

高效液相色谱法测定香附中 α -香附酮的含量

何桂英*, 邓竹君, 郑好, 涂雨佳, 岳玲燕, 罗恩莉

(太极集团四川绵阳制药有限公司, 绵阳 621000)

摘要: **目的** 通过高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 探索香附中 α -香附酮的提取方式和含量的测定方法, 达到方法准确可靠简便易操作的目的。**方法** 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Agilent Eclipse Plus, 十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱, 150×4.6 mm, 5 μ m, 流动相为: 甲醇-水 (70:30), 紫外-可见分光检测器; 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 240 nm; 柱温为 35°C。**结果** 香附在 0.02314-0.46287 mg/mL 线性范围内呈良好线性关系, $R^2=1$, 平均回收率 99.84%, RSD (Relative Standard Deviation)=0.09%。**结论** 该方法操作简便, 灵敏度高, 重复性好, 准确、可靠, 可用于测定香附 α -香附酮的含量, 并有效控制香附的质量。

关键词: 香附; α -香附酮; 紫外-可见分光检测器; 高效液相色谱法

A high performance liquid chromatography method for the determination of α -cyperone in Cyperi Rhizoma

HE Gui-Ying*, DENG Zhu-Jun, ZHEN Hao, TU Yu-Jia, YUE Ling-Yan, LUO En-Li

(Sichuan Mianyang Pharmaceutical Co., Ltd., Taiji Group, Mianyang 621000, China)

ABSTRACT: Objective By means of High Performance Liquid Chromatography (HPLC), the extraction method and content determination method of α -cyperone were explored to achieve the purpose of accuracy, reliability, convenience and easy operation. **Methods** High performance liquid chromatography was used. The chromatography was performed on Agilent Eclipse Plus (150×4.6 mm, 5 μ m) silica gel column with mobile phase consisted of methanol-water (70:30) and UV-VIS spectrometer. The flow rate was 1.0 mL/min. The detection wavelength was 240 nm. The column temperature was 35°C. **Results** The results showed a good linear relationship in the linear range of 0.02314-0.46287 mg/mL with $R^2=1$, the average recovery rate of 99.84% and relative standard deviation (RSD)=0.09%. **Conclusion** The method has the advantages of simple operation, high sensitivity, good repeatability, accuracy and reliability, and can be used to determine the content of α -cyperone in order to control the quality of cyperone effectively.

KEY WORDS: Cyperi Rhizoma; alpha-cyperone; ultraviolet-visible spectroscopy detector; high performance liquid chromatography

0 引言

香附 (Cyperi Rhizoma) 来源于莎草科植物莎草 *Cyperus rotundus* L. 的干燥根茎^[1], 具有疏肝解郁, 理气宽中, 调经止痛

的功效^[1]。香附, 原名“莎草”, 始载于《名医别录》, 列为中品^[2]。《唐本草》始称香附子^[3]。《本草纲目》列入草部芳草类, 名“莎草香附子”^[4], 2020年版《中国药典》收载的香附, 【含量测定】项为挥发油, 不得少于 1.0% (mL/g), 其中主要成分为 α -香附酮,

* 通信作者: 何桂英, 副主任中药师, 经理, 研究方向为中药材鉴定、中成药生产管理、中成药质量管理, 药物警戒等。E-mail: 457315191@qq.com

*Corresponding author: HE Gui-Ying, Deputy Chief Pharmacist of Chinese Medicine, Manager, Sichuan Mianyang Pharmaceutical Co., Ltd., Taiji Group, Mianyang 621000, China. E-mail: 457315191@qq.com

本文采用HPLC法测定香附中 α -香附酮的含量。方法简便、快速、准确, 专属性强, 可用于香附的质量控制。

1 材料与方法

1.1 仪器

高效液相色谱仪(1260, 安捷伦), 包括紫外-可见分光检测器; 安捷伦十八烷基硅烷键合硅胶(150×4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱; XS205DU 十万分之一电子天平(梅特勒-托利多科技(中国)有限公司); SB-500DTY 扫频超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); UPR-11-10T 优谱超纯水器(四川优谱超纯科技有限公司)。

1.2 材料

对照品 α -香附酮(批号: 110748-202117, 特性量值: 99.8%), 购于中国食品药品检定研究院; 甲醇为分析纯、色谱纯(成都市科隆化学品有限公司); 超纯水自制。香附(广西南药药业有限公司, 经绵阳市食品药品检验所魏云主任中药师鉴定为莎草科植物莎草 *Cyperus rotundus* L. 的干燥根茎)。

