

天麻药材 HPLC 指纹图谱的研究

石上梅¹,孙婕²,杜庆鹏^{1*},田金改¹,林瑞超¹(1. 中国药品生物制品检定所,北京 100050;2. 天津中新药业集团股份有限公司研究中心,天津 300122)

摘要:目的 用高效液相色谱法建立天麻药材甲醇提取液的指纹图谱分析方法。方法 采用 Dikma diamonsil ODS C₁₈(4.6 mm × 250 mm,5 μm)色谱柱,乙腈-0.4%磷酸为流动相,梯度洗脱,检测波长为 270 nm,以天麻苷元(对-羟基苯甲醇)为参照物。结果 共有 16 个共有峰。结论 方法准确、可靠,为有效地控制天麻药材的内在质量提供了科学依据。

关键词:天麻;高效液相色谱法;指纹图谱

中图分类号:R284.1 文献标识码:A 文章编号:1001-2494(2005)10-0739-03

Study on HPLC fingerprint of *Rhizoma Gastrodiae*

SHI Shang-mei¹, SUN Jie², DU Qing-peng^{1*}, TIAN Jin-gai¹, LIN Rui-chao¹(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China; 2. Technical Center of Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Group Co., Ltd. Tianjin 300122, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the fingerprints analysis of the methanol extract of *Rhizoma Gastrodiae* by HPLC. METHODS Dikma diamonsil ODS C₁₈(4.6 mm × 250 mm,5 μm) was used. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.4% phosphoric acid with gradient elution. The detective wavelength was 270 nm, and *p*-hydroxyl benzyl alcohol was used as reference compound. RESULTS Fingerprint consisted of 16 common peaks. CONCLUSION This method is accurate, reliable and provides a scientific basis for the quantity controlling of *Rhizoma Gastrodiae*.

KEY WORDS: *Rhizoma Gastrodiae*; HPLC; fingerprint

天麻为兰科植物天麻(*Gastrodia elata* Bl.)的干燥块茎。具有平肝息风的功效,用于治疗头痛眩晕,肢体麻木,小儿惊风,癫痫抽搐,破伤风等,为传统的名贵中药材。其野生资源主要分布在秦巴山地、川、鄂、湘山地、云贵高原;栽培产地主要为陕西、湖北、湖南、安徽等省^[1-2]。市场商品天麻既有栽培品种,又有野生的。天麻在采挖后要立即洗净,蒸透,敞开低温凉干,以破坏其中的酶类成分来防止有效成分的分解^[3]。为更有效地控制其质量,保证商品药材及相应制剂质量的稳定,我们用 HPLC 建立了天麻药材甲醇提取液指纹图谱的分析方法并对 11 批药材进行了测定。

1 仪器与试剂

Waters 2690 高效液相色谱仪,2690/996 二极管阵列检测器;乙腈为色谱纯(Fisher,美国),水为高纯水,磷酸为分析纯。对羟基苯甲醇(纯度>99%)

分别收集了云南、陕西、贵州、安徽、湖南等省的天麻药材样品 11 份,有 9 份样品购自当地的药材市场,2 份采自陕西商洛的天麻栽培基地。药材产地

详见表 1。表 1 中天麻药材均经中国药品生物制品检定所中药室张继副主任药师鉴定。

表 1 11 份天麻样品的产地

Tab 1 11 samples of *Gastrodia elata* Bl from various sources

编号	来源	产地
01	云南昆明	云南昭通野生
02	云南昆明	云南昭通家种
03	陕西西安药材市场	陕西商洛野生
04	河北安国药材市场	陕西家种
05	湖南安江药材市场	不详
06	陕西西安药材市场	陕西商洛家种
07	贵州药材公司	贵州毕节野生
08	贵州药材公司	贵州遵义野生
09	云南昆明	云南昭通大关县野生
10	安徽金寨县中药厂	不详
11	云南迪庆	云南迪庆州维西县野生

