

RP-HPLC法同时测定人血浆中马钱子4种生物碱的含量

翁德新^{1*},戴其昌²(1.德清县第三人民医院药剂科,浙江德清 313200;2.湖州市食品药品检验所,浙江湖州 313000)

中图分类号 R28;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)15-1371-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.15.09

摘要 目的:建立同时测定人血浆中马钱子4种生物碱含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法。色谱柱为HYP-ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.2%十二烷基硫酸钠溶液(40:60, V/V, pH2.8),流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,检测波长为254 nm。结果:番木鳖碱、马钱子碱、番木鳖碱氮氧化物、马钱子碱氮氧化物的质量浓度分别在0.53~53.40、0.54~53.55、0.53~53.40、0.53~53.25 μg/ml范围内与待测物峰面积积分值呈良好线性关系($r \geq 0.998 0$);精密度的RSD<9.0%,稳定性的RSD均在2.15%~7.69%之间;提取回收率分别为1.05%~2.36%、1.32%~2.43%、1.44%~2.55%和1.52%~2.69%。结论:该方法灵敏度高、精密度好、简便可行,可用于马钱子中4种生物碱的药动学研究。

关键词 马钱子;生物碱;含量测定;反相高效液相色谱法;血浆

Establishment of RP-HPLC Method for the Content Determination of 4 Kinds of Alkaloids from *Strychnos nux-vomica* in Human Plasma

WENG De-xin¹, DAI Qi-chang²(1.Dept. of Pharmacy, Deqing County Third People's Hospital, Zhejiang Deqing 313200, China; 2.Huzhou Municipal Institute for Food and Drug Control, Zhejiang Huzhou 313000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of 4 kinds of alkaloids from *Strychnos nux-vomica* in human plasma. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on HYP-ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% sodium lauryl sulfate(40:60, V/V, pH 2.8) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 30 ℃, and the detection wavelength was 254 nm. RESULTS: The linear ranges of strychnine, brucine, strychnine N-oxide and brucine N-oxide were 0.53-53.40, 0.54-53.55, 0.53-53.40, 0.53-53.25 μg/ml($r \geq 0.998 0$); RSDs of precision tests were less than 9.0%; RSDs of stability tests were 2.15%-7.69%; extraction recoveries were 1.05%-2.36%, 1.32%-2.43%, 1.44%-2.55% and 1.52%-2.69%, respectively. CONCLUSIONS: The method is sensitive, precise, convenient and feasible, and can be used for pharmacokinetic study of 4 kinds of alkaloids from *S. nux-vomica*.

KEYWORDS *Strychnos nux-vomica*; Alkaloids; Content determination; RP-HPLC; Plasma

马钱子,也称番木鳖,为马钱科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L.或云南马钱 *S. pierriana* A.W.Hill的干燥成熟种子,其味苦、性寒、有大毒,在中医药临床上用于通络止痛、散结消肿。现代医学理论证明,马钱子具有抗肿瘤作用^[1]。马钱子中的各种生物碱是马钱子的主要有效部位,其中番木鳖碱(Strychnine)、马钱子碱(Brucine)、番木鳖碱氮氧化物(Strychnine N-oxide)和马钱子碱氮氧化物(Brucine N-oxide)是较为重要的生物碱^[2-4]。马钱子的体内分析研究较少,通常是单一成分检测或两种成分一起检测^[5],目前未见4种成分一起检测的方法。本研究建立了同时检测人血浆中马钱子4种生物碱类成分含量的方法,以为马钱子的体内药动学分析提供依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱(HPLC)仪(日本岛津公司); AE-240S型十万分之一电子天平(瑞士Mettler Toledo公司); KQ-100型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);涡旋混合器(上海沪西分析仪器厂);3K15型离心机(德国Sigma公司)。

1.2 药品与试剂

番木鳖碱(批号:110705-200306)、马钱子碱(批号:110706-200505)、石杉碱甲(批号:100243-200601)对照品均购自中国食品药品检定研究院;番木鳖碱氮氧化物、马钱子碱氮

[13] Alexander JJ, Jacob A, Cunningham P, et al. TNF is a key mediator of septic encephalopathy acting through its receptor, TNF receptor-1[J]. *Neurochem Int*, 2008, 52(3): 447.

