

# HPLC 同时测定川芎-天麻药对中 4 种指标性成分的含量

周赛妮<sup>1</sup>, 刘明平<sup>1\*</sup>, 文艺<sup>2</sup>, 严萍<sup>3</sup>, 毛禹康<sup>1</sup>, 黄志云<sup>1</sup>

(1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学 第一附属医院, 广州 510405;  
3. 广州中医药大学 中药资源研究与工程中心, 中药资源科学教育部重点实验室, 广州 510006)

**[摘要]** 目的:建立川芎-天麻药对中天麻素、天麻苷元、阿魏酸和藁本内酯 4 种成分的含量测定方法。方法:采用 Inertsil ODS-3 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.05% 磷酸水梯度洗脱, 检测波长 220 nm(天麻素、天麻苷元), 320 nm(阿魏酸、藁本内酯), 柱温 25 ℃, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。结果:4 种效应成分分离度良好, 标准曲线在检测范围内线性关系良好, 天麻素、天麻苷元、阿魏酸和藁本内酯的平均回收率分别为 104.0%, 103.4%, 100.6%, 101.8%, RSD 分别为 0.4%, 0.5%, 4.5%, 2.6%。结论:该方法简便、精密度高、重复性好, 可用于川芎-天麻药对中 4 种效应成分的含量测定。

**[关键词]** 天麻素; 天麻苷元; 阿魏酸; 藁本内酯; 川芎-天麻药对

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0053-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030053

## Simultaneous Determination of Four Index Components in Extracts of *Ligusticum chuanxiong*-*Gastrodia elata* by HPLC

ZHOU Sai-ni<sup>1</sup>, LIU Ming-ping<sup>1\*</sup>, WEN Yi<sup>2</sup>, YAN Ping<sup>3</sup>, MAO Yu-kang<sup>1</sup>, HUANG Zhi-yun<sup>1</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. First Affiliated Hospital of TCM, Guangzhou 510405, China;  
3. Ministry of Education Key Laboratory for Chinese Herbal Resource Science, Research Centre of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for the content determination of gastrodin, 4-hydroxybenzyi alcohol, ferulic acid and ligustilide in extracts of *Ligusticum chuanxiong*-*Gastrodia elata*. **Method:** The determination was performed on Inertsil ODS-3 chromatographic column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with mobile phase of methanol-0.05% phosphoric acid for gradient elute, at the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was set at 220 nm (gastrodin, 4-hydroxybenzyi alcohol), 320 nm (ferulic acid, ligustilide) and column temperature was 25 ℃. **Result:** The four compounds were well separated and showed good linearity within the concentration ranges tested. Their average recovery rate was 104.0%, 103.4%, 100.6% and 101.8% for gastrodin, 4-hydroxybenzyi alcohol, ferulic acid and ligustilide; and RSD of the above four components was 0.4%, 0.5%, 4.5% and 2.6%, respectively. **Conclusion:** This method is simple, precise and repeatable, and it can be used to determine the four active components in *Ligusticum chuanxiong*-*Gastrodia elata*.

**[Key words]** gastrodin; 4-hydroxybenzyi alcohol; ferulic acid; ligustilide; *Ligusticum chuanxiong*-*Gastrodia elata*

川芎<sup>[1]</sup>主含挥发油、酚酸类、生物碱等成分,以 藁本内酯、阿魏酸、川芎嗪<sup>[2-4]</sup>等成分研究较多;天

**[收稿日期]** 20150129(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81274107)

**[第一作者]** 周赛妮, 硕士, 从事中药药理与中药养生保健研究, Tel:18826414562, E-mail:zhousainilq@163.com

**[通讯作者]** \*刘明平, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药药性配伍与免疫药理研究, Tel:020-39358089, E-mail:liumingpingfly@163.com

麻<sup>[1]</sup>含天麻素、天麻苷元等酚类化合物成分<sup>[5-6]</sup>。川芎配天麻是古今治疗头痛眩晕最常用药对,大川芎丸《赤水玄珠》、天麻丸《本草纲目》。随着二者配伍剂量变化(1:4,4:1)分别用于不同证型(肝阳上亢、血瘀型)偏头痛。课题组前期分别采用硝酸甘油、电刺激三叉神经节致大鼠偏头痛模型,对川芎-天麻不同比例配伍对肝阳上亢、血瘀证药效学差异进行了系统的研究<sup>[7-8]</sup>;然而川芎-天麻药效物质基础尚不明确,因此课题组采用不同流动相等度洗脱对川芎-天麻不同配比中指标成分进行含量测定<sup>[9]</sup>。文献报道 HPLC 同步测定天麻素、阿魏酸和 6,7-二羟基藁本内酯<sup>[10-11]</sup>。本实验采用梯度洗脱,进一步优化实验条件旨在建立 HPLC 同时测定川芎-天麻药对中天麻素、天麻苷元、阿魏酸和藁本内酯的含量。

