

# 高效液相色谱法同时检测石菖蒲中 $\beta$ -细辛醚、 $\alpha$ -细辛醚的含量

柳梦婷, 方婧, 吴宏伟\*, 付梅红, 杨洪军  
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:建立石菖蒲药材中 $\beta$ -细辛醚、 $\alpha$ -细辛醚的HPLC含量测定方法,并对石菖蒲药材进行质量评价。方法:采用岛津高效液相色谱仪,对样品的前处理方法、色谱柱、检测波长、流动相等分析条件进行了优化筛选,并对分析方法的线性范围、精密度、重复性、稳定性、准确度进行考察,建立同时检测 $\beta$ -细辛醚、 $\alpha$ -细辛醚的石菖蒲药材质量控制方法。结果:采用Kromasil C<sub>18</sub>色谱柱,柱温35℃,流动相甲醇-水(含0.1%甲酸)(70:30)等度洗脱,检测波长257 nm。回归方程 $\beta$ -细辛醚为 $Y = 2 \times 10^6 X + 205.93$  ( $r = 0.9999$ ,  $0.02696 \sim 0.5392 \mu\text{g}$ ),  $\alpha$ -细辛醚 $Y = 6 \times 10^6 X - 117.6$  ( $r = 0.9999$ ,  $0.01604 \sim 0.3208 \mu\text{g}$ );方法精密度 $\beta$ -细辛醚RSD 0.119%, $\alpha$ -细辛醚RSD 0.116%;重复性试验 $\beta$ -细辛醚RSD 0.877%, $\alpha$ -细辛醚RSD 0.815%;稳定性试验室温下20 h内样品中 $\beta$ -细辛醚RSD 0.42%, $\alpha$ -细辛醚RSD 0.25%;准确度 $\beta$ -细辛醚平均回收率为97.7% (RSD 1.9%), $\alpha$ -细辛醚平均回收率为102.3% (RSD 1.5%)。所收集的石菖蒲样品中 $\beta$ -细辛醚含量1.12%~3.51%, $\alpha$ -细辛醚含量0.03%~1.01%。结论:该方法快速、准确、重复性好,可用于石菖蒲药材的质量评价。

**[关键词]** 石菖蒲;  $\beta$ -细辛醚;  $\alpha$ -细辛醚; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0075-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2014190075

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140819.0919.005.html>

**[网络出版时间]** 2014-08-19 9:19

**[收稿日期]** 20131209(012)

**[基金项目]** 北京市中药学重点学科资助

**[通讯作者]** \*吴宏伟,博士,助理研究员,从事中药学研究, Tel:010-64014411-2948, E-mail:whw9905012@163.com

## [参考文献]

- [1] 刘兰生,宋阳,扬锡,等.高效液相色谱法测定奇正止痛贴膏中木犀草素的含量[J].中国药事,2006(7):418.
- [2] 何希瑞,李茂星,樊鹏程,等.HPLC法测定独一味制剂中山梔苷甲酯[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(7):50.
- [3] 邱建国,张泉龙,尉丽力,等.止血镇痛散的制备及其质量标准[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(21):15.
- [4] 金兰,罗桂花.HPLC测定青海野生和栽培藏药独一味中山梔苷甲酯[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(14):71.
- [5] 朱斌,龚念,彭崇胜,等.独一味镇痛作用及其有效成分研究[J].中国药理学与毒理学杂志,2012,26

(3):442.

- [6] 吴诚,许惠琴.镰形棘豆中2',4'-二羟基查尔酮抗炎止血作用的实验研究[J].药学实践杂志,2010,28(6):431.
- [7] Li M, Shang X, Zhang R, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of iridoid glycosides extract of *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo [J]. Fitoterapia, 2010, 81(3):167.
- [8] 苑伟,宋玉成,梁资富.不同产地藏药独一味的镇痛、抗炎作用比较[J].中国药房,2003(12):12.
- [9] 廖立东,唐灿,卢胜明,等.HPLC梯度洗脱法测定山梔苷甲酯、8-O-乙酰山梔苷甲酯在独一味中含量[J].现代中药研究与实践,2011,25(5):70.
- [10] 杨凤梅.青鹏膏剂中多组药效成分的含量测定[J].中华中医药杂志,2011,26(7):1633.

