

天麻藥材中指標成分Parishin, Parishin B及C之 高效液相層析定量法之探討

顧祐瑞 劉宜祝 郝景平 溫國慶 林哲輝 *黃文鴻

行政院衛生署藥物食品檢驗局
*陽明大學 衛生福利研究所

摘 要

本研究利用高效液相層析儀，分析天麻藥材中之高極性成分parishin、parishin B及C之含量，採用C₁₈逆相層析管柱，移動相為甲醇—0.1% 磷酸溶液，利用線性梯度沖提，檢測波長為222 nm；得到良好分析結果。Parishin、parishin B及C三成分之線性迴歸方程式及相關係數(r)分別為：parishin (濃度80~1,200 μ g/ml), $Y=433.82X-13.90$ ($r=0.9998$)，parishin B(濃度120~760 μ g/ml), $Y=359.03X+55.98$ ($r=0.9831$)及parishin C(濃度40~320 μ g/ml), $Y=548.45X-60.66$ ($r=0.9995$)，均呈現良好線性關係。添加回收率試驗結果，parishin為 $102.6\pm3.3\%$ ，parishin B為 $102.8\pm2.7\%$ ，parishin C為 $102.6\pm2.9\%$ ，顯示準確性佳。三種指標成分之同日間及異日間試驗之相對標準偏差，分別為0.73~2.11%及0.67~3.56%，顯示高效液相層析法用於天麻指標成分之分析其結果良好。

市售天麻藥材23種，利用上述高效液相層析法，定量分析各指標成分parishin、parishin B及C的含量百分比，結果parishin之含量則在0.37~1.50%之間，平均為0.96%；parishin B之含量在0.12~0.65%之間，平均為0.42%；parishin C之含量在0.08~0.27%之間，平均為0.16%。

前 言

天麻(Gastrodiae Rhizoma)，別名明天麻，係蘭科(Orchidaceae)植物天麻*Gastrodia elata* Blume的乾燥根莖。首載於神農本草經，列為上品，原名赤箭，性甘，味微溫，其效用為治頭暈目眩、中風驚癇、風寒濕痺，為治眩暈及頭痛的鎮定劑^(1,2,3)。對小白鼠有鎮靜、抗驚厥鎮痛等作用，臨床用於祛風止痛及神經衰弱失眠等症⁽⁴⁾。

有關天麻之成分研究，Taguchi等⁽⁵⁾曾報告以甲醇萃取分離得到 parishin, gastrodioside, 4-hydroxybenzyl alcohol, 4-hydroxybenzyl methyl

ether, 4-(4'-hydroxybenzyloxy)benzyl methyl ether, 4-hydroxy-benzaldehyde, bis(4-hydroxybenzyl) ether及4-(β -D-glucopyranosyloxy)-benzyl alcohol等成分。在品質鑑別方面僅有以天麻粉末加水，於水浴上加熱後，其濾液加碘試液，呈現赤紫色之呈色反應⁽²⁾及以天麻藥材(不同加工炮製品、不同產地天麻、不同收穫期天麻、偽品)及天麻所含成分之薄層層析法分析⁽⁶⁾等二則報導，而對於天麻所含成分之定量分析則尚無報告。為因應藥材品質管制之需，作者曾針對其高極性成分加以探討，而分離得 parishin、parishin B及C三成分⁽⁷⁾，(結構式如圖一所示)。本研究試圖利用高效液相層析儀，

