

离子色谱法测定明目上清片中常见无机阴离子含量

陈琛

(天津市胸科医院药剂科,天津 300222)

摘要:目的 建立同时测定明目上清片中9种常见无机阴离子含量的离子色谱法。方法 采用改进的 QuEChERS 前处理方法净化样品,离子色谱法测定样品。用去离子水提取,N-丙基乙二胺(PSA)和 C₁₈净化,Ion Pac AS11-HC 阴离子交换分析柱分离,氢氧化钾淋洗液梯度洗脱,洗脱 25 min,流速为 1.0 mL·min⁻¹,柱温为 30 ℃,进样量为 30 μL。结果 9种常见无机阴离子均能达到基线分离,线性范围在 0.5~50.0 mg·L⁻¹之间,线性关系良好,相关系数为 0.999 0~0.999 9 范围内,仪器精密度、重复性和稳定性良好,平均加样回收率为 90.26%~101.22%,RSD 为 0.51%~2.15%,仪器精密度、重复性和稳定性良好。结论 该方法简便快速和自动化,可用于明目上清片中无机阴离子含量的测定。

关键词:离子色谱法;明目上清片;无机阴离子;QuEChERS 法

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.02.016

Determination of common inorganic anions in mingmushangqing tablets by ion chromatography

CHEN Chen

(Department of Pharmacy, Tianjin Chest Hospital, Tianjin 300222, China)

Abstract: Objective To establish the method for simultaneous determination of common inorganic anions (fluoride, formate, chloride, nitrite, bromide, nitrate, sulfate, oxalate and phosphate) in Mingmushangqing tablets by ion chromatograph. **Method** The samples were extracted by using Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe extraction (QuEChERS) and determined by ion chromatography. Common inorganic anions were determined by anion exchange column Ion Pac AS11-HC and eluted for 25 min by gradient hydroxide potassium in at the rate of 1.0 mL·min⁻¹ and the temperature of 30 ℃, and the sampling volume was 30 μL. **Results** Good resolution can be achieved among the above mentioned nine inorganic anions. The nine inorganic anions showed a good linear relationship in the ranges of 0.5~50.0 mg·L⁻¹ and their linear correlations over the investigated concentration were in the range of 0.999 0~0.999 9, while relative standard deviations, repeatability and stability were good. The average recoveries were 90.26%~101.22% with relative standard deviation of 0.51%~2.15% respectively. **Conclusion** The ion chromatography method were the better simple, fast and automated for determine nine inorganic anions in mingmushangqing tablets.

Key words: Ion chromatography; Mingmushangqing tablets; Inorganic anion; QuEChERS

明目上清片在 2015 年版《中国药典》中有记载,由黄连、熟大黄、黄芩、连翘、栀子和桔梗等 21 味中药组成^[1]。该中药复方制剂的作用主要为清热散风、明目止痛等,主要用于治疗焦火盛引起的暴发火眼,红肿痛痒,热泪昏花,云翳遮睛,头痛目眩,烦躁口渴,大便燥结等症状^[2]。根据现代药理研究表明,中药复方制剂中一般含多味中药,化学成分较复杂,药效由多种有效成分共同作用,研究较困难,为了全面有效的研究中药药效成分,应该从考虑多方面,包括的有效成分不仅包括有机成分,也包括无机离子成分^[3]。目前,明目上清片复方制剂的质量控制主要运用高效液相色谱法(HPLC)检测明目上清片中黄芩苷、橙皮苷和小檗碱等的有机成分含量^[4,6],但尚未有文献报道控制

明目上清片中阴阳离子等无机成分的含量。为了更加全面控制明目上清片的质量,本研究建立离子色谱法测定明目上清片中常见无机阴离子的含量。

离子色谱法是一种公认的有效分析无机阴离子性物质的液相色谱方法,具有准确性和灵敏度高、抗干扰能力强等特点,能实现多成分同时定性定量的测定和分离,被广泛应用于医药、食品和环境等领域测定阴离子含量^[7-10],是一种有效的无机阴离子物质分析方法。再者,中药复方制剂基体复杂,各种常见阴离子含量差异比较大。样品需要通过优化前处理方法,去除杂质,提纯样品。本研究用 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) 前处理方法,具有方便、快捷、经济合理等优势,同时测定了明目上清片中 9 种常见无机

