

天麻超微饮片的 HPLC 指纹图谱研究

Studies on HPLC Fingerprint of Ultramicro Rhizoma *Gastrodiae*

蔡光先/CAI Guang-xian^{1,2}, 李顺祥/LI Shun-xiang^{1,2}

1. 湖南中医学院, 长沙 410007

2. 湖南省中医研究院, 长沙 410006

1. Hunan University of TCM, Changsha 410007

2. Hunan Academy of TCM, Changsha 410006

[摘要] 研究天麻超微饮片的 HPLC 指纹图谱,考察其有效成分及含量,为天麻超微饮片的质控提供可靠方法。色谱柱为大连依利特公司 Hypersil BDS C18(4.6 mm×200 mm,5 μm)柱。流动相为 0.05 % 磷酸水溶液洗脱,柱温为 25 ℃,流速为 1.0 ml·min⁻¹,检测波长为 220 nm。建立了天麻超微饮片的 HPLC 指纹图谱,标定了 7 个共有峰。结论为利用 HPLC 指纹图谱可以较全面的控制天麻超微饮片的内在质量。

[关键词] 中药学,天麻超微饮片,指纹图谱,高效液相色谱法

[文献标识码] A

[中图分类号] F284.1,TQ460.7+2

[文章编号] 1000-7857(2006)02-0033-03

Abstract: To determine the HPLC fingerprint of the ultramicro rhizoma *Gastrodiae* and to test its potent constituents and content. Chromatographic column: Hypersil BDS C18 (4.6 mm×200 mm,5 μm). Mobile phase: 0.05% phosphoric acid in water. Column temperature: 25℃. Flow rate: 1.0 ml·min⁻¹. Wavelength: 220nm. The fingerprint of ultramicro rhizoma *Gastrodiae* was established and 7common peaks are in the fingerprint. Conclusion is that methods and data can be used to control the quality of the ultramicro rhizoma *Gastrodiae*.

Key Words: traditional Chinese materia medica, ultramicro rhizoma *Gastrodiae*, fingerprint, HPLC

CLC Numbers: F284.1,TQ460.7+2

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2006)02-0033-03

天麻超微饮片为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎经超微粉碎后制成的饮片。它可提高中药成分的利用率,减少中药资源的浪费^[1,2]。本实验对 12 批不同地区的商品天麻药材制成的超微饮片进行测定,并进行方法学考察,初步建立了指纹图谱,为天麻标定了 7 个共有指纹峰,其中天麻素为对照品。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪(配有 Waters 510 输液泵, Waters 484 紫外检测器,柱温箱);天麻素对照品(Gastrodin,批号 807-

200104,供含量测定用,中国药品生物制品检定所提供);甲醇为色谱纯;水为双蒸水;其余试剂为分析纯。药材 12 批商品天麻药材采购自湖南、四川、甘肃、山东等地,经湖南中医药研究院中药研究所生药室谢昭明研究员鉴定,分别为天麻 *Gastrodia elata* Bl.,分别加工成超微饮片。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

分别精密称取天麻超微饮片粉末约 0.5 g(共 12 种),置于 10

收稿日期:2006-01-18

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(2001BA701A43),湖南省教育厅课题(04C452),湖南省卫生厅中医药科研基金课题(24303)

作者简介:蔡光先,男,长沙市韶山中路 113 号湖南中医学院、湖南省中医药研究院,研究员,主要研究方向为内科学,中药临床药理学;E-mail:lishunxiang@hotmail.com

有效地溶解单畴或多畴的磁性颗粒,导致土壤磁性减弱。

参考文献(References)

- [1] 王学松,秦勇.论城市表层土壤中重金属的可持续管理与发展[J].科技导报,2005,23(9):26-30.
- [2] 王学松,秦勇.徐州城市表层土壤的磁学特性[J].科技导报,2005,23(11):14-19.
- [3] THOMPSON R, OLDFIELD F. Environmental Magnetism [M]. London: Allen and Unwin, 1986.
- [4] 刘庆生,刘树根.塔北雅克拉油田储层岩石的磁性与矿物学特征及其意义[J].科学通报,1997,42(24):2 637-2 642.
- [5] 张卫国.长江口潮滩沉积物环境磁学研究[D].上海:华东师范大学地理系,2001.
- [6] 王学松.城市土壤重金属富集淋滤特征与磁学响应——以徐州市城

