

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.10.09

蜘蛛香胶囊的质量标准研究

杨海峰^{1,2}, 金礼琴^{1,2}, 陈晓兰^{1,2}, 李锋涛¹, 李艳艳¹, 吴悦¹, 李勇军^{1,2*}

(1. 江苏农牧科技职业学院, 泰州 225300; 2. 江苏中牧倍康药业有限公司, 泰州 225300)

[收稿日期] 2018-03-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 10-0066-06 [中图分类号] S853.7

[摘要] 对蜘蛛香胶囊进行质量研究, 为其质量标准制定提供依据。采用显微鉴别和薄层色谱 (TLC) 法对蜘蛛香胶囊进行定性鉴别, 按照《中国兽药典》检查蜘蛛香胶囊的水分、装量差异、崩解时限和微生物限度等项目; 采用高效液相色谱 (HPLC) 法测定蜘蛛香胶囊中橙皮苷含量。薄层鉴别斑点清晰, 专属性强。蜘蛛香胶囊的各检查项均符合国家相关质量要求。含量测定方法简便、可靠、灵敏、重复性好, 橙皮苷在 $0.16 \sim 6.4 \mu\text{g}$ 范围内与峰面积呈良好线性关系 ($r=0.9999$), 平均回收率为 97.6%, RSD 为 1.3%, 6 批次蜘蛛香胶囊中的橙皮苷平均含量为 2.08 mg/粒。研究结果表明蜘蛛香胶囊质量可靠, 质控方法可行。

[关键词] 蜘蛛香胶囊; 质量标准; 橙皮苷; 薄层色谱; 高效液相色谱

Study on the Quality Standard of *Valeriana jatamansi* Jones Capsule

YANG Hai-feng^{1,2}, JIN Li-qin^{1,2}, CHEN Xiao-lan^{1,2}, LI Feng-tao¹, LI Yan-yan¹, WU Yue¹, LI Yong-jun^{1,2*}

(1. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou, Jiangsu, 225300, China;

2. Jiangsu Zhongmu Beikang Pharmaceutical Company Limited, Taizhou, Jiangsu, 225300, China)

Corresponding author: LI Yong-jun, E-mail: yf6011@hotmail.com

Abstract: Study on the quality of *Valeriana jatamansi* Jones capsule was carried out to provide the basis for quality standard. *Valeriana jatamansi* Jones capsule was identified by microscopic observation and thin-layer chromatography (TLC) method. The moisture content, weight difference, disintegration time limited and microbial limit of *Valeriana jatamansi* Jones capsule were inspected according to Chinese veterinary pharmacopoeia. High performance liquid chromatography (HPLC) method was used to determine the content of hesperidin. Hesperidin could be identified by TLC and the spots were clear and strongly specific. All examination parameters of *Valeriana jatamansi* Jones capsule were in line with national quality requirements. The determination method was simple, sensitive and accurate with good repeatability. The linear range of hesperidin was $0.16 \sim 64 \mu\text{g}$ ($r=0.9999$), the average recovery rate was 97.6% and RSD was 1.3%. The average content of hesperidin in each *Valeriana*

基金项目: 江苏高校“青蓝工程”资助项目 (苏教师[2018]12号); 江苏省高校科研成果产业化推进项目 (JHB2012-90); 泰州市科技支撑农业项目 (TN201711)

作者简介: 杨海峰, 博士, 副教授, 从事兽医药理学研究及新兽药研发工作。

通讯作者: 李勇军。E-mail: yf6011@hotmail.com

jatamansi Jones capsule was 2.08 mg from 6 batches. The results showed that the quality of *Valeriana jatamansi* Jones capsule wascontrollable and the quality control method was feasible.

Key words: *Valeriana jatamansi* Jones capsule; quality standard; hesperidin; TLC; HPLC

蜘蛛香为败酱科植物蜘蛛香 *Valeriana jatamansi* Jones 的干燥根茎和根,其性味微苦、辛、温,归肺、脾、胃经,有理气止痛、消食止泻、祛风除湿之功效,主治肚腹胀痛、食积不化、腹泻痢疾、风湿痹痛^[1-3]。蜘蛛香主要含有挥发油、黄酮类、环烯醚萜类和多糖等化学成分^[4]。现代药理学研究表明,蜘蛛香提取物不仅具有镇静、催眠、镇痛、双向调节肠道蠕动等作用^[5-7],对细菌、病毒引起的肠炎也有较好的疗效^[8-9]。蜘蛛香胶囊为蜘蛛香药材细粉制成的单方硬胶囊,于 2017 年 1 月获得国家三类新兽药证书,是目前国内获批的中药类宠物药品,主要用于防治犬细小病毒性肠炎。试验从性状、鉴别、检查、含量测定等方面开展了蜘蛛香胶囊的质量研究,建立了质量控制方法,为其临床应用的有效性和安全性提供了实验依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 LC20A 型高效液相色谱仪,配备 SPD-20A 紫外检测器、LC-20AT 双泵、HT-220A 柱温箱,日本岛津公司产品;UV-2250 型紫外可见分光光度计,日本岛津公司产品;AS1201 型自动进样器,大连依利特公司产品;BT25S 型电子天平,北京赛多利斯公司产品。

