

HPLC-MS 法同时测定天麻饮片中 8 种活性成分

单鸣秋^{1,2}, 张丽^{1,2}, 于生^{1,2}, 钱岩^{1,2}, 王君焱^{1,2}, 丁安伟^{1,2*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 建立同时测定天麻饮片中天麻素、对羟基苯甲醇、香荚兰醇、对羟基苯甲醛、香荚兰醛、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 A 8 种成分的高效液相色谱-质谱 (HPLC-MS) 分析方法。**方法** 采用 Agilent 1220 高效液相系统, Hypersil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.5% 醋酸水溶液 (A)-0.5% 醋酸甲醇溶液 (B), 梯度洗脱: 0~10 min, 98% A; 10~60 min, 98%~60% A; 60~75 min, 60% A; 分析时间 75 min; 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。采用电喷雾离子源进行负离子模式监测, 多反应监测模式用于定量分析, 源喷射电压为-4 500 V, 离子源温度为 550 °C。**结果** 测定的 8 种成分在线性范围内均具有良好的线性关系 ($r \geq 0.999 2$); 平均回收率在 94.51%~102.70%, RSD<3.50%。在不同产地的天麻饮片中, 8 种成分的量差异较大。其中, 3 种巴利森苷类成分的量较高, 香荚兰醇和香荚兰醛的量均较低。**结论** 建立的测定方法分离效果及重复性好, 且快速、简便, 可作为天麻饮片的质量控制方法。

关键词: 天麻; 高效液相色谱-质谱法; 天麻素; 对羟基苯甲醇; 香荚兰醇; 对羟基苯甲醛; 香荚兰醛; 巴利森苷 B; 巴利森苷 C; 巴利森苷 A; 质量控制

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)14-2087-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.14.012

Simultaneous determination of eight active components in *Gastrodiae Rhizoma* by HPLC-MS

SHAN Ming-qiu^{1,2}, ZHANG Li^{1,2}, YU Sheng^{1,2}, QIAN Yan^{1,2}, WANG Jun-yan^{1,2}, DING An-wei^{1,2}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the simultaneous determination of eight active components (gastrodin, 4-hydroxybenzyl alcohol, vanillyl alcohol, vanillin, *p*-hydroxybenzaldehyde, parishin B, parishin C, and parishin A). **Methods** The analysis was performed on an Agilent 1220 system with a Hypersil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The eight components were separated in 75 min with gradient mobile phase consisting of 0.5% CH₃COOH-H₂O (A) and 0.5% CH₃COOH-CH₃OH (B): 0—10 min, 98% A; 10—60 min, 98%—60% A; 60—75 min, 60% A. The temperature of column was 30 °C, and the injection volume was 20 μL. The multiple-reaction monitoring (MRM) scanning was employed for the quantification with switching electrospray ion source polarity in negative mode. The ion spray voltage was set at -4500 V and the turbo spray temperature was maintained at 550 °C. **Results** The eight components had the good linearity ($r \geq 0.999 2$) within the linear ranges. The average recovery rate was 94.51%—102.70% with RSD < 3.50%. The contents of the eight components of *Gastrodiae Rhizoma* varied according to the different habits. The contents of parishins A, B, and C were high while the contents of vanillyl alcohol and vanillin were low. **Conclusion** The developed HPLC-MS method is simple, sensitive, and accurate, and has the good repeatability in separation, which is available for the quality control of *Gastrodiae Rhizoma*.

Key words: *Gastrodiae Rhizoma*; HPLC-MS; gastrodin; 4-hydroxybenzyl alcohol; vanillyl alcohol; *p*-hydroxybenzaldehyde; vanillin; parishin B; parishin C; parishin A; quality control

收稿日期: 2015-02-25

基金项目: 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心项目 (ZDXM-1-3); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

作者简介: 单鸣秋 (1978—), 男, 副教授, 博士, 主要从事中药炮制及饮片质量标准研究。Tel: (025)85811519 E-mail: shanmingqiu@163.com

*通信作者 丁安伟 (1950—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制研究。Tel: (025)85811523 E-mail: awding105@163.com

