

天麻有效成分巴利森苷的降解规律分析

田紫平^{1,2}, 肖慧¹, 冯舒涵¹, 刘德文¹, 程锦堂¹, 陈莎^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 贵州益佰制药股份有限公司, 贵阳 550008)

[摘要] 目的: 巴利森苷是天麻中已经明确的具有临床疗效的活性成分之一, 其结构式是由天麻素和柠檬酸组成, 在蒸煮加热过程中, 易发生降解反应, 从而使天麻炮制后的天麻素含量增加, 本文拟通过一定的技术与方法研究巴利森苷的降解规律。方法: 以反应动力学为基础, 运用 HPLC-DAD-ESI-MSⁿ 技术系统研究天麻中主要成分巴利森苷的降解动力学特征和降解机制。结果: 温度和 pH 是影响巴利森苷稳定的主要因素, 其降解途径表现为酯键的断裂及天麻素残基的不断丢失, 同时推导了巴利森苷可能的降解路径。结论: 巴利森苷在一定条件下与天麻素之间可能存在转化, 天麻炮制后天麻素含量增加可能来源于巴利森苷类成分的转化, 建议在天麻的生产过程中需控制好加工条件, 为该药材的后续加工和产业化研究提供参考。

[关键词] 天麻; 巴利森苷; 降解路径; 天麻素; 降解动力学; 温度

[中图分类号] R283; R943.1; O657.6; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)23-0018-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017230018

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170912.1151.014.html>

[网络出版时间] 2017-09-12 11:51

Analysis of Degradation Mechanism of Parishin in Gastrodiae Rhizoma

TIAN Zi-ping^{1,2}, XIAO Hui¹, FENG Shu-han¹, LIU De-wen¹, CHENG Jin-tang¹, CHEN Sha^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Guizhou Yibai Pharmaceutical Co. Ltd., Guiyang 550008, China)

[Abstract] **Objective:** Parishin is one of the main bioactive ingredients in Gastrodiae Rhizoma with multiple beneficial properties, its structural formula is composed of gastrodin and citric acid, the degradation reaction of parishin is easy to occur in the cooking and heating process. This paper was in order to study on the degradation mechanism of parishin in processing of Gastrodiae Rhizoma by certain techniques and methods. **Method:** Based on the reaction kinetics, HPLC-DAD-ESI-MSⁿ was employed to investigate the characters of kinetics and mechanism of degradation of parishin in aqueous solution. **Result:** Temperature and pH were the main factors affecting the stability of parishin, and the hydrolysis of ester bond in the parishin was the primary degradation pathways, furthermore, a possible primary degradation pathway of parishin based on MS fragmentation characteristics was proposed. **Conclusion:** The increase in gastrodin content may be derived from the conversion of parishin, it is suggested that the processing conditions should be controlled during the production process of Gastrodiae Rhizoma.

[Key words] Gastrodiae Rhizoma; parishin; degradation pathway; gastrodin; degradation kinetics; temperature

天麻又名赤箭、独摇芝、定风草等, 为兰科天麻属植物天麻的干燥块茎, 是一种名贵的传统中药材,

主要用于治疗各种头晕、头痛、风湿、四肢痉挛等^[1-3]。从中分离已得到酚酸类、甾醇及有机酸等

[收稿日期] 20170525(008)

[基金项目] 中药国际贸易中安全性关键环节研究项目(Z2015024)

[第一作者] 田紫平, 从事中药学研究, Tel: 0851-84716687, E-mail: 523321539@qq.com

[通讯作者] * 陈莎, 博士, 副研究员, 从事药用植物化学分析研究, Tel: 010-64032496, E-mail: schen@icmm.ac.cn

化学成分^[4-8],其中酚酸类成分为主要活性成分,代表性成分有天麻素、巴利森苷及其衍生物,具有镇静、镇痛、安眠和神经保护作用^[9-10]。巴利森苷及其衍生物,其结构式是由天麻素和柠檬酸组成,在蒸煮加热过程中,易发生降解反应,从而使炮制后天麻素的含量增加^[11-12]。炮制加工是影响天麻化学组成和天麻素含量的重要因素^[13]。研究天麻有效成分巴利森苷在不同条件下的降解规律具有重要意义。

