

基于 HPLC 特征图谱研究不同生长阶段麦冬有效组分积累特征

吴发明^{1,2}, 王 盼¹, 李 敏^{1*}, 姚尹伊¹, 包小红³, 周 娟³

1. 成都中医药大学 中药材标准化教育部重点实验室, 中药资源系统研究与开发利用国家重点实验室, 四川 成都 611137

2. 遵义医学院, 贵州 遵义 563003

3. 四川省食品药品检验检测院, 四川 成都 611000

摘要: **目的** 研究麦冬块根发育过程中有效组分的积累规律, 为麦冬生产和质量控制提供理论支持。**方法** 采用高效液相色谱法进行分析。DAD 检测器: 柱温 30 ℃, 检测波长 203 nm, 进样量 15 μL, 以乙腈 (A)-水 (B) 为流动相梯度洗脱, 0~20 min, 25%~40% A; 20~50 min, 40%~50% A; 50~60 min, 50%~70% A; 60~70 min, 70% A; 70~80 min, 70%~100% A; 80~90 min, 100% A, 体积流量 1.0 mL/min。ELSD 检测器: 柱温 35 ℃, 漂移管温度 100 ℃, 气体体积流量 3.0 L/min; 进样量 15 μL, 流动相为乙腈 (A)-0.1%磷酸水 (B) 溶液, 梯度洗脱: 0~60 min, 35%~65% A, 体积流量 1.0 mL/min。**结果** 2 种不同检测条件色谱图中主要代表组分均能较好分离, 203 nm 条件下有 14 个有效峰, 主要峰为黄酮类成分, ELSD 条件下有 11 个有效峰, 主要峰为皂苷类成分, 黄酮类成分中以麦冬甲基黄酮 A 为代表, 皂苷类成分中以麦冬皂苷 D 为代表, 根据峰面积可以判断出麦冬药材中各组分在不同生长阶段其积累特征各不相同, 但其整体变化特征呈增大至平衡后小幅下降趋势。**结论** HPLC 特征图谱能够比较全面地反映麦冬块根有效组分积累特征, 可为指导麦冬生产和药材质量控制提供丰富的信息。

关键词: 麦冬; HPLC; 皂苷; 黄酮; 麦冬甲基黄酮 A; 麦冬皂苷 D

中图分类号: R286.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)07-1682-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.07.029

Study on accumulation rules of effective components in *Ophiopogonis Radix* of different growth phase based on HPLC specific chromatogram

WU Fa-ming^{1,2}, WANG Pan¹, LI Min¹, YAO Yin-yi¹, BAO Xiao-hong³, ZHOU Juan³

1. Chengdu University of TCM, The Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese crude drug, State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research Development and Utilization of Chinese Medicines Resources Co-founded by Sichuan Province and MOST, Chengdu 611137, China

2. Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China

3. Sichuan Institute for Food and Drug Control, Chengdu 611000, China

Abstract: Objective To explore the change features of *Ophiopogonis Radix* in the development process, and to find the accumulation rules of effective components in *Ophiopogonis Radix*. **Methods** The method of chlorfluazuron formulation was analyzed by HPLC. DAD detector, column temperature was set at 30 ℃ and detection wavelength was 203 nm; Flow rate was set at 0.8 mL/min and sample size was 15 μL and the mobile phase was acetonitrile (A)-water (B) with gradient elution mode (0~20 min, 25% A→40% A; 20~50 min, 40%~50% A; 50~60 min, 50%~70% A; 60~70 min, 70% A; 70~80 min, 70%~100% A; 80~90 min, 100% A), at the volume flow rate of 1.0 mL/min. ELSD detector, column temperature was set at 35 ℃, drift tube temperature at 100 ℃ and the gas flow rate was set at 3.0 L/min. The sample size was 15 μL and the mobile phase was acetonitrile (A)-0.1% phosphoric acid water (B) with gradient elution mode: 0~60 min, 35%~65% A, at the volume flow rate of 1.0 mL/min. **Results** The main components in the chromatogram were both separated well under the two conditions. At 203 nm, there were 14 effective peaks, the main components were

收稿日期: 2017-10-23

基金项目: 川产道地药材麦冬、半夏的品种和质量评价研究 (2014F038); 四川三台县涪城麦冬集成技术推广与应用科技惠民项目 (2013GS510102); 中药质量安全检验检测和风险控制技术平台 (2014ZX09304307-002); 麦冬整合式产业链综合开发研究 (2015SZ0033)

作者简介: 吴发明, 男, 博士, 研究方向为中药品种、质量及资源研究。Tel: 18215697609 E-mail: 283131241@qq.com

***通信作者** 李 敏, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药品种、质量及资源研究。Tel: 13980038316 E-mail: 028limin@163.com

flavones whose representative was methylphlopiogonanone A. There were 11 effective peaks in the condition of ELSD, and the main peak represent saponins whose representative was Ophiopogonin D. It could be judged that the accumulation law of the each component in *Ophiopogonis Radix* was inconsistent in the different growth phase according to the peaks area. The overall change tendency of the components is increase to peak value and keep balance and to a slight decrease after the balance. **Conclusion** The accumulation rules of effective components in *Ophiopogonis Radix* could be reflected comprehensively by HPLC specific chromatogram. It could provide abundant information for the produce of *Ophiopogonis Radix* and quality control.