天麻 *Gastrodiae Rhizoma* 为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎, 列于《神农本草经》上品, 为我国传统贵重药材。天麻性甘、平, 归肝经, 有平肝息风止痉的功效, 临床上主要用于头痛眩晕、肢体麻木、小儿惊风、癫痫抽搐、破伤风等的治疗^[1]。天麻的主要成分为酚类化合物及其苷、多糖、甾醇等^[4-8]。其中天麻素是主要有效成分, 多项药理研究表明天麻素具有镇痛的作用, 临床上多用于治疗头痛、眩晕、神经痛、肢体麻木、手足不遂、冠心病、心绞痛等, 因此包括《中国药典》2010年版在内的多项标准都是以天麻素作为指标评价天麻饮片的质量。目前, 也有较多文献指出天麻中所含香荚兰醇、香荚兰醛、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛及巴利森苷类成分均具有较强的生理活性^[9-14], 表明仅采用单一指标测定天麻素量的方法, 对天麻内在质量的判断不够全面。

本研究建立了 HPLC-MS 法同时测定天麻中天麻素、对羟基苯甲醇、香荚兰醇、对羟基苯甲醛、香荚兰醛、巴利森苷 B、巴利森苷 C 和巴利森苷 A 8 个成分的量, 以期客观、综合评价天麻饮片的质量, 并为其药效物质基础研究提供方法学依据。

1 仪器与试剂

Shimadzu LC 20A 型高效液相色谱仪; AB Sciex Qtrap 5500 型三重四级杆线性离子阱质谱仪, 配有 ESI 离子源, Analyst 1.5.1 Software 工作站, 美国 AB 公司。Shimadzu Librorael-40SM 型电子分析天平, 精确到 0.01 mg。

天麻素 (批号 00256-2013)、香荚兰醇 (批号 01083-2013)、香荚兰醛 (批号 01147-2013) 对照品, 购自南京泽朗医药科技有限公司, 对羟基苯甲醇 (批号 2014-0192)、对羟基苯甲醛 (批号 2014-0193)、巴利森苷 A (批号 2014-0078)、巴利森苷 B (批号

2014-0079)、巴利森苷 C (批号 2014-0080) 对照品, 购自南京森贝伽生物科技有限公司; 上述对照品经 HPLC 法检测, 质量分数均大于 98.0%。甲醇为色谱纯, 水为纯净水, 其余试剂均为分析纯。

收集产地为安徽 (编号为 S1~S3)、云南 (编号为 S4~S6)、陕西 (编号为 S7~S9)、贵州 (S10~S11) 的 11 批天麻饮片, 均经南京中医药大学吴啟南教授鉴定为兰科天麻属植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[15]

Hypersil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.5% 醋酸水溶液 (A)-0.5% 醋酸甲醇溶液 (B), 线性梯度洗脱: 0~10 min, 98% A; 10~60 min, 98%~60% A; 60~75 min, 60% A; 体积流量 0.8 mL/min; 检测波长 270 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。

2.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子化源 (ESI); 多反应监测模式 (MRM) 进行定量分析; 采用负离子检测模式; 源喷射电压 (IS) 为 -4 500 V; 离子源温度为 550 °C; 雾化气 (N₂) 压力为 379.28 kPa (55 psi); 辅助气 (N₂) 压力为 379.28 kPa (55 psi); 气帘气 (N₂) 压力为 241.36 kPa (35 psi)。接口加热, 全程通入氮气, MRM 模式定量。监测的离子对、驻留时间 (Dwell)、解簇电压 (DP)、碰撞室射出电压 (CXP) 和碰撞能量 (CE) 等见表 1。8 个被测成分的多重反应监测色谱图见图 1。

