

## 反相离子对高效液相色谱法测定疏风活络丸中 4 种生物碱的含量

郭青<sup>1,2</sup>, 孙姗<sup>3</sup>, 吕霞<sup>1</sup>, 王玉<sup>2</sup>, 余伯阳<sup>1\*</sup>

(1. 中国药科大学, 南京 210009; 2 江苏省食品药品检验所, 南京 210008 3 南京中医药大学, 南京 210046)

**摘要** 目的: 建立疏风活络丸中伪麻黄碱、麻黄碱、马钱子碱和土的宁的含量测定方法。方法: 采用 5% 氢氧化钠溶液浸润样品后以三氯甲烷于 70℃ 水浴中回流提取, 以反相离子对高效液相色谱法测定, 采用 C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 分离, 柱温 30℃; 流动相: A 为 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 庚烷磺酸钠与 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾等量混合溶液 (用磷酸调 pH 2.8), B 为乙腈, 梯度洗脱 (0 min 时, A 为 81%, B 为 19%; 30 min 时, A 为 73%, B 为 27%); 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 206 nm。结果: 4 种生物碱成分色谱行为良好, 平均回收率 (n=6) 分别为伪麻黄碱 97.36% (RSD=2.1%), 麻黄碱 97.22% (RSD=2.5%), 马钱子碱 98.65% (RSD=1.3%), 土的宁 97.69% (RSD=1.6%)。结论: 所建立的方法简单易行, 专属性强, 准确性好, 可用于疏风活络丸中活性兼毒性生物碱类成分的质量控制。

**关键词** 疏风活络丸; 伪麻黄碱; 麻黄碱; 马钱子碱; 土的宁; 反相离子对高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)01-0006-04

## Ion pair RP-HPLC determination of 4 alkaloids in Shufeng Huo Luo pills

GUO Qing<sup>1,2</sup>, SUN Shan<sup>3</sup>, LÜ Xia<sup>1</sup>, WANG Yu<sup>2</sup>, YU Bo-yang<sup>1\*</sup>

(1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009 China; 2 Jiangsu Institute for Food and Drug Control Nanjing 210008, China; 3 Nanjing University of Traditional Chinese Medicine Nanjing 210046 China)

**Abstract Objective** To develop a method for the determination of ephedrine, pseudoephedrine, brucine and strychnine in Shufeng Huo Luo pills, a traditional Chinese patent medicine. **Method** The samples were infiltrated with 5% NaOH solution following a reflux extraction with chloroform at 70℃, a ion pair RP-HPLC method was employed to determine the target components in a step gradient elution, a column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) of C<sub>18</sub> with a temperature at 30℃ was used to separate the alkaloids, the mobile solution (pH was adjusted to 2.8 with phosphate acid) composing of 0.01 mol·L<sup>-1</sup> sodium heptanesulfonate solution and equal quantity of 0.01 mol·L<sup>-1</sup> potassium dihydrogen phosphate solution was chosen as mobile phase A and acetonitrile as B to elute in a gradient program of A-B (81:19) at 0 min and A-B (73:27) at 30 min, the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the detection wavelength was at 206 nm. **Results** 4 alkaloids were separated perfectly, the average recoveries (n=6) were 97.36% (RSD=2.1%) for pseudoephedrine, 97.22% (RSD=2.5%) for ephedrine, 98.65% (RSD=1.3%) for brucine and 97.69% (RSD=1.6%) for strychnine. **Conclusions** The developed method, which is simple and practical, demonstrates a good accuracy and specificity, it can be adopted to monitor the active and toxic alkaloids in Shufeng Huo Luo pills.

