

HPLC同时测定维吾尔族药复方小艾飞中5种有效成分的含量

张涛涛, 热娜·卡斯木*, 米仁沙·牙库甫, 胡君萍, 王晓梅, 王新玲, 王小青
(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] **目的:**建立 HPLC 同时测定复方小艾飞中槲皮素、山柰素、乔松素、高良姜素 4 种黄酮类成分及胡椒碱含量的方法。**方法:**采用 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈(A)-1% 磷酸溶液(B)-甲醇(C)为流动相, 梯度洗脱(0~12 min, 28% A: 52% B: 20% C; 12~13 min, 28%~30% A, 52%~50% B, 20% C; 13~45 min, 30% A: 50% B: 20% C), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 进样量 20 μL, 检测波长 280 nm。**结果:**槲皮素、山柰素、乔松素、高良姜素、胡椒碱的标准曲线分别为 $Y = 357\ 314X - 88\ 066$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 442\ 853X - 74\ 204$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 647\ 926X - 327\ 436$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 471\ 672X - 256\ 408$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 290\ 000X - 391\ 906$ ($r = 0.999\ 9$), 线性关系良好。平均加样回收率($n = 9$)分别为 98.4% (RSD 1.6%), 98.9% (RSD 1.7%), 101.3% (RSD 2.2%), 98.6% (RSD 2.1%), 98.6% (RSD 1.8%)。**结论:**该方法准确、简便, 具有良好的重复性, 可用于维吾尔族药复方小艾飞的质量控制。

[关键词] 维吾尔族药复方小艾飞; 槲皮素; 山柰素; 乔松素; 高良姜素; 胡椒碱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)03-0071-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017030071

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161117.1549.002.html>

[网络出版时间] 2016-11-17 15:49

Content Determination of 5 Kinds of Effective Components in Uighur Medicine Compound Xiaoaifei by HPLC

ZHANG Tao-tao, RENA Kasimu*, MIRENSHA Yakufu, HU Jun-ping,
WANG Xiao-mei, WANG Xin-ling, WANG Xiao-qing
(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for simultaneous contents determination of 4 flavonoids including quercetin, kaempferide, pinocembrin, and galangin as well as alkaloids piperine in Uighur medicine compound Xiaoaifei by using HPLC. **Method:** Separation was performed on Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with acetonitrile (A) -1% phosphoric acid (B) -methanol (C) (0-12 min, 28% A: 52% B: 20% C; 12-13 min, 28%-30% A, 52%-50% B, 20% C; 13-45 min, 30% A: 50% B: 20% C) as the mobile phase for gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 280 nm; the column temperature was 30 ℃, and the sample size was 20 μL. **Result:** $Y = 357\ 314X - 88\ 066$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 442\ 853X - 74\ 204$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 647\ 926X - 327\ 436$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 471\ 672X - 256\ 408$ ($r = 0.999\ 9$), and $Y = 290\ 000X - 391\ 906$ ($r = 0.999\ 9$), respectively in the calibration curves of quercetin, kaempferide, pinocembrin, galangin and piperine, showing good linear relationship. The mean recoveries ($n = 9$) of them were 98.4% (RSD 1.6%), 98.9% (RSD 1.7%), 101.3% (RSD 2.2%), 98.6% (RSD 2.1%) and 98.6% (RSD 1.8%), respectively. **Conclusion:** The developed method is simple, accurate, reliable, and

[收稿日期] 20160707(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460616); 江西民族传统药现代科技与产业发展协同创新项目(JXXT201403002)

[第一作者] 张涛涛, 在读硕士, 从事新疆特色中药资源的开发与利用研究, Tel: 15160875963, E-mail: 1277876751@qq.com

[通讯作者] * 热娜·卡斯木, 博士, 教授, 从事新疆特色中药资源的开发与利用研究, Tel: 0991-4362473, E-mail: renakasimu@vip.sina.com

helpful to control the quality of Uighur medicine compound Xiaoaifei.