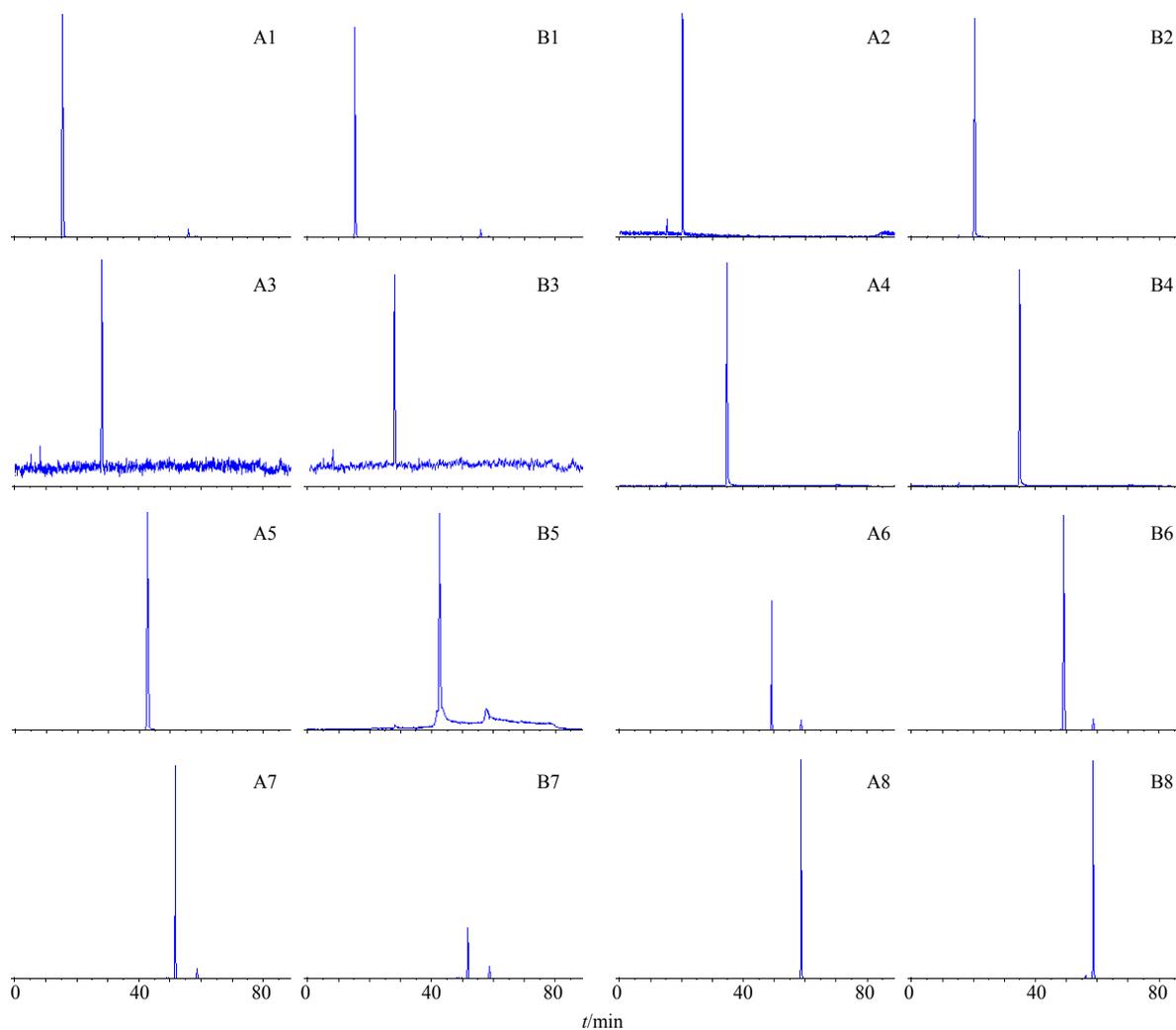
2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 取各对照品适量, 加水制成含天麻素 120.60 μg/mL、对羟基苯甲醇 184.20 μg/mL、香荚兰醇 3.06 μg/mL、对羟基苯甲醛 10.60

表 1 8 种成分的质谱数据

Table 1 HPLC-ESI-MSⁿ data of eight components

成分	t _R /min	母离子质荷比 (m/z)	子离子质荷比 (m/z)	驻留时间/ms	DP/V	CE/eV	CXP/V
天麻素	15.36	285.047	122.957	100	-75	-14	-13
对羟基苯甲醇	20.39	122.956	105.962	100	-75	-14	-11
香荚兰醇	28.07	152.953	136.020	100	-75	-14	-9
对羟基苯甲醛	34.91	120.900	93.000	100	-190	-31.8	-7
香荚兰醛	42.65	150.676	135.929	100	-105	-16	-15
巴利森苷 B	49.20	727.005	423.080	100	-150	-36	-27
巴利森苷 C	51.74	727.005	423.080	100	-150	-36	-27
巴利森苷 A	58.69	995.113	727.114	100	-65	-38	-27