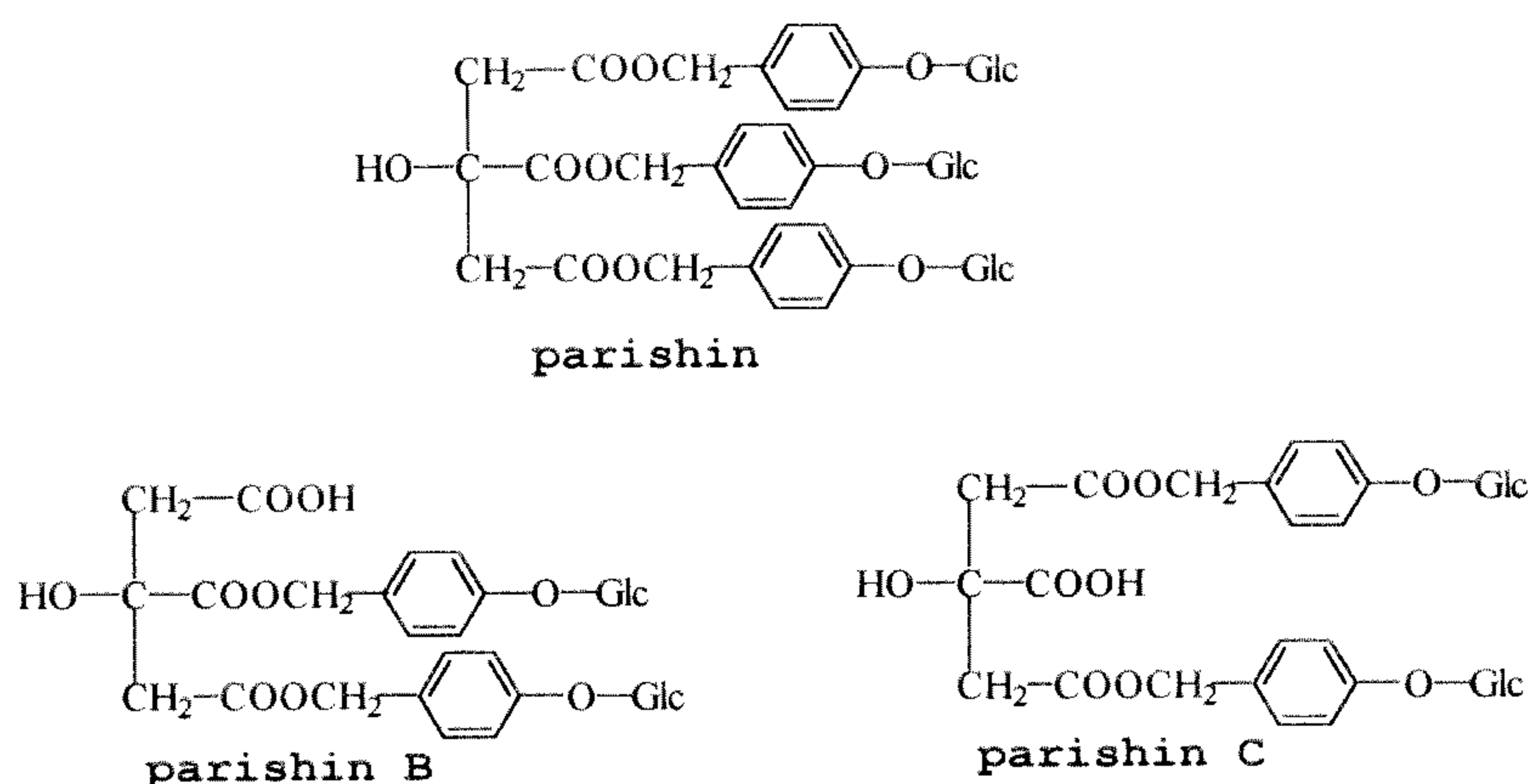


Figure 1. Structures of parishin, parishins B and C.

