

蜘蛛香药材 HPLC 指纹图谱研究

付思红^{1,2,3}, 姚成芬^{2,3}, 张宝^{2,3}, 陆苑¹, 黄勇¹, 夏彬^{1,2}, 李勇军³, 王爱民^{3*}, 席晓岚^{2*}

1. 贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004

2. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550004

3. 贵州医科大学 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心 国家苗药工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550004

摘要: 目的 对蜘蛛香药材的指纹图谱进行研究, 为有效控制其质量提供可靠的方法。方法 以 Phenomenex Gemini C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)为流动相, 梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温 25 °C, 测定蜘蛛香药材的 HPLC 指纹图谱。结果 建立的蜘蛛香药材 HPLC 指纹图谱有 17 个共有峰, 并对 6 个共有峰进行了化学成分指认; 18 批蜘蛛香药材中有 15 批相似度大于 0.89; 主成分分析用 3 个主成分抽象代表 17 个成分进行评价。结论 该方法简便、快速、可靠, 可以有效地评价该药材的质量。

关键词: 蜘蛛香; 高效液相色谱; 指纹图谱; 相似度评价; 主成分分析

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)21-4537-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.21.027

Study on HPLC fingerprint of *Valeriana jatamansi*

FU Si-hong^{1,2,3}, YAO Cheng-fen^{2,3}, ZHANG Bao^{2,3}, LU Yuan¹, HUANG Yong¹, Xia Bin^{1,2}, LI Yong-jun³, WANG Ai-min³, XI Xiao-lan²

1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

3. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, Ministry of Education/National Engineering Research Center of Miao's Medicines, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

Abstract: Objective To study the fingerprint of *Valeriana jatamansi* by HPLC, which can be used for the evaluation of its quality control. **Methods** The Phenomenex Gemini C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used with a mobile phase of methyl acetonitrile (A)-0.1% phosphoric acid (B) gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 25 °C, and the detection wavelength was 254 nm. Above all these would be used for determining the fingerprint. **Results** There were 17 common peaks were found in the fingerprint of *V. jatamansi*, within six peaks were identified. The similarity degrees of 15 batches of samples were more than 0.89. Three principal components were abstractly represented 17 components and evaluated. **Conclusion** The established method is simple, fast, reliable, and can be used for evaluating the quality of *V. jatamansi*.

Key words: *Valeriana jatamansi* Jones.; HPLC; fingerprint; similarity evaluation; principal component analysis

蜘蛛香系败酱科缬草属植物 *Valeriana jatamansi* Jones. 的干燥根茎和根, 又名马蹄香、老虎七、印度缬草等, 收载于《中国药典》2015 年版一部中, 具有理气止痛、消炎止泻、祛风除湿的疗效^[1], 民间常用其治疗心腹疼痛、风湿麻木及筋肉

酸痛, 并可镇静、顺气、消食, 治发痧、止水泻, 用菜油调敷可治蜘蛛疮等^[2], 目前对蜘蛛香药材的研究主要集中在化学成分、提取工艺、药理作用等方面, 且其化学成分中对环烯醚萜类、倍半萜类、生物碱类和黄酮类化合物报道较多^[3-9], 而关于蜘蛛

收稿日期: 2017-05-23

基金项目: 贵州省优秀青年科技人才培养对象专项资金项目 (201511); 贵州省教育厅项目 (ZYRC2014012); 贵州省科技厅平台人才项目 (20165613)

作者简介: 付思红 (1992—), 在读硕士, 研究方向为中药、天然药物药效物质基础研究。Tel: 18285146865 E-mail: 879032590@qq.com

*通信作者 王爱民, 教授, 硕士生导师, 研究方向为药物质量控制研究。Tel: (0851)86908468 E-mail: gywam100@163.com

席晓岚, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药新药研发及质量控制研究。Tel: (0851)86908468 E-mail: 970088464@qq.com

