

# 以离子液体为流动相添加剂测定香连丸中 3 种生物碱

朱益雷<sup>1,2</sup>, 方海红<sup>2,3</sup>, 魏惠珍<sup>1,2</sup>, 刘晟楠<sup>1</sup>, 段奕倩<sup>1</sup>, 龚明<sup>2</sup>, 饶毅<sup>1</sup>

(1. 江西中医药大学药学院, 南昌 330006; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006; 3. 江西科技师范大学药学院, 南昌 330013)

**[摘要]** 目的:建立离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐为流动相添加剂测定香连丸中小檗碱、药根碱和巴马汀 3 种主要生物碱含量的方法。方法:以月旭 Ultimate XB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)分离,考察离子液体浓度的影响,以及与传统三乙胺(TEA)作为添加剂进行比较。结果:离子液体加入到流动相中能改善 C<sub>18</sub> 柱分离色谱柱的峰型,提高分离度,并且效果优于传统的三乙胺类添加剂。结论:该法可用于同时测定香连丸中多种生物碱。

**[关键词]** 香连丸; 1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐; 流动相添加剂; 生物碱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)12-0075-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016120075

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160512.1622.028.html>

**[网络出版时间]** 2016-05-12 16:22

## Determination of Three Alkaloids in XianglianPills with Ionic Liquids as Mobile Phase Additives

ZHU Yi-lei<sup>1,2</sup>, FANG Hai-hong<sup>2,3</sup>, WEI Hui-zhen<sup>1,2</sup>, LIU Sheng-nan<sup>1</sup>,  
DUAN Yi-qian<sup>1</sup>, GONG Ming<sup>2</sup>, RAO Yi<sup>1</sup>

(1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China;  
2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China)  
3. School of Pharmacy, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330013, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method to determine the contents of three alkaloids (berberine, jatrorrhizine and palmatine) in Xianglian pills with ionic liquids [BMIM] PF<sub>6</sub> as mobile phase additives. **Method:** The effect of ionic liquid concentration was investigated by using the Ultimate XB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column for separation, and compared with traditional triethylamine (TEA) additives then. **Result:** Ionic liquid added to the mobile phase could improve the peak pattern of C<sub>18</sub> separative chromatographic column, improve the separation degree, and the effect was better than that of traditional triethylamine additives. **Conclusion:** This method can be used for the simultaneous determination of a variety of alkaloids in Xianglian pills.

**[Key words]** Xianglian pills; [BMIM] PF<sub>6</sub>; mobile phase additives; alkaloid

**[收稿日期]** 201511180(012)

**[基金项目]** 江西省科技厅青年科学基金项目(20132BAB215024);江西省教育厅科研项目(GJJ13580);江西省研究生创新专项(YC2015-S348);江西中医药大学校级硕士研究生创新专项(JZYC15S26);江西中医药大学校级博士研究生创新专项(JZYC15B03)

**[第一作者]** 朱益雷,在读硕士,从事中药分析研究,Tel: 0791-7119609, E-mail: zhuyi1991@163.com

**[通讯作者]** \* 饶毅,教授,博士生导师,从事中药分析研究,Tel: 0791-7119609, E-mail: fxs\_ry021228@126.com

离子液体(ionic liquids, ILs)是近年来发展起来的一种由有机阳离子(咪唑类盐离子、吡啶类盐离子、季铵盐离子等)和无机阴离子(卤素离子、四氟硼酸离子、六氟磷酸离子)组成的一种绿色溶剂。作为一种新型溶剂,由于其独特的性能被广泛应用于分析化学的各个领域中<sup>[1-7]</sup>。近期研究结果表明<sup>[2-4]</sup>,把离子液体作为有效成分的萃取剂能提高萃取效率,避免有机试剂对环境的污染,减少对人体的伤害,离子液体在中药领域的应用越来越广泛。