**Key words** Shufeng Huo Luo pills; ephedrine; pseudoephedrine; brucine; strychnine; ion pair RP-HPLC method; determination

疏风活络丸为传统处方大蜜丸, 由制马钱子、麻黄、虎杖、菝葜、桂枝、木瓜、甘草、防风、秦艽、桑寄生共 10 味中药组成, 全部药味以生粉投料。具有疏风活络、散寒祛湿的功能, 临床用于风寒湿痹, 四肢麻

木、关节、腰背酸痛等症<sup>[1]</sup>, 收载于卫生部药品标准中药成方制剂第 5 册。原标准中质量控制项只有性状、鉴别和检查项, 没有含量测定。方中麻黄和制马钱子为君药, 麻黄主要含麻黄碱和伪麻黄碱, 制马钱

\* 通讯作者 Tel: (025) 83271383 E-mail: boyangyu59@163.com

子主要含马钱子碱和土的宁,这些生物碱类成分既是有效成分,又是毒性成分,应当合理控制。本研究在综合马钱子生物碱和麻黄生物碱液相色谱测定方法的基础上<sup>[2-4]</sup>,采用 5% 氢氧化钠溶液浸润样品后以三氯甲烷于 70 ℃ 水浴中回流提取,反相离子对高效液相色谱法分离,成功建立了同时测定疏风活络丸中伪麻黄碱、麻黄碱、马钱子碱和土的宁含量的方法,4种成分在梯度洗脱下均得到良好分离,尤其是麻黄碱和伪麻黄碱 2 个手性异构体基本达完全分离,从而为疏风活络丸中活性兼毒性生物碱类成分的控制提供了可靠方法和依据。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国), Precisa 92SM-202A 电子天平 (瑞士 Precisa 仪器有限公司)、JL-720DT 超声波清洗仪 (上海杰理超声仪器有限公司)、Satorius BS21S 电子天平 (北京赛多利斯天平有限公司); 色谱柱: Phenomenex Luna C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 庚烷磺酸钠为分析纯,由日本东京化成工业株式会社出品; 磷酸二氢钾为分析纯,由南京化学试剂一厂出品; 硅藻土为化学纯,由汕头市西陇化工厂出品; 乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。疏风活络丸样品 3 批以及缺马钱子和缺麻黄阴性样品各 1 批均由雷允上药业有限公司 (苏州) 提供; 对照品盐酸麻黄碱 (0714-9802)、盐酸伪麻黄碱 (1237-9801)、马钱子碱 (110706-200505) 和土的宁 (110705-200306) 均购自中国药品生物制品检定所。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 采用 C<sub>18</sub> 柱分离,柱温: 30 ℃; 流动相: A 为 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 庚烷磺酸钠与 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾等量混合溶液 (用磷酸调 pH 2.8), B 为乙腈,梯度洗脱 (0 min 时 A 为 81%, B 为 19%; 30 min 时, A 为 73%, B 为 27%); 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 206 nm, 进样量 10 μL。理论板数按土的宁峰计算,不低于 5000, 伪麻黄碱和麻黄碱的分离度不低于 1.2。

**2.2 供试品溶液制备** 取本品 10 丸,精密称定,剪切成细条,取约 10 g 精密称定,再取硅藻土约 5 g 精密称定,与样品混匀后充分研磨,取研匀粉末约 6 g 精密称定,置锥形瓶中,滴加 5% 氢氧化钠溶液约 5 mL,充分振摇湿润,超声 (250 W, 50 kHz) 处理 2 min,精密加入三氯甲烷 50 mL,称重,70 ℃ 水浴回流 2 h 取出,放冷,再称重,用三氯甲烷补足减失重量,充分振摇,通过铺有适量无水硫酸钠的滤器滤过,精

密吸取续滤液 10 mL,置 10 mL 量瓶中,立即氮气吹干,加三氯甲烷-甲醇 (3:7) 溶解并稀释至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液即得。

**2.3 对照品混合溶液制备** 分别取 4 种生物碱对照品,精密称定,盐酸伪麻黄碱和盐酸麻黄碱以甲醇溶解,马钱子碱和土的宁以三氯甲烷溶解,制成每 1 mL 各含 1 mg 的对照品浓溶液,再各精密吸取适量,加甲醇稀释制成与供试品溶液浓度相当的对照品混合溶液 (浓度分别为盐酸伪麻黄碱 25.18 μg·mL<sup>-1</sup>, 盐酸麻黄碱 68.46 μg·mL<sup>-1</sup>, 马钱子碱 33.51 μg·mL<sup>-1</sup>, 土的宁 136.20 μg·mL<sup>-1</sup>)。

