

天麻药材高效液相色谱指纹图谱研究

黄小玲¹ 杨春燕¹ 袁慧文²

(1. 广东省深圳市慢性病防治中心, 广东 深圳 518020; 2. 广东省深圳市药品检验所, 广东 深圳 518029)

摘要: 目的 研究天麻药材的高效液相色谱指纹图谱, 为其质量控制提供可靠的方法。方法 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Ultimate XB - C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇 - 1% 冰醋酸水溶液(梯度洗脱), 柱温为 30 °C, 流速 1 mL/min, 检测波长 270 nm。结果 初步建立了天麻药材的高效液相色谱指纹图谱, 标定出 16 个共有峰, 天麻素的加样加收率为 102.66%, RSD < 2.5% (n = 6)。结论 高效液相色谱指纹图谱为天麻药材质量控制提供了一种新方法, 并为未知天麻样品的鉴别提供一个准确、快捷的工具。

关键词: 天麻; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 质量控制; 天麻素

中图分类号: R284.1; R282.71

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2011)02-0017-03

HPLC Fingerprint of *Gastrodia elata* Blume

Huang Xiaoling¹, Yang Chunyan¹, Yuan Huiwen²

(1. Shenzhen Chronic Disease Prevention and Cure Centre, Shenzhen, Guangdong, China 518020;

2. Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen, Guangdong, China 518029)

Abstract: Objective To study the HPLC fingerprint of medicinal material *Gastrodia elata* Blume to provide the reliable method for its quality control. **Methods** The analysis was performed on Ultimate XB - C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of methanol - 1% glacial acetic acid aqueous solution in the gradient elution. The column temperature was 30 °C and the flow rate was 1.0 mL/min. The UV detector was set at 270 nm. **Results** The HPLC fingerprint of *Gastrodia elata* Blume was preliminarily established and 16 common peaks were displayed in the fingerprint. The average sample recovery rate of gastrodine was 102.66%, RSD < 2.5% (n = 6). **Conclusion** The HPLC fingerprint may provide a new model for controlling the quality of medicinal material *Gastrodia elata* Blume and also may provide an accurate and rapid tool for identifying unknown sample of *Gastrodia elata* Blume.

Key words: *Gastrodia elata* Blume; HPLC; fingerprint; quality control; gastrodine

天麻为兰科多年生草本植物天麻 *Gastrodia elata* Blume 的干燥块茎, 味甘、性微温, 具平肝、息风、止痉等功效, 是我国名贵中草药之一, 在我国分布广泛。2005 年版《中国药典(一部)》中主要以天麻素含量来评价天麻药材的质量^[1]。笔者采用高效液相色谱(HPLC)法对 10 批不同地区的天麻药材进行测定, 初步建立了高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 标出 16 个共有指纹峰; 并以天麻素为对照品, 测定比较了不同来源的天麻药材中天麻素含量, 初步评价药材质量。现报道如下。

1 仪器与试剂

Waters 1525 型二元高效液相色谱仪, 包括 Waters 2996 型二级管阵列检测器、Empower 2 色谱分析软件(美国 Waters 公司)。甲醇(江苏汉邦科技有限公司, 色谱纯); 甲醇、乙醇、醋酸(汕头化学试剂厂, 分析纯), 其他试剂均为分析纯; 水为双蒸水。天麻素对照品(中国药品生物制品检定所, 供含量测定用), 10 批天麻样品来源于全国不同产地, 由深圳市药品检验所鉴定为兰科药用植物天麻。天麻样品来源 TM₁ 为西藏林芝, TM₂ 为高黎贡山(野生), TM₃ 为云南小草坝, TM₄ 为云南九华公司, TM₅ 为丽江巨甸, TM₆ 为安徽亳州, TM₇ 为安徽大别山, TM₈ 为四川(野生), TM₉ 为四川(家种), TM₁₀ 为陕西略阳九中金, TM_{对照} 为中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 天麻素含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱: Ultimate XB - C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)和 1% 冰醋酸水溶液(B), 二元梯度洗脱 50 min, 0 ~ 25 min 时, 5% ~ 40% A(V/V), 25 ~ 35 min, 40% ~ 80% A(V/V), 35 ~ 50 min 时 80% ~ 85% A(V/V); 流速: 1 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 270 nm; 进样量: 20 μL。

