

高效液相色谱法测定丁桂儿脐贴中桂皮醛和胡椒碱含量

杨晓宁 禹玉洪 刘辉 董蓉 张超

【摘要】 目的 建立丁桂儿脐贴中桂皮醛和胡椒碱的含量测定方法。**方法** 采用 C18 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 测定桂皮醛以甲醇—水 (50:50) 为流动相, 检测波长为 290 nm; 测定胡椒碱以乙腈—水 (45:55) 为流动相, 检测波长为 343 nm。**结果** 桂皮醛进样量在 0.1053 ~ 3.3696 μg 范围内与色谱峰峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.9999$), 胡椒碱进样量在 0.02592 ~ 0.25920 μg 范围内与色谱峰峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.9999$), 它们准确度、精密度、稳定性均符合要求。**结论** 采用高效液相色谱 (HPLC) 法测定丁桂儿脐贴中丁香酚和胡椒碱含量, 具有简便、快速、准确等优点, 可用于控制丁桂儿脐贴的质量。

【关键词】 丁桂儿脐贴; 高效液相色谱; 桂皮醛; 胡椒碱; 含量测定

【中图分类号】 R284.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.01.004

Determination of cinnamaldehyde and piperine in Dingguier Umbilical Paste by HPLC YANG Xiao-ning, YU Yu-hong, LIU Hui, et al. Yaobao Pharmaceutical group, Beijing 101111, China
Corresponding author: YANG Xiao-ning, E-mail: yn3528@126.com

【Abstract】 Objective To establish a method for the determination of cinnamaldehyde and piperine in Dingguier Umbilical Paste. **Methods** Determination of Cinnamaldehyde: The C18 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with the mobile phase of methanol-water (50:50). The detection wave-length was 290 nm. Determination of piperine: The C18 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with the mobile phase of acetonitrile-water (45:55). The detection wave-length was 343 nm. **Results** Cinnamaldehyde had the good linearity in the range of 0.1053 ~ 3.3696 μg ($r=0.9999$). Piperine had the good linearity in the range of 0.02592 ~ 0.25920 μg ($r=0.9999$). **Conclusion** The method is proved to be simple, accurate and reliable, which can be used to control the quality of Dingguier Umbilical Paste.

【Key words】 Dingguier Umbilical Paste; High performance liquid chromatography; Cinnamaldehyde; Piperine; Content determination

丁桂儿脐贴 (小儿腹泻帖) 是针对儿童常见病, 高发病腹泻腹痛的预防和治疗用药, 由丁香、肉桂、荜茇组成, 临床疗效好, 安全无副作用。为了提高其质量控制标准, 笔者采用高效液相色谱法测定丁桂儿脐贴中有效成分桂皮醛和胡椒碱含量。

1 仪器与材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪; AB265-S 电子天平 (Mettler Toledo); KQ-500DE 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。桂皮醛对照品 (购自中国食品药品检定研究院, 供含量测定用, 批号: 110710-201016), 胡椒碱对照品 (购自中国食品药品检定研究院, 供含量测定用, 批号: 0775-200203); 乙腈及甲醇为色谱纯 (Burdick & Jackson 公司), 超纯水, 无水乙醇为分析纯。丁桂儿脐贴来源于亚宝药业集团股份有限公司, 批号 110849、110850、110851, 随机抽取连续生产的 3 批成品。

基金项目: 国家重大新药创制项目 (2011ZX09201-201-35); 山西省自然科学基金 (2011011035-5)

作者单位: 101111 北京, 亚宝药业集团股份有限公司北京药物研究院

作者简介: 杨晓宁 (1977 -), 女, 硕士, 工程师。研究方向: 中药新药研发。E-mail: yn3528@126.com

2 方法与结果

2.1 桂皮醛含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适应性试验 以 Agilent technologies ZORBAX SB-C18 为色谱柱;以水—甲醇 (50:50) 为流动相;检测波长为 290 nm。理论板数按桂皮醛峰计算应不低于 3000^[1]127-128。