### 1 材料

e2695 型高效液相色谱仪 (Empower 2 工作站, e2998 紫外检测器,美国 Waters)。天麻素(批号 110807-201306)和阿魏酸(批号 110773-201313)对照品均购自中国食品药品检定研究院,天麻苷元(批号 BCBB9069V)对照品购自 Sigma 公司,藁本内酯(批号 G-010-130628)对照品购自成都瑞芬思生物科技有限公司,甲醇为色谱纯,磷酸为分析纯, Synergy 超纯水系统 (Merck-millipore), XR 205SM-DR 型分析天平(瑞士 Precisa)。

川芎(批号 131002671)和天麻(批号 130603771)药材均购于康美药业股份有限公司,经南方医科大学中药鉴定教研室刘传明副教授鉴定川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* 的干燥根茎,天麻为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* 的干燥块茎。

### 2 方法与结果

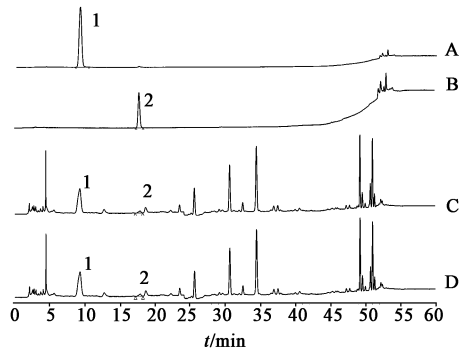
**2.1 色谱条件** Inertsil ODS-3 色谱柱(4.6 mm × 250 nm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.05% 磷酸水(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 10% A; 10 ~ 40 min, 10% ~ 55% A; 40 ~ 50 min, 55% ~ 100% A; 50 ~ 60 min, 100% A; 60 ~ 61 min, 100% ~ 10% A; 61 ~ 70 min, 10% A);检测波长 220 nm(天麻素、天麻苷元), 320 nm(阿魏酸、藁本内酯);流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 25 °C,进样量 10 μL。

**2.2 对照品溶液制备** 精密称取天麻素对照品 5.00 mg,加甲醇制成 2.00 g·L<sup>-1</sup>的天麻素对照品贮备液;精密称取天麻苷元对照品 2.60 mg,加甲醇制成 0.104 g·L<sup>-1</sup>的天麻苷元对照品贮备液;精密称取阿魏酸对照品 2.60 mg,加甲醇制成 0.104 g·L<sup>-1</sup>

的阿魏酸对照品贮备液;精密量取藁本内酯 10.00 mg,加甲醇制成 1.00 g·L<sup>-1</sup>的藁本内酯对照品贮备液。

**2.3 供试品溶液制备** 精密称取川芎粗粉 5 g,天麻粗粉 5 g,加 10 倍量 70% 乙醇,加热回流提取 2 次,每次 1.5 h,合并提取液,浓缩至约 100 mL,放冷,摇匀,过滤,滤液定容于 100 mL 的量瓶,0.45 μm 滤膜过滤,取续滤液,即得川芎-天麻 1:1 供试品溶液。依此方法分别制备缺天麻、缺川芎的阴性样品溶液。

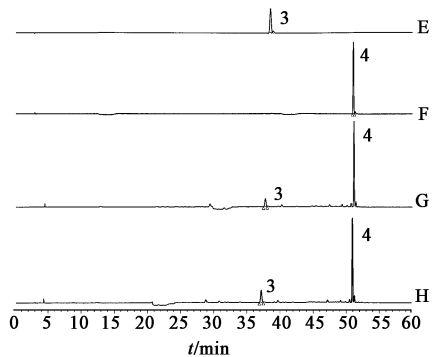
**2.4 系统适用性试验** 取混合对照品溶液,单味药的供试品溶液及川芎-天麻药对合煎剂的供试品溶液,按上述色谱条件分别进样测定。结果显示,天麻素、天麻苷元、阿魏酸和藁本内酯具有良好的分离度;供试品中 4 种成分色谱峰的保留时间与对照品色谱峰的保留时间相符合;220 nm 波长时川芎单煎剂在天麻素和天麻苷元相同的保留时间未显示色谱峰,320 nm 波长时天麻单煎剂在阿魏酸和藁本内酯相同的保留时间未显示色谱峰。见图 1, 2。



A, B. 对照品; C. 缺川芎阴性样品; D. 川芎-天麻(1:1)样品; 1. 天麻素; 2. 天麻苷元

图 1 川芎-天麻药对样品 HPLC (220 nm)

Fig. 1 HPLC chromatograms for quantitative analysis (220 nm)