阴离子含量,为明目上清片的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

ICS-2100 型离子色谱仪(美国戴安公司), ASE350 加速溶剂萃取仪(美国戴安公司) XS205 电子天平(德国 Mettler toledo 公司),离心机(江苏环宇科学仪器有限公司)。KQ-100VDB 型台式三频数控超声波清洗器(上海谱振生物科技有限公司);氟离子(F^-)、甲酸根离子(COO^-)、氯离子(Cl^-)、亚硝酸根离子(NO_2^-)、溴离子(Br^-)、硝酸根离子(NO_3^-)、硫酸根离子(SO_4^{2-})、草酸根离子($C_2O_4^{2-}$)和磷酸根离子(PO_4^{3-})标准品溶液,质量体积浓度均为 $1\ 000\ mg \cdot L^{-1}$ (均购于中国计量科学研究院)。Milli-Q 超纯仪(美国 Millipore 公司),尼龙滤膜($0.22\ \mu m$,天津富集色谱技术发展公司)。氢氧化钾溶液由离子色谱仪自动产生。超纯水(电阻率 $>18.2\ M\Omega \cdot cm^{-1}$)由 Milli-Q 超纯仪产生。

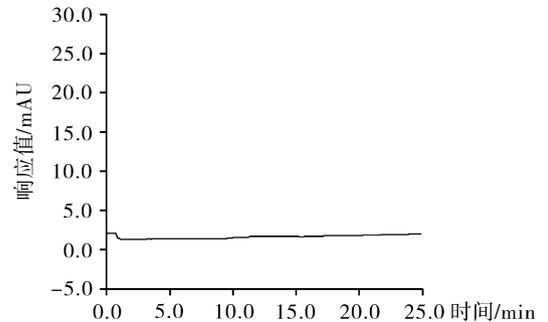
2 实验方法

2.1 标准溶液配置 通过移液器分别准确移取上述 9 种阴离子标准溶液 $5\ mL$ 于 $50\ mL$ 棕色容量瓶中,用超纯水稀释至刻度,然后分别准确移取 0.1 、 0.2 、 0.5 、 1.0 、 2.0 、 $5.0\ mL$ 的 9 种阴离子混合储备溶液分别至 $10\ mL$ 棕色容量瓶中,分别用超纯水稀释至刻度,配置成制成系列一系列 9 种阴离子混合标准工作溶液,工作溶液质量浓度由低到高分别为 1.0 、 2.0 、 5.0 、 10.0 、 20.0 、 $50.0\ mg \cdot L^{-1}$ 。

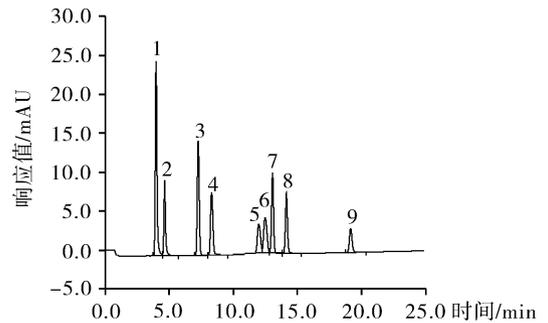
2.2 样品前处理 将明目上清片研磨至粉末后混合均匀,过 100 目号筛后,准确称取 $50\ mg$ 明目上清片粉末样品于 $100\ mL$ 容量瓶具塞三角瓶中,加入 $50\ mL$ 去离子水溶解样品,超声 $10\ min$,静置室温后,将上清液移至 $50\ mL$ 离心管中,加入 N-丙基乙二胺(PSA) $100\ mg$, C_{18} 固体粉末 $50\ mg$,摇匀后涡旋 $5\ min$,离心($5\ 000\ r \cdot min^{-1}$) $10\ min$,提取上清液,并采用 $0.22\ \mu m$ 微孔滤膜过滤上清液。同时另 1 个容量瓶具塞三角瓶,不加入样品,用去离子水平行处理作为空白样品。

