

HPLC 法同时测定蜘蛛香中 7 种成分含量

刘开萍¹ 杨 军² 程盛勇¹ 罗喜荣^{1*} 刘兴赋¹ 尹 航¹

(1. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 中国科学院地球化学研究所, 贵州 贵阳 550081)

摘要 目的: 建立 HPLC 法同时测定蜘蛛香中 7 种成分(新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、橙皮苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C)的含量。方法: 采用 WondaSil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 甲酸溶液, 梯度洗脱; 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 30 °C; 检测波长为 284 和 327 nm。结果: 7 种成分均达到基线分离, 各成分均有较宽的线性范围和良好的线性关系($r \geq 0.9995$) 平均加样回收率($n=6$) 为 96.47%~99.01% ,RSD 均<2%。结论: 该方法简便、准确、专属性好, 为蜘蛛香的全面质量控制提供了科学依据。

关键词 蜘蛛香; 高效液相色谱; 绿原酸; 橙皮苷

中图分类号: R284.3 文献标识码: A 文章编号: 1001-4454(2018)04-0922-03

DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2018.04.031

蜘蛛香系败酱科缬草属植物蜘蛛香 *Valeriana jatamansi* Jones 的干燥根茎和根, 具有理气止痛、消食止泻、祛风除湿、镇惊安神的功效^[1]。蜘蛛香主要含有挥发油、缬草三酯类、黄酮类、酚酸类等化学成分^[2-9]。现代药理研究表明, 其具有抗肿瘤、抗焦虑、神经保护、保肝、抗氧化、抗菌、抗病毒等作用。中国药典 2015 年版对蜘蛛香的有效成分含量检测限度尚未规定, 本实验首次建立 HPLC 同时测定蜘蛛香中新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、橙皮苷、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 含量的方法, 以期为其质量控制和临床应用提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Agilent 1100 DAD 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); BSA224S 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); KQ3200E 超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 材料 新绿原酸(批号: MUST-15011412)、绿原酸(批号: MUST-15041814)、咖啡酸(批号: MUST-15090803)、异绿原酸 A(批号: MUST-15042518)、异绿原酸 B(批号: MUST-15081411)、异绿原酸 C(批号: MUST-15081414) 对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司; 橙皮苷对照品(批号: FC4D-GHSP) 购于中国食品药品检定研究院; 乙腈为色谱纯; 水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。蜘蛛香药材样品信息见表 1, 经贵州医科大学药学院覃容贵教授鉴定为败酱科缬草属植物蜘蛛香 *Valeriana jatamansi* Jones 的干燥根、根茎和叶。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: WondaSil C₁₈ 柱(250 mm×

表 1 10 批蜘蛛香样品信息

样品	产地	部位	采集时间
S1	贵州贵阳	根茎及根	2011-08
S2	贵州贵阳	根茎及根	2016-05
S3	湖南凤凰	根茎及根	2015-07
S4	贵州铜仁	根茎及根	2015-07
S5	贵州贵阳	根	2016-06
S6	贵州贵阳	根茎	2016-06
S7	贵州贵阳	叶	2016-06
S8	贵州安顺	根	2016-06
S9	贵州安顺	根茎	2016-06
S10	贵州安顺	叶	2016-06

4.6 mm 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1% 甲酸溶液(B), 梯度洗脱(0~18 min, 12%~30% A; 18~20 min, 30%~32% A; 20~23 min, 32%~40% A); 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL; 检测波长: 284 nm(橙皮苷), 327 nm(新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C); 柱温: 30 °C。在此条件下, 各色谱峰均达到基线分离, 见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 取新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、橙皮苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C 对照品适量, 加甲醇定容, 配制成浓度分别为 10、35、5、10、70、15、15 mg/L 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取 0.5 g 蜘蛛香药材粉末(过 60 目筛), 用石油醚回流脱脂至提取液无色, 残渣挥干石油醚后置具塞锥形瓶中, 加入 70% 甲醇 50 mL, 密塞, 摇匀, 称定重量, 超声提取(250 W, 20 kHz) 40 min, 放冷, 用 70% 甲醇补足缺失的重量, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液 0.2 mL, 加甲醇稀释并定容至 10 mL, 即得。

收稿日期: 2017-11-11

基金项目: 贵州省联合基金(黔科合 LH 字[2014]7091 号); 贵州省社发攻关项目(黔科合 SY 字[2015]3032 号); 贵州省中药现代化专项(黔科合 ZY 字[2012]3010 号)