蛛香药材的质量标准研究报道较少, 仅狄宏晔等^[10]对其进行了质量控制研究。

实验室在蜘蛛香的前期研究中发现了咖啡酰基奎宁酸类化学成分^[11], 并进行了其中几个化合物的定量测定^[12], 本研究在采用 HPLC 法建立蜘蛛香药材的指纹图谱同时, 对其中的 5-*O*-咖啡酰基奎宁酸、3-*O*-咖啡酰基奎宁酸、咖啡酸、橙皮苷、3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 6 个共有峰进行了指认。本研究建立的指纹图谱, 可为蜘蛛香的质量控制提供有效的依据。

1 仪器及试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪系列 (美国安捷伦科技公司, 包括四元梯度泵、真空脱气机、自动进样

器、柱温箱、二极管阵列检测器、Chemstation 工作站); AE240 十万分之一电子天平 (梅特勒公司); 超纯水机 (四川沃特尔科技发展有限公司)。5-*O*-咖啡酰基奎宁酸、3-*O*-咖啡酰基奎宁酸、咖啡酸、橙皮苷、3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸对照品 (自制, 经 ¹H-NMR、¹³C-NMR、MS 等波谱鉴定, 并采用 HPLC 峰面积归一化法测定质量分数均大于 98.0%), 乙腈 (色谱纯级, 江苏汉邦科技有限公司), 水为实验室自制超纯水, 其余试剂均为分析纯。实验用药材由贵州医科大学龙庆德副教授鉴定为败酱草科缬草属植物蜘蛛香 *Valeriana jatamansi* Jones. 的干燥根茎及根, 标本存于贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室。其相关信息见表 1。

表 1 蜘蛛香药材信息

Table 1 Information of *Valeriana jatamansi*

批号	样品名	采集时间	产地	批号	样品名	采集时间	产地
20091012	蜘蛛香	2009-10-12	毕节市	20090514	蜘蛛香	2009-05-14	安顺市
20100713	蜘蛛香	2010-07-13	龙里县	20090603	蜘蛛香	2009-06-03	关岭县
20090512	蜘蛛香	2009-05-12	毕节市	20090718	蜘蛛香	2009-07-18	水城县
20090926	蜘蛛香	2009-09-26	毕节市	20090720	蜘蛛香	2009-07-20	贵阳市
20090926	蜘蛛香	2009-09-26	大方县	20090811	蜘蛛香	2009-08-11	龙里县
20091026	蜘蛛香	2009-10-26	毕节市	20090726	蜘蛛香	2009-07-26	清镇市
20101020	蜘蛛香	2010-10-20	凯里市	20090913	蜘蛛香	2009-09-13	凯里市
20100710	蜘蛛香	2010-07-10	贵阳市	20090914	蜘蛛香	2009-09-14	遵义市
20090510	蜘蛛香	2009-05-10	遵义市	20090316	蜘蛛香	2009-03-16	水城县

2 方法与结果

2.1 HPLC 色谱条件

Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A) -0.1%磷酸水溶液 (B)。梯度洗脱程序: 0~16 min, 6%~20% A; 16~30 min, 20%~24% A; 30~60 min, 24%~70% A; 60~65 min, 70%~90% A; 65~75 min, 90%~97% A。体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液制备 分别取 5-*O*-咖啡酰基奎宁酸、3-*O*-咖啡酰基奎宁酸、咖啡酸、橙皮苷、3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的对照品适量, 精密称定, 置于量瓶中, 加入 70%甲醇溶液制得含 5-*O*-咖啡酰基奎宁酸 28.1 μg/mL, 3-*O*-咖啡酰基奎宁酸 93.8 μg/mL、咖啡酸 21.6 μg/mL、橙皮苷 50.9 μg/mL、3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 31.4

μg/mL、4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 267 μg/mL 的混合对照品溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液制备 取蜘蛛香药材 (过 40 目筛) 1 g, 精密称定, 精密加入 70%甲醇 25 mL, 称定质量, 水浴加热回流提取 1 h, 放冷至室温, 再称定质量, 用 70%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一份 (批号 20091012) 供试品溶液, 按“2.1”项下条件重复进样 6 次, 通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 年 A 版”评价相似度, 结果相似度均大于 0.99, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取同一批蜘蛛香样品 (批号 20091012) 共 6 份, 按“2.2.2”项下制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样, 通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 年 A 版”评价相似度, 结果相似度均大于 0.99, 表明重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一份(批号 20091012)供试品溶液,按“2.2.2”项下制备供试品,按“2.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、6、8、16 h 进样,通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 年 A 版”评价相似度,结果显示相似度均大于 0.99,表明供试品在 16 h 内稳定。

