

HPLC 同时测定葶苈中胡椒碱和葶苈明宁碱含量

毕赢¹, 刘军辉¹, 罗容¹, 王庆松², 吴霞^{1*}

(1. 首都医科大学中医药学院中药系, 北京 100069; 2. 首都医科大学
基础医学院实验教学中心, 北京 100069)

[摘要] 目的: 采用 HPLC 同步测定葶苈中胡椒碱和葶苈明宁碱的含量, 为葶苈药材多指标质量控制奠定基础。方法: 以葶苈药材中胡椒碱和葶苈明宁碱为指标成分, 应用 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱, 流动相 0.25% 甲酸-甲醇 (35:65), 流速为 1 mL·min⁻¹, 检测波长 343 nm, 柱温 40 ℃。结果: 胡椒碱和葶苈明宁碱的峰面积与浓度的线性关系良好 ($r=0.9999$), 平均加样回收率为 100.4%, 102.2%, RSD 分别为 2.6%, 2.5%。建立了同时对葶苈中的 2 个成分进行定量的测定方法, 并将此方法用于不同来源的葶苈各成分的测定。结论: 该方法简便快捷, 重复性良好, 为中药材葶苈提供了更合理、可靠的质控方法。

[关键词] 高效液相色谱法; 葶苈; 胡椒碱; 葶苈明宁碱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0047-04

Simultaneous Determination of Piperine and Piperlongumine in *Piper longum* by HPLC

BI Ying¹, LIU Jun-hui¹, LUO Rong¹, WANG Qing-song², WU Xia^{1*}

[收稿日期] 20110511(012)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81073016); 北京市教育委员会科技计划面上项目(KM201010025013, PHR200907113)

[第一作者] 毕赢, 在读硕士研究生, 从事中药化学成分与新药研发, Tel: 13466790318, E-mail: dlby0419@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 吴霞, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药化学成分与新药研发, Tel: 010-83911671, E-mail: wuxia6710@163.com

- [8] 白雁, 张威, 龚海燕, 等. NIRS 结合 TQ 软件建立银黄颗粒中绿原酸定量模型[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 35.
- [9] 万楷杨, 高慧敏, 张启伟, 等. 近红外漫反射光谱法快速测定苦参和白土苓药材的水分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 62.
- [10] 杨南林, 程翼宇, 瞿海斌. 一种用于中药纯化过程的近红外光谱分析新方法[J]. 化学学报, 2003, 61(5): 742.
- [11] 邢丽红, 徐金钟, 瞿海斌. 近红外光谱法快速测定丹参醇沉过程中的鞣制[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(10): 1813.
- [12] Woo Y A, Kim H J, Ze K R. Near-infrared spectroscopy for the non-destructive and fast determination of geographical origin of *Angelicae gigantis radix* [J]. Phram Biomed, 2005, 36(5): 955.
- [13] Blanco M, Gozalez B R, Bertran E. Monitoring powder blending in pharmaceutical processes by use of near infrared spectroscopy [J]. Talanta, 2002, 56(1): 203.
- [14] 吉海彦. 近红外光谱仪器技术[J]. 现代科学仪器, 2001: 6.
- [15] 张延莹, 张金巍, 刘岩. 近红外技术在白芍醇提在线质量监控中的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(9): 662.
- [16] 章顺楠, 杨海雷, 刘占强, 等. 近红外光谱法在线检测复方丹参滴丸料液中有有效成分含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(2): 192.
- [17] 陈雪英, 陈勇, 王龙虎, 等. 红花醇沉液浓缩除醇过程中多元指控指标的近红外快速检测[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(11): 2086.
- [18] Max Feinberg, Bruno Boulanger, Walther Dewe. New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data[J]. Anal Bioanal Chem, 2004, 380: 502.