1.3 色谱条件

采用安捷伦十八烷基硅烷键合硅胶(150×4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱, 流动相为甲醇: 水(70:30), 柱温为35°C; 紫外-可见分光检测器; 检测器温度40°C。理论板数按 α -香附酮计算应不低于4000。检测波长240 nm^[5], 进样量10 μ L。

1.4 溶液的制备

1.4.1 对照品溶液的制备

精密称取 α -香附酮对照品适量, 加甲醇溶解, 制成每

1 mL 含 0.3 mg 的对照品溶液, 即得。

1.4.2 供试品溶液的制备

精密称取香附粉末1 g, 置50 mL容量瓶中, 加甲醇适量, 超声处理30 min, 定容至刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 作为供试品溶液^[6]。

1.4.3 阴性样品溶液的制备

按1.4.2项下方法(不加香附样品, 其他处理方法均一致), 制备阴性供试品溶液。

2 结果与分析

2.1 专属性试验

分别取1.4.1、1.4.2、1.4.3项下的对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液, 按1.3项下的色谱条件进行测定, 进样量为10 μ L, 测定结果阴性样品溶液对测定成分无干扰, 专属性良好(见图1-3)。

2.2 线性关系考察

精密吸取1.4.1项下对照品溶液1 mL分别置2、5、10、20 mL的量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 制得不同质量浓度的对照品溶液, 按1.3项下的色谱条件依次进5个浓度对照品溶液, 20 μ L, 记录色谱图峰面积, 以峰面积为纵坐标, 以对照品浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 结果显示 α -香附酮的线性回归方程 $Y=55826X+22.341$, 线性范围0.02314-0.46287 mg/mL, 相关系数 $R^2=1$, α -香附酮在浓度范围内与其峰面积呈现良好的线性关系。标准曲线(见图4)。

