

### 3 讨论

3.1 本实验比较了甲醇、50% 甲醇、乙醇 3 种提取溶剂,索氏、回流、超声 3 种提取方法,结果甲醇超声提取 30 min 即可提取完全,操作简便。

3.2 本实验比较了甲醇-水系统、乙腈-水系统、乙腈-甲酸-水系统、乙腈-磷酸-水系统、乙腈-醋酸铵-水系统的洗脱效果,结果在乙腈-水洗脱条件下,主要峰分离度较好;另外还对多个不同的洗脱梯度进行了比较,确定了最佳洗脱条件。比较了 Diamonsil C<sub>18</sub>柱、Agilent Zorbax Extend-C<sub>18</sub>柱和依利特 Hypersil ODS2 柱的分离效果,结果依利特 Hypersil ODS2 色谱柱分离效果最佳。

3.3 本实验通过对不同产地 13 批白鲜皮药材指纹图谱的研究,建立了白鲜皮对照指纹图谱,共标定出 11 个共有峰。各共有峰相对保留时间 RSD 小于 1%,而相对峰面积 RSD 差异较大,最高达 63.7%,且各批白鲜皮样品与共有模式的相似度均在 0.9 以上,由此可以认为不同批次药材中主要化学成分组成相似,但相对比例有明显差异,可能因为白鲜皮生产过程中受到土壤、气候等环境因素以及采收加工过程中诸多因素的影响。白鲜皮分布广泛,要满足对其全面的质量管理,尚需进行大量样本分析和性能比较研究。

### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 102.
- [2] 中科院植物志编辑委员会. 中国植物志 43 卷第 2 册[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 91-93.
- [3] 付永霞. 白鲜皮的抑菌作用[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(6): 238-239.
- [4] 杨佳明, 艾丹. 白鲜皮抗炎有效部位的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2209-2210.
- [5] 艾丹, 杨佳明. 大孔吸附树脂分离白鲜皮抗炎有效组分的实验研究[J]. 中医药信息, 2010, 27(3): 113-115.
- [6] 秦蒙, 国汉邦, 许扬. 白鲜皮水提物对 ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化早期病变形成的抑制作用[J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(3): 191-195.
- [7] 武海燕. 药用植物白鲜皮的化学成分及药理作用综述[J]. 内蒙古石油化工, 2007, 33(3): 50-51.
- [8] 杜程芳, 杨欣欣, 屠鹏飞. 白鲜皮的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(21): 1663-1666.
- [9] 李翔, 汤华钊, 苟小军, 等. 白鲜皮的化学成分研究[J]. 中药材, 2008, 31(12): 1816-1819.
- [10] 武子敬, 冉靛, 沈笑媛. 白鲜皮挥发油化学成分分析[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(30): 14693-14694, 14706.
- [11] 吴琴, 叶冲, 宋培浪, 等. 白鲜皮挥发油成分的 SPME-GC-MS 分析[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(1): 137-139.
- [12] 王锋, 徐宁宁. 中药白鲜皮的化学成分研究[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(10): 1865-1866.

## 梵净山仿野生天麻高效液相指纹图谱研究

田静<sup>1</sup>, 许亚玲<sup>2</sup>, 舒娟<sup>3</sup>, 王元辉<sup>3</sup>

(1. 贵州省药品集中采购服务中心 贵州 贵阳 550002; 2. 贵州省药品检验所 贵州 贵阳 550000; 3. 铜仁地区药品检验所 贵州 铜仁 554300)

摘要: 目的 建立天麻药材的指纹图谱质量分析方法。方法 采用高效液相色谱法,对所收集的 10 批天麻药材样品甲醇提取液进行了指纹图谱的测定。C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 磷酸水溶液 - 0.1% 磷酸甲醇溶液非线性梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 226 nm, 柱温 30 °C。天麻素作对照品。结果 图谱中主要色谱峰(含 6 个共有峰)均达到了基线分离, 从相似度计算结果可知, 梵净山仿野生天麻的指纹图谱与野生天麻的相似度均大于 0.90。而不同产地间的天麻药材样品相似度结果差异较大。结论 采用指纹图谱的相似度计算, 可以较好地区分不同产地的天麻药材。