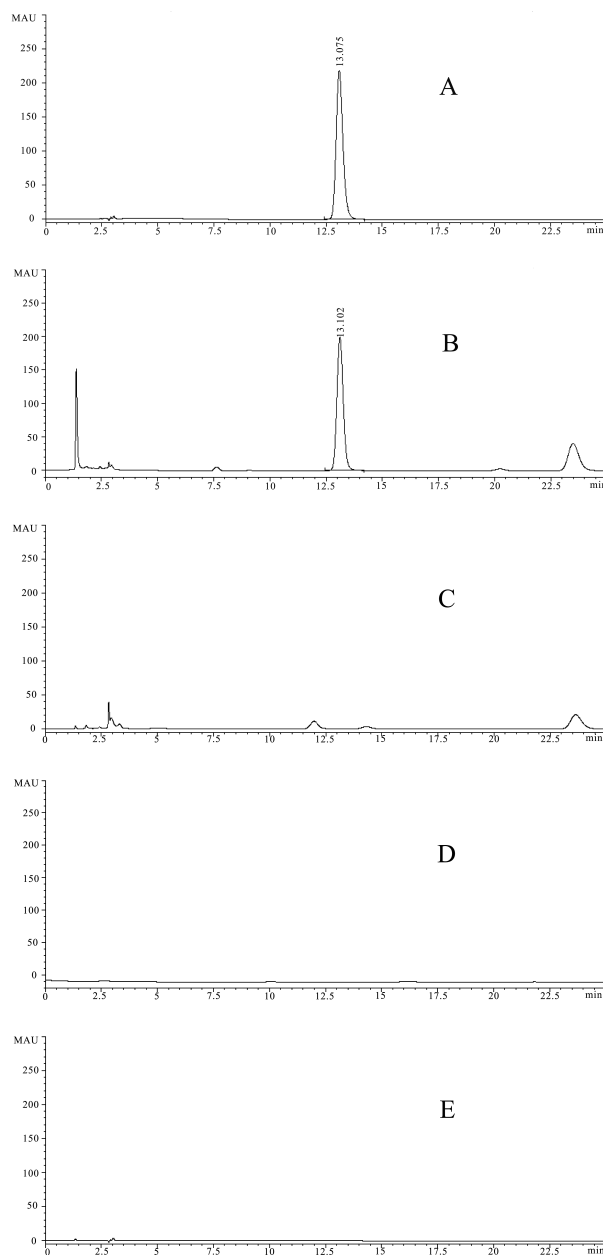
2.1.2 溶液的制备 (1) 对照品溶液的制备:取桂皮醛对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中加入无水乙醇制成每 1 ml 含 40 μg 的溶液,即得。(2) 供试品溶液的制备:取装量差异项下本品 10 贴,除去盖衬、背衬,剪碎,混匀,立即取样约 0.5 g,精密称定,置具塞棕色锥形瓶中,精密加入无水乙醇 50 ml,称定重量,置冷水浴中,超声处理(功率 500 W,频率 40 kHz)30 分钟,放至室温,再称定重量,用无水乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,滤液置冰箱中冷藏,放置过夜,滤过,取续滤液,即得。(3) 肉桂阴性对照溶液的制备:按处方药味比例,去肉桂,按制备工艺制成阴性对照制剂,再按供试品溶液制备方法制备成阴性对照液。

2.1.3 准确度 精密称取装量差异项下同一批本品 9 份,每份约 0.25 g,分成 3 组,分别精确加入 0.9477 mg/ml 的桂皮醛对照品溶液 0.8 ml、1 ml、1.2 ml (即含桂皮醛 0.7582 mg、0.9477 mg、1.1372 mg),按“2.1.2”项下方法配制供试品溶液,测定含量。色谱条件同“2.1.1”的方法。桂皮醛的平均回收率为 102.47%, $RSD = 0.52\%$, $n = 9$ 。表明该法加样回收率合格。

