

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.05.035

高效液相色谱法同时测定牙痛药水中丁香酚和胡椒碱含量*

黄 华, 许莺婷[△], 胡卫南, 余小平

(浙江省衢州市食品药品检验研究院, 浙江 衢州 324002)

摘要:目的 建立同时测定牙痛药水中丁香酚和胡椒碱含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(72:28), 检测波长为 280 nm, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30 ℃。结果 2 种待测成分分离度良好, 阴性无干扰。丁香酚、胡椒碱质量浓度线性范围分别为 25.4~279.8 μg/mL($r=0.999\ 6$)和 12.5~137.8 μg/mL($r=1.000\ 0$); 平均回收率分别为 100.53% 和 98.99%, RSD 分别为 0.82% 和 0.67% ($n=9$); 丁香酚、胡椒碱含量范围分别为 0.850~1.439 mg/mL 和 0.227~0.632 mg/mL。结论 该方法操作简便、快速, 结果准确, 重复性好, 可同时测定牙痛药水中丁香酚和胡椒碱的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 牙痛药水; 丁香酚; 胡椒碱; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)05-0132-03

Simultaneous Determination of Eugenol and Piperine in Toothache Potion by HPLC

HUANG Hua, XU Yingting, HU Weinan, YU Xiaoping

(Quzhou Institute for Food and Drug Inspection, Quzhou, Zhejiang, China 324002)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) method for simultaneous determination of eugenol and piperine in toothache potion. **Methods** The chromatographic column was a C₁₈ column(150 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-water(72:28), the detection wavelength was 280 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, and the column temperature was 30 ℃. **Results** The two components were well separated and negative without interference. The linear ranges of mass concentration of eugenol and piperine were 25.4~279.8 μg/mL($r=0.999\ 6$) and 12.5~137.8 μg/mL($r=1.000\ 0$); the average recoveries were 100.5% and 98.99%, RSD s were 0.8% and 0.6% ($n=9$); the ranges of content of eugenol and piperine were 0.850~1.439 mg/mL and 0.227~0.632 mg/mL. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate, and reproducible, which can be used to determine the content of eugenol and piperine in toothache potion.

Key words: high performance liquid chromatography; toothache potion; eugenol; piperine; content determination

*基金项目: 浙江省衢州市重点实验室项目[衢科发高[2015]8号]; 浙江省衢州市科技项目[20101115]。

第一作者: 黄华, 女, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为药物分析, (电子信箱)43719437@qq.com。

[△]通信作者: 许莺婷, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为药物分析与质量管理, (电子信箱)25434569@qq.com。

表2 样品含量测定结果(mg/g, $n=3$)

批号	原阿片碱	苯甲酰乌头原碱
190405	0.449	0.086
180721	0.491	0.103
181215	0.476	0.078

3 讨论

3.1 测定波长选择

取原阿片碱对照品, 配制质量浓度为 10.0 μg/mL 的标准溶液, 加 70% 甲醇至刻度, 摇匀, 即得波长测试溶液, 依法配制苯甲酰乌头原碱波长测试溶液。开启紫外可见分光光度计, 在 200~400 nm 波段对上述溶液分别进行光谱扫描。结果原阿片碱和苯甲酰乌头原碱分别在 236 nm 和 290 nm 波长处有最大吸收, 为使 2 种待测成分有较好的响应, 本研究中选择 264 nm 作为检测波长。

3.2 提取溶剂选择

复方夏天无片中待测成分提取溶剂的选择是影响检测结果准确度和基质干扰情况的重要因素。本研究中分别考察了乙腈、甲醇、95% 甲醇、70% 甲醇作为提取溶剂样品中原阿片碱和苯甲酰乌头原碱提取率的影响。结果选择 70% 甲醇作为提取溶剂时, 2 种待测成分提取率

高, 且基质干扰小。

综上所述, 该方法操作简便、准确、重复性好, 可用于同时测定复方夏天无片中原阿片碱和苯甲酰乌头原碱的含量。

参考文献:

- [1] 马金玉. 复方夏天无片联合氟桂利嗪治疗偏头痛的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(5): 1034-1037.
- [2] 梅杰, 李卫平, 邹光翼, 等. 复方夏天无片在关节镜肩袖损伤修复术后应用的疗效分析[J]. 中成药, 2017, 39(2): 440-442.
- [3] 魏文智, 王秋莲. 复方夏天无与推拿、正脊综合治疗颈椎间盘突出症疗效观察[J]. 陕西中医, 2017, 38(8): 1032-1033.
- [4] 李显文, 荣超, 伍玲. 复方夏天无片治疗(类)风湿性关节炎的药物经济学评价[J]. 国外医学: 卫生经济分册, 2016, 33(1): 31-33.
- [5] 梅杰, 李卫平, 李浩, 等. 复方夏天无片联合硫酸氨基葡萄糖治疗腕骨关节炎疗效观察[J]. 浙江中西医结合杂志, 2016, 26(9): 825-827.
- [6] 张斌, 陈刚, 李海龙, 等. 复方夏天无片治疗老年骨质疏松性桡骨远端骨折的疗效观察[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(12): 2445-2448.
- [7] 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: 1239-1240.

(收稿日期: 2019-06-29)

牙痛药水收载于《卫生部药品标准·中药成方制剂(第二册)》(标准编号为WS₃-B-2009-90),由荜茇、高良姜、细辛、丁香、冰片组方,前3味药经60%乙醇加热回流提取,丁香用乙醇提取,合并后加甘油混合,加冰片混匀,有止痛、杀菌、防蛀作用,主要用于风火牙痛、牙龈红肿、虫蛀牙痛及一切神经牙痛。荜茇为方中君药,含胡椒碱,丁香中含丁香酚,为本制剂的有效成分,原标准中只测定乙醇量,有效成分测定均未涉及。液相法分别测定牙痛药水中胡椒碱含量已有报道,但通过中国知网查询,同时测定丁香酚和胡椒碱含量国内目前未见报道。本研究中查阅文献[1-11],建立了同时测定丁香酚和胡椒碱含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),包括真空脱气机(G1322A),四元泵(G1311A),自动进样器(G1329A),柱温箱(G1316A),二极管阵列检测器(DAD)(G1315D),Agilent 色谱工作站(Rev. B. 03. 02 January, 2008);Mettler AE 240 型电子天平(梅特勒公司,精密密度为0.01 mg);KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,250 W,40 kHz);UV2450 型紫外分光光度计(日本岛津公司)。

1.2 试剂

甲醇为分析纯;水为纯化水;丁香酚对照品(批号110725-201615,含量为99.3%),胡椒碱对照品(批号110775-201104,含量为99.2%),均由中国食品药品检定研究院提供;牙痛药水[市购3批,规格均为每瓶5 mL(批号为170802,成都迪康制药有限公司;批号为170501,广西慧宝源制药有限公司;批号为G17034,包头中药有限责任公司)];高良姜、细辛、冰片本地市购,经我院宋剑锋主任中药师鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters Sunfire - C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(72:28, V/V);流速:1.0 mL/min;

柱温:30 ℃;进样量:5 μL;检测器:DAD 检测器;检测波长:280 nm。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:分别取丁香酚对照品 25 mg、胡椒碱对照品 12 mg,精密称定,置同一 50 mL 容量瓶中,加甲醇超声溶解并定容,摇匀,作为对照品贮备液。精密量取 5 mL,置同一 25 mL 容量瓶中,甲醇至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液。

供试品溶液:取本品 5 支,混匀,精密量取 2 mL,置 25 mL 容量瓶中,加甲醇适量,超声处理 10 min,冷至室温,在加甲醇稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,即得。