香连丸含有萸黄连和木香 2 种药材,具有行气止痛、清热化湿等功效。目前,市售的香连丸种类繁多,质量有所差异,使得疗效无法得到保证。2015 年版《中国药典》只对其中盐酸小檗碱含量进行了测定,其他药效成分未予控制<sup>[8-9]</sup>,有文献报道采用 HPLC 法分离测定香连丸中多种成分。生物碱类盐酸小檗碱、盐酸药根碱和盐酸巴马汀是该制剂中萸黄连的主要有效成分<sup>[10]</sup>,而此 3 种生物碱都含有季铵氮,碱性很强。当采用反相高效液相色谱法时,由于柱中存在少量的硅羟基,分离碱性物质时,会与物质产生较强的吸附作用,色谱峰明显有拖尾现象。近年来,采用离子液体作为添加剂在反相液相色谱流动相的研究急剧增加,董影杰等<sup>[10]</sup>发现以离子液体作为流动相添加剂分离测定水杨酸时可明显提高检测灵敏度,抑制有机水相所造成的色谱峰拖尾,同时也减小了对色谱柱和仪器的损害。边敏等<sup>[11]</sup>同样采用离子液体作为流动相添加剂分离测定辣椒类生物碱,结果表明当向流动相中加入由高疏水性的长烷基链阳离子和高离液序阴离子组成的离子液体时,可改善各组分的峰形,提高分离效率,与此同时探讨了其分离机制。目前应用最广泛的是咪唑类离子液体<sup>[11-13]</sup>,本试验主要是将咪唑类离子液体作为高效液相色谱流动相添加剂分离测定香连丸中 3 种生物碱。

## 1 仪器和试剂

2695 型高效液相色谱仪(Waters 公司),Mili-Q 超纯水仪(Milipore 公司),AUW2200 型 1/10 万电子分析天平(日本岛津公司),AB104-N 型 1/万天平(梅特勒-托利多公司),KQ3200 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司),PB-10 型 pH 计(sartorius 公司)。

乙腈色谱纯,甲醇、磷酸、磷酸二氢钾分析纯;离子液体为 1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐([BMIM]PF<sub>6</sub>),购置于兰州中科凯特科工贸有限公司(纯度不低于 99%);盐酸小檗碱(批号 110713-200609),

盐酸药根碱(批号 0733-200005),盐酸巴马汀(批号 0732-200005)购于中国食品药品检定研究院;香连丸(湖北诺得胜制药有限公司,批号 140901,140902,150101)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 月旭 C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-20 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾溶液(B)(30:70),磷酸调 pH 到 3.0,体积流量 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样体积 10 μL,检测波长 348 nm,柱温为室温。另向流动相中加入 10 mmol·L<sup>-1</sup>的离子液体([BMIM]PF<sub>6</sub>)为添加剂。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液** 取盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀对照品适量,精密称定,分别置于 10 mL 的量瓶中,加盐酸-甲醇(1:100)溶解并稀释至刻度,摇匀,得 3 种对照品储备液,各取 5 mL 至 25 mL 量瓶中,稀释定容,摇匀得到混合对照品溶液(盐酸小檗碱 40.6 mg·L<sup>-1</sup>,盐酸药根碱 79.2 mg·L<sup>-1</sup>,盐酸巴马汀 41.3 mg·L<sup>-1</sup>)。混合液保存于冰箱,使用前放置至室温,0.45 μm 滤膜过滤。

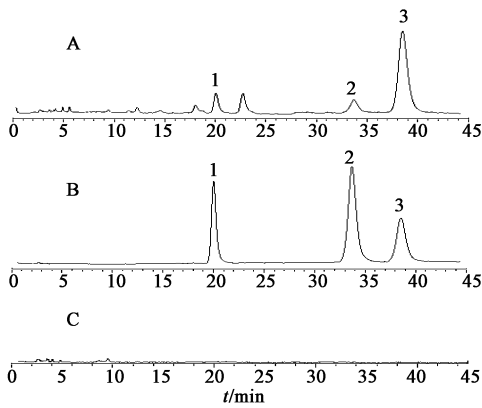
**2.2.2 供试品溶液** 取香连丸适量,研细,取 0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加盐酸-甲醇(1:100)的混合溶液 250 mL,密塞,称定质量,超声(功率 120 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,盐酸-甲醇用(1:100)补足减失的质量,摇匀,静置取上清液过 0.45 μm 的微孔滤膜。