作者简介: 刘开萍(1993-), 女, 在读硕士研究生, 专业方向: 药物新剂型、新技术及药代动力学研究; E-mail: 857568047@qq.com。

* 通讯作者: 罗喜荣, Tel: 0851-88416164, E-mail: 1341323603@qq.com。

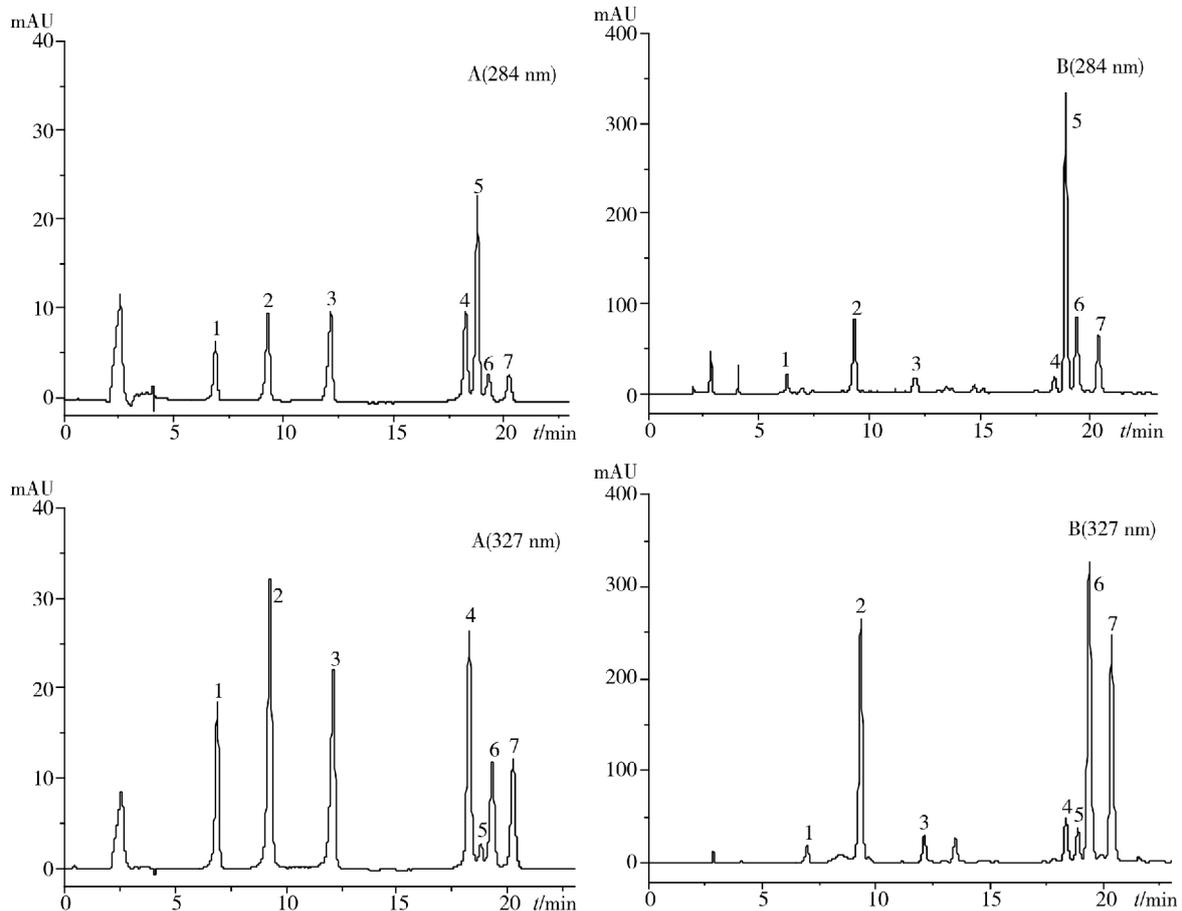


图 1 混合对照品 (A) 和蜘蛛香样品 (B) 的 HPLC 色谱图

1. 新绿原酸 2. 绿原酸 3. 咖啡酸 4. 异绿原酸 B 5. 橙皮苷 6. 异绿原酸 A 7. 异绿原酸 C

2.4 线性关系考察 精密量取混合对照品储备液 1.25、2.50、5.00、7.50、10.00 mL, 加甲醇定容至 10 mL, 制成系列浓度的混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以对照品浓度 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标, 进行线性回归, 结果见表 2。

表 2 7 种成分回归方程及线性范围

成分	回归方程	r	线性范围 / (mg/L)
新绿原酸	$Y = 11.321X + 4.561$	0.9997	1.250 ~ 10
绿原酸	$Y = 29.101X + 20.974$	0.9995	4.375 ~ 35
咖啡酸	$Y = 65.514X - 3.304$	0.9996	0.625 ~ 5
异绿原酸 B	$Y = 31.469X - 3.309$	0.9999	1.250 ~ 10
橙皮苷	$Y = 37.951X - 108.610$	0.9998	8.750 ~ 70
异绿原酸 A	$Y = 42.062X - 23.326$	0.9996	1.875 ~ 15
异绿原酸 C	$Y = 44.521X - 26.665$	1.0000	1.875 ~ 15

2.5 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 计算得到新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、橙皮苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C 峰面积的 RSD 分别为 1.06%、1.53%、1.51%、1.02%、0.57%、1.05%、0.81%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一批蜘蛛香供试品溶液, 室温放置, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 计算得到新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、橙皮苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C 峰面积的 RSD 分别为 1.82%、1.64%、1.96%、1.61%、1.06%、1.27%、0.62%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一批蜘蛛香药材, 按“2.3”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 计算得到新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、橙皮苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C 质量分数的 RSD 分别为 1.85%、0.47%、1.45%、1.65%、1.6%、0.3%、0.97%, 表明方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取 6 份已知含量的蜘蛛香药材粉末 0.1 g, 分别加入混合对照品溶液适量, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 计算得到新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、橙皮苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的平均加样回收率分别为 98.46%、98.40%、96.47%、97.44%、97.01%、97.94%、99.01%, RSD 分别为 1.19%、0.83%、1.03%、1.80%、1.11%、