### 2.4 方法学验证

**2.4.1 线性试验** 取“2.3”项下对照品浓溶液,制成起始浓度分别为盐酸伪麻黄碱 0.2290 mg·mL<sup>-1</sup>, 盐酸麻黄碱 0.2020 mg·mL<sup>-1</sup>, 马钱子碱 0.2330 mg·mL<sup>-1</sup>, 土的宁 0.2266 mg·mL<sup>-1</sup> 的混合溶液,再稀释成 12 个梯度浓度的系列混合溶液,精密吸取各 10 μL,分别进样测定,以进样浓度 (μg·mL<sup>-1</sup>) 为 X 轴,峰面积值为 Y 轴计算回归方程,选择 r 在 0.9990 以上的线性范围和相应回归方程如表 1。

表 1 4 种生物碱的线性方程、线性范围和相关系数

Tab 1 Regression equation, linear range and coefficient of 4 alkaloids

成分 (component)	线性方程 (regression equation)	线性范围 (linear range) μg·mL <sup>-1</sup>	r
伪麻黄碱 (pseudoephedrine)	Y = 2.701 × 10 <sup>4</sup> X - 1.227	2.52~45.80	0.9991 (n = 7)
麻黄碱 (ephedrine)	Y = 1.817 × 10 <sup>4</sup> X + 13.77	6.85~202.0	0.9993 (n = 9)
马钱子碱 (bucine)	Y = 7.834 × 10 <sup>4</sup> X + 10.29	20.14~151.1	0.9994 (n = 8)
土的宁 (strychnine)	Y = 7.357 × 10 <sup>4</sup> X - 183.5	13.62~194.2	0.9992 (n = 9)

**2.4.2 仪器精密度的试验** 取“2.3”项下对照品混合溶液,连续进样。结果 4 种成分峰面积值的 RSD (n = 5) 分别为 1.2% (伪麻黄碱), 1.5% (麻黄碱), 1.6% (马钱子碱), 1.3% (土的宁)。

**2.4.3 稳定性试验** 取“2.2”项下方法制备的同一份供试品溶液,在相同条件下分别于 0 h, 2 h, 8 h, 16 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h 进样测定,结果峰面积值的 RSD (n = 8) 分别为 3.6% (伪麻黄碱), 2.5% (麻黄碱), 1.2% (马钱子碱), 3.0% (土的宁)。

**2.4.4 重复性试验** 取批号 FB10002 样品,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,6 份,进样测定。

结果, 平均含量 ( $n = 6$ ) 分别为伪麻黄碱  $0.2928 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  (RSD = 2.6%), 麻黄碱  $0.6952 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  (RSD = 3.2%); 马钱子碱  $0.5384 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  (RSD = 2.6%), 土的宁  $1.175 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  (RSD = 1.9%)。

**2.4.5 专属性试验** 分别取缺麻黄和缺马钱子的阴性样品按“2.2”项下方法制备阴性样品溶液, 进样测定, 结果见图 1: 高效液相色谱图中, 缺马钱子阴性样品未出现与马钱子碱和土的宁对照品保留时间相一致的色谱峰, 缺麻黄阴性样品未出现与麻黄碱和伪麻黄碱对照品保留时间相一致的色谱峰。表明样品中除麻黄外其他 9 味药及辅料对麻黄碱、伪麻黄碱无干扰, 除马钱子外其他 9 味药及辅料对马钱子碱、土的宁测定无干扰。此外, 对照品和样品的 30 多份数据显示: 麻黄碱和伪麻黄碱分离度为 1.25 ~ 1.82。