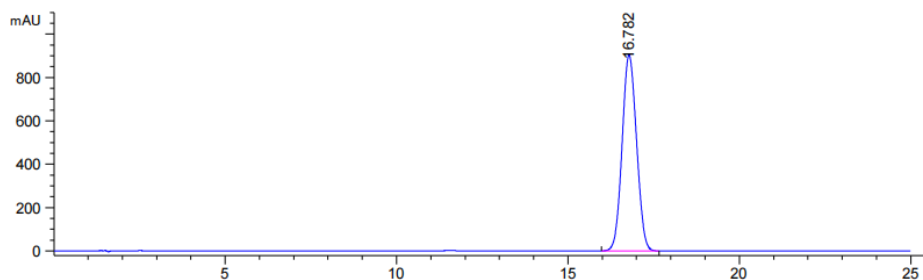


图1 对照品溶液色谱图

Fig.1 Chromatogram of reference solution

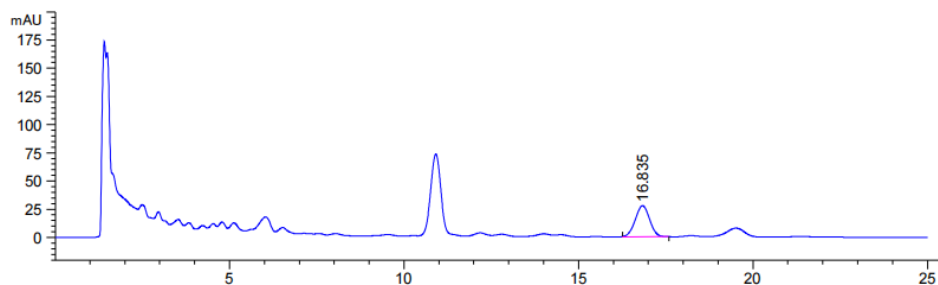


图2 供试品溶液色谱图

Fig.2 Chromatogram of test solution

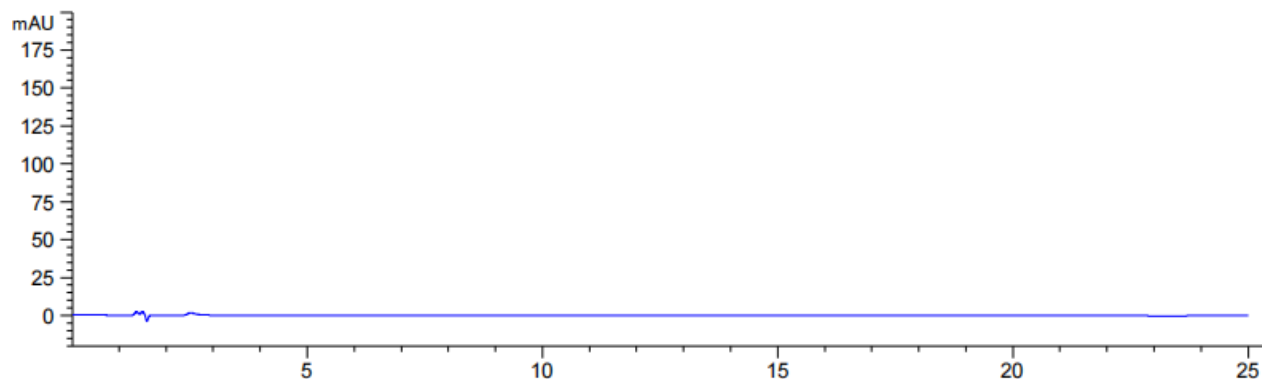


图3 阴性样品溶液色谱图

Fig.3 Chromatogram of negative sample solution

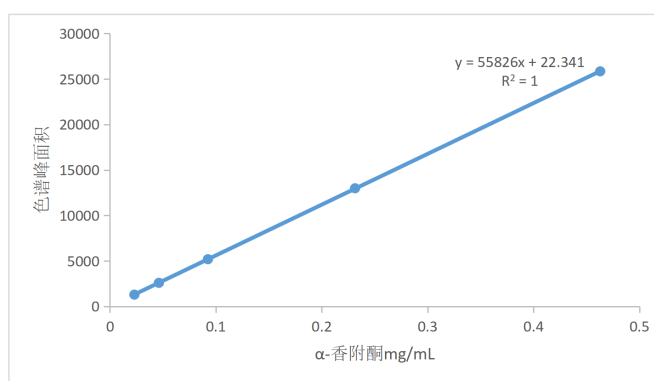


图4 峰面积与对照品浓度的线性标准曲线

Fig.4 Linear standard curve of peak area versus reference substance concentration

2.3 精密度试验

精密吸取 α -香附酮对照品溶液（浓度为 $0.4638 \text{ mg/mL} \times 99.8\%$ ） $20 \mu\text{L}$ ，按 1.3 项下的色谱条件连续进样 6 次，记录峰面积，其 $\text{RSD}=0.2\%$ ，表明仪器的精密度良好。

2.4 重复性试验

取同一香附样品，按 1.4.2 项下方法平行制备 10 份供试品溶液，按 1.3 项下的色谱条件依次检测，分别测定并计算含量， α -香附酮平均含量为 0.702 mg/g ，其 RSD 为 0.2% ，表明该方法重复性良好。

2.5 稳定性试验

取同一供试品溶液，分别在 0、1、2、4、6、8、12 小时进行测定，记录峰面积并计算 RSD ，结果 α -香附酮峰面积的 RSD 为 0.3% ，表明供试品溶液在制备后 12 小时内稳定。

2.6 加样回收率试验

精密称取已知含量的供试品 9 份，分别精密加入一定量的 α -香附酮对照品，按 1.4.2 中制备供试品溶液的方法进行处理，测定并计算，结果见表 1。

2.7 样品测定

取 10 批待测香附样品，按 1.4.2 中制备溶液的方法进行处理并测定，分别计算含量，验证结果如下。结果见表 2。

表1 加样回收率试验结果

Table 1 Test results of recovery rate of adding samples

编号	样品取样量 (g)	样品自身含量 (mg)	加样量 (mg)	测定含量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	1.0006	0.702	27.12	27.801	99.92		
2	1.0004	0.702	26.87	27.473	99.63		
3	0.9998	0.702	27.17	27.820	99.81		
4	1.0008	0.702	43.52	44.178	99.90		
5	0.9997	0.702	43.87	44.537	99.92	99.84	0.09
6	1.0003	0.702	43.57	44.207	99.85		
7	1.0005	0.702	87.02	87.600	99.86		
8	1.0003	0.702	86.96	87.532	99.85		
9	1.0007	0.702	87.09	87.661	99.85		

表2 不同批次 α -香附酮的含量
Table 2 Content of α -cyperone in different batches

批号项目	含量(%)		
	样1	样2	平均
001	0.070	0.074	0.072
002	0.074	0.071	0.0725
003	0.054	0.058	0.056
004	0.055	0.051	0.053
005	0.047	0.046	0.0465
006	0.051	0.054	0.0525
007	0.074	0.071	0.0725
008	0.052	0.056	0.054
009	0.077	0.081	0.079
010	0.072	0.076	0.074

3 讨论与结论

香附中 α -香附酮属于倍半萜类^[7],易溶于醇及有机溶剂,难溶于水。 α -香附酮化学结构式中含有双键的烃基、酯基两大官能团^[8],两者皆属于疏水基团,是非极性官能团,而水是极性^[9],根据相似相溶原理, α -香附酮难溶于水,易溶于有机溶剂。