以上述之成分作為指標成分，進行其含量測定方法之探討，並調查市售品之各該指標成分之含量，以供天麻藥材品質管制之參考。

材料與方法

一.材料

市售炮製天麻 23 種，分別購於台灣北、中、南部及大陸各地區，各約40g。此等23 種天麻藥材事先經台灣必安研究所張憲昌博士鑑定，確定其基原均為*Gastrodia elata* Blume植物之根莖。

二.儀器

本實驗中之高效液相層析儀使用Hitachi L-6200 intelligent pump，連接Shimadzu sil 9A auto injector及 L-3000 Photo Diode Array Detector。所用條件如下：層析管為Cosmosil 5C₁₈-AR (5 μ m, 15cm $\times$ 4.6mm I.D.)；流速為1ml/min；波長為222 nm；移動相為甲醇—0.1% 磷酸溶液，其比例開始時為15:85，15分鐘時為25:75，30分鐘時為30:70，以線性梯度進行沖提，30-40分鐘維持30:70。

三.標準品及溶媒

指標成分parishin、parishin B及C為自天麻藥材中分離而得⁽⁷⁾。內部標準品 sulfamethoxy-pyridazine (product number: S-7257, Sigma Chemical Co.)。甲醇係採HPLC級，磷酸係分析級。

四.實驗方法

(一)萃取條件之探討

天麻碎片約10g，置入圓底燒瓶，加入70%甲醇25ml，80 $^{\circ}$ C水浴加熱迴流一小時後過濾，重覆萃取五次，濾液分別以0.45 μ m濾膜過濾，得檢品溶液五份，分別注入高效液相層析儀，測定三種指標成分之相對萃取率。

(二)天麻藥材中指標成分之定量方法

1. 萃取方法

天麻藥材切碎後各取2.5g，精確稱定，以70%甲醇10 ml於80 $^{\circ}$ C水浴加熱迴流萃取一小時，收集抽取液，殘渣繼以70%甲醇10 ml萃取第二次，再以70%甲醇4 ml萃取第三次，合併抽取液，並加入適量之內部標準品sulfamethoxypyridazine溶液，定容至25 ml為檢液，使內部標準品之濃度為3.0 mg/ml。

2. 標準溶液之配製

精確稱取標準品parishin、parishin B及C及內部標準品sulfamethoxypyridazine適量，以70%甲醇稀釋調配成一系列濃度之溶液。parishin諸液之濃度依序為80，160，400及1200 μ g/ml；parishin B諸液之濃度依序為120，240，480，600及760 μ g/ml；parishin C諸液之濃度依序為40，80，160，200及320 μ g/ml；各溶液之內部標準品sulfamethoxypyridazine之濃度為3.0 mg/ml。

3. 檢量線之製作

分別取不同濃度之標準品溶液注入高效液相層析儀分析。以各標準品與內部標準品波峰面積比為X軸，標準品之濃度為Y軸，作圖畫檢量線並求出線性迴歸方程式及相關係數。

4. 添加回收率試驗

於三份已知指標成分含量之檢液中，分

別加入不同量之對照標準品溶液，使其每份檢液中添加之濃度依序為 parishin：51、102及204 μ g/ml；parishin B：53、106及212 μ g/ml；parishin C：50、100及200 μ g/ml；以高效液相層析儀分析，求其添加回收率。

5. 同日間及異日間試驗

於對照標準品檢量線範圍內，選擇 parishin 160 μ g/ml，parishin B 240 μ g/ml及 parishin C 80 μ g/ml之對照標準品溶液，於同一日及不同的五天重覆注入高效液相層析儀分析各五次，將所得之數據(peak area ratio)計算相對標準偏差。

結果與討論

Table 1. Relative extractive ratio of three marker substances in Gastrodiae Rhizoma with 70% methanol

Marker substance	Relative extractive ratio (%)						
	Number of extraction	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th	Total
Parishin		64.9	19.7	9.7	4.0	1.7	100
Parishin B		70.1	17.9	7.9	2.9	1.2	100
Parishin C		67.6	17.4	9.3	4.1	1.6	100

