文章编号:1000-5404(2011)06-0621-04

论著

十五味黑药丸中4种活性成分的定性鉴别及胡椒碱的含量测定

胡 婧[1],易凡力[2],刘松青[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院药剂科[1];300193 天津,天津中医药大学中药学系[2])

【摘要】 **目的** 对十五味黑药丸中4种主要中药成分进行定性鉴别并测定胡椒碱的含量。**方法** 采用薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)对方中藏木香、荜茇、黑胡椒、干姜、烈香杜鹃进行定性鉴别;采用高效液相色谱法(HPLC)测定胡椒碱的含量。色谱柱:Phenomenex Luna C_{18}(2)(4.6 mm×150 mm,5 μm),流动相:甲醇-水(74∶26),流速0.8 ml/min,检测波长343 nm,柱温35 ℃。**结果** 采用TLC均能检出3批十五味黑药丸中的去氢木香内酯、胡椒碱及烈香杜鹃和干姜药材,该鉴别方法专属性强、薄层色谱斑点清晰,阴性对照无干扰;胡椒碱的HPLC色谱峰与其他色谱峰分离良好,进样量在0.021 056~0.105 28 μg范围内呈良好线性关系(r=0.999 8),平均加样回收率(n=9)为97.76%,3个批次(010624、021008、030323)9个样品中胡椒碱的含量平均值为1.64 mg/丸。**结论** 建立的十五味黑药丸质量标准可用于藏木香、荜茇、黑胡椒、干姜、烈香杜鹃5种中药的成分鉴别及组方中胡椒碱的含量测定。

【关键词】 十五味黑药丸;胡椒碱;薄层色谱法;高效液相色谱法
【中图法分类号】 R286;R284 **【文献标志码】** A

Identification of five active ingredients and content determination of piperine in Shiwuwei Heyaowan pills by TLC and HPLC

Hu Jing[1], Yi Fanli[2], Liu Songqing[1] ([1] Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2] Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 300193, China)

【Abstract】 **Objective** To identify five active ingredients (Inula racemosa, Piper longum, Piper nigrum, *Zingiber officinale* and *Rhododendron anthopogonoides*) and determine the content of piperine in traditional Tibetan medicine pills—Shiwuwei Heyaowan. **Methods** Three batches of Shiwuwei Heyaowan pills were dissolved in ethyl ether or absolute ethyl alcohol as the sample solutions. Thin layer chromatography (TLC) was utilized to identify *Inula racemosa*, *Piper longum*, *Piper nigrum*, *Zingiber officinale* and *Rhododendron anthopogonoides* in Shiwuwei Heyaowan pills. High performance liquid chromatography (HPLC) was employed to determine the content of piperine. In HPLC, the chromatographic column is Phenomenex Luna C_{18}(2) (4.6 mm×150 mm, 5 μm); the mobile phase is methanol-water (74∶26); the flow rate is 0.8 ml/min; the detection wavelength is 343 nm; the column temperature is 35 ℃. **Results** In TLC, dehydrocostunolide lactone (the characteristic compound of *Inula racemosa*), piperine (the characteristic compound of *Piper longum* and *Piper nigrum*), *Rhododendron anthopogonoides* and *Zingiber officinale* were identified in all batches of Shiwuwei Heiyaowan pills. The identification method was highly specific with clear TLC spots. The negative control did not impose any disturbance. In HPLC, the chromatographic peak of piperine was well isolated from other peaks. There was a good linear relationship between the sample size and the peak area of piperine in a range of 0.021 056 – 0.105 28 μg (r = 0.999 8). The average recovery of piperine was 97.76% (n = 9). The average piperine content of nine samples (three from each batch) was 1.64 mg/pill. **Conclusion** The constructed quality standards can be utilized to identify *Inula racemosa*, *Piper longum*, *Piper nigrum*, *Zingiber officinale* and *Rhododendron anthopogonoides*, as well as determine the content of piperine in Shiwuwei Heiyaowan pills.

