

高效液相色谱法测定不同加工工艺 天麻中天麻素和天麻苷元含量

沈肖晶^{1,2}, 金传山^{1,2}, 许凤清^{1,2}, 李保明³, 胡 雨^{1,2}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽道地中药材品质提升协同创新中心, 安徽 合肥 230012; 3. 安徽协和成药业饮片有限公司, 安徽 亳州 236800)

[摘要]目的 建立高效液相色谱法同时测定天麻中天麻素及天麻苷元含量的方法, 优选不同产地的天麻加工工艺。方法 采用高效液相色谱法测定天麻素和天麻苷元含量, 色谱柱为 Spursil C₁₈-EP(250 mm×4.6 mm), 流动相为甲醇-0.1%磷酸水(5:95), 检测波长 220 nm, 柱温 40℃, 流速 1 mL/min。结果 隔水蒸 30 min、清水煮 15 min、0.2%矾水煮 15 min、煮后直接切片是 4 种较佳的加工工艺, 所制得的天麻饮片中天麻素和天麻苷元含量依次降低。结论 隔水蒸 30 min 所制得的天麻饮片中天麻素及天麻苷元含量最高, 优于其他处理方法。

[关键词]天麻; 天麻素; 天麻苷元; 加工工艺; 高效液相色谱法

[中图分类号]R284 **[文献标志码]**A **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2014.06.022

天麻为兰科植物天麻 *Gastradia elata* Bl. 的干燥块茎, 是我国传统的常用名贵中药材, 被历版《中华人民共和国药典》所收录, 亦为安徽的大宗药材之一。天麻有“治风之神药”之称, 具有平肝熄风止痉的作用, 主要用于头痛眩晕、小儿惊风、破伤风、肢体麻木、癫痫抽搐等症^[1]。目前, 天麻传统产地加工方法主要有隔水蒸法、水煮法与矾煮法等, 多依据药农经验进行加工, 其质量参差不齐。

天麻素(对羟基苯甲醇-β-D-吡喃葡萄糖苷)具有镇静催眠、镇痛、抗癫痫等作用^[2], 一直被公认为是天麻的有效成分和质量控制的主要指标成分。现代药理研究表明, 天麻中天麻素、天麻苷元(对羟基苯甲醇)等成分具有抗惊厥、镇痛、镇静、提高记忆力等生物活性^[3]。而早期研究多仅仅选择天麻素作为质量评价指标^[4-5], 鲜见同时测定天麻素及天麻苷元以比较天麻加工工艺的文献^[6]。故本实验采用高效液相色谱技术, 建立同时测定天麻中天麻素及天麻苷元的方法, 同时比较隔水蒸法、清水煮法、矾水煮法等不同参数条件下的加工方法对这两种成分的影响, 为天麻加工工艺研究提供基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Shimadzu LC-20AT 型高效液相色谱仪(含 LC-20AT 泵、SPD20M 检测器、天津东康 DT-230A 型柱温箱、LC-Solution 工作站); Spursil C₁₈-EP 色谱柱: 美国迪马公司; AT 系列溶剂过滤

器; AS3120 型超声清洗仪: 天津 Autoscience 公司; MS105/0.01 mg 电子天平: 上海梅特勒托利多公司; CP225D 型十万分之一电子天平: 德国 Sartorius 公司; 202-2 型电热恒温干燥箱: 上海实验仪器有限公司; LK-400B 型粉碎机: 浙江温岭创新药材器械厂; 2SHB-III 循环水式多用真空泵: 河南郑州长城工贸有限公司; HH-S2 系列恒温水浴锅: 江苏金坛环宇科学仪器厂。

1.2 试剂 天麻素标准品: 中国药品生物制品检定所, 批号 110807-200205; 天麻苷元对照品: 纯度 98%, Adamas 试剂公司; 甲醇: 色谱纯, 天津市四友精细化学品有限公司生产, 批号 401321; 磷酸: 分析纯, 天津市永大化学试剂有限公司生产, 批号 20100313; 纯净水: 杭州娃哈哈有限公司生产, 批号 121530; 天麻鲜品: 2013 年 12 月采于安徽省安庆市岳西县石关乡马畈村, 经安徽中医药大学药学院金传山教授鉴定为天麻 *G. elata* Bl. 的干燥块茎。

