HPLC分析比较提取方法对天麻活性成分的影响

余 兰[1,2]，娄方明[1]，张新申[2]
（1.遵义医学院药学系，贵州遵义 563003；2.四川大学轻纺与食品学院，四川成都 610065）

摘 要：分析比较不同提取方法对天麻药材中活性成分提取的影响。以天麻生药材为分析对象，比较微波辅助提取、超声波提取、冷凝回流提取3种提取方法对天麻素提取率的影响。采用高效液相（HPLC）测定其提取的天麻素含量，条件为Angilent Tc-C_{18}（4.6mm×250mm，5μm）色谱柱，V（乙腈）∶V（0.05%磷酸）=15∶85为流动相，流速0.5mL/min，检测波长221nm，柱温25℃。天麻素在4.28~214μg范围内线性关系良好，平均回收率为100.02%（RSD=1.52%）。微波辅助提取法提取天麻素得率为1.613%，超声波法提取天麻素得率为1.215%，冷凝回流提取天麻素得率为0.703%。对于天麻生药材，不同提取方法对活性成分天麻素的提取影响较大，建议选用微波辅助提取法作为天麻素的提取方法。本实验所建立的HPLC方法具有良好的精密度、重现性，结果准确可靠，可作为天麻药材及天麻素类产品的质量控制方法。

关键词：天麻，天麻素，高效液相色谱法（HPLC），提取

Effects of extracting methods on active component in *Gastrodia elata* by HPLC analysis

YU Lan[1,2]，LOU Fang-ming[1]，ZHANG Xin-shen[2]
（1.Department of Pharmacy，Zunyi Medical College，Zunyi 563003，China；
2.College of Light Textile and Food Science，Sichuan University，Chengdu 610065，China）

Abstract：The effects of the gastrodine content of the active component in *Gastrodia elata* were compared and analyzed by different extracting methods.The raw *Gastrodia elata* was used and the concentration of gastrodine determined by HPLC after three extracting techniques.HPLC method was performed on as the mobile phase was a mixture of acetonitrile-0.05% phosphoric acid（v∶v = 15∶85） at 25℃，the chromatographic column was Agilent Tc-C_{18}（416mm ×250mm，5μm），the flow rate was 0.5mL/min，and the detection wavelength was 221nm.The calibration curve was linear（R^2 = 0.9998） in the range of 4.28~214μg for gastrodin，the average recovery was 100.02% with RSD 1.52%.The ratios of gastrodine was 1.613% by the microwave extracting method，the ratios of gastrodine were 1.215%，0.703% respectively by ultrasonic extracting method and circumfluence extracting method extraction，which was higher than other extracting methods by raw material. Different methods have evident extracting effects on the gastrodine with raw material. According to active component most suitable microwave extracting method should be adopted.The HPLC method built by this study is stable，reliable，and which can be used as a quality control item for *Gastrodia elata* and the gastrodine products.

Key words：*Gastrodia elata Bl.*；*Gastrodine*；high performance liquid chromatography；extracting
中图分类号：TS201.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1002-0306（2010）08-0220-03

天麻（*Gastrodia elata Blume*）为兰科植物天麻（*Gastrodia elata Bl.*）的干燥块茎，为常用名贵中药。该药性平、味甘，具有平肝熄风，止痉之功效。临床上用于治疗头痛眩晕、肢体麻木、小儿惊风、癫痫抽搐、破伤风等症[1]，近年来的研究发现，天麻还具有增智、健脑、延缓衰老和增强机体免疫力的作用[2]。天麻主要含天麻素、甾醇、有机酸、多种氨基酸、多糖、核苷和淀粉等成分[3-4]，其中的最主要活性成分是天麻素。随着天麻药理和临床研究的深入，天麻药用产品的开发研制工作日益得到关注。以天麻为主要原料的中成药现已成为许多制药厂的重要产品，另外，还有天麻片、天麻胶囊、天麻口服液、天麻酒、天麻定眩宁、天麻蜂王浆、天麻益脑冲剂等产品[5]。在食品开发方面，有蜜饯、饮料、含片、糖果等。天麻的

