

UPLC – MS/MS 法检测不同产地野生天麻中天麻素及对羟基苯甲醇含量

秦伟瀚¹, 师莹¹, 花雷¹, 白孝勇², 张左香², 舒兴勇², 郭延垒¹, 阳勇^{1*}

(1. 重庆市中药研究院, 重庆 400065; 2. 云南省威信县天麻产业发展办公室, 云南威信 657900)

摘要 [目的]采用超高效液相色谱质谱联用法同时测定6个产地天麻中天麻素和对羟基苯甲醇含量。[方法]采用 Phenomenex C₁₈ 柱 (50 mm×2.1 mm, 3 μm), 乙腈–5 mmol/L 乙酸铵 (0.1% 甲酸) 水溶液作流动相, 流速 0.2 mL/min; 多反应监测正离子模式 (MRM–Pos)。[结果]天麻素在 0.122 0~1 220.000 0 ng/mL、对羟基苯甲醇在 0.502 0~5 020.000 0 ng/mL 浓度范围内呈良好的线性关系。所有样品中天麻素和对羟基苯甲醇的含量均超过《中国药典》2015 年版中“天麻”含量测定要求, 按照 2 种成分总含量排序从大到小依次为云南昭通、贵州毕节、四川雅安、重庆城口、陕西汉中、甘肃陇南。[结论]该方法精密度、重现性和分离效果好, 分析快速、准确, 适用于对天麻中天麻素和对羟基苯甲醇的定性、定量研究。
关键词 天麻; 超高效液相色谱–质谱/质谱联用; 天麻素; 对羟基苯甲醇; 含量
中图分类号 S567.23+9 **文献标识码** A **文章编号** 0517–6611(2016)17–143–03

Determination of Gastrodine and 4-Hydroxybenzyl alcohol in *Gastrodia elata* Bl. from Different Habitats by UPLC-MS/MS
QIN Wei-han, SHI Xuan, HUA Lei, YANG Yong* et al (Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065)
Abstract [Objective] To develop an UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of gastrodine and 4-hydroxybenzyl alcohol in *Gastrodia elata* Bl. from six different habitats. [Method] The analyses were performed on a Phenomenex C18 column (50 mm×2.1 mm, 3 μm) with a mobile phase of acetonitrile–5 mmol/L ammonium acetate aqueous (0.1% formic acid) at a flow rate of 0.2 mL/min operating in MRM positive ion mode (MRM-Pos). [Result] Gastrodine and 4-hydroxybenzyl alcohol contents showed good linearity in ranges of 0.122 0–1 220.000 0 and 0.502 0–5 020.000 0 ng/mL, respectively. In all the samples, gastrodine and 4-hydroxybenzyl alcohol contents all exceeded the content determination requirements in Chinese Pharmacopoeia (2015 edition). These herbs of *Gastrodia elata* Bl. could be ordered according to the total content of gastrodine and 4-hydroxybenzyl alcohol: Zhaotong in Yunnan > Bijie in Guizhou > Ya'an in Sichuan > Chengkou in Chongqing > Hanzhong in Shanxi > Longnan in Gansu. [Conclusion] This method is quick, precise, rapid and accurate, and is suitable for the qualitative and quantitative research on gastrodine and 4-hydroxybenzyl alcohol in *G. elata*.
Key words *Gastrodia elata* Bl.; UPLC-MS/MS; Gastrodine; 4-Hydroxybenzyl alcohol; Content