2.1.2 溶液配制

取天麻素标准品(干燥至恒重), 用 30% 甲醇配成 0.255 g/L 的

对照品溶液。取天麻药材, 粉碎, 取 60 目筛细粉, 精密称取 0.500 g, 加入 15 mL 30% 甲醇, 超声提取 30 min, 过 0.45 μm 滤膜, 取滤液, 加入 1% 的壳聚糖溶液(以 1% 冰醋酸为溶剂), 配成 15 mL 4 °C 冰箱过夜, 取上清液, 即得供试品溶液。

2.1.3 测定方法

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 记录 50 min 的色谱图。

2.1.4 方法学考察

线性关系考察: 精密量取对照品溶液, 用水稀配成 0.255 ~ 25.500 μg/mL 的系列对照品溶液, 分别进样 20 μL, 测定峰面积积分值。以对照品溶液质量浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归, 得回归方程 $Y = 15466.11X - 2459.62$, $r = 0.9988$ 。结果表明天麻素质量浓度在 0.255 ~ 25.5 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 取 1 号供试品溶液, 进样 5 次, 以 15 号峰为参照峰, 计算其他各峰的相对保留时间和相对峰面积。结果单峰面积占总峰面积 10% 以上指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别小于 3.0% 和 2.5% (n = 5)。

稳定性试验: 取 1 号供试品溶液(保存于低温冰箱中), 于配制后 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 h 时分别进样, 以 15 号峰为参照峰, 计算其他各峰的相对保留时间和相对峰面积。结果单峰面积占总峰面积 10% 以上指纹峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 分别小于 1.53% 和 1.48% (n = 8), 表明供试品溶液在 72 h 内稳定。

重复性试验: 取 1 号供试品 5 份, 依供试品溶液制备溶液, 分别进样, 以 15 号峰为参照峰计算。结果单峰面积占总峰面积 10% 以上指纹峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 分别小于 0.86% 和 3.00% (n = 5)。

加样回收试验: 准确称取 1 号供试品 0.5 g, 平行 6 份, 于每份样品准确加入已知质量浓度的天麻素对照品溶液 1.5 mL, 加入 15 mL

30% 甲醇,按供试品溶液制备方法处理,计算加样回收率。结果平均加样回收率为 102.66%, RSD 小于 2.5% (n=6)。

2.2 对照指纹图谱的建立

分别将各批样品和天麻对照药材上样分析,记录各自色谱,见图 1。根据 10 批天麻样品和天麻对照药材保留时间的一致性,确定 16 个共有峰,其中 5 号峰为天麻素。但由于天麻素对照品成分峰过早出现,故另选出峰时间稳定、峰面积较大且分离度良好的 15 号峰为参照峰(S),以其保留时间和峰面积为 1,计算其他各峰的相对保留时间和相对峰面积。以天麻素为对照品,对照药材作为“指纹对照品”^[2],建立天麻药材的 HPLC 指纹图谱(图 1)。可见,10 批不同天麻样品都能检出 16 个指纹峰,但相对峰面积有所不同,表明不同产地天麻化学成分种类相似,但各成分的相对含量与绝对含量略有不同。