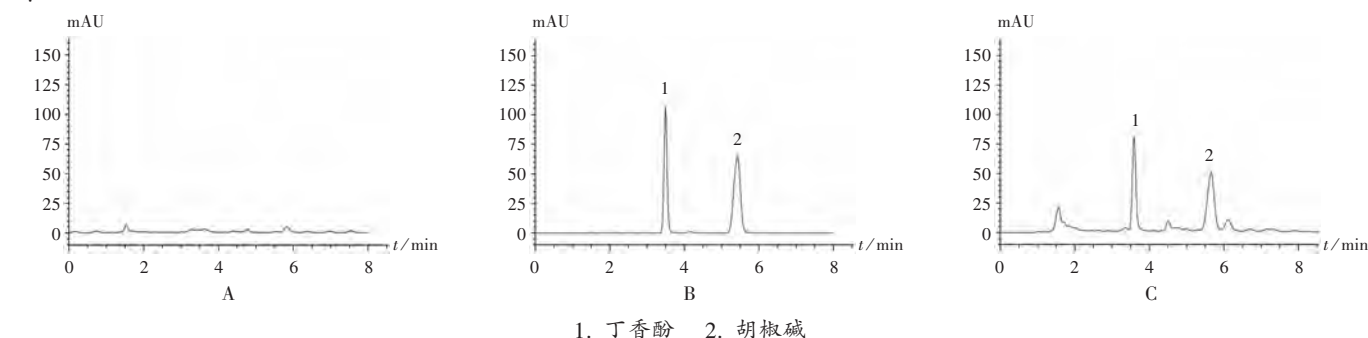
阴性对照品溶液:按其质量标准中处方比例、制法制备不含荜茇、丁香的阴性样品溶液,按供试品溶液制备方法制得。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:取上述 3 种溶液,按拟订色谱条件,分别进样 5 μL,记录色谱图,见图 1。可见,丁香酚的保留时间(*t*)为 3.5 min,胡椒碱的保留时间(*t*)为 5.4 min,阴性对照品溶液在丁香酚、胡椒碱出峰时间区域无干扰峰出现,故对丁香酚、胡椒碱的测定无干扰作用。理论板数以丁香酚计可达 8 000 以上,样品中丁香酚、胡椒碱与相邻色谱峰的分度度满足测定要求。

线性关系考察:分别精密量取对照品贮备液 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0 mL,分别置 20 mL 容量瓶,加甲醇稀释至刻度,摇匀,注入液相色谱仪,记录色谱图。以丁香酚、胡椒碱质量浓度为横坐标(*X*)、峰面积为纵坐标(*Y*)进行线性回归,得回归方程 $Y_T = 5.007X + 2.7219$, $r = 0.9996$ ($n = 6$) 和 $Y_H = 12.858X + 7.1014$, $r = 1.0000$ ($n = 6$)。结果表明,丁香酚和胡椒碱质量浓度在 25.4 ~ 279.8 μg/mL 和 12.5 ~ 137.8 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取同一混合对照品溶液,重复进样 5 次,以峰面积和保留时间考察进样精密度。结果丁香酚、胡椒碱的峰面积值基本不变, *RSD* 分别为 1.45% 和



A. 阴性对照品溶液 B. 混合对照品溶液 C. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

0.12%,表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密量取同一供试品溶液,按拟订色谱条件,分别于0,2,4,6,8,20,24 h时进样测定。结果丁香酚、胡椒碱峰面积的RSD分别为0.73%和1.06% ($n=7$),表明供试品溶液在常温下24 h内稳定。

重复性试验:取样品(批号为170802),分别按2.2项下方法制备6份供试品溶液和混合对照品溶液,分别精密量取5 μ L注入液相色谱仪,以外标法分别计算含量。结果丁香酚、胡椒碱平均含量分别为1.439 mg/mL和0.632 mg/mL, RSD分别为0.69%和0.84% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密量取阴性样品溶液9份,每份2 mL,分别置25 mL容量瓶中,再分别精密加入对照品贮备液4.0,5.0,6.0 mL各3份,按2.2项下方法制备供试品溶液和对照品溶液,分别进样,记录峰面积,按外标法计算丁香酚、胡椒碱的回收率。结果见表1。

表1 加样回收试验结果($n=9$)

