

HPLC 波长切换法测定止痛片中芍药苷与胡椒碱的含量

吴坚,吉灵*,王丽芳,肖林林,何勇,赖彦婷,李莉

(赣州市人民医院药剂科,江西 赣州 341000)

[摘要] 目的:建立同时测定止痛片中芍药苷和胡椒碱含量的方法。方法:采用 Phenomsil ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,以乙腈-0.1% 磷酸为流动相,梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 230 nm (0~15 min,芍药苷),343 nm (15~30 min,胡椒碱),柱温 30 ℃。结果:芍药苷在 4.82~48.24 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 8$) 呈良好的线性关系,平均回收率为 100.59%,RSD 1.43% ($n=6$),胡椒碱在 2.51~25.12 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 7$) 呈良好的线性关系,平均回收率为 99.84%,RSD 1.45% ($n=6$)。结论:方法简单,灵敏度高,可用于止痛片中芍药苷和胡椒碱的含量测定。

[关键词] 止痛片;芍药苷;胡椒碱;高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0140-03

[doi] 10.11653/syfy2013150140

RP-HPLC with UV Switch Determination of Paeoniflorin and Pepper Alkali in Zhitong Tablets

WU Jian, JI Ling*, WANG Li-fang, XIAO Lin-lin, HE Yong, LAI Yan-ting, LI Li

(Department of Pharmacy, People's Hospital of Ganzhou, Ganzhou 341000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a simultaneous determination method for paeoniflorin and pepper alkali in Zhitong Tablets. **Method:** The determination was performed on a Phenomsil ODS column with acetonitrile-0.1% phosphoric acid as the mobile phase. The detection wavelength was set at 230 nm (0-15 min, paeoniflorin) and 343 nm (15-30 min, pepper alkali). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was maintained at 30 ℃. **Result:** paeoniflorin presented a good linearity in the concentration range of 4.82-48.24 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 8$). The average recovery rate was 100.59% with RSD 1.43% ($n=6$). Pepper alkali presented a good linearity in the concentration range of 2.51-25.12 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 7$). The average recovery rate was 99.84% with RSD 1.45% ($n=6$). **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible, it can be used as the basis for quality control of Zhitong Tablets.

[Key words] Zhitong Tablets; paeoniflorin; pepper alkali; HPLC

止痛片是根据民间验方仲氏止痛散^[1],结合临床实践予以加减化裁而成的经验方,由制川乌、白芍、延胡索和胡椒经提取精制而成,具有温通散寒、活血行气、化痰止痛作用,主要用于乳痛、痛经、腹部及肢体疼痛、术后疼痛以及晚期肺癌、乳腺癌、直肠癌

引起的疼痛^[2]。采用 HPLC 同时测定止痛方中 2 味药(延胡索、胡椒)或是 3 味药(制川乌、白芍、延胡索)的含量已有报道,但其检测指标终究不能同时控制 4 种药材的质量,因此在止痛方质量控制中稍显不足,此外同时测定白芍和胡椒中有效成分含量尚未见报道。本文在文献报道的基础上^[4-8],以方中白芍与胡椒中的主要成分芍药苷和胡椒碱^[3]为指标成分,建立同时测定二者含量的 HPLC 方法,旨在为全面评价止痛方的质量提供参考依据。

1 材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(G1314A VWD 检测器,在线脱气机,G1311A 四元梯度泵,柱温箱)

[收稿日期] 20130303(010)

[第一作者] 吴坚,主管药师,从事中药新剂型与新制剂研究, Tel:0797-8083593, E-mail: 1143967314@qq.com

[通讯作者] *吉灵,主任医师,从事药剂学与心胸外科学研究, Tel: 0797-8083513, E-mail: 13970768266@163.com

(美国 Agilent 公司), AB135-S 型 1/10 万电子天平(梅特勒-托利多), KQ-200 VDE 型超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司)。

芍药苷对照品(批号 110736-200933), 胡椒碱对照品(批号 110775-200902) 购于中国药品生物制品检定所, 乙腈为色谱纯, 水为重蒸水, 其他试剂均为分析纯, 止痛片自制(0.5 g/片, 素片)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Phenomasil ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸(B), 梯度洗脱(见表 1), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 230 nm(0~15 min 芍药苷), 343 nm(15~30 min 胡椒碱), 进样量 20 μL。

