

探讨液相色谱中部分中药生物碱在 SCX 柱上的色谱分离行为

刘琼¹, 姜舜尧², 田颂九³ (1. 浙江英特药业有限责任公司, 浙江 杭州 310006; 2. 浙江省药品监督管理局, 浙江 杭州 310012; 3. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要:目的 运用 HPLC 法以微粒 SCX 色谱柱对中药中的一些亲水性生物碱成分进行分离分析, 并考察它们在 SCX 柱上的色谱机制。方法 选用 Spherisorb SCX 色谱柱。流动相选用不同离子浓度和 pH 的磷酸盐溶液, 分析麻黄碱类时流动相中加入少量乙腈。测定鲜益母草胶囊中的水苏碱, 使君子药材中的胡芦巴碱, 半夏露糖浆中的麻黄碱、伪麻黄碱。结果 选择适当的色谱条件, 以上成分可以分离测定。各成分在 SCX 柱上除离子交换保留机制外还有其他保留机制。尽管流动相 pH 变化可影响测定成分的质子化带电情况, 但以含盐水溶液为流动相, 测定物 pKa 值无法用于指示流动相 pH 在何处时其保留因子开始迅速变化(增加)。结论 SCX 柱可作为 C₁₈ 柱的补充, 用于测定中药中一些亲水性生物碱成分, 并可提供这些生物碱类成分的指纹图谱信息。

关键词: 水苏碱; 胡芦巴碱; 麻黄碱; 伪麻黄碱; SCX 修饰硅胶; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.01; TQ464.4 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2004)01-0064-04

Analysis of some alkaloids in Chinese traditional medicine using HPLC on microparticulate strong cation exchange materials

LIU Qiong¹, JIANG Shun-yao, TIAN Song-jiu (1. Zhejiang Int'l Medicine Co. Ltd., Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate sulfonic acid (SCX)-modified silica column in liquid chromatography for the separation of some alkaloids in Chinese traditional medicine. **METHOD** SCX-modified silica HPLC columns together with phosphate-aqueous eluents was used. The analytes studied were as follows: 1. stachydrine in fresh motherwort herbs capsule, 2. trigonelline in the seed of *Quisqualis indica*, 3. ephedrine and pseudoephedrine in Banxialu syrups, a preparation composed of 9 different TCM including *Herba Ephedrae*. **RESULTS & CONCLUSION** SCX-modified silica HPLC column used with aqueous buffer eluents of appropriate pH and ionic strength can give these hydrophilic alkaloids appropriate retentions and good separations. In the eluents system studied, although eluent pH influenced retention(k) via protonation of basic analytes, the pKa of the analytes could not indicated the pH where retention(k) begins to vary dramatically(increase). The underlying retention mechanism appears to be ion exchange with the SCX moieties, while other contribution to retention also exist especially dominant at higher eluent pH values. As for stachydrine and trigonelline, these analytes that can obtained appropriate retentions on SCX-modified silica column were poorly retained on C₁₈ column even with aqueous buffer eluents. More studies indicated that SCX-modified silica column can be used to give useful chromatographic fingerprints for the analysis of some alkaloids in Chinese traditional medicine.

KEY WORDS: stachydrine; trigonelline; ephedrine; pseudoephedrine; SCX-modified silica; HPLC

阳离子交换色谱柱(SCX)是以微粒硅胶为基质的表面再键合磺酸基团而得, 这种色谱柱已广泛应用于含碱基化合物的分析。关于 SCX 柱色谱分离机制, 曾有报道应用无定型微粒硅胶为基质制成的 Partisil SCX 柱, 分析了 30 种化学药物在柱上的色谱分离行为及其机制^[1], 后有报道研究了碱性化合物在球形微粒硅胶柱上与未修饰硅醇基团所存在的离子交换保留机制^[2-5], 之后研究者又进一步研究了以此硅胶为基质修饰而得的 Spherisorb SCX 柱, 用含一定离子浓度的非水或含少量水的有机溶剂作为流动相, 分析了一些碱性药物和季胺化合物在 SCX 柱上的色谱机制^[6,7]。本实验即采用 Spherisorb SCX 柱, 以磷酸盐溶液(或加入少量有机溶媒)为流动相, 对中药中的一些亲水性小分子生物碱类成分作了分离分析, 并初步考察了这些成

分在 SCX 柱上的色谱分离行为及其机制。

1 仪器及试剂

Agilent 1100 高效液相色谱系统: GI 311 A 四元泵, GI 322 A 脱气机, GI 313 A 自动进样器, GI 314 紫外可见检测器, GI 315 B 二极管阵列检测器, GI 316 柱温箱, A08.03 版 Agilent 化学工作站。

