

附马风湿片中土的宁碱和马钱子碱的含量测定

黄 驰 王旭敏¹ 朱蓉贞

(江苏省药品检验所,南京 210008;¹生药学教研室)

摘要 采用双波长薄层扫描法测定附马风湿片中土的宁碱和马钱子碱的含量。土的宁碱和马钱子碱的最大吸收波长分别是为 260 nm 和 304 nm, 参比波长均为 350 nm。本法使两组分在同一薄层板上完成定量分析。操作简便, 结果满意, 为有效控制产品质量提供了依据。

关键词 附马风湿片; 土的宁碱; 马钱子碱; 双波长薄层扫描法

附马风湿片是一种新药, 由附子、马钱子等 20 多味中药组成, 对风湿和类风湿具很好的疗效。方中的马钱子是主药, 同时又是剧毒药, 为了使其充分发挥药效而又不致中毒, 我们对其中的土的宁碱和马钱子碱进行了定量控制。有关该两成分的含量测定研究报道甚多, 但在同一薄层板上完成该两组分的定量尚未见报道。我们利用双波长薄层扫描法对该两成分进行了含量测定研究。研究表明: 土的宁碱和马钱子碱的最大吸收波长分别为 260 nm 和 304 nm, 参比波长均为 350 nm; 展开后, 两个组分均在 3 h 内稳定; 线性范围分别为 1.002~5.01 μg 和 0.525~2.625 μg; 标准曲线的相关系数 r 分别为 0.9991 和 0.9997; 回收率分别为 97.73% ($n=4$) 和 100.72% ($n=5$); 精密度分别为 4.46% ($n=6$) 和 0.71% ($n=6$)。对 5 个批号的附马风湿片进行了该两组分的含量测定。本法快速、简便、结果准确、无干扰。

1 实验部分

1.1 仪器与试药

CS-930 薄层扫描仪(日本岛津公司); 土的宁碱和马钱子碱对照品均由国家药品生物制品检定所提供, 附马风湿片(5 批)由江苏某药厂生产; 硅胶 GF₂₅₄ 为青岛海洋化工厂生

产; 所有试剂均为分析纯。

1.2 测定条件的选择

1.2.1 试样的提取 按文献方法^[1,2]将样品置碘量瓶中, 加氨水湿润, 精密加入氯仿, 密塞, 摆匀, 精密称定, 超声处理 40 min, 再称重, 用氯仿补足损失的重量, 振摇, 滤过, 精密量取一定量的滤液, 置分液漏斗中, 以一定浓度的硫酸液提取 4 次, 合并提取液, 用氨水调至弱碱性, 再加氯仿提取 4 次, 合并提取液, 置水浴浓缩至干, 残渣加氯仿定容至一定体积, 作为供试品溶液。结果表明, 所选择的提取方法效果良好。

1.2.2 展开系统的选择 根据土的宁碱和马钱子碱的性质和文献报道, 试验了以下四种展开系统: 1. 甲苯-丙酮-乙醇-浓氨试液(4:5:0.6:0.4)^[2]; 2. 正己烷-醋酸乙酯-乙醇(6.3:3.6:1), 氨气饱和; 3. 甲苯-丙酮-乙醇-浓氨水(8:6:0.5:2)的上层液^[1]; 4. 苯-醋酸乙酯(1:2)^[3]。结果以甲苯-丙酮-乙醇-浓氨水(8:6:0.5:2)的上层液为展开剂, 其分离效果最佳, 马钱子碱的 R_f 值为 0.26, 土的宁碱的 R_f 值为 0.43, 而且在此两斑点的前后无其它斑点干扰, 为在同一薄层板上测定二个成分的含量奠定了基础。层析色谱图见图 1。

1.2.3 最大吸收波长的选择 利用薄层扫

描仪分别对士的宁碱、马钱子碱及与此两斑点相对应的样品斑点进行光谱吸收扫描，士的宁碱及与此相对应的样品斑点的最大吸收波长均为 260 nm；马钱子碱及与此相对应的样品斑点的最大吸收波长均为 304 nm；两组分的参比波长均为 350 nm，各组分与相对应的样品斑点的光谱吸收曲线完全一致。