Key words: *Ophiopogonis Radix*; HPLC; saponins; flavones; methylphlopiogonanone A; ophiopogonin D

麦冬来源于百合科沿阶草属植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f) Ker. -Gawl. 的干燥块根, 是常用中药材之一, 其主要用于治疗肺燥干咳、阴虚癆嗽、喉痹咽痛、津伤口渴、内热消渴等疾病^[1]。主产四川、浙江、湖北、山东、安徽等地, 形成了川麦冬、杭麦冬^[2]等道地品种。产量和有效组分的关系是确定中药材生产周期的主要因素之一。麦冬中代表成分有麦冬多糖、麦冬皂苷和麦冬黄酮^[3-4], 针对麦冬块根形成过程中有效组分动态积累的研究目前尚停留在对单一组分的测定^[5], 测定方法简单, 评价指标单一。麦冬 HPLC 特征图谱主要针对采收后的药材进行分析^[6], 针对块根发育动态的研究尚未有研究报道。本研究通过高效液相指纹图谱分析方法, 对麦冬药材发育过程中主要有效组分的积累动态变化进行综合分析, 为麦冬品种选育、农业生产和质量控制等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 麦冬样品

麦冬种苗由四川代代为本公司农业科技提供, 经成都中医药大学李敏教授鉴定均为百合科沿阶草属植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f) Ker. -Gawl.。在三台县花园镇进行栽培 (2014 年 4 月~2015 年 4 月), 设置 2 个处理, 不施用多效唑 (CK 组) 和施用多效唑 (D 组), 多效唑处理按照 45 kg/km² 喷施 (500 倍液), 其他管理同大田生产。从 2014 年 11 月 14 日开始至 2015 年 3 月 30 日, 间隔 7~10 d 采样 1 次, 其中 CK 组共采集到有效麦冬药材样品 14 份 (CK1~CK14), D 组共采集到有效麦冬药材样品 16 份 (D1~D16)。

1.2 试剂及仪器

Agilent1200 高效液相色谱仪, DAD 检测器, Alltech ELSD-2000 蒸发光散射检测器 (美国安捷伦公司); A580 型双光束紫外可见分光光度计 (上海翔艺仪器有限公司); BP121S 十万分之一电子天平 (德国赛多利斯公司); KQ-500DB 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 对照品麦冬甲基

表 1 样品信息
Table 1 Information of sample

样品编号	样品采集时间	样品编号	样品采集时间
D1	2014-11-14	D16	2015-03-30
D2	2014-11-26	CK1	2014-12-04
D3	2014-12-04	CK2	2014-12-13
D4	2014-12-13	CK3	2014-12-20
D5	2014-12-20	CK4	2014-12-27
D6	2014-12-27	CK5	2015-01-04
D7	2015-01-04	CK6	2015-01-10
D8	2015-01-10	CK7	2015-01-27
D9	2015-01-27	CK8	2015-02-05
D10	2015-02-05	CK9	2015-02-13
D11	2015-02-13	CK10	2015-02-27
D12	2015-02-27	CK11	2015-03-06
D13	2015-03-06	CK12	2015-03-16
D14	2015-03-16	CK13	2015-03-23
D15	2015-03-23	CK14	2015-03-30

黄烷酮 A (批号 MUST-14072002)、甲基麦冬二氢高异黄酮 B 由四川省维克奇提供, 麦冬皂苷 D、麦冬皂苷 D'、麦冬皂苷 C、3-O- α -L-鼠李糖-(1 $\rightarrow$ 2)- β -葡萄糖麦冬苷元、去乙酰基-ophiopo japonin A 由成都曼思特生物科技有限公司提供, 质量分数均 $\geq$ 98%; 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他均为分析纯。

2 方法

2.1 对照品溶液制备

取麦冬甲基黄烷酮 A、甲基麦冬二氢高异黄酮 B、麦冬皂苷 D、麦冬皂苷 D'、麦冬皂苷 C、3-O- α -L-鼠李糖-(1 $\rightarrow$ 2)- β -葡萄糖麦冬苷元、去乙酰基-ophiopo japonin A 适量, 精密称定, 加甲醇溶解并定容至 5 mL, 制成质量浓度分别为 0.110 0、0.168 0、0.124 0、0.136 0、0.112 0、0.156 5、0.138 0 mg/mL 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液制备

2.2.1 HPLC-DAD 条件供试品溶液制备 分别称取麦冬样品粉末 (过 4 号筛) 3.0 g, 精密称定, 加甲醇 50 mL, 静置 24 h 后超声提取 30 min, 滤过, 滤液水浴蒸干, 残渣用甲醇溶解并定容至 5 mL, 0.45 μ m 滤膜滤过, 即得麦冬药材供试品溶液 1。

2.2.2 HPLC-ELSD 条件供试品溶液制备 分别称取麦冬粉末(过 4 号筛) 3.0 g, 精密称定, 加甲醇 50 mL, 超声提取 45 min, 滤过, 滤渣加甲醇 30 mL, 超声提取 30 min, 抽滤, 合并滤液, 回收溶剂至干, 残渣加水 10 mL 使溶解, 用水饱和正丁醇振摇提取 5 次, 每次 15 mL, 合并正丁醇液, 用氨试液洗涤 2 次, 每次 5 mL, 弃去氨液, 正丁醇液回收至干。残渣用甲醇溶解并定容至 5 mL, 0.45 μm 滤膜滤过, 即得麦冬药材供试品溶液 2。

2.3 色谱条件

2.3.1 HPLC-DAD 检