

# 天麻饮片的 HPLC 指纹图谱鉴别

麻印莲, 肖永庆, 耿立冬, 张村\*, 李丽, 于定荣, 顾雪竹  
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 研究建立天麻饮片的 HPLC 指纹图谱鉴别方法。方法: 选择 HPLC-UV 指纹图谱法, Kromasil C<sub>18</sub> 柱; 流动相乙腈-0.5% 冰醋酸溶液线形梯度洗脱, 检测波长 270 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。以指纹图谱软件计算相似度和图谱比较, 以聚类分析比较不同来源饮片的差异。结果: 建立了天麻饮片的标准指纹图谱, 6 个产地共 10 批次天麻饮片的指纹图谱基本一致, 共能检出 15 个共有峰, 10 个样品的平均相似度 >98%, 但相对峰面积有较大差异; 聚类分析结果与饮片产地基本一致。结论: 该方法重复性好, 结合聚类分析可用于天麻饮片的定性鉴别, 为天麻饮片的质量控制提供了科学依据。

**[关键词]** 天麻饮片; 指纹图谱; 鉴别

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0104-04

## HPLC Fingerprint Chromatograms for Processed Products of *Gastrodia elata*

MA Yin-lian, XIAO Yong-qing, GENG Li-dong, ZHANG Cun\*, LI Li, YU Ding-rong, GU Xue-zhu  
(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicinal Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the HPLC fingerprint chromatogram identification of the processed products from *Gastrodia elata*. **Method:** HPLC procedure was performed on a chromatographic column of Kromasil C<sub>18</sub>. Acetonitrile-glacial acetic acid water solution (0.5%) was used as mobile phase by gradient elution, and the detection wavelength was at 270 nm. The mobile phase flow rate was at 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The similarity and the clustering analysis were carried out by fingerprint chromatogram software. **Result:** The standard HPLC Fingerprint chromatogram was established through the determination of 10 batches processed products from 6 different producing areas. 15 peaks can be detected and the average similarity was over 98% in 10 samples. The processed products were almost the same on the whole chromatograms but the relative peak areas had the differences. The cluster analysis was consistent with the processed origins. **Conclusion:** HPLC method can be used in quality control of *G. elata*.

**[收稿日期]** 2011-05-30

**[通讯作者]** \* 张村, 博士, 研究员, 研究方向: 中药化学、中药炮制, Tel: 010-84018690, E-mail: zhc95@163.com

本方法对葛根、淫羊藿及丹参药材中的化学成分有较好的响应值, 而赤芍、麦冬、牛膝、生地药材的色谱均集中在 10 min 左右, 不能有效区分色谱峰的具体归属。本指纹图谱基本上反应了在 DAD 检测器条件下糖脉康颗粒化学成分的全貌, 其更完整的化学成分信息有待于利用其他检测方法进行补充。

### [参考文献]

[1] 李永芝, 孟凡毅. 消渴[M]. 北京: 中国中医药出版社,

1995:3.

[2] 沈金鱼, 吴玉华. 消渴[M]. 太原: 山西科学教育出版社, 1986:3.

[3] 陈应辉, 曹洪义, 任欣. TMK 联合弥可保治疗糖尿病周围神经病变疗效分析[J]. 西南军医, 2008, 10(4):31.

[4] 国家药典委员会. 中药色谱指纹图谱相似度评价系统操作规范[S]. 2004A.

[责任编辑 蔡仲德]

[ **Key words** ] *Gastrodia elata*; HPLC fingerprint; identification.

天麻为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎。具有平肝息风止痉的作用,临床上用于头痛眩晕,肢体麻木,小儿惊风,癫痫抽搐,破伤风等症。天麻药用历史悠久,主要分布于我国东北、西南及陕西、河南、湖北、湖南等地。文献报道天麻主要含有酚类及其苷、甾醇、多糖等多种化学成分;药理研究表明天麻生药及天麻苷具有镇静、镇痛、抗惊厥等作用,同时对心血管系统,对免疫系统等亦有作用,另有文献报道了天麻药材的质量评价以及指纹图谱等方面的研究<sup>[1-2]</sup>。本课题组前期对天麻饮片有效部位的药理作用研究表明<sup>[3]</sup>,该部位有与天麻功能主治相似的生理活性。为更加有效地控制饮片的内在质量,保证临床用药安全,本文通过天麻 6 个产地共 10 批次饮片的指纹图谱研究,并结合聚类分析,建立天麻饮片的 HPLC 指纹图谱定性鉴别方法。