天麻(*Gastrodia elata* Bl.)又名赤箭、独摇芝、离母等,为兰科天麻属多年生草本植物的干燥块茎^[1]。早在《神农本草经》中就有关于天麻的记载,称“赤箭”,沈括在《梦溪笔谈》中亦有记载:“世人惑于天麻之说,遂止用之治风,良可惜哉”。至明朝李时珍《本草纲目》始称“天麻”之名^[2]。其味甘、性平,入肝经^[3],既是传统名贵中药材,也是深受现代人青睐的保健食材^[4]。天麻中富含天麻素、香荚兰素、对羟基苯甲醇、蛋白质、氨基酸、多糖等多种有效活性成分^[5]。天麻素是天麻中的主要成分,其含量高低直接影响药材的质量,而对羟基苯甲醇作为天麻素的苷元,在天麻中含量也是颇高。随着天麻主产地野生资源日渐枯竭,其在药市上的售价往往是家种天麻的数倍,对于普通消费者而言不仅价高,且难以辨别,因而野生天麻品质优劣也愈发受到消费者的关注。笔者采集了全国5个主要产区的野生天麻,采用超高效液相色谱串联质谱法同时测定其中主要化学成分的含量,为驯化野生天麻以便于选择更为合适地域提供科学依据,也为天麻产业中质量控制环节提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器。LC–30A 型超高效液相色谱仪(日本岛津公司);API4000 型三重四极杆质谱仪(美国 AB 公司);高速中药粉碎机(广东新丰机械公司);BSA224S 型万分之一

析天平(德国赛多利斯公司);RE–52 型旋转薄膜蒸发器(上海亚荣公司);HH–S8 型水浴锅(江苏新宝仪器公司);KH–55A 型烘箱(广东康恒公司)。

1.1.2 药材与试剂。收集到6批天麻样品,分别来源于重庆城口、贵州毕节、云南昭通、四川雅安、陕西汉中及甘肃陇南,经重庆市中药研究院刘翔副研究员鉴定为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的鲜品块茎。天麻素(批号 110807–200205,中国药品生物制品检定所),对羟基苯甲醇(批号 UMJ5A–SM,东京化成工业株式会社),乙腈、水(色谱级,德国 merck 公司);甲酸、乙酸铵(色谱级,美国 ACS 公司),乙醇(分析纯,重庆川东化工公司)。

1.2 方法

1.2.1 药材预处理。将不同产地鲜品天麻洗净,切成薄片,于蒸锅上蒸制 30 min,取出置于烘箱中 60 ℃干燥 6 h,高速粉碎机粉碎成细末,过 3 号筛备用。

1.2.2 色谱条件。采用菲罗门 Luna C₁₈ 柱 (50 mm×2.1 mm, 3 μm) 色谱柱,柱温 30 ℃,进样体积 2 μL,流速 0.2 mL/min。流动相 A 为 5 mmol/L 乙酸铵 (0.1% 甲酸) 水溶液,流动相 B 为乙腈。梯度洗脱程序:0~2 min, 5%~20% B; 2~3 min, 20% B; 3.0~3.1 min, 20%~5% B; 3.1~5.0 min, 5% B。

1.2.3 质谱条件。喷雾电压 5 500 V;雾化气压力 35 Psi;气帘气压力 15 Psi;辅助加热气压力 50 Psi;离子源温度 400 ℃;多反应监测正离子模式;碰撞气为 Medium。定量离子对、定性离子对去簇电压 (Declustering potential, DP)、碰撞能量 (Collision energy, CE) 见表 1。

作者简介 秦伟瀚 (1981–), 男, 重庆人, 助理研究员, 从事中药新药开发、药物质量标准研究。* 通讯作者, 副研究员, 硕士, 从事中药新药开发、药物质量标准及药物代谢研究。
收稿日期 2016-04-25

表 1 多反应离子监测参数

Table 1 The parameters of multiplereaction monitoring (MRM)

化合物 Chemical compound	母离子 Parent ion(<i>m/z</i>)	子离子 Daughter ion(<i>m/z</i>)	去簇电压 Declustering potential //V	碰撞能量 Collision energy //V
天麻素 Gastrodin	304. 2	107. 1 ⁺ ,286. 3	41. 0	22. 0
对羟基苯甲醇 p-Hydroxybenzylalcohol	142. 1	107. 0 ⁺ ,124. 1	18. 5	8. 3

注: * 为定量离子对。
Note: * was quantitative ion pairs.