收稿日期：2010-01-19
作者简介：余兰（1971-），女，副教授，在读博士研究生，主要从事天然产物活性成分分离领域的研究。
基金项目：贵州省卫生厅2006年度科研计划项目；遵义市科技基金项目（遵义市科合社字：200706号）。

药食兼用、保健功能方面研究仍具有重大潜在价值。天麻产品的开发与研究应从简单的粗加工向深加工、提取、精制转化,扩大其药用,提高其药的质量和药效[6-7],因此提取天麻活性成分并建立其测定方法具有十分重要的意义。天麻药材的质量控制,2005版药典采用天麻素为对照品进行定性、定量分析[1]。不同炮制方法[8-10]和提取方法对天麻活性成分的提取均有影响。为了更好地利用我国的天麻资源,本文采用HPLC法测定了微波辐射提取法、超声提取法、冷凝回流提取法3种不同的提取方法对天麻素提取率的影响,该法简便、快速、灵敏、准确,可为天麻产品的开发利用及含量检测提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

天麻药材　市售,由遵义医学院药学系生药学教研室杨建文副教授鉴定为兰科植物天麻 *Gastrodia elate Bl.*,粉碎,粉末过80目筛,80℃干燥1h备用;天麻素对照品　中国药品生物制品检定所,批号:110807-200205,80℃减压干燥1h备用;乙腈　色谱纯,Sigma公司;水　超纯水;其它试剂　均为分析纯。

Agilent1100高效液相色谱仪　配有Tc-C_{18}(416mm×250mm,5μm)色谱柱;1100 G1315A二极管阵列检测器、1100 G1311A四元泵、1100配套化学工作站　美国Agilent公司;KQ-500DE数控超声波清洗器　昆山市超声仪器有限公司;AL204电子天平　瑞士METTLER TOLEDO公司;Anke TGL-16C型高速离心机　上海安亭科学仪器厂;FZ植物粉碎机　天津泰斯特仪器有限公司;MAS-II型常压微波合成/萃取反应工作站　上海新仪微波化学科技有限公司;艾柯DZG-303A型纯水仪　成都唐氏康宁科技有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　天麻素的提取

1.2.1.1　冷凝回流法提取　精密称取天麻粉末5.0g,将天麻粉末置于150mL圆底烧瓶中,加入70%甲醇60mL,浸泡2h后,称定重量。加热回流提取3h,放冷后,再称定重量,用70%甲醇补足减失的重量,将提取液进行离心分离并收集上层清液,取上层清液5mL移至50mL容量瓶中,用70%的甲醇水溶液定容,摇匀并经0.45μm过滤膜过滤、超声波脱气后待检测。

1.2.1.2　微波提取　精密称取天麻粉末5.0g,将天麻粉末置于150mL圆底烧瓶中,加入70%甲醇60mL,浸泡2h后,称定重量,置于MAS-II型常压微波合成/萃取反应工作站中,装好冷凝管,在功率400W,温度50℃条件下,作用9min。放冷后,再称定重量,用70%甲醇补足损失的重量,将提取液进行离心分离并收集上层清液,取上层清液5mL移至50mL容量瓶中,用70%的甲醇水溶液定容,摇匀并经0.45μm过滤膜过滤、超声波脱气后待检测。

1.2.1.3　超声波提取　精密称取天麻粉末5.0g,将天麻粉末置于250mL锥形瓶,加入70%甲醇60mL,称定重量,浸泡2h后,置于KQ-500DE数控超声波清洗器中,在功率300W,温度55℃条件下,作用30min。放冷后,再称定重量,用70%甲醇补足损失的重量,将提取液进行离心分离并收集上层清液,取上层清液5mL移至50mL容量瓶中,用70%的甲醇水溶液定容,摇匀并经0.45μm过滤膜过滤、超声波脱气后待检测。

1.2.2　分析方法

1.2.2.1　天麻素对照品备用液的配制　称取在80℃减压干燥1h的对照品42.8mg,置于10mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,得天麻素对照品储备液。再取5mL此储备液于100mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,得天麻素对照品备用液,浓度为428μg/L。