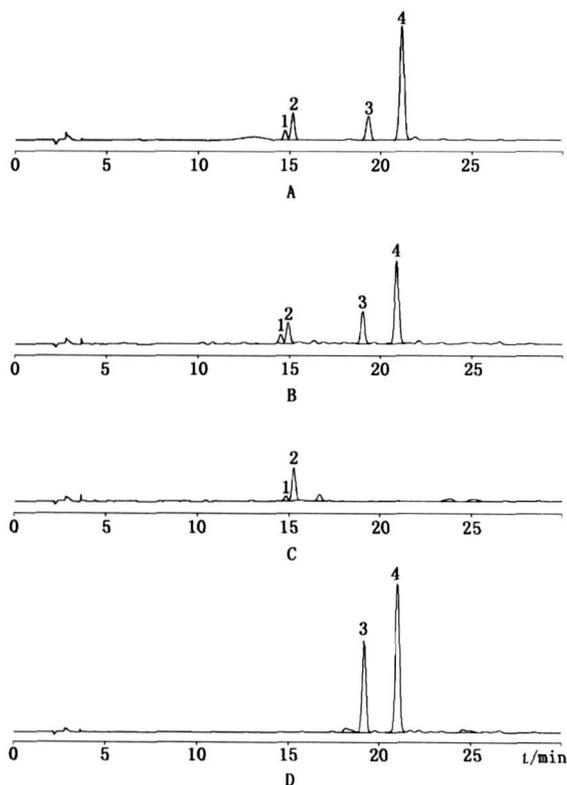


图 1 专属性试验高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of specificity test

A. 对照品 (reference substances) B. 样品 (sample) C. 缺马钱子的阴性样品 (negative sample without Strychnine) D. 缺麻黄的阴性样品 (negative sample without Herba Ephedrae)

1 伪麻黄碱 (pseudoephedrine) 2 麻黄碱 (ephedrine) 3 马钱子碱 (bucine) 4 土的宁 (strychnine)

**2.4.6 回收率试验** 取“2.4.4”项下已测知含量的批号 FB10002 样品, 按照“2.2”项下方法制成粉末, 取 3 g 精密称定, 精密加入浓度分别为 0.687

$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (盐酸伪麻黄碱)、 $1.515 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (盐酸麻黄碱)、 $0.906 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (马钱子碱) 和  $1.553 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (土的宁) 的对照品混合溶液 1 mL, 挥干后, 按“2.2”项下方法制备溶液, 进样测定, 计算回收率。结果平均回收率 ( $n = 6$ ) 分别为伪麻黄碱 97.36% (RSD = 2.1%), 麻黄碱 97.22% (RSD = 2.5%), 马钱子碱 98.65% (RSD = 1.3%), 土的宁 97.69% (RSD = 1.6%)。

**2.5 含量测定** 取样品分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 每批制备 2 份溶液, 每份进样测定 2 次, 外标一点法计算, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 ( $\text{mg} \cdot \text{丸}^{-1}$ ,  $n = 4$ )

Tab 2 The result of sample determination (mg per pill  $n = 4$ )

批号 (Lot No)	伪麻黄碱 (pseudoephedrine)	麻黄碱 (ephedrine)	马钱子碱 (bucine)	土的宁 (strychnine)
FB 10001	1.918	5.680	4.033	8.687
EB 10002	0.5419	5.510	4.912	7.026
FB 10002	2.283	5.450	4.305	9.330

### 3 讨论

**3.1** 4 种生物碱均有很强的末端吸收, 尽管马钱子碱在 265 nm, 土的宁在 254 nm 另有次强吸收, 麻黄碱和伪麻黄碱在 258 nm 处也有弱吸收, 但为达最高检测灵敏度, 本文选择 206 nm 波长进行检测, 结果是可行的, 4 种生物碱色谱行为无杂质干扰。

**3.2** 采用缓冲盐溶液离子对色谱分析增强了生物碱类成分的选择性, 既排除了其他成分的干扰, 又可将性质非常相近的生物碱组分彼此分开。在中国药典马钱子含量测定项下流动相组成<sup>[2]</sup>的基础上, 通过流动相强度由高到低筛选梯度洗脱程序, 最终选择了合适的梯度范围, 在保证分离的前提下, 进一步合理控制各生物碱成分的出峰时间。

**3.3** 伪麻黄碱和麻黄碱的分离度会随浓度发生变化, 当 2 个成分的浓度均低于约  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 分离度可达 2.0 但随着其中 1 个成分的浓度增大, 分离度会逐渐下降; 2 个成分浓度一起上升时, 分离度会很快下降, 当 2 个成分浓度均达约  $90 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  以上时, 分离度降至 1.1 以下。