1.2.4 对照品储备液的制备。精密称取天麻素及对羟基苯甲醇对照品适量,精密称定,加甲醇配制成每 1 mL 含天麻素 0.122 mg 和对羟基苯甲醇 0.502 mg 的混合对照品溶液,避光,4 ℃ 环境储存备用。

1.2.5 供试品溶液的制备。精密称取样品粉末约 2 g,置具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇 50 mL,称定重量,加热回流 3 h,放冷,再次称定重量,用稀乙醇补足减失的重量。摇匀,滤过,精密量取续滤液 10 mL,浓缩至近干。残渣加乙腈-水(5:95)混合溶液溶解,转移至 25 mL 量瓶中。用乙腈-水(5:95)混合溶液稀释至刻度,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

1.2.6 样品制备。精密称取 6 个产地的天麻样品各 3 份,每份 2 g,按“1.2.5”方法制备供试品溶液,测定天麻素和对羟基苯甲醇的含量。

2 结果与分析

2.1 方法学考察

2.1.1 线性范围及检测限。取“1.2.4”项下混合对照品储备液适量,用色谱甲醇逐级稀释为 7 个不同浓度的系列混合对照品溶液,0.22 μm 微孔滤膜滤过,按“1.2.2”色谱条件、“1.2.3”质谱条件分别进样 2 μL,进行质谱检测,以天麻素和对羟基苯甲醇峰面积为纵坐标、相应的质量浓度为横坐标,得到天麻素和对羟基苯甲醇的线性回归方程分别为 $Y = 14\,654.591\,57X + 7\,210.417\,17$ ($r = 0.999\,4$)、 $Y = 1\,421.507\,14X + 7\,920.872$ ($r = 0.999\,6$),表明天麻素在

0.122 0 ~ 1 220.000 0 ng/mL、对羟基苯甲醇在 0.502 0 ~ 5 020.000 0 ng/mL 浓度范围内呈良好的线性关系。

以基线响应的 3 倍和 10 倍作为该物质的检出限和定量限,天麻素、对羟基苯甲醇检出限(LOD)分别为 0.006 2、0.015 2 ng/mL,定量限(LOQ)分别为 0.024 5、0.054 5 ng/mL。

2.1.2 稳定性试验。取同一供试品溶液分别在 0、4、6、8、12 h 进样 2 μL 测定天麻素、对羟基苯甲醇的峰面积,发现其相对标准偏差(RSD)分别为 1.53%、2.04%,表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.1.3 重现性试验。精密称取 5 份云南昭通的天麻粉末样品,按照“1.2.5”方法进行处理测定天麻素、对羟基苯甲醇峰面积,测得其 RSD 分别为 1.59%、2.34%,表明该方法重现性良好。

2.1.4 精密度试验。取同一供试品溶液,按照“1.2.2”色谱条件、“1.2.3”质谱条件重复进样分析 5 次,测定天麻素、对羟基苯甲醇峰面积,测得其 RSD 分别为 1.68%、1.27%,表明该方法精密度良好。

2.1.5 回收率试验。精密称取 5 份已知含量的云南昭通天麻粉末约 1 g,分别精密加入混合标准储备液 1 mL,按照“1.2.5”方法进行处理,制备供试品溶液,按照“1.2.2”色谱条件、“1.2.3”质谱条件进样分析,测定峰面积,计算各成分的量及回收率。由表 2 可知,该方法测定天麻素、对羟基苯甲醇的平均回收率分别为 94.45% 和 92.78%,RSD 分别为 2.28% 和 2.41%。由此可见,该方法回收率高、偏差小、准确度高。