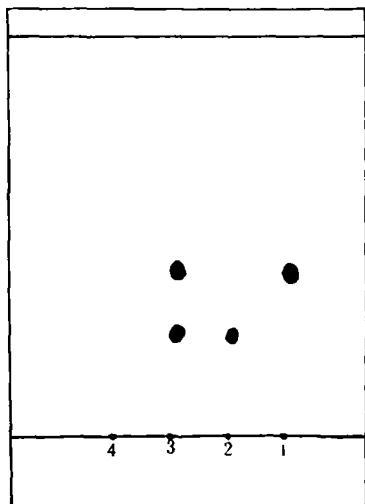


Fig 1. TLC chromatograms of Fumafengshi Tablet
1. Strychnine; 2. Brucine; 3. Sample; 4. Control

1.2.4 稳定性考察 两个成分经点样，展开，取出，晾干后立即进行色谱测定，记录各峰面积的积分值，以后每隔一定时间测定一次，观察积分值的变化趋势，在测至 3 h 时，峰面积的积分值仍基本保持不变，表明两组分展开后保持稳定。

1.2.5 薄层扫描参数的选择 采用双波长反射法锯齿扫描，狭缝 $1.2 \times 1.2\text{mm}$, $S_k = 3$ ，士的宁碱 $\lambda_1 = 260\text{ nm}$, $\lambda_2 = 350\text{ nm}$ ；马钱子碱 $\lambda_1 = 304\text{nm}$, $\lambda_2 = 350\text{nm}$ 。外标二点法程序自动计算含量。

1.2.6 标准曲线的绘制 精密称取 105℃ 干燥至恒重的士的宁碱对照品 10.02 mg，马钱子碱对照品 5.25 mg，置同一 10 ml 量瓶中，加氯仿适量溶解并稀释至刻度，分别吸取上述对照品溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 μl ，点于同一硅胶 GF₂₅₄薄层板上，以甲苯

-丙酮-乙醇-氨水 (8:6:0.5:2) 的上层液为展开剂，展开，取出，晾干，置紫外光灯 (254 nm) 下定位，分别测出各点的峰面积积分值，以浓度为横坐标，峰面积积分值为纵坐标，绘制出各自的标准曲线，经回归得士的宁碱的回归方程为 $A = 647.46 + 9177.97C$ ，相关系数 $r = 0.9991$ ，线性范围为 1.002~5.01 μg ；马钱子碱的回归方程为 $A = 1.34 + 10803.24C$ ，相关系数 $r = 0.9997$ ，线性范围为 0.525~2.625 μg 。

1.3 样品士的宁碱和马钱子碱的含量测定

1.3.1 供试品溶液的制备和测定 取本品 15 片，研碎，混合均匀，精密称取 4 g，置 100 ml 碘量瓶中，加氨水 0.3 ml 使湿润，精密加入氯仿 25 ml，密塞，摇匀，精密称定，超声处理 40 min，再称重，用氯仿补足损失的重量，充分振摇，滤过，精密量取滤液 10 ml，置分液漏斗中，以 0.5 mol/L 硫酸液提取 4 次，依次是 15、15、10、10 ml，合并提取液，用氨水调至弱碱性，再以氯仿提取 4 次，依次是 15、15、10、10 ml，合并提取液，置水浴浓缩至干，残渣加氯仿溶解并定容至 1 ml，作为供试品溶液。吸取供试品溶液 1 μl ，对照品溶液 2 μl 和 4 μl ，分别点于同一硅胶 GF₂₅₄薄层板上，以甲苯-丙酮-乙醇-浓氨水 (8:6:0.5:2) 的上层液为展开剂，展开，取出，晾干，置 CS-930 薄层扫描仪上进行色谱测定。外标二点法程序自动计算出供试品中该二组分的重量 (μg)，按下式算出样品中的含量。5 批样品测定结果见表 1。

$$\text{士的宁碱 \% (mg/g)} = \frac{2.5 \times C}{W} \times 100\%$$

$$\text{马钱子碱 \% (mg/g)} = \frac{2.5 \times C}{W} \times 100\%$$

C 为薄层板上测得的量 (μg)，W 为样品取样量 (g)

