

HPLC 同时测定丹绿补肾胶囊中次野鸢尾黄素和胡椒碱的含量

王文鹏¹, 李响明¹, 周永妍^{1*}, 冯玉康¹, 郝鹏彬¹, 高亮¹, 孙胜斌¹, 姜国志²(1.神威药业集团有限公司, 石家庄 051430; 2.中药注射剂新药技术开发国家地方联合工程实验室, 石家庄 051430)

摘要:目的 建立同时测定丹绿补肾胶囊中次野鸢尾黄素、胡椒碱含量的 HPLC 方法。方法 选用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 乙腈-0.2%磷酸为流动相(41:59), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 40 °C, 检测波长为 266 nm。结果 次野鸢尾黄素和胡椒碱分别在 0.010 30~0.309 0 μg, 0.081 73~2.451 9 μg 内呈良好的线性关系, 相关系数≥0.999 8; 加样回收率(n=9)分别为 99.7%, 100.6%; RSD 分别为 1.2%, 0.9%; 样品在 24 h 内稳定, 次野鸢尾黄素和胡椒碱 RSD 分别为 1.6%, 0.6%; 在测定样品中, 次野鸢尾黄素和胡椒碱最低含量分别为每粒 0.35, 6.4 mg。结论 该方法简便、准确、重复性好, 可作为丹绿补肾胶囊的质量控制方法。

关键词: 丹绿补肾胶囊; 次野鸢尾黄素; 胡椒碱; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)07-1001-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.07.012

引用本文: 王文鹏, 李响明, 周永妍, 等. HPLC 同时测定丹绿补肾胶囊中次野鸢尾黄素和胡椒碱的含量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(7): 1001-1003.

Simultaneous Determination of Irisfloreantin and Piperine in Danlyu Bushen Capsules by HPLC

WANG Wenpeng¹, LI Xiangming¹, ZHOU Yongyan^{1*}, FENG Yukang¹, HAO Pengbin¹, GAO Liang¹, SUN Shengbin¹, JIANG Guozhi²(1.Shineway Pharmaceutical Group Co., Ltd., Shijiazhuang 051430, China; 2.State-local Joint Engineering Laboratory of New Drugs Development Technology for TCM Injection, Shijiazhuang 051430, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for the simultaneous determination of irisfloreantin and piperine in Danlyu Bushen capsules. **METHODS** The HPLC was carried on Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), the mobile phase acetonitrile-0.2% phosphoric acid (41:59), the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was 40 °C, detection wavelength was 266 nm. **RESULTS** Under the chromatographic conditions, irisfloreantin in 0.010 30~0.309 0 μg (r=0.999 8); piperine in 0.081 73~2.451 9 μg (r=0.999 8), had good linear relationship. Irisfloreanti and piperine average sample recovery rate (n=9) were 99.7% and 100.6%; RSD were 1.2%, 0.9%, respectively. In the sample, the minimum content of irisfloreantin and piperine was 0.35, 6.4 mg per granule, respectively. **CONCLUSION** The method is simple, accurate and has a good repeatability. It can be used as the quality control method of Danlyu Bushen capsules.

KEY WORDS: Danlyu Bushen capsules; irisfloreantin; piperine; HPLC; content determination

丹绿补肾胶囊(曾用名: 勐龙胶囊)源自云南西双版纳傣族医药古籍《档哈雅》中记载的验方, 是由白花丹、绿包藤、射干、胡椒、干姜提取精制而制得的一种胶囊剂^[1]。用于阴阳两虚所致阳痿遗精, 腰膝酸软, 身体乏力。可用于治疗男性形衰体弱, 性欲低下甚或阳痿、遗精、精少、精冷、不育等, 以及女性未老先衰, 容颜无华, 颜面黑斑, 月经不调、痛经、闭经、宫寒不孕等^[1-2]。

现行丹绿补肾胶囊质量标准^[3]采用 HPLC 以甲醇-水(77:23)为流动相测定胡椒中胡椒碱的含量, 测定成分单一。目前报道的关于胡椒中胡椒碱和射干中次野鸢尾黄素的测定方法多为单独测定^[4-11]。笔者采用现有文献报道的方法测定丹绿补

肾胶囊中次野鸢尾黄素时发现其与相邻峰的分度较差, 甚至会出现合峰。为了更全面地多指标反映产品的质量, 本着简便、快捷、有效的原则, 本实验研究使用普通液相色谱仪、等度洗脱同时测定丹绿补肾胶囊中的次野鸢尾黄素和胡椒碱含量的方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 型高效液相色谱仪, Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱; CPA225D 电子天平(德国赛多利斯); SHB-III 循环水式真空泵(郑州长城科工贸有限公司); KH3200E 型超声清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