[责任编辑 蔡仲德]

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, College of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2. Basic Medical Experimental Teaching Center, College of Basic Medicine Capital Medical University, Beijing 100069, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a high performance liquid chromatographic method (HPLC) for simultaneous determination of piperine and piperlongumine in *Piper longum*. **Method:** Agilent Eclipse XDB-C18 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used to separate the analytes using a mode with a mobile phase consisting of water with 0.25% formic acid (35) and methyl alcohol (65) at a flow rate of 1 mL·min⁻¹ and an operating column temperature of 40 °C. The detection wave length was set at 343 nm. **Result:** All the constituents showed good linearity ($r=0.9999$) in the range of the tested concentration, the average recoveries of the method were 100.4% and 102.2%, RSD were 2.6% and 2.5%. This method successfully determined 2 compounds in *P. longum* (from 8 different origins) simultaneously and quantitatively. **Conclusion:** This is a more reasonable and credible quality control method for the Chinese traditional medicine of *P. longum* and it is simple, well reproducible.

[Key words] HPLC; *Piper longum*; piperine; piperlongumine; determination

荜茇是中、蒙、藏、维医的习惯用药,具有温中散寒,行气止痛的功能,收载于《中国药典》(2010年版一部)^[1]及《中华人民共和国药典卫生部药品标准维吾尔药分册》^[2]。对于荜茇的化学成分研究表明,荜茇中主要的成分是生物碱及酰胺类成分,此外还含有萜类、挥发油等其他类成分^[3]。现代药理学研究表明,荜茇具有广泛的药理活性如抗胃肠道疾病^[4]、抗菌消炎^[5]、抗氧化^[6]等。2010年版《中国药典》及有关文献选用活性成分胡椒碱为指标成分对荜茇药材进行质量控制^[1,7-8]。荜茇明宁碱也是荜茇中的有效成分,具有抗血小板聚集等作用^[9]。近年来,荜茇明宁碱由于其明确的药理作用,越来越受到人们的关注。本实验采用 HPLC 同时测定荜茇中胡椒碱和荜茇明宁碱的含量,并对不同批次的荜茇药材进行了含量测定。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪系列,包括: G1365D DAD(检测器), G1311A Quat Pump(四元梯度泵), G1332A(在线真空脱气机), G1329A ALS(自动进样器), G1316A Colcom(柱温箱), Agilent Chemstation system(工作站)(Agilent Technologies, 美国); ME235S 1/10 万电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司), KQ5200DV 型数控超声波清洗器(40 kHz, 昆山市超声仪器有限公司); Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)(Agilent Technologies 公司, 美国)胡椒碱对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 0775-200203, 纯度 > 99%), 荜茇明宁碱对照品(首都医科大学中医学

院自制, 纯度 > 99%), 实验用 8 批荜茇药材购于 2008 年 5 月至 2011 年 3 月, 见表 1, 购于新疆维吾尔医院的药材由新疆维吾尔医药研究所闫明研究员鉴定, 购于河北安国药材市场和同仁堂药店的药材由首都医科大学中医药学院刘长利副教授鉴定, 各批药材鉴定为荜茇 *Piper longum* L. 的干燥果穗, 凭证标本保存于本院中药化学教研室。

表 1 荜茇样品来源信息

批号	来源
200805	2008 年购于河北安国药材市场
200810	2008 年购于新疆维吾尔医院
200905	2009 年购于河北安国药材市场
201003	2010 年购于北京同仁堂药店
201005	2010 年购于河北安国药材市场
201008	2010 年购于河北安国药材市场
201102	2011 年购于北京同仁堂药店
201103	2011 年购于河北安国药材市场

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.25% 甲酸(65:35), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 343 nm, 柱温 40 °C, 进样量 10 μL。

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 4.04 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为胡椒碱储备液, 依次精密吸取 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 mL 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容

后,即得系列胡椒碱对照品溶液;精密称取萆苈明宁碱对照品 1.02 mg,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇定容配置成 $0.0408\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的萆苈明宁碱储备液,依次稀释配成 0.001 671, 0.002 089, 0.002 611, 0.003 264, 0.004 080, 0.006 120, 0.008 160 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