1-天麻素 2-对羟基苯甲醇 3-香荚兰醇 4-对羟基苯甲醛 5-香荚兰醛 6-巴利森苷 B 7-巴利森苷 C 8-巴利森苷 A
1-gastrodin 2-*p*-hydroxybenzyl alcohol 3-vanillyl alcohol 4-vanillin 5-*p*-hydroxybenzaldehyde 6-parishin B 7-parishin C 8-parishin A

图1 对照品溶液 (A) 和供试品溶液 (B) 8种成分的MRM色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of eight components in reference solution (A) and sample solution (B)

μg/mL、香荚兰醛 0.69 μg/mL、巴利森苷 B 95.536 mg/mL、巴利森苷 C 445.73 μg/mL、巴利森苷 A 311.66 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备^[1] 取本品粉末(过3号筛)约2g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇50mL,放置2h,时时振摇,称定质量,加热回流3h,放冷,再称定质量,用稀乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液10mL,浓缩至近干,残渣加甲醇-水(3:97)混合溶液溶解,转移至25mL量瓶中。用甲醇-水(3:97)混合溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系、检测限(LOD)与定量限(LOQ) 精密量取混合对照品溶液4mL,置于5mL量瓶中,

加水稀释至刻度。用倍比稀释的方法以甲醇-水(3:97)混合溶液制成系列对照品溶液,在“2.1”项色谱条件下,分别进样20μL,每个质量浓度进3针,测定峰面积值。以峰面积平均值与质量浓度进行线性回归。将混合对照品溶液用水不断稀释后分析,得到8种成分的LOD值(S/N≈3)和LOQ值(S/N≈10)。结果见表2。

2.4.2 精密度试验 取编号为S7的天麻饮片制备的供试品溶液,进样20μL,连续进样6次,依法测定,分别记录峰面积,计算RSD。结果天麻素、对羟基苯甲醇、香荚兰醇、对羟基苯甲醛、香荚兰醛、巴利森苷B、巴利森苷C、巴利森苷A峰面积的RSD分别为2.47%、3.53%、1.22%、2.84%、2.99%、3.06%、1.60%和0.54%。

表2 8种成分的回归方程及 LOD、LOQ 值

Table 2 Regression equations and values of LOD and LOQ of eight components

化合物	回归方程	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	r	LOD/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
天麻素	$Y=2.24\times 10^5 X-2.99\times 10^5$	6.03~ 96.48	0.999 7	2.19	10.95
对羟基苯甲醇	$Y=1.36\times 10^4 X+3.72\times 10^3$	9.21~147.36	0.999 5	1.38	6.91
香荚兰醇	$Y=7.56\times 10^2 X+1.90\times 10^1$	0.15~ 2.45	0.999 2	0.47	4.72
对羟基苯甲醛	$Y=1.11\times 10^5 X+7.93\times 10^3$	0.53~ 8.48	0.999 6	0.29	0.88
香荚兰醛	$Y=1.73\times 10^7 X-8.30\times 10^4$	0.03~ 0.55	0.999 8	0.65	2.62
巴利森苷 B	$Y=3.01\times 10^5 X+2.72\times 10^6$	47.77~764.29	0.999 5	2.81	8.43
巴利森苷 C	$Y=4.19\times 10^5 X-3.04\times 10^6$	22.29~356.58	0.999 7	3.92	19.60
巴利森苷 A	$Y=6.67\times 10^5 X+1.18\times 10^6$	15.58~249.33	0.999 2	3.76	18.80

2.4.3 稳定性试验 取编号为 S7 的天麻饮片制备的供试品溶液, 于 0、1、2、4、6、8 h 分别进样 20 μL , 依法测定, 分别记录峰面积, 计算 RSD。结果天麻素、对羟基苯甲醇、香荚兰醇、对羟基苯甲醛、香荚兰醛、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 A 峰面积的 RSD 分别为 2.71%、1.92%、3.48%、1.50%、2.33%、2.61%、3.09% 和 1.18%, 表明供试品溶液中 8 种成分在 8 h 内稳定。