- 市土壤为例[D].徐州:中国矿业大学资源与地球科学学院,2005.
- [7] LOVELY D R. Dis-similatory Fe (3+) and Mn (+4) reduction [J]. Microbiology Review, 1991, 55: 259-287.
- [8] BURDIGE D J. The biogeochemistry of manganese and iron reduction in marine sediments [J]. Earth-Sci Rev, 1993, 35: 249-284.
- [9] 张卫国,俞立中,陆敏.长江口潮滩沉积物氧化铁与磁性特征的关系[J].地球物理学报,2003,46(1):80-85.
- [10] 戴树桂.环境化学[M].北京:高等教育出版社,1997.
- [11] OLDFIELD F, YU L. The influence of particle size variations on the magnetic properties of sediments from the north-eastern Irish Sea [J]. Sedimentology, 1994, 41: 1093-1108.
- [12] KAPICKA A, JIRDANOVA N, PETROVSKY E, et al. Magnetic study of weakly contaminated forest soils [J]. Water,Air and Soil Pollution,2003,148:31-44.

(责任编辑 王 芷)

ml 容量瓶中,加甲醇至刻度,超声 30 min, 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取在 110 ℃干燥至恒重的天麻素对照品约 5 mg,置 25 ml 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.3 色谱条件

色谱柱为大连依利特公司 Hypersil BDS C18 柱(4.6 mm×100 mm, 5 μm)。色谱条件:流动相为 0.05 % 磷酸水溶液洗脱。柱温为 25℃,流速为 1.0 ml·min⁻¹,检测波长为 220 nm。该条件下天麻的各色谱峰均获得较好的分离,见图 1。

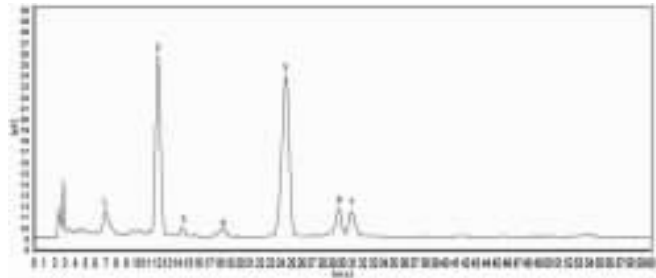


图 1 天麻超微饮片的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of ultramicro rhizoma *Gastrodiae*

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度实验

取同一份天麻超微饮片的供试品连续进样 5 次,比较共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致,RSD<2%(见表 1、表 2),符合指纹图谱的检测要求。

表 1 精密度试验结果(相对保留时间)

Table.1 Result of precision (relative retention time)

峰号	相对保留时间					RSD(%)
	1 次	2 次	3 次	4 次	5 次	
1	0.282 6	0.287 5	0.282 9	0.284 4	0.282 7	0.731 5
2	0.490 7	0.493 2	0.493 2	0.493 8	0.489 4	0.387 6
3	0.587 8	0.585 2	0.582 7	0.580 4	0.580 4	0.549 1
4	0.749 5	0.757 5	0.755 5	0.751 1	0.757 1	0.481 2
5	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.000 0
6	1.209 9	1.217 6	1.218 3	1.219 6	1.205 9	0.495 7
7	1.259 4	1.262 1	1.268 9	1.273 6	1.250 0	0.719 0

表 2 精密度试验结果(相对峰面积)

Tbl. 2 Result of precision (relative retention areas)