1.2 试药 蜘蛛香胶囊,规格 0.25g/粒,批号分别为 150826、150828、150830、150906、150908、150910,江苏中牧倍康药业有限公司提供;橙皮苷对照品,批号 110721-201316,购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,水为自制纯化水,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

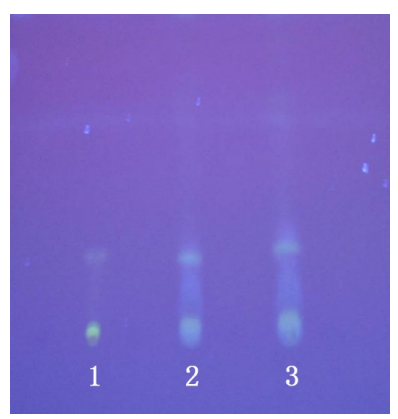
2.1 性状 蜘蛛香胶囊为蜘蛛香药材细粉制成的硬胶囊,内容物为灰棕色或棕色的颗粒和粉末;气特异,味微苦、辛。

2.2 鉴别

2.2.1 显微鉴别 取蜘蛛香胶囊内容物,置显微镜

下观察。显微鉴别特征明显,可见淀粉粒甚多,单粒类圆形、长圆形或卵形,有的一端尖突,直径 5~39 μm,脐点裂缝状、三叉状或点状,有的可见层纹;复粒由 2~4 粒组成。导管主为网状导管和单纹孔导管。薄壁细胞内含有淡棕褐色物和橙皮苷结晶。

2.2.2 薄层色谱鉴别 取蜘蛛香胶囊内容物 0.2 g,加乙醚 5 mL,振摇,放置 5 min,滤过,滤液挥去乙醚,残渣加甲醇 0.5 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取蜘蛛香对照药材 0.2 g,同法制成对照药材溶液。吸取供试品溶液 5 μL、对照品溶液 2 μL,分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,以石油醚-丙酮(5:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(254 nm)下检视。薄层色谱图见图 1,可见斑点清晰,供试品、对照药材及对照品在相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,说明 TLC 法能鉴别出橙皮苷。



(1.橙皮苷对照品;2.蜘蛛香对照药材;3.蜘蛛香胶囊供试品)

(1. reference substance of hesperidin;
2. reference drug of *Valeriana jatamansi* Jones reference;
3. ested sample of *Valeriana jatamansi* Jones capsule)

图 1 橙皮苷的薄层色谱图

Fig 1 The TLC chromatogram of hesperidin

2.3 检查

2.3.1 水分 采用烘干法测定蜘蛛香胶囊的水分,准确称取 3 批次蜘蛛香胶囊内容物 2 g,平铺于已

干燥恒重的称量瓶中,精密称定,置 105 ℃ 干燥至恒重。根据减失的重量,测得 3 批次蜘蛛香胶囊的水分含量分别为 6.8%、7.1%、6.5%,均低于 9%,符合规定。

2.3.2 装量差异 取蜘蛛香胶囊 10 粒,分别精密称定重量,倾出内容物,囊壳用小刷拭净,再分别精密称定囊壳重量,计算每粒内容物的装量与平均装量。3 批次蜘蛛香胶囊的平均装量($n=10$)分别为 0.2503 g ($RSD=2.7\%$)、0.2530 g ($RSD=3.5\%$)、0.2515 g ($RSD=2.4\%$),装量差异在标示装量的 $\pm 10\%$ 以内,符合规定。

2.3.3 崩解时限 取蜘蛛香胶囊 6 粒,采用升降式崩解仪测定其崩解时限。3 批次蜘蛛香胶囊的崩解时间分别为 15、16、15 min,均在 30 min 之内崩解,符合规定。