2.1.4 精密度 (1) 重复性:实验室的实验人员 (A) 操作,精密称取装量差异项下同一批本品 6 份,每份约 0.5 g,按“2.1.2”项下方法配制供试品溶液,色谱条件同“2.1.1”项下的方法。测定桂皮醛的平均含量为 3.82 mg/g, $RSD = 1.60\%$, $n = 6$ 。表明样品重复性良好。(2) 中间精密度试验:同实验室不同实验人员 (B) 操作,精密称取装量差异项下同一批本品 6 份,每份约 0.5 g,按“2.1.2”项下方法配制供试品溶液,使用不同的色谱柱 (Agilent technologies Eclipse XDB-C18, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 色谱柱 S/N: USH016008)、不同的液相测定,色谱条件同“2.1.1”项下的方法,并与实验人员 (A) 测定结果相比较,结果测定桂皮醛的平均含量为 3.80 mg/g, $RSD = 1.22\%$, $n = 12$ 。表明样品中间精密度良好。

2.1.5 专属性 (1) 分别精密吸取肉桂阴性对照

溶液、空白溶剂(无水乙醇)及流动相各 10 μl,注入液相色谱仪,测定,即得。(2) 结果:在肉桂阴性对照溶液、空白溶剂(无水乙醇)及流动相色谱图中,在与桂皮醛对照品色谱峰相应的保留时间 ($RT = 12.9 \sim 13.3$ 分钟) 点,未见有色谱峰。(3) 结论:阴性无干扰,本品其他药材、溶剂及辅料不干扰本品的桂皮醛含量测定。本方法的专属性很好,见图 1。



A: 桂皮醛对照品; B: 供试品溶液; C: 肉桂阴性对照溶液;
D: 流动相; E: 空白溶剂

图 1 桂皮醛含量测定专属性 HPLC 色谱图

2.1.6 线性 (1) 对照品溶液的制备:精密称取桂皮醛对照品适量,加无水乙醇制成每 1 ml 含 1.053 mg 的溶液,即得对照品储备液。(2) 精密量

取上述对照品溶液 0.1 ml、0.2 ml、0.4 ml、0.8 ml、1.6 ml、3.2 ml, 分别置 10 ml 棕色量瓶中, 用无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品 1、2、3、4、5、6。分别精密量取 10 μ l, 注入色谱仪, 测得峰面积, 以对照品进样量 X 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标作图。计算得到线性回归方程为 $Y = 10705X + 96.038$ ($r = 0.9999$), 结果表明桂皮醛 0.1053 ~ 3.3696 μ g 范围内与色谱峰峰面积呈良好的线性关系。

2.1.7 供试品溶液的稳定性考察 取装量差异项下本品 10 贴, 除去盖衬, 剪碎, 混匀, 取约 0.5 g, 按“2.1.2”项下方法配制供试品溶液, 分别在制备后 0 小时、4 小时、8 小时、12 小时、16 小时、20 小时、24 小时进样。在 24 小时内测得桂皮醛平均峰面积为 3957.92, $RSD = 0.47\%$, 表明样品在 24 小时内稳定性良好。

2.1.8 样品的桂皮醛含量测定 分别测定本公司三批丁桂儿脐贴成品, 按照“2.1.2”项下方法配制供试品溶液, 色谱条件同“2.1.1”项下的方法, 测定桂皮醛含量, 结果见表 1。

表 1 三批样品桂皮醛含量测定结果 ($n = 4$)

批号	含量 (mg/g)	RSD (%)
110849	3.90	0.95
110850	3.93	0.89
110851	3.99	0.97

2.2 胡椒碱含量测定

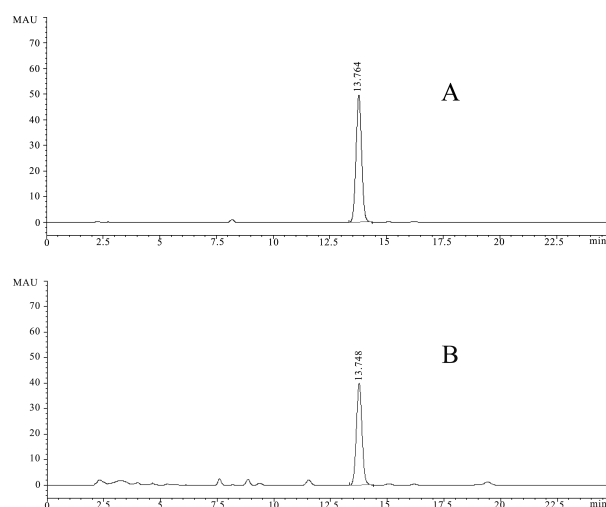
2.2.1 色谱条件与系统适应性试验 以 Waters X Bridge C18 为色谱柱; 以乙腈—水 (45:55) 为流动相; 检测波长为 343 nm。理论板数按胡椒碱峰计算应不低于 3000^{[1]219}。