峰号	相对保留时间					RSD(%)
	1 次	2 次	3 次	4 次	5 次	
1	0.118 4	0.120 5	0.119 9	0.121 8	0.118 3	1.226 6
2	0.731 5	0.737 3	0.739 0	0.728 6	0.722 9	0.891 0
3	0.032 4	0.032 7	0.031 7	0.032 3	0.033 2	1.751 5
4	0.049 8	0.049 5	0.048 8	0.049 9	0.049 1	0.088 3
5	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.000 0
6	0.122 3	0.123 7	0.122 7	0.124 4	0.122 6	0.707 4
7	0.129 5	0.133 8	0.127 0	0.130 1	0.129 2	1.884 6

2.4.2 稳定性实验

取同一份天麻超微饮片的供试品溶液,分别在制备后 1、4、8、16、24、48 h 进样,比较各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致,RSD<2%,表明样品在 48 h 内稳定,符合指纹图谱的检测要求。

2.4.3 重现性实验

取同一批天麻超微饮片样品 5 份,按供试品溶液制备方法分

别制备供试品溶液,比较各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致,RSD<2%,符合指纹图谱的检测要求。

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 共有指纹峰的标定

采用相对保留时间标定共有指纹峰:以图谱中天麻素为参照物(S),将各色谱峰保留时间与同一图谱中参照物的保留时间比较,其比值为各色谱峰的相对保留时间。分别计算 12 批天麻样品的指纹图谱中各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积,其中 7 个色谱峰为天麻共有(见表 3),因此,标定它们为共有指纹峰。以图谱中天麻素参照峰(S)为 1,计算其它共有指纹峰的相对保留时间为:峰 1(0.2793),峰 2(0.5094),峰 3(0.5543),峰 4(0.6994),峰 5(1.0000),峰 6(1.2044),峰 7(1.3088)。

表 3 12 批天麻超微饮片的相对保留时间

Tbl. 3 Relative retention time of 12 batches of ultramicro rhizoma *Gastrodiae*

样品号	相对保留时间						
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7
1	0.281 5	0.500 9	0.551 9	0.707 9	1.000 0	1.202 2	1.289 9
2	0.282 4	0.512 4	0.552 7	0.705 0	1.000 0	1.200 6	1.294 0
3	0.281 5	0.508 9	0.545 4	0.697 8	1.000 0	1.204 7	1.300 3
4	0.283 2	0.510 1	0.550 7	0.699 27	1.000 0	1.205 9	1.304 5
5	0.284 4	0.514 1	0.544 7	0.695 1	1.000 0	1.202 7	1.298 9
6	0.283 6	0.509 5	0.544 8	0.691 1	1.000 0	1.202 8	1.300 0
7	0.284 6	0.510 6	0.545 5	0.693 0	1.000 0	1.203 6	1.305 2
8	0.253 1	0.496 6	0.522 6	0.682 1	1.000 0	1.212 7	1.326 0
9	0.279 4	0.512 8	0.536 3	0.695 2	1.000 0	1.205 7	1.332 3
10	0.281 1	0.523 3	0.546 2	0.707 6	1.000 0	1.205 7	1.337 5
11	0.278 6	0.507 6	0.550 7	0.714 5	1.000 0	1.202 1	1.302 1
12	0.278 4	0.506 6	0.548	0.703 9	1.000 0	1.203 7	1.315 0
平均值	0.279 3	0.509 4	0.554 3	0.699 4	1.000 0	1.204 4	1.308 8

2.5.2 共有指纹峰的相对峰面积

以图谱中天麻素为参照物(S),将各共有指纹峰峰面积与同一图谱中参照物的峰面积比较,其比值为各共有指纹峰的相对峰面积。根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》的规定^[3],单峰峰面积占总峰面积<10%时,峰面积比值不作要求,仅需标定相对保留时间。但在实验里我们把所有的峰面积全部标定,结果见表 4。

表 4 12 批天麻超微饮片共有指纹峰的相对峰面积

Tbl. 4 Area of common fingerprint peak of 12 batches of ultramicro rhizoma *Gastrodiae*