【通信作者】 刘松青,电话:(023)68765997, E-mail:songqingliu@hotmail.com

【Key words】 Shiwuwei Heyaowan pills; piperine; thin layer chromatography; high performance liquid chromatography; quality standard

Corresponding author: Liu Songqing, Tel: 86-23-68765997, E-mail: songqingliu@hotmail.com

十五味黑药丸是由荜茇、黑胡椒、烈香杜鹃、藏木香、藏木通、肉豆蔻、芫荽果等十五味藏药材组成的复方制剂，具有散寒消食、破瘀消积的功效，用于慢性肠胃炎、胃出血、胃冷痛、消化不良、食欲不振、呕吐泄泻、腹部有痞块及嗳气频作的治疗。十五味黑药丸收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·藏药》第一册成方制剂中[1]，为藏药保护品种。荜茇、黑胡椒的主要成分为胡椒碱，也是本品的有效成分之一[2-4]，为了有效控制十五味黑药丸质量，本研究对十五味黑药丸进行了定性、定量的研究，进行了十五味黑药丸的薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)鉴别及高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)含量测定，旨在为其质量控制和临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试药

Waters高效液相色谱仪包括Waters 1525泵、2487双通道紫外检测器、Waters柱温箱、Breeze液相色谱工作站，Brasson超声清洗仪，塞多利斯十万分之一电子天平(德国)，MICROCAPS定量毛细管(1、2、5、10 μl，DRUMMOND SCIENTIFIC COMPANY)，硅胶G薄层板自制(10 cm×20 cm)。胡椒碱对照品(含量测定用，中国药品生物制品检定所，批号0775-9702)，去氢木香内酯对照品(薄层鉴别用，中国药品生物制品检定所，批号1525-200102)，十五味黑药丸3批(生产批号010624、021008、030323，规格0.8 g/丸)。阴性样品自制，甲醇为美国Tedia色谱纯，水为超纯水，硅胶G由青岛海洋化工厂生产，其他试剂均为分析纯。

1.2 薄层色谱鉴别

1.2.1 藏木香TLC鉴别 取本品粉末2 g，加乙醚10 ml，振摇2 h，滤过，滤液于35 ℃减压(0.04 MPa)浓缩至2 ml，作为供试品溶液。按处方比例及制备工艺同法制备不含藏木香的阴性样品，照供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液(缺藏木香)。另取去氢木香内酯对照品，加氯仿制成每1毫升含0.5 mg的溶液，作为对照品溶液。照薄层色谱法(附录ⅥB)实验，定量毛细管吸取供试品溶液、阴性对照品溶液和对照品溶液各5 μl，分别点于同一硅胶G薄层板上，以环己烷-醋酸乙酯(3∶1)为展开剂，展开，取出，晾干，喷以茴香醛酸试液，加热至斑点显色清晰[5-6]。

1.2.2 荜茇和黑胡椒TLC鉴别 取本品粉末1 g，加无水乙醇5 ml，超声处理10 min，静置，上清液作为供试品溶液。按处方比例及制备工艺同法制备不含荜茇和黑胡椒的阴性样品，照供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液(缺荜茇和黑胡椒)，另取胡椒碱对照品，置棕色瓶中，加无水乙醇制成每1毫升含0.5 mg的溶液，作为对照品溶液，照薄层色谱法实验，吸取供试品溶液、阴性对照品溶液和对照品溶液各5 μl，分别点于同一硅胶G薄层板上，以石油醚—醋酸乙酯(7∶3)为展开剂，展开，取出，晾干，喷以10%硫酸乙醇溶液，置紫外光灯(365 nm)下检视[7-8]。

1.2.3 干姜TLC鉴别 取1.2.1的供试品溶液，按处方比例及制备工艺同法制备不含干姜的阴性样品，照供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液(缺干姜)。另取干姜对照药材0.5 g，加乙醚5 ml，振摇2 h，静置，上清液作为对照药材溶液。照薄层色谱法(附录ⅥB)实验，吸取供试品溶液、阴性对照品溶液各10 μl、对照药材溶液5 μl，分别点于同一硅胶G薄层板上，以环己烷—醋酸乙酯(8∶1)为展开剂，展开，取出，晾干，喷以茴香醛试液，加热至斑点显色清晰[8-9]。