2.3 色谱条件 色谱柱采用 Ion Pac AS11-HC ($250\ mm \times 4\ mm, 4\ \mu m$) 阴离子交换分析柱和 Ion Pac AG11-HC ($50\ mm \times 4\ mm, 4\ \mu m$) 保护柱;抑制器为 ASRS 300 $4\ mm$ 阴离子抑制器,淋洗液:为氢氧化钾溶液梯度洗脱($0 \sim 4\ min, 5\ mmol \cdot L^{-1}$; $4 \sim 5\ min, 5 \sim 30\ mmol \cdot L^{-1}$; $5 \sim 20\ min, 30\ mmol \cdot L^{-1}$; $20 \sim 21\ min, 30 \sim 5\ mmol \cdot L^{-1}$; $21 \sim 25\ min, 5\ mmol \cdot L^{-1}$);柱温:为 $30\ ^\circ C$;抑制器:ASRS 300 $4\ mm$ 阴离子抑制器,抑制电流为 $75\ mA$,自循环抑制

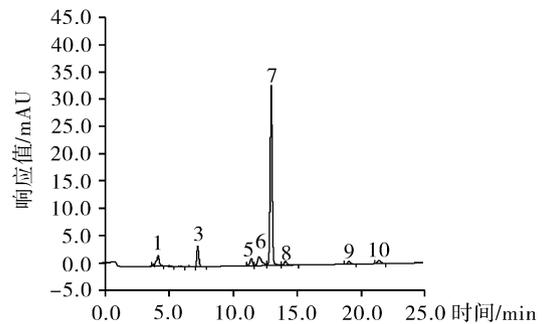
模式;检测器:为电导检测器,检测池温度为 $30\ ^\circ C$;流速:为 $1.0\ mL \cdot min^{-1}$;洗脱时间为 $25\ min$;进样体积为 $30\ \mu L$;进样前用流动相冲洗离子色谱系统至基线平稳后再进行进样分析。离子色谱图见图 1。



A. 空白溶液



B. 对照品溶液



C. 样品溶液

注:1. F^- ; 2. COO^- ; 3. Cl^- ; 4. NO_2^- ; 5. Br^- ; 6. NO_3^- ; 7. SO_4^{2-} ; 8. $C_2O_4^{2-}$; 9. PO_4^{3-} ; 10. 待验证。

图1 明目上清片的离子色谱图

3 结果

3.1 线性关系、检测限和定量限 在优化的色谱条件下,将 9 种阴离子混合标准线性工作液从低到高质量浓度依次在“2.3”项色谱条件下测定,结果以各离子的体积质量质量浓度 $X(mg \cdot L^{-1})$ 为横坐标,被测离子的峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线。以水为空白溶液,空白溶液的色谱图未见色谱峰,将样品溶液逐级稀释,按照“2.3”项色谱条件分别测定。以信噪比为 3:1 的样品质量溶液浓度为方法

检测限。以信噪比为 10:1 的样品溶液体积质量浓度为定量限。结果表明:9 种离子的线性范围 0.5 ~ 50.0 mg · L⁻¹, 线性关系良好 ($r^2 \geq 0.999$), 9 种阴离子的检出限为 0.007 ~ 0.028 mg · L⁻¹, 定量限为 0.025 ~ 0.086 mg · L⁻¹, 9 种阴离子的结果符合检测的要求, 具体结果见表 1。