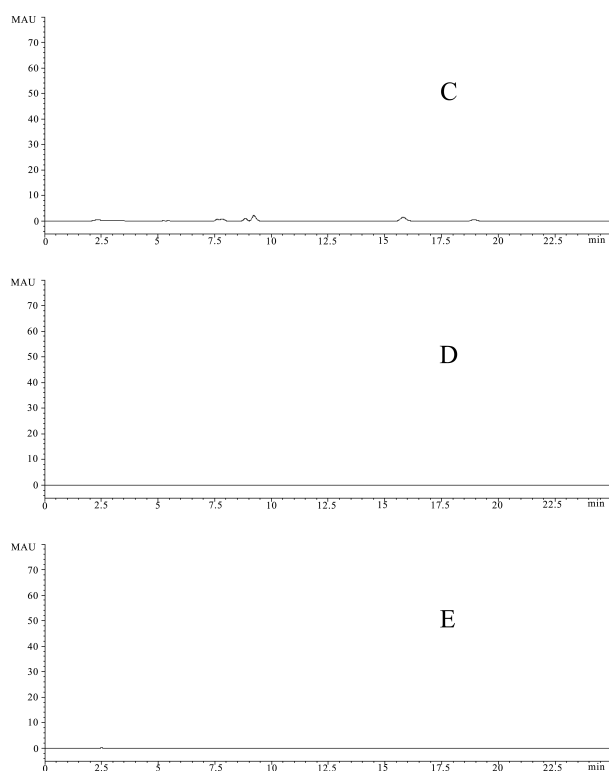
2.2.2 溶液的制备 (1) 对照品溶液的制备: 取胡椒碱对照品适量, 精密称定, 置棕色量瓶中加无水乙醇制成每 1 ml 含 12 μ g 的溶液, 即得。(2) 供试品溶液的制备: 取装量差异项下本品 10 贴, 除去盖衬、背衬, 剪碎, 混匀, 取约 0.5 g, 精密称定, 置 100 ml 棕色量瓶中, 加入无水乙醇 90 ml, 密塞, 超声处理 (功率 500 W, 频率 40 kHz) 30 分钟, 放至室温, 用无水乙醇定容至刻度, 摇匀, 置冰箱中冷藏, 放置过夜, 滤过, 取续滤液, 即得。(3) 茛菪阴性对照溶液的制备: 按处方药味比例, 去茛菪, 按制备工艺制成阴性对照制剂, 再按供试品溶液制备方法制备成阴性对照液。

2.2.3 准确度 精密称取装量差异项下同一批本品 9 份, 每份约 0.25 g, 分成 3 组, 分别精确加入 0.5702 mg/ml 的胡椒碱对照品溶液 0.8 ml、1.0 ml、1.2 ml (即含胡椒碱 0.4562 mg、0.5702 mg、0.6843 mg), 按“2.2.2”项下方法配制供试品溶液, 测定含量。色谱条件同“2.2.1”项下的方法。胡椒碱的平均回收率为 100.46%, $RSD = 1.43\%$, $n = 9$ 。表明该法加样回收率合格。

2.2.4 精密度 (1) 重复性: 由实验室的实验人员 (A) 操作, 精密称取装量差异项下同一批本品 6 份, 每份约 0.5 g, 按“2.2.1”项下方法配制供试品溶液, 测定含量。色谱条件同“2.2.1”项下的方法。测定胡椒碱的平均含量为 2.15 mg/g, $RSD = 0.71\%$, $n = 6$ 。表明样品重复性良好。(2) 中间精密度: 由同实验室不同实验人员 (B) 操作, 精密称取装量差异项下同一批本品 6 份, 每份约 0.5 g, 按“2.2.2”项下方法配制供试品溶液, 使用不同的色谱柱 (Agilent, SB-C18, 4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m, 色谱柱 S/N: USCL032313)、不同的液相 (Agilent 1200 高效液相色谱仪, 编号: 4 号) 测定, 色谱条件同“2.2.1”项下的方法, 并与实验人员 (A) 测定结果相比较。结果测定胡椒碱的平均含量为 2.15 mg/g, $RSD = 0.26\%$, $n = 12$ 。表明样品中间精密度良好。