2 方法

2.1 色谱条件 采用 Spursil C₁₈-EP 色谱柱(250 mm×4.6 mm), 流动相为甲醇-0.1%磷酸水(5:95), 检测波长为 220 nm, 流速 1 mL/min, 柱温为 40℃, 进样量为 20 μL。该条件下天麻素与天麻苷元分离度良好, 见图 1、图 2。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取 80℃减压干燥 1 h 的天麻素对照品 9.95 mg、天麻苷元对照品 2.74 mg, 流动相定容至 25 mL 容量瓶, 混匀过 0.22 μm 滤膜, 取续滤液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取各样品粉末(24 目)1g, 溶于 70%甲醇, 定容至 25 mL 容量瓶, 超声

基金项目: 国家科技部国际合作项目(2011DF31950)

作者简介: 沈肖晶(1990-), 女, 硕士研究生

通信作者: 金传山, jcs4@sohu.com

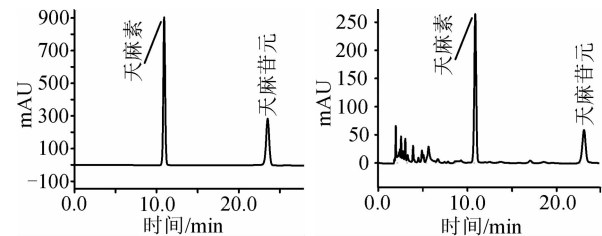


图1 天麻素及天麻苷元
高效液相色谱图

图2 天麻药材
高效液相色谱图

20 min,取出放冷后精密移取 10 mL,置洁净干燥蒸发皿中水浴浓缩至近干,残渣溶于流动相,定容至 10 mL 容量瓶,摇匀,过 0.45 μm 滤膜,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察 精密移取天麻素与天麻苷元混合对照品溶液,按“2.2”项下方法制备,分别取 0.05、0.2、0.5、1、2、3、5 mL 混合对照品溶液,流动相定容至 5 mL 容量瓶中,按照“2.1”项下色谱条件进行测定。以对照品浓度(*x*)为横坐标,峰面积(*y*)为纵坐标,得天麻素线性方程为 $y=3.6\times10^7x+122\,715$, $r=0.999\,8$,线性范围为 0.020 0~1.990 0 mg;天麻苷元线性方程为 $y=7.1\times10^7x-70\,748$, $r=0.999\,3$,线性范围为 0.005 5~0.548 0 mg。在此范围内天麻素及天麻苷元线性关系良好。

2.5 精密度试验 取天麻素和天麻苷元混合对照溶液,按“2.1”项下操作,连续重复进样 5 次,测定天麻素、天麻苷元含量,天麻素和天麻苷元含量的 RSD 分别为 0.16%、0.33%,符合定量分析要求。

2.6 重复性试验 称取样品粉末,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进样,测定样品中天麻素和天麻苷元含量,天麻素和天麻苷元含量的 RSD 分别为 1.02%、1.19%,符合定量分析要求。

2.7 稳定性试验 称取样品粉末,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样,测定样品中天麻素和天麻苷元含量,天麻素和天麻苷元含量的 RSD 分别为 0.88%、0.92%,说明供试品在 24 h 内质量稳定。

2.8 加样回收试验 精密称取已知含量的样品粉末 6 份,每份 0.5 g,加入适量的天麻素和天麻苷元对照品溶液,按“2.3”项下方法制备,测定天麻素和天麻苷元含量。天麻素和天麻苷元平均回收率分别为 100.98%、104.28%,RSD 分别为 1.62%、1.72%,说明该方法回收率良好。见表 1。