2.3.4 微生物限度 按照非无菌产品,采用微生物计数法和控制菌检查法进行微生物限度检查。供试液制备方法如下:取蜘蛛香胶囊内容物 10 g 置入灭菌研钵中,加 pH6.8 无菌磷酸盐缓冲液至 20 mL,置 45 ℃ 水浴中,振荡,使溶解,充分研磨,并在研磨过程中逐渐增加稀释液,直至供试品完全呈细匀状态为止,稀释液加入至总量为 100 mL,作为 1:10 的供试液。测定 3 批次蜘蛛香胶囊的细菌总数分别为 74 cfu/g、67 cfu/g、61 cfu/g,霉菌和酵母菌总数分别为 23 cfu/g、28 cfu/g、25 cfu/g,未检出大肠埃希菌,微生物限度检查结果符合规定。

2.4 含量测定

2.4.1 对照品溶液制备 精密称取橙皮苷对照品适量,加甲醇制成质量浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,即得。

2.4.2 供试品溶液制备 取蜘蛛香胶囊内容物,研细,分别取约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,密塞,称定重量,加热回流 30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4.3 色谱条件 色谱柱:CAPCELL PAK C18 (4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μm);流动相:甲醇-冰醋酸-水(35:4:61);检测波长:284 nm;流速:1.0 mL/min;

柱温:30 ℃;进样量:20 μL 。在上述色谱条件下,橙皮苷与供试品溶液中的其他组分分离度良好,其保留时间在 14.6 min 左右,见图 2。

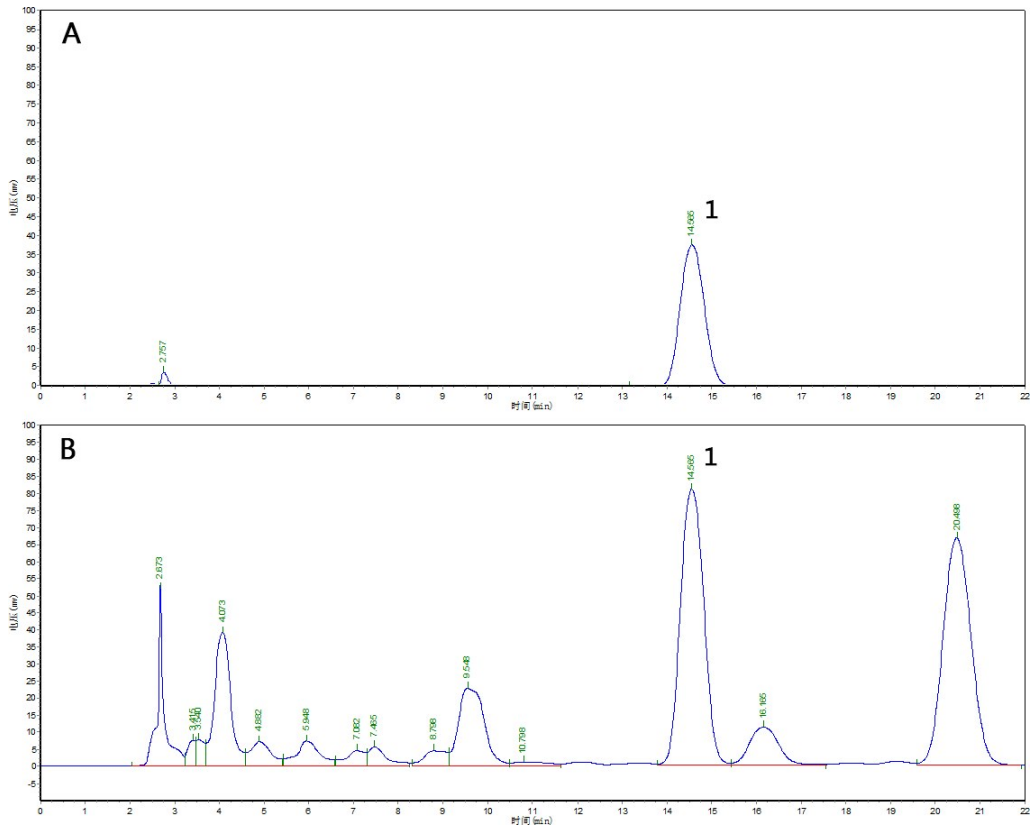
2.4.4 线性关系考察 精密称取橙皮苷对照品 20 mg,置 50 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀。精密吸取上述溶液 0.5、1、2、5、10、20 mL,分别置 25 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成 8、16、32、80、160、320 g/mL 系列浓度的对照品溶液。精密吸取上述不同浓度的对照品溶液 20 μL ,分别进样,测定峰面积。以峰面积(Y)对橙皮苷质量(X)进行线性回归,得回归方程 $Y=1906206.20X+102959.48$ ($r=0.9999$),橙皮苷进样量在 0.16~6.4 μg 范围内与峰面积成良好的线性关系。