关键词: 天麻; 指纹图谱; 高效液相色谱

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2011)09-1472-04

## HPLC fingerprint of pseudo-wild *Gastrodiae Rhizoma* in Mt. Fanjing

收稿日期: 2011-01-27

作者简介: 田静(1970—), 女(土家族), 副主任药师, 研究方向: 药品检验和质量分析。Tel: 13985340966, E-mail: 1346779299@eg.com

TIAN Jing<sup>1</sup>, XU Ya-ling<sup>2</sup>, SHU Juan<sup>3</sup>, WANG Yuan-hui<sup>3</sup>

( 1. Guizhou Provincial Service Center for Drugs Central Purchase, Guiyang 550002, China; 2. Guizhou Provincial Institute for Drug Control, Guiyang 550000, China; 3. Tongren District Institute for Drug Control, Tongren 553000, China)

**KEY WORDS:** *Gastrodiae Rhizome*; fingerprint chromatogram; HPLC

天麻为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎,为常用名贵中药,主产于四川、云南、贵州、陕西等省,安徽省大别山区、皖南山区也有出产。天麻具有平肝熄风功能,临床上用于头痛眩晕、肢体麻木、癫痫抽搐等症。目前从天麻药材中分离得到的化合物中,天麻素量最高,因此,天麻药材和其制剂产品均以天麻素为指标<sup>[1-2]</sup>。但现代临床和药理研究表明<sup>[3]</sup>,天麻制剂与天麻药材的功效是有很大的区别的;也有实验证明<sup>[4]</sup>,香莢兰醇、天麻苷元以及天麻中的酚性成分等都有生物活性。因此寻找一种全面的质量控制标准对天麻药材进行控制是十分重要的。指纹图谱是控制天然药物质量的有效方式之一。另外,天麻野生资源由于人为过度采集和适宜生态因子逐渐削弱而越来越少,远不能适应市场需求,自20世纪70年代中期开始大面积栽培供药用,目前天麻的栽培生产通常在庭院或林下、室内栽培,采用室内或塑料大棚育种<sup>[5]</sup>。贵州省铜仁地区德江、印江两县选择野生天麻分布相对集中的天麻原生林地,建立了仿野生天麻栽培基地,即在天麻生长的全过程几乎不改变天麻野生环境状态。为了尽快推进中药特色经济,建立天麻GAP基地,保护天麻种质资源,有必要对各产地天麻开展天麻质量的对比研究<sup>[6]</sup>。本实验通过对收集的10个天麻药材样品(包括野生天麻及对照药材)进行指纹图谱的研究,以比较野生与栽培品种以及不同产地样品间的差异。

## 1 实验材料

1.1 仪器与试剂 日本岛津LC-20AD高效液相色谱仪(具LC-20AD串联双泵,SPD-M20A二极管阵列检测器,CBM-20A系统控制器,SIL-20A自动进样器,CTO-40ASvp柱温箱,LCSolution色谱工作站。色谱柱:DIKMA C<sub>18</sub>(4.6 mm × 200 mm,5 μm,柱号8023933)。

AUW-120D电子天平、AY-120电子天平(日本岛津公司);DZ60电热恒温真空干燥箱;TCQ-250超声清洗器(北京医疗设备二厂)。

甲醇为色谱纯,水为超纯水,磷酸为分析纯。

天麻对照药材(中国药品生物制品检定所,批号120944-200507)。天麻素对照品(中国药品生物

制品检定所,批号110807-200205)