1. 36%、1. 68% 表明方法准确度良好。

2. 9 样品测定 取 10 批蜘蛛香样品,按“2. 3”项

下方法制备样品溶液,按“2. 1”项下色谱条件进样分析,计算样品中各指标成分的含量,结果见表 3。

表 3 10 批蜘蛛香样品中 7 种成分的含量测定结果(mg/g $n=3$)

样品	新绿原酸	绿原酸	咖啡酸	异绿原酸 B	橙皮苷	异绿原酸 A	异绿原酸 C
S1	0. 239	0. 582	0. 206	0. 449	2. 783	1. 169	1. 022
S2	0. 915	15. 735	3. 643	0. 854	7. 126	5. 055	3. 551
S3	0. 509	4. 633	0. 520	1. 025	18. 080	2. 336	2. 564
S4	0. 257	1. 699	0. 126	0. 312	14. 143	1. 043	0. 958
S5	0. 444	9. 145	0. 163	0. 693	12. 999	3. 138	1. 691
S6	0. 406	9. 668	0. 096	1. 864	27. 546	8. 067	6. 360
S7	0. 317	4. 160	3. 758	0. 287	1. 739	2. 191	0. 621
S8	0. 363	3. 443	0. 777	2. 250	8. 895	1. 401	0. 550
S9	0. 414	7. 852	0. 055	1. 281	24. 703	7. 234	4. 520
S10	0. 673	13. 767	0. 088	0. 504	1. 710	4. 964	2. 839

3 讨论

蜘蛛香中含有较多的挥发油和缬草三酯类成分,本实验比较未脱脂、石油醚脱脂和乙酸乙酯脱脂对其含量的影响,结果以石油醚脱脂为佳;提取溶剂比较了水和不同浓度甲醇(10%、30%、50%、70%、100%) 结果表明 70% 甲醇提取效率最高。

蜘蛛香中酚酸类成分及橙皮苷属弱酸性物质,故本实验选用乙腈-甲酸溶液、乙腈-乙酸溶液、乙腈-磷酸溶液等流动相体系进行梯度洗脱,结果显示乙腈-0. 1% 甲酸溶液为洗脱系统时,色谱峰分离效果最好。采用 DAD 检测器在 190~400 nm 范围内对混合对照品溶液和供试品溶液进行扫描,结果发现橙皮苷的最大吸收波长为 284 nm,酚酸类成分为 327 nm,故确定检测波长为 284 nm 和 327 nm。

不同来源的蜘蛛香中各指标成分含量波动较大,总量差异明显,可能与药材产地、采收时间、储藏时间等有关。蜘蛛香叶中指标成分总量较高,可能与根茎和根有相同的药理作用,具有一定的研究开发价值。

本实验建立 HPLC 法同时测定蜘蛛香中 7 种成分的含量,该方法简单、准确、专属性强,可用于蜘蛛香药材的质量控制。中国药典 2015 年版对蜘蛛香的质量控制主要是 TLC 法鉴别缬草三酯和乙酰缬草三酯,为全面控制蜘蛛香药材质量,建议增加新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、橙皮苷、异绿原

酸 A 和异绿原酸 C 的含量测定。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S].一部.北京:中国医药科技出版社,2015:368-369.
- [2] 刘畅,李韶菁,唐仕欢,等.蜘蛛香药理研究进展[J].中国中药杂志,2012,37(14):2174-2177.
- [3] 杨军,龙庆德,罗喜荣,等.超临界二氧化碳萃取蜘蛛香油工艺的研究[J].时珍国医国药,2012,23(1):157-158.
- [4] 田弋夫,龙庆德,罗喜荣,等.蜘蛛香油化学成分的气相色谱-飞行时间质谱分析[J].时珍国医国药,2012,23(4):924-926.
- [5] 罗喜荣,罗俊,杨军,等.蜘蛛香不同部位中总缬草三酯含量测定[J].安徽农业科学,2012,40(16):8884-9106.
- [6] 罗喜荣,苑天红,杨军,等.超临界 CO₂ 萃取蜘蛛香中总缬草三酯的工艺研究[J].广东农业科学,2012,39(16):119-121.
- [7] 罗喜荣,苑天红,杨军,等.超临界 CO₂ 萃取蜘蛛香中缬草素工艺优化[J].湖北农业科学,2013,52(8):1901-1902,1912.
- [8] 李蓉,李小平,吴莹.紫外分光光度法测定蜘蛛香中总黄酮的含量[J].辽宁中医药大学学报,2008,10(12):149-150.
- [9] 刘开萍,杨军,罗喜荣,等.蜘蛛香中绿原酸及总酚酸的含量测定[J].湖北农业科学,2017,56(2):288-290.