2.4.5 精密度试验 精密吸取 20 μL 同一橙皮苷对照品溶液,按“2.4.3”项下色谱条件连续进样 6 次,测定峰面积,结果橙皮苷对照品溶液峰面积的 RSD 为 0.43% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.4.6 稳定性试验 取蜘蛛香胶囊内容物约 0.5 g,精密称定,按“2.4.2”项下制备供试品溶液,分别于配制后 0、1、3、6、12、24 h,按“2.4.3”项下色谱条件进样测定,测定峰面积。结果同一供试品溶液在不同时间点所测得的橙皮苷峰面积的 RSD 为 1.7% ($n=6$),说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.7 重复性试验 取同一批号的蜘蛛香胶囊内容物 6 份,每份约 0.5 g,精密称定,按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.4.3”项下色谱条件进样测定。测得同一批次蜘蛛香胶囊中橙皮苷的平均含量为 2.11 mg/粒, RSD 为 1.9% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.4.8 加样回收率试验 取同一批号已知橙皮苷含量的蜘蛛香胶囊内容物 6 份,每份约 0.5 g,精密称定,每份分别精密加入橙皮苷对照品溶液 20 mL (0.2005 mg/mL),按“2.4.2”项下制备供试品溶液,并按“2.4.3”项下色谱条件进样测定。加样回收率试验结果见表 1,橙皮苷的平均回收率为 97.7%, RSD 为 1.3% ($n=6$),表明该方法准确性良好。



(A.橙皮苷对照品;B.蜘蛛香胶囊供试品;1. 橙皮苷)
(A.reference substance of hesperidin; B. tested sample of *Valeriana jatamansi* Jones capsule; 1. hesperidin)

图 2 橙皮苷的高效液相色谱图

Fig 2 The HPLC chromatogram of hesperidin

表 1 蜘蛛香胶囊中橙皮苷的加样回收率

Tab 1 Results of sample recovery rate							
样品编号	样品重量	样品含量	加入量	测得总量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.5007	4.1952	4.01	8.1650	99.0	97.7	1.3
2	0.4997	4.1974	4.01	8.0323	95.6		
3	0.5001	4.1928	4.01	8.1213	97.9		
4	0.5005	4.2009	4.01	8.1427	98.3		
5	0.5003	4.1933	4.01	8.1575	98.9		
6	0.4995	4.1987	4.01	8.0773	96.7		

2.4.9 样品含量测定 取不同批次的蜘蛛香胶囊内容物,每批取 3 份,每份约 0.5 g,精密称定,按“2.4.2”项下制备供试品溶液,并按“2.4.3”项下色谱条件进样测定,测得峰面积,用外标法计算出橙皮苷

含量,并换算成每粒蜘蛛香胶囊中所含的橙皮苷含量。6 批次蜘蛛香胶囊的橙皮苷含量测定结果见表 2,橙皮苷平均含量为 2.08 mg/粒。

表 2 蜘蛛香胶囊中橙皮苷的含量测定结果

Tab 2 The determination of hesperidin in tested sample of *Valeriana jatamansi* Jones capsule

样品批号	样品编号	含量/mg	平均含量/mg	RSD/%
150826	S ₁	2.14	2.12	1.5
	S ₂	2.12		
	S ₃	2.11		
	S ₄	2.12		
150828	S ₅	2.10	2.11	3.6
	S ₆	2.07		
	S ₇	2.11		
	S ₈	2.15		
150830	S ₉	2.16	2.14	2.6
	S ₁₀	2.06		
	S ₁₁	2.17		
	S ₁₂	2.03		
150906	S ₁₃	2.03	2.05	2.1
	S ₁₄	1.98		
	S ₁₅	2.01		
	S ₁₆	2.06		
150908	S ₁₇	2.09	2.01	2.5
	S ₁₈	2.15		
150910			2.07	2.1

3 讨论与结论

目前中药质量控制的方法是其活性成分的定性与定量分析。橙皮苷(hesperidin)是蜘蛛香的主要化学成分之一,含量高,稳定性好,可作为蜘蛛香质量控制的监测指标。鉴别试验中,采用了兽药典普遍采用的显微鉴别和薄层色谱鉴别,其鉴别操作简单、特征明显,专属性强,重现性好。对水分、装量差异、崩解时限、微生物限度等检查项目进行方法验证和测定,检查结果均符合我国兽药典的相关规定。参考文献报道的蜘蛛香药材中橙皮苷 HPLC 检测方法^[10-12],分别选择了乙腈-0.1%磷酸溶液(15:80)、乙腈:水(15:85)、甲醇-冰醋酸-水(35:4:61)、乙腈-2%醋酸溶液(18:82)等几种不同组成及不同比例的流动相进行了考察,结果显示以甲醇-冰醋酸-水(35:4:61)作为流动相获得的色谱峰峰形较好,橙皮苷的分离效果最好。