1.2 天麻样品来源 见表1。

表1 天麻样品来源

Tab. 1 *Gastrodiae Rhizome* sample sources

样品号	药材产地
1	印江梵净山(野生)
2	德江高山(仿野生)
3	德江沙溪(仿野生)
4	印江豆湊林(仿野生)
5	德江天宇(仿野生)
6	对照药材
7	毕节大方(栽培)
8	湖北(栽培)
9	安徽(栽培)
10	云南(栽培)

以上样品均经铜仁地区药品检验所工作人员鉴定为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎。

## 2 实验方法

2.1 色谱分析条件 色谱柱:DIKMA C<sub>18</sub>(4.6 mm × 200 mm,5 μm,柱号8023933);流动相:A为0.1%磷酸水溶液,流动相B为0.1%磷酸甲醇溶液,二元梯度分离(梯度条件见表2);体积流量:1 mL/min;检测波长:226 nm;柱温:30 °C;进样量:20 μL。所有成分在60 min内出峰。

表2 梯度条件

Tab. 2 Gradient conditions

时间	A/%	B/%
0	97	3
15	93	7
65	0	100
70	97	3

2.2 供试品溶液的制备 取样品粉碎成粗粉,在60 °C减压干燥1 h,粉碎,取粉末(过五号筛)约0.8 g,加10 mL60%甲醇超声提取1 h,静置2 h,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液即得。

2.3 空白试验 取制备供试品溶液所用60%甲醇为空白溶液,按上述色谱条件进样分析,结果表明:保留时间位于0~10 min为空白溶剂峰。

2.4 样品分析 精密吸取供试品溶液20 μL,注入液相色谱仪,按上述色谱条件进样分析。得到各样品的HPLC图谱。见图1、图2。

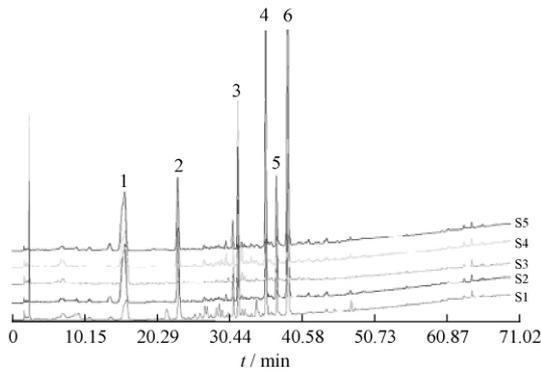


图1 梵净山野生及仿野生天麻色谱图

1. 天麻素 s1. 印江梵净山 s2. 德江高山  
s3. 德江沙溪 s4. 印江豆湊林 s5. 德江天宇

Fig. 1 The wild and pseudo-wild *Gastrodiae Rhizoma* of Mt. Fanjing chromatograms

1. Gastrodin s1. Yingjiang Mt. Fanjing s2. Dejiang Gaoshan  
s3. Dejiang Shaxi s4. Yinjiang Doucoulin s5. Dejiang Tianyu

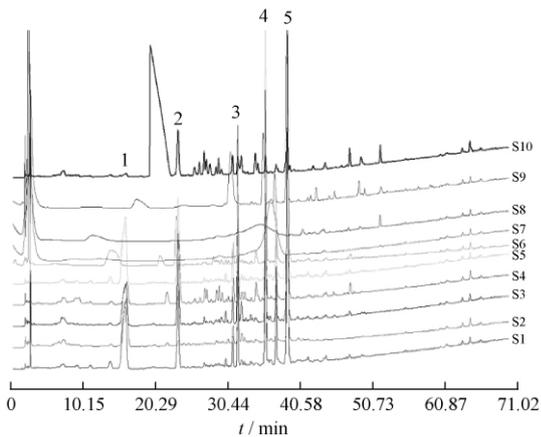


图2 天麻样品色谱图

1. 天麻素 s1. 印江梵净山 s2. 德江高山 s3. 德江沙溪 s4. 印江豆湊林 s5. 德江天宇 s6. 对照药材 s7. 毕节大方 s8. 湖北 s9. 安徽 s10. 云南