对照品盐酸水苏碱、胡芦巴碱、盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱均由中国药品生物制品检定所提供。鲜益母草胶囊系鲜品益母草药材经匀浆加工制得的单味制剂, 浙江省中药研究所提供; 使君子仁(饮片)为药店购买, 药检所检定; 半夏露糖浆由含麻黄药味在内的 9 味中药组成, 杭州天目山制药有限公司提供。乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 重蒸馏水。

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Spherisorb SCX(150 mm × 4.6 mm, 5 μm, 大连伊利特公司), 流动相: 分析水苏碱的流动相为 100 mmol·L⁻¹ 磷酸盐溶液(pH 5.5), 分析胡芦巴碱的流动相为 20 mmol·L⁻¹ 磷酸盐溶液(pH 3.2), 分析麻黄碱、伪麻黄碱的流动相为 75 mmol·L⁻¹ 磷酸盐溶液(pH 7.0)-乙腈(85:15), 流速均为 1.0 mL·min⁻¹, 各流动相 pH 值均以一定的同离子浓度的磷酸溶液、磷酸二氢钠溶液、磷酸氢二钠溶液调节而成。检测波长: 水苏碱、胡芦巴碱、麻黄碱(伪麻黄碱) 分别为 192, 265, 206 nm。

2.2 实验溶液的制备

2.2.1 对照品 精密称取盐酸水苏碱、胡芦巴碱、盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱对照品适量, 分别加适当溶剂制成各对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 1. 鲜益母草胶囊 称取样品内容物 0.75 g, 置索氏提取器中, 加乙醇回流提取 8 h, 提取液蒸干, 残渣加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 10 mL 使溶解, 加活性炭适量加热脱色, 滤过, 滤液置 25 mL 量瓶中, 用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液定容, 再用水稀释 5 倍, 即得。2. 使君子仁 称取样品粉末 0.3 g, 加入 70% 甲醇溶液 25 mL, 静止 3 h, 超声提取 40 min, 用 70% 甲醇补足损失的溶剂, 滤过, 即得。3. 半夏露糖浆 称取样品 25 g, 置蒸馏瓶中, 加水 10 mL, 加氯化钠 7.5 g 和 20% 氢氧化钠溶液 100 mL, 蒸馏, 用预先盛有 0.5 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 5 mL 的 100 mL 量瓶收集蒸馏液近 95 mL, 加水至刻度, 摇匀, 即得。

3 实验结果与讨论

3.1 供试品色谱分离

在各色谱条件下, 各供试品的色谱分离结果。见图 1~3。

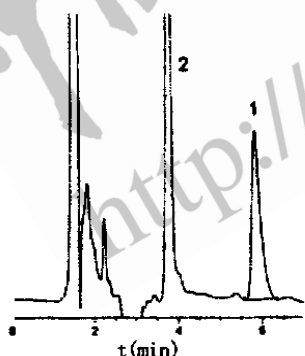


图 1 鲜益母草胶囊供试溶液 HPLC 分离图谱

Fig 1 HPLC chromatogram of extract of fresh motherwort herbs capsule

1. 水苏碱(stachydrine) 2. 未知成分 I (unknown compound I)

2.2 流动相 pH 对测定成分保留因子的影响

按上述各分离色谱条件下各种流动相磷酸盐摩尔浓度, 以同摩尔浓度的磷酸溶液、磷酸二氢钠溶液、磷酸氢二钠溶液, 互相调节配制不同 pH 值的等摩尔浓度的磷酸盐溶液, 作为流动相各自测定各分析物的保留因子, 以流动相不同 pH 条件下所得各分析物的保留因子变化作图 4。

中国现代应用药学杂志 2004 年 2 月第 21 卷第 1 期

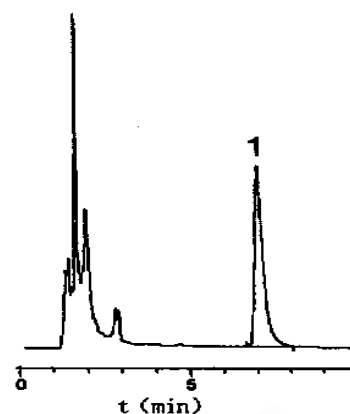


图 2 使君子仁供试溶液 HPLC 分离图谱

Fig 2 HPLC chromatogram of extract of the seed of *Quisqualis indica*

1. 胡芦巴碱(trigonelline)

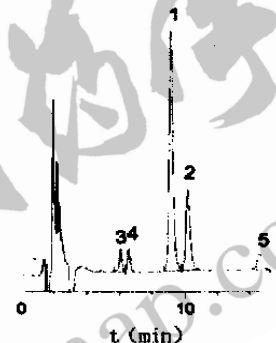


图 3 半夏露糖浆供试溶液 HPLC 分离图谱

Fig 3 HPLC chromatogram of extract of Banxialu syrup

1. 麻黄碱(ephedrine) 2. 伪麻黄碱(pseudoephedrine) 3~5. 未知成分 I、II、III(unknown compound I、II、III)