**2.2.3 阴性样品溶液** 取木香粉末 0.02 g,按 2.2.2 项下方法制得不含萸黄连阴性样品溶液。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 系统适用性考察** 分别精密吸取盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀对照品溶液,供试品溶液各 10 μL 注入高效液相色谱仪,采用 2.1 项下色谱条件(选定离子液体浓度为 10 mmol·L<sup>-1</sup>)检测各样品的色谱图,见图 1。结果表明,供试品溶液与对照品溶液在相同时间均有对应峰出现。

**2.3.2 线性关系考察** 精密移取混合对照品溶液 0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL 于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度。按 2.1 项下色谱条件测定,以对照品进样量为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,得到盐酸药根碱、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀的回归方程分别为  $Y = 1.129 \times 10^6 X - 1.208 \times 10^5$  ( $r = 0.9997$ );  $Y = 1.279 \times 10^6 X - 2.834 \times 10^5$  ( $r = 0.9999$ );  $Y = 9.330 \times 10^5 X - 3.496 \times 10^5$  ( $r = 0.9993$ ),盐酸药根碱在 3.96 ~ 39.60 mg·L<sup>-1</sup>,盐酸



1. 盐酸药根碱; 2. 盐酸巴马汀; 3. 盐酸小檗碱  
图 1 香连丸样品(A), 混合对照品(B)和阴性样品(C) HPLC  
Fig. 1 HPLC of Xianglian pills (A), mixed reference substances (B) and negative reference substances (C)

小檗碱在  $2.03 \sim 20.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 盐酸巴马汀在  $2.07 \sim 20.65 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  线性关系良好。

**2.3.3 精密度试验** 吸取 3 种生物碱混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 分别测定, 结果盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀峰面积的 RSD 分别为 1.3%, 1.7%, 0.6%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.4 重复性试验** 取香连丸样品 6 份, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 结果盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀的质量分数分别为 44.3, 5.3, 5.3  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 分别为 1.4%, 1.3%, 1.8%, 表明该方重复性良好。

**2.3.5 稳定性试验** 取香连丸供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 24 h 进样  $10 \mu\text{L}$  测定, 结果盐酸小檗碱、盐酸药根碱和盐酸巴马汀峰面积的 RSD 分别为 0.7%, 0.5%, 1.0%, 表明供试品液中盐酸小檗碱、盐酸药根碱和盐酸巴马汀在 24 h 内稳定。

**2.3.6 加样回收率试验** 取 6 份已知含量香连丸样品粉末各 0.05 g, 分别加入盐酸小檗碱、盐酸药根碱和盐酸巴马汀对照品溶液适量, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 进样  $10 \mu\text{L}$  测定, 结果盐酸小檗碱、盐酸药根碱和盐酸巴马汀的平均回收率分别为 100.74%, 98.92%, 98.15%, RSD 分别为 0.3%, 1.2%, 1.8%。见表 1。

