

- and pseudoephedrine in MAHUANGTANG by GC-MS and effect of compatible medicinal herbs on concentration of components in decoction [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (4): 307-309.
- [4] Fang W J, Chen J, Zhang D L, *et al.* Pharmacokinetics and relative bioavailability of pseudoephedrine [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1999, 34 (7): 472-474.
- [5] Zhong M K, Shi X J, Zhang J H, *et al.* Pharmacokinetics of pseudoephedrine sustained-released tablet in health volunteers [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2001, 21 (7): 395-397.
- [6] Zhao X L. *Base and Application of Clinical Pharmacokinetics* (临床药代动力学基础与应用) [M]. Zhengzhou: Zhengzhou University Press, 2002.

HPLC 法测定盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱中杂质

刘祥东^{1,2}, 梁琼麟¹, 罗国安^{1*}, 王义明¹, 刘清飞¹

(1. 清华大学 化学系, 北京 100084; 2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 建立盐酸麻黄碱(E)和盐酸伪麻黄碱(PE)中杂质的高效液相色谱 HPLC 测定方法。方法 用 RP C₁₈ 色谱柱, 以 20 mmol/L KH₂PO₄ 水溶液-甲醇(96:4)为流动相, 检测波长为 210 nm, 分析时间为 20 min。结果 6 种麻黄生物碱均达到基线分离; 混合对照品连续进样 6 次, 色谱峰面积 RSD 均小于 1.0%; 对照品质量浓度在选定范围内呈现良好的线性关系($R^2 > 0.999$); 各成分最低检出限分别为: 去甲基麻黄碱(NE)为 0.05 $\mu\text{g/mL}$, 去甲基伪麻黄碱(NPE)为 0.04 $\mu\text{g/mL}$, E 和 PE 为 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 甲基麻黄碱(ME)和甲基伪麻黄碱(MPE)为 0.2 $\mu\text{g/mL}$; 各成分的加样回收率均大于 97.1%; 6 个待测样品均被检测出不同程度的杂质。结论 本方法分离度好、精密度高、专属性强、灵敏度高, 可用于麻黄生物碱类药物中杂质成分的定性和定量测定。

关键词: 盐酸麻黄碱; 盐酸伪麻黄碱; 高效液相色谱; 杂质

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)09-1316-04

Determination of impurity in ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride by HPLC

LIU Xiang-dong^{1,2}, LIANG Qiong-lin¹, LUO Guo-an^{1*}, WANG Yi-ming¹, LIU Qing-fei¹

(1. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

Abstract: **Objective** To develop an HPLC method for determination of impurities in ephedrine hydrochloride (E) and pseudoephedrine hydrochloride (PE). **Methods** All of ephedrine alkaloids reference substances and samples were separated with a 20 mmol/L aqueous KH₂PO₄ containing 4% methanol buffer under isocratic elution by using a C₁₈ reversed-phase column within 20 min, and the detection wavelength was 210 nm. **Results** Six ephedrine alkaloids reference substances were base-line separated and were linear in concentration of selection ($R^2 > 0.999$). The relative standard deviation (RSD) of chromatogram area was less than 1.0% for all of them after six successive injections. The detection limit was 0.05 $\mu\text{g/mL}$ for norephedrine (NE), 0.04 $\mu\text{g/mL}$ for norpseudoephedrine (NPE), 0.1 $\mu\text{g/mL}$ for E and PE, and 0.2 $\mu\text{g/mL}$ for mephedrine (ME) and mepseudoephedrine (MPE), respectively ($S/N \geq 3$). The recovery rate was more than 97.1% for six ephedrine alkaloids. Under this method system, all of the above-mentioned six samples were tested and found to contain some of the impurity at different levels. **Conclusion** This developed method, which is very simple, perfect precision, high sensitivity, and selectivity, can be used for the qualitative and quantitative determination of impurities of ephedrine alkaloid-type samples.