2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 共有峰的确定及归属 本实验测定了不同产地和不同批次蜘蛛香样品,确定了 17 个共有峰,建立蜘蛛香药材的指纹图谱,通过对照品指认了 6 个共有色谱峰,代表性指纹图谱见图 1。

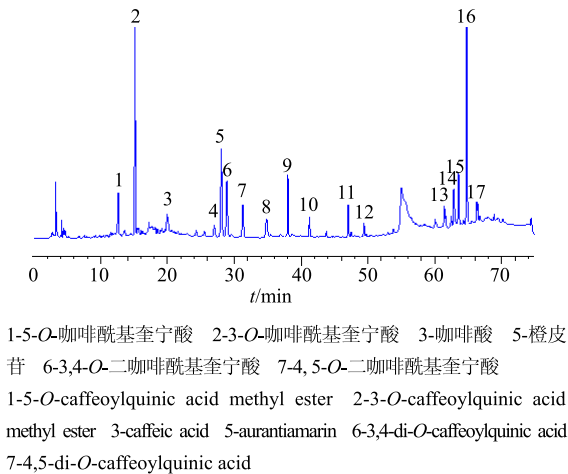


图 1 蜘蛛香药材指纹图谱
Fig. 1 Fingerprint of *V. jatamansi*

2.4.2 相似度评价 采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 年 A 版)”对上述 18 批蜘蛛香药材进行相似度评价,利用中位数法进行多点校正生成对照图谱,分别计算蜘蛛香药材的相似度。18 批次的蜘蛛香药材的相似度在 0.421~0.984。指纹图谱见图 2,相似度见表 2。

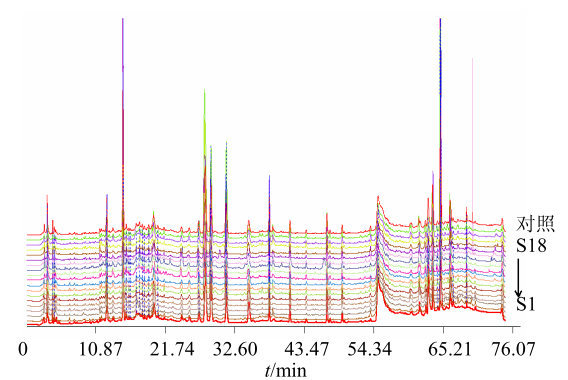


图 2 18 批蜘蛛香样品指纹图谱
Fig. 2 Fingerprint of 18 batches of *V. jatamansi*

表 2 18 批蜘蛛香药材与对照图谱相似度

Table 2 Similarity of 18 batches of *V. jatamansi*

编号	批号	相似度	编号	批号	相似度
S1	20091012	0.967	S10	20090514	0.930
S2	20100713	0.421	S11	20090603	0.975
S3	20090512	0.551	S12	20090718	0.928
S4	20090926	0.963	S13	20090720	0.961
S5	20090926	0.984	S14	20090811	0.933
S6	20091026	0.981	S15	20090726	0.971
S7	20101020	0.938	S16	20090913	0.892
S8	20100710	0.963	S17	20090914	0.964
S9	20090510	0.969	S18	20090316	0.918

由表 2 可知,18 批药材中除了 S2、S3 外,其余相似度均大于 0.89,说明贵州省内各产地的药材质量具有较高的均一性。

2.4.3 主成分分析(PCA) 为了更好地体现出蜘蛛香的类别关系,特将蜘蛛香原药材的多样本进行 PCA,采用 SPSS18.0 统计软件进行 PCA,得到主成分的特征值和方差贡献率。根据 18 批蜘蛛香药材主成分分析得到的总方差,成分 1、2、3 累积方差≥70%,能抽象代替药材中 17 种成分。故针对前 3 个主成分进行分析,以主成分为变量的 18 个批次蜘蛛香药材的主成分得分图见图 3。