Fig. 2 *Gastrodiae Rhizoma* sample chromatograms

1. Gastrodin s1. Yingjiang Mt. Fanjing s2. Dejiang Gaoshan s3. Dejiang Shaxi s4. Yinjiang Doucoulin s5. Dejiang Tianyu s6. referene herb s7. BijieDafang s8. Hubei s9. Anhui s10. Yunnan

### 3 实验结果

#### 3.1 方法学考察

3.1.1 稳定性实验 取同一份供试品溶液分别于0、2、4、6、8、10、12、24h等8个时间点进行检测,记录色谱图中各色谱峰的保留时间和峰面积。直观观察指纹图谱的全貌无明显变化,用相似度软件计算,结果相似度均大于0.98,表明在此时间段内供试品溶液的成分是稳定的。

3.1.2 精密度实验 取同一供试品溶液,连续进样5次,考察进样精密度,用相似度软件计算,结果相

似度均大于0.99,表明供试品进样精密度良好。

3.1.3 重现性实验 取同一批次样品5份,按2.2项下方法制成供试品溶液,分别进样测定,用相似度软件计算,结果相似度均大于0.99,表明本法测定的重现性良好。

#### 3.2 指纹图谱标准的建立

3.2.1 参照图谱 本实验采用野生天麻样品为参照物,所以在相似度计算时采用野生天麻样品指纹图谱为参照图谱。并采用国家药典委员会编写的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A版”计算软件进行相似度测定,生成标准对照指纹图谱。

3.2.2 时间窗宽度 0.10 min。

3.2.3 数据剪切 空白试验表明,0~10 min为空白溶剂峰,为避免对相似度结果的影响,将供试品指纹图谱中0~10 min内的色谱峰予以剪切。

3.2.4 校正方式 由于该实验采用了梯度洗脱方式,供试品指纹图谱中色谱峰的保留时间可能与对照图谱中相应的色谱峰不一致,故采用多点匹配,以中位法生成对照图谱。

3.2.5 指纹图谱相似度计算结果见表3、表4。

表3 梵净山野生及仿野生天麻样品相似度计算结果

Tab. 3 The wild and pseudo-wild *Gastrodiae Rhizoma* samples of Mt. Fanjing similarity calculation results

编号	产地	相似度(参照)	相似度(对照)
1	印江梵净山(野生)	1.000	0.952
2	德江高山(仿野生)	0.935	0.984
3	德江沙溪(仿野生)	0.911	0.944
4	印江豆湊林(仿野生)	0.964	0.977
5	德江天宇(仿野生)	0.935	0.984

表4 所有天麻样品相似度计算结果

Tab. 4 All the *Gastrodiae Rhizoma* sample similarity calculation results

编号	产地	相似度(参照)	相似度(对照)
1	印江梵净山(野生)	1.000	0.878
2	德江高山(仿野生)	0.832	0.890
3	德江沙溪(仿野生)	0.909	0.884
4	印江豆湊林(仿野生)	0.869	0.880
5	德江天宇(仿野生)	0.832	0.890
6	对照药材	0.737	0.854
7	毕节大方(栽培)	0.024	0.025
8	湖北(栽培)	0.025	0.025
9	安徽(栽培)	0.118	0.087
10	云南(栽培)	0.089	0.067

### 4 讨论

4.1 检测波长的确定 曾选用220、226、254、270

nm 等波长检测并观察其色谱图,结果在 226 nm 处各色谱峰均有较好的紫外吸收,色谱信息最为丰富。因此,选择该波长为检测波长。

4.2 流动相的选择 天麻药材所含成分复杂且极性范围跨度很大,等度洗脱很难分离,故采用梯度洗脱方式。酚类成分呈弱酸性,酸性缓冲系统比纯水系统分离更优。分别比较了 0.1% 醋酸水系统<sup>[7]</sup>和 0.1% 磷酸水系统,发现两者的分离效果相近,考虑到中国药典采用磷酸水系统测定天麻素量,故选择磷酸水系统,最终确定 0.1% 磷酸水溶液-0.1% 磷酸甲醇溶液为流动相。