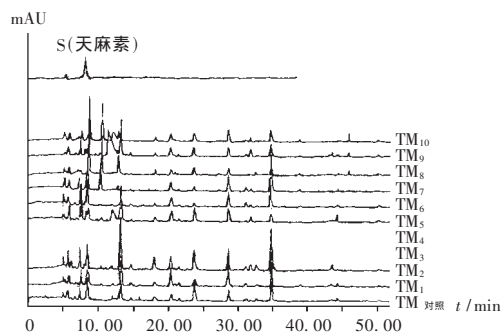


图 1 天麻药材的高效液相色谱指纹图谱

2.3 共有指纹峰分析

根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》^[3]和常用中药材 HPLC 指纹图谱测定技术^[4],单峰峰面积占指纹图谱色谱总面积 10% 以上的共有指纹峰尚需标定其与参照峰峰面积比值。10 批天麻样品 16 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积(计算平均值)见表 2。可见,其中峰 1、峰 3、峰 5、峰 6、峰 8、峰 9、峰 11、峰 12 共 8 个指纹峰的峰面积均超过峰 15(参照峰)的 10% 以上,可作为天麻定性鉴别、定量检测的依据。相似度是评价有效成分间相对含量一致性的重要指标。以相关系数为主、夹角余弦为辅进行相似度分析,以 16 个共有指纹峰的相对峰面积为基本参数,对 10 批天麻样品的 HPLC 指纹图谱进行相似度评价。结果见表 3。可见,TM₂, TM₅, TM₇, TM₁₀ 与 TM_{对照} 的相关系数均在 0.9 以上,其相应夹角余弦系数也均在 0.8 以上,说明高黎贡山(野生)、丽江巨甸、安徽大别山和陕西略阳九中金的天麻中各成分的相对含量与对照药材较接近;而 TM₈(四川野生)的相关系数低于 0.6,夹角余弦系数则低于 0.4,其他样品的相关系数及夹角余弦系数则介于中间数值,差别较大,可能与样品产地、生长年限、采收时间等因素有关;四川野生天麻的相似度不如四川家种天麻。以上说明,选用的天麻对照药材与四川野生天麻的种属差异较远,而安徽大别山和陕西略阳九中金(家种)产天麻则与天麻对照药材种属亲近。

2.4 主要成分定量分析

对 10 批样品中天麻素含量依本法进行定量分析,结果见表 3。可见,安徽大别山产天麻中的天麻素含量最高,其次是四川家种天麻,高黎贡山(野生)、丽江巨甸、安徽亳州及陕西略阳九中金山产天麻中的天麻素含量都超过对照药材,且西藏林芝、云南小草坝和云南九华公司产天麻中的天麻素含量均高于中国药典规定的 0.20%,只有四川野生天麻中天麻素的含量低于 0.20%。以上结果表明,现代指纹(fingerprint)分析是分析、比较、评价和校验^[5]中药材的一种手段。这里的指纹图谱是指狭义的表达植物药代谢产物

表 2 10 批样品 16 个共有峰的相对保留时间及峰面积(平均值)

峰号	相对保留时间	相对峰面积	峰号	相对保留时间	相对峰面积
1	0.161	0.240	9	0.558	0.692
2	0.192	0.089	10	0.616	0.095
3	0.212	0.333	11	0.681	0.982
4	0.233	0.082	12	0.822	0.463
5	0.251	0.692	13	0.891	0.093
6	0.373	0.612	14	0.912	0.082
7	0.421	0.095	15(S)	1.000	1.000
8	0.511	0.255	16	1.272	0.059

表 3 10 批样品共有指纹峰相对峰面积指纹图谱的相似度分析及含量测定结果

样品编号	收集时间	相似度分析		天麻素含量 (%)
		夹角余弦系数	相关系数	
TM ₁	2009-05-28	0.759 6	0.877 9	0.367 7
TM ₂	2009-03-30	0.866 2	0.931 1	0.433 3
TM ₃	2009-03-30	0.778 8	0.886 6	0.386 6
TM ₄	2009-04-16	0.749 6	0.876 6	0.315 5
TM ₅	2009-04-20	0.880 3	0.938 6	0.498 8
TM ₆	2009-05-25	0.690 6	0.849 6	0.625 5
TM ₇	2009-05-27	0.891 1	0.976 6	1.100 2
TM ₈	2009-08-20	0.309 8	0.539 8	0.172 2
TM ₉	2009-05-10	0.560 3	0.786 6	0.856 8
TM ₁₀	2009-03-30	0.846 6	0.929 6	0.420 9
TM _{对照}	2009-11-15	1.000 0	1.000 0	0.426 6