**2.3.7 样品含量测定** 取 3 个不同批次的样品按 2.1.2 项下方法分别制备供试品溶液, 进样测定, 计算各批次中 3 种生物碱的含量。结果见表 2。

### 3 讨论

**3.1 流动相添加剂的考察** 离子液体与三乙胺的比较 三乙胺之所以能够减少拖尾, 是因为它能质子化生成阳离子, 被色谱柱固定相上的硅羟基吸附。

表 1 香连丸中 3 种生物碱的加样回收率试验

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
盐酸小檗碱	0.050 1	2.220 1	2.215	4.455 1	100.90	100.74	0.3
	0.050 1	2.219 6	2.215	4.444 6	100.45		
	0.049 9	2.211 5	2.215	4.438 5	100.54		
	0.050 2	2.225 4	2.215	4.448 4	100.36		
	0.050 1	2.217 4	2.215	4.456 4	101.08		
	0.050 0	2.214 4	2.215	4.454 4	101.13		
盐酸药根碱	0.050 1	0.254 0	0.265	0.517 1	99.28	98.92	1.2
	0.050 1	0.265 5	0.265	0.532 4	100.72		
	0.049 9	0.264 6	0.265	0.528 3	99.52		
	0.050 2	0.265 0	0.265	0.523 6	97.59		
	0.050 1	0.265 6	0.265	0.527 4	98.80		
	0.050 0	0.264 1	0.265	0.522 7	97.59		
盐酸巴马汀	0.050 1	0.265 8	0.265	0.525 5	98.00	98.15	1.8
	0.050 1	0.264 6	0.265	0.531 6	100.75		
	0.049 9	0.265 8	0.265	0.521 5	96.50		
	0.050 2	0.266 1	0.265	0.522 5	96.75		
	0.050 1	0.263 8	0.265	0.527 5	99.50		
	0.050 0	0.266 2	0.265	0.524 4	97.43		

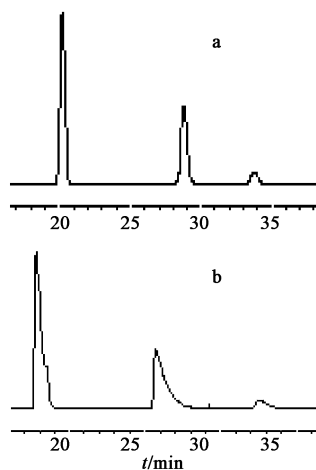
表 2 香连丸中 3 种生物碱的质量分数

批号	小檗碱	药根碱	盐酸巴马汀
140901	44.3	5.3	5.3
140902	43.8	5.0	4.7
150101	47.1	5.7	5.5

而离子液体 [BMIM]PF<sub>6</sub> 同样能在酸性条件下解离成咪唑阳离子和阴离子 PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, 而咪唑类阳离子可以抑制硅羟基作用。分别向流动相加入 5 mmol 离子液体和三乙胺, 结果见图 2。表明加入离子液体为流动相添加剂的峰型明显好于三乙胺, 拖尾情况得到了更好的改善。

**3.2 离子液体浓度的考察** 前期已有文献<sup>[8-10]</sup> 对保留因子进行了考察, 研究显示在一定浓度范围内, 随着离子液体的浓度升高, 生物碱的保留时间减少, 提高分离效率。本文主要考察离子液体浓度对各个组分拖尾因子进行考察, 结果见图 3。从图可以看出, 随着离子液体浓度的增大, 拖尾因子减小, 当浓度增大到一定值时, 即无明显效果。