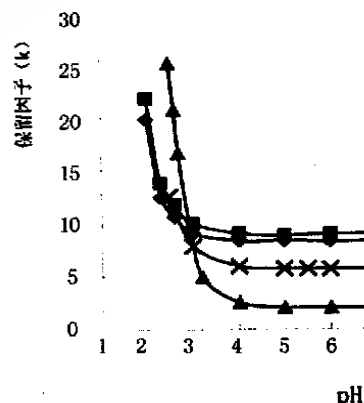


图 4 一定离子浓度的流动相其 pH 变化对分析物保留因子的影响

Fig 4 Effect of eluent pH on the retention(*k'*) of analytes at constant ionic strength

■ 伪麻黄碱, 流动相为不同 pH 值的 75 mmol·L⁻¹ 磷酸盐溶液-乙腈(85:15); ◆ 麻黄碱, 流动相同伪麻黄碱; × 水苏碱, 流动相为不同 pH 值的 100 mmol·L⁻¹ 磷酸盐溶液; ▲ 胡芦巴碱, 流动相为不同 pH 值的 20 mmol·L⁻¹ 磷酸盐溶液

■ pseudoephedrine, with the eluent consisting of 75 mmol·L⁻¹ phosphate solution-acetonitrile(85:5); ◆ ephedrine, with the same eluent

as for pseudoephedrine; × stachydrine, with the eluent containing $100 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate solution; ▲ trigonelline, with the eluent containing $20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate solution

可看出,各测定成分的保留因子变化在流动相 pH 一定值以上基本不受其影响,低于该 pH 值则随流动相 pH 降低而迅速增加,该曲线图与先前研究者以非水有机溶媒(含一定离子浓度)作为流动相分析所得的曲线图有差异,后者亦采用 Spherisorb SCX 柱,但所分析的一些碱性药物在非水溶液流动相 pH 低于某一值时其保留因子变化趋于平坦,另分析物 pK_a 值可用于指示流动相 pH 上升至何值时其保留因子开始迅速下降^[7,8],而本图谱中以伪麻黄碱为例,曲线变化拐点处其流动相 pH 约为 3.0,与其 pK_a 值(9.22)^[8]差异很大。

3.3 流动相离子浓度对测定成分保留因子的影响

以各种同摩尔浓度的磷酸溶液、磷酸二氢钠溶液、磷酸氢二钠溶液,互相调节配制成具一定 pH 值的各种等摩尔浓度的磷酸盐溶液,作为流动相或流动相中含盐水溶液部分,其需调节的 pH 为各分离色谱条件下各流动相的 pH 值;另在分析水苏碱成分时,增加了流动相为 pH 3.0 点处进行分析。以上各流动相各自测定各分析物的保留因子,以磷酸盐浓度的倒数与各分析物的保留因子变化作图 5。

可看出,除分析水苏碱的流动相 pH 5.5 外,其余各流动相的离子浓度倒数与各分析物的保留因子变化可成一斜率为正值的直线,表明此时各分析物与 SCX 柱存在着离子交换保留机制,其截距说明还存在着除离子交换作用以外的保留机制^[1-3,5-7],而分析水苏碱在其流动相 pH 5.5 时,所得的直线斜率为负值,表明这时保留机制已不存在离子交换作用(存在盐析作用)^[1,3,5,6]。另外,图中可看出,分析水苏碱、胡芦巴碱成分所得的直线斜率很小,分析原因为直线斜率正比于分析物的离子交换平衡常数及柱填料的离子交换能力^[4],而水苏碱和胡芦巴碱成分分子结构均为带羧基的弱碱, pK_a 值小,与柱的离子交换保留能力差,保留因子小^[5]。

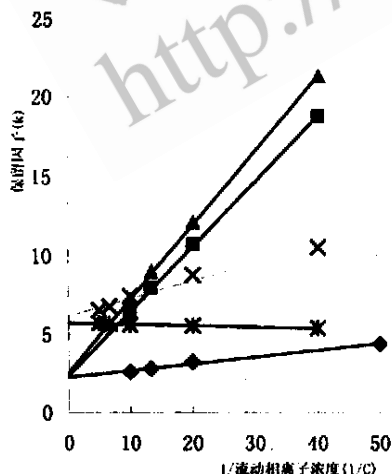


图 5 流动相(pH 相同)不同离子浓度对各分析物保留因子(k)的影响

Fig 5 Effect of eluent ionic strength on the retention(k) of

analytes at constant pH

▲ 伪麻黄碱,流动相为 pH 为 7.0 的不同离子浓度的磷酸盐溶液-乙腈(85:15); ■ 麻黄碱,流动相同伪麻黄碱; × 水苏碱,流动相 pH 为 3.0 的不同离子浓度的磷酸盐溶液; * 水苏碱,流动相 pH 为 5.5 的不同离子浓度的磷酸盐溶液; ◆ 胡芦巴碱,流动相 pH 为 3.2 的不同离子浓度的磷酸盐溶液