2.4.4 重复性试验 取编号为 S7 的天麻饮片 6 份, 每份 2 g, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 依法测定并计算 6 份样品中 8 种成分的平均质量分数和 RSD。结果, 天麻素、对羟基苯甲醇、香荚兰醇、对羟基苯甲醛、香荚兰醛、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 A 的平均质量分数分别为 2.573、4.101、0.075 75、0.272、0.018 55、22.265、10.368、7.964 mg/g, RSD 分别为 2.78%、1.90%、3.33%、3.82%、2.66%、4.05%、2.00%、1.52%。

2.4.5 加样回收率试验 取编号为 S7 的天麻饮片 6 份, 每份 1 g, 精密称定, 精密加入混合对照品溶 1 mL (含天麻素 2.293 mg/mL、对羟基苯甲醇 0.364 mg/mL、香荚兰醇 0.082 6 mg/mL、对羟基苯甲醛 0.311 mg/mL、香荚兰醛 0.199 mg/mL、巴利森苷 B 24.261 mg/mL、巴利森苷 C 12.836 mg/mL、巴利森苷 A 7.281 mg/mL), 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 依法测定并计算 6 份样品中 8 种成分的平均加样回收率和 RSD。结果, 天麻素、对羟基苯甲醇、香荚兰醇、对羟基苯甲醛、香荚兰醛、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 A 的平均加样回收率分别为 97.73%、95.56%、97.55%、94.51%、100.12%、102.70%、99.30%、96.81%, RSD 分别为 2.39%、2.14%、3.03%、1.07%、2.55%、1.91%、1.15%、1.35%。

2.5 样品测定

取 11 批天麻饮片, 每批 3 份, 按“2.3.2”项下方法分别制备供试品溶液, 各进样 20 μL , 以各成分峰面积按外标法对其中的天麻素、对羟基苯甲醇、香荚兰醇、对羟基苯甲醛、香荚兰醛、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 A 进行测定, 并计算每批 3 份的平均质量分数, 结果见表 3。

3 讨论

结合文献报道^[15], 以《中国药典》2010 年版天麻定量测定中提取方法为依据, 本实验比较了超声提取、加热回流提取等不同提取方式, 结果发现加热回流提取优于超声提取, 且 2 次加热回流提取之间间隔较长时间优于 2 次加热回流提取连续进行。

本实验结果表明, 天麻饮片中所含天麻素、对羟基苯甲醇、香荚兰醇、对羟基苯甲醛、香荚兰醛、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 A 这 8 种成分的量差异较大, 同一个成分的量相差甚至十几至几十倍, 分析其原因, 主要有 (1) 产地的影响, 我国幅员辽阔, 适宜天麻种植的产区较多, 不同地区的气候、光照、海拔等环境因素不尽相同, 对天麻的生长及其生长过程中各种次生代谢产物的累积也不相同。(2) 产地加工的影响, 中药材采收后均需产地进行一定的初加工处理, 以便保存其中的主要成分和后续的运输、贮藏, 但是不同地区的产地加工方法也不相同, 如有的地区对天麻采用蒸的方法, 有的地区采用煮的方法, 甚至有的地区还用硫磺进行熏蒸。(3) 炮制工艺的影响, 饮片来源于药材, 又不同于药材, 还需要经过一定的炮制工艺。不同地区的炮制习惯、不同饮片厂的炮制工艺具体参数和炮制设备也都有所差异, 这也会造成各种成分量的差异。此外需要注意的是, 受试样品中仍有少数

表 3 11 批饮片中 8 种成分的质量分数
Table 3 Determination of eight components in *Gastrodiae Rhizoma*

样品	产地	质量分数/(mg·g ⁻¹)							
		天麻素	对羟基苯甲醇	香荚兰醇	对羟基苯甲醛	香荚兰醛	巴利森苷 B	巴利森苷 C	巴利森苷 A
S1	安徽	1.979*	3.915	4.069×10 ⁻³	0.446	0.015 67	14.909	6.974	8.090
S2		3.359	1.322	0.016 07	0.193	0.024 28	23.882	8.915	8.164
S3		4.396	0.507	0.049 32	0.404	0.022 18	13.865	2.681	5.508
S4	云南	4.781	0.707	0.024 58	0.358	0.025 94	21.121	6.137	15.463
S5		4.565	1.265	9.528×10 ⁻³	0.373	0.020 73	20.273	6.805	13.679
S6		1.989*	11.462	0.170	0.238	0.018 16	23.845	9.227	8.430
S7	陕西	2.563	4.198	0.078 79	0.263	0.017 31	22.888	10.795	8.032
S8		4.345	0.452	4.706×10 ⁻³	0.395	0.023 11	13.696	2.739	5.274
S9		2.513	3.966	0.088 48	0.248	0.023 45	22.958	11.326	8.346
S10	贵州	0.708*	28.362	0.472	1.100	0.068 30	11.605	2.333	10.176
S11		2.970	4.701	0.094 15	0.292	0.029 26	24.136	14.704	8.214