表 2 回收率试验结果

Table 2 Results of recovery rate test

组分 Component	样品含量 Sample content mg	加入对照品量 Adding reference substance amount // mg	测得量 Measured amount // mg	回收率 Recovery rate // %	平均回收率 Average recovery rate // %	RSD %
天麻素 Gastrodin	4.646	4.880	9.245	94.24	94.45	2.28
	4.644	4.880	9.292	95.25		
	4.652	4.880	9.408	97.46		
	4.657	4.880	9.125	91.56		
	4.634	4.880	9.209	93.75		
对羟基苯甲醇 4-Hydroxybenzyl alcohol	5.235	5.020	9.834	91.61	92.78	2.41
	5.233	5.020	9.980	94.56		
	5.242	5.020	9.772	90.24		
	5.247	5.020	9.857	91.83		
	5.222	5.020	10.023	95.64		

2.2 不同产地天麻中天麻素和对羟基苯甲醇含量分析 精密吸取天麻样品溶液 2 μL,按照“1.2.2”色谱条件、“1.2.3”

质谱条件进样分析,测定峰面积,外标法计算。由表 3 可见,所有样品中天麻素和对羟基苯甲醇的含量均超过《中国药

典》2015 年版中“天麻”含量测定要求,说明野生天麻质量比较可靠;云南昭通天麻中天麻素、对羟基苯甲醇及总含量均高于其他样品,而甘肃陇南样品含量则均为最低值;按照 2 种成分总含量排序从大到小依次为云南昭通、贵州毕节、四川雅安、重庆城口、陕西汉中、甘肃陇南。

表 3 不同产地天麻中天麻素及对羟基苯甲醇含量
Table 3 The contents of gastrodine and 4-hydroxybenzyl alcohol in *G. elata* in different production area %

产地 Production area	天麻素 Gastrodine content	对羟基苯甲醇 4-Hydroxy- benzyl alcohol content	总含量 Total content
重庆城口 Chengkou in Chongqing	0.32	0.38	0.70
贵州毕节 Bijie in Guizhou	0.39	0.45	0.84
云南昭通 Zhaotong in Yunnan	0.44	0.51	0.94
四川雅安 Ya'an in Sichuan	0.35	0.40	0.75
陕西汉中 Hanzhong in Shanxi	0.30	0.37	0.67
甘肃陇南 Longnan in Gansu	0.25	0.32	0.57

3 结论

该研究采用超高效液相色谱质谱联用法同时测定 6 个产地天麻中天麻素和对羟基苯甲醇含量,结果表明,天麻素、对羟基苯甲醇含量测定方法的线性关系良好,线性范围分别为 0.122 0~1 220.000、0.502 0~5 020.000 ng/mL;所有样品中 2 种主要成分的含量均超过《中国药典》2015 年版中“天麻”含量测定要求,说明野生天麻质量比较可靠;按照 2 种成

(上接第 142 页)

清等^[5]对 9 种蕨类植物多糖的提取发现,华南毛蕨多糖提取率最高,达 12.10%;肾蕨多糖提取率最低,仅为 3.80%;多糖含量最高的是芒萁,为 24.30%,最低的是华南毛蕨,仅为 1.34%。而此次试验中红色新月蕨和乌毛蕨多糖的提取率均比华南毛蕨的多糖提取率高,红色新月蕨的多糖提取率比华南毛蕨的高 2.20%,乌毛蕨的多糖提取率比华南毛蕨的高 4.79%;红色新月蕨和乌毛蕨的多糖含量比芒萁分别少 11.64%和 11.94%,但红色新月蕨和乌毛蕨的多糖含量却比华南毛蕨的多,分别多 11.32%和 11.02%。可见,不同的蕨类其多糖的提取率和含量是有所差异的,这些差异与其生长的环境直接相关。

陶海南等^[6]首次从紫萁中分离提取多糖,其得率为 25.8%,对藤黄八叠球菌的抑菌圈为 8.0 mm,而此次试验中红色新月蕨和乌毛蕨的多糖对藤黄八叠球菌的抑菌圈分别为 33.0 和 21.3 mm,明显高于紫萁的抑菌效果。此次试验结果显示,红色新月蕨和乌毛蕨中提取的多糖得率为 14.30%和 16.89%,且从红色新月蕨和乌毛蕨中提取的多糖对枯草芽孢杆菌、青霉菌、啤酒酵母菌、藤黄八叠球菌、大肠杆菌这 5 种菌类均有抗菌活性,说明这 2 种蕨类多糖具有广谱抗菌性。我国民间中医一直有用水煎煮蕨类植物用以治疗某些