## 1 仪器与试药

Waters 高效液相色谱仪(Waters 2695 Separations Module, Waters 2996 PAD 检测器, Millennium<sup>32</sup> 数据处理软件), KQ-500DB 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); EYELA 型旋转蒸发器; 中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004, 国家药典委员会)。乙腈为色谱纯,水为纯净水,使用前均经 0.45 μm 滤膜滤过;其他试剂均为分析纯。

天麻药材分别购于四川、安徽、吉林、陕西、河南、湖北等地,经中国中医科学院中药研究所胡世林教授鉴定均为 *G. elata* 的干燥块茎;以上样品由安徽沪谯中药饮片厂依法炮制,分别制备成 10 批生天麻饮片,粉碎过 40 目筛,置干燥器中备用。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱 Kromasil C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈(A)-0.5% 冰醋酸溶液(B) 线形梯度洗脱(0 ~ 20 min, 1% ~ 20% A; 20 ~ 25 min, 20% ~ 25% A; 25 ~ 60 min, 25% ~ 85% A), 检测波长 270 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。在此条件下不同产地的天麻饮片共能检出 15 个峰,样品在 60 min 左右出峰完毕,且色谱图基线平稳,各色谱峰分离较佳,故将分析时间定为 60 min。

**2.2 供试品溶液的制备** 称取天麻饮片粉末 2 g 精密称定,加入 50% 甲醇 50 mL,超声提取 15 min

后,过滤,将滤液蒸干,残留物以 2 ~ 3 mL 水溶解,上 D101 大孔吸附树脂柱(0.5 cm × 5 cm),分别以水, 50% EtOH 和 95% EtOH 各 50 mL 洗脱,收集 50% EtOH 洗脱液,减压蒸干后,残渣以甲醇溶解至 10 mL 量瓶中,以 0.45 μm 微孔滤膜过滤后备用。

## 2.3 方法学考察

**2.3.1 精密度试验** 取同一供试品溶液 10 μL,连续进样 5 次,检测指纹图谱,计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果测得各色谱峰的相对保留时间的和相对峰面积的 RSD < 5%,说明仪器性能良好。

**2.3.2 稳定性试验** 取同一供试品溶液 10 μL,分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 检测指纹图谱,计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果样品在 24 h 内基本稳定(RSD < 5%)。

**2.3.3 重复性试验** 取同一批样品 5 份,分别制备成供试品溶液,依法检测指纹图谱,计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD,结果表明样品制备方法重复性较好(RSD < 5%)。

## 2.4 指纹图谱测定与评价

**2.4.1 共有峰的指定** 参考《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》,并结合天麻不同批次饮片的 HPLC 峰状况,选择 HPLC 图中可以用于反映天麻内在质量的共有峰进行测定。天麻饮片指定共有峰 15 个,以 7 号峰为参照峰(s)进行相对保留时间和相对峰面积的计算,所选择的共有峰面积之和占总峰面积的 95% 以上,可以较为全面的反映样品的内在质量。

**2.4.2 天麻饮片指纹图谱的测定及相似度评价** 根据建立的指纹图谱方法,分别取中试生产的 10 批次天麻饮片样品,依法制备成供试品溶液。吸取供试品溶液 10 μL,进样于高效液相色谱仪进行检测。以 7 号峰为参照峰(s)的相对保留时间和相对峰面积为 1,计算其余各峰的相对保留时间和相对峰面积,结果各峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.5%, 10 批天麻饮片色谱峰面积 RSD 差异较大(18% ~ 113%), RSD 平均值为 31.28%,见表 1, 2 和图 1。

表 1 天麻饮片指纹图谱测定(相对保留时间)

