

反相高效液相色谱法同时测定天麻中天麻素和 3 种核苷

刘红*, 陈燕芹, 罗树常, 夏志, 蔡丽

- (1. 毕节学院化学化工实验教学中心, 贵州 毕节 551700;
2. 贵州省应用化学特色重点实验室, 贵州 毕节 551700)

[摘要] 目的:建立同时测定天麻中天麻素和 3 种核苷含量的 RP-HPLC 方法。方法:采用 ZORBAX-SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相 0.1% 磷酸水溶液-甲醇梯度洗脱,柱温 25 °C,流速 0.6 mL·min⁻¹,检测波长 270 nm。结果:天麻素、尿苷、鸟苷和腺苷分别在 0.286~4.29 μg ($r=0.9999$), 0.0289~0.4335 μg ($r=0.9997$), 0.0668~1.002 μg ($r=1.0000$), 0.1356~2.034 μg ($r=1.0000$) 与峰面积线性关系良好。结论:该测定方法简便、快速、准确,可以作为天麻的质量控制方法之一。

[关键词] 天麻素;尿苷;鸟苷;腺苷;高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0081-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170081

Determination of Three Glycosides and Gastrodine Contents in Gastrodiae Rhizoma by RP-HPLC

LIU Hong*, CHEN Yan-qin, LUO Shu-chang, XIA Zhi, CAI Li

- (1. Experiment Teaching Center for Chemistry and Chemical Engineering, Bijie University, Bijie 551700, China;
2. Key Laboratory on Applied Chemistry, Bijie 551700, China)

[Abstract] **Objective:** The study was performed to establish the RP-HPLC gradient elution method for determination of three glycosides and gastrodine contents in Gastrodiae Rhizoma. **Method:** RP-HPLC gradient elution method was used. The extracts were separated on a ZORBAX-SB-C₁₈ analytical column (4.60 mm × 250 mm, 5 μm) with CH₃OH-0.1% phosphoric acid as mobile phase, the UV detection wavelength was set at 270 nm, the flow rate fixed at 0.6 mL·min⁻¹ and the column temperature was maintained at 25 °C. **Result:** The linear ranges of gastrodine, uridine, guanosine and adenosine were 0.286-4.29 μg ($r=0.9999$), 0.0289-0.4335 μg ($r=0.9997$), 0.0668-1.002 μg ($r=1.0000$), 0.1356-2.034 μg ($r=1.0000$), respectively. **Conclusion:** This method is fast, simple and accurate, which can be used for quality control of Gastrodiae Rhizoma.

[Key words] gastrodine; uridine; guanosine; adenosin; HPLC

天麻是我国名贵的中药材之一,是药食两用植物^[1-3]。天麻性味甘平,具有平肝息风止痉、祛风通络等功效^[2],主产于贵州、云南等地。天麻的主要活性成分为天麻素(gastrodine, gas),具有镇定、安神和镇痛等中枢抑制作用^[4]。此外,天麻中还含有尿苷、腺苷等活性成分,腺苷等核苷类在调节免疫和抗

肿瘤方面有重要作用^[5-6]。《中国药典》仅把天麻素作为天麻药材质量的评价指标,以单一成分作为质量控制指标的方法不能全面的评价其质量^[6],为更加客观、科学、全面地评价天麻质量,核苷类成分和天麻素的同时测定,对于全面评价天麻药材的质量

[收稿日期] 20140120(004)

[基金项目] 贵州省科技厅联合基金项目(黔科合 J 字 LKB[2013]05 号);贵州省教育厅大学生创新项目(201310668005);毕节学院实验室开放基金项目(毕院教 OLF NO[2013]120020 号)

[通讯作者] *刘红,硕士,副教授,从事光谱分析方法的研究及应用, Tel:13698566804, E-mail:hliu315@126.com

有着重要的意义。本文根据文献报道的相关天麻素^[7-8]和核苷类化合物^[9]HPLC 含量测定方法,建立了同时测定天麻素和 3 种核苷的方法,可为天麻的质量评价提供更全面参考。

1 材料

1.1 仪器 1260 系列高效液相色谱系统(美国 Agilent,包括 VL 型二级管阵列检测器),BSA224S 型电子分析天平(德国赛多利斯),MDS-2002AT 型控温控压微波萃取仪(上海新仪)。

1.2 试药 天麻素(批号 29132,含量 $\geq 98\%$)对照品购于阿拉丁试剂(上海)有限公司,鸟苷(批号 20120302,含量 $\geq 98\%$)对照品购于国药集团化学试剂公司,腺苷(批号 22709214,含量 $\geq 98\%$)、尿苷(批号 054K1280,含量 $\geq 99\%$)对照品购自 Sigma 公司,纯净水(杭州娃哈哈有限公司),甲醇为色谱纯,天麻购于毕节市各县,经毕节学院植物教研室张以中博士鉴定为兰科多年生寄生植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 ZORBAX-SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流速 0.6 mL · min⁻¹,检测波长 270 nm,柱温 25 °C。流动相 0.1% 磷酸水(A)-甲醇(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 97% ~ 95% A; 10 ~ 15 min, 95% ~ 80% A; 15 ~ 20 min, 80% ~ 60% A)。