1.2.2.2　天麻素色谱条件　色谱柱:Angilent Tc-C_{18}柱(5μm,4.6mm×250mm);柱温25℃;流动相:V(乙腈):V(0.05%磷酸)=15:85;检测波长221nm;流速0.5mL/min;进样量10μL。

1.2.2.3　标准曲线制备　精密吸取"1.2.2.1"配制的天麻素对照品溶液0.1,0.2,0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0mL,分别置于10mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,得质量浓度4.28,8.56,21.4,42.8,85.6,128.4,171.2,214.0μg/L的天麻素样品溶液,0.45μm微孔滤膜滤过,分别进样10μL。以峰面积对天麻素进样量做线性回归,得回归方程 $Y=16.275x-11.751$, $R^2=0.9998$。结果表明天麻素进样量在4.28~214μg/L范围内与峰面积有良好的线性关系。

1.2.2.4　精密度实验　精密吸取浓度为128.4μg/L的对照品溶液10μL,在上述色谱条件下,重复进样8次,结果测定天麻素峰面积相对标准偏差RSD为0.94%,表明仪器精密度良好。

1.2.2.5　加样回收率实验　取同批天麻样品,精密量取已知含量的样品9份,分别加入一定量的天麻素对照品,按照"1.2.1.2"项下方法进行处理,测定天麻素含量,计算回收率,结果见表1。

表1　加样回收率实验结果(n=9)

实验号	样品含量(mg)	加入量(mg)	实际测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.4870	0.5000	0.9865	99.91	100.02	1.52
2	0.4972	0.5000	0.9906	98.67		
3	1.0020	1.0000	1.9821	98.01		
4	0.9986	1.0000	2.0010	100.24		
5	1.4942	1.5000	3.0126	101.23		
6	1.4986	1.5000	3.0297	102.07		