E, F. 对照品; G. 缺天麻阴性样品; H. 川芎-天麻(1:1)样品; 3. 阿魏酸; 4. 藁本内酯

图 2 川芎-天麻药对样品 HPLC (320 nm)

Fig. 2 HPLC chromatograms for quantitative analysis (320 nm)

## 2.5 方法学考察

**2.5.1 线性关系的考察** 分别精密吸取天麻素、天麻苷元、阿魏酸、藁本内酯贮备溶液适量配制成系列质量浓度的对照品溶液,天麻素 1.600, 1.200, 0.800, 0.600, 0.400, 0.200, 0.160  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 天麻苷元 0.062, 0.042, 0.031, 0.021, 0.010, 0.008, 0.006  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 阿魏酸 0.083, 0.062, 0.041, 0.031, 0.021, 0.011, 0.006, 0.004  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 藁本内酯 1.000, 0.800, 0.400, 0.200, 0.100, 0.080, 0.040, 0.010  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以进样量( $X$ )为横坐标,峰面积( $Y$ )为纵坐标制作标准曲线,结果表明天麻素、天麻苷元、阿魏酸、藁本内酯在范围内线性关系良好。见表 1。

表 1 4 个对照品的线性关系和范围

Table 1 Regression equations and linear ranges of four reference substances

对照品	回归方程	$r$	线性范围 $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
天麻素	$Y = 17\ 385\ 912.56X + 379\ 628.49$	0.999 3	0.160 ~ 1.600
天麻苷元	$Y = 31\ 196\ 250.32X - 3\ 476.44$	0.999 6	0.006 ~ 0.062
阿魏酸	$Y = 23\ 053\ 627.07X - 15\ 647.70$	0.997 6	0.004 ~ 0.083
藁本内酯	$Y = 14\ 620\ 721.60X + 10\ 933.02$	0.997 0	0.010 ~ 1.000

**2.5.2 精密度试验** 分别精密吸取天麻素、天麻苷元、阿魏酸、藁本内酯对照品贮备液适量制成混合对照品溶液,在上述色谱条件下连续进样 6 次,记录 4 个成分的色谱峰面积,结果天麻素、天麻苷元、阿魏酸、藁本内酯峰面积的 RSD 分别为 0.6%, 1.6%, 1.9%, 3.0%, 表明仪器精密度良好。

**2.5.3 稳定性试验** 精密吸取川芎-天麻的供试品溶液,在上述色谱条件下于 0, 2, 4, 8, 12, 16 h 进样,记录 4 个成分的色谱峰面积,结果天麻素、天麻苷元、阿魏酸、藁本内酯峰面积 RSD 分别为 0.6%, 1.6%, 0.3%, 1.9%, 表明供试品溶液在 16 h 内稳定性良好。

**2.5.4 重复性试验** 精密吸取川芎-天麻的供试品溶液,共 6 份,在上述色谱条件下进样,分别记录 4 个成分的色谱峰面积,并计算含量。测得天麻素、天麻苷元、阿魏酸和藁本内酯平均质量分数分别为 0.285, 0.012, 0.046, 0.515  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 结果天麻素、天麻苷元、阿魏酸、藁本内酯峰含量的 RSD 分别为 0.8%, 1.7%, 1.6%, 1.0%, 结果表明本方法重复性较好。

**2.5.5 加样回收率试验** 取已知质量分数的川芎-天麻药对供试品溶液,加入等量的天麻素、天麻苷

元、阿魏酸和藁本内酯 4 个成分,平行制备 6 份,按上述色谱评价进样,计算加样回收率,结果见表 2。

表 2 4 个成分的加样回收率试验 ( $n = 6$ )

Table 2 Recoveries of four constituents ( $n = 6$ )

分析物	加入量 $/\text{mg}$	样品中量 $/\text{mg}$	测得量 $/\text{mg}$	回收率 $/\%$	平均值 $/\%$	RSD $/\%$
天麻素	1.410	1.420	2.887	104.0	104.0	0.4
	1.410	1.419	2.889	104.2		
	1.410	1.420	2.879	103.5		
	1.410	1.420	2.883	103.7		
	1.410	1.418	2.892	104.5		
	1.410	1.421	2.885	103.8		
天麻苷元	0.057	0.603	0.120	104.5	103.4	0.5
	0.057	0.600	0.119	103.3		
	0.057	0.601	0.119	103.2		
	0.057	0.600	0.119	103.3		
	0.057	0.602	0.119	103.0		
	0.057	0.601	0.119	103.2		
阿魏酸	0.248	0.231	0.490	104.8	100.6	4.5
	0.248	0.230	0.487	103.9		
	0.248	0.228	0.461	93.4		
	0.248	0.230	0.488	104.4		
	0.248	0.231	0.475	98.3		
	0.248	0.230	0.475	98.7		
藁本内酯	1.55	1.567	3.062	96.5	101.8	2.6
	1.55	1.569	3.156	102.4		
	1.55	1.568	3.165	103.0		
	1.55	1.568	3.166	103.1		
	1.55	1.567	3.155	102.4		
	1.55	1.569	3.171	103.3		