Table 2. Intraday and interday assay variations of parishin, parishins B and C

Marker substance	Peak area of marker substance / peak area of sulfamethoxypyridazine		Mean $\pm$ S.D. (R.S.D.,%)	
	intraday	interday	intraday	interday
Parishin (160 μ g/ml)	0.3999	0.3988	0.3938 $\pm$ 0.0042 (1.08)	0.3962 $\pm$ 0.0027 (0.67)
	0.3915	0.3955		
	0.3906	0.3918		
	0.3977	0.3957		
	0.3891	0.3991		
Parishin B (240 μ g/ml)	0.5396	0.5524	0.5456 $\pm$ 0.0040 (0.73)	0.5422 $\pm$ 0.0096 (1.77)
	0.5496	0.5401		
	0.5429	0.5251		
	0.5503	0.5436		
	0.5455	0.5499		
Parishin C (80 μ g/ml)	0.1491	0.1457	0.1504 $\pm$ 0.0032 (2.11)	0.1525 $\pm$ 0.0054 (3.56)
	0.1473	0.1492		
	0.1533	0.1520		
	0.1550	0.1619		
	0.1473	0.1537		

一. 萃取條件之探討

以70%甲醇，在80℃水浴加熱迴流萃取五次之相對萃取率如表一，顯示萃取三次約可得到95%之萃取率。本研究過程中，藥材以10ml、10ml及4ml萃取三次，合併濾液。

二. 天麻藥材指標成分定量方法之探討

本研究建立了一個快速、精確的高效液相層析法來分析天麻藥材中各指標成分的含量。此層析法採用逆相層析管，移動相為採用甲醇與含0.1%磷酸水溶液，以線性梯度沖提方式分離；檢測波長設定為222nm，移動相採用之磷酸不會影響成分之分析，分析所得的parishin、

Table 3. Recoveries of parishin, parishins B and C in Gastrodiae Rhizoma

Marker Substance	Amount added ($\mu\text{g/ml}$)	Amount measured ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)	Mean $\pm$ S.D.* (%)	R.S.D. (%)
Parishin	51	54.62	107.1	102.6 $\pm$ 3.33	3.25
	102	103.62	101.6		
	204	202.23	99.1		
Parishin B	53	52.41	98.9	102.8 $\pm$ 2.73	2.66
	106	111.17	104.9		
	212	221.50	104.5		
Parishin C	50	53.23	106.5	102.6 $\pm$ 2.94	2.87
	100	99.33	99.3		
	200	204.02	102.0		