No.	样品	1	2	3	4	5	6	7(s)	8	9	10	11	12	13	14	15
1	四川天麻 A	0.389	0.419	0.524	0.601	0.736	0.802	1	1.055	1.218	1.505	1.744	1.796	1.906	2.751	2.984
2	四川天麻 B	0.391	0.420	0.527	0.605	0.739	0.807	1	1.057	1.216	1.499	1.743	1.789	1.902	2.743	2.976
3	安徽天麻 A	0.390	0.420	0.526	0.616	0.737	0.803	1	1.055	1.217	1.502	1.745	1.795	1.905	2.750	2.983
4	安徽天麻 B	0.395	0.423	0.531	0.615	0.741	0.811	1	1.066	1.213	1.468	1.736	1.777	1.893	2.725	2.955
5	安徽天麻 C	0.394	0.423	0.531	0.620	0.741	0.810	1	1.065	1.214	1.492	1.737	1.778	1.894	2.729	2.959
6	吉林天麻 A	0.388	0.418	0.524	0.613	0.741	0.939	1	1.054	1.231	1.505		1.796	1.906	2.751	2.984
7	吉林天麻 B	0.393	0.422	0.529	0.618	0.744	0.810	1	1.061	1.229	1.494	1.740	1.782	1.897	2.732	2.963
8	陕西天麻	0.389	0.419	0.525	0.615	0.736	0.812	1	1.055	1.234	1.505	1.747	1.798	1.908	2.756	2.990
9	河南天麻	0.390	0.420	0.525	0.604	0.739	0.804	1	1.055	1.228	1.502	1.743	1.793	1.904	2.746	2.979
10	湖北天麻	0.390	0.420	0.527	0.606	0.738	0.814	1	1.056	1.227	1.499	1.743	1.792	1.903	2.745	2.977
	均值	0.391	0.420	0.527	0.611	0.739	0.821	1	1.058	1.223	1.497	1.742	1.790	1.902	2.743	2.975
	RSD/%	0.57	0.39	0.48	1.03	0.33	4.80	0	0.40	0.61	0.71	0.20	0.41	0.26	0.38	0.40

表 2 天麻饮片指纹图谱测定(相对峰面积)

No.	样品	1	2	3	4	5	6	7(s)	8	9	10	11	12	13	14	15
1	四川天麻 A	0.289	0.163	0.157	0.419	0.267	0.133	1	0.737	2.776	0.077	0.056	0.075	0.094	0.044	0.080
2	四川天麻 B	0.299	0.165	0.164	0.436	0.285	0.133	1	0.737	2.756	0.090	0.099	0.082	0.095	0.048	0.053
3	安徽天麻 A	0.199	0.123	0.235	0.357	0.354	0.101	1	0.532	2.455	0.071	0.042	0.037	0.074	0.038	0.058
4	安徽天麻 B	0.210	0.119	0.241	0.322	0.382	0.100	1	0.487	2.536	0.032	0.068	0.044	0.066	0.050	0.068
5	安徽天麻 C	0.220	0.128	0.238	0.324	0.390	0.101	1	0.500	2.540	0.065	0.068	0.044	0.065	0.058	0.068
6	吉林天麻 A	0.313	0.121	0.176	0.452	0.162	0.106	1	0.693	1.806	0.094		0.043	0.097	0.041	0.069
7	吉林天麻 B	0.328	0.138	0.176	0.454	0.176	0.105	1	0.689	1.816	0.072	0.046	0.050	0.093	0.047	0.052
8	陕西天麻	0.087	0.164	0.985	0.327	0.281	0.066	1	0.614	2.446	0.129	0.176	0.092	0.159	0.033	0.040
9	河南天麻	0.294	0.151	0.042	0.363	0.227	0.010	1	0.743	2.446	0.078	0.083	0.044	0.143	0.034	0.048
10	湖北天麻	0.203	0.279	1.498	0.239	0.210	0.155	1	0.879	1.697	0.108	0.151	0.050	0.120	0.053	0.058
	均值	0.244	0.155	0.391	0.369	0.273	0.101	1.0000	0.661	2.327	0.082	0.088	0.056	0.101	0.045	0.059
	RSD/%	28.80	28.93	113.43	18.00	28.38	37.72	0.0018	0.07	16.35	30.37	50.39	32.71	29.66	17.37	18.98

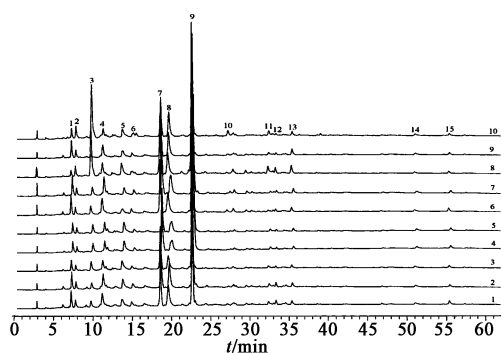
以中药指纹图谱相似度处理软件,采用中位数计算法,确定了天麻饮片标准指纹图谱(见图 2),该图谱与 10 个样品的相似度分别为 0.991, 0.991, 0.995, 0.994, 0.994, 0.990, 0.992, 0.967, 0.908, 0.986, 平均相似度为 98% 以上。因此所建立的对照指纹图谱具有较好的代表性,可用于饮片的指纹图谱比较测定。

