

天麻及其近缘植物酚性成分的高效液相色谱定量分析*

阮德熹 杨崇仁 浦湘渝

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明)

摘要 本文应用高效液相色谱技术对天麻(*Gastrodia elata* Blume)及其近缘植物共16个样品的8种酚性成分进行定性定量分析。实验结果表明,该方法不仅可用于检验中药天麻的质量,亦可用于筛选新的天麻素药物资源,并为其化学分类提供一定的依据。

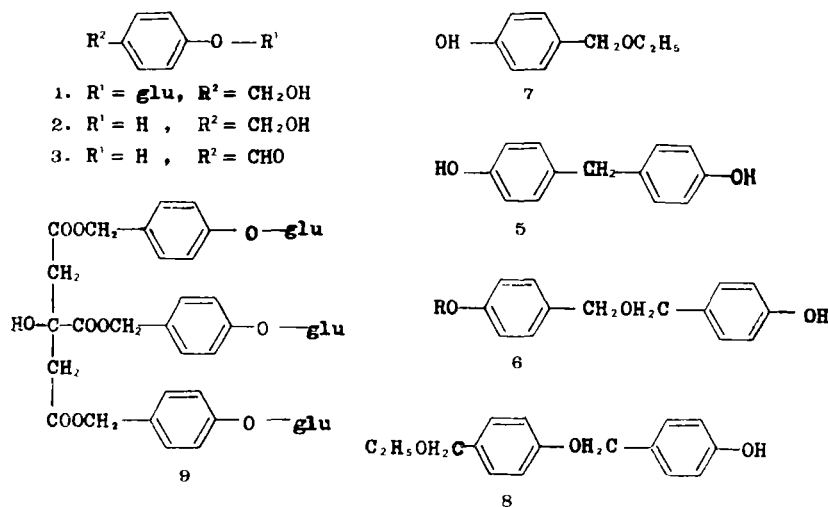
关键词 天麻; 原天麻; 山珊瑚; 酚性成分; 高效液相色谱

天麻(*Gastrodia elata* Blume),又名赤箭、定风草等,属兰科植物,是我国著名中药。我们曾报道从天麻中分离到天麻素(gastrodin)(1)等多种酚性成分,药理实验和临床验证表明其中的天麻素是天麻中镇静镇痛的有效成分之一〔1-5〕。我们进而人工合成了天麻素〔6〕。周铨等对天麻的生物学特性进行了长期系统的观察,且研究了天麻的有性繁殖技术〔7〕。目前天麻在我国各地已普遍种植。人们曾研究用多种方法(包括HPLC)〔8,9〕测定天麻素的含量。由于天麻中除天麻素(1)外,尚含有多种酚性成分,为了对天麻中的酚性成分进行较全面的比较,本文报告天麻中多种酚性成分的HPLC测定技术及其应用。

天麻中的酚性成分极性差异较大,天麻素(gastrodin(1)和三〔4-(β-D-葡萄糖吡喃糖基)-氧-苄基-柠檬酸酯(Tris(4-β-D-glucopyranosyl)-oxy-benzyl) citrate, parishin(9)是水溶性酚甙类成分,而对羟基苯甲醇(P-hydroxybenzyl alcohol)(2),对羟基苯甲醛(P-hydroxybenzyl aldehyde)(3),4,4'-二羟基二苯基甲烷(4,4'-dihydroxydiphenyl methane)(5),4,4'-二羟基二苯醚(4,4'-dihydroxydibenzyl ether)(6),对羟基苯基乙基醚(P-hydroxybenzyl ethyl ether)(7),4-乙氧基苄基-4'-羟苄基醚(4-ethoxymethyl phenyl-4'-hydroxy benzyl ether)(8),则是酯溶性的酚性化合物。通过反复实验表明,企图用一种色谱柱,一套溶剂系统就将这些酚性成分完全分离是困难的。为此我们先将植物样品分成极性和非极性两部份,然后选用不同填料的两种类型的色谱柱及不同溶剂系统分别进行分析,这两部份均得到了良好的分离(图1,1、3)。在此基础上,我们对16个植物样品的8种酚性成分进行了定性定量分析。