天麻素和巴利森苷是天麻中的活性成分,2015年版《中国药典》中将天麻素作为质量评价的指标性成分之一,但是文献报道天麻素的含量受温度和溶剂等因素的影响^[14],在不同温度、溶剂条件下,含量差别很大。其中结合型天麻素^[15](巴利森苷,巴利森苷 B,巴利森苷 C 等),在药材中的含量远高于按 2015 年版《中国药典》方法测得的游离型天麻素的含量,前期研究表明天麻素含量的差别有可能是由巴利森苷类成分不稳定引起的。一般影响药物稳定性的因素主要包括 2 个方面:①药物化学结构,对于巴利森苷而言,最主要特征在于其由三分子天麻素和一分子柠檬酸缩合而成的,酯键的存在决定了其在水溶液中的不稳定性;②药物所处的条件,对于液体制剂而言,主要包括溶液的 pH 和温度等。目前关于巴利森苷的稳定性研究尚未见文献报道。

本实验针对巴利森苷在不同条件下稳定性进行考察,采用 HPLC 检测不同影响因素下巴利森苷含量的变化情况,结合 LC-MS 研究巴利森苷的降解产物,以解析其降解规律和降解路径,为控制天麻药材的稳定性提供依据,同时为天麻素在加工炮制前后及不同条件下的不稳定性提供一定的科学依据。

1 材料

G6545A 型双压线性离子阱高分辨率组合型质谱仪(美国 Thermo 公司),UltiMate 3000 型高效液相色谱仪(美国戴安公司),BS224S 型 1/10 万电子分析天平 and PB-10 型 pH 计(德国赛多利斯股份有限公司)。天麻素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 0807-9702,纯度 > 99%),巴利森苷、巴利森苷 B 和巴利森苷 E 对照品(自制,均经 HPLC 按面积归一化法测定,纯度均 ≥ 98%),水为娃哈哈纯净水,乙腈、甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 检测条件 色谱条件为 Merck Purospher STAR RP-18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.05% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 5% ~ 15% B; 10 ~ 20 min, 15% ~ 35% B;

20 ~ 22 min, 35% ~ 90% B),流速 1 mL·min⁻¹,进样量 50 μL,柱温 35 °C,检测波长 220 nm。质谱条件为 LC 流出液以 1:1 的分流比例进入离子源,雾化气为高纯氮气(N₂),喷雾电压 40 V,干燥气温度 350 °C,干燥器流速 10 L·min⁻¹,全扫描质谱范围 *m/z* 100 ~ 1 200,目标化合物相对分子质量 *m/z* 700,化合物稳定性 70%,碰撞能量 30% ~ 100%。在 MS 分析过程中,每一级扫描的丰度最高的离子将被选择作为下一级质谱分析的母离子。

2.2 巴利森苷的降解试验

2.2.1 巴利森苷的降解过程 精密称取巴利森苷对照品 10.03 mg,加甲醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中,得 401.2 mg·L⁻¹ 储备液,放入 -4 °C 冰箱中备用。每次实验时,取储备液 0.5 mL 加入反应器中,密封置于水浴锅中。根据实验具体要求,每间隔适当时间取出反应液 0.8 mL,迅速冷却终止反应。取出的样品也需保存于冰盒中,8 h 内进行分析。

2.2.2 pH 对反应速率的影响 精密吸取巴利森苷对照品储备液 0.5 mL,加入不同 pH 的水溶液 29.5 mL,用磷酸及其缓冲盐调节 pH 分别为 0.65, 1.44, 3.20, 3.90, 4.80, 6.01, 6.92, 8.20,最终的 pH 以 pH 计测量为准,置于水浴锅内,控制反应液温度 90 °C,加热提取 60 min,每间隔 10 min 取出反应液 0.8 mL,同时补足水溶液 0.8 mL,采用 HPLC 测定。

2.2.3 温度对反应速率的影响 精密称取巴利森苷对照品储备液 0.5 mL,加入 pH 6 的水溶液 29.5 mL,置于水浴锅内,加热提取 120 min,每隔 20 min 取出反应液 0.8 mL,同时补足相应 pH 的水溶液 0.8 mL,取出的反应液迅速冷却以终止反应,分别考察温度为 42, 52, 63, 72 °C 时反应速率的变化。

2.3 巴利森苷的降解动力学特征分析 巴利森苷的降解过程符合一级动力学特征,一级动力学方程为 $\lg C_t = \lg C_0 - k_{obs}t$,其中 *t* 为反应时间,*C*₀ 和 *C*_{*t*} 分别为巴利森苷的初始质量浓度和 *t* 时刻质量浓度,*k*_{obs} 为一级降解动力学常数,其值反映了巴利森苷的降解快慢。以 $\lg C_t$ 对 *t* 作图,应得一斜率为 -*k*_{obs} 的直线,反应物巴利森苷的质量浓度总是随着降解时间呈指数下降,相关系数均 > 0.98,呈现一级反应特征。见表 1。