1.3.2 回收率测定 在同一样品中加入已知量的对照品，如法测定，士的宁碱的回收率为 97.73%，马钱子碱的回收率为 100.72%。结果见表 2。

Tab 1. Results of samples analysis($n=4$)

Batch No.	Strychnine, % (mg/g)	Brucine, % (mg/g)	S S+B, %	B S+B, %
920822	114.40	83.28	57.9	42.1
910604	182.12	128.42	58.6	41.4
901030	127.07	96.65	56.8	43.2
920820	97.01	62.50	60.8	39.2
910906	145.36	121.18	54.5	45.5

Tab 2. Recovery test

Compd.	No.	Added, μg	Found, μg	Recovery, %	Average, %	CV, %
Strychnine	1.	2.004	1.924	96.01		
	2.	2.004	1.960	97.80		
	3.	2.004	1.990	99.30	97.73	1.19
	4.	2.004	1.960	97.80		
	5.	0.525	0.530	100.95		
Brucine	1.	0.525	0.530	100.95		
	2.	0.525	0.540	102.86		
	3.	0.525	0.528	100.57	100.72	1.62
	4.	0.525	0.516	98.28		
	5.	0.525	0.530	100.95		

1.3.3 精密度的考察 同一样品如法测定6次,得士的宁碱的精密度为4.46%;马钱子的精密度为0.71%。结果见表3。

Tab 3. Accuracy test

Compd.	No.	Cont., μg	Average, μg	CV, %
Strychnine	1.	1.906		
	2.	2.055		
	3.	2.051	2.067	4.46
	4.	2.144		
	5.	2.168		
	6.	2.078		
Brucine	1.	2.374		
	2.	2.391		
	3.	2.383	2.393	0.71
	4.	2.381		
	5.	2.412		
	6.	2.415		

2 讨论与小结

2.1 从对5个批号的士的宁碱和马钱子碱的含量测定结果可见,士的宁碱均较马钱子碱含量高,士的宁碱约占两组分的54%~

60%,马钱子碱约占39%~45%,这与文献报道^[4]较一致。

2.2 从表1可知,不同批号样品的含量高低相差达1倍左右,这是因为不同批次或不同产地的马钱子原药材中的含量不尽一致,高低也相差近一倍左右,《中国药典》1990年版一部规定马钱子中士的宁碱的含量幅度也相差近1倍。因此本品的含量相差幅度较大是正常现象。

2.3 对西药来说,含量测定按惯例是对标示量而言的,但中成药的含量测定就无法做到这一点,因为其原料中某一成分的含量随产地、采收季节、加工方法、贮藏等一系列因素的不同而不同,甚至影响很大,所以《中国药典》1990年版一部中有关成药的含量测定均不是对标示量而言,而是用样品重量直接计算出百分含量,最后规定一个低限即可。由于本品中的马钱子既是有效成分又是有毒成分,必须控制在一定的幅度内。根据药典规定马钱子中士的宁碱的含量幅度,再结合本品5个批号的累积数据和本方中马钱子的量,我们认为,士的宁碱控制在90.0%~185.0%(mg/g),马钱子碱控制在60.0%~130.0%(mg/g)为宜。

参 考 文 献

- 1 黄驰,朱善贞.薄层色谱-紫外分光光度法测定风湿宁片中士的宁的含量.基层中药杂志,1993;7(1):18
- 2 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国药典.1990年版一部.北京:人民卫生出版社,1990;37-38
- 3 刘训红等.中药材薄层色谱鉴别.天津:天津科学技术出版社,1990;428-31
- 4 江苏新医学院.中药大辞典.上册.上海:上海人民出版社,1977;291-2