1.2.2.6　稳定性实验　取同一供试品溶液,每隔2h进样10μL,共测10次,以天麻素面积计算得其RSD%为1.23%。表明供试品溶液在12h内稳定。

1.2.2.7　重现性实验　取同一批天麻样品,照"1.2.1.2"方法,制备5份,进行测定。以天麻素含量计算,RSD为0.97%。

2　结果与分析

2.1　不同提取方法HPLC色谱图比较

采用反相高效液相色谱法测定了天麻素的含量,天麻素对照品和天麻样品色谱图见图1~图4,三种不同的提取方法的提取液都在8.2min左右有天麻

素的色谱峰。

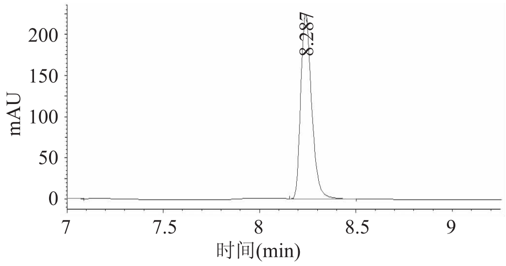

图1　天麻素对照品色谱图

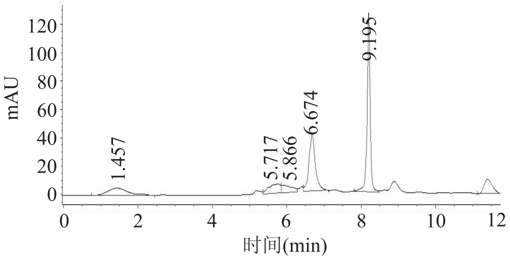

图2　冷凝回流法提取样品色谱图

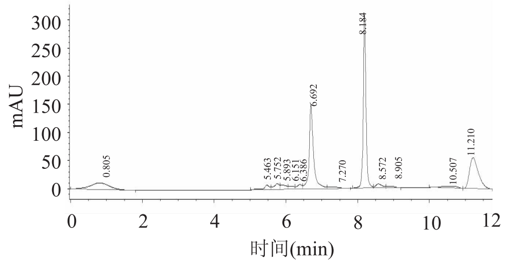

图3　微波辅助法提取样品色谱图

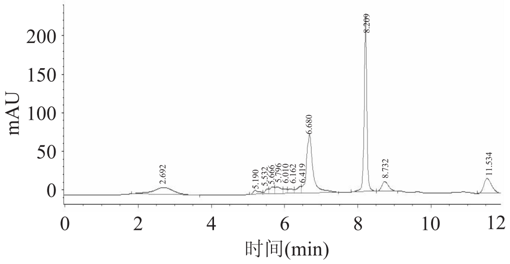

图4　超声波法提取样品色谱图

为达到天麻样品提取液中天麻素与其它物质基线分离的目的，使其它物质对天麻素测定基本不形成干扰。选用不同比例的乙腈-0.05%磷酸为流动相，考察流动相对色谱行为的影响，最后选用乙腈-0.05%磷酸（15:85）为流动相，流速为0.5mL/min，天麻素提取样品得到较好分离，峰形良好。本实验所建立的HPLC方法具有良好的精密度、重现性，结果准确可靠，可作为天麻药材及天麻素类产品的质量控制方法。

2.2　样品含量测定

称取15批天麻样品，按“1.2.1”提取方法进行提取，在上述色谱条件下进样测定，将所得峰面积代入相应的标准曲线方程，计算样品中天麻素的含量，结果详见表2。结果表明，对相同量的天麻样品中天麻素的提取，微波提取效率明显高于超声提取法和传统提取法。

表2　天麻中天麻素不同提取方法含量比较

方法	质量（g）	溶剂用量（mL）	提取时间（min）	提取率（%）
冷凝回流	3	60	180	0.703
微波提取	3	60	9	1.613
超声提取	3	60	30	1.215

3　讨论

本文提供了适合天麻素提取的三种方法，微波提取法与冷凝回流、超声提取法相比，不仅提取效率高，而且提取时间短、节约能源。微波提取法有利于甲醇溶液渗透穿过天麻的细胞壁和细胞膜，较好地将天麻素从天麻物质中溶出，从而获得较高提取率。提取天麻素时，推荐采用微波提取法。微波作为一种新型、高效、便捷、快速的提取手段，显示出越来越大的优势，将日益应用到中草药大规模开发生产中。

参考文献

[1]国家药典委员会.中华人民共和国药典一部[S]. 第五版. 北京：化学工业出版社，2005：39.

[2]张赫名.天麻的研究进展[J].中药研究与信息，2005，7(11)：19-22.

[3]国家中医药管理局(中华本草)编委会.中华本草第8卷[M].上海：上海科学技术出版社，1999：716-722.

[4]金文珊，田德蔷.天麻的药理和化学研究概况[J].中药研究与信息，2000，2(6)：21.

[5]张宏杰，周建军，李新生.天麻研究进展[J].氨基酸和生物资源，2003，25(1)：17-20.

[6]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，2004，24(3)：22-24.

[7]张梦娟，徐怀德，牛素哲，等.天麻多糖水提取工业优化研究[J].食品工业科技，2006，27(11)：119-121.

[8]秦俊哲，张洁，周涵.不同炮制方法对天麻素含量的影响[J].中药材，2006，29(12)：1285-1288.

[9]王兴，周明眉.天麻中有效成分的提取工艺[J].华西药学，2003，18(4)：269-270.

[10]高国英，魏晓舒.超声处理对天麻饮片含量测定的影响[J].江苏药学与临床研究，2000，8(1)：61-62.

（上接第219页）

表3　二次提取结果

次数	第1次	第2次	总和
绿色素提取率(mg/g)	1.7269	0.4546	2.1815

3　结论

绿茶中绿色素的最佳提取条件为：温度75℃，时间60min，乙醇浓度95%，醇茶比14:1（mL/g），二次提取，提取率为2.1815mg/g。

参考文献

[1] 中国农业科学院茶叶研究所.中国茶叶加工现状[J].中国茶叶，2008(8)：4-6.

[2] 马士成，于海宁，沈生荣.茶绿色素的制备及其稳定性研究进展[J].茶叶，2007，33(1)：11-15.

[3] 陈彦，陈戈.茶绿色素的制取工艺及稳定性研究[J].中国茶叶加工，1998(1)：30-33.

[4] 李凤娟，王玉，杜金华.茶绿色素提取工艺研究[J].现代食品科技，2005(1)：87-89.