将得到的系列速率常数扣除初始浓度得到绝对速率常数 $\lg(C_t/C_0)$,针对不同时间点的绝对速率常数进行线性模拟,得不同 pH 条件下绝对速率常数随着时间变化的线性图,见图 1。结果发现 pH-速

表 1 巴利森苷在不同 pH 水溶液 (90 °C) 中的降解速率及半衰期
Table 1 Degradation rates and half-times of parishin in aqueous solutions with different pH at 90 °C

pH	k_{obs}/min^{-1}	R^2	$t_{1/2}/\text{min}$
0.65	0.120 6	0.987	5.75
1.44	0.024 9	0.991	27.88
3.20	0.004 8	0.999	143.36
3.90	0.005 1	0.999	136.86
4.80	0.005 1	0.999	136.83
6.01	0.007 4	0.999	94.07
6.92	0.022 1	0.999	31.36
8.20	0.211 9	0.993	3.27

率曲线分为 3 个部分,当 pH < 3.0 时,绝对速率常数随 pH 减小而迅速增加,表明巴利森苷受 H⁺ 催化;当 pH > 6.0 时,绝对速率常数随 pH 增加而迅速增大,表明巴利森苷受 OH⁻ 催化;在 3.0 < pH < 6.0 时,巴利森苷绝对速率常数基本保持不变,表明巴利森苷在这个范围最稳定。

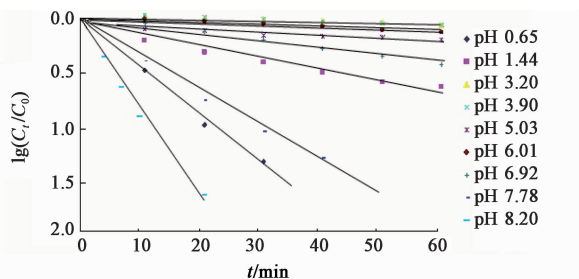


图 1 不同 pH 下巴利森苷的降解速率曲线
Fig. 1 Relationship between $\lg(C_t/C_0)$ and hydrolysis time for parishin in aqueous solutions with different pH at 90 °C

一般而言,反应速率随温度的升高而加快,二者之间存在指数关系,可用经典的 Arrhenius 公式表示,即 $\lg k_{obs} = \lg A - E_a/2.303RT$, 式中 A 是巴利森苷水解反应活化能的指前因子, E_a 为活化能, R 为气体常数, T 为绝对温度, k_{obs} 为反应数量常数。结果表明巴利森苷的降解速率随着温度升高而增大。由 Arrhenius 公式可知,以巴利森苷降解表现速率的对数值对温度的倒数作图得一直线,斜率为活化能与 R 的比值,在温度为 42, 52, 63, 72 °C 时,得到 R^2 在 0.97 ~ 0.99 的线性关系,其中 $\lg k_{obs}$ 在 $138.2 \times 10^{-5} \sim 322.4 \times 10^{-4}$ 。通过 Arrhenius 公式计算得巴利森苷的降解活化能为 $94.56 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 处在化学活化能的低能量段 ($40 \sim 400 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$), 说明巴利森苷很不稳定。这一结果提示巴利森苷在室温条件下是极不稳定的,应在低温条件下储存以延长其半衰期。以巴利森苷降解速率的反应指标 $\lg k_{obs}$ 为纵