4.3 提取方法及溶剂的选择 提取方法曾选用方法 1,取粉末 4 g,回流提取 1 h,定容,用 0.45 μm 滤膜滤过;方法 2,取粉末 0.8g,超声处理 1 h,静置 2 h,定容,用 0.45 μm 滤膜滤过。提取溶剂曾分别采用甲醇、60% 甲醇、稀乙醇、水提取,经实验比较,采用 60% 甲醇为溶剂、方法 2 提取处理样品所得实验效果最佳,并且处理方法操作简便、可行。

4.4 记录时间的选择 按上述色谱条件,记录 60 min 后,保持流动相比例不变继续 45 min 色谱图(即记录 105 min 指纹图谱)经与空白色谱图比较,保留时间 60~105 min 内为空白溶剂峰,故确定分析时间为 60 min。

4.5 从相似度计算结果来看,铜仁地区德江、印江两县选择野生天麻分布相对集中的天麻原生林地进行栽培的仿野生天麻,由于其生长环境与野生天麻较为接近,其指纹图谱与野生天麻的相似度均大于 0.90。

4.6 从以野生天麻指纹图谱作为参照图谱得到的各个产地样品图谱的相似度结果来看,所收集的 10 个天麻药材(包括对照药材),由于其产地、生长年限、采收季节、加工工艺等影响天麻药材内在质量的因素都无法明确,所得到的指纹图谱所表达的信息,仅代表天麻药材商品的整体情况,故而 10 个样品的相似度计算结果差异较大,1~6 号样在 1.000~0.737(参照)和 0.878~0.854(对照),而 7~10 号样为 0.024~0.118(参照)和 0.025~0.087(对照)。本实验还同时对上述样品按中国药典方法进行了定量测定,从天麻素测定结果来看,除云南产天

麻样品外,其余样品的天麻素量均远高于药典标准,因而进一步说明了天麻药材所含成分复杂,光以天麻素为质量控制指标无法反映其质量优劣,因此,研究天麻药材中其它成分的变化情况为天麻药理学研究和最大化利用提供科学依据,同时寻找一种全面的质量控制标准对天麻药材进行控制是十分重要的。采用指纹图谱的相似度计算,可以较好地区分不同产地的天麻药材(见表 4)。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<sup>[8]</sup>但在中药指纹图谱中,可能还含有很多未知化合物的信息,该对它们作如何处理,仍是一个尚待研究的问题。

4.7 另外,根据对天麻素测定结果的分析,野生天麻的天麻素量高于药典标准,但个体差异较大,这可能与采挖的野生天麻 60% 以上是抽苔开花营养被消耗的春麻有关。而仿野生天麻是选择野生天麻分布相对集中的天麻原生林地进行栽培,并且是在其质量最佳时期采挖,所含天麻素的量均远高于药典标准。由于野生资源的匮乏,野生天麻完全不能满足市场的需求,因此,建立符合国家 GAP 规范要求的天麻栽培基地来满足市场的需求是切实可行的。

#### 参考文献:

- [1] 杨世林,兰进,徐锦堂.天麻的研究进展[J].中草药,2000,31(1):66.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2010年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:54.
- [3] 熊建明.天麻药理学研究进展[J].中国药理学报,1987,8(1):57.
- [4] 郑虎占.天麻的化学和药理学研究概况[J].中国现代研究与应用,1997,1:897.
- [5] 刘杰,王春霞.栽培天麻与野生天麻质量比较[J].井冈山医学专报,2004,11(4):85-86.
- [6] 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.
- [7] 王莉,程孟春,育红斌,等.天麻液相色谱指纹图谱研究[J].中草药,2006,37(9):1402-1405.
- [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.