	含量(%)	RSD(%)
030816	0.0282	0.96
030113	0.0256	1.48
031010	0.0204	1.13

(9) 样品含量测定。样品3批,分别依(4)项下方法制成供试品溶液,依法测定,土的宁含量测定结果如表2。

二、讨 论

1. 仁青常觉是100余味的大处方丸剂,成分很复杂。本文采用的供试品制备方法具有选择性,可有效去除杂质。曾以中国药典2000年版一部马钱子药材项下色谱条件对样品进行测定,结果分离效

果差,基线不回零,且拖尾严重。经比较研究,用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,甲醇-0.01mol/L磷酸二氢钾溶液(25:75)(用10%磷酸溶液调至pH2.5)为流动相,样品分离效果理想。

2. 因为土的宁既是有效成分,又是毒性成分,为了确保仁青常觉的安全性和有效性,故暂订仁青常觉含马钱子以土的宁($C_{21}H_{22}N_2O_2$)计,小丸应为0.04~0.08mg,大丸应为0.17~0.32mg。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2005年版一部. 化学工业出版社,北京:390~391.
- 2 郭社民. RP-HPLC测定治伤消瘀丸中土的宁的含量. 中国药事, 1999, 13(6):407.

Determination of the Content of Strychnine in Renqingchangjue by RP-HPLC

Huang Zhifang, Yi Jinhai

(Sichuan Institute of Chinese Materia Medica, Chengdu 610041)

Deji, Gongbu

(Tibet Medical Hospital of Tibet Autonomous Region, Lasa 850000)

Objective To establish an RP-HPLC method for determining the content of strychnine in Renqingchangjue . **Methods** The chromatographic conditions were : Diamonsil (TM) C_{18} , (4.6 mm×200 mm, 5 μ m) column as analytic column; MeOH-0.01mol/L KH_2PO_4 water solution (25:75) (pH2.5, 10% H_3PO_4) as mobile phase; detection wavelength at 254nm ;column temperature at 35℃; flow rate at 0.8ml/min . **Results** The separating resolution for chromatographic peak of strychnine with other peaks is good and the liner range of strychnine was 0.03792~0.18960 μ g , $r=0.9999$. The average recovery was 97.02%, RSD=1.26% (n=6). **Conclusion** The method is simple and convenient, and the result is accurate and, reproducible, and provides a reliable method to quality control of ;Renqingchangjue which can be used to enhance the quality control of this drug .

Keywords: RP-HPLC ;Renqingchangjue; Strychnine ;determination

(责任编辑:刘维杰,责任编辑:杜力军,责任译审:凌仰之)