表 1 流动相梯度表

t/min	乙腈/%	0.1% 磷酸/%
0	12	88
8	24	76
12	39	61
30	80	20

2.2 测定溶液的制备

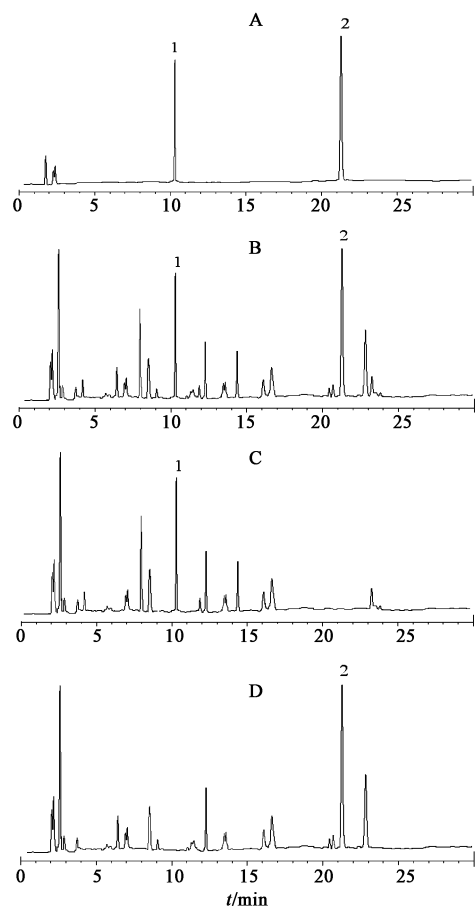
2.2.1 对照品溶液的制备 分别取芍药苷对照品(五氧化二磷减压干燥器中干燥 72 h)与胡椒碱对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇制成每 1 mL 含 48.24 μg 芍药苷、25.12 μg 胡椒碱的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取止痛片 20 片, 研磨成细粉, 精密称定粉末 0.1 g, 置于 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇定容, 超声处理 30 min, 放冷, 用 50% 甲醇补足至刻度, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液制备 按处方比例分别制备不含白芍和胡椒的 2 种止痛片, 按供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适应性试验 分别精密吸取供试品溶液、对照品溶液和阴性样品溶液各 20 μL, 在 2.1 项下条件分析, 结果表明, 在此条件下测定止痛片中芍药苷与胡椒碱指标成分分离良好, 分离度均 > 2.0, 理论塔板数分别为 63 850, 40 125 且其他成分及杂质不干扰其测定。对照品与样品的色谱图见图 1。

2.4 线性关系考察 分别准确吸取 2.2.1 项下混合标准品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 置 1 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇定容, 摇匀, 得系列浓度的混合对照品溶液。按 2.1 项下色谱条件进样分析, 以浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y) 绘制标准曲线, 得回



A. 标准品溶液; B. 止痛片供试品溶液; C. 胡椒阴性对照溶液; D. 白芍阴性对照溶液; 1. 芍药苷; 2. 胡椒碱

图 1 止痛片高效液相色谱

归方程 $Y_{\text{芍药苷}} = 51\ 319X - 15.259$ ($r = 0.999\ 8$), 表明芍药苷在 4.82 ~ 48.24 mg·L⁻¹ 良好的线性关系, $Y_{\text{胡椒碱}} = 20\ 193X - 18.542$ ($r = 0.999\ 7$), 表明胡椒碱在 2.51 ~ 25.12 mg·L⁻¹ 呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液 20 μL, 同一日内重复进样 6 次, 按 2.1 项下色谱条件, 记录芍药苷和胡椒碱的峰面积, 计算日内精密度, 结果芍药苷和胡椒碱的日内精密度 RSD 分别为 0.5%, 0.3%; 连续进样 5 d, 每天重复进样 1 次, 得日间 RSD, 芍药苷和胡椒碱的 RSD 分别为 1.0%, 0.5%。

2.6 重复性试验 取同一批样品适量, 按 2.2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 照 2.1 项下色谱条件测定, 记录峰面积, 计算样品含量。结果芍药苷与胡椒碱平均含量的分别为 1.626, 1.256 mg·g⁻¹, RSD 分别为 0.9%, 1.8% ($n = 6$), 表明本方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 20 μL, 照 2.1 项下色谱条件, 分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12 h, 测定供试品

溶液中芍药苷和胡椒碱峰面积,计算 RSD 分别为 1.54%,1.28%,表明 12 h 内供试品溶液中芍药苷与胡椒碱基本稳定。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的止痛片 20 片(含芍药苷 1.614 mg·g⁻¹,胡椒 1.248 mg·g⁻¹),研细,称取约 0.05 g,平行 6 份,精密称定,置 10 mL 量瓶中,精密加入含 78.92 mg·L⁻¹芍药苷与 61.25 mg·L⁻¹胡椒碱混合对照品溶液 1 mL,按 2.2.2 项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,并按 2.1 项下的色谱条件进行含量测定,计算回收率。结果见表 2。