1987-03-24收稿

* 国家自然科学基金资助项目



实验部分

1. 仪器与条件

Shimadzu LC-4A高效液相色谱仪, SPD-2AS可变波长紫外检测器, SIL-1A无隔膜手动进样阀, C-R 3A数据处理机。

色谱柱: Zorbax ODS 250×4.6 mm (Dupont) (用于乙醚提取物); Partisil ODS 250×9.4 mm (Whatman) (用于正丁醇提取物)。

2. 溶液的制备

各取一定量的(1)~(9)标准品分别配成 $0.045-1\text{mg/ml}$ 浓度的溶液作为对照溶液。

试样的制备 取试样50 g,于索氏提取器中用甲醇回流提取,提取液减压浓缩至干,用200 ml水混悬,水液用乙醚、正丁醇相继萃取,乙醚提取液用无水硫酸钠干燥,过滤,减压蒸干得乙醚提取物,正丁醇提取液减压蒸干得正丁醇提取物。

3. 分离条件与测定方法

(1) 分离条件 经反复试验和比较不同类型的色谱柱和洗脱液发现,含水溶性酚甙类成分(1)和(9)的正丁醇提取物在Partisil ODS柱上,流动相:甲醇:水(9:1)、流速 0.25 ml/min ,波长 225 nm ,灵敏度 0.32 AUFs ,分离良好(图1,1、2),而含酯溶性酚性化合物(2)~(8)的乙醚提取物则在Zorbax ODS柱上,洗脱液:甲醇:水(6.5:3.5),流速 0.2 ml/min ,波长 270 nm ,灵敏度 0.08 AUFs ,分离较佳(图1,3、4)。

(2) 标准曲线的制备 精密称取经 45°C 真空干燥箱干燥6小时后的上述8个酚性成分标准品各 1 mg 置于 1 ml 容量瓶内,甲醇溶解定容,按进样量对峰面积作图,在 $1-7\text{ }\mu\text{g}$ 定量范围内,各酚性成分的浓度与峰面积均呈线性关系(图2、图3)。

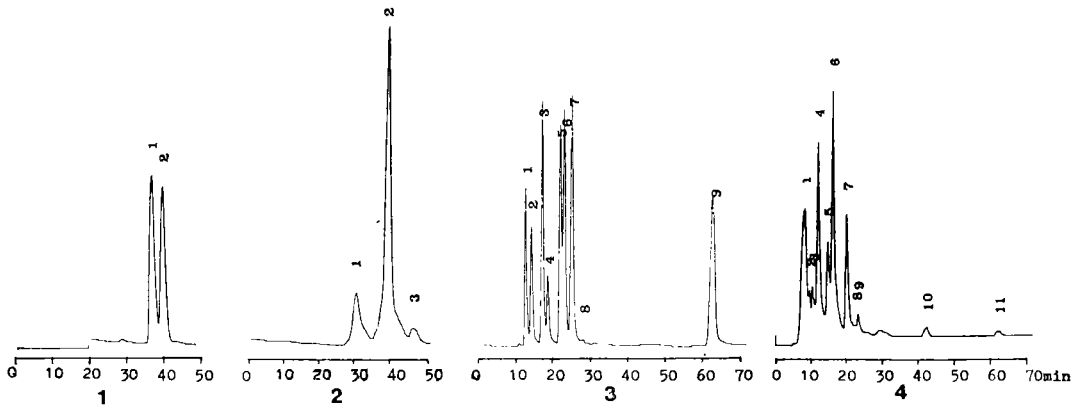


图 1 1.天麻正丁醇提取物酚性成分标准品；2.云南石屏野生乌天麻；3.天麻乙醚提取物酚性成分标准品；4.云南昆明栽培乌天麻。

Fig 1 1. Standard, the phenols from BuOH ext. of *Gastrodia elata*; 2. Yunnan Shipin (native); 3. Standard, the phenols from Et₂O ext. of *Gastrodia elata*; 4. Yunnan Kunming (cultivate).