▲ pseudoephedrine, with the eluent consisting of phosphate solution (pH 7.0)-acetonitrile (85:15); ■ Ephedrine, with the same eluent as for pseudoephedrine; × stachydrine, with the eluent containing phosphate solution (pH 3.0); * stachydrine, with the eluent containing phosphate solution (pH 5.5); ◆ trigonelline, with the eluent containing phosphate solution (pH 3.2)

3.4 同 C_{18} 柱比较

实验发现水苏碱、胡芦巴碱在 C_{18} 柱上的保留能力很小,即使采用水或磷酸盐溶液作为流动相,也无法使这二成分在柱上获得一定的保留,因此无法与中药中的其它杂质分离。而麻黄碱、伪麻黄碱在 C_{18} 柱上用适宜的流动相即能获得一定的保留,并与半夏露糖浆供试品中的其它成分分离完全。实验表明采用这两种色谱柱测定这二成分的含量结果一致。

3.5 色谱指纹识别

半夏露糖浆供试品用 SCX 柱测定,其图 3 色谱中有 5 个指纹峰成分,较采用 C_{18} 柱测定所得要少,这是因为以 SCX 柱分离,酸性和中性成分不保留或很少保留^[6,7],实验同时研究了流动相 pH 值和离子浓度变化对另 3 个指纹峰(峰 3~5)保留因子的影响,结果表明峰 3~5 的色谱保留行为同图 4、图 5 中的麻黄碱、伪麻黄碱所得结果一致,可证实这些成分均与 SCX 柱存在着离子交换作用机制,判断为带碱基化合物,另外,缺麻黄空白对照证明峰 3~5 成分为麻黄药味中所特有,麻黄药材供试品(制备方法同半夏露糖浆供试品)用 SCX 柱测定分离所得指纹图谱与图 3 完全一致,同时二极管阵列扫描表明峰 3~5 与麻黄碱、伪麻黄碱的紫外光谱一致,故可推测峰 3~5 成分均为麻黄碱类生物碱,因此采用 SCX 柱分析可较直观得到半夏露糖浆中所含生物碱类成分的信息。

另外,实验也用同样方法证明鲜益母草供试品色谱中另一主峰成分(图 1 中峰 2)亦为带碱基化合物,故在色谱中所显示的二个主峰成分均为带碱基化合物;另外,我们应用 CZE 法分析益母草供试品所得的电泳图上也仅显示二个带正电荷的主峰^[9],可见这两种均适用于测定带正电成分的分析方法所得分离图谱有相似点。

参考文献

- [1] Twitchett PJ, Gorvin AE, Moffat AC. High-pressure liquid chromatography of drugs. II. An evaluation of a microparticulate cation-exchange column[J]. J Chromatogr, 1976, 120: 359.
- [2] Flanagan RJ, Jane I. High-performance liquid chromatographic analysis of basic drugs on silica columns using non-aqueous ionic eluents. I. Factors influencing retention, peak shape and de-

tector response[J]. J Chromatogr , 1985 ,323 :173 .

- [3] Cox GB, Stout RW. Study of the retention mechanisms for basic compounds on silica under “ pseudo-reversed-phase” conditions[J]. J Chromatogr .1987 ,384 :315 .
- [4] Law B. Analysis of basic compounds on a silica column with an aqueous methanol eluent . The use of quantitative structure-retention relationships in metabolite identification[J]. J Chromatogr , 1987 ,407 :1 .
- [5] Nawrocki J. The silanol group and its role in liquid chromatography(Review)[J]. J chromatogr A, 1997 ,779 :29 .
- [6] Croes K, McCarthy PT, Flanagan RJ. HPLC of basic drugs and quaternary ammonium compounds on microparticulate

strong cation-exchange materials using methanolic or aqueous methanol eluents containing an ionic modifier[J]. J Chromatogr A.1995 ,693 :289 .

- [7] Flanagan RJ, Harvey EJ, Spencer EP. HPLC of basic drugs on microparticulate strong cation-exchange materials-a review[J]. Forensic Sci Int ,2001 , 121 :97 .
- [8] Merck Index[M].12th ed. Merck ,Rahway ,NJ,1996 :611 .
- [9] 姜舜尧,田颂九,陈碧莲,等.几种中药生物碱的毛细管区带电泳分析.现代药物分析论坛[M].香港:世界医药出版社,1999 :128 .

收稿日期:2002-10-25