**3.4** 本实验中样品为大蜜丸, 需加入硅藻土吸附糖蜜, 以便于研磨取样和提取。取样量按大蜜丸、硅藻土、研匀后粉末三者的精确称重来折算。

**3.5** 土的宁, 尤其是马钱子碱在 30 ~ 36 °C 室温下保存在三氯甲烷溶液中时间不宜太长, 易发生分解, 应及时处理使保留在甲醇溶液或甲醇与三氯甲烷混

合溶液中, 并置 10 °C 以下保存。

**3.6 供试品溶液制备时, 最后残渣用纯甲醇、甲醇与三氯甲烷混合溶液溶解时, 可导致吸收值发生变化, 4种生物碱在纯甲醇溶液中的吸收值均比较低, 实验中应注意合理选择溶剂, 并尽量保证对照品与样品所用溶剂一致。**

**3.6 研究比较了超声与回流 2种不同提取方法对提取效率的影响, 结果显示回流提取率较高。但小分子的游离麻黄碱、伪麻黄碱具挥发性, 溶解性特殊, 既溶于水又溶于三氯甲烷, 提取时应避免水浴温度过高, 同时在加热及冷却过程中, 尽量减少敞口处理样品; 此外, 5% 氢氧化钠溶液加入量应严格控制, 否则成为液液分配萃取, 导致三氯甲烷不能从水溶液中将它们全部萃取出来, 采用氢氧化钠碱化, 有利于生物碱从水溶液中盐析, 易于被三氯甲烷萃取。**

#### 参考文献

- 1 Drug Specification Promulgated by the Ministry of Public Health, P.R. China (卫生部药品标准). Traditional Chinese Patent Medicines (中药成方制剂). 1999. Section 5 (第 5册): 189
- 2 ChP (中国药典). 2005. Vol I (一部): 34
- 3 ZENG Jia (曾佳), LI Yan (李艳), YANG Ai-qun (杨爱群). Determination of the concentration of ephedrine hydrochloride in blood drug by ion pair- HPLC (离子对- 高效液相色谱法测定盐酸伪麻黄碱的血药浓度). *Sun Yatsen Univ Forum* (中山大学学报论丛), 2006, 28(12): 193
- 4 LIU Tao (刘涛), WANG Xiao-hui (王晓辉), ZHAO Yun-li (赵云丽), et al. Determination of ephedrine and pseudoephedrine in Maxingshigan Tang by ion pair- HPLC (离子对色谱法测定麻杏石甘汤中的麻黄碱和伪麻黄碱). *Chin J Chromatogr* (色谱), 2006, 24(4): 417

(本文于 2008年 3月 6日收到)

## 欢迎订阅 2009年《药物分析杂志》

《药物分析杂志》是由中国科学技术协会主管, 中国药学会主办, 中国药品生物制品检定所药物分析杂志编辑部编辑出版的学术性期刊。主要栏目有研究论文、交流、综述等。报道化学药物、中药与天然药物、抗生素、蛋白质、多肽类药物、生物技术药物等的分析、质量标准研究、临床药物分析、药物分析基础理论与实践以及新方法、新技术的应用, 并及时报道国家重大研究课题的最新成果。

本刊获 2006年、2007年、2008年中国科协精品科技期刊工程项目 C类资助。

本刊为我国自然科学核心期刊, 被国内外主要检索系统收录。

本刊坚持质量第一, 面向广大读者, 以其独特的深度与广度展示我国药物分析的现状与发展。

本刊 2005年开始由双月刊改为月刊, 大 16开本, 每期 126页, 国内外公开发行。每期定价 20元, 全年定价 240元, 国内邮发代号: 2- 237, 国外读者请同中国国际图书贸易总公司 (中国国际书店, 北京 399信箱) 联系。欢迎广大读者到当地邮局订阅, 并欢迎有关专业人员集体订购, 价格从优。

本刊已将创刊以来的文章制成光盘, 需要者请与本刊联系。

希望为本刊推广发行者, 价格另议。

地址: 北京市天坛西里 2号 (100050) 联系人: 刘小帅

电话: (010) 67058427 传真: (010) 67012819

编辑部网址: [www.ywfxzz.cn](http://www.ywfxzz.cn) 浏览网址: [www.nicpbp.org.cn](http://www.nicpbp.org.cn) E-mail: [ywfx@nicpbp.org.cn](mailto:ywfx@nicpbp.org.cn)

《药物分析杂志》编辑部