1.2.4 烈香杜鹃TLC鉴别 取1.2.1的供试品溶液，按处方比例及制备工艺同法制备不含烈香杜鹃的阴性样品，照供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液(缺烈香杜鹃)。另取烈香杜鹃对照药材0.5 g，加乙醚5 ml，振摇2 h，静置，上清液作为对照药材溶液。照薄层色谱法实验，吸取供试品溶液、阴性对照品溶液各10 μl、对照药材溶液5 μl，分别点于同一硅胶G薄层板上，以环己烷—醋酸乙酯(10∶0.5)为展开剂，展开，取出，晾干，喷以茴香醛试液，加热至斑点显色清晰[10]。

1.3 含量测定

1.3.1 色谱条件 色谱柱：Phenomenex Luna C_{18}(2)分析柱(4.6 mm×150 mm，5 μm)；柱温：35 ℃；流动相：甲醇-水(74∶26)；检测波长：343 nm；流速：0.8 ml/min。供试品溶液和阴性对照品溶液进样量为10 μl、对照品溶液进样量为5 μl，理论板数按胡椒碱峰计算大于2 500[11]。

1.3.2 对照品溶液的制备 精密称取胡椒碱对照品3.29 mg，置25 ml棕色量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，精密量取0.8 ml，置10 ml棕色量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，即得(0.010 528 mg/ml)。

1.3.3 供试品溶液的制备 取本品4 g，研细(过4号筛)，精密称取约0.1 g，置50 ml棕色量瓶中，加无水乙醇约45 ml，超声处理40 min，放冷，加无水乙醇稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液置棕色量瓶中，即得。

1.3.4 阴性对照溶液的制备 按处方比例及制备工艺同法制备不含荜茇和黑胡椒的阴性样品，按1.3.3方法制备阴性对照溶液。

1.3.5 专属性考察 分别精密吸取对照品溶液5 μl、供试

品溶液和阴性对照品溶液各 10 μl,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,记录色谱图。

1.3.6　线性关系考察　　分别精密吸取 1.3.2 的对照品溶液(0.010 528 mg/ml) 2、4、6、8、10 μl,注入液相色谱仪中测定[12],记录峰面积。以进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标作回归曲线。

1.3.7　精密度实验　　精密吸取同一对照品溶液 5 μl,重复进样 5 次,测定胡椒碱峰面积。

1.3.8　稳定性实验　　制备样品(批号 021008)的供试品溶液,室温放置 0、2、4、6、8、24 h,依法测定,记录色谱峰面积。

1.3.9　重复性实验　　取同一样品(批号 021008),精密称定 5 份,照 1.3.3 方法分别制成供试品溶液,依法测定。

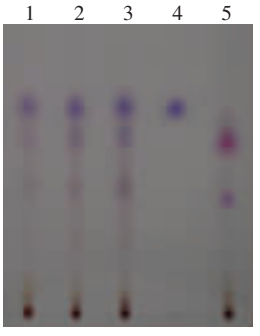
1.3.10　加样回收率实验　　取已知胡椒碱含量的样品(批号 021008,2.363 mg/g)50 mg,精密称定,共 9 份,平均分为 3 组,依次加入相当于样品中胡椒碱含量的 80%、100%、120% 的对照品 0.131 6 mg/ml,照 1.3.3 方法制成所需溶液。依法测定,计算回收率。

1.3.11　样品含量测定　　取不同批号的样品(010624、021008、030323)各 3 份,照 1.3.3 方法制备供试品溶液,依法测定,采用外标二点法计算样品中的胡椒碱含量。

2　结果

2.1　薄层色谱鉴别

2.1.1　藏木香　　经 TLC 鉴别,结果显示供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的蓝色斑点。阴性对照品在相应的色谱位置上无干扰。见图 1。

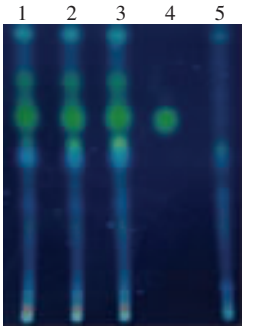


1-3:供试品(010624、021008、030323) 4:去氢木香内酯对照品; 5:阴性对照

图 1　藏木香的 TLC 鉴定结果

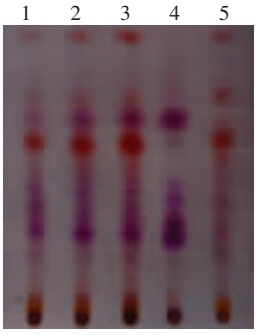
2.1.2　荜茇和黑胡椒　　经 TLC 鉴别,结果显示供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的黄色荧光。阴性对照品在相应的色谱位置上无干扰。见图 2。