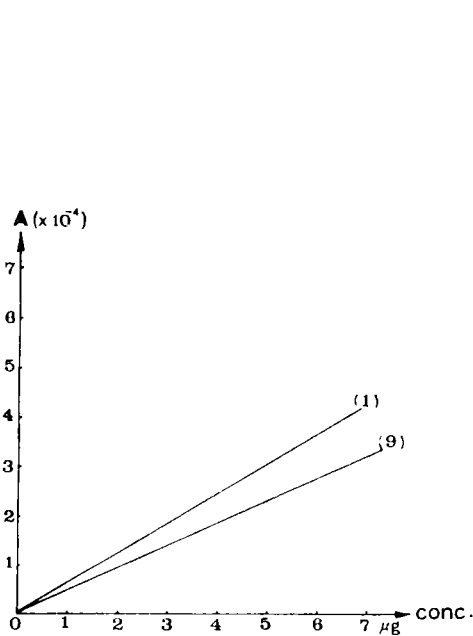


图 2 标准曲线
Fig. 2 Standard curve

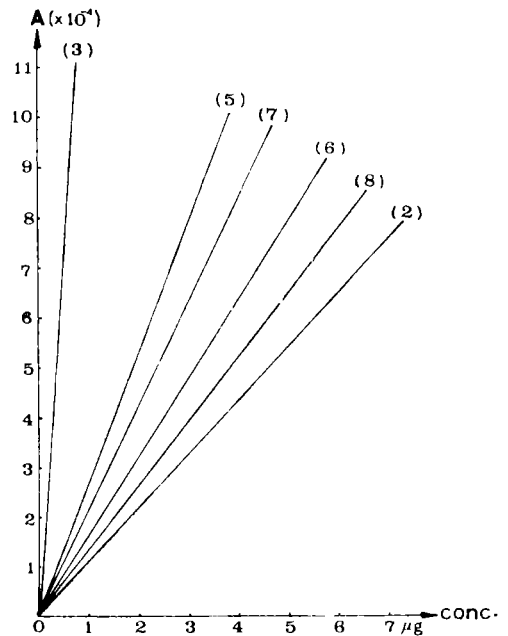


图 3 标准曲线
Fig. 3 Standard curve

表1 天麻素(1)重复性试验
Table 1 Repeatability test of gastrodin

样品名称	三次平均值(mg)	标准差(s)	变异系数(c.v%)
云南野生乌天麻	129.15	1.84	1.42
云南昆明家种乌天麻	41.58	0.67	1.61
云南富民家种新鲜乌天麻	20.96	0.67	3.19
四川荣经野生红天麻	48.18	2.47	5.13
云南景东泡夜台家种红天麻	13.29	0.051	0.41
云南景东青刚家种红天麻	25.29	1.02	1.03
云南景东铁夜台家种红天麻	18.89	0.73	3.88
云南彝良山珊瑚	8953.13	224.96	2.51

表2 回收率试验
Table 2 Test of returned rate

酚性成分编号 (NO.)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	三次回收率平均值 (%)	变异系数 (c.v%)
(1)	0.485	0.4991		
(1)	0.485	0.5009	103.09	3
(1)	1.845	1.8652		
(1)	1.845	1.8327	100.16	0.91
(2)	0.490	0.4853		
(2)	0.490	0.4682	97.29	1.79
(3)	0.049	0.0499		
(3)	0.049	0.0481	100.00	
(5)	0.485	0.4926		
(5)	0.485	0.4543	97.62	4.04
(6 + 7)	1.00	1.0088		
(6 + 7)	1.00	0.9375	97.32	3.65
(8)	0.7275	0.6326		
(8)	0.7275	0.6089	85.33	1.90
(9)	2.02	2.0379		
(9)	2.02	2.0165	100.36	0.52

(3) 精密度和回收率试验 选择 8 个植物样品重复进样 3—9 次, 测定天麻素(1)的含量, 重现性良好, 变异系数分别在 0.41—5.13% 之间, 结果见表 1。

回收率试验 准确称取一定量的 8 个酚性成分的标准品, 依法处理并测定, 其中 7 个酚性成分的回收率在 94—104% 之间, (8) 的回收率稍低, 在 83—86% 之间, 结果见表 2。