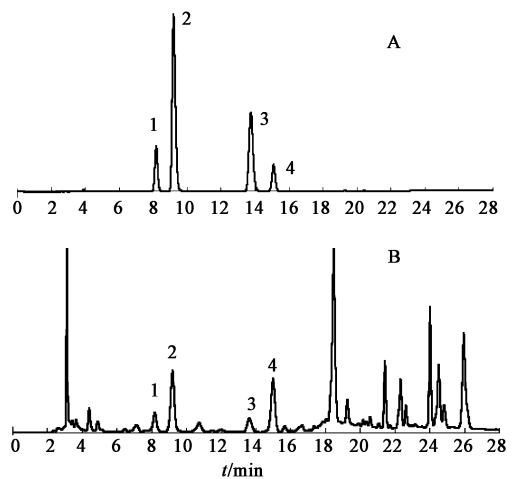
2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的制备 分别准确称取天麻素、鸟苷、腺苷、尿苷对照品适量于同一 10 mL 量瓶中,配成含尿苷 14.46 mg · L⁻¹,鸟苷 33.4 mg · L⁻¹,腺苷 67.8 mg · L⁻¹,天麻素 143 mg · L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取 0.5 g 干燥的天麻药材粉末(过 60 目筛)精密称定,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,准确加水 25 mL,称重,于 25 °C 下超声提取 20 min,取出冷却,用超纯水补足减少质量,在 4 000 r · min⁻¹ 离心分离 10 min,过 0.45 μm 滤膜,取续滤液备用。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适应性试验 按 2.1 项下的色谱条件对供试品溶液、对照品溶液取样 20 μL 进行测定,结果天麻素、尿苷、鸟苷和腺苷的理论塔板数均不低于 1 万,天麻素及 3 种核苷与周围峰的分度均 > 1.5,拖尾因子也符合含量测定要求。对照品及天麻样品(毕节大方)的色谱见图 1。



A. 对照品; B. 样品; 1. 尿苷; 2. 鸟苷; 3. 腺苷; 4. 天麻素
图 1 天麻的 HPLC

2.3.2 线性考察 分别精密吸取 2.2.1 项下混合对照品溶液 2, 5, 10, 15, 20, 30 μL 进样,按 2.1 项下色谱条件测定峰面积。以进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归。结果天麻素的回归方程为 $Y = 238.28X + 2.53$ ($r = 0.9999$),线性范围 0.286 ~ 4.29 μg;尿苷的回归方程为 $Y = 3361.07X - 5.19$ ($r = 0.9997$),线性范围为 0.0289 ~ 0.4335 μg;鸟苷的回归方程为 $Y = 6678.94X - 14.61$ ($r = 1.0000$),线性范围 0.0668 ~ 1.002 μg;腺苷的回归方程为 $Y = 1833.82X - 9.47$ ($r = 1.0000$),线性范围 0.1356 ~ 2.034 μg。

2.3.3 精密度试验 精密吸取 2.2.1 项下混合对照品溶液 20 μL 进样,测定峰面积。计算得天麻素、尿苷、鸟苷和腺苷 4 种成分峰面积的 RSD 分别为 1.39%, 0.47%, 0.73%, 1.43%,表明本方法的精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一样品,按照 2.2.2 项下制备供试品溶液,将供试品溶液在 25 °C 下放置 0, 1, 3, 5, 8, 12, 24, 48 h,进样测定 20 μL 各自色谱峰面积,天麻素、尿苷、鸟苷和腺苷峰面积的 RSD 分别为 1.49%, 1.22%, 0.50%, 1.54%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.3.5 重复性试验 精密称取同一天麻样品粉末按 2.2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件各进样 20 μL,计算,结果天麻素、尿苷、鸟苷和腺苷的平均质量分数分别为 5138.13, 119.59, 203.90, 202.34 μg · g⁻¹, RSD 分别为 1.53%, 0.94%, 1.50%, 1.57%,说明本方法重复性较好。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取 9 份已知含量

(毕节大方)的天麻粉末 0.5 g 于 25 mL 具塞锥形瓶中,3 份为一组,按供试品溶液的制备方法加入适量对照品制成低、中、高 3 个质量浓度的加标供试品溶液,按 2.1 项色谱条件分别进样 20 μL ,测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 天麻中 4 种成分的加样回收率