[14] Jang AS, Lee JU, Choi IS, et al. Expression of nitric oxide synthase, aquaporin 1 and aquaporin 5 in rat after bleomycin inhalation[J]. *Intensive Care Med*, 2004, 30(3): 489.

(收稿日期:2013-08-28 修回日期:2013-10-10)

* 副主任药师。研究方向:医院药学、药事管理、临床药学。
E-mail: wengdexin_zj@163.com

氧化物对照品(德国 Carl GmBH 公司,纯度均>98%);十二烷基硫酸钠为色谱纯,水为纯净水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:HYP-ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.2% 十二烷基硫酸钠溶液(40:60, V/V, pH2.8);流速:1.0 ml/min;柱温:30 ℃;检测波长:254 nm;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取经五氧化二磷减压干燥至恒质量的番木鳖碱、马钱子碱、番木鳖碱氮氧化物和马钱子碱氮氧化物对照品适量,用流动相溶解并定容至同一 25 ml 量瓶中,制备成质量浓度分别为 0.356 mg/ml(番木鳖碱)、0.357 mg/ml(马钱子碱)、0.356 mg/ml(番木鳖碱氮氧化物)、0.355 mg/ml(马钱子碱氮氧化物)的混合对照品溶液,即为混合对照品母液,4 ℃贮藏,备用。精密移取混合对照品母液 0.5 ml,置 1 ml 量瓶中,用甲醇定容,混匀,即为混合对照品系列溶液①。再分别精密移取混合对照品系列溶液① 3 ml,置 10 ml 量瓶中,用甲醇定容,混匀,为混合对照品系列溶液②。然后分别精密移取混合对照品系列溶液② 0.5、1、5、10、20、50 ml,置 50 ml 量瓶中,用甲醇定容,混匀,得混合对照品系列溶液③~⑧,其中番木鳖碱的质量浓度分别为 0.53、1.07、5.34、10.68、21.36、53.40 μg/ml,马钱子碱的质量浓度分别为 0.54、1.07、5.36、10.71、21.42、53.55 μg/ml,番木鳖碱氮氧化物的质量浓度分别为 0.53、1.07、5.34、10.68、21.36、53.40 μg/ml,马钱子碱氮氧化物的质量浓度分别为 0.53、1.06、5.33、10.65、21.30、53.25 μg/ml。4 ℃贮藏,备用。

2.2.2 内标溶液的制备 精密称取经五氧化二磷减压干燥至恒质量的石杉碱甲对照品适量,以甲醇溶解制得质量浓度为 40.02 μg/ml 的内标溶液。4 ℃贮藏,备用。

2.2.3 质控样品的制备 分别取“2.2.1”项下混合对照品系列溶液 10 μl 与内标液 10 μl,置 50 μl 空白血浆中,得高、中、低质量浓度的质控样品,即番木鳖碱血浆浓度分别为 53.40、10.68、0.50 μg/ml、马钱子碱血浆浓度分别为 53.55、10.71、0.54 μg/ml、番木鳖碱氮氧化物血浆浓度分别为 53.40、10.68、0.50 μg/ml,马钱子碱氮氧化物血浆浓度分别为 53.25、10.65、0.53 μg/ml。-20 ℃贮藏,备用。

2.3 血浆样品的处理

精密吸取人血浆样品 50 μl,加入“2.2.1”项下混合对照品系列溶液 50 μl、石杉碱甲 20 μl、氨水 20 μl,涡旋 2 min,再加入乙腈 600 μl 沉淀蛋白,涡旋 3 min,以离心半径为 13.5 cm、15 000 r/min 离心 5 min,取上清液 20 μl 进样。