坐标, $1/T \times 10^3$ 为横坐标,得相关性方程 $Y = 4.9385X + 12.742 (R^2 = 0.98)$ 。

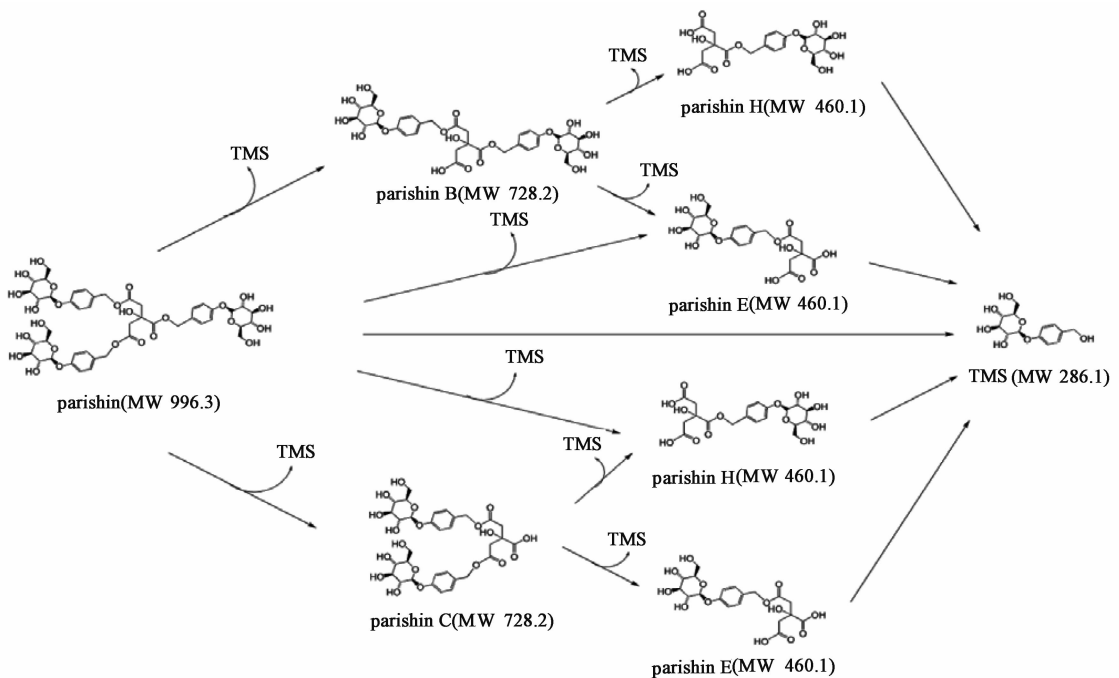
2.4 降解产物和降解途径的提出 巴利森苷的降解产物中有 6 个主要峰,通过质谱数据碎片的解析以及与对照品的比对,其中峰 1, 6, 2 和 3 被确定分别为巴利森苷, 天麻素, 巴利森苷 B 和巴利森苷 C。根据质谱裂解的碎片,峰 4 和峰 5 被确定为巴利森苷 H 和巴利森苷 E。巴利森苷降解产物的鉴定是根据质谱裂解的碎片信息,同时化合物的解析也与文献报道是吻合的^[16]。

降解产物 6 被鉴定为天麻素主要是依据负离子模式下一级质谱提供的相对分子质量的信息 m/z 331 $[M - \text{HCOO}]^-$, 以及负离子模式下二级特征碎片 m/z 123 $[M - \text{Glc} - \text{H}]^-$, 中性丢失 m/z 161 $[\text{Glc} - \text{H}]^-$ 等碎片的存在,天麻素的解析与文献^[16]报道的一致。化合物 2 和 3 的解析在正、负离子模式下一级质谱中有 $[M + K]^+$, $[M + \text{Na}]^+$, $[M - \text{H}]^-$ 峰对应的 m/z 767, 751, 727 的离子,化合物 2 和 3 的相对分子质量都是 728, 二级裂解中丢失 1 个天麻素分子产生 $[M - \text{H} - \text{TMS}]^-$ 的离子 m/z 441 的碎片,同样的解析规律质谱图中还存在 $[M - \text{H} - \text{TMS} + \text{H}_2\text{O}]^-$ 的离子 m/z 459, $[M - \text{H} - \text{TMS}]^-$ 的离子 m/z 441 及 $[M - 3\text{H} - \text{TMS} + \text{H}_2\text{O}]^-$ 的离子 m/z 369。

与对照品的匹配,化合物 2 和 3 被鉴定为巴利森苷 B 和巴利森苷 C。降解产物 1 在正模式下的离子 $[M + \text{Na}]^+$ 的离子 m/z 1 019 降解产物 1 的相对分子质量是 996。通过与文献报道的解析降解产物 1 被鉴定为是巴利森苷。降解产物 4 和 5 在正离子模式下都是 $[M + \text{Na}]^+$ 的离子 m/z 483, 负离子模式下 $[M - \text{H}]^-$ 的离子 m/z 459, 降解产物 4 和 5 的相对分子质量均为 460, 包含有 2 个单元的天麻素,同时正离子模式下特征碎片 m/z 309 $[\text{TMS} + \text{Na}]^+$, $[M - \text{TMS} + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}]^+$ 的离子 m/z 215 以及中性丢失的离子 $[\text{Glc} + \text{Na}]^+$ 离子 m/z 185, 所以降解产物 4 和 5 被鉴定为巴利森苷 H 和巴利森苷 E。6 个降解产物根据分析 LC-MS 的碎片信息、保留时间等依次得到了解析。根据巴利森苷的分子结构、降解产物以及产物的化学结构,推断巴利森苷可能的降解途径见图 2。