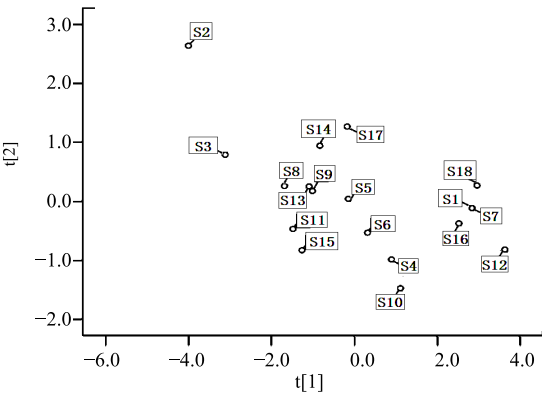


图 3 18 批蜘蛛香样品的主成分得分图
Fig. 3 PCA Score plot of 18 batches of *V. jatamansi*

从 18 批蜘蛛香药材的主成分得分图中可以明显看到,S2、S3 和其他药材偏离较大,其结果与相似度评价的结果一致,可能受生长环境、采收季节等因素的影响。

3 讨论

本实验比较了不同体积分数的甲醇、乙醇等溶剂的提取效果,结果发现 70%甲醇提取信息量最全

面,故选择 70%甲醇作为提取溶剂。并考察了回流、超声和索氏 3 种提取方法,结果发现回流提取优于其他 2 种方法,故采用回流提取的方法。同时对回流提取时间进行考察,最终选择了提取效率较高的 1 h 进行提取。

通过比较了 Phenomenex Gemini C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、伊利特-(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 3 种不同色谱柱的分离效果,最终采用了色谱峰的分离度、峰形、灵敏度和出峰时间均较好的 Phenomenex Gemini C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 作为色谱柱。并利用二极管阵列检测器(DAD)进行检测,得到各波段的三维色谱及光谱图,从兼顾各个成分的信息量表达全面度出发,选择了 254 nm 作为检测波长。

本实验指纹图谱指认了 5-*O*-咖啡酰基奎宁酸、3-*O*-咖啡酰基奎宁酸、咖啡酸、橙皮苷、3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 6 个化合物,且建立的方法符合指纹图谱要求,为控制蜘蛛香药材的整体质量提供了科学依据。

参考文献

[1] 中国药典[S]. 一部. 2015.

- [2] 吴家荣. 中草药蜘蛛香(印度缬草)的鉴定研究[J]. 新医药通讯, 1976(1): 73-78.
- [3] 胡轶群, 张如松. 药用植物蜘蛛香化学成分及药理作用研究[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(24): 194-197.
- [4] 许婧, 刘翠周, 桂丽萍, 等. 蜘蛛香的化学成分研究[J]. 药物评价研究, 2010, 33(2): 132-134.
- [5] 李元旦, 李蓉涛, 李海舟. 蜘蛛香的化学成分研究[J]. 云南中医中药杂志, 2011, 32(6): 80-81.
- [6] 毛成栋, 宋会珠, 杨波, 等. 蜘蛛香化学成分研究[J]. 中药材, 2015, 38(8): 1665-1667.
- [7] 雍妍, 黄青, 王茹静, 等. 蜘蛛香化学成分研究[J]. 中草药, 2015, 46(23): 3466-3470.
- [8] 施金钺, 李萍, 高增平, 等. 蜘蛛香的化学成分研究[J]. 西北药学杂志, 2016, 31(3): 225-227.
- [9] 赵梅, 龙厚宁, 贺欢, 等. 蜘蛛香挥发油的气相色谱指纹图谱[J]. 医药导报, 2016, 35(3): 291-295.
- [10] 狄宏晔, 石晋丽, 闫兴丽, 等. 蜘蛛香药材质量标准研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(22): 2357-2359.
- [11] 李勇军, 刘佳, 陈青凤, 等. 蜘蛛香化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(12): 8-10.
- [12] 李靖, 刘佳, 乔里, 等. 高效液相色谱法同时测定蜘蛛香中 3 种活性成分的含量[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(20): 1840-1844.