*表明天麻素质量分数低于《中国药典》2010 年版规定的 0.20%

*contents of gastrodin below 0.20%, minimum value defined in *Chinese Pharmacopoeia* (Volume I, 2010)

几批的天麻素质量分数低于《中国药典》2010 年版的规定（不少于 0.20%），说明目前市场上销售的天麻质量问题不容忽视。

从化学结构上观察，巴利森苷 A、B、C 均为天麻素和柠檬酸结合而成的酯类。本实验结果表明，其量较高，大多数均高于天麻素，有的甚至超出 10 倍以上。此外，还有一些尚未确定结构的化合物在饮片中亦有较高的量。上述这些成分的存在或其量高低可能会对天麻饮片的质量产生影响。因此，还需对这些质量分数较高的化合物进行结构确证和归属，探索它们对天麻药效的贡献及它们与天麻素之间的内在转化关系，并为进一步完善天麻的质量控制方法提供技术支持和研究基础。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
 [2] 周俊, 杨雁宾, 杨崇仁. 天麻的化学研究 [J]. 化学学报, 1979, 37(3): 183-189.
 [3] 王莉, 王艳萍, 肖红斌, 等. 天麻化学成分研究 [J]. 中草药, 2006, 37(11): 1635-1637.
 [4] 刘艳华. 天麻素注射液治疗紧张性头痛 96 例临床疗效观察 [J]. 中国卫生产业, 2013, 22(16): 74-75.
 [5] 李惠萍. 天麻素治疗眩晕症疗效观察 [J]. 医学信息, 2011, 24(3): 1329.
 [6] 苗凯, 王美, 谢祎. 天麻素治疗冠心病心绞痛临床效果的观察 [J]. 天津药学, 2009, 21(6): 26-27.
 [7] 官昌伦, 曹光宇, 熊波, 等. 天麻素对偏头痛患者疼

痛程度的影响及临床疗效的观察 [J]. 内蒙古中医药, 2014, 33(8): 2-3.

[8] 贾玉. 天麻素治疗血管神经性头痛临床疗效 [J]. 中国现代药物应用, 2015, 9(1): 99-100.
 [9] Gao L W, Li W Y, Zhao Y L, et al. The cultivation, bioactive components and pharmacological effects of *Armillaria mellea* [J]. *Afr J Biotechnol*, 2009, 8(25): 7383-7390.
 [10] 毕天, 李彦文, 段靖远, 等. 天麻抗老年期痴呆有效成分的研究进展 [J]. 中医药导报, 2013, 19(2): 103-106.
 [11] Ha J H, Shin S M, Lee S K, et al. *In vitro* effects of hydroxybenzaldehydes from *Gastrodia elata* and their analogues on GABA ergic neurotransmission and a structure-activity correlation [J]. *Planta Med*, 2001, 67(9): 877-880.
 [12] Junko H, Toshikazu S, Shigeyoshi D, et al. Phenolic compounds from *Gastrodia Rhizome* and relaxant effects of related compounds on isolated smooth muscle preparation [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59(5): 513-519.
 [13] 李秀芳, 代蓉, 李国花, 等. 天麻成分对羟基苯甲醛抗血小板聚集作用及急性毒性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(3): 317-320.
 [14] 李艳, 蒋石, 郭营营, 等. 天麻成分对羟基苯甲醇抗实验性脑血栓形成及抗炎作用研究 [J]. 昆明医科大学学报, 2015, 36(1): 28-31.
 [15] 王莉. 天麻化学物质基础及质量控制方法研究 [D]. 大连: 中国科学院研究生院 (大连化学物理研究所), 2007.