

天麻中天麻素 RP-HPLC 测定及提取工艺研究

田 洋¹, 肖 蓉^{2,*}, 徐昆龙², 史崇颖¹, 代 祎²

(1. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南农业大学动物科学技术学院, 云南 昆明 650201)

摘 要: 通过考察不同检测波长、流动相和溶剂对天麻素出峰效果的影响, 改进了 2005 年版《中国药典》收载的天麻药材中天麻素含量测定的 RP-HPLC 方法, 并探讨了提取溶剂、提取温度、料液比、提取时间对天麻素提取工艺的影响。结果表明: 采用 Diamonsil C₁₈ 柱(150mm × 4.6mm, 5 μm), 乙腈-水(3:97, V/V)溶液为流动相, 流速 1ml/min, 柱温为室温, 检测波长 220nm, 并用乙腈-0.05% 磷酸溶液(3:97, V/V)作为溶剂, 天麻素在 10~80 μg/ml 浓度范围内呈现良好的线性关系, 其回归方程和相关系数分别为: $y = 4.0264x + 0.6311$, $R^2 = 0.9992$, 最低检测限为 2ng。精密度 RSD 为 0.41%(n = 6), 重现性实验 RSD 为 0.86%(n = 6), 回收率为 98.4%, RSD 为 0.84%(n = 6); 天麻素最佳提取工艺条件为: 提取溶剂 50% 乙醇, 提取温度 70℃, 料液比 1:10 (g/ml), 提取时间 6h。
关键词: 天麻; 天麻素; RP-HPLC; 提取工艺

Determination of Gastrodin in *Gastrodia elata* Bl. by Reverse Phase (RP)-HPLC and Study on Its Extraction Technology

TIAN Yang¹, XIAO Rong^{2,*}, XU Kun-long², SHI Chong-ying¹, DAI Yi²

(1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: By investigating the effects of different detection wavelength, mobile phase and solvent on the peak profile of gastrodin, the present study improved the traditional RP-HPLC method for determining gastrodin in *Gastrodia elata* Bl.. Also, the effects of extraction solvent, extraction temperature, solid-liquid ratio and extraction time on the extraction rate of gastrodin were discussed. The results showed that the optimal working conditions of RP-HPLC were as follows: using Diamonsil C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) at ambient temperature, acetonitrile-water (3:97, V/V) as the mobile phase, flow rate 1.0 ml/min, detection wavelength 220 nm, and acetonitrile-0.05% phosphoric acid (3:97, V/V) as the solvent of gastrodin. The calibration curve was well linear in the range of 10 to 80 μg/ml, the regression equation was $y = 4.0264x + 0.6311$ with a determination coefficient of 0.9992. The limit of detection of this method was 2 ng. The relative standard deviations (RSDs) of precision and repeatability were 0.41% and 0.86%, respectively (n = 6), and the average spike recovery rate was 98.4% with a RSD of 0.84% (n = 6). The optimum extraction conditions of gastrodin from *Gastrodia elata* Bl. were determined as follows: 50% alcohol as extraction solvent, temperature 70 °C, ratio of solid to liquid 1:6 (g/ml), and extraction time 3 h.

Key words: *Gastrodia elata* Bl.; gastrodin; RP-HPLC; extraction technology

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)10-0077-05

天麻为兰科植物天麻(*Gastrodia elata* Bl.)的干燥块茎, 为常用名贵中药。该药性平、味甘, 具有平肝熄风, 止痉之功效。临床用于治疗头痛眩晕、肢体麻木、小儿惊风、癫痫抽搐、破伤风等症。近年来的研究发现, 天麻还具有增智、健脑、延缓衰老和增强机体免疫力的作用^[1]。天麻中含有天麻素(gastrodin)、天麻甙元(p-hydroxybenzyl alcohol)、天麻醚甙