3 不同工艺加工的天麻中天麻素和天麻苷元含量测定

3.1 样品加工方法 将新鲜天麻样品洗净,大小分级,选取 100~150 g 天麻,分别进行如下加工。

3.1.1 隔水蒸法:取适量天麻置蒸笼上隔水蒸,圆气后开始计时,分别蒸 10、15、20、30 min,取出置烘箱中 50 ℃烘干。

表 1 天麻素、天麻苷元加样回收率							
成分	称样量/g	已知量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
天麻素	0.500 1	1.703 2	1.704	5.176 2	1.02	100.98	1.62
	0.500 2	1.703 7	1.704	5.167 4	1.02		
	0.500 0	1.702 8	1.704	5.182 1	1.02		
	0.500 1	1.703 3	1.704	5.032 6	0.98		
	0.500 0	1.702 8	1.704	5.150 9	1.01		
	0.500 0	1.703 0	1.704	5.146 9	1.01		
天麻苷元	0.500 1	0.437 0	0.435	1.350 7	1.05	104.28	1.72
	0.500 2	0.437 2	0.435	1.363 4	1.06		
	0.500 0	0.437 0	0.435	1.356 9	1.05		
	0.500 1	0.437 1	0.435	1.326 2	1.02		
	0.500 0	0.437 0	0.435	1.332 2	1.02		
	0.500 0	0.437 0	0.435	1.361 4	1.06		

3.1.2 清水煮法:取适量天麻置清水中,清水淹没天麻,保持微沸,分别煮制 10、15、20、25、30 min,捞出沥干表面水分,置烘箱中 50 ℃烘干。

3.1.3 矾水煮法:分别配制浓度为 0.2%、0.5%、1%、2%、4% 的白矾溶液,取适量天麻置白矾溶液中,溶液浸没天麻,保持微沸 15 min,捞出沥干表面水分,置烘箱中 50 ℃烘干。

3.1.4 直接切片:分别对天麻水煮 15 min 后切片、新鲜天麻切片后水煮 10 min、新鲜天麻切片后隔水蒸 10 min、新鲜天麻切片后 4% 矾水煮 20 min。

3.2 供试品测定 取不同加工工艺的天麻样品,编号,干燥,粉碎,取过 24 目不过 60 目的粉末,精密称取 1 g,按照“2.3”项下方法制备,在“2.1”项色谱条件下测定,分别计算样品中天麻素和天麻苷元含量,结果见表 2。

4 讨论

本实验中考察了纯甲醇超声法、70% 甲醇超声法和 50% 乙醇热回流法^[7-8]等样品制备方法,对于同一样品,70% 甲醇超声法提取率约为回流法的 80%,纯甲醇超声提取率约为回流法的 25%。虽然提取率不及回流法,但超声法具有省时、简便、易操作的优点,故选用 70% 甲醇超声法制备样品。

综合样品含量测定结果,经过不同工艺处理的天麻中天麻素及天麻苷元含量差别较大,天麻素含量最高达 0.82%,最低只有 0.19%;天麻苷元含量最高达 0.12%,最低仅为 0.01%。从样品中天麻素及天麻苷元的含量来看,隔水蒸法要高于清水煮法,与大多文献报道一致,且隔水蒸 30 min 的天麻素含量明显高于其他,是否 30 min 为蒸制的最佳时间有待于进一步研究。

表2 各样品中天麻素与天麻苷元含量(n=3)

样品	加工工艺	平均含量/%	
		天麻素	天麻苷元
1	隔水蒸 10 min	0.363 9	0.010 3
2	隔水蒸 15 min	0.354 9	0.016 9
3	隔水蒸 20 min	0.611 3	0.023 1
4	隔水蒸 30 min	0.817 7	0.022 8
5	清水煮 10 min	0.343 8	0.014 7
6	清水煮 15 min	0.507 4	0.010 6
7	清水煮 20 min	0.225 0	0.012 5
8	清水煮 25 min	0.414 5	0.019 6
9	清水煮 30 min	0.356 3	0.022 7
10	0.2%砒水煮 15 min	0.457 2	0.017 3
11	0.5%砒水煮 15 min	0.431 3	0.019 5
12	1%砒水煮 15 min	0.343 6	0.025 7
13	2%砒水煮 15 min	0.363 5	0.045 4
14	4%砒水煮 15 min	0.238 7	0.030 4
15	煮后直接切	0.443 8	0.080 7
16	直接切水煮 10 min	0.192 4	0.062 3
17	直接切隔水蒸 10 min	0.266 8	0.010 9
18	切后 4%砒煮 20 min	0.425 2	0.119 1
19	天麻原药材	0.340 6	0.087 4