加入量(g/L)		测得量(g/L)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1.013	0.480	1.012	0.481	99.90	100.21				
1.013	0.480	1.000	0.478	98.72	99.58				
1.013	0.480	1.015	0.477	100.20	99.38				
1.266	0.600	1.282	0.589	101.26	98.17				
1.266	0.600	1.278	0.593	100.95	98.83	100.53	98.99	0.82	0.67
1.266	0.600	1.277	0.592	100.87	98.67				
1.520	0.720	1.530	0.707	100.66	98.19				
1.520	0.720	1.532	0.711	100.79	98.75				
1.520	0.720	1.541	0.714	101.38	99.17				

注:A为丁香酚,B为胡椒碱。

2.4 样品含量测定

按2.2项下方法制备供试品溶液和对照品溶液,按拟订色谱条件各精密量取5 μ L注入液相色谱仪,记录峰面积,按外标法计算含量。结果见表2。

表2 样品含量测定($n=3$)

批号	丁香酚		胡椒碱	
	含量(mg/mL)	RSD(%)	含量(mg/mL)	RSD(%)
170501	0.850	0.87	0.475	0.73
G17034	0.873	1.20	0.227	0.54
170802	1.439	0.68	0.632	0.84

3 讨论

3.1 测定指标确定^[1]

牙痛水中荜茇为君药,荜茇被收载在2015年版《中国药典(一部)》,含量测定指标为胡椒碱;处方中丁香也为2015年版《中国药典(一部)》收载品种,含量测定指

标为丁香酚,故本研究中将胡椒碱和丁香酚确定为牙痛水中含量测定指标。

3.2 测定波长选择

紫外最大吸收波长丁香酚为280 nm,胡椒碱为343 nm,丁香酚在343 nm波长处几乎无吸收,胡椒碱在280 nm波长处有吸收。综合考虑,选择280 nm作为测定波长。

3.3 流动相选择

本研究选用不同比例的甲醇水作为流动相,水比例提高,主峰出峰推迟,胡椒碱峰变宽,对称度变差。最终选择甲醇-水(72:28, V/V)为测定条件,此条件下阴性对照品溶液在丁香酚、胡椒碱出峰时间区域无干扰峰出现,对结果影响较小。水相pH调高调低,对主峰出峰时间无影响。

3.4 样品测定浓度确定

样品浓度以2 mL稀释至25 mL较合理,浓度太高杂质对测定有干扰,易造成含量偏高。

参考文献:

- [1] 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,2015:4,235.
- [2] 邢俊波,曹红,陈玉敏,等. 气相色谱法测定更年舒注射液中丁香酚含量[J]. 中国药业,2009,18(21):35.
- [3] 吴军侠,赵红侠. 高效液相色谱法测定蒙药暖宫七味散中丁香酚含量[J]. 中国药业,2010,19(5):31.
- [4] 王也,袁国丽,黄华. 高效液相色谱法测定丁桂儿脐贴中丁香酚和桂皮醛含量[J]. 中国药业,2011,20(10):43-44.
- [5] 叶玲,杜伟锋,张瑞瑞,等. 高效液相色谱-二极管阵列检测法测定胡椒中胡椒碱[J]. 当代化工,2019,48(5):1113-1116.
- [6] 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.
- [7] 陈星,鲁晓光,仲格嘉,等. 藏药安神丸的质量标准提高[J]. 中南药学,2018,16(6):835-838.
- [8] 朋汤义,柳清,洪燕,等. 超高效液相色谱法同时测定消瘀接骨散中6个活性成分的含量[J]. 贵阳中医学院学报,2017,39(4):19-23.
- [9] 杨晓宁,禹玉洪,刘辉,等. 高效液相色谱法测定丁桂儿脐贴中桂皮醛和胡椒碱含量[J]. 环球中医药,2014,7(1):17-20.
- [10] 韩亚南,袁铭,周娟,等. 藏药如意珍宝丸的质量标准研究[J]. 国际中医中药杂志,2017,39(1):53-58.
- [11] 逮雯洁,王慧春,海平,等. 高效液相色谱法同时测定二十五味珍珠丸中7种成分及其特征图谱[J]. 中国医院药学杂志,2016,36(21):1885-1890.

(收稿日期:2019-07-12)