(gastrodioside)、派立辛(parishin)、香草醇(vanillyl alcohol)、香草醛(vanillin)、β-谷甾醇(β-sitosterol)、对羟基苯甲醛(p-hydroxybenzaldehyde)、琥珀酸(succinic acid)、棕榈酸(palmitic acid)等成分^[2], 其中天麻素是天麻的主要有效成分, 含量高达 0.33%~0.67%^[3]。在传统中药利用中, 天麻常与钩藤、半夏、川芎、防风等配伍使用, 其开发利用主要集中在药用方面, 而其药

收稿日期: 2008-09-06

基金项目: 云南省自然科学基金项目(2005C0037M)

作者简介: 田洋(1982-), 男, 助教, 硕士研究生, 研究方向为保健食品开发与功能性评价。E-mail: tianyang216@yahoo.cn

* 通讯作者: 肖蓉(1965-), 女, 副教授, 本科, 研究方向为食品安全性和功能性评价。E-mail: xiaorong91515@163.com

食兼用、保健功能方面研究仍具有重大潜在价值。天麻产品的开发与研究应从简单的粗加工向深加工、提取、精制转化,扩大其药用,提高其药的质量和药效^[4],因此提取天麻活性成分并建立其测定方法具有十分重要的意义。

目前天麻素含量测定方法有高效液相色谱法、薄层析法、紫外分光光度法、毛细管电泳法等^[2-5]。在文献报道中多参照2005版《中国药典》采用高效液相色谱法测定天麻素含量,但在实验过程中发现参照2005版《中国药典》方法测定天麻中天麻素含量时,通过改变流动相和溶剂会对天麻素的测定结果产生很大影响,同时药典中关于天麻素的提取方法仅概略叙述,缺少具体工艺参数^[6],因此本研究改进了药典中关于天麻中天麻素含量的测定方法,以期建立更准确、灵敏度更高的RH-HPLC方法,并确定天麻素提取的最佳工艺条件,旨在为天麻药材的品质评价以及综合开发利用提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

天麻药材购于云南省昆明市菊花村药材市场,产地为云南省昭通市彝良县小草坝乡。

天麻素标准品(批号110807) 中国药品生物制品检定所;乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯)、磷酸(优级纯)和超纯水。

HP1100系列液相色谱系统(配有四元泵G1311A、自动进样器(ALS)G1313A、柱温箱G1316A和可变波长紫外检测器G1314A)、HP8453型紫外-可见分光光度计 美国惠普公司;DL-180A型超声波清洗器 常州市华普达教学仪器有限公司;RE-2000旋转蒸发器 上海亚荣仪器制造有限公司;BS210S电子天平称 北京赛多利斯天平有限公司。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈(150mm × 4.6mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(3:97, V/V)溶液; 流速 1ml/min; 柱温: 室温; 检测波长: 220 nm; 进样量: 20 μl。

1.2.2 天麻素标准品溶液的制备

精密称取0.008g天麻素标准品两份(A和B)各置于100ml容量瓶中,分别加入经超声处理30min的乙腈-水(3:97, V/V)溶液和乙腈-0.05%磷酸溶液(3:9, V/V)溶解,稀释至刻度,摇匀,配制成浓度为80 μg/ml的标准品溶液,待进样分析。

1.2.3 天麻供试品溶液的制备^[7]

精密称取天麻粉末(过80目筛)4.0029g,按料液比

1:10(g/ml)加入50%乙醇置70℃旋转蒸发器内水浴提取3次,随时补充被蒸发出的液体,每次提取1h,过滤,合并3次滤液,回收乙醇,提取液在70℃浓缩成浸膏状,将其分成等量的两份(C和D)各置于250ml容量瓶中,分别加入经超声处理30min的乙腈-水(3:97, V/V)溶液和乙腈-0.05%磷酸溶液(3:97, V/V)溶解,稀释至刻度,摇匀,将溶液经0.45 μm微孔滤膜过滤,待进样分析。

1.2.4 标准曲线的绘制^[8]