[Key words] Uighur medicine compound Xiaoaifei; quercetin; kaempferide; pinocembrin; galangin; piperine

复方小艾飞由高良姜、干姜、荜茇、黑胡椒和金钱白花蛇五味维吾尔族药组成,各味药共研细粉,加以炼蜜制成膏剂服用,用于治疗肿瘤、消化道和生殖系统的炎症、漏疹、顽固性疮疡等^[1-2],是由维吾尔族医学验证并长期在新疆维吾尔自治区维吾尔族医院使用的医院复方制剂,是维吾尔族特色药。

鉴于复方小艾飞制剂工艺粗糙,剂量不准确,没有建立规范的质量标准,本课题组前期分别采用紫外分光光度法和高效液相色谱法对该复方中的高良姜素和胡椒碱进行了含量测定^[3]。研究显示该复方中高良姜和干姜两味药中主要成分为槲皮素、山柰素、乔松素和高良姜素等黄酮类成分^[4-6],黑胡椒和荜茇两味药中均含有胡椒碱等生物碱类成分^[7-8],金钱白花蛇中则主要含有蛋白质和脂肪酸类成分^[9],建立全面控制制剂质量的分析方法迫在眉睫。本实验建立了 HPLC 同时测定该复方中槲皮素、山柰素、乔松素、高良姜素及胡椒碱等 5 种成分的含量,此方法的建立提高了该复方质量控制水平,并为控制制剂质量及制剂二次开发和临床应用提供理论指导和实验依据。

1 仪器与材料

2487 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),KQ3200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),AB135-S 型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司),PL6001-S 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),TDL-5A 型离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司)。

对照品槲皮素(批号 100081-200907),山柰素(批号 110861-201310),乔松素(批号 111829-201102),高良姜素(批号 111699-200501),胡椒碱(批号 110755-201405)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈色谱纯,蒸馏水(自制),甲醇、磷酸分析纯。

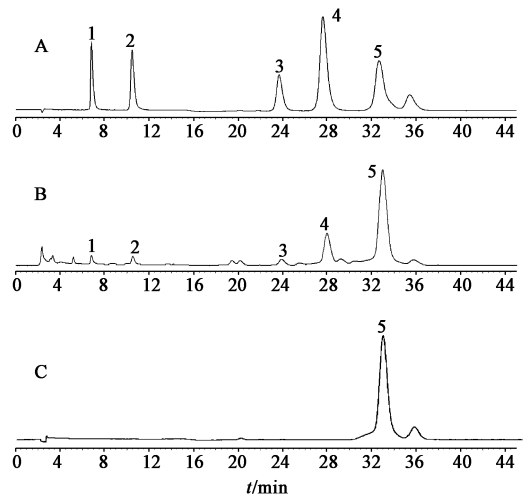
复方小艾飞组成的高良姜、黑胡椒等五味维吾尔族药材,购于新疆维吾尔自治区维吾尔族医院,所购药材经新疆医科大学药学院帕丽达·阿不力孜教授鉴定为姜科山姜属植物高良姜 *Alpinia officinarum* 的干燥根茎(新疆和济中药饮片有限公司,批号 140401),胡椒科植物荜茇 *Piper longum* 的未成熟果实(新疆和济中药饮片有限公司,批号

140301),姜科植物干姜 *Zingiber officinale* 的栽培品种药姜的干燥根茎(新疆和济中药饮片有限公司,批号 140410),胡椒科植物黑胡椒 *Piper nigrum* 的果实(湖北聚瑞中药饮片有限公司,批号 140622),眼镜蛇科动物金钱白花蛇 *Bungarus multicinctus* 的干燥体(湖北聚瑞中药饮片有限公司,批号 110815)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-1% 磷酸溶液(B)-甲醇(C)梯度洗脱(0 ~ 12 min, 28% A : 52% B : 20% C; 12 ~ 13 min, 28% ~ 30% A, 52% ~ 50% B, 20% C; 13 ~ 45 min, 30% A : 50% B : 20% C),流速 1.0 mL · min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 20 μL,检测波长 280 nm。

