

HPLC法测定荜茇根中胡椒碱的含量^Δ

胡玉^{1*}, 吕顺忠², 高鸿亮³, 王建华², 罗兰^{2#a}, 姚萍^{3#b} (1.新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830054; 2.新疆医科大学第一附属医院药学部, 乌鲁木齐 830054; 3.新疆医科大学第一附属医院消化科, 乌鲁木齐 830054)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)07-0633-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.07.19

摘要 目的: 建立测定荜茇根中胡椒碱含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Inertsil ODS-3(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(77:23, V/V), 检测波长为 343 nm, 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 30 ℃。结果: 胡椒碱的质量浓度在 0.000 8~0.024 0 mg/ml 范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD<2%; 平均加样回收率为 100.85%, RSD=0.82% ($n=6$)。结论: 该方法简便、快速、准确、重复性好, 可用于荜茇药材的质量控制。

关键词 高效液相色谱法; 荜茇根; 胡椒碱; 含量测定

Content Determination of Piperine in the Roots of *Piper longum* by HPLC

HU Yu¹, LYU Shun-zhong², GAO Hong-liang³, WANG Jian-hua², LUO Lan², YAO Ping³ (1. College of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2. Dept. of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 3. Dept. of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of piperine in the roots of *Piper longum*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Inertsil ODS-3(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-water (77:23, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 343 nm, and column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear range of piperine were 0.000 8-0.024 0 mg/ml ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; average recovery was 100.85% (RSD=0.82%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid, accurate and reproducible, and can be used for quality control for the roots of *P. longum*.

KEYWORDS HPLC; The roots of *Piper longum*; Piperine; Content determination

荜茇(*Piper longum* L.)为胡椒科植物的干燥近成熟或成熟果穗^[1], 蒙医、中医都用荜茇的果实入药, 其温热之性可祛寒温胃, 治疗中焦胃寒等证^[2-3]。维医不同于蒙、藏、中医, 不是用其果实, 而是用其根茎, 作为消化系统常用药材。维医古籍《大医典》中记载, 荜茇根为三级热、二级干, 味辛, 性温, 入脾、胃经, 具有补胃消食、祛寒止痛、通气除胀、消除胃内黏液、开通肝脾阻滞的功效^[4]。有研究在调查维医治疗消化系统炎症性疾病的复方制剂中发现, 荜茇根作为君药或主药的出现率达 90% 以上^[5]。

荜茇所含化学成分较为复杂, 荜茇果实含胡椒碱、四氢胡

椒酸、棕榈酸、十一碳-1-烯-3, 4-甲撑二氧苯、哌啶、挥发油、荜茇十一碳三烯哌啶、芝麻素、荜茇壬二烯哌啶、胡椒酰胺、荜茇明宁碱、荜茇壬三烯哌啶、*N*-异丁基二十碳-2, 4, 8-三烯酰胺、*N*-异丁基二十碳-2, 4-二烯酰胺^[6], 还有一种具有舒张冠状动脉活性的酰胺成分 Dehydropiperonallinet^[7]; 茎含荜茇明碱; 种子含双异胺脂素、长柄胡椒碱^[8]。其中, 胡椒碱为各用药部位中主要化学成分。2010 年版《中国药典》记载胡椒碱作为荜茇果实药材的指标性成分^[1], 但荜茇根尚缺乏相应的质量标准。鉴于此, 笔者采用高效液相色谱(HPLC)法对荜茇根中胡椒碱的含量测定方法进行研究, 旨在为维药荜茇根提供更合理、可靠的质控方法。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AD 型 HPLC 仪, 包括 SPD-20A 型紫外检测器、SIC-20A 型自动进样器等(日本岛津公司); BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司, $d=0.01$ mg); MS 型数显涡旋振荡仪(德国 IKA 公司); KQ-200VDB 型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81260670)

* 硕士研究生。研究方向: 新药研发、临床药理。E-mail: 274347906@qq.com

#a 通信作者: 主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 博士。研究方向: 新药研发、临床药理。电话: 0991-4363438。E-mail: ll4820703@163.com

#b 通信作者: 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 硕士。研究方向: 功能性胃肠病的基础与临床。电话: 0991-4366064。E-mail: pingyaozh@sina.com

1.2 试剂

胡椒碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110775-201104);甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

萆薢根(产地:安徽,亳州市保华药业有限公司,批号:100111、100112、100113),由新疆医科大学药学院天然药物/生药教研室从媛媛副教授鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Inertsil ODS-3(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(77:23,V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:343 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。在此色谱条件下,供试品中胡椒碱的色谱峰与前后杂质峰的分离度均>1.5。色谱见图1。