(4) 试样的测定 将试样正丁醇提取物用甲醇溶解, 通过 S_μp-pak R_p-18 (Waters) 预柱过滤, 反复用甲醇清洗预柱, 合并滤液、转移至 5 ml 容量瓶内, 配成 1—4 mg/ml 左右浓度的样品溶液, 进样 10 μl, 与标准样品的相对保留时间比较, 并用加入法定性, 以外标法由 C-R 3A 数据处理机计算各成分的含量。另外, 将乙醚提取物用甲醇溶解, 通过 S_μp-pak R_p-18 (Waters) 预柱过滤、反复清洗预柱、合并滤液, 转移至 5 ml 容量瓶内, 配成 2—8 mg/ml 左右浓度的样品溶液、进样 10 μl, 与标准样品的相对保留时间比较, 并用加入法定性, 以外标法由 C-R 3A 数据处理机计算各成分的含量, 分析结果见表 3。

表 3 天麻及其近缘植物酚性成分的含量 (%)

Table 3. The content of phenol constituent of *Gastrodia elata* and its related plants

植物名称	酚 性 成 分								
	1	2	3	5	6	7	8	9	
云南昭通野生乌天麻	0.122								
云南野生乌天麻	0.258	0.0489	0.0047	0.0034	0.0191	0.0202	0.0034	0.084	
四川荣经野生乌天麻	0.281	0.0214	0.0041	0.0108	0.0303	0.0321	0.0164	0.085	
四川荣经家种乌天麻	0.106	0.0023	0.0013	0.0028	0.0011	0.0012		0.003	
云南昆明家种乌天麻	0.085	0.0316	0.0007	0.0009	0.0046	0.0050	0.0008	0.047	
云南富民家种新鲜乌天麻	0.042	0.0169	0.0010	0.0132	0.0135	0.0143	0.0091		
东北通化野生红天麻	0.264	0.0058	0.0017	0.0021	0.0011	0.0002			
四川荣经野生红天麻	0.096	0.0222	0.0019	0.0042	0.0113	0.0120	0.0043	0.048	
四川荣经家种红天麻	0.225	0.0751	0.0024	0.0018	0.0056	0.0059		0.079	
云南景东泡夜合家种红天麻	0.070	0.1106	0.0015	0.0084	0.0112	0.0113		0.026	
云南景东青刚家种红天麻	0.137	0.1711	0.0018	0.0061	0.0115	0.0123		0.045	
云南景东铁夜合家种红天麻	0.063	0.0241	0.0009	0.0033	0.0095	0.0101		0.042	
云南石屏野生原天麻	0.154	0.0624	0.0060	0.0104	0.0114	0.0121	0.0020	0.052	
云南丽江野生原天麻		0.0251	0.0013	0.0032	0.0074	0.0015	0.0635		
云南大理野生原天麻	0.048	0.1140	0.0052	0.0036	0.0078	0.0067			
云南彝良山珊瑚	1.658	0.1998	0.0241	0.0483	0.0453	0.0481	0.0282		

讨 论

应用半制备柱分离(1)和(9),效果良好,但在分析柱上却分不开。前人报道^[8,9]用HPLC分析的天麻素(1)含量偏高,很可能是混有(9)的缘故。

1. 野生天麻的酚性成分

云南昭通和四川荣经产的野生乌天麻(*G. elata*, f. *glauca*)和红天麻(*G. elata*, f. *elata*)这两个变型的天麻素(1)含量一般在0.1—0.3%之间,二者没有明显的区别,其余微量成分以(2)和(9)的含量偏高,并均以含有(9)为特征。但东北产的红天麻除天麻素外,其余成分的含量均相对较低,而且未检出(8)和(9),似乎因地分布而产生的酚性成分的差异要大于同一产地不同变型之间的变化。若进一步采集大量样品进行深入的系统研究显然是有化学生态学意义的。

2. 家种天麻的酚性成分

通常家种天麻的酚性成分与野生天麻相似,其中乌天麻的酚性成分均较野生者偏低,但四川荣经家种红天麻与当地野生红天麻比较,天麻素(1)及其甙(2)和(9)的含量则相对较高。