2.1.3　干姜　　经 TLC 鉴别,结果显示供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。阴性对照品在相应的色谱位置上无干扰。见图 3。



1-3:供试品(010624、021008、030323) 4:胡椒碱对照品 5:阴性对照

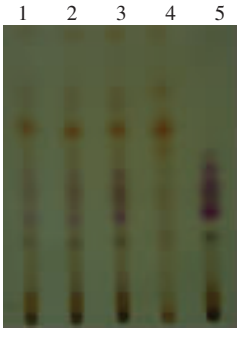
图 2　荜茇、黑胡椒的 TLC 鉴定结果



1-3:供试品(010624、021008、030323) 4:干姜对照品 5:阴性对照

图 3　干姜的 TLC 鉴定结果

2.1.4　烈香杜鹃　　经 TLC 鉴别,结果显示供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。阴性对照品在相应的色谱位置上无干扰。见图 4。



1-3:供试品(010624、021008、030323) 4:烈香杜鹃对照品 5:阴性对照

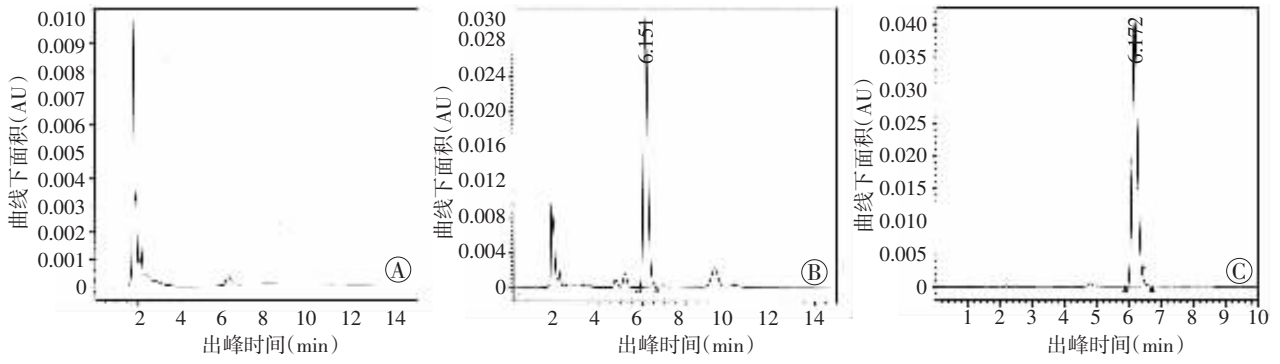
图 4　烈香杜鹃的 TLC 鉴定结果

2.2　含量测定

2.2.1　专属性考察　　供试品色谱峰中胡椒碱峰与其他峰分离良好,阴性对照色谱在胡椒碱峰处无干扰,基线稳定,方法可行。见图 5。

2.2.2　线性关系考察　　得回归方程 $y = 8.91 \times 10^6 x + 2.45 \times 10^2$, $r = 0.999\ 8$。结果表明,胡椒碱进样量在 0.021 056 ~ 0.105 28 μg范围内与峰面积值呈良好的线性关系。

2.2.3　精密度　　相对标准偏差(RSD) = 0.94% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。



A:阴性样品;B:样品;C:胡椒碱对照品

图5 十五味黑药丸HPLC结果

2.2.4 稳定性 RSD=0.61%（$n=6$），表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.5 重复性 样品中胡椒碱的平均含量（$n=5$）为2.363 mg/g，RSD=1.26%。表明方法重现性良好。

2.2.6 加样回收率 低、中、高3种浓度的回收率（$n=3$）分别为98.23%（RSD=0.58%）、98.69%（RSD=1.03%）、97.68%（RSD=1.23%），平均回收率（$n=9$）为97.76%。