作者简介: 王文鹏, 男, 工程师 Tel: 15032706391 E-mail: 449119178@qq.com *通信作者: 周永妍, 女, 硕士, 药师 Tel: 13323013153 E-mail: zhouyongyan33004@163.com

乙腈(色谱纯, 天津科密欧化学试剂有限公司); 磷酸(分析纯, 天津科密欧化学试剂有限公司); 次野鸢尾黄素对照品(批号: 111557-200602; 纯度: 100%)、胡椒碱对照品(批号: 110775-201405; 纯度: 98.9%)均由中国食品药品检定研究院提供; 丹绿补肾胶囊(云南神威施普瑞药业有限公司, 批号: 15070551, 15070651, 15070751, 15101161, 15101261, 15101361, 16051651, 16051751, 16051851, 16051951)。

2 方法与结果

2.1 测定方法

2.1.1 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以乙腈-0.2%磷酸水溶液(41:59)为流动相; 检测波长为 266 nm; 柱温为 40 °C; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 进样量为 20 μL。理论板数按胡椒碱峰计算应≥5 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别取次野鸢尾黄素和胡椒碱对照品适量, 精密称定, 置棕色量瓶中, 加甲醇制成每 1 mL 含次野鸢尾黄素 10 μg、胡椒碱 80 μg 的溶液, 作为混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取丹绿补肾胶囊内容物约 0.35 g, 精密称定, 至具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失质量, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 即得。

2.2 方法学考察

2.2.1 系统适用性及专属性试验 分别按处方比例和样品制备工艺不加射干和胡椒制成阴性样品, 按“2.1.3”项下方法制成射干、胡椒的阴性样品溶液。

取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液进行检测, 考察方法的适用性及专属性。结果表明, 样品中各个峰分离较好, 峰形对称, 并且阴性无干扰, 该方法专属性良好, 结果见图1。

2.2.2 线性范围考察 取“2.1.2”项下混合对照品溶液, 分别进样 1, 2, 5, 10, 20, 30 μL, 测定峰面积, 以峰面积(Y)为纵坐标, 进样量(X, μg)为横坐标, 进行线性回归, 得标准曲线。

次野鸢尾黄素回归方程为 $Y=4\ 445.4X-1.513$, $r=0.999\ 8$, 进样量在 0.010 30~0.309 0 μg 内与峰面积呈良好的线性关系; 胡椒碱回归方程为 $Y=5\ 517.6X-55.041$, $r=0.999\ 8$, 进样量在 0.081 73~2.451 9 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

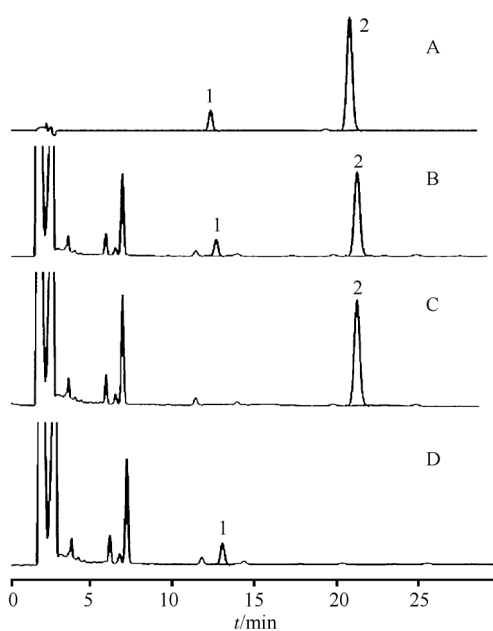


图1 丹绿补肾胶囊的含量测定图谱

A-混合对照; B-样品; C-射干阴性; D-胡椒阴性; 1-次野鸢尾黄素; 2-胡椒碱。

Fig. 1 Determination of the content of Danlyu Bushen capsule

A-mixed control solution; B-sample solution; C-Belamcandae Rhizoma negative sample solution; D-Piperis Fructus negative sample solution; 1-irisflorentin; 2-piperine.

2.2.3 仪器精密度试验 取同一供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件重复进样 5 次, 测定峰面积, 计算次野鸢尾黄素与胡椒碱色谱峰面积的 RSD 分别为 0.2%和 0.6%, 结果表明仪器精密度良好。

2.2.4 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 测定, 计算次野鸢尾黄素与胡椒碱峰面积的 RSD 分别为 1.6%和 0.6%, 结果表明供试品溶液室温放置 24 h 稳定。

2.2.5 重复性试验 分别取同一批样品(批号: 16070811) 0.175, 0.350, 0.525 g 各 3 份制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 测得次野鸢尾黄素和胡椒碱含量的 RSD 分别为 1.2%和 1.1%。结果表明重复性良好。