样品号	相对保留时间						
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7
1	0.054 8	0.312 9	0.024 3	0.023 4	1.000 0	0.111 2	0.042 3
2	0.048 3	0.162 4	0.044 6	0.025 6	1.000 0	0.059 6	0.051 7
3	0.031 8	0.075 6	0.027 0	0.019 9	1.000 0	0.044 9	0.057 3
4	0.057 6	0.740 8	0.033 9	0.031 6	1.000 0	0.259 9	0.062 8
5	0.042 9	0.078 5	0.026 6	0.020 4	1.000 0	0.049 3	0.058 2
6	0.088 8	0.743 8	0.037 4	0.025 1	1.000 0	0.241 2	0.062 9
7	0.113 2	0.765 1	0.042 5	0.020 9	1.000 0	0.240 7	0.068 3
8	0.055 8	0.093 9	0.038 0	0.021 3	1.000 0	0.136 3	0.042 4
9	0.064 1	0.107 5	0.033 8	0.024 4	1.000 0	0.078 6	0.043 6
10	0.092 4	0.199 4	0.029 9	0.024 3	1.000 0	0.033 8	0.047 2
11	0.061 3	0.181 9	0.044 9	0.031 5	1.000 0	0.056 2	0.051 7
12	0.113 0	0.731 5	0.032 4	0.049 8	1.000 0	0.111 5	0.121 4
平均值	0.068 7	0.349 4	0.034 6	0.026 5	1.000 0	0.118 6	0.059 2

2.6 天麻超微饮片中天麻素的含量测定

2.6.1 天麻素线性关系考察^[4]

按照中国药典 2000 版一部天麻项下的含量测定条件,精密

量取配制好的天麻素对照品溶液,1、2.5、5、10、15、20 μ l 进样,测定峰面积。以天麻素进样量为横坐标(X),以峰面积响应值为纵坐标(Y),绘标准曲线,得回归方程: $Y=370.09X-9\ 174.4(r=0.999\ 6)$ 。结果表明天麻素在 200~4 000 ng 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.6.2 12 批不同来源天麻的超微饮片中的天麻素含量比较 (见表 5)。

2.7 相似度计算

采用中南大学“计算机辅助相似性评价系统”进行相似度计算。

表 5 12 批不同来源天麻的超微饮片的天麻素含量结果

Tbl. 5 The content of gastrodin in 12 batches of ultramicro rhizoma *Gastrodiae* from different origin

样品号	样品来源	天麻素含量(%)
1	四川	0.47
2	重庆桐君阁大药房	0.45
3	浙江张同泰	0.52
4	深圳二天堂	0.26
5	甘肃 1	0.49
6	甘肃 2	0.23
7	北京阳光同仁	0.35
8	杭州方回春堂	0.37
9	四川万泽百美	0.30
10	山东	0.35
11	云南	0.28
12	湖南	0.26

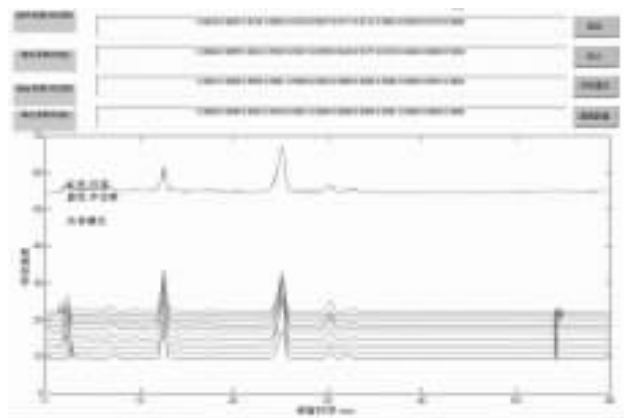


图 2 天麻相似度计算(全谱)结果

Fig. 2 Comparability computing result of whole HPLC fingerprints of ultramicro rhizoma *Gastrodiae*

有关参数设置如下:

预处理:数据压缩 70 230 $\times$ 13,压缩层数 4

数据平滑 使用移动窗口多项式最小二乘拟合平滑

数据平移 三标准峰平移

谱峰处理:谱峰识别 所有指纹图谱同一阈值 0.001;自动谱峰匹配。

相似度计算结果见图 2。

3 结论与讨论

1) 超微饮片是我院研制的一种微米级新型中药饮片,因其原药材的形状、显微特征已不存在,采用建立的指纹图谱来控制其质量具有较强的专属性。相似度计算结果表明,4 组相似度的参数基本都在 0.9 以上,说明建立的指纹图谱相似度较好。

2) 实验中分别使用 Hanbon Lichrospher C18 柱和依利特 Hypersil BDS C18 柱,后者的分离效果好,且 3 种不同柱号(E1518722,E1518723,E1523236)依利特柱,色谱峰的保留时间基本不变,故选用依利特 Hypersil BDS C18 柱。

3) 本实验所用的对照品为天麻素,参照中国药典中天麻的含量测定方法[4]制备供试品溶液,对超声时间进行考察(15 min,30 min,45 min),结果显示,30 min 提取已基本完全,较为合适。参照文献[4-8],采取 0.05 % 磷酸水溶液为流动相,分离效果较好,保留时间适当。

4) 对 12 批不同商品的天麻超微饮片进行了天麻素的含量测定,结果表明天麻超微饮片因原料品种与产地的不同,其有效成分的含量也有较大的差异。其中浙江张同泰的天麻中天麻素含量高,但它的指纹图谱显示其它成分含量均较低。

参考文献 (References)

- [1] 蔡光先,杨永华,李跃辉.超微粉体技术与中药饮片改革[J].世界科学技术-中医药现代化,2004,6(2):67-70.
- [2] 刘智,王丽.天麻细胞级微粉碎和普通粉碎质量标准对比实验研究[J].中国现代应用药学杂志,2002,19(6):474-476.
- [3] 国家药品监督管理局.中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[J].中草药,2000,22(10):671-675.
- [4] 国家药典委员会.中国药典 2000 版.一部[S].北京:化学工业出版社,2000.45.
- [5] 国家药典委员会.中国药典 2005 版.一部[S].北京:化学工业出版社,2005.39-40.
- [6] 原文鹏,马成双.RP-HPLC 法测定三通风湿康胶囊中天麻素的含量[J].中草药,2000,31(1):18-19.
- [7] 秦剑,邓开英,李胜容,等.RP-HPLC 测定天麻丸中天麻素的含量[J].中成药,2003,25(16):508-509.
- [8] 文东旭,黄东萍,林文翰.高效液相法测定天麻及天芎注射液中天麻素的含量[J].中国药事,2003,17(11):690-692.

(责任编辑 李慧政)

·读者·作者·编者·

《科技导报》2006 年专题论文出版计划

2006 年,本刊将继续贯彻“刊登原创学术论文,报道前沿科技成果;涵盖科技各个领域,关注重大科技问题;重视理论研究创新,鼓励学术观点争鸣;促进中外科技交流,探索强国兴邦道路”办刊方针,高度重视专题论文的出版。现将初步拟定的本刊 2006 年专题论文出版计划公布如下,欢迎广大读者踊跃投稿,或提供专题出版论文选题;同时热忱欢迎相关领域的专家学者毛遂自荐,在贵研究领域组织海内外学者为本刊专题论文出版撰稿。

《科技导报》2006 年专题论文出版计划:(1)农作物育种研究专题;(2)“嫦娥计划”相关技术研究专题;(3)古生物及化石发掘研究专题;(4)人、兽、共患病预防及医治研究专题;(5)地震预报研究专题;(6)重大突发灾害事件处置研究专题;(7)数学基本问题研究专题;(8)天体物理研究专题;(9)微观物理研究专题;(10)区域生态环境研究专题;(11)重大矿难预防及救治研究专题;(12)废旧机电产品处置研究专题;(13)地球物理科学研究进展专题;(14)纳米技术研究专题;(15)遥感及地理信息系统研究专题;(16)材料科学最新研究进展专题。

(本刊编辑部)