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Dikma DiamonsilTM C₁₈ (4.6 mm × 250 mm,5 μm),柱温: 25℃,检测波长: 270 nm,流速: 1 mL·min⁻¹;流动相: 乙腈-0.4%磷酸,梯度洗脱: 0 min: 乙腈-酸水(2:98); 10 min: 乙腈-酸水(2:98); 20 min: 乙腈-酸水(4:96); 25 min: 乙腈-酸水(4:

作者简介:石上梅,女,副主任药师 * 通讯作者:杜庆鹏,男,药师

Tel: (010)67017755-424

96);35 min:乙腈-酸水(11:89);50 min:乙腈-酸水(11:89);60 min:乙腈-酸水(18:82);75 min:乙腈-酸水(18:82);76 min:乙腈-酸水(18:82)。0~10 min,流动相比比例相当于恒定;10~20 min 流动相比比例为线性梯度;20~25 min,流动相比比例相当于恒定;25~35 min,流动相比比例为线性梯度;35~50 min,流动相比比例相当于恒定;50~60 min,流动相比比例为线性梯度,60~75 min,流动相比比例相当于恒定;76 min 结束。

2.2 供试品溶液的制备

天麻粉末 4 g,精密称定,加甲醇 50 mL,水浴回流提取 1 h,过 0.45 μ m 滤膜,即得。

2.3 参照物溶液的制备

称取天麻苷元(对羟基苯甲醇)适量,精密称定,

表 2 天麻指纹图谱的稳定性及精密度

Tab 2 Precision and stability of fingerprints of *Rhizoma Gastrodiae*

编号	峰号															
	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'	10'	11'	12'	13'	14'	15'	16'
1	1	0.182	0.207	0.256	0.320	0.405	0.638	0.744	1.481	1.526	1.799	1.901	2.194	2.275	2.315	2.509
2	1	0.182	0.204	0.258	0.322	0.403	0.639	0.743	1.486	1.523	1.801	1.906	2.193	2.273	2.310	2.507
3	1	0.184	0.205	0.254	0.321	0.409	0.642	0.756	1.489	1.532	1.801	1.910	2.206	2.279	2.321	2.519
4	1	0.183	0.206	0.256	0.323	0.406	0.639	0.753	1.487	1.529	1.803	1.908	2.201	2.278	2.319	2.520
5	1	0.181	0.208	0.257	0.322	0.405	0.640	0.759	1.489	1.528	1.802	1.907	2.202	2.276	2.318	2.518
RSD/%		0.63	0.77	0.58	0.35	0.54	0.24	0.96	0.22	0.22	0.08	0.18	0.25	0.10	0.18	0.24

取 1 号天麻药材样品 5 份,按照“2.2”方法处理,并测定其 16 个共有峰相对保留时间的 RSD

表 3 天麻指纹图谱的重现性

Tab 3 Reproducibility of fingerprints of *Rhizoma Gastrodiae*

编号	峰号															
	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'	10'	11'	12'	13'	14'	15'	16'
1	1	0.182	0.207	0.256	0.320	0.403	0.638	0.744	1.481	1.526	1.799	1.901	2.194	2.275	2.315	2.509
2	1	0.182	0.211	0.258	0.325	0.400	0.630	0.743	1.473	1.523	1.819	1.891	2.184	2.266	2.318	2.517
3	1	0.184	0.205	0.250	0.321	0.408	0.642	0.756	1.489	1.507	1.801	1.883	2.207	2.279	2.321	2.519
4	1	0.183	0.206	0.248	0.318	0.410	0.639	0.753	1.475	1.510	1.824	1.908	2.281	2.268	2.319	2.523
5	1	0.185	0.208	0.257	0.322	0.401	0.631	0.761	1.489	1.529	1.806	1.902	2.193	2.276	2.298	2.499
RSD/%		0.71	1.11	1.77	0.81	1.09	0.82	1.03	0.51	0.65	0.61	0.52	1.79	0.24	0.40	0.38

2.7 指纹图谱及技术参数

测定 11 批天麻药材的指纹图谱及参照物——天麻苷元的单独图谱,见图 1,2,3。根据结果,确定 16 个共有色谱峰,相对保留时间和相对峰面积值结果见表 4 和表 5。