[责任编辑 顾雪竹]

## Simultaneous Determination Content of $\beta$ -asarone and $\alpha$ -asarone in *Acorus tatarinowii* by HPLC

LIU Meng-ting, FANG Jing, WU Hong-wei\*, FU Mei-hong, YANG Hong-jun

(Institute of Chinese Materia Medica China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** A method of high-performance liquid chromatography was developed to evaluate the quality of a traditional Chinese medicine *Acorus tatarinowii* through analyzing the content of  $\beta$ -asarone and  $\alpha$ -asarone. **Method:** The conditions of sample preparation, chromatography column, detected wavelength and mobile phase were optimized. The linear ranges, precision, reproducibility, stability and accuracy of the method were evaluated based on a Shimadzu HPLC system. And six batches of *A. tatarinowii* were detected. **Result:** The determination was performed on a Kromasil C18 column at 257 nm wavelength. The mobile phase was isocratic elution of methanol-water (0.1% formic acid) (70:30). The flow rate was set at 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, and column temperature was at 35 °C. The regression equation of  $\beta$ -asarone was  $Y = 2 \times 10^6 X + 205.93$  ( $r = 0.9999$ , 0.02696-539.2  $\mu\text{g}$ ), and that of  $\alpha$ -asarone was  $Y = 6 \times 10^6 X - 117.6$  ( $r = 0.9999$ , 0.01604-0.3208  $\mu\text{g}$ ); the RSDs of precision were 0.119% ( $\beta$ -asarone) and 0.116% ( $\alpha$ -asarone); the RSDs of repeatability were 0.877% ( $\beta$ -asarone) and 0.815% ( $\alpha$ -asarone); the RSDs of stability test within 20 hours at room temperature were 0.42% ( $\beta$ -asarone) and 0.25% ( $\alpha$ -asarone); the average recovery of  $\beta$ -asarone was 97.7% (RSD 1.9%), for  $\alpha$ -asarone it was 102.3% (RSD 1.5%). The content of  $\beta$ -asarone and  $\alpha$ -asarone in *A. tatarinowii* samples were in the range of 1.12%-3.51% and 0.03%-1.01%, respectively. **Conclusion:** This method is convenient, accurate and reliable, which can be applied to be a quality evaluation method for *A. tatarinowii*.

**[Key words]** *Acorus tatarinowii*;  $\beta$ -asarone;  $\alpha$ -asarone; HPLC

石菖蒲具有开窍豁痰、醒神益智、化湿开胃功效,临床用于神昏癫痫、健忘失眠、耳鸣耳聋、脘痞不饥、噤口下痢<sup>[1]</sup>。现代研究表明菖蒲(包括石菖蒲、水菖蒲)主要化学成分为挥发油类成分、黄酮、生物碱、氨基酸及糖类,其中研究最多的为挥发性成分<sup>[2]</sup>。石菖蒲挥发性油主要由苯丙素类、倍半萜类、单萜类构成,其中 $\beta$ -细辛醚、 $\alpha$ -细辛醚为挥发油的主要成分,且在镇静、抗惊厥、抗衰老、抗心率失常等方面均有相关活性报道<sup>[3-4]</sup>。因此石菖蒲的质量控制多集中在挥发油类成分的质控。

2010年版《中国药典》对石菖蒲的质量控制是测定其总挥发油的含量(不低于0.1%, mL·g<sup>-1</sup>),目前对石菖蒲的质量控制方法还有薄层色谱法<sup>[5]</sup>、紫外光谱法<sup>[6]</sup>、气相色谱法<sup>[7-8]</sup>、液相色谱法<sup>[9-10]</sup>等,其中薄层色谱、紫外检测主要是对石菖蒲的定性鉴别分析,气相色谱法主要针对石菖蒲挥发油的定性分析及其组成成分的定量分析,液相色谱主要针对药材中 $\alpha$ (或 $\beta$ )-细辛醚的定量分析。