2.2.7 样品含量 3个批次（010624、021008、030323）9个样品中胡椒碱的含量平均值为1.64 mg/丸，以平均值下浮20%作为本品含量的下限，即1.64×80%=1.31 mg/丸，故暂订本品每丸含胡椒碱（$C_{17}H_{19}NO_3$）总量不得少于1.3 mg。

3 讨论

本研究对十五味黑药丸进行了定性、定量研究，新增藏木香、荜茇、黑胡椒、烈香杜鹃、干姜的薄层色谱鉴别，采用HPLC法测定本品中胡椒碱的含量，制定质量标准，建立了简便可行的质量控制方法。本品中黑胡椒和荜茇性辛、热，归胃、大肠经，在方中起到散寒消食、下气止痛的作用[3]，其主要成分胡椒碱具有抗菌、消炎、抗胃溃疡及神经性镇痛作用[4]，为本品的有效成分之一，测定其含量可有效控制产品质量。本研究参考《中国药典》2005版胡椒药材的含量测定方法[13]，优化色谱条件，建立了十五味黑药丸中胡椒碱的含量测定方法，并进行了方法学考察[14]，结果表明色谱分离效果好，阴性无干扰，保留时间合适，线性、精密度、回收率等符合要求，该方法简便可行，可用于十五味黑药丸中胡椒碱的含量检测。

根据3批样品含量测定结果，结合生产工艺及大生产中原料药材含量的波动，以平均值下浮20%作为本品含量的下限，故暂订本品每丸含胡椒碱（$C_{17}H_{19}NO_3$）总量不得少于1.3 mg。

十五味黑药丸药味较多，阴性干扰大，本研究通过提取溶剂和展开剂的优化筛选[15]，对方中荜茇、黑胡椒、烈香杜鹃、藏木香、干姜进行了薄层色谱鉴别，供试品色谱中，在与对照品和/或对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点，阴性对照无干扰，表明本方法专属性强、简便、快速。

参考文献：

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准：藏药[S]. 第1册. 北京：人民卫生出版社，1995：202.

[2] 吴霞，于志斌，叶蕴华，等. 荜茇化学成分的研究(I)[J]. 中草药，2008，39(2)：178-180.

[3] 李瑞和，苏日纳，郭林云，等. 荜茇化学成分与药理作用研究概况[J] 中国民族医药杂志，2006，(3)：73-74.

[4] 白音夫，旭红. 胡椒碱抗实验性胃溃疡的作用[J]. 中国药理学学报：英文版，2000，21(4)：357-359.

[5] 利毛才让，热增才旦. 藏药四味藏木香汤散的质量研究[J]. 中成药，2010，32(3)：524-526.

[6] 陈燕，刘玉红，黄志芳，等. 二十五味大汤胶囊质量标准研究[J]. 基层中药杂志，2002，16(6)：6-8.

[7] 余红芳，喻喜华，焦玉，等. 24批市售荜茇的质量分析[J]. 中国现代中药，2009，11(5)：35-38.

[8] 马玉花，李生花. 藏药八味石榴散中四味药材的薄层色谱鉴别[J]. 时珍国医国药，2009，20(10)：2529-2530.

[9] 金凤环，段彦杰. 寒热痹胶囊质量标准研究[J]. 中国医药导报，2009，6(29)：48-50.

[10] 周燕雪，宋霞，逯雯洁. 藏药烈香杜鹃质量标准研究[J]. 中成药，2010，32(4)：619-621.

[11] 温爱平，王玉华，杨来秀. 高效液相色谱法测定蒙药升阳十一味丸中胡椒碱的含量[J]. 内蒙古医学院学报，2010，32(3)：306-308.

[12] 李方，曹阳，张清波. 高效液相色谱法测定荜茇中胡椒碱的含量[J]. 中医药信息，2010，27(2)：21-22.

[13] 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，2005：168.

[14] 应懿，何志红，周世文，等. 测定黄连中5种生物碱含量的高效液相色谱法研究[J]. 第三军医大学学报，2007，29(9)：843-845.

[15] 文志云，刘元，莫海涛，等. TLC法定性鉴别咽炎片中3味中药[J]. 中国民族民间医药，2009，(15)：12-13.

（收稿 2010-10-13 修回 2010-12-01）

（编辑 张 维）