表 1 回归方程、检测限和定量限

离子种类	回归方程	相关系数 r^2	线性范围/ mg · L ⁻¹	检测限/ mg · L ⁻¹	定量限/ mg · L ⁻¹
F ⁻	$Y=0.309X+0.772$	0.999 3	0.5 ~ 50.0	0.007	0.025
COO ⁻	$Y=0.154X+0.064$	0.999 1	0.5 ~ 50.0	0.028	0.070
Cl ⁻	$Y=0.373X-0.124$	0.999 4	0.5 ~ 50.0	0.010	0.038
NO ₂ ⁻	$Y=0.175X-0.015$	0.999 9	0.5 ~ 50.0	0.023	0.064
Br ⁻	$Y=0.266X-0.149$	0.999 2	0.5 ~ 50.0	0.018	0.056
NO ₃ ⁻	$Y=0.178X-0.053$	0.999 9	0.5 ~ 50.0	0.016	0.052
SO ₄ ²⁻	$Y=0.144X-0.321$	0.999 5	0.5 ~ 50.0	0.012	0.040
C ₂ O ₄ ²⁻	$Y=0.164X+0.021$	0.999 5	0.5 ~ 50.0	0.014	0.044
PO ₄ ³⁻	$Y=0.164X-0.095$	0.999 2	0.5 ~ 50.0	0.028	0.086

3.2 加标回收率和精密度 本实验的样品中分别被添加了 0.5、2.5、10 mL 的 100 mg · L⁻¹ 溶液 (即样品最终添加质量浓度为 1.0、5.0、20.0 mg · L⁻¹), 分别重复 6 次实验, 经过样品前处理后测定样品溶液质量浓度, 经过“2.3”项色谱条件分析, 回收率和精密度结果见表 2。

表 2 加标回收率试验/%

离子种类	平均质量浓度/ mg · L ⁻¹	低质量浓度 (1.0 mg · L ⁻¹)		中质量浓度 (5.0 mg · L ⁻¹)		高质量浓度 (20.0 mg · L ⁻¹)	
		回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
F ⁻	0.66	90.45	1.64	95.26	1.48	91.17	1.56
COO ⁻	-	99.67	1.09	96.14	2.07	97.64	2.15
Cl ⁻	2.75	91.46	1.98	95.11	1.77	94.35	2.14
NO ₂ ⁻	-	96.25	0.87	98.26	1.79	99.31	1.66
Br ⁻	3.25	91.34	1.78	95.47	1.73	94.22	1.34
NO ₃ ⁻	3.11	93.12	1.66	90.11	1.56	92.15	0.51
SO ₄ ²⁻	31.35	92.26	1.35	89.53	1.86	95.16	1.69
C ₂ O ₄ ²⁻	0.91	98.26	1.53	93.82	1.63	97.12	2.08
PO ₄ ³⁻	1.97	97.34	1.62	95.41	1.79	91.45	1.83

3.3 仪器精密度试验 本实验将 9 种阴离子混合标准工作液 (5.0 mg · L⁻¹) 不经过前处理, 连续用离子色谱进样 6 次, 结果表明显示上述 9 种无机阴离子色谱峰面积的 RSD < 2.0%, 说明该仪器测定较稳定。

3.4 重复性试验 准确称取明目上清片粉末样品 50 mg, 平行称取 6 份, 按照样品前处理步骤样品溶液, 平行制备 6 份, 通过离子色谱仪的分析, 结果表明显示上述 9 种无机阴离子的平均色谱峰面积的均 RSD < 3.0%, 该分析方法重复性良好。

3.5 稳定性试验 将经过前处理后制好的样品溶液放置 0、3、6、12、24 h 后分别进行分析进样, 上述 9 种无机阴离子的色谱峰面积的 RSD 均 ≤ 2.0%。样品溶液中 9 种阴离子在 24 h 内较稳定。

3.6 样品含量测定 采用本方法测定明目上清片样品, 取 8 个批次明目上清片样品, 通过样品前处理步骤后制成样品溶液, 并按照在已优化色谱条件下测定样品溶液。明目上清片样品中测出 9 种无机阴离子, 9 种无机阴离子的质量浓度在 0.63 ~ 31.38 mg · L⁻¹, 结果见表 3。