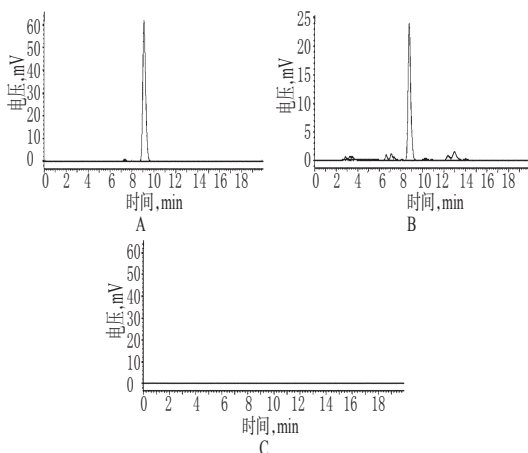


图1 高效液相色谱图

A.胡椒碱对照品;B.萆薢根;C.阴性对照

Fig 1 HPLC chromatograms

A.piperine control;B.the roots of *P. longum*;C.negative control

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取胡椒碱对照品2.0 mg,置于25 ml棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,至涡旋振荡仪上混匀,制得质量浓度为0.08 mg/ml的对照品贮备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 将萆薢根剪碎,研细,精密称取萆薢根粉末(过80目筛)1 000 mg,置于50 ml棕色量瓶中,加甲醇适量,超声(功率:90 W,频率:45 kHz)处理1 h,再以甲醇定容,放冷,摇匀,滤过,精密量取续滤液20 ml,置于50 ml棕色量瓶中,加甲醇至刻度,过0.22 μm微孔滤膜,制成质量浓度为8 mg/ml的萆薢根供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 取色谱纯甲醇适量,作为阴性对照溶液。

2.3 线性关系考察

分别精密吸取对照品溶液0.1、0.3、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml,置于10 ml量瓶中,加甲醇定容,依次稀释成质量浓度为0.000 8、0.002 4、0.004 0、0.008 0、0.012 0、0.016 0、0.020 0、0.024 0 mg/ml的系列对照品溶液,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以对照品质量浓度(x)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得胡椒碱的回归方程为 $y=90\ 795\ 071x+22\ 129$ ($r=0.999\ 9$, $n=8$)。结果表明,胡椒碱的质量浓度在0.000 8~0.024 0 mg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验

吸取同一质量浓度的对照品溶液适量,按上述色谱条件

重复进样测定6次,记录峰面积。结果显示, $RSD=0.22\%$ ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

2.5.1 对照品溶液的稳定性试验 取对照品溶液适量,分别于1、2、3、4、8、12、24 h按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示, $RSD=0.39\%$ ($n=7$),表明对照品溶液在24 h内稳定性良好。再取对照品溶液适量,分别于第1、2、3、4、5、6天同法测定,记录峰面积。结果显示, $RSD=0.28\%$ ($n=6$),表明对照品溶液日间稳定性良好。

2.5.2 供试品溶液的稳定性试验 取萆薢根供试品溶液适量,用甲醇稀释10倍,按“2.5.1”项下方法测定。结果显示,萆薢根日内稳定性的 $RSD=0.16\%$ ($n=7$),日间稳定性的 $RSD=0.19\%$ ($n=6$),表明萆薢根供试品溶液的稳定性良好。

2.6 重复性试验

精密称取同一批萆薢根粉末1 000 mg,共6份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再用甲醇稀释10倍,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示, $RSD=1.90\%$ ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

精密称取萆薢根粉末1 000 mg,共6份,分别置于50 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,超声(功率:90 W,频率:45 kHz)30 min,放冷,摇匀,滤过。精密称取4.5 mg胡椒碱对照品,加甲醇溶解并定容至10 ml量瓶中。精密量取萆薢根样品溶液1.0 ml,置于10 ml量瓶中,再加入胡椒碱对照品溶液1.0 ml,加甲醇定容,涡旋振荡,摇匀。平行操作6份,按样品含量测定方法操作,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

取样量,mg	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
1 000	0.443	0.450	0.900	101.56		
1 000	0.443	0.450	0.894	100.22		
1 000	0.444	0.450	0.898	100.89	100.85	0.82
1 000	0.442	0.450	0.891	99.78		
1 000	0.443	0.450	0.896	100.67		
1 000	0.444	0.450	0.903	102.00		

2.8 样品含量测定

取3批萆薢根粉末各500 mg,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,每批制备3份。分别精密吸取供试品溶液10 μl,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,以峰面积计算样品中胡椒碱的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of content determination of samples($n=3$)

批号	取样量,mg	胡椒碱含量,mg/g	\bar{x} ,mg/g	RSD,%
100111	500	0.23		
	500	0.23	0.23	0.04
	500	0.23		
100112	502	0.24		
	502	0.24	0.24	0.01
	502	0.24		
100113	501	0.23		
	501	0.23	0.23	0.30
	501	0.23		