Study on the Quantity of Strychnine and Brucine from Fumafengshi Tablets

Huang Chi, Wang Xuming¹, Zhu Rongzhen

Jiangsu Institute for Drug Control, Nanjing 210008; Department of Pharmacognosy

This paper reported the determination of strychnine and Brucine from Fumafengshi tablets by the dual-wavelength thin layer chromatography scanning method. The sample wavelenthes of the two compounds are 260 nm and 304 nm, respectively, the reference wavelength being the same as 350 nm, $S_x = 3$, the slit being 1.2 mm \times 1.2 mm, and the standard curve being linear within 1.002-5.01 μg and 0.525-2.625 μg . The correlation coefficient is 0.9991 and 0.9997, the average recovery is 97.7% ($n=4$) and 100.72% ($n=5$), and the CV% of this method is 4.46% ($n=6$) and 0.71% ($n=6$), respectively. This method is very special, rapid, simple and accurate. It is suitable for quality control of Fumafengshi tablet.

Key words Fumafengshi tablet; Strychnine; Brucine; Dualwavelength thin layer chromatography scanning

香附、川芎、赤芍与黄芪、归尾配伍的血液流变学实验研究

薛建欣 导师:蒋莹 严永清

(中药研究所, 中药药理与理论研究室)

作者在对补气药黄芪、补血养血药当归及其配伍进行血液流变学研究的基础上,配伍理气药香附、活血药川芎、赤芍,对正常及“血瘀”动物模型进行血液流变学实验研究,比较理气、活血、补气、补血药配伍作用的异同,并对其作用机理进行初步探讨,从而在血液流变学研究方面对气血理论、“血瘀”理论及理气、活血、补气、补血药物配伍作用的性质提供较多的论据。

依据中医内伤忧怒及外感寒邪可致“血瘀”的理论,用肾上腺素加冰水刺激的方法建立动物“血瘀”实验模型,其血液流变性表现为增粘、增浓、增聚等特点。给予各种药物后,上述指标有明显改善,其中尤以全方组作用最强,可使全血粘度降低至接近正常对照组水平(与对照组比较 $P>0.05$),其降低“血瘀”大鼠全血粘度的作用是通过减少红细胞的生成、降低血浆粘度和提高红细胞的分散性来实现的。在正常大鼠中亦观察到,香附、川芎、赤芍具有一定程度的改善血液流变性的作用,配伍后作用增强,全方组能降低被黄芪、归尾增加的全血粘度(与基本方比较 $P<0.05$)、血浆粘度、缩短红细胞电泳时间、提高电泳率。以上结果表明,在改善血液流变性的作用方面,香附与川芎、赤芍配伍具有明显的协同效应,香附增强了川芎、赤芍的活血化瘀效应,这为中医关于“气行则血行,气滞则血瘀”之说提供了实验依据。

药物对大鼠血小板聚集及体外血栓形成的实验表明,给大鼠造成“血瘀”模型后,血小板聚集性增强,体外血栓形成的长度、湿重、干重增加。给药后,所有给药组均明显抑制 ADP、凝血酶诱导的正常及“血瘀”大鼠血小板聚集性,以及“血瘀”大鼠体外血栓的形成。

采用放射免疫法对大鼠血浆中 TXB₂ 及胸主动脉壁 6-keto-PGF_{1α} 含量测定结果表明,黄芪、归尾有升高血浆 TXB₂ 含量的趋势,配伍香附、川芎、赤芍后,血浆 TXB₂ 含量明显降低,其中以全方组作用最强。所有给药组均显著增加大鼠胸主动脉壁 6-keto-PGF_{1α} 的生成。此结果提示,香附、川芎、赤芍抑制血小板聚集作用可能与其降低血浆 TXB₂ 含量、增加主动脉壁 6-keto-PGF_{1α} 的生成,调节 TXA₂-PGI₂ 平衡系统有关。

用荧光光度法对大鼠血小板中 5-HT 含量及释放率的测定结果表明,香附、川芎、赤芍均能明显降低血小板中 5-HT 含量,抑制 5-HT 释放反应,可能这也是其抗血小板聚集作用机理之一。实验还证实,用现代科学方法研究中药药理作用时,应用适当的病理模型是十分重要的。中医气血学说、血瘀与活血化瘀理论有着极其丰富的内容,还有待今后深入研究。

(全文待发表)