过去分离生物碱常常是在流动相加入缓冲盐的



a. [BMIM]PF<sub>6</sub>; b. 三乙胺

图 2 不同添加剂的 HPLC

Fig. 2 HPLC of chromatogram different additives

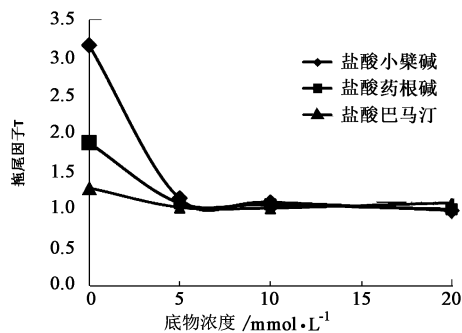


图 3 不同浓度离子液体对 3 种生物碱的拖尾因子

Fig. 3 Symmetry factor with ionic liquid having different concentration

情况下添加少量三乙胺作为流动相添加剂,该方法不仅对仪器和柱子有较大的损伤,分离的效果也相对较差,而将离子液体作为流动相添加剂时,能更好地改善拖尾情况,而且与常用流动相添加剂比,分离度更高、对色谱柱损伤也更低,作为绿色溶剂的离子液体也更安全<sup>[14-15]</sup>,与 2010 年版《中国药典》HPLC 测定香连丸中盐酸小檗碱的含量相比,该方法不仅降低了流动相中缓冲盐的浓度,而且各个成分的色谱峰都实现了基线分离,更好地完成了多种成分的测定,为测定含相关生物碱制剂以及药材提供了参考依据。虽然离子液体作为流动相添加剂在分离一些极性化合物方面取得一定的进展,但不同阴离子序列以及不同阳离子组成与各种化合物类型之间的关系有待更深入的研究。

在以离子液体为流动相添加剂情况下,对香连丸中 3 种生物碱类成分进行含量测定,通过考察发现样品中除盐酸小檗碱外,盐酸药根碱和盐酸巴马汀含量均较高,并进行了方法学考察,结果均符合要求。

[参考文献]

[ 1 ] Yi H, Shun Y, Hang S. Application of ionic liquids in liquid chromatography and electrodriven separation [J]. J Chromatogr A, 2013, 51(7): 739-752.

[ 2 ] 魏金凤, 张志娟, 李冬冬, 等. 超声辅助离子液体-反相液相色谱法测定赤芍中齐墩果酸和芍药苷的含量 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(3): 443-449.

[ 3 ] 刘微, 李冬冬, 杨洪帅, 等. 离子液体辅助萃取山高粱中 4 种黄酮类成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(7): 1305-1310.

[ 4 ] 杨红帅, 王菊, 郭翠, 等. 超声辅助离子液体-反相液相色谱法同时测定茜草中茜草素和大叶茜草素的含量 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13): 2617-2623.

[ 5 ] Minglei T, Liu J, Row H K. Effect of ionic liquids as the mobile phase additives on the HPLC resolution of four active compounds from *Sophora flavescens* Ait [J]. Molecules, 2009, 14(6): 2127-2134.

[ 6 ] 吕芳, 何丽君, 伍艳, 等. 离子液体作薄层色谱添加剂对麻黄碱分离的影响 [J]. 化学试剂, 2006, 28(9): 551-552.

[ 7 ] 刘建平, 何丽君. 离子液体作薄层色谱添加剂对氨基酸分离的研究 [J]. 化学试剂, 2011, 33(7): 649-651.

[ 8 ] 韩玉珮, 章丽, 韩永彬, 等. 不同厂家香连丸中盐酸小檗碱和盐酸巴马汀的含量测定 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(1): 94-95.

[ 9 ] 黄艳萍, 刘德玲, 刘小燕, 等. 香连丸的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 2014-2016.

[ 10 ] 戈早川, 周建明. 胶束薄层扫描法测定黄连及其制剂中的小檗碱、巴马汀和药根碱 [J]. 分析化学, 2004, 32(1): 99-101.

[ 11 ] 董影杰, 于泓, 黄旭, 等. 离子液体作高效液相色谱流动相添加剂测定水杨酸 [J]. 分析测试学报, 2011, 30(3): 302-306.

[ 12 ] 边敏, 杨勇, 周昊. 以离子液体作流动相添加剂高效液相色谱法分离辣椒素类生物碱 [J]. 分析测试学报, 2013, 32(2): 174-178.

[ 13 ] 王婧菲, 于泓, 卜文. 离子液体作高效液相色谱流动相添加剂分离测定芳香族羧酸 [J]. 分析测试学报, 2014, 33(5): 533-538.

[ 14 ] Marszall M P, Baczek T, Kalisz R. Reduction of silanophilic interactions in liquid chromatography with the use of ionic liquids [J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 547(2): 172-178.

[ 15 ] 姜昕易, 张晖芬, 王胜男, 等. ILs-HPLC 同时测定黄柏中 5 种生物碱含量 [J]. 中国中药杂志, 2014, 33(19): 3808-3812.

[责任编辑 顾雪竹]