4 讨论

4.1 色谱条件的优化 测定阴离子的传统化学方法因操作繁琐复杂, 对操作人员有一定要求, 检出限高, 不能满足多种阴离子同时有效测定等缺点而逐渐被离子色谱法等方法取代^[12]。目前, 离子色谱法在电子、大气、工业和水质等方面成为权威机构的标准分析方法^[13], 同时在中药或中药复方制剂中测定阴离子含量的应用也越来越多^[3,12,14-15]。本研究采用 ICS-2100 型离子色谱仪配备的淋洗液自动发生器, 在线产生 KOH 梯度淋洗, 进样前先用在线产生 KOH 流动相冲洗系统, 基线平稳, 重现性好。采用 AS11-HC 阴离子交换柱分析, 能够快速实现阴离子与杂质成分良好分离。这可能是因为 AS11-HC 阴离子交换柱的材料主要是含烷醇季铵功能基团的, 该色谱柱属于中高亲水性色谱柱, 适于复杂基体中低浓度阴离子的分离^[14]。

表 3 明目上清片样品测定结果/mg · L⁻¹

批次	F ⁻	COO ⁻	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	Br ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	C ₂ O ₄ ²⁻	PO ₄ ³⁻
1	0.66	-	2.75	-	3.25	3.11	31.35	0.91	1.97
2	0.67	-	2.76	-	3.21	3.15	31.37	0.94	1.98
3	0.64	-	2.81	-	3.23	3.14	31.34	0.94	1.93
4	0.63	-	2.76	-	3.27	3.13	31.36	0.95	1.95
5	0.67	-	2.74	-	3.26	3.11	31.31	0.93	1.94
6	0.65	-	2.77	-	3.25	3.12	31.37	0.92	1.94
7	0.68	-	2.74	-	3.28	3.15	31.38	0.97	1.93
8	0.65	-	2.73	-	3.24	3.18	31.33	0.92	1.96

各离子的分离度和保留时间主要受淋洗液强度的影响,各离子的极性不同,淋洗液对其的作用也会有所不同。淋洗液的强度越大,对阴离子的洗脱能力就越强,淋洗液的强度越小,对阴离子的洗脱能力就越弱。在 AS11-HC 阴离子交换柱和氢氧化钾(KOH)淋洗液条件作用下,Cl⁻和COO⁻、Br⁻和NO₃⁻的保留行为相近,且Cl⁻和COO⁻的保留能力相对其他离子较弱。为了实现Cl⁻和COO⁻良好的分离,开始时,需要使用较低强度的KOH淋洗液条件,因此在前4 min内,淋洗液的浓度为5 mmol·L⁻¹。为了在较短时间实现分离其他离子,需要适当提高KOH淋洗液的强度。因此在1 min内将KOH淋洗液的强度提高至30 mmol·L⁻¹。在5~20 min范围内分离其他7个离子,7个离子均能实现良好分离。最后,将KOH淋洗液强度恢复至初始条件,并平衡4 min,有助于提高实验的重现性和稳定性。

4.2 QuEChERS 前处理的优化 本试验采用改进的QuEChERS前处理方法能够吸附大量有机化合物杂质,显著减小溶液中的酚酸类成分、色素、皂苷和内酯等杂质成分的干扰,并通过过滤后,上清液中几乎只保留着无机成分,有效净化了样品。该试验采用单因素分别考察了提取溶液的体积、PSA和C₁₈的用量对各阴离子回收率的影响。试验分别考察了20、30、40、50、60 mL去离子水,10、50、100、200、500 mg的PSA和10、50、100、200、500 mg的C₁₈对各离子回收率的影响。结果表明,随着去离子水提取体积的提高,各离子的回收率逐渐升高,当提取体积达到40 mL以后,各离子的回收率趋于稳定,可能是各离子的溶解趋于饱和。为了保证试验的稳定性,试验选择50 mL作为提取体积。随着PSA质量的增加,杂质的影响越来越小。在10~100 mg间,随着PSA质量的增加,各阴离子的回收率越来越高,且回收率均能达到90%以上。但在200~500 mg间,随着PSA质量的增加,各阴离子的回收率越来越低,可能是因为PSA质量的增加,使得PSA对各阴离子的吸附增加。因此试验最终选择100 mg的PSA,同理选择优化C₁₈,最终50 mg的回收率最高,干扰少,因此选择50 mg C₁₈。