化学特征,即中药化学(成分)的指纹图谱^[6]。

3 讨论

本试验初步建立了国内不同产地的天麻药材 HPLC 指纹图谱,对 10 批药材进行了相似度评价;初步建立了天麻中天麻素类成分的共有模式,确定了 16 个共有峰为特征峰。该方法可操作性强、重复性好、图谱相对稳定,可供天麻药材内在质量评价和质量控制标准制订时参考^[7]。

采用两相梯度洗脱装置,分别将水相(纯水 1% 醋酸、0.1% 磷酸)和有机相(甲醇、乙腈)按不同配比进行试验,结果以甲醇-1% 醋酸水溶液作为流动相时分离效果最佳。取天麻素对照品溶液,以二极管阵列检测器进行全波长检测,结果在 226 nm 及 270 nm 波长处均有吸收。但以甲醇-1% 醋酸水溶液为流动相时,以 226 nm 为检测波长时天麻素的吸收峰飘移不定,故选择 270 nm 为检测波长。还对提取溶剂(甲醇、乙醇及不同比例的乙醇和水)、提取方法(超声、回流)、提取时间等进行了考察,确定了 2.1.2 项下供试品溶液的提取制备方法。

现阶段,中药的有效成分大多尚未明确,中药指纹图谱的整体性和模糊性正好符合中药质量控制的整体性要求,较单一成分或指标成分的质量控制方法更科学、合理^[8]。但在中药指纹图谱中,可能还含有未知化合物的信息,该对它们作如何处理,仍是一个尚待研究的问题。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 39.
- [2] 宋敏, 杭太俊, 张正行. 丹参水溶性成分 HPLC 指纹图谱对照品对照法的研究[J]. 中草药, 2005, 36(3): 360-364.
- [3] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[J]. 中成药, 2000, 22(10): 671.
- [4] 蔡宝昌, 刘训红. 常用中药材 HPLC 指纹图谱测定技术[M]. 北京: 化

水蒸气蒸馏提取与顶空进样气相色谱-质谱分析吴茱萸挥发性成分*

容蓉, 邱丽丽, 刘朋, 吕青涛

(山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355)

摘要: 目的 分析比较不同采集方法制备的吴茱萸中挥发性成分。方法 分别采用水蒸气蒸馏法和顶空加热提取挥发性成分的方法, 对其进行气相色谱-质谱(GC-MS)分析。结果 两种提取方法无论在成分还是其相对含量方面均存在一定的差异, 采用水蒸气蒸馏法可鉴定出16种挥发性化学成分, 采用顶空进样技术可鉴定出18种挥发性化学成分, 共有成分为8种。结论 两种样品采集方法, 分别提供了不同沸点吴茱萸挥发物的化学信息; 运用这两种方法可建立更全面的吴茱萸挥发性成分GC-MS表征体系。

关键词: 吴茱萸; 挥发性成分; 气相色谱-质谱; 水蒸气蒸馏; 顶空进样

中图分类号: R284.1; R282.71

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2011)02-0019-02

GC-MS Analysis for Volatile Compounds Extracted from Fructus Evodiae by Steam Distillation and Headspace Injection

Rong Rong, Qiu Lili, Liu Peng, Lv Qingtao

(College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong, China 250355)

Abstract: Objective To compare the difference of volatile components in fructus evodiae prepared with different sample collection methods.