*n=3

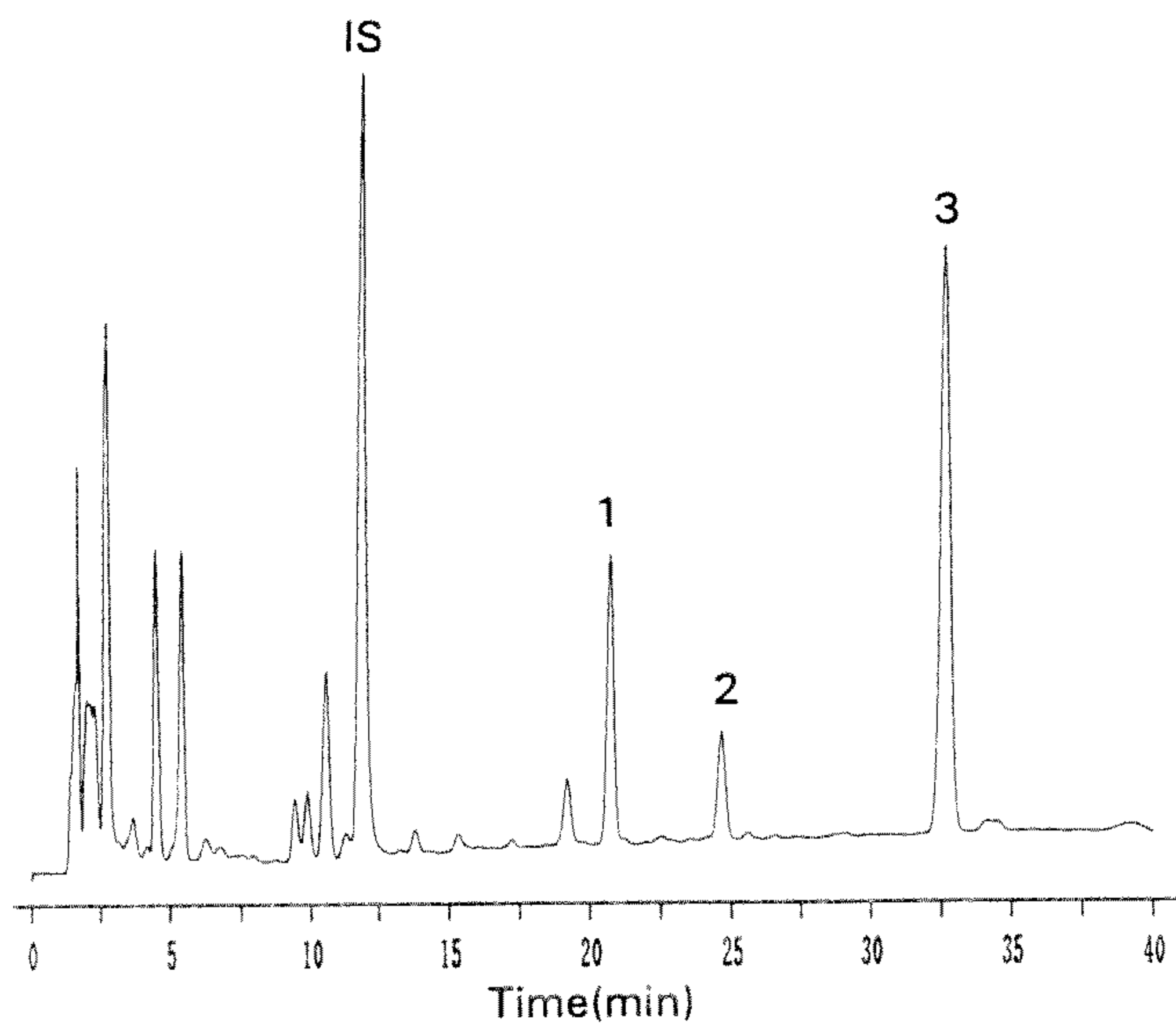


Figure 2. HPLC chromatogram of Gastrodiae Rhizoma. Peak identities: (1) parishin B, (2) parishin C, (3) parishin. IS for internal standard (sulfamethoxypyridazine).

parishin B及C三成分之波峰顯著，其高效液相層析圖譜如圖二所示，三指標成分之滯留時間分別為32.6分鐘，21.5分鐘及24.7分鐘。所採用的內部標準品為sulfamethoxypyridazine，出現的滯留時間為12.0分鐘，天麻藥材於此處並無干擾，故為一可接受的內部標準品。

以本法分析parishin、parishin B及C對照標準品，其線性迴歸方程式及相關係數(r)分別為：parishin, $Y=433.82X-13.90$ ($r=0.9998$)；parishin B, $Y=359.03X+55.98$ ($r=0.9831$)及parishin C, $Y=548.45X-60.66$ ($r=0.9995$)，其結

果顯示parishin在濃度80~1200 $\mu\text{g/ml}$ 範圍內，parishin B在濃度120~760 $\mu\text{g/ml}$ 範圍內及parishin C在濃度40~320 $\mu\text{g/ml}$ 範圍內均呈良好線性關係。三種指標成分之同日間及異日間再現性試驗結果如表二，顯示其同日間之相對標準偏差為0.73~2.11%，異日間為0.67~3.56%，顯示高效液相層析法用於天麻指標成分之分析結果良好。添加回收率的試驗結果(表三)顯示parishin、parishin B及C的回收率均在100 $\pm$ 4%之內，其中parishin為102.6 $\pm$ 3.3%，parishin B為102.8 $\pm$ 2.70%，parishin C為

Table 4. Contents of three marker substances (parishin, parishins B and C) in commercial Gastrodiae Rhizoma