3. 新鲜天麻的酚性成分

在供分析的新鲜天麻的一个样品,即云南富民栽培的乌天麻中,各酚性成分的含量均较低,但在乙醚提取物中另外还检出两个未知成分含量较高,分别达0.58% (tR = 15.41 min)和0.18% (tR = 40.54 min)。目前这两个成分的化学结构正在鉴定中。市售的生药天麻是经过蒸煮、晒干等传统加工方法制成的,很可能在加工过程中一些酚性成分发生了变化,这一推测有待进一步证实。

4. 其它天麻属植物的酚性成分

原天麻(*G. angusta* S. Chow et S. C. Chen)的酚性成分因产地不同而异,云南海南(石屏)产的原天麻天麻素(1)含量在0.13—0.15%之间,其余微量成分的含量与乌天麻和红天麻相近,可以考虑作为天麻的代用品利用。云南西部(丽江、大理)产的原天麻,天麻素的含量甚微,其余酚性成分含量亦低,且未检出(9)。

5. 山珊瑚的酚性成分

山珊瑚(*Galeola lindleyana* (Hook. f. et Thoms) Reichd. f.)又称山海椒、假天麻,为兰科山珊瑚属植物,在云南东北部常绿阔叶林下与天麻生长在同样的生境条件下,生态类型与天麻相同,且均与密环菌共生。HPLC检出的酚性成分与天麻相似,而与天麻素保留时间相同的成分含量高达1.66%,是否为天麻素,有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 周俊,杨雁宾,杨崇仁. 科学通报 1978; 7: 335
- 2 周俊,杨雁宾,杨崇仁. 化学学报 1979; 37(3): 183—189
- 3 周俊,浦湘渝,杨雁宾. 科学通报 1981; 18: 1118—1120

- 4 周俊, 杨雁宾, 浦湘渝. 云南植物研究 1980; 3 (2): 370
- 5 周俊, 浦湘渝, 杨雁宾等. 云南植物研究 1983; 5 (4): 443—444
- 6 周俊, 杨雁宾, 杨崇仁. 化学学报 1980; 38 (2): 161—166
- 7 周铨, 杨兴华, 梁汉兴等. 天麻形态学. 北京: 科学出版社, 1987: 5—9
- 8 程式之, 梁翠资, 冉懋雄等. 药物分析杂志 1984; 4 (6): 344—347
- 9 沙振芳, 孙文基. 药物分析杂志 1985; 5 (4): 218—221

THE QUANTITATIVE ANALYSIS OF PHENOLS FROM *GASTRODIA ELATA* AND ITS RELATED PLANTS BY HPLC

Ruan Dechun, Yang Chongren, Pu Xiangyu

(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming*)

Abstract A high performance liquid chromatographic method for the quantitative analysis of eight phenols compounds, gastrodin (1), p-hydroxybenzyl alcohol (2), p-hydroxybenzyl aldehyde (3), 4,4'-dihydroxy-diphenyl methane (5), 4,4'-dihydroxy-dibenzyl ether (6), p-hydroxybenzyl ethyl ether (7), 4-ethoxymethyl phenyl-4'-hydroxy benzyl ether (8), parishin (9) was reported. Determination was carried out under the following conditions: ethyl ether extract; column, Zorbax ODS 250×4.6 mm (Dupont); mobile phase, methanol-water (6.5 : 3.5); flow rate, 0.2 ml/min; wave length 270 nm; detector, SPD-2AS. n-butyl alcohol extract; column, Partisil ODS 250×9.4 mm (Whatman); mobile phase, methanol-water (9 : 1); flow rate, 0.25 ml/min; detector, SPD-2AS wave length 225 nm. External standard method was used. With this method, the qualitative and quantitative analysis of the phenol constituents of sixteen samples of *Gastrodia elata* and its related plants *G. angusta* and *Galeola lindleyana* were examined. It is shown that HPLC is a useful tool not only for the quality determination of *Gastrodia elata* as a herb drug, but also for chemical ecology and chemotaxonomy of genus *Gastrodia* and its related plants, and for screening of new natural resources of gastrodin.

Key words *Gastrodia elata*; *G. angusta*; *Galeola lindleyana*; Phenols; HPLC