3 讨论

3.1 药材供试品溶液提取方法的考察

经过实验发现,以 95% 乙醇、甲醇超声提取和甲醇回流提取比较,后者指纹图谱峰数目多于前二者,且其对参照物的提取也较前两种方法完全,故选择以甲醇回流提取药材。

加甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液,作为参照物溶液。

2.4 样品测定

分别精密吸取参照物溶液和供试品溶液各 10 μ L,注入液相色谱仪,依“2.1”项下色谱条件测定,记录色谱图。在供试品色谱中,以天麻苷元色谱峰(S 峰)的保留时间和色谱峰面积为 1,计算各指纹峰的相对保留时间和相对峰面积值。

2.5 稳定性和精密度实验

取同一份天麻供试品溶液,分别在 0,2,4,6,8 h 进样 5 次,测定各共有峰的相对保留时间的 RSD(%),结果表明天麻供试品溶液稳定,仪器精密度良好,见表 2。

2.6 重复性实验

(%),结果说明方法重复性好,符合指纹图谱的要求,见表 3。

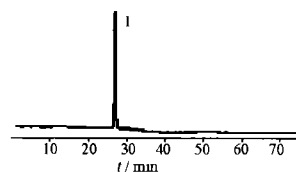


图 1 天麻苷元(对羟基苯甲醇)HPLC 图

1 - 天麻苷元

Fig 1 HPLC of *p*-hydroxyl benzyl alcohol

1 - *p*-hydroxyl benzyl alcohol

3.2 参照物的选择

根据文献^[3~4]报道,天麻苷(天麻素)、天麻苷元均为天麻药材的活性成分,而天麻苷峰(7 号峰)在

中国药学杂志 2005 年 5 月第 40 卷第 10 期

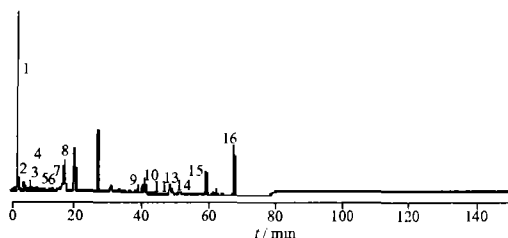


图2 1号天麻 150 min 的指纹图谱

Fig 2 Fingerprint of *Rhizoma Gastrodiae* (No.1) in 150 min
指纹图谱中有前展, 无论怎样改变流动相的条件, 也无法达到较好的峰形, 故选择以天麻苷元为参照物。

3.3 流动相洗脱梯度的选择

分别对乙腈、0.4% 磷酸的洗脱梯度进行了试验, 结果以文中所列流动相梯度出峰较多且峰的分度度较好, 同时对 1 号天麻药材的供试品溶液进行 150 min 的 HPLC 测定, 结果 76 min 后无色谱峰出现

表4 11 批天麻指纹图谱中共有指纹峰的相对保留时间

Tab 4 Retention time of commonality fingerprint peaks in 11 batch *Rhizoma Gastrodiae*