本研究采用液相色谱法,建立同时检测石菖蒲

中 $\alpha$ -细辛醚、 $\beta$ -细辛醚含量的方法,实验中对样品提取方法、色谱条件进行了优化,可用于石菖蒲的质量控制。

### 1 仪器与试剂

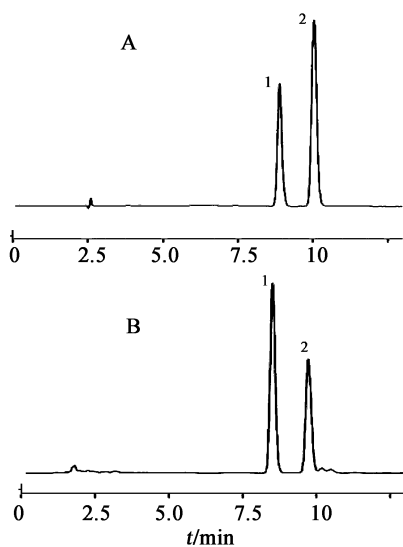
20A型高效液相色谱仪(包括LC-20AT泵, SIL-20A自动进样器, CTO-20A柱温箱, SPD-M20A二极管阵列检测器, DGU-20A在线脱气, SHIMADZU色谱工作站, 日本岛津), KQ5200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。 $\alpha$ -细辛醚对照品(Flukar analytital,  $\geq 97.0\%$ , CAS 2883-98-9),  $\beta$ -细辛醚对照品(Dr. Ehrenstorfer GmbH 90.0%, CAS 5273-86-9)。12批石菖蒲药材经付梅红研究员鉴定为天南星科石菖蒲(*Acorus tatarinowii* Schott.), 甲醇为色谱纯, 蒸馏水, 冰乙酸为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 供试品的制备** 精密称取石菖蒲粉末(过4号筛)约0.1g置于锥形瓶中, 精密加入甲醇25mL, 精确称重, 超声45min, 补重, 过0.45 $\mu\text{m}$ 滤膜进样测定。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取 $\alpha$ -细辛醚对照品 4.01 mg, $\beta$ -细辛醚对照品 6.74 mg,置于 250 mL 量瓶中,加甲醇定容,制成含 $\alpha$ -细辛醚 $0.1604\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , $\beta$ -细辛醚 $0.02696\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

**2.3 色谱条件** Kromasil  $\text{C}_{18}$  色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm,5  $\mu\text{m}$ ),流动相甲醇-水(含 0.1% 甲酸)(70:30)等度洗脱,检测波长 257 nm,柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ 。对照品及供试品的色谱见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;1.  $\beta$ -细辛醚,2.  $\alpha$ -细辛醚

图 1 石菖蒲 HPLC

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 线性关系及检测限考察** 取混合对照品溶液,进样量为 1,2,4,8,10,16,20  $\mu\text{L}$ ,依次注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积,以进样量 $\mu\text{g}(X)$ 和峰面积( $Y$ )进行回归,得回归方程。结果表明 $\beta$ -细辛醚 $Y = 2 \times 10^6 X + 205.9 (r = 0.9999)$ 在 $0.02696 \sim 0.5392\ \mu\text{g}$ , $\alpha$ -细辛醚 $Y = 6 \times 10^6 X - 117.6 (r = 0.9999)$ 在 $0.01604 \sim 0.3208\ \mu\text{g}$ ,进样量( $\mu\text{g}$ )与峰面积线性关系良好。将混合对照品溶液依次稀释至不同浓度,按上述色谱条件分别注入高效液相色谱仪测定,进样量为 10  $\mu\text{L}$ ,确定检测限(信噪比 3:1)和定量限(信噪比 10:1), $\beta$ -细辛醚检出限为 0.27 ng,定量限为 0.89 ng; $\alpha$ -细辛醚检出限为 0.16 ng,定量限为 0.53 ng。

**2.4.2 精密度试验** 取混合对照品溶液重复进样 6 次,每次 10  $\mu\text{L}$ , $\beta$ -细辛醚峰面积 RSD 0.119%; $\alpha$ -细辛醚峰面积 RSD 0.116%。结果表明,仪器精密度良好,符合定量分析要求。

**2.4.3 稳定性试验** 取同一份供试品溶液分别在

制备后 0,3,6,8,20 h 进样,每次 10  $\mu\text{L}$ , $\beta$ -细辛醚峰面积 RSD 0.42%; $\alpha$ -细辛醚峰面积 RSD 0.25%。结果表明,样品溶液在 20 h 内稳定。