Sample	Content		
	parishin (mean ± S.D.*,%)	parishin B (mean ± S.D.*,%)	parishin C (mean ± S.D.*,%)
1	1.0353 ± 0.1078 [#]	0.5130 ± 0.0326 [#]	0.2212 ± 0.0195 [#]
2	1.2261 ± 0.0451 [#]	0.5374 ± 0.1129 [#]	0.2067 ± 0.0113 [#]
3	0.3663 ± 0.0190	0.1212 ± 0.0231	0.0825 ± 0.0071
4	0.4874 ± 0.0279	0.2579 ± 0.0131	0.1231 ± 0.0054
5	0.4922 ± 0.0163	0.3261 ± 0.0187	0.1651 ± 0.1853 [#]
6	1.1686 ± 0.0578 [#]	0.5412 ± 0.0274 [#]	0.2313 ± 0.0098 [#]
7	0.9564 ± 0.0300	0.4188 ± 0.0325	0.1623 ± 0.0091
8	0.6211 ± 0.0087	0.2897 ± 0.0155	0.1132 ± 0.0042
9	1.3967 ± 0.0680 [#]	0.4828 ± 0.0422 [#]	0.1577 ± 0.0175
10	0.5441 ± 0.0184	0.3502 ± 0.0092	0.1384 ± 0.0054
11	1.3855 ± 0.0440 [#]	0.6457 ± 0.0232 [#]	0.1788 ± 0.0128 [#]
12	0.7117 ± 0.0335	0.6457 ± 0.0262 [#]	0.2676 ± 0.0215 [#]
13	1.3296 ± 0.0550 [#]	0.3356 ± 0.0210	0.1654 ± 0.0240 [#]
14	1.0218 ± 0.0347 [#]	0.4656 ± 0.0242 [#]	0.1541 ± 0.0031
15	1.5006 ± 0.1531 [#]	0.5273 ± 0.0556 [#]	0.2353 ± 0.0431 [#]
16	1.4762 ± 0.0329 [#]	0.5215 ± 0.0136 [#]	0.2646 ± 0.0129 [#]
17	1.0745 ± 0.0048 [#]	0.3871 ± 0.0063	0.1718 ± 0.0058 [#]
18	0.5982 ± 0.0051	0.3908 ± 0.0083	0.1007 ± 0.0023
19	1.3406 ± 0.0232 [#]	0.5308 ± 0.0169 [#]	0.1673 ± 0.0111 [#]
20	1.0146 ± 0.0111 [#]	0.4533 ± 0.0162 [#]	0.1394 ± 0.0115
21	0.7489 ± 0.0590	0.2662 ± 0.0234	0.1048 ± 0.0109
22	0.6737 ± 0.0181	0.2779 ± 0.0112	0.1023 ± 0.0169
23	0.9732 ± 0.0155 [#]	0.4384 ± 0.0059 [#]	0.1256 ± 0.0068
Range	0.3663 ~ 1.5006	0.1212 ~ 0.6457	0.0825 ~ 0.2676
Mean ± S.D.	0.9628 ± 0.3387	0.4228 ± 0.1258	0.1643 ± 0.0504
R.S.D.(%)	35.18	29.74	30.67

* n=3

[#] its content larger than mean

102.6 ± 2.9%，三指標成分回收率之相對標準偏差範圍在2.66 ~ 3.25%之間，顯示準確性佳。

三. 市售天麻之指標成分含量調查

市售天麻藥材依所建立之高效液相層析法來定量分析，各天麻藥材中其指標成分 parishin、parishin B及C的含量百分比如表四所示：parishin之含量，以檢體15含1.50%為最高，檢體3含0.37%為最低，平均為0.96%；

parishin B之含量，以檢體11及12含0.65%為最高，檢體3含0.12%為最低，平均為0.42%；parishin C之含量，以檢體12含0.27%為最高，檢體3含0.08%為最低，平均為0.16%。另外表四顯示三指標成分均高於各含量平均值者7件(編號1、2、6、11、15、16及19)，三指標成分均低於平均值者9件(編號3、4、5、7、8、10、18、21及22)，而編號9、12、13、14、17、20及23等七件，雖只有二種指標成分均高於含量平均值，然另一指標成分與平均值接