**2.5.6 样品含量测定** 按照供试品溶液制备方法连续制得 3 批川芎-天麻药对提取物,依法处理,测定 4 种成分的峰面积,计算药对中各成分的质量分数,结果见表 3。

表 3 川芎-天麻药对中 4 个成分的含量测定 ( $n = 3$ )

Table 3 Contents of four constituents in samples ( $n = 3$ )  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

批号	天麻素	天麻苷元	阿魏酸	藁本内酯
1	4.041	0.261	0.852	8.816
2	4.034	0.260	0.852	8.706
3	4.015	0.259	0.853	8.672

## 3 结果与讨论

本研究建立了川芎-天麻药对提取物中 4 种主

要成分的 HPLC 含量测定方法,实现了天麻素、天麻苷元、阿魏酸和藁本内酯的同时测定,本法简便,准确,重复性、稳定性好,且能满足 4 种成分同时定量的要求。

按照 2010 年版《中国药典》中单味药 HPLC 含量测定方法无法使川芎-天麻药对中的 4 种主要成分同时达到理想的分离。本文考察了乙腈-0.05% 磷酸水和甲醇-0.05% 磷酸水 2 种流动相洗脱,结果发现乙腈-0.05% 磷酸水洗脱时,出杂峰较多且多重。采用甲醇-0.05% 磷酸水梯度洗脱时天麻素、天麻苷元、阿魏酸和藁本内酯可与相邻峰达基线分离,且分离度较好,故最终确定甲醇-0.05% 磷酸水为流动相进行梯度洗脱。

建立 HPLC 方法对各成分的检测波长进行考察,2010 年版《中国药典》中 220 nm 为天麻素最大吸收波长,实验中发现天麻素在 220,270 nm 波长处有较大吸收,天麻素色谱峰在 220 nm 处灵敏度、峰面积都大于 270 nm,且天麻苷元在 220 nm 波长处有最大吸收,所以选择 220 nm 作为天麻素与天麻苷元的测定波长;2010 年版《中国药典》阿魏酸的最大吸收波长为 321 nm,另外有文献报道阿魏酸和藁本内酯在 320 nm 均有较大吸收<sup>[12]</sup>,本次实验中川芎-天麻药对提取液在 220 nm 波长时阿魏酸和藁本内酯出峰时间处有吸收峰出现,可能是阿魏酸和藁本内酯在 220 nm 处有少量吸收,但在 320 nm 波长时色谱峰的灵敏度、峰面积都大于 220 nm,因此选择 320 nm 为阿魏酸和藁本内酯的检测波长。

[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,2005:28.

- [2] 肖永庆,李丽,游小琳,等. 川芎化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2002,27(7):519-521.
- [3] 郭小藤,赵睁睁,容蓉,等. 两种方法测定川芎油中藁本内酯、洋川芎内酯 A 和正丁基苯酞的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):95-98.
- [4] 吕非非,胡昌江,吴珊珊,等. 不同等级川芎饮片中藁本内酯和阿魏酸含量对比[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(20):52-54.
- [5] 李西林,米健芳,马晓悦,等. HPLC 法对不同产地天麻药材的质量分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(8):96-97.
- [6] 任守利,刘塔斯,林丽美,等. HPLC 测定不同商品规格天麻中天麻苷与天麻苷元的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):55-57.
- [7] 刘霞,刘明平,毛禹康,等. 川芎-天麻不同配伍比例水提物组对大鼠肝阳上亢证偏头痛模型的影响[J]. 中国药理与临床,2014,30(6):93-96.
- [8] 刘霞. 川芎-天麻不同剂量配伍防治偏头痛的药效学差异研究[D]. 广州:广州中医药大学,2013.
- [9] 刘明平,毛禹康,韦品清,等. 川芎-天麻不同比例配伍药效成分含量变化研究[J]. 广东药学院学报,2015,31(1):54-57.
- [10] 张晖芬,陈晓辉,霍艳双,等. RP-HPLC 双波长切换法同时测定天舒胶囊中天麻素、阿魏酸和 6,7 二羟基藁本内酯的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2012,29(6):443.
- [11] 徐艳里,刘天富,王中彦,等. HPLC 测定注射用大川芎(冻干)中阿魏酸和天麻素的含量[J]. 中成药,2006,28(9):1281-1284.
- [12] 熊耀坤,梁爽,洪燕龙,等. 应用反相高效制备液相同时分离川芎中阿魏酸、洋川芎内酯 I 和 H[J]. 中国中药杂志,2013,38(12):1947-1949.

[责任编辑 顾雪竹]