Key words: ephedrine hydrochloride (E); pseudoephedrine hydrochloride (PE); HPLC; impurity

盐酸麻黄碱(ephedrine hydrochloride, E)和盐酸伪麻黄碱(pseudoephedrine hydrochloride, PE)

收稿日期: 2004-12-24

基金项目: 科技部重大专项基金资助项目(2002BA906A29-3, 2002DEA20021-3, 2001BA701A36-18)

作者简介: 刘祥东(1980—), 男, 江西南康人, 江西中医学院中药化学与成分分析专业在读硕士。

* 通讯作者 罗国安

是麻黄中的两个主要活性成分,两者为非对映异构体,均具有多方面的药理作用^[1],是许多OTC药物中的常用配伍成分,也可用于某些化合物定量时的内标成分^[2]。作为原料药《中国药典》2000年版(二部)规定E和PE的质量分数均不得低于99.0%。现在应用的麻黄碱和伪麻黄碱主要有两个来源途径,从麻黄中提取而来和由合成而来,目前仍以提取得来的居多。麻黄中除了麻黄碱和伪麻黄碱之外,还有4种主要的生物碱类成分——甲基麻黄碱(ME)、甲基伪麻黄碱(MPE)、去甲基麻黄碱(NE)和去甲基伪麻黄碱(NPE)。这4种麻黄生物碱的结构与E和PE相近,是两者中常见的杂质成分。近年来,麻黄碱和伪麻黄碱的提取纯化、区分鉴别及相互转化技术在不断取得新的进展,提取技术如水蒸气蒸馏法、离子交换法、酸水煮提法^[3]、微波法^[4]、生物碱膜提取法^[5]、超临界流体萃取法^[6];区分鉴别技术有电喷雾质谱法^[7];相互转化技术如以冰醋酸为溶剂、乙醇为催化剂的一步转化法^[8]等。本实验采用反相高效液相色谱法建立了麻黄碱和伪麻黄碱两个原料药中杂质成分的定性和定量检测方法。

1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪; Waters 2996 PDA 检测器; SZ-93 自动双纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

盐酸麻黄碱(E, 批号: 05106-1, 质量分数 99.28%)、盐酸伪麻黄碱(PE, 批号: 16340-1, 质量分数 99.3%)、甲基麻黄碱(ME, 批号: 13525-1, 质量分数 99.4%)、甲基伪麻黄碱(MPE, 批号: 13535-1, 质量分数 100.0%)、去甲基麻黄碱(NE, 批号: 14511-1, 质量分数 99.6%)、去甲基伪麻黄碱(NPE, 批号: 14532-S, 质量分数 99.33%), 对照品均购自 Chroma Dex 公司。E 和 PE 样品由中国医药对外贸易公司提供。甲醇为色谱纯, 磷酸二氢钾为分析纯, 自制二次水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液配制: 精密称取 6 种麻黄生物碱对照品适量, 用甲醇分别配制单一对照品储备液, 储存于 4℃ 冰箱中。精密吸取 6 种麻黄生物碱单一对照品储备液一定体积, 置于 10 mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 混匀, 作为混合对照品储备液。该储备液中各成分的最终质量浓度分别为 NE: 15.1 μg/mL; NPE: 6.33 μg/mL; E: 14.9 μg/mL; PE: 15.3 μg/mL; ME: 16.0 μg/mL; MPE: 14.9 μg/mL。

2.2 供试品溶液的配制: 取样品约 0.5 g, 精密称

定, 用适量流动相使其完全溶解。将此溶液转移至 100 mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 备用。

2.3 色谱条件: Phenomenex Synergi Polar-RP C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 4 μm), 配有 Polar RP Cartridges 预柱; 流动相为 20 mmol/L KH₂PO₄ 水-甲醇(96:4); 体积流量为 1.2 mL/min; 柱温为 30℃; 进样量为 20 μL; 检测波长为 210 nm。