**2.4.4 重复性试验** 精密称取 0.2 g 样品,平行 6 份,按上述方法制成供试品溶液进样测定。计算得 $\beta$ -细辛醚质量分数平均值为 2.31%,RSD 0.877%; $\alpha$ -细辛醚质量分数平均值为 0.519%,RSD 0.815%。结果表明,本方法重复性良好。

**2.4.5 加样回收试验** 精密称定已知含量的石菖蒲供试品粉末约 40 mg,根据其中 $\alpha$ -细辛醚和 $\beta$ -细辛醚含量,按 1:1 加入适量 $\alpha$ -细辛醚和 $\beta$ -细辛醚对照品,按照 2.1 项下方法制备供试品溶液,平行 6 份,进样测定,计算加样回收率。结果见表 1,2。

表 1  $\beta$ -细辛醚加样回收率试验

称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.044 5	1.028	1.979	100.8		
0.043 6	1.007	1.912	95.9		
0.043 4	1.003	1.935	98.8	97.7	1.9
0.040 7	0.940	1.850	96.4		
0.040 9	0.945	1.867	97.7		
0.041 2	0.952	1.863	96.6		

注:加入量均为 0.943 6 mg。

**2.5 样品测定及聚类分析** 分别取 12 批不同来源石菖蒲按供试品溶认制备方法制备,按上述色谱条件进样测定。结果见表 3。从结果可以看到,所收集到的样品中 $\beta$ -细辛醚为 3.51%~1.12%, $\alpha$ -细辛醚在 1.01%~0.03%。以 $\beta$ -细辛醚, $\alpha$ -细辛醚及二者的总含量为统计变量进行层次聚类分析,分析结果如图 2 所示。

## 3 讨论

本实验过程中,发现 $\beta$ -细辛醚、 $\alpha$ -细辛醚混合对照品溶液并不稳定,在 $-4\ ^{\circ}\text{C}$ 冰箱长期放置后,其相对含量发生改变,根据峰面积计算, $\beta$ -细辛醚相对减少、 $\alpha$ -细辛醚相对升高,且在本实验的色谱条件下,没有看到明显的新色谱峰, $\beta$ -细辛醚、 $\alpha$ -细辛醚互为顺反异构体, $\beta$ -细辛醚为顺式结构, $\alpha$ -细辛醚为反式结构,二者之间转化条件及动力学有待进一步研究。而且有文献报道 $\alpha$ -细辛醚对酸、光、氧化均不稳定<sup>[11]</sup>,因此在测定 $\beta$ -细辛醚、 $\alpha$ -细辛醚含量时,对照品溶液应即用即配。另外有报道发现药材也存在类似现象<sup>[12]</sup>,石菖蒲存放过程 $\beta$ -细辛醚有部分转化成 $\alpha$ -细辛醚,因此为了控制药材质量,应对存储条件加

表 2  $\alpha$ -细辛醚加样回收率试验

称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.044 5	0.231	0.556	104.5	102.3	1.5
0.043 6	0.227	0.539	100.5		
0.043 4	0.226	0.548	103.5		
0.040 7	0.212	0.526	100.9		
0.040 9	0.213	0.532	102.7		
0.041 2	0.214	0.531	101.7		

注:加入量均为 0.311 mg。

表 3 12 批不同来源石菖蒲  $\beta$ -细辛醚,  $\alpha$ -细辛醚含量 ( $n=6$ ) %

No.	来源(产地)	$\beta$ -细辛醚	$\alpha$ -细辛醚	合计
C_1	北京仟草订购(湖南)	2.14	0.71	2.85
C_2	北京白塔寺药店(湖北)	2.69	0.27	2.96
C_3	北京同仁堂药店(四川)	2.17	0.16	2.33
C_4	北京同芝堂药店(湖北荆门)	2.89	0.18	3.07
C_5	北京永安堂药店(湖北)	2.52	0.25	2.77
C_6	北京新概念大药房(湖南)	1.81	0.03	1.84
C_7	河北安国药材市场(安徽)	3.54	1.01	4.55
C_8	河北安国药材市场(四川)	2.89	0.17	3.06
C_9	河北安国药材市场(湖北)	2.47	0.19	2.66
C_10	河北安国药材市场(河南)	1.12	0.05	1.17
C_11	北京同仁堂药店(湖南)	2.01	0.12	2.13
C_12	北京西苑医院药房(安徽)	3.51	0.76	4.27