结合表2实验结果优选各工艺最佳参数,隔水蒸 30 min、清水煮 15 min、0.2%砒煮 15 min、煮后直接切这4种工艺所制得的天麻饮片中天麻素及天麻苷元含量较高,具体工艺参数有待进一步研究。不同工艺炮制前后含量变化差别较大,直接切的样品含量下降较显著,隔水蒸的样品含量上升较明显。从含量变化趋势来看,隔水蒸法较稳定,清水煮法变化不成规律,较容易受水量、温度、时间的影响。

本实验比较了不同浓度白砒溶液煮制天麻的成分差异,结果显示在一定范围内,砒水浓度越高,天麻素含量越低;而天麻苷元变化不成规律,但与清水

煮的天麻比较,其天麻苷元含量明显升高,其中2%砒水煮制天麻中天麻苷元含量最高,这一规律是否成立有待深入研究。实验中发现,0.1%砒水煮制天麻的色泽较差,且存储时较易被虫蛀,存储时间远低于0.2%及以上浓度砒水煮制的样品,故本实验中未考察0.1%砒水煮制的样品。

综上所述,不同加工工艺所制得的天麻中天麻素及天麻苷元含量存在差异,隔水蒸 30 min、清水煮 15 min、0.2%砒水煮 15 min、煮后直接切片是4种较佳的加工工艺,所制得的天麻饮片中天麻素和天麻苷元含量依次降低。本研究可为天麻产地加工工艺的规范化研究与参数的进一步优选提供依据。

参考文献:

[1] 高学敏. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版社,2002: 478-480.

[2] 洪全,陈森,李雪萍. 天麻药理研究进展[J]. 中国实用医药,2010,5(11):249-250.

[3] 吴刚,秦民坚,康继川,等. 不同产地天麻质量评价[J]. 现代中药研究与实践,2007,21(1):40-43.

[4] 秦俊哲,张洁,周涵. 不同炮制方法对天麻素含量的影响[J]. 中药材,2006,29(12):1285-1288.

[5] 李德勋,陈桂,肖顺经,等. 正交试验法优选鲜天麻的蒸制干燥工艺[J]. 现代中药研究与实践,2006,20(2): 56-57.

[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):55-58.

[7] 李瑞洲,刘守金. 天麻采集加工方法考察[J]. 安徽中医学院学报,2000,19(6):44-45.

[8] 李德勋,肖顺经. 天麻的传统加工工艺调查和质量考察[J]. 现代中药研究与实践,2004,18(4):12-13.

(收稿日期:2014-09-02)

Simultaneous Determination of Gastrodin and p-Hydroxybenzyl Alcohol in *Gastrodia elata* Processed with Different Methods by High-performance Liquid Chromatography

SHEN Xiao-jing^{1,2}, JIN Chuan-shan^{1,2}, XU Feng-qing^{1,2}, LI Bao-ming³, HU Yu^{1,2}
(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. Synergetic Innovation Center of Anhui Authentic Chinese Medicine Quality Improvement, Anhui Hefei 230012, China; 3. Anhui Xiehecheng Co., Ltd., Anhui Bozhou 236800, China)

[Abstract]Objective To establish a method for simultaneous determination of gastrodin and p-hydroxybenzyl alcohol in *Gastrodia elata* by high-performance liquid chromatography (HPLC) and to optimize the processing of *Gastrodia elata* from different habitats. Methods HPLC was performed on a Spursil C₁₈-EP column (250 mm × 4.6 mm) with a mobile phase of methanol-0.1% phosphoric acid (5:95) at a detection wavelength of 220 nm, a column temperature of 40 ℃, and a flow rate of 1 mL/min. Results The content