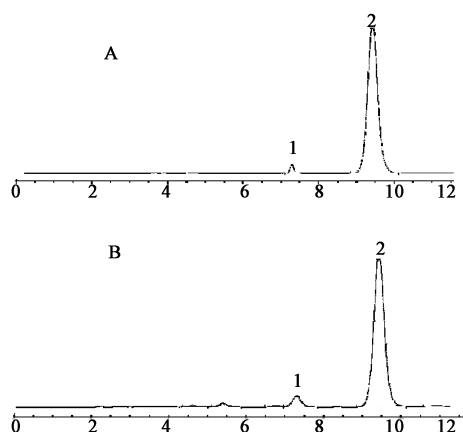
2.2.2 供试品溶液的制备 将萆苈药材粉碎过 80 目筛,取 100 mg 置于 100 mL 量瓶中,加甲醇定容,超声 10 min,用甲醇补足至刻度,0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 将 2.2.1 项下配置的标准品溶液按 2.1 的色谱条件进行 HPLC 检测,以浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,得胡椒碱的回归方程为 $Y = 63\ 629X - 11.219$ ($r = 0.999\ 9$),表明胡椒碱在 $0.008\ 08 \sim 0.064\ 64\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 呈良好的线性关系;萆苈明宁碱回归方程为 $Y = 61\ 187X - 19.452$ ($r = 0.999\ 9$),表明萆苈明宁碱在 $0.001\ 67 \sim 0.008\ 16\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 呈良好的线性关系,对照品和供试品的液相色谱图见图 1。

2.3.2 精密度试验 吸取同一对照品溶液,在 2.1 项下色谱条件,于同一天内重复进样 6 次,记录胡椒碱和萆苈明宁碱的峰面积为日内精密度。胡椒碱和萆苈明宁碱的 RSD 分别为 0.5%, 0.3%;将上述供试品溶液连续进样 3 天,每天重复进样 6 次。记录峰面积为日间精密度,胡椒碱和萆苈明宁碱的 RSD 分别为 1.0%, 0.5%,均 < 3%,表明精密度良好。

2.3.3 重复性试验 按 2.2.2 项下供试品溶液制



1. 萆苈明宁碱; 2. 胡椒碱

图 1 混合对照品(A)和供试品(B)液相色谱

备方法,称取同一批次萆苈样品 0.1 g,共 6 份,胡椒碱和萆苈明宁碱质量分数分别为 2.85%, 0.11%, RSD 分别为 2.9%, 2.9%。

2.3.4 稳定性试验 取萆苈供试品溶液,室温放置 72 h,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 h 在 2.1 项下色谱条件测定,记录峰面积。胡椒碱和萆苈明宁碱的 RSD 分别为 1.4%, 1.2%。结果表明供试品溶液至少在 72 h 内稳定。

2.3.5 加样回收率试验 称取已测知含量的萆苈样品 6 份,每份约 100 mg,加入胡椒碱对照品适量,按供试品溶液制备方法操作,并按上述色谱条件测定;称取同一批次萆苈样品 6 份,每份约 200 mg,加入萆苈明宁碱对照品适量,按供试品溶液制备方法操作,并按上述色谱条件测定胡椒碱的平均回收率为 100.4%, RSD 2.6%,萆苈明宁碱的平均回收率 102.2%, RSD 2.5%,见表 2,3。

表 2 胡椒碱加样回收率试验 ($n = 6$)

称样量 /mg	样品中含量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
100.33	2.55	2.50	5.13	103.3	100.4	2.6
100.49	2.55	2.51	5.08	100.7		
100.28	2.55	2.51	4.98	96.9		
100.37	2.55	2.50	5.11	102.4		
100.16	2.54	2.51	5.09	101.4		
100.24	2.55	2.51	4.99	97.4		