在上述色谱条件下,槲皮素、山柰素、乔松素、高良姜素、胡椒碱与相邻色谱峰的分离度均 > 1.5,理论板数按槲皮素峰计算不低于 5 000,拖尾因子符合要求,见图 1。



A. 对照品; B. 样品; C. 只有黑胡椒和荜茇的阴性样品; 1. 槲皮素; 2. 山柰素; 3. 乔松素; 4. 高良姜素; 5. 胡椒碱

图 1 复方小艾飞 HPLC

Fig. 1 HPLC of compound Uighur medicine Xiaoaifei

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取对照品槲皮素、山柰素、乔松素、高良姜素和胡椒碱 10.03, 10.05, 10.02, 10.03, 10.01 mg 用甲醇分别制成质量浓度 0.040 12, 0.040 20, 0.040 08, 0.040 12, 0.040 04 g · L⁻¹ 的对照储备溶液。精密量

取上述槲皮素、山柰素对照储备液 1.0 mL, 乔松素对照储备液 2.0 mL, 高良姜素、胡椒碱对照储备液 3.0 mL, 置于同一 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照储备液。

2.2.2 供试品溶液制备 精密称定复方小艾飞 3.000 4 g, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 40 mL, 密塞, 称定质量。超声提取(250 W, 59 kHz) 45 min, 冷却至室温后, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀。离心(1 万 $r \cdot \text{min}^{-1}$) 8 min, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.3 方法学确证

2.3.1 线性关系考察 分别精密量取混合对照储备液 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得系列混合对照溶液。分别取各系列质量浓度混合对照溶液进样分析, 以峰面积(Y) 为纵坐标, 溶液的质量浓度(X) 为横坐标进行线性回归, 得到槲皮素的回归方程为 $Y = 357\ 314X - 88\ 066$ ($r = 0.999\ 9$), 线性范围 1.604 8 ~ 9.628 8 μg , 山柰素的回归方程为 $Y = 442\ 853X - 74\ 204$ ($r = 0.999\ 9$), 线性范围 1.608 0 ~ 9.648 0 μg , 乔松素的回归方程为 $Y = 647\ 926X - 327\ 436$ ($r = 0.999\ 9$), 线性范围 3.206 4 ~ 19.238 4 μg , 高良姜素的回归方程为 $Y = 471\ 672X - 256\ 408$ ($r = 0.999\ 9$), 线性范围 4.814 4 ~ 28.886 4 μg , 胡椒碱的回归方程为 $Y = 290\ 000X - 391\ 906$ ($r = 0.999\ 9$), 线性范围 4.804 8 ~ 28.828 8 μg 。

2.3.2 精密度试验 在上述色谱条件下, 取同一混合对照品溶液连续进样 6 次, 测得槲皮素、山柰素、乔松素、高良姜素和胡椒碱的峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 0.8%, 0.6%, 1.2%, 1.2%, 1.0%。

2.3.3 重复性试验 取同一批复方小艾飞按 2.2.2 方法平行制备供试溶液 6 份, 按 2.1 项下色谱条件下分别进样分析, 测得槲皮素、山柰素、乔松素、高良姜素和胡椒碱的平均质量分数分别为 0.330 0, 0.300 0, 0.690 2, 2.399 9, 11.299 2 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 2.8%, 2.7%, 2.3%, 1.9%, 1.7%, 符合方法学验证要求, 表明方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 在上述色谱条件下, 取同一份供试品溶液分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 重复进样, 测得槲皮素、山柰素、乔松素、高良姜素和胡椒碱的峰面积的 RSD 分别为 2.2%, 2.0%, 2.5%, 2.0%, 2.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.5 加样回收率试验 取已测知含量的复方