Methods The volatile components from fructus evodiae were extracted by steam distillation and headspace injection respectively and then analyzed by GC-MS. **Results** There was a certain difference in the compositions and relative content of the volatile compounds between the above two extraction methods. 16 volatile chemical compounds were identified in volatile oil obtained by SD, whereas 18 volatile components were identified in the herb treated with HS; among the detected compounds in the samples treated with different method. There were 8 mutual compounds with different relative contents. **Conclusion** The above two methods of sample collection provides the chemical information of volatile matters with different boiling points from fructus evodiae, which can be used for establishing more comprehensive GC-MS representation system.

Key words: fructus evodiae; volatile components; GC-MS; steam distillation; headspace injection

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 石虎 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实。8~11月果实尚未开裂时, 剪下果枝, 晒干或低温干燥, 除去枝、叶、果梗等杂质即得^[1]。吴茱萸性辛、苦、热, 有小毒, 具有散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻的功效。现代药理研究证明, 吴茱萸在治疗高血压、抗菌、抗病毒、抗溃疡方面都有很好的疗效^[2], 其挥发油具有一定的抗氧化作用和抗菌活性^[3]。运用现代色质联用技术对吴茱萸挥发性成分进行表征, 将有助于认识决定其药效的物质基础。笔者分别采用水蒸气蒸馏法(steam distillation, 简称SD)和顶空直接进样技术(headspace injection, 简称HS)对吴茱萸挥发性成分进行了采集和气相色谱-质谱联用(GC-MS)分析, 并对分析结果进行了比较。

1 仪器和试剂

GC 6890 型气相色谱仪, MS 5975 型质谱仪, 7683B 型自动进样器, 7694E 型顶空进样器, 色谱数据处理系统为 MSD Chemstation D. 03. 00. 611(美国 Agilent 公司); 质谱检索数据库为 NIST MS search 2. 0。吴茱萸(产地贵州), 经山东中医药大学李峰教授鉴定为

吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth., 所用试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 挥发性成分提取

2.1.1 SD法

称取吴茱萸粉末(过40目筛)50g, 精密称定, 加蒸馏水500mL与玻璃珠数粒, 振摇混合后, 按2005年版《中华人民共和国药典(一部)》附录XD挥发油测定法(甲法)^[1]项下方法连接装置。自冷凝管上端加水至充满挥发油测定器的刻度部分, 并再精密加入3mL的乙酸乙酯于挥发油测定器刻度上方。置电热套中加热提取6h, 至测定器中油量不再增加, 停止加热, 放置片刻, 取出乙酸乙酯层。用乙酸乙酯溶解转移至10mL量瓶中, 并定容至刻度, 用1g无水Na₂SO₄干燥, 取上层清液作为挥发油供试液, 用于GC-MS分析, 进样量0.2μL。

2.1.2 HS法

取新鲜粉碎的吴茱萸粉末(过40目筛)0.5g, 精密称定, 放入10mL顶空瓶中密封, 置顶空进样器中按顶空进样条件进样。顶空进样条件: 样品瓶加热温度100℃; 样品环温度120℃; 传输线温度140℃; 样品瓶加热时间40min, 样品环平衡时间0.05min, 进样时间1min。

* 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)资助项目, 项目编号: 2007CB512601。

学工业出版社, 2005: 22-25.

[5] 胡芳弟, 封士兰, 苟子强. 中药质量控制方法研究进展[J]. 兰州医学院学报, 2004, 30(3): 90-92.

[6] 罗国安, 王义明. 中药指纹图谱的分类和发展[J]. 中国新药杂志, 2002, 11(1): 46-51.

[7] 张艳, 范俊安, 夏永鹏, 等. 重庆垫江牡丹皮 HPLC 指纹图谱研究(Ⅲ)——刮丹皮指纹图谱[J]. 中国药房, 2010, 21(3): 238-241.

[8] 彭苗苗, 方芸. 中药复方药效物质基础研究进展[J]. 中国药房, 2010, 21(7): 659-661.

(收稿日期: 2010-09-09)