3 讨论

萆薢中胡椒碱的提取多采用煎煮法或加热回流法^[9],但为

肉桂配方颗粒的HPLC指纹图谱研究^Δ

曾超^{1*}, 陆东², 段伟昌², 蓝晓庆², 韦红言², 何翊², 杨梅², 周永强², 温庆伟² [1. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023; 2. 培力(南宁)药业有限公司, 南宁 530007]

中图分类号 R283.62⁷;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)07-0635-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.07.20

摘要 目的: 建立肉桂配方颗粒的指纹图谱。方法: 采用反相高效液相色谱法。色谱柱为 Thermo Hypersil ODS-2(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(28:72, V/V), 检测波长为 280 nm, 流速为 1.0 ml/min, 进样量为 10 μl。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A版)》对 10 批样品进行相似度评价。结果: 10 批肉桂配方颗粒共检出 4 个共有指纹峰, 并指出其中桂皮醛、肉桂酸、香豆素 3 个化学成分。10 批样品指纹图谱的相似度均 > 0.900。结论: 所建指纹图谱重复性好, 可作为肉桂药材及其配方颗粒的质量控制方法。

关键词 肉桂; 配方颗粒; 反相高效液相色谱法; 指纹图谱

Study on HPLC Fingerprint of *Cinnamomum cassia* Formula Granules

ZENG Chao¹, LU Dong², DUAN Wei-chang², LAN Xiao-qing², WEI Hong-yan², HE Yi², YANG Mei², ZHOU Yong-qiang², WEN Qing-wei² (1. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of TCM, Nanning 530023, China; 2. Pur-aPharm (Nanning) Pharmaceuticals Co., Ltd., Nanning 530007, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the fingerprint of *Cinnamomi cassia* formula granules. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Thermo hypersil ODS-2(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with acetonitrile-0.1% phosphoric acid(28:72, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 280 nm and sample size was 10 μl. The similarity of 10 batches of samples were evaluated by using Similarity Calculation Software of TCM Chromatogram Fingerprint (2004 A edition). RESULTS: 4 common peaks were identified in 10 batches of samples, and 3 chemical compounds were identified, such as cinnamyl aldehyde, cinnamic acid, coumarin. The similarity of fingerprint were all higher than 0.900. CONCLUSIONS: HPLC fingerprint is reproducible, and a suitable method for quality control of *C. cassia* and *C. cassia* formula granules.

KEYWORDS *Cinnamomi cassia*; Formula granules; RP-HPLC; Fingerprint

为了提高分析对象的提取率, 减少杂质的干扰, 本试验以甲醇为提取溶剂, 以胡椒碱的提取率为指标, 分别比较了加热回流法与超声提取法的提取效果。结果显示, 在相同时间内, 回流提取法比超声提取法的提取率低 8%, 且超声提取法操作简单方便、提取时间较短、各操作参数可控、提取过程重复性较好, 有助于实现图谱的高重复性, 因此选择了超声提取法提取样品。

综上, 本试验采用 HPLC 法测定了萆薢根中胡椒碱的含量, 方法简便、快速、准确、重复性好, 可为今后开发维药萆薢根提供科学依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 161.
- [2] 呼日乐巴根. 胡椒碱的药理作用研究概况[J]. 中国民族医药杂志, 2009, 15(2): 68.

Δ 基金项目: 广西千亿元产业重大科技攻关项目(No. 桂科攻 11107009-2-7)

* 主管中药师。研究方向: 中药鉴定学。电话: 0771-5848422。E-mail: liujie882144@163.com

通信作者: 高级工程师, 博士。研究方向: 中药药效物质基础及中药配方颗粒质量标准。电话: 0771-3218026。E-mail: wqw760623@163.com

药杂志, 2009, 15(2): 68.

- [3] 赵小原, 其其格, 白音夫. 萆薢对大鼠寒冷型应激性胃黏膜损伤保护作用及病理改变的观察[J]. 中国民族医药杂志, 2004, 10(3): 28.
- [4] 国家中医药管理局. 中华本草: 维吾尔药卷[M]. 1 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 251.
- [5] 姚萍, 高鸿亮, 刘发. 萆薢根对胆汁反流胃炎大鼠模型的防治作用及对胃泌素、PGE₂、TNF-α、IL-8 含量的影响[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(1): 111.
- [6] 包照日格图, 吴恩. 萆薢拔油非皂化物对小鼠高脂血症的影响[J]. 中草药, 1992, 23(4): 197.
- [7] 陈显慧, 王海梅, 李月廷, 等. 萆薢油非皂化物对大鼠血清高密度脂蛋白胆固醇的影响[J]. 中国民族医药杂志, 1997, 3(2): 45.
- [8] 郝福明. 关于萆薢的蒙医中医药用分析[J]. 中国民族医药杂志, 2001, 7(4): 16.
- [9] 马建春, 何伟, 李勇, 等. 萆薢中胡椒碱提取工艺研究[J]. 中国药房, 2010, 21(35): 3 295.

(收稿日期: 2013-09-29 修回日期: 2013-12-17)