3 讨论

巴利森苷具有热不稳定性,在受热过程中,酯键容易断裂,导致巴利森苷类化合物之间相互转化。本研究结果表明巴利森苷的降解符合一级降解动力



parishin. 巴利森昔;TMS. 天麻素;MW. 相对分子质量

图 2 巴利森昔可能的降解途径

Fig. 2 Proposed degradation pathways for parishin

学特征,其降解速率受到 pH 和温度的影响。在 $3.0 < \text{pH} < 6.0$ 时,巴利森昔最稳定。当 $\text{pH} < 3.0$ 时,反应速率常数随 pH 减小而迅速增加,表明巴利森昔受 H^+ 催化;当 $\text{pH} > 6.0$ 时,反应速率常数随 pH 增加而迅速增大,表明巴利森昔受 OH^- 催化;巴利森昔的降解速率随温度升高而增大,降解活化能 $94.56 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,处在化学活化能的低能量段 ($40 \sim 400 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$),这项研究说明巴利森昔不稳定,应在低温下保存。通过巴利森昔稳定性研究表明巴利森昔类成分稳定性不是很好,在一定条件下与天麻素之间可能存在转化,研究结果也解释了前期文献报道关于天麻素在鲜天麻和不同天麻饮片之间差异显著的原因,这是因为天麻素和巴利森昔在天麻在加工炮制过程中产生了转化和转移,提示在生产过程中控制好加工炮制的条件才能更好地对天麻质量进行控制。

【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: 中国医药科技出版社, 2015: 58-59.
[2] 章建平, 方华, 杨森, 等. 天麻素对脊髓缺血再灌注损伤中脊髓微循环血流量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21 (16): 128-133.
[3] Ojemann L M, Nelson W L, Shin D S, et al. Tian ma, an ancient Chinese herb, offers new options for the treatment of epilepsy and other conditions [J]. Epilepsy Behav, 2006, 8 (2): 376-383.
[4] 黄占波, 宋冬梅, 陈发奎. 天麻化学成分的研究 (I) [J]. 中国药物化学杂志, 2005, 15 (4): 227-229.

[5] 王莉, 王艳萍, 肖红斌, 等. 天麻化学成分研究 (II) [J]. 中草药, 2006, 37 (11): 1635-1637.
[6] 王莉, 肖红斌, 梁鑫淼. 天麻化学成分研究 (I) [J]. 中草药, 2003, 34 (7): 11-12.
[7] 王莉, 肖红斌, 梁鑫淼. 天麻化学成分研究 (III) [J]. 中草药, 2009, 34 (8): 1186-1189.
[8] 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: 自然科学版, 2004, 24 (3): 22-25.
[9] LI N, WANG K J, CHEN J J, et al. Phenolic compounds from the rhizomes of *Gastrodia elata* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2007, 9 (3/5): 373-377.
[10] HUANG Z B, WU Z, CHNE F K, et al. The protective effects of phenolic constituents from *Gastrodia elata* on the cytotoxicity induced by KCl and glutamate [J]. Arch Pharm Res, 2006, 29 (11): 963-968.
[11] 袁胜浩, 王东, 张香兰, 等. 天麻中天麻素含量的影响因素研究 [J]. 云南植物研究, 2008, 30 (1): 110-114.
[12] 董金波, 杨水新. 天麻受热干燥过程中天麻素的稳定性探讨 [J]. 浙江实用医学, 2004, 8 (6): 380-381.
[13] 钱岩, 单鸣秋, 张丽. 基于化学成分和药理效应分析天麻饮片一体化工艺与传统工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22 (18): 5-8.
[14] 负亚波, 徐剑, 张永萍. 影响天麻中天麻素提取的因素研究 [J]. 中南药学, 2009, 7 (5): 327-330.
[15] 刘玉红, 易进海, 陈燕, 等. RP-HPLC 法同时测定天麻中游离天麻素、巴利森昔和总天麻素 [J]. 中成药, 2012, 34 (1): 182-184.
[16] WANG L, XIAO H B, LIANG X M, et al. Identification of phenolics and nucleoside derivatives in *Gastrodia elata* by HPLC-UV-MS [J]. J Sep Sci, 2007, 30 (10): 1488-1491.

【责任编辑 刘德文】