成分	样品中量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均值/%	RSD/%			
尿苷	60.15	30.19	90.83	101.61	100.56	1.63			
	60.17	30.19	90.30	99.80					
	60.19	30.19	91.22	102.78					
	60.18	72.30	131.12	98.12					
	60.19	72.30	134.09	102.22					
	60.21	72.30	133.41	101.24					
	60.18	144.60	202.37	98.34					
	60.15	144.60	204.54	99.86					
	60.17	144.60	206.37	101.11					
	鸟苷	102.56	50.10	149.86			94.41	95.11	1.17
		102.58	50.10	151.23			97.10		
		102.62	50.10	150.29			95.14		
102.60		100.20	198.04	95.25					
102.62		100.20	196.86	94.05					
102.66		100.20	196.54	93.69					
102.60		167.00	260.50	94.55					
102.56		167.00	261.74	95.31					
102.58		167.00	263.72	96.49					
腺苷		101.78	56.50	155.78	95.58	96.86	1.33		
	101.80	56.50	155.83	95.64					
	101.84	56.50	156.54	96.82					
	101.82	113.00	213.58	98.91					
	101.84	113.00	209.98	95.70					
	101.88	113.00	212.33	97.74					
	101.82	226.00	317.90	95.61					
	101.78	226.00	323.79	98.24					
	101.80	226.00	322.10	97.48					
	天麻素	2 584.48	715.00	3279.63	97.22			95.74	1.58
2 584.99		715.00	3264.10	94.98					
2 586.02		715.00	3284.67	97.71					
2 585.51		2145.00	4641.47	95.85					
2 586.02		2145.00	4682.60	97.74					
2 587.05		2 145.00	4 637.70	95.60					
2 585.51		4 290.00	6 642.06	94.56					
2 584.48		4 290.00	6 604.71	93.71					
2 584.99	4 290.00	6 630.31	94.30						

2.4 样品含量分析 分别称取 3 份不同地方的天麻样品(过 60 目筛),按 2.2.2 项下操作,在上述色谱条件进行分析,采用标准曲线法计算含量,结果见表 2。从表 2 可以看到,不同来源的天麻样品中天麻素、尿苷、鸟苷、腺苷含量略有差异。

表 2 天麻样品中 4 种成分含量测定 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

产地	尿苷	鸟苷	腺苷	天麻素
毕节大方	118.52	198.83	196.77	5 048.60
毕节纳雍	118.61	204.61	202.24	5 102.57
毕节七星关区	130.68	208.72	205.60	5 188.83

3 讨论

以混合对照品进样,分别对天麻素和 3 种核苷用 DAD 检测器在 190~400 nm 下进行检测,可以观测到天麻素在 225,270 nm 有最大吸收;鸟苷和腺苷在 256 nm 处都有较大的吸收峰,尿苷在 275 nm 有较大的吸收峰,综合考虑,选择 270 nm 作为其检测波长。

本试验对室温冷浸、超声辅助提取和微波辅助提取 3 种提取方法进行了考察,试验结果表明,微波提取法重复性较差,超声法提取效率及重复性都较好;在超声时间上选择了 5,10,20,30,40 min 分别做试验,结果表明 20 min 时 4 种化合物的提取率都已达到最大,增加时间对提取率无明显提高,因此试验选择超声提取时间为 20 min。

本方法前处理简单、快速,线性范围宽,精密度高,回收率高,可满足日常样品的检测需求。测定结果表明,天麻中不仅含有天麻素,还含有在调节免疫和抗肿瘤方面有重要作用核苷类物质。

[参考文献]

- [1] 李翠芹,陈桐. ICP-AES 测定黔产天麻中微量元素[J]. 光谱实验室, 2007, 24(4):570.
- [2] 王勋,罗珊珊,蒋嘉焯,等. 酶解法提取天麻多糖的研究[J]. 中药材, 2013, 36(1):137.
- [3] 赵杨,康志娇,周欣,等. 药食两用植物——天麻[J]. 贵州师范大学学报:自然科学版, 2013, 31(4):9.
- [4] 门金玉,马丽丽,金艺,等. 天麻素在大鼠体内的药物动力学[J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(9):729.
- [5] 王莉,肖红斌,梁鑫淼. 天麻化学成分研究(III)[J]. 中草药, 2009, 40(8):1186.
- [6] 闫宝庆,张晖芬,逢楠楠,等. RP-HPLC 同时测定天麻中 4 种成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22):2903.
- [7] 金虹,李凤,段宁. 天麻提取物工艺及其功效成分含量的分析[J]. 中药材, 2009,32(5):799.
- [8] 徐顶巧,周建军,刘益红. 天麻中天麻素提取检测方法研究[J]. 中药材, 2013, 35(11):1799.
- [9] 陈燕芹,刘红,张俊. 反相高效液相色谱法同时测定半夏中尿苷鸟苷和腺苷[J]. 医药导报, 2013, 32(12):1634.

[责任编辑 顾雪竹]