6 个不同批次的蜘蛛香胶囊中橙皮苷(C₂₈H₃₄O₁₅)

的平均含量为 2.08 mg/粒,考虑不同产地蜘蛛香药材中橙皮苷含量的差异,以含量测定值的 80%作为含量下限,本品每粒含蜘蛛香以橙皮苷(C₂₈H₃₄O₁₅)计,不得少于 1.66 mg。综上所述,所建立的蜘蛛香胶囊质量控制方法专属性强、重复性好,能准确的进行定性和定量检测,可作为其生产、检验、使用和监管的技术依据。

参考文献:

[1] 中国兽药典委员会.中华人民共和国兽药典 2010[S]. China Veterinary Pharmacopoeia Committee. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia, 2010 edition[S].

[2] 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.

Mao C D, Song H Z, Yang B, et al. Chemical Constituents from Rhizome of *Valeriana jatamansi* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2015, 38(8): 1665-1667.

[3] 陈畅,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.

- Chen C, Li S J, Tang S H, *et al.* Advance of pharmacological studies on *Valeriana jatamansi* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2012, 37(14): 2174-2177.
- [4] 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.
- Shi J B, Li P, Gao Z P, *et al.* Study on the chemical constituents of *Valeriana jatamansi* Jones [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2016, 31(3): 225-227.
- [5] 闫智勇,张天娥,彭 佳,等. 蜘蛛香对焦虑模型大鼠行为学及脑组织神经递质含量的影响[J]. 中药药理与临床,2008,24(3):67-69.
- Yan Z Y, Zhang T E, Peng J, *et al.* Effect of the extract of *Valeriana jatamansi* Jones on the ethology and neurotransmitter in the brain in the anxiety model of rat [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2008, 24(3): 67-69.
- [6] 毛晓健,李静平,王 军. 蜘蛛香镇痛、镇静作用及对胃肠道的影响[J]. 云南中医学院学报,2008,31(3):34-37.
- Mao X J, Li J P, Wang J. Main pharmacodynamic study on *Valeriana wallichii* DC [J]. Journal of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, 2008, 31(3): 34-37.
- [7] 马丽娟,李 鹏,宋 宇,等. 马蹄香镇痛作用的研究及肠蠕动的影晌[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(7):47-48.
- Ma L J, Li P, Song Y, *et al.* The research in analgesia and intestine peristalsis of *saruma henryi* olive [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2010, 37(7): 47-48.
- [8] 郜红利,谭玉柱. 蜘蛛香提取物的药理学研究[J]. 华西药学杂志,2014,29(2):154-157.
- Gao H L, Tan Y Z. Advance of pharmacological studies on the extract of *Valeriana jatamansi* Jones [J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, 29(2): 154-157.
- [9] 裴秋燕,李 璇,朱军旋,等. 蜘蛛香的药理作用及其机理研究进展[J]. 中华中医药学刊,2010,28(9):1864-1865.
- Pei Q Y, Li X, Zhu J X, *et al.* Advances in study on pharmacological action and mechanism of *Valeriana wallichii* DC [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2010, 28(9): 1864-1865.
- [10] 石晋丽,刘 勇,肖培根. HPLC 法测定不同产地蜘蛛香中橙皮苷的含量[J]. 中草药,2005,36(3):449-450.
- Shi J L, Liu Y, Xiao P G. Determination of hesperidin in *Valeriana jatamansi* Jones from different provenances by HPLC [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2005, 36(3): 449-450.
- [11] 陈 玲,鲍家科,徐 洪,等. 贵州地产蜘蛛香质量分析[J]. 中国当代医药,2010,17(13):46-47.
- Chen L, Bao J K, Xu H, *et al.* Quality analysis for *Valeriana jatamansi* Jones from different habitats in Guizhou [J]. China Modern Medicine, 2010, 17(13): 46-47.
- [12] 曾建伟,吴锦忠,林忠宁,等. HPLC 测定不同产地佛手中橙皮苷的含量[J]. 中国实验方剂学,2012,18(19):97-99.
- Zeng J W, Wu J Z, Lin Z N, *et al.* Determination of hesperidin in fructus citris sarcodactylis from different provenances by HPLC [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2012, 18(19): 97-99.

(编辑:陈 希)