精密称取在80℃减压干燥1h的天麻素标准品0.01g于100ml容量瓶中,加入经超声处理30min的乙腈-0.05%磷酸(3:97, V/V)溶液溶解,定容,摇匀,配制成浓度为100 μg/ml的标准贮备液,用标准贮备液分别配制成10、20、40、60、80 μg/ml的标准工作溶液,按1.2.1色谱条件测定峰面积,以标准品进样浓度x(μg/ml)为横坐标,峰面积积分值y为纵坐标进行线性回归。回归方程为: $y = 4.0264x + 0.6311$, $R^2 = 0.9992$,天麻素标准品的浓度在10~80 μg/ml范围内与峰面积呈良好的线性关系,最低检测限为2 ng(图1)。

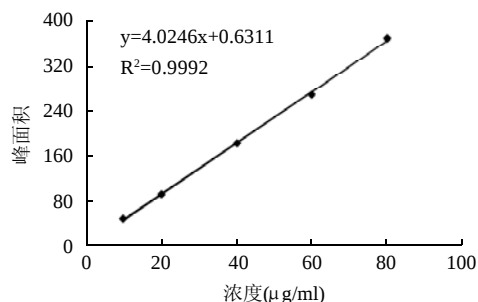


图1 天麻素标准曲线

Fig.1 Calibration curve of gastrodin for RP-HPLC determination

1.2.5 提取方法的选择^[9-10]

参考文献[6]提取方法进行提取。精密称取天麻粉末0.8g,置具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇50ml,称定重量,加热回流提取3h,放冷再称定重量,用稀乙醇补足减失的重量,滤过,即得。为了使天麻素的浸出更完全,本实验以天麻素浸出率为指标考察提取溶剂、提取温度、料液比及提取时间对天麻素浸出的影响,进一步完善药典的提取方法,确定最佳的工艺参数。

$$\text{天麻素浸出率(\%)} = \frac{C \times V \times 10^{-6}}{M} \times 100$$

式中: C 为试样溶液中天麻素浓度, μg/ml; V 为试样溶液体积, ml; M 为天麻素药材的质量, g。

1.2.5.1 提取溶剂的选择

精密称取天麻药材粉末(过80目筛)10g,分别按料液比1:10(g/ml)添加水、30%、50%、70%、95%乙醇置70℃旋转蒸发器内水浴浸提3次,随时补充被蒸发出

的液体, 每次提取 1h, 过滤, 合并 3 次滤液, 70℃ 浓缩成浸膏, 用经超声处理 30min 的乙腈-0.05% 磷酸(3:97, V/V)溶液溶解, 定容至 500ml, 摇匀, 将溶液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 按 1.2.1 中色谱条件进样分析。

1.2.5.2 提取温度的选择

精密称取天麻药材粉末(过 80 目筛)10g, 按料液比 1:10 加入 50% 乙醇置旋转蒸发仪水浴提取 3 次, 水浴温度分别设置为 50、60、70、80℃, 随时补充被蒸发出的液体, 每次提取 1h, 过滤, 合并 3 次滤液, 70℃ 浓缩成浸膏, 用经超声处理 30min 的乙腈-0.05% 磷酸(3:97)溶液溶解, 定容至 500ml, 摇匀, 将溶液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 按 1.2.1 中色谱条件进行进样分析。

1.2.5.3 料液比的选择

精密称取天麻药材粉末(过 80 目筛)10g, 分别按料液比 1:8、1:10、1:12 加入 50% 乙醇置 70℃ 旋转蒸发仪内水浴提取 3 次, 随时补充被蒸发出的液体, 每次提取 1h, 过滤, 合并 3 次滤液, 70℃ 浓缩成浸膏, 用经超声处理 30min 的乙腈-0.05% 磷酸(3:97)溶液溶解, 定容至 500ml, 摇匀, 将溶液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 按 1.2.1 中色谱条件进行进样分析。

1.2.5.4 提取时间的选择

精密称取天麻药材粉末(过 80 目筛)10g, 分别按料液比 1:10 加入 50% 乙醇置 70℃ 旋转蒸发仪内水浴提取 3、4、5、6、9h(提取时间分为均等的三份), 随时补充被蒸发出的液体, 过滤, 合并滤液, 70℃ 浓缩成浸膏, 定容至 500ml, 摇匀, 将溶液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 按 1.2.1 中色谱条件进行进样分析。