2.4 方法学考察

2.4.1 方法专属性 取“2.2.3”项下中质量浓度的质控样品溶液适量,按“2.3”项下方法处理后,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果表明,马钱子碱氮氧化物、石杉碱甲、番木鳖碱氮氧化物、番木鳖碱和马钱子碱的保留时间分别为 3.5、5.2、7.3、24.7、30.8 min,血浆中所含的内源性物质不干扰被测物和内标

的测定,且峰形良好。色谱见图 1。

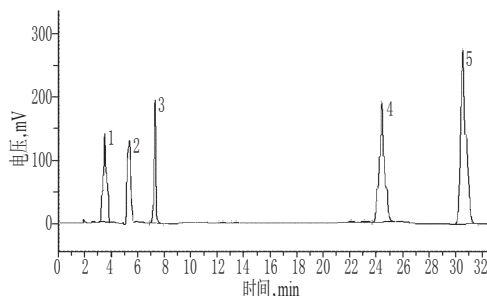


图 1 高效液相色谱图

1. 马钱子碱氮氧化物; 2. 石杉碱甲; 3. 番木鳖碱氮氧化物; 4. 番木鳖碱; 5. 马钱子碱

Fig 1 HPLC chromatograms

1. brucine N-oxide; 2. huperzine A; 3. strychnine N-oxide; 4. strychnine; 5. brucine

2.4.2 标准曲线的制备 取“2.2.1”项下混合对照品系列溶液③~⑧,按“2.3”项下方法处理,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以待测物质量浓度(x)为横坐标,待测物的峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归。回归方程与线性范围见表 1。

表 1 回归方程与线性范围(n=6)

Tab 1 Regression equation and linear range(n=6)

生物碱	回归方程	相关系数(r)	线性范围, μg/ml
番木鳖碱	y=23 465x+5 634	0.998 0	0.53~53.40
马钱子碱	y=20 648x-3 647	0.999 0	0.54~53.55
番木鳖碱氮氧化物	y=18 652x+2 164	0.999 0	0.53~53.40
马钱子碱氮氧化物	y=14 957x-1 657	0.998 0	0.53~53.25

2.4.3 精密度试验 按“2.2.3”项下方法制备高、中、低质量浓度的质控样品,按“2.3”项下方法处理,按“2.1”项下色谱条件测定日内精密度(6次)、日间精密度(6d)。结果,番木鳖碱、马钱子碱、番木鳖碱氮氧化物、马钱子碱氮氧化物日内、日间精密度的 RSD 均小于 9.0%,表明本方法精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取“2.2.3”项下中质量浓度的质控样品溶液 5 份,置 4 ℃下 24 h 后测定,考察血浆样品的短期稳定性;另取该溶液 5 份,贮藏于 -70 ℃,30 d 后测定,考察血浆样品的长期稳定性;再取该溶液 5 份,在室温中充分解冻,然后再次冷冻,每次间隔 24 h,重复 3 个冻融周期后测定,考察血浆样品的 3 周期冻融稳定性。稳定性试验结果见表 2。

表 2 稳定性试验结果(n=5)

Tab 2 Results of stability tests(n=5)

生物碱	冻融稳定性的 RSD, %	长期稳定性的 RSD, %	短期稳定性的 RSD, %
番木鳖碱	5.61	2.44	2.15
马钱子碱	6.77	2.51	2.33
番木鳖碱氮氧化物	7.69	2.39	2.67
马钱子碱氮氧化物	5.67	3.58	3.59

2.4.5 提取回收率试验 取“2.2.3”项下高、中、低质量浓度的质控样品适量,按“2.3”项下方法处理,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。与未经处理的相应质量浓度的对照品溶液峰面积比较,计算番木鳖碱、马钱子碱、番木鳖碱氮氧化物和马钱子碱氮氧化物的回收率,结果见表 3。

表3 提取回收率试验结果(n=6)

Tab 3 Results of extraction recovery tests(n=6)

生物碱	质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	提取回收率, %
番木鳖碱	0.50	2.36
	10.68	2.25
	53.40	1.05
马钱子碱	0.54	2.43
	10.71	2.39
	53.55	1.32
番木鳖碱氮氧化物	0.50	2.55
	10.68	2.49
	53.40	1.44
马钱子碱氮氧化物	0.53	2.69
	10.65	2.53
	53.25	1.52