表 2 止痛片中 2 种成分加样回收率试验

名称	样品含量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
芍药苷	80.86	78.92	160.09	100.39	100.59	1.43
	81.99		159.91	98.73		
	79.09		159.78	102.25		
	81.18		161.12	101.29		
	80.38		160.72	101.80		
	81.67		159.87	99.09		
胡椒碱	62.52	61.25	123.89	100.19	99.84	1.45
	63.40		124.34	99.50		
	61.15		121.65	98.77		
	62.77		122.67	97.79		
	62.15		124.38	101.60		
	63.15		125.12	101.18		

2.9 样品含量测定 取各批样品,按 2.2.2 项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,并按 2.1 项下的色谱条件进行各批次样品含量测定,结果见表 3。

表 3 止痛片中芍药苷与胡椒碱的含量测定(n=3)

名称	批号			平均含量 /mg·g ⁻¹	RSD /%
	20121203	20121205	20121212		
芍药苷	1.62	1.67	1.64	1.64	1.32
胡椒碱	1.18	1.22	1.24	1.22	2.47

3 讨论

3.1 指标成分的选择 在之前研究的基础上^[1-2],选择方中白芍与胡椒的主要成分芍药苷与胡椒碱,采用梯度洗脱结合切换波长法,使得止痛片中芍药苷与胡椒碱两个成分在同一张色谱图上得到有效分离分析,节省分析时间,为该方建立一种快速的质量控制方法。

3.2 检测波长的选择 单波长测定时,仅能保证一种指标成分的峰面积最大,其他指标成分无法达到最大紫外吸收^[9]。为了能准确、真实地反映止痛片中芍药苷和胡椒碱的含量,因此本试验中分别选定

检测波长为 230,343 nm,采用不同检测时间的波长切换法^[10],以保证两种指标成分的紫外吸收均在最大处,从而保证了本试验方法的准确性。

3.3 流动相的选择 比较使用甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸溶液、乙腈-醋酸溶液、乙腈-磷酸溶液等流动相系统,结果表明,以乙腈-0.1% 磷酸溶液作为流动相系统,梯度洗脱两种指标成分与杂质达到基线分离,峰形较好,理论塔板数高,分离效果最好。

3.4 提取溶剂的选择 由于止痛方中芍药苷受热不稳定^[11],胡椒碱相对稳定^[12],为避免加热回流提取中长时间的高温对样品中芍药苷的破坏,故采用超声提取。本试验分别考察了以水、50% 甲醇、甲醇为提取溶剂的超声提取效果,结果表明 50% 甲醇的提取效果最好。

[参考文献]

[1] 郑琴,郝伟伟,杨明,等. RP-HPLC 同时测定止痛方提取物中 6 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(7):1269.

[2] 郑琴,郝伟伟,杨明. HPLC 同时检测止痛胶囊中 2 种生物碱的含量[J]. 中成药, 2007, 29(12):1791.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:96, 227.

[4] 雷定超,鄂秀辉,张兰兰,等. HPLC 同时测定糖敏灵丸中 5 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13):70.

[5] 毕赢,刘军辉,罗容,等. HPLC 同时测定芫花中胡椒碱和芫花明宁碱含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1):47.

[6] 李中娥,王春颖. HPLC 同时测定妇康片中芍药苷和阿魏酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10):143.

[7] 毕晓黎,孙冬梅,罗文汇,等. HPLC 法同时测定复方姜黄微囊中姜黄素和胡椒碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2):20.

[8] 肖霞,曹俊凯. 中药止痛胶囊中芍药苷的 HPLC 含量测定[J]. 中国现代药物应用, 2011, 5(11):72.

[9] 刘海涛,雷鹏,唐涛,等. RP-HPLC 法同时测定补阳还五汤中 3 种指标成分的含量[J]. 中国药房, 2013, 24(3):232.

[10] 李伟铭,赵月然,杨燕云,等. HPLC 波长切换法同时测定白芍饮片中 9 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(12):2208.

[11] 解江纯,刘志东,田慧,等. 芍药苷稳定性研究[J]. 天津中医药, 2010, 27(4):344.

[12] 莫峥嵘,张岐. 胡椒碱的抗氧化活性及稳定性研究[J]. 海南师范学院学报:自然科学版, 2006, 19(1):52.

[责任编辑 顾雪竹]