2.4 工作曲线的制备: 将混合对照品储备液分别稀释 3、4、6、10、15、30、40 倍, 配制成混合对照品的系列质量浓度, 每个质量浓度分别进样 3 次。以 3 次进样的色谱峰面积平均值对质量浓度作线性回归, 得各成分回归方程。NE: $Y = 42\,000X - 1.35$, $R^2 = 0.999\,0$; NPE: $Y = 42\,500X - 1\,000$, $R^2 = 0.999\,9$; E: $Y = 39\,900X - 45\,400$, $R^2 = 0.999\,9$; PE: $Y = 39\,700X - 7\,710$, $R^2 = 0.999\,8$; ME: $Y = 36\,400X - 1\,100$, $R^2 = 0.998\,6$; MPE: $Y = 37\,100X - 3\,740$, $R^2 = 0.999\,6$ 。由于最低质量浓度的混合对照品溶液中 ME 和 MPE 两个成分的质量浓度接近检出限, 偏差较大, 故在作回归方程时将其舍去, 只取前面 6 个质量浓度的数据。

2.5 检出限试验: 将混合对照品溶液(对照品母液稀释 30 倍)逐步稀释进样, 当稀释 2.5 倍时 ME 和 MPE 最低检出($S/N \geq 3$), 稀释 5 倍时 E、PE 和 NPE 最低检出, 稀释 10 倍时 NE 最低检出。以对照品原质量浓度计算得各成分的最低检出限分别为 NE: 0.05 μg/mL, NPE: 0.04 μg/mL, E、PE: 0.1 μg/mL, ME、MPE: 0.2 μg/mL。

2.6 专属性试验: 用流动相空白溶剂进样。表明系统无污染, 对检测结果无干扰。用 6 种麻黄生物碱单一成分对照品溶液分别进样, 再用混合对照品溶液进样, 单一成分的色谱峰保留时间与混合对照品中对应成分的色谱峰保留时间相比较, 各色谱峰彼此吻合, 表明方法专属性良好。

2.7 精密度试验: 麻黄生物碱混合对照品溶液连续进样 6 次, 各成分的色谱峰保留时间和峰面积 RSD 分别为 NE: 0.014%、0.417%, NPE: 0.015%、0.723%, E: 0.021%、0.471%, PE: 0.021%、0.737%, ME: 0.028%、0.275%, MPE: 0.038%、0.904%。

2.8 稳定性试验: 取同一供试品溶液, 分别于 0、12、24、48 h 进行测定, 考察 E 和 PE 峰面积的 RSD 分别为 0.837%、0.915% ($n=4$)。

2.9 重现性试验: 取同一样品(E 批号 20040101, PE 批号: 20030905), 平行制备供试品溶液 5 份, 用

流动相稀释 1 000 倍,测定,E 和 PE 色谱峰面积的 RSD 分别为 4.09%、5.38% ($n=4$)。

2.10 加样回收率试验:取批号:20040101 样品,用流动相稀释 100 倍后,取 500 μ L,加入等体积混合对照品溶液(对照品母液稀释 6 倍),平行处理 3 份,进样分析,用回归方程计算。同时,取稀释后样品 500 μ L,与等体积流动相混合,进样计算原样品中各麻黄生物碱的量。按计算加样回收率[回收率=(测得量-原样品中的量)/加入量 $\times$ 100%],结果回收率和 RSD 分别为 NE: 103.2%、4.94%, NPE: 102.1%、7.34%, E: 97.1%、4.48%, PE: 102.3%、9.01%, ME: 99.3%、8.90%, MPE: 99.2%、6.60% ($n=3$)。

2.11 样品测定:分别取 6 个批号的样品母液各 1 mL 置 10 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度。同法再稀释 2 次,将样品液稀释至原母液的 1 000 倍,用 0.45 μ m 滤膜滤过至自动进样小瓶中,连续进样 3 次,以色谱峰保留时间自动匹配出原料药中的主成分,由对应的回归方程计算其质量分数,从而得出相应的杂质的质量分数。色谱图见图 1,结果见表 1。

连续进样 3 次,以色谱峰保留时间自动匹配出原料中的杂质成分,根据对应的回归方程直接计算杂质的质量分数。结果见表 2。

表 1 样品中各成分测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of components in samples ($n=3$)

批号	主成分	主成分质量分数/%	RSD	杂质/%
20030905	PE	99.98	0.073 4	0.02
20030906	PE	99.97	0.090 2	0.03
20030907	PE	99.97	0.061 6	0.03
20040101	E	99.85	0.071 8	0.15
20040102	E	99.82	0.025 1	0.18
20040103	E	99.83	0.097 7	0.17