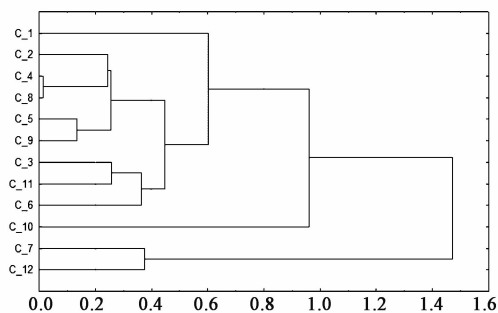


图 2 石菖蒲样品质量聚类分析

以规范。

样品提取方法采用单因素考察法,以  $\alpha$ -细辛醚,  $\beta$ -细辛醚的含量为检测指标,对提取溶剂(甲醇、乙酸乙酯、石油醚)、提取方法(回流、超声、冷浸)提取时间(0.5, 1, 2 h)进行了考察,经比较确定样品最终处理方法为取石菖蒲粉末 0.1 g,加入 25 mL 甲

醇,超声 45 min。

实验中针对流动相进行了考察,相关文献<sup>[9-10]</sup>主要采用离子对试剂(磷酸二氢钾、十二烷基磺酸钠)调节  $\alpha$ -细辛醚,  $\beta$ -细辛醚的峰形及二者的分离效果,由于离子对试剂影响色谱柱使用寿命且配制相对繁琐,本实验经调整,采用甲醇-水(含 0.1% 甲酸)(70:30),获得理想分离效果,并提高柱温,使分析时间在常规高效液相色谱仪上减少为 15 min。

从测定结果可以看到所收集的石菖蒲药材质量较为稳定,其中安徽产石菖蒲  $\beta$ -细辛醚,  $\alpha$ -细辛醚含量略高,聚类分析也可以看到安徽产的 2 个样品(C\_7, C\_12)聚为一类,河南产石菖蒲样品(C\_10)含量略低,独自聚为一类,其余四川、湖南、湖北产石菖蒲样品质量接近,聚为一类。

### 【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:85.
- [2] 杨晓燕,陈发奎. 石菖蒲的化学成分研究概况[J]. 沈阳药科大学学报, 1999, 16(1):71.
- [3] 王争,王曙东,侯中华. 石菖蒲成分及药理作用的研究概况[J]. 中国药业, 2012, 21(11):1.
- [4] 吴启端,吴清和. 石菖蒲的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(6):477.
- [5] 黎奕明,眭道顺. 石菖蒲的薄层鉴别及  $\beta$ -细辛醚的含量测定[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(4):369.
- [6] 郭家林,郭建平,余明志,等. 菖蒲及其混淆品的紫外光谱鉴别[J]. 基层中药杂志, 2000, 14(2):22.
- [7] 刘春海,刘西京,杨华生. 石菖蒲挥发油的 GC-MS 分析[J]. 中医药学刊, 2006, 24(7):1280.
- [8] 魏立平,吴玖涵. 用气相色谱法同时测定石菖蒲挥发油中  $\alpha$ -细辛醚和  $\beta$ -细辛醚的含量[J]. 解放军药学报, 2005, 21(1):62.
- [9] 柯雪红,方永奇. RP-HPLC 测定石菖蒲、水菖蒲药材中  $\beta$ -细辛醚、 $\alpha$ -细辛醚的含量[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(3):279.
- [10] 柯雪红,魏刚,方永奇,等. HPLC 测定石菖蒲药材中  $\beta$ -细辛醚、 $\alpha$ -细辛醚的含量[J]. 中成药, 2002, 24(10):791.
- [11] 兰烨荣,刘素香,张铁军,等. 细辛醚的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2):252.
- [12] 郭玫,郭力,董晓萍. 石菖蒲中  $\alpha$ 、 $\beta$ -细辛醚含量的测定[J]. 成都中医药大学学报, 1999, 22(4):26.

【责任编辑 顾雪竹】