近，由上述結果顯示三指標成分中，似有某一指標成分含量高於平均值，則其他二種指標成分均高於或接近平均之趨勢。

本研究建立一個高效液相層析法來作天麻之指標成分之定性及定量分析，可瞭解天麻藥材之品質，由前述種種結果顯示此法分析效果良好。

誌謝

本研究承行政院衛生署國家衛生研究院之經費支持(計畫編號:DOH 83-HR-307)，得以完成，特此誌謝。台灣必安研究所張憲昌博士協助鑑定藥材，林雅姿小姐協助實驗，謹申謝忱。

參考文獻

- 1.難波恆雄. 1980. 原色和漢藥圖鑑(上). p. 16. 保育社. 大版. 日本.
- 2.顏焜熒. 1980. 原色中藥飲片圖鑑. p. 73. 南天書局有限公司. 台北.
- 3.劉接寶. 1984. 臨床實用彩色中藥大典(3). pp. 142-145. 立得出版社. 台北.
- 4.周金黃. 王筠默. 1986. 中藥藥理學. pp. 163-165. 上海科學技術出版社. 上海.
- 5.Taguchi, H., Yosioka, I., Yamasaki, K. and Kim, I. H. 1981. Studies on the Constituents of *Gastrodia elata* B. Chem. Pharm. Bull. 29(1) : 55-62.
- 6.劉訓紅, 王玉璽, 房克慧, 李泉. 1989. 中藥材薄層色譜鑑別. pp. 264-271. 天津科學技術出版社. 天津.
- 7.Lin, J.-H., Liu, Y.-C., Hau, J.-P. and Wen, K.-C. Parishins B and C from the Rhizoma of *Gastrodia elata* Blume. Phytochem. (accetped).

Determination of Parishin, Parishins B and C in Gastrodiae Rhizoma by HPLC

YOE-RAY KU, YI-CHU LIU, JING-PING HAU,
KUO-CHING WEN, JER-HUEI LIN AND *WENG-FONG HUANG

*National Laboratories of Foods and Drugs, Department of Health, Executive Yuan
161-2, Kuen Yang Street, Nankang, Taipei, Taiwan, R.O.C
*Graduate Institute of Health & Welfare Policy, National Yang-Ming University,
Shih-Pai, Taipei 11221, Taiwan, R.O.C*

ABSTRACT

A rapid method by high performance liquid chromatography was developed for the simultaneous determination of three marker substances, parishin, parishins B and C, in *Gastrodiae Rhizoma*. This determination was carried out by using a gradient elution with methanol and 0.1% phosphoric acid on a Cosmosil 5C₁₈-AR column.

The linear calibration range of parishin, parishins B and C were 80 ~ 1200 µg/ml ($r=0.9998$), 120 ~ 760 µg/ml ($r=0.9831$) and 40 ~ 320 µg/ml ($r=0.9995$), respectively. The recoveries of the markers were parishin: $102.6 \pm 3.3\%$,

parishin B: $102.8 \pm 2.7\%$ and parishin C: $102.6 \pm 2.9\%$. The relative standard deviations of the three marker substances for intraday and interday analyses were 0.73 ~ 2.11% and 0.67 ~ 3.56%, respectively. The contents of the markers mentioned above in 23 crude drugs of *Gastrodiae Rhizoma* have been determined and the results were obtained as follows : parishin 0.37 ~ 1.50%, parishin B 0.12 ~ 0.65% and parishin C 0.08 ~ 0.27%. Therefore, HPLC is a useful technique to determine these selected markers.

Key words : *Gastrodiae Rhizoma*, *Gastrodia elata* Blume, parishin, parishin B, parishin C, HPLC.