3.1 α -香附酮的提取方式

实验分别采用了《中国药典》方法加乙醇超声提取^[10]、加乙醚回流^[11]、加水超声提取^[12]三种方法,结果表明加乙醇超声提取样品,色谱峰无杂峰,含 α -香附酮的量低,方法较简单,理论塔板数达到要求,分离效果好;加乙醚回流,色谱峰周围有杂峰干扰,含 α -香附酮的量较高,方法复杂,理论塔板数达到要求,分离效果好;加水超声提取样品,峰周围无杂峰,含 α -香附酮的量最高,方法简单,理论塔板数达到要求,分离效果最好,故选择加水超声提取的方法。

3.2 α -香附酮测定色谱条件

通过查阅参考文献^[5-15]的 α -香附酮含量测定项,对色谱柱、流动相、柱温等和检测器温度条件进行以下实验:实验中选取氨基键合硅胶柱(250×4.6 mm)色谱柱和十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱,250×4.6 mm, 5 μ m进行对比分析,后者分析出的色谱图理论塔板数、分离度、拖尾因子等均优于前者,故选用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱,250×4.6 mm, 5 μ m。

实验用分别采用了甲醇:水(65:35)^[13]、甲醇:水(45:55)、甲醇:水(70:30)^[14]三种流动相,采用甲醇:水(65:35)流动相,色谱图峰宽较大影响拖尾因子,使其达不到药典标准;甲醇:水(45:55)流动相,色谱图未出峰;采用甲醇:水(70:30)流动相,操作简单,检验时间短,分离度满足需求,杂峰及溶剂峰少,故选择甲醇:水(70:30)流动相。

实验中对柱温和检测器温度条件进行了考察,分别设置柱温40、35、30℃^[15],检测器温度40、35、30℃,结果表明当柱温为40℃、检测器温度40℃时色谱峰的分离度最大。

3.3 结论

通过HPLC方法成功摸索出 α -香附酮的提取方式和含量的测定方法,具有操作简单快捷、灵敏度高、重复性好、准确可靠、

所用试剂种类少、分离效果好等特点,可用于香附 α -香附酮的测定,并有效控制质量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2020年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2020,270.
- [2] 许娜,牟玉贞,李文兵,等. 基于HPLC法和多元统计分析的不同产地香附挥发油中4种成分含量的比较研究[J]. 中国药房,2020,31(23):2833-2840.
- [3] 徐秀梅,刘文建. 香附药理作用及临床应用的进展[J]. 广东化工,2023,50(09):122-123,69.
- [4] 楼英. 香附的一药多用[J]. 浙江中西医结合杂志,2006,16(03):188-189.
- [5] 杨佃志,王育虎,王凤玲,等. 不同产地香附中 α -香附酮含量测定[J]. 亚太传统医药,2013,9(03):17-19.
- [6] 王雪婷,王磊,宋德成,等. 不同产地香附中 α -香附酮含量测定[J]. 天津科技,2013,40(01):28-29.
- [7] 张晶,刘莉,徐慧荣,等. 香附化学成分及药理作用研究新进展[J]. 化学工程师,2021(03):55-57,7.
- [8] 罗淑文,邓远辉,黎雄,等. 香附化学成分的研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2014(02):142-144,149.
- [9] 董学文. 中学有机化合物水溶性的进阶学习[J]. 中学化学教学参考,2022,(06):19-20.
- [10] 李英霞,侯立静,刘青,等. 不同地区市售香附饮片中 α -香附酮含量测定[J]. 中国中医药信息杂志,2011,18(01):59-61.
- [11] 闵春艳,游本刚. 香附、苍术挥发油中 α -香附酮和苍术素含量的同时测定[J]. 中国药业,2013,22(12):89-91.
- [12] 张昕莹,王庆伟,张文娟,等. 川芎-香附不同配比提取物中主要成分含量变化研究[J]. 中国医药导报,2013,10(19):121-123.
- [13] 宋莹,崔业波,张大勇,等. 高效液相色谱法测定追风透骨丸中 α -香附酮和香附烯酮的含量[J]. 中国药物经济学,2023,18(12):108-111.
- [14] 许娜,牟玉贞,李文兵,等. 基于HPLC法和多元统计分析的不同产地香附挥发油中4种成分含量的比较研究[J]. 中国药房,2020,31(23):2833-2840.
- [15] 孙楠. HPLC法测定香附丸中 α -香附酮含量[J]. 亚太传统医药,2017,13(01):24-25.

作者简介



何桂英,副主任中药师,研究方向为中药材鉴定、中成药生产管理、中成药质量管理、药物警戒等。