2.2.5 专属性 (1) 分别精密吸取茛菪阴性对照溶液、空白溶剂 (无水乙醇) 及流动相各 10 μ l, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。(2) 结果: 在茛菪阴性对照溶液、空白溶剂 (无水乙醇) 及流动相色谱图中, 在与茛菪对照品色谱峰相应的保留时间 ($RT = 13.5 \sim 13.9$ 分钟) 点, 未见有色谱峰。(3) 结论: 阴性无干扰, 本品其他药材、溶剂及辅料不干扰本品的胡椒碱含量测定, 本方法的专属性很好, 见图 2。





A: 胡椒碱对照品; B: 供试品溶液; C: 茛菪碱对照溶液;
D: 流动相; E: 空白溶剂

图2 胡椒碱含量测定专属性 HPLC 色谱图

2.2.6 线性 (1)对照品溶液的制备 精密称取胡椒碱对照品适量,加无水乙醇制成每 1 ml 含 0.864 mg 的溶液,即得对照品储备液。精密量取上述对照品溶液 3 ml 至 100 ml 量瓶,无水乙醇定容,摇匀,即得对照品浓度为 0.02592 mg/ml 的对照品储备液。(2)精密量取浓度为 0.02592 mg/ml 的对照品储备液 1.0 ml、3.0 ml、5.0 ml、7.0 ml、9.0 ml、10.0 ml,分别置 10 ml 棕色量瓶中,用无水乙醇稀释至刻度,摇匀,即得对照品 1、2、3、4、5、6。分别精密量取 10 μ l,注入色谱仪,测得峰面积,以对照品进样量 X 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标作图。计算得到线性回归方程为 $Y = 66613X - 3.8247$ ($r = 0.9999$),结果表明胡椒碱 0.02592 ~ 0.25920 μ g 范围内与色谱峰峰面积呈良好的线性关系。

2.2.7 供试品溶液的稳定性考察 本次试验考察了供试品溶液的稳定性,方法如下:取装量差异项

下本品 10 贴,除去盖衬,剪碎,混匀,取约 0.5 g,按“2.2.2”项下方法配制供试品溶液,分别在制备后 0 小时、4 小时、8 小时、12 小时、16 小时、20 小时、24 小时进样。在 24 小时内测得胡椒碱平均峰面积为 820.9, $RSD = 0.44\%$ 。表明样品在 24 小时内稳定性良好。

2.2.8 样品的胡椒碱含量测定 分别测定 本厂三批丁桂儿脐贴成品,按照“2.2.2”项下方法配制供试品溶液,测定胡椒碱含量,结果见表 2。

表2 三批样品胡椒碱含量测定($n = 4$)

批号	含量 (mg/g)	RSD (%)
110849	2.13	0.07
110850	2.15	0.32
110851	2.11	0.27

3 讨论

桂皮醛含量测定流动相考察了乙腈—水^[1]127-128、甲醇—水系统,结果乙腈—水系统为流动相桂皮醛峰拖尾,而甲醇—水系统为流动相桂皮醛峰拖尾因子符合规定,最后根据保留时间、拖尾因子、分离度等因素,确定流动相选择甲醇—水(50:50)。胡椒碱含量测定流动相选择参照 2010 版《中华人民共和国药典》一部茛菪^[1]219 含量测定项下流动相甲醇—水系统,并考察了乙腈—水系统^[2]。由试验结果可知流动相乙腈—水(45:55),保留时间合适,分离度大于 1.5,拖尾因子略超出 0.95 ~ 1.05,理论板数大于 3000,胡椒碱峰能够得到很好的分离,且峰型较好,故流动相选择乙腈—水(45:55)。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 127-128, 219.
- [2] 邵台川, 彭霞. RP-HPLC 法测定傣药辣藤中胡椒碱的含量[J]. 中国民族医药杂志, 2008, 14(2): 50-52.

(收稿日期: 2013-10-12)

(本文编辑: 董历华)