4.3 样品含量分析 清心明目上清片样品9种阴离子中,SO₄²⁻含量最高,而且明显高于其他离子的含量,这是否与清心明目上清片的药理作用有密切关系,有待学者们进一步的研究。根据生活对常见阴离子的认识,过量的摄入硫酸盐,会使硫酸盐与钙镁离子结合使水变得苦涩,还会出现肠胃功能紊

乱,腹胀腹泻等生理症状^[16]。因此明目上清片样品的SO₄²⁻含量值得关注。再者,Cl⁻,C₂O₄²⁻,Br⁻,F⁻、NO₃⁻和PO₄³⁻含量次之,未检测出NO₂⁻和COO⁻的含量。根据图1C可知,色谱峰9后面存在一个色谱峰10。根据笔者的经验,该离子很可能是柠檬酸根离子,有待学者们进一步的确证。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:1056.
- [2] 施法,侯峰,董斌,等. GC法同时测定明目上清片中4个成分的含量[J]. 药物分析杂志,2013,33(1):146-149.
- [3] 周伟娥,杨立佼,谢巍,等. 离子色谱法同时测定感冒清热颗粒中9种无机阴离子[J]. 中国药房,2015,26(18):2546-2549.
- [4] 柴金苗. 高效液相色谱法测定明目上清片中橙皮苷的含量[J]. 中国中医药信息杂志,2010,17(12):43-44.
- [5] 袁汀,郝延军. 高效液相色谱法测定明目上清片中黄芩苷的含量[J]. 山西医药杂志,2009,38(19):963-964.
- [6] 周萍,周浓,张海珠. HPLC同时测定明目上清片中盐酸小檗碱和黄芩苷的含量[J]. 大理学院学报(综合版),2012,11(6):12-15.
- [7] 王国海,宋莉,杨瑞瑞. 用离子色谱法研究饮片中残留二氧化硫在制剂过程中的变化[J]. 安徽医药,2015,19(2):270-272.
- [8] ZHU Y, GUO Y, YE M, et al. Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography[J]. J Chromatogr A, 2005, 1085(1):143-146.
- [9] PAGE N, STEVENSON R, POWELL M. Analysis of N-methylpyrrolidine in cefepime hydrochloride by ion chromatography using suppressed conductivity detection with solid-phase extraction pretreatment[J]. Analytical Methods, 2014, 6(4):1248.
- [10] ITO K, NOMURA R, FUJII T, et al. Determination of nitrite, nitrate, bromide, and iodide in seawater by ion chromatography with UV detection using dilauryldimethylammonium-coated monolithic ODS columns and sodium chloride as an eluent[J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 404(8):2513-2517.
- [11] 刘胜男,卫星,巩卫东. QuEChERS方法在检测分析中的应用研究进展[J]. 食品研究与开发,2013,34(10):133-136.
- [12] 郭新苗,郭庆梅,周凤琴. 中药金银花中4种阴离子含量的离子色谱法测定[J]. 时珍国医国药,2013,24(12):3067-3069.
- [13] 罗振亚. 抑制型电导法离子色谱检测在环境、食品中的阴离子的应用研究[D]. 重庆:西南大学,2009.
- [14] 刘静,李静,聂黎行,等. 离子色谱法同时测定注射用丹参(冻干)中有机酸和无机阴离子[J]. 药物分析杂志,2012,32(10):1774-1777.
- [15] 魏惠珍,卢欢,邓杰华,等. 离子色谱法测定大承气汤中硫酸根离子含量及不确定度评价[J]. 时珍国医国药,2013,24(5):1074-1076.
- [16] 裴丹,赵梦蝶,张医舫,等. 饮用水和茶水中无机阴离子含量调查[J]. 广东化工,2016,43(7):25-27.

(收稿日期:2016-07-10,修回日期:2016-08-17)