**2.4.3 聚类分析** 在相似度分析的基础上,又进行了 10 批次天麻饮片指纹图谱的系统聚类分析。选用欧氏距离作为样品间的相似性测度,采用可变类平均法聚类分析,结果(图 3)可分为 5 类:其中 1, 2, 9 号样本(分别为四川天麻 2 批样品和河南天麻样

品)为一类,3,4,5 号样本(均来源于安徽天麻)为一类,6,7 号样本(来源于吉林天麻)为一类,8 号样本(陕西天麻)为一类,10 号样本(湖北天麻)为一类,由此说明天麻饮片与药材产地密切相关。

### 3 讨论

通过 DAD 对所有色谱峰在 190 ~ 400 nm 进行扫描,比较各个波长下的色谱峰的情况,结果在 270 nm 波长下色谱峰数量多,面积较大,与 220 nm 波长相比基线更加平稳,所以选择 270 nm 做为检测波长;同时比较了多种流动相的分离条件,如乙腈-水,甲醇-水,甲醇-冰醋酸水,乙腈-冰醋酸水等采用不同的梯度进行检测,结果以乙腈-0.5% 冰醋酸水溶液



1. 四川天麻 A; 2. 四川天麻 B; 3. 安徽天麻 A; 4. 安徽天麻 B;  
5. 安徽天麻 C; 6. 吉林天麻 A; 7. 吉林天麻 B;  
8. 陕西天麻; 9. 河南天麻; 10. 湖北天麻

图 1 10 批次天麻饮片的 HPLC 叠加

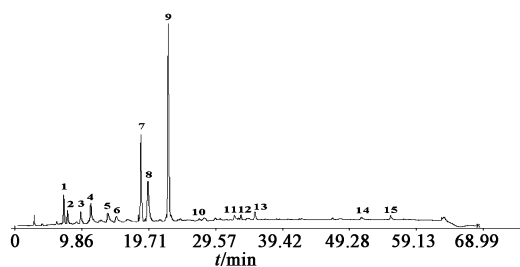


图 2 天麻饮片标准指纹图谱

为流动相进行梯度洗脱,各色谱峰基线平稳,分离较佳。

本实验还对样品的提取溶剂(甲醇,50%甲醇,乙醇),提取方法(超声,回流,冷浸)以及纯化方法(正丁醇萃取,D101 树脂纯化)等进行了比较研究,最终确定了供试品溶液的制备方法。

从 10 个批次不同产地的天麻饮片指纹图谱的测定结果来看,指定共有峰 15 个,各批次饮片的色谱峰基本一致,个别产地的饮片指纹图谱中有缺峰的情况存在。以 7 号峰作为参照,计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果相对保留时间的

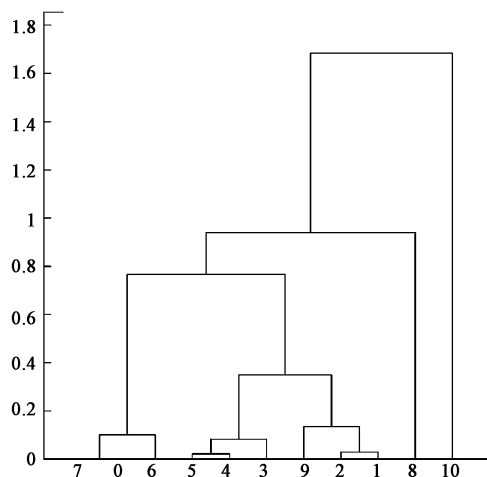


图 3 天麻饮片聚类分析图

RSD < 5%,而各饮片的相对峰面积差异较大,且以陕西天麻和湖北天麻 3 号峰强度最大,说明不同产地天麻饮片的质量差异较大。

同时高效液相色谱指纹图谱法结合聚类分析对天麻饮片能有效分类,因此以 HPLC 指纹图谱对天麻饮片定性较为适宜,此为天麻饮片质量控制模式的建立奠定了基础。

#### [参考文献]

- [1] 王莉,程孟春,肖红斌,等. 天麻液相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药,2006,37(9):1402.
- [2] 石上梅,孙婕,杜庆鹏,等. 天麻药材 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国药学杂志,2005,40(10):739.
- [3] 李文,张村,耿立冬,等. 天麻有效部位药理作用研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(10):856.

[责任编辑 蔡仲德]