分总含量排序从大到小依次为云南昭通、贵州毕节、四川雅安、重庆城口、陕西汉中、甘肃陇南。云南昭通市野生天麻中天麻素及对羟基苯甲醇总含量相对较高(0.94%),为其作为全国天麻道地产区提供科学依据^[6];四川、贵州的含量与其差异不大,完全可以将这 2 个产地的天麻作为昭通天麻的替代品。研究中还发现不同纬度天麻素和对羟基苯甲醇含量有差异,而这差异为低纬度含量高于高纬度,这将需要深入研究得到进一步证明。

该研究利用质谱分析的特性,不需要样品峰与杂质峰达到完全分离,样品用量少,且由结果可知天麻素和对羟基苯甲醇的检出限分别为 0.006 23 和 0.015 20 ng/mL,表明该方法灵敏度高,特别适合天麻等传统名贵中药材样品及基质复杂样品的含量测定。该方法精密度、重现性和分离效果好,分析快速、准确,适用于对天麻中天麻素和对羟基苯甲醇的定性、定量研究,为天麻及其相关产品的质量控制提供科学方法。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:54-55.
[2] 孙星衍,孙冯翼. 神农本草经[M]. 北京:人民卫生出版社,1962:22.
[3] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京:华文出版社,2009:71.
[4] 谢学强,唐德华,彭宗杰,等. 甘孜州野生天麻资源调查[J]. 安徽农业科学,2015,43(29):27-28.
[5] 杨超,吕紫媛,伍瑞云. 天麻的化学成分与药理机制研究进展[J]. 中国现代医生,2012,50(17):27-31.
[6] 王兴文,方波. 昭通野生和栽培天麻中微量元素及氨基酸化学成分研究[J]. 云南中医学院学报,1994,17(4):1-5.

病症,因此此次试验也采用 100 ℃ 的水浴法提取多糖物质,是以研究源于生活,便于以后的大面积推广。此外,许柑叶等^[7]通过蕨类抗菌筛选认为采用不同的提取剂、提取时间等提取条件,选择不同的受试菌均有可能产生相异的抗菌结果。该试验结果表明蕨类种类不同其抗菌活性差异较大,这与许柑叶等^[7]的报道一致。

蕨类植物来源广泛,成本低,对于一些常见的菌类有明显的抑菌效果,具有明显的药用价值,在条件允许的情况下可大面积推广使用,但红色新月蕨和乌毛蕨二者的多糖提取物是否还有其他药用价值有待于进一步的深入研究。

参考文献

[1] 许乐仁. 蕨和与蕨相关的动物病[M]. 贵阳:贵州科技出版社,1993:8-10.
[2] 罗来辉. 乌毛蕨的开发利用探索[J]. 内江科技,2006(8):131-132.
[3] 蔡建秀,吴文杰,葛清秀. 20 种药用蕨类植物提取液抑菌试验研究[J]. 亚热带植物科学,2004,33(1):22-25.
[4] 福建植物志编写组. 福建植物志:第一卷[M]. 福州:福建科学技术出版社,1982:18-19.
[5] 陈晓清,许柑叶. 九种蕨类植物多糖提取物抗动植物病原菌活性[J]. 亚热带植物科学,2007,36(1):43-45.
[6] 陶海南,刘辉,薛喜文,等. 紫萁多糖抗菌活性初步研究[J]. 南昌大学学报(理科版),1996,20(4):306.
[7] 许柑叶,郑台,陈晓清. 8 种蕨类植物多糖提取物抑菌效果的研究[J]. 福建师范大学学报(自然科学版),2005,21(2):99-102.