2.2.6 回收率试验 取已知含量丹绿补肾胶囊(批号: 16070811)9 份, 分别精密加入一定量的次野鸢尾黄素和胡椒碱对照品, 按“2.1.3”项下方法制成低、中、高浓度的供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定。次野鸢尾黄素平均回收率为 99.7%, RSD 为 1.1%, 胡椒碱含量为 100.6%, RSD 为 0.9%。

2.2.7 含量测定 取 10 批次样品, 按“2.1.3”项

下方法制备供试品溶液，并按“2.1.1”项下色谱条件进行测定。结果见表1。

表1 丹绿补肾胶囊中次野鸢尾黄素和胡椒碱含量测定结果
Tab. 1 Determination of the content of irisin and piperine in Danlyu Bushen capsule

样品	每粒含量/mg	
	次野鸢尾黄素	胡椒碱
样品1	0.56	6.4
样品2	0.54	7.5
样品3	0.38	7.4
样品4	0.42	8.1
样品5	0.47	7.6
样品6	0.47	6.9
样品7	0.52	7.2
样品8	0.43	8.0
样品9	0.35	7.5
样品10	0.38	7.4

3 讨论

3.1 波长的选择

分别取次野鸢尾黄素、胡椒碱对照品溶液，注入液相色谱仪，采用二极管阵列检测器进行光谱扫描，对比2个对照品的紫外光谱图，最终选择266 nm为检测波长。

3.2 供试品溶液制备方法的选择

为了选择样品的最佳提取方式，对超声、回流等进行了综合评价，结果显示超声、回流2种方式的含量基本一致，同时对提取溶剂(水、甲醇、30%甲醇水溶液、50%甲醇水溶液、70%甲醇水溶液)和提取时间(20, 30, 40 min)进行考察，本着快捷简便的原则，最终确定用甲醇超声处理30 min。

3.3 流动相的选择

流动相分别选用乙腈-0.2%磷酸水溶液、乙腈-0.2%甲酸水溶液、乙腈-0.2%冰醋酸水溶液，反复试验调节流动相的比例，结果表明乙腈-0.2%磷酸水溶液(41:59)分离效果较好。

3.4 柱温的考察

样品分别在35, 40, 45 °C柱温下测定，结果表明柱温对胡椒碱无显著影响，对次野鸢尾黄素前后峰的分离程度，柱温为40 °C时分离效果较好。

3.5 结论

本研究建立了同时测定丹绿补肾胶囊中次野鸢尾黄素与胡椒碱含量的HPLC方法，结果表明该方法简单可靠，可作为丹绿补肾胶囊中次野鸢尾黄素和胡椒碱的质量控制方法，样品处理方法简便，重复性良好。

REFERENCES

- [1] 薛慈民, 朱琦, 徐兆东. 勐龙胶囊治疗阳痿30例[J]. 中国新药杂志, 2000, 9(7): 486-488.
- [2] 邓庶民, 万奔, 王建业, 等. 勐龙胶囊治疗勃起功能障碍61例[J]. 中国新药杂志, 2000, 9(7): 484-486.
- [3] 国家食品药品监督管理局标准(WS-10436(ZD-0436)-2002-2012Z)[S]. 2012.
- [4] 李军, 董晓兵, 高秋涛, 等. RP-HPLC法测定射干中的鸢尾苷和次野鸢尾黄素的含量[C]. 2006 海峡两岸暨CSNR全国第七届天然药物资源学术研讨会论文集, 2006.
- [5] 申志英, 于辉, 高赛男, 等. HPLC法测定射干根中次野鸢尾黄素的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2013, 27(1): 19-21.
- [6] KONG Q Q, SHI G Y, HAN M M. Determination of piperine in Zhenlong Xingnao capsules by HPLC [J]. Food Drug(食品与药品), 2016, 18(1): 19-21.
- [7] YU H, REN D X, SHEN Z Y, et al. HPLC method of determination of irisin from *Belamcanda chinensis* in Daqing [J]. J Chengdu Univ Tradit Chin Med(成都中医药大学学报), 2012, 35(4): 58-60.
- [8] 林先哲, 黄雪松. HPLC法测定胡椒花、幼果和成熟果中胡椒碱的含量[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(3): 141-143.
- [9] WANG W Z, SUN Y, HE C L. Determination of piperine in Pepper by UV [J]. J North Pharm(北方药学), 2014, 11(5): 1-2.
- [10] SHI L, HUA Y. RP-HPLC determination of piperine in roots of *Piper nigrum* Linn. from Hainan [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm(中国民族民间医药), 2010, 19(1): 39-40.
- [11] 孙朝荣, 王廉文. 反相高效液相色谱法测定射干合剂中次野鸢尾黄素含量[J]. 医药导报, 2016, 35: 99-100.

收稿日期: 2017-12-02
(本文责编: 曹粤锋)