小艾飞 9 份, 每份约 1.5 g。按低、中、高质量浓度分别精密加入质量浓度为 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 槲皮素 0.3, 0.6, 0.9 mL, 质量浓度为 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 山柰素 0.2, 0.4, 0.6 mL, 质量浓度为 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 乔松素 0.1, 0.2, 0.3 mL, 质量浓度为 120 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 高良姜素对照溶液 0.1, 0.2, 0.3 mL 和质量浓度为 120 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胡椒碱对照溶液 0.1, 0.2, 0.3 mL, 每一质量浓度制备 3 份。按 2.2.2 项下方法制备所需溶液, 分别进样分析, 加样回收率计算结果见表 1。

2.3.6 样品的测定 取复方小艾飞 3 批, 按 2.2.2 项下方法制备供试溶液, 在 2.1 项下色谱条件下进行分析, 用外标法计算槲皮素、山柰素、乔松素、高良姜素和胡椒碱的含量, 结果见表 2。

由测量结果表明, 3 批复方小艾飞中槲皮素、山柰素、乔松素、高良姜素 4 种黄酮类成分的含量差异不明显, 黄酮平均总质量分数分别为 3.715 9, 3.721 0, 3.716 3 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 3 批复方小艾飞中胡椒碱的含量差异也不大, 结果显示该复方中胡椒碱的含量明显高于 4 种黄酮类总含量。

3 讨论

已有学者对该复方中的单味药材进行化学成分及含量研究^[4-9], 但采用 HPLC 法同时测定该复方中的 4 种黄酮类成分和 1 种生物碱类成分胡椒碱含量的方法还未见报道, 本实验测定结果显示, 3 批复方小艾飞中黄酮类化合物及胡椒碱的含量差异不大, 以高良姜素、胡椒碱含量较高。

流动相中加入适量乙腈能保证较短的分析时间, 加入少量酸可抑制组分解离、避免色谱峰拖尾。其次, 槲皮素、山柰素、乔松素、高良姜素和胡椒碱中, 前 4 种均为黄酮类化合物, 其化学结构中含有酚羟基, 呈弱酸性, 采用甲醇作为流动相可以提高分离的效率与选择性。梯度洗脱时, 待测的 5 种成分的色谱峰峰形良好, 分离效果好, 故本实验最终采用含乙腈、甲醇、磷酸水溶液的溶剂系统作为流动相。

将混合对照储备溶液进样分离后, 利用 DAD 检测器在波长 200 ~ 400 nm 扫描其吸收光谱, 槲皮素、山柰素、乔松素和高良姜素分别在 280, 270, 290 和 265 nm 和处有最大吸收, 胡椒碱, 胡椒碱最佳吸收为 340 nm, 在 280 nm 处有吸收且共同吸收最大。考虑到槲皮素、胡椒碱在 280 nm 处均有最大吸收, 而且槲皮素含量最低, 故选择波长 280 nm 为检测波长, 同时, 药材中外源性物质在此波长下不干扰槲皮素的测定。