编号	峰号															
	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'	10'	11'	12'	13'	14'	15'	16'
01	1	0.182	0.207	0.254	0.321	0.403	0.638	0.744	1.486	1.526	1.799	1.901	2.194	2.275	2.315	2.509
02	1	0.183	0.208	0.254	0.320	0.405	0.638	0.756	1.481	1.521	1.794	1.894	2.186	2.268	2.311	2.505
03	1	0.180	0.206	0.246	0.313	0.400	0.630	0.758	1.467	1.507	1.778	1.878	2.162	2.245	2.284	2.446
04	1	0.181	0.207	0.259	0.325	0.410	0.641	0.754	1.475	1.514	1.784	1.883	2.171	2.254	2.295	2.448
05	1	0.183	0.203	0.248	0.313	0.396	0.635	0.736	1.478	1.527	1.799	1.902	2.195	2.275	2.317	2.517
06	1	0.184	0.211	0.253	0.320	0.401	0.633	0.766	1.489	1.529	1.801	1.906	2.200	2.279	2.320	2.515
07	1	0.181	0.208	0.251	0.315	0.406	0.642	0.753	1.473	1.513	1.785	1.866	2.172	2.254	2.294	2.488
08	1	0.182	0.206	0.251	0.317	0.402	0.637	0.757	1.486	1.526	1.799	1.903	2.196	2.275	2.319	2.516
09	1	0.181	0.205	0.247	0.312	0.395	0.639	0.754	1.478	1.518	1.790	1.896	2.185	2.264	2.305	2.502
10	1	0.180	0.200	0.245	0.309	0.402	0.638	0.740	1.475	1.515	1.788	-	2.179	2.258	2.300	2.496
11	1	0.183	0.204	0.251	0.316	0.399	0.640	-	1.479	1.519	1.790	1.854	2.181	2.261	2.303	2.198
平均	1	0.182	0.206	0.251	0.316	0.402	0.637	0.752	1.480	1.520	1.792	1.891	2.0184	2.264	2.306	2.498
RSD%		0.74	1.46	1.67	1.48	1.08	0.56	1.20	0.47	0.47	0.42	0.84	0.55	0.49	0.51	0.81

表5 11 批天麻指纹图谱中共有指纹峰的相对峰面积值

Tab 5 Peak areas of commonality fingerprint in 11 batch *Rhizoma Gastrodiae*

编号	峰号															
	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'	10'	11'	12'	13'	14'	15'	16'
01	1	0.023	0.025	0.062	0.021	0.016	0.773	0.669	0.032	0.145	0.162	0.015	0.237	0.027	0.040	0.562
02	1	0.237	0.593	0.988	0.826	0.343	6.964	3.388	0.288	4.403	0.928	0.692	3.972	0.207	0.618	8.762
03	1	0.012	0.021	0.092	0.039	0.012	0.342	0.016	0.126	0.244	0.208	0.035	0.442	0.072	0.084	0.957
04	1	0.063	0.095	0.228	0.219	0.055	3.113	0.559	0.137	1.851	0.644	0.119	1.359	0.169	0.257	2.412
05	1	0.014	0.020	0.120	0.075	0.028	0.398	1.791	0.151	0.231	0.169	0.068	0.420	0.174	0.068	0.598
06	1	0.031	0.067	0.195	0.093	0.020	0.988	0.408	0.323	0.659	0.320	0.108	0.540	0.320	0.113	0.990
07	1	0.055	0.040	0.137	0.171	0.040	0.899	0.714	0.101	1.321	0.584	0.064	0.663	0.113	0.113	1.460
08	1	0.018	0.020	0.042	0.033	0.028	0.831	0.010	0.029	0.145	0.251	0.017	0.337	0.041	0.047	0.985
09	1	0.025	0.037	0.144	0.095	0.074	0.383	0.161	0.030	0.228	0.262	0.043	0.337	0.019	0.033	0.722
10	1	0.006	0.007	0.045	0.047	0.012	0.038	0.607	0.124	0.062	0.394	-	0.023	0.012	0.086	0.067
11	1	0.005	0.002	0.014	0.017	0.004	0.198	-	0.013	0.056	0.164	0.006	0.156	0.048	0.014	0.292

参考文献

- [1] 卢进, 丁德容. 天麻的本草考证[J]. 中药材, 1994, 17(12): 34.
- [2] 中国药材公司. 中国中药资源[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 211~212.
- [3] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用(第一卷)[M]. 北京: 学苑出版社, 1997: 885~907.
- [4] 沙振方, 孙文基. 天麻中天麻素及其甙元动态变化的研究[J]. 中草药, 1986, 17(2): 29.
- [5] 沙振方, 孙文基. 天麻制剂中天麻素及其甙元含量的考察[J]. 中成药研究, 1986, 10: 12.
- [6] 童春燕. 天麻注射液中天麻素及甙元的 HPLC 分析[J]. 药物分析杂志, 1989, 9(3): 182.
- [7] 陈发奎. 中草药有效成分含量测定[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 103~110. (收稿日期: 2004-08-16)