2.4 萆苈药材的含量测定 分别称取 8 批来源不同的萆苈样品 100 mg,按 2.2.2 项制备供试品溶液,按 2.1 色谱条件进行测定,结果见表 4。

3 结果与讨论

3.1 多成分同时测定 由于中药成分的复杂性和

多样性,目前在中药的质量控制方面,倾向于多成分、多指标控制。而以往对于萆苈的质量控制只采用胡椒碱为单一指标成分。本实验突破了以往仅采用胡椒碱为指标成分的单指标质量控制方法,同时测定萆苈中胡椒碱和萆苈明宁碱的含量,为萆苈药

表 3 萆薢明宁碱回收率试验 (n=6)

称样量 /mg	样品中含量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
200.26	0.22	0.21	0.44	104.6	102.2	2.5
200.19	0.22	0.23	0.46	104.3		
200.28	0.22	0.21	0.44	104.6		
200.33	0.22	0.23	0.45	99.8		
200.14	0.22	0.26	0.48	99.9		
200.30	0.22	0.24	0.46	99.9		

表 4 不同批号萆薢药材中胡椒碱和萆薢明宁碱含量 (n=3) %

药材批号	胡椒碱	萆薢明宁碱
200805	2.85	0.11
200905	2.63	0.12
201005	3.03	0.11
200810	3.00	0.09
201003	2.58	0.13
201008	2.75	0.11
201102	2.59	0.12
201103	2.83	0.11

材多指标质量控制标准的建立提供了依据,也为含此类酰胺类生物碱类成分的其他药材定量分析提供了参考。

3.2 提取条件的优化 为了提高分析对象的提取率,减少杂质的干扰,本研究以甲醇为提取溶剂,以胡椒碱和萆薢明宁碱的提取率为指标,分别比较了冷浸提取法、加热回流提取法及超声提取法。结果表明,回流提取法与超声提取法的提取率相当,均优于冷浸法。考虑到超声提取法操作简单方便、提取时间较短、各操作参数可控、提取过程重复性好,有助于实现图谱的高重复性,因此选择超声提取法。并且分别考察了提取时间、提取溶剂体积对提取率的影响,结果表明液料比 100 mL:0.1 g,超声提取 10 min 能够较完全地提取出分析对象。

3.3 关于不同批次样品含量的差异性 由萆薢药材的含量测定可知,8 批商品萆薢中胡椒碱和萆薢明宁碱的含量相差较大,RSD 分别为 6.3%,

11.1%。其原因我们认为可能与药材不同产地和贮存时间的长短等因素有关。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部 [S]. 2010:164.
 [2] 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 [S]. 1999:64.
 [3] Parmar V S, Jain S C, Gupta S. Polyphenols and alkaloids from *Piper* species [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49 (4):1069.
 [4] Aqvi S, Intasar H, Shah A J, et al. Insight into the possible mechanism of antidiarrheal and antispasmodic activities of piperine [J]. *Pharm Biol*, 2009, 47(8):660.
 [5] Vaghasiva Y, Nair R, Chanda S. Investigation of some *Piper* species for antibacterial and anti-inflammatory property [J]. *Int J Pharmacol*, 2007, 3(5):400.
 [6] Veeru P, Kishor M P, Meenakshi M. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity [J]. *J Med Plants Res*, 2009, 3(8):608.
 [7] 余红芳, 喻喜华, 焦玉, 等. 24 批市售萆薢的质量分析 [J]. *中国现代中药*, 2009, 11(5):35.
 [8] 姚征, 顾建刚, 储戟农. 高效液相色谱法测定萆薢止痛酊中胡椒碱的含量 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2007, 14(12):43.
 [9] Iwashita M, Oka N, Ohkubo S, et al. Piperlongumine, a constituent of *Piper longum* L., inhibits rabbit platelet aggregation as a thromboxane A2 receptor antagonist [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 570(1/3):38.

[责任编辑 蔡仲德]