3 讨论

马钱子在炮制为制马钱子过程中,番木鳖碱和马钱子碱可转化成相应的氮氧化物^[6],可能在体内会转化为极性更高的氮氧化物,而且其氮氧化物与原生物碱的药理药效相当^[7],因此研究番木鳖碱、马钱子碱、番木鳖碱氮氧化物和马钱子碱氮氧化物具有参考价值。

2010年版《中国药典》对番木鳖碱和马钱子碱进行HPLC测定,流动相为庚烷磺酸钠^[8],本课题组参考文献^[9]的流动相用十二烷基硫酸钠替代庚烷磺酸钠,调pH为2.8,未加磷酸二氢钠,流动相的制备更方便简单,也获得了较好的分离效果。

番木鳖碱、马钱子碱、番木鳖碱氮氧化物和马钱子碱氮氧化物均为碱性物质^[10],本研究采用氨水碱化血样,使得各生物碱以游离分子形式存在,从而提高了生物碱从血浆提取的效率,与王丹丹等^[11-12]采用三乙胺作为流动相有相似的原理。有研究采用氯仿提取并溶解番木鳖碱,但笔者筛选了几种有机溶液,发现乙腈的提取率最高,而采用氯仿提取时处理有难度,且番木鳖碱在放置过程中有降解,与文献结果相似^[13]。

综上所述,本研究采用RP-HPLC法同时测定人血浆中马钱子4种生物碱的含量,本方法简单、快速、灵敏和准确,可以作为马钱子4种生物碱的药动学研究方法。

参考文献

[1] 赵立民,刘玉国,徐恒卫.马钱子碱对大鼠慢性胃炎胃癌癌前病变模型的保护作用研究[J].中国药房,2012,23(35):3285.

[2] Yin W, Wang TS, Yin FZ, *et al.* Analgesic and anti-inflammatory properties of brucine and brucine N-oxide ext-

racted from seeds of *Strychnos nux-vomica*[J]. *J Ethnopharmacol*,2003,88(2/3):205.

[3] Yin W, Deng XK, Yin FZ, *et al.* The cytotoxicity induced by brucine from the seed of *Strychnos nux-vomica* proceeds via apoptosis and is mediated by cyclooxygenase 2 and caspase 3 in SMMC 7221 cells [J]. *Food Chem Toxicol*,2007,45(9):1700.

[4] 屈艳格,陈军,王冬月,等.马钱子生物碱类成分经口给药后在大鼠体内的药动学研究[J].中草药,2013,44(8):1008.

[5] 肖寒露,陈军,蔡宝昌.HPLC同时测定大鼠血浆中马钱子碱和土的宁的浓度[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(11):26.

[6] Hu J, Wu Z, Hu K, *et al.* Preparation and characterization of niosomes of Semen *Strychni* alkaloids extract[J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*,2011,36(14):1955.

[7] Chen X, Lai Y, Cai Z. Simultaneous analysis of strychnine and brucine and their major metabolites by liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry [J]. *J Anal Toxicol*,2012,36(3):171.

[8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:47.

[9] 刘学湘,潘扬,王丽,等.反相离子对HPLC同时测定制马钱子中4种生物碱的含量[J].中国药理学杂志,2010,45(9):698.

[10] Tang HB, Cai HL, Li HD, *et al.* HPLC-DAD method for comprehensive quality control of Semen *Strychni*[J]. *Pharm Biol*,2013,51(11):1378.

[11] 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,2008,16(6):523.

[12] 杨艳娇,刘雅敏,白月明,等.HPLC法测定骨痹舒片中土的宁和马钱子碱的含量[J].风湿病与关节炎,2013,2(12):39.

[13] 王豫辉,胡海廷,牛家萍.HPLC测定腰痛宁胶囊中土的宁的含量[J].中国药理学杂志,1998,33(11):698.

(收稿日期:2013-12-04 修回日期:2014-02-18)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