表 2 样品杂质测定结果 ($n=3$)

Table 2 Determination of impurity in samples ($n=3$)

批号	杂质	杂质/%	RSD/%	主成分质量分数/%
20030905	NPE	0.033 3	9.75	99.967
20030906	NPE	0.033 2	9.17	99.967
20030907	NPE	0.039 8	4.60	99.960
20040101	NE	0.191	4.48	99.809
20040102	NE	0.186	5.16	99.814
20040103	NE	0.191	7.32	99.809

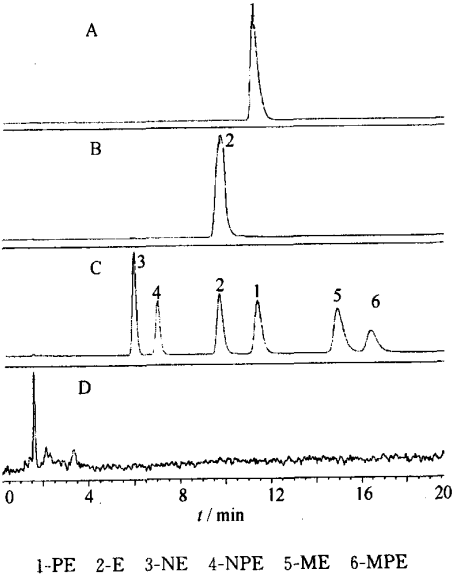
3 讨论

流动相中加入 KH_2PO_4 可以明显改善色谱峰的拖尾,这是由于 KH_2PO_4 缓冲盐体系控制系统的 pH 值。但过高的盐浓度容易导致盐析,堵塞液相管路及色谱柱,因此在不影响分离的情况下,应尽量减小缓冲盐的浓度。试验考察 10、20、50、80、100 mmol/L 5 个浓度水平。结果表明,当盐浓度达到 20 mmol/L 时,增加 KH_2PO_4 浓度对分离无明显影响。最后确定采用 20 mmol/L 的 KH_2PO_4 。

甲醇的比例在本实验中会较大幅度地影响各成分的出峰时间,增大比例可缩短分析时间,但分离度降低,反之则分离度好,但分析时间长。

增大流动相的体积流量可以缩短分析时间,且峰形变窄,但柱压升高,对色谱柱不利,体积流量过小则色谱峰扩散严重。试验考察了 1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5 mL/min 6 个水平,经过对比优化,最后确定 1.2 mL/min。

对 6 种麻黄生物碱类成分进行了外标法定量方法的研究,并采用两种方法对原料药 PE 和 E 进行杂质的测定,不仅测定其杂质的量,而且通过保留时间匹配出其中的杂质成分。根据第 1 种方法测定的结果,3 个 E 样品中的杂质比 3 个 PE 样品中的杂质的量要高,因此在用第 2 种方法测定时,将两者稀释成不同的质量浓度,以减小因样品质量浓度过大而产生的色谱柱过载,影响测定结果。



1-PE 2-E 3-NE 4-NPE 5-ME 6-MPE
图 1 PE 样品(A)、E 样品(B)、混合对照品溶液 (C)和空白溶剂(D)的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC chromatograms of PE sample (A), E sample (B), mixed reference substances (C), and blank solution (D)

取 6 个批号的样品母液各 1 mL 置 10 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,其中主成分为 PE 的 3 个样品直接用 0.45 μ m 滤膜滤过至自动进样小瓶中;主成分为 E 的 3 个样品用流动相再稀释 1 倍,用 0.45 μ m 滤膜滤过至自动进样小瓶中。每个样品均

References:

- [1] Zheng P, Dai G D, Li H Q. The pharmacological advance of ephedrine and pseudoephedrine [J]. *Ningxia Med J* (宁夏医学杂志), 2002, 24 (2): 126-127.
- [2] Ru Q H, Luo G A. Internal standard quantitative method of tetrodotoxin by capillary electrophoresis [J]. *Anal Lett*, 2000, 33 (14): 3013-3023.
- [3] Li L, Chen J. Extraction process and analysis of ephedrine and pseudoephedrine [J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2003, 34 (4): 202-205.
- [4] Fan Z G, Zhang Y P, Sun Y, et al. The quantity effect of lixiviated ephedrine from *Herba Ephedrae* using microwave technology [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, 22 (7): 520-521.
- [5] Lu C H, Jia Y, Zhang J S, et al. Study on membrane extraction method for alkaloids of *Ephedra Herba* and *Rhizoma Coptidis* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2002, 24 (4): 251-254.
- [6] Gao L H, Zhao P, Cai S H, et al. Resolution of dl-pseudoephedrine by supercritical fluid extraction [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37 (12): 959-962.
- [7] Song F R, Liu Z Y, Sun W X, et al. New method of mass spectrometry for distinguishing ephedrine and isoeephedrine [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 1999, 27 (9): 1 000-1 002.
- [8] Li J L, Feng X, Yuan Y J. Conversion of (+) - pseudoephedrine to (-) - ephedrine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32 (2): 108-110.

超滤膜纯化夏天无总碱的研究

朱才庆^{1,2}, 余 华^{1*}, 范其坤¹, 熊胜泉¹, 徐丽英¹, 魏东芝²(1. 江西省药物研究所 天然药物研究室, 江西 南昌 330029; 2. 华东理工大学
生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要:目的 探讨应用超滤膜分离技术纯化夏天无总碱工艺。方法 采用不同截留分子的膜组件、操作参数进行正交设计, 以与原阿片碱相关的各种指标考察不同膜组件及操作参数对膜分离效果的影响。结果 截留相对分子质量为 $6 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$ 的 PS 膜具有较好的膜分离效果, 选择压力 0.08 MPa、料液温度 40 ℃、进料体积流量 2.8 L/min 的操作参数工作效率更高。结论 利用膜分离工艺制备的夏天无注射液澄清、色泽好, 显示出更强的药效作用。

关键词:夏天无总碱; 原阿片碱; 膜分离; 药效作用

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)09-1319-04

Purification of *Rhizoma Corydalis Decumbentis* total alkaloids
by ultrafiltration membrane technology

ZHU Cai-qing^{1,2}, YU Hua^{1*}, FAN Qi-kun¹, XIONG Sheng-quan¹, XU Li-ying¹, WEI Dong-zhi²

(1. Department of Natural Medicine, Institute of Materia Medica of Jiangxi Province, Nanchang 330029, China; 2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Objective To explore the possibility for application of ultrafiltration membrane technology to purify *Rhizoma Corydalis Decumbentis* total alkaloids (RCDTA). **Methods** Based on the index related to protopine, to investigate the effect of different aperture membrane and orthogonal test of separation parameters on membrane separation efficiency of Xiatianwu Injection. **Results** The PS membrane with $6 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$ interception molecular weight had better separation efficiency and the preferred operation parameters were 0.08 MPa of pressure, 40 ℃ of liquid temperature, and 2.8 L/min of liquid speed. **Conclusion** Xiatianwu Injection prepared by ultrafiltration membrane technology is clear with good colour and better drug function.

Key words: *Rhizoma Corydalis Decumbentis* total alkaloids (RCDTA); protopine; membrane separation; drug function

夏天无为罂粟科植物伏生紫堇 *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. 的干燥块茎, 是一种有

镇痉止痛、活血去瘀和降压行气功效的民间常用中草药。目前临床上用于各种类型的高血压和其后遗

收稿日期: 2004-11-28

基金项目: 江西省重大科技攻关项目(赣科发计字[2002]64号)

作者简介: 朱才庆(1973—), 男, 江西信丰人, 工学博士, 现为华东理工大学与江西省药物研究所联合培养博士后, 研究方向为天然药物有效成分的分离纯化。Tel: (0791) 8105994 E-mail: zhucqing@sohu.com

* 通讯作者 余 华 Tel: (0791) 8106317 Fax: (0791) 8101739 E-mail: jxyuhua@sina.com