高效液相色谱法测定主产区天麻中天麻素含量

李慧慧¹,刘守金¹,方成武¹,徐国兵²,陈庆辉³

(1. 安徽中医药大学药学院,安徽 合肥 230012;2. 安徽省食品药品检验研究院,安徽 合肥 230051;3. 安徽省天和中药材开发有限公司,安徽 合肥 231131)

[摘要]目的 测定全国5个主要产地天麻中天麻素含量,比较不同产地天麻质量。方法 采用高效液相色谱法测定天麻中天麻素含量,采用 Wondasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),检测波长 220 nm,柱温 25 ℃,流动相:乙腈-0.05%硫酸水溶液(3:97),流速 0.6 mL/min。结果 天麻素在 0.20~3.20 μg 内呈良好的线性关系,平均回收率为 100.87%,RSD=2.89%(n=5)。结论 5个主要产地天麻中天麻素含量有所差异。

[关键词]天麻;天麻素;高效液相色谱法;含量测定

[中图分类号]R284 **[文献标志码]**A **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2014.06.023

天麻为兰科天麻属植物天麻 *Gastrodia elata* Blume. 的干燥块茎,临床主要用于神经衰弱及其综合征、血管神经性头痛、经前期紧张等病症^[1],主产于四川、云南、贵州、陕西、甘肃、安徽、湖北等省。天麻素为天麻主要的活性物质之一,2010年版《中华人民共和国药典》采用高效液相色谱法测定天麻中天麻素的含量。有关天麻素的含量测定方法,已有相关文献报道^[2-3]。本研究采用高效液相色谱法^[4]比较贵州、安徽、四川、甘肃、云南出产的天麻中天麻素含量,为进一步评价天麻质量提供依据。

1 实验仪器与试剂

LC-15C 高效液相色谱仪、SPD-15C 紫外检测器、Wondasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm);岛津企业管理(中国)有限公司;天麻素对照品:成都曼斯特生物科技有限公司,批号 MUST-11122815,纯度大于 99.5%;乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂为分析纯;天麻药材样品采于甘肃康县,四川江油,云南昭通,贵州大方,安徽金寨、霍山、岳西等地。原植物经安徽中医药大学中药

与资源教研室刘守金教授鉴定为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Blume. 的块茎。

2 实验方法

- 2.1 对照品溶液的制备 精密称取天麻素对照品适量,加流动相制成 50 μg/mL 的溶液,即得。
- 2.2 样品溶液的制备^[5-6] 取天麻粉末(50 目)2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50%乙醇 50 mL 称质量,50 ℃超声 40 min。放冷,称质量,用 50%乙醇补足减失的质量,滤过,精密量取滤液 10 mL,浓缩至近干,残渣加流动相混合溶液溶解,转移至 25 mL 容量瓶中。定容,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。
- 2.3 色谱条件 岛津 Wondasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm);检测波长:220 nm;柱温 25 ℃;流动相乙腈-0.05%磷酸水溶液(3:97);流速 0.6 mL/min;进样量 10 μL。
- 2.4 色谱系统适用性实验 在上述色谱条件下,主色谱峰与相邻色谱峰之间分离度大于 1.5,理论塔板数大于 5 000,对照品溶液连续进 5 针,RSD 值小于 2%。
- 2.5 样品测定 分别精密吸取对照品溶液与样品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定。色谱图见图 1。天麻素含量测定结果见表 1。

作者简介:李慧慧(1989-),女,硕士研究生
通信作者:刘守金,shjinliu@sina.com

of gastrodin and p-hydroxybenzyl alcohol in *Gastrodia elata* decoction pieces was highest after *Gastrodia elata* was processed by water steaming for 30 min, followed by decoction in clear water for 15 min, decoction in 0.2% alum solution for 15 min, and slicing after decoction. **Conclusion** *Gastrodia elata* is optimally processed by water steaming for 30 min, and the *Gastrodia elata* decoction pieces produced by this method have the highest content of gastrodin and p-hydroxybenzyl alcohol.

[Key words] *Gastrodia elata*; gastrodin; p-Hydroxybenzyl alcohol; process; high-performance liquid chromatography