表 1 复方小艾飞中 5 种成分的加样回收率测定

Table 1 Determination results of recovery of compound Uighur medicine Xiaoaifei

成分	称样量 /g	样品中量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
槲皮素	1.501	0.495	0.012	0.507	98.3	98.4	1.6
	1.500	0.495	0.012	0.507	99.9		
	1.507	0.497	0.012	0.509	99.2		
	1.503	0.496	0.024	0.519	97.5		
	1.501	0.495	0.024	0.519	100.5		
	1.502	0.496	0.024	0.520	99.6		
	1.498	0.494	0.036	0.530	98.4		
	1.495	0.493	0.036	0.528	96.7		
	1.504	0.496	0.036	0.531	95.9		
	山柰素	1.501	0.450	0.008	0.458		
1.500		0.450	0.008	0.458	96.3		
1.507		0.452	0.008	0.460	100.0		
1.503		0.451	0.016	0.467	101.3		
1.501		0.450	0.016	0.466	98.0		
1.502		0.451	0.016	0.467	99.8		
1.498		0.449	0.024	0.473	98.6		
1.495		0.449	0.024	0.473	100.4		
1.504		0.451	0.024	0.475	98.7		
乔松素		1.501	1.036	0.008	1.044	100.3	101.3
	1.500	1.035	0.008	1.043	100.0		
	1.507	1.04	0.008	1.048	99.9		
	1.503	1.037	0.016	1.053	100.0		
	1.501	1.036	0.016	1.053	106.2		
	1.502	1.036	0.016	1.052	101.0		
	1.498	1.034	0.024	1.059	104.2		
	1.495	1.031	0.024	1.055	99.9		
	1.504	1.038	0.024	1.062	100.0		
	高良姜素	1.501	3.602	0.012	3.614	100.0	
1.500		3.600	0.012	3.612	99.9		
1.507		3.617	0.012	3.629	100.0		
1.503		3.607	0.024	3.630	95.8		
1.501		3.602	0.024	3.625	95.8		
1.502		3.605	0.024	3.629	100.0		
1.498		3.595	0.036	3.630	97.2		
1.495		3.598	0.036	3.623	97.2		
1.504		3.61	0.036	3.646	101.3		
胡椒碱		1.501	16.96	12	28.93	99.8	98.6
	1.500	16.95	12	28.58	96.9		
	1.507	17.03	12	28.99	99.7		
	1.503	16.98	24	40.45	97.8		
	1.501	16.96	24	40.98	100.1		
	1.502	16.97	24	40.47	97.9		
	1.498	16.93	36	53.11	100.5		
	1.495	16.89	36	52.86	99.9		
	1.504	16.7	36	50.89	95.0		

表 2 复方小艾飞样品中成分质量分数测定

批号	槲皮素	山柰素	乔松素	高良姜素	胡椒碱
20140706	0.329 7	0.298 5	0.689 3	2.398 4	11.299 3
20140809	0.330 2	0.299 7	0.690 8	2.400 3	11.300 7
20141005	0.333 4	0.301 0	0.692 1	2.389 8	11.297 1

比较了加热回流提取超声提取。但超声提取方法简单,容易操作,在超声提取时间方面,考虑了 30,45,60 min,提取溶剂用量(30,40,50,60 mL)进行考察,结果表明在权衡之下,采用甲醇 40 mL,40 min/次提取率高。因此选择甲醇为提取溶剂,进行超声提取。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准. 维吾尔药分册[M]. 乌鲁木齐:新疆科技出版社, 1999: 136.

[2] 米仁沙·牙库甫, 热娜·卡斯木, 帕丽达·阿不力孜, 等. 复方小艾飞蜜膏抗炎作用研究[J]. 中药药理与临床, 2014(2): 166-168.

[3] 米仁沙·牙库甫, 买买提依力·努尔买买提, 热娜·卡斯木, 等. 复方小艾飞的提取工艺研究[J]. 西北药学杂志, 2014(3): 222-225.

[4] 刘原作, 王鑫, 刘友平, 等. RP-HPLC 法同时测定高良姜中槲皮素等 4 种黄酮的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2014(1): 13-16.

[5] 李季萍, 王跃生, 马华, 等. 干姜与生姜主要化学成分的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(11): 748-751.

[6] 李智勇, 孙冬梅, 张建军. HPLC 法测定高良姜中高良姜素和山柰素的含量[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(9): 1368-1370.

[7] 李瑞和, 苏日纳, 郭林云, 等. 萆薢化学成分与药理作用研究概况[J]. 中国民族医药杂志, 2006, 5(3): 73-74.

[8] 周亮, 许旭东, 杨峻山, 等. 胡椒属植物生物碱及木脂素类化合物的研究进展[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(3): 161-164.

[9] 邢少璟. 银环蛇粗毒的分离及其有效组分作用于人神经胶质瘤 SWO 细胞的研究[D]. 广州:暨南大学, 2001.

[10] 冯伟红, 李曼玲, 康琛, 等. 膝骨消痛膏的质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(7): 4-6.

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 71.

[责任编辑 顾雪竹]