2 结果与分析

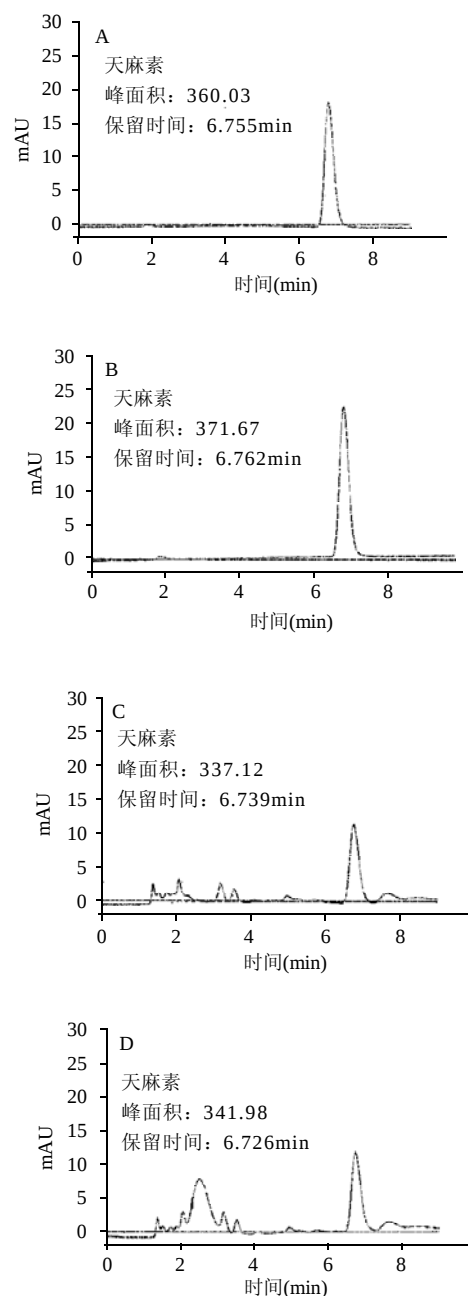
2.1 检测波长的选择

对天麻素标准品溶液(A、B)分别在 200~400nm 范围内进行紫外扫描, 结果显示天麻素标准品溶液(A、B)在 220nm 和 271nm 处均有吸收峰, 且 220nm 处的吸光度显著强于 271nm 处。虽然 220nm 接近末端吸收波长, 但所选择流动相中乙腈在该波长无近末端吸收峰, 故选择 220nm 作为检测波长, 其结果与 2005 年版《中国药典》上的记载相符^[6]。

2.2 流动相与溶剂的选择

按照 2005 版《中国药典》中天麻药材项下天麻素含量测定方法, 即用乙腈-0.05% 磷酸溶液(3:97, V/V)作为流动相, 用乙腈-0.05% 磷酸溶液(3:97, V/V)和乙腈-水(3:97, V/V)溶液分别作为天麻素标准品和天麻供试品的溶剂, 对天麻素进行测定。为了比较不同流动相及溶剂对天麻素出峰效果的影响, 本实验用乙腈-

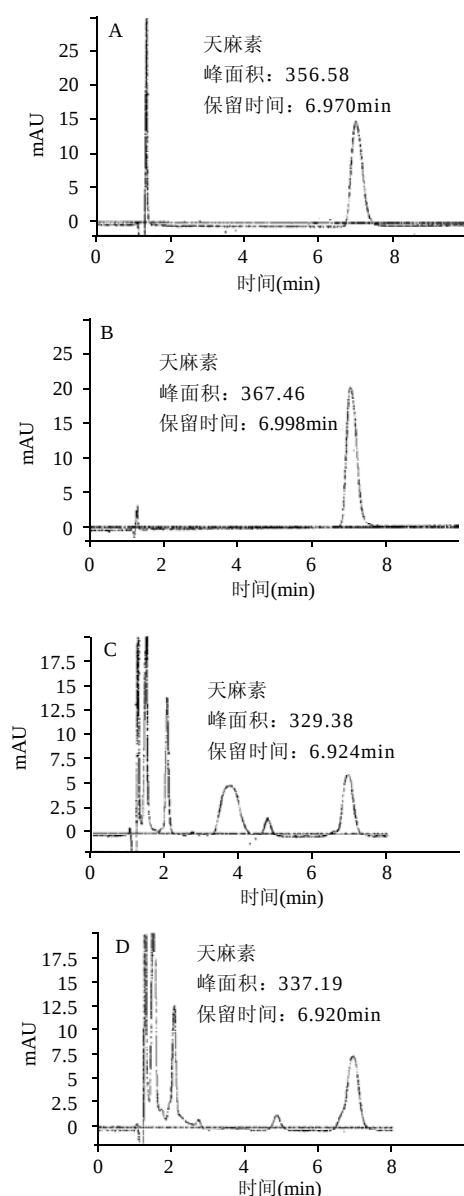
0.05% 磷酸溶液(3:97, V/V)、乙腈-水(3:97, V/V)溶液作为流动相和溶剂, 在检测波长 220nm 处, 对天麻素标准品溶液(A 和 B)及天麻药材供试品溶液(C 和 D)中的天麻素进行测定。色谱图见图 2、3。



A. 乙腈-水(3:97)溶液为溶剂的天麻素标准品溶液; B. 乙腈-0.05% 磷酸溶液(3:97)为溶剂的天麻素标准品溶液; C. 乙腈-水(3:97)溶液为溶剂的天麻供试品溶液; D. 乙腈-0.05% 磷酸溶液(3:97)为溶剂的天麻供试品溶液。

图2 乙腈-水(3:97)溶液为流动相的色谱图

Fig.2 RP-HPLC chromatograms of standard gastrodin and prepared gastrodin sample in acetonitrile-water (3:97, V/V) solution or acetonitrile-0.05% phosphoric acid (3:97, V/V) solution using acetonitrile-water (3:97, V/V) solution as mobile phase



A. 乙腈-水(3:97)溶液为溶剂的天麻素标准品溶液; B. 乙腈-0.05% 磷酸溶液(3:97)为溶剂的天麻素标准品溶液; C. 乙腈-水(3:97)溶液为溶剂的天麻供试品溶液; D. 乙腈-0.05% 磷酸溶液(3:97)为溶剂的天麻供试品溶液。

图3 乙腈-0.05% 磷酸溶液(3:97)为流动相的色谱图

Fig.3 RP-HPLC chromatograms of standard gastrodin and prepared gastrodin sample in acetonitrile-water (3:97, V/V) solution or acetonitrile-0.05% phosphoric acid (3:97, V/V) solution using acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution (3:97, V/V) as mobile phase

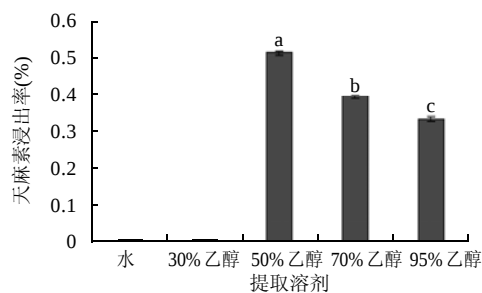
由图2、3可知,天麻素在不同流动相和溶剂中均能达到基线分离,用乙腈-水溶液作为流动相,天麻供试品溶液(C、D)中天麻素保留时间与天麻素标准品(A、B)保留时间一致,为6.7min;用乙腈-0.05%磷酸溶液作为流动相,天麻供试品溶液(C、D)中天麻素保留时间与天麻素标准品(A、B)保留时间一致,为6.9min,测得乙腈-水溶液和乙腈-0.05%磷酸溶液的pH值分别为6.63、3.12。结果表明,天麻素标准品溶液(A、B)和天麻供试

品溶液(C、D)中天麻素的迁移速度随流动相pH值下降而减慢,保留值增大,并且pH值的降低,导致天麻素峰型出现了展宽的趋势。同时发现天麻供试品溶液(C、D)和天麻标准品溶液(A、B)在乙腈-水溶液作为流动相时,它们的峰面积分别显著高于乙腈-0.05%磷酸溶液作为流动相的峰面积($p < 0.05$),说明流动相pH值的增加导致了天麻素吸光度增加,这样可以提高天麻素测定的灵敏度。综合考虑,选择乙腈-水溶液为流动相。

当溶剂为乙腈-0.05%磷酸溶液时,天麻素标准品溶液B和天麻药材供试品溶液D的流动相不论为乙腈-0.05%磷酸溶液还是乙腈-水溶液,它们的天麻素峰面积均显著高于溶剂为乙腈-水溶液(A、C)的天麻素峰面积($p < 0.05$),即峰面积 $B > A$ 、 $D > C$ 。说明天麻素易于溶解在较低pH值的极性溶液中,这样能更完全测出天麻中天麻素的含量,故选择乙腈-0.05%磷酸溶液为溶剂。

2.3 提取方法的选择

2.3.1 提取溶剂的选择



不同字母标记的数据差异显著, $p > 0.05$ 。下同。

图4 提取溶剂对天麻素浸出的影响

Fig.4 Effects of different extraction solvent on extraction yield of gastrodin

由图4可知,天麻用水提取,提取液黏稠,成膏状,后序工作无法进行;用30%乙醇提取天麻,提取液经 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后,溶液仍混浊,无法测定;当乙醇浓度大于50%时,随着乙醇浓度的增加,天麻素含量显著降低($p < 0.05$)。因此,本实验选用50%乙醇为最佳溶剂。

2.3.2 提取温度的选择

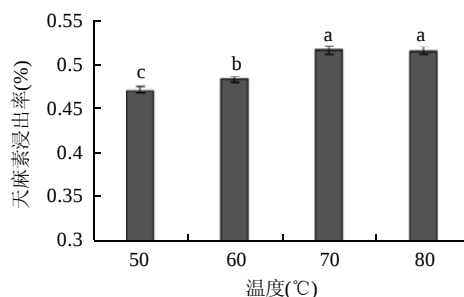


图5 温度对天麻素浸出的影响

Fig.5 Effects of temperature on extraction yield of gastrodin

由图5可知,提取温度在50~70℃之间,随着提取温度的升高天麻素的浸出率显著增加($p < 0.05$),提取温度为70℃时,天麻素的浸出率达到最大值;温度超过70℃时,天麻素浸出率不再增加($p > 0.05$)。因此,选择70℃为最佳提取温度。

2.3.3 料液比的选择

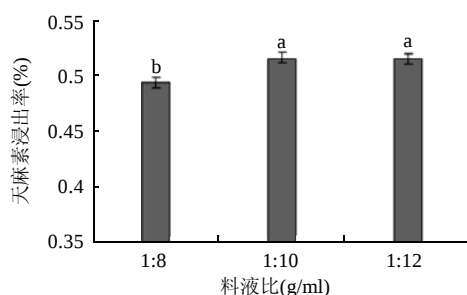


图6 料液比对天麻素浸出的影响

Fig.6 Effects of solid-liquid ratio on extraction yield of gastrodin

由图6可知,料液比由1:8(g/ml)到1:10(g/ml),天麻素浸出率随之升高($p < 0.05$),但提取溶剂继续增加,天麻素含量不再增加($p > 0.05$)。为了节约成本,故选择1:10(g/ml)为最佳料液比。

2.3.4 提取时间的选择

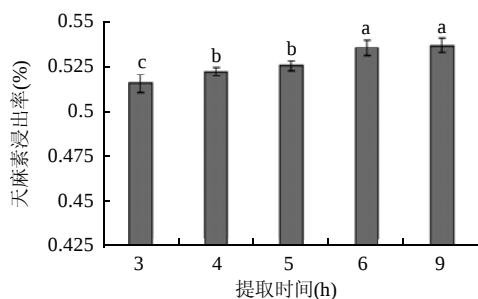


图7 时间对天麻素浸出的影响

Fig.7 Effects of extraction time on extraction yield of gastrodin

由图7可知,随着提取时间的延长,天麻素浸出率呈增加的趋势。在3~4h之间,天麻素浸出率显著增加($p < 0.05$);而5h与4h相比,天麻素浸出率之间的差异不显著($p > 0.05$),当提取时间为6h时,天麻素浸出率最高;随着时间的延长,天麻素浸出率不再增加($p > 0.05$)。为了提高生产效率,故选择最佳提取时间为6h。

2.4 精密度实验

精密度实验是在规定的测试条件下,对同一个均匀供试品,经多次取样测定所得结果之间接近的程度。取1.2.4中浓度为40 μg/ml的天麻素标准品溶液,进样20 μl,连续进样6次,分别记录峰面积,结果其RSD值为0.41%,表明仪器的精密度良好。

2.5 重复性实验

取同一批天麻药材样品6份,按筛选的最佳工艺条件提取,采用优化的色谱条件进行测定,分别记录峰面积,结果其RSD值为0.86%,表明该方法的重现性良好。

2.6 加标回收率实验

精密称取已知天麻素含量的同一批天麻药材6份,在每份样品中准确加入一定量的天麻素标准品,按筛选出的最佳工艺条件提取,采用优化的色谱条件进行测定,结果平均回收率为98.4%、RSD为0.84%(表1),表明该方法的回收率较好。

表1 回收率测定结果
Table 1 Average spike recoveries of gastrodin

编号	取样量(g)	样品中天麻素量(mg)	加入天麻素量(mg)	测得天麻素量(mg)	回收率(%)	平均值(%)	RSD(%)
1	1.0012	5.38	1.1	6.43	97.8	98.4	0.84
2	1.0066	5.41	1.2	6.52	98.1		
3	1.0097	5.42	1.2	6.55	97.4		
4	1.0057	5.40	1.3	6.65	98.5		
5	1.0032	5.39	1.1	6.42	99.1		
6	1.0045	5.40	1.0	6.36	99.6		

3 结论

3.1 通过优化2005年版《中国药典》记载的测定天麻药材中天麻素含量的色谱条件,成功地摸索出天麻中天麻素含量的RH-HPLC测定方法,提高了分析的准确度。该方法杂质干扰少,且精密度较高,重现性和回收率好,是一种理想的检测方法。

3.2 从天麻中提取天麻素的最佳工艺为:在温度70℃条件下,按料液比1:10加入50%乙醇,浸提3次,每次2h,共6h,天麻素的浸出效果最好。

参考文献:

- [1] 张赫名. 天麻的研究进展[J]. 中药研究与信息, 2005, 7(11): 19-22.
- [2] ZHAO Y K, CAO Q, XIANG Y Q, et al. Identification and determination of active components in *Gastrodia elata* Bl. by capillary electrophoresis [J]. Journal of Chromatography A, 1999, 849(1): 277-283.
- [3] 岑信钊. 天麻的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中药材, 2005, 28(10): 958-961.
- [4] 谢笑天, 李海燕, 王强, 等. 天麻化学成分研究概况[J]. 云南师范大学学报, 2004, 24(3): 22-24.
- [5] LI L L, ZHANG Z R, GONG T, et al. Simultaneous determination of gastrodin and ligustrazine hydrochloride in dog plasma by gradient high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 41(4): 1083-1087.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 39-40.
- [7] 刘金龙, 陈根洪, 郑小江. 提高天麻素提取纯度研究[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 29-332.
- [8] 吴春敏, 陈海滨. 天麻中天麻素含量测定方法的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(12): 1157-1159.
- [9] 王兴, 周明媚. 天麻中有效成分的提取工艺[J]. 华西药学杂志, 2003, 18(14): 269-270.
- [10] 郭增军, 苏纪兰, 王开, 等. 天麻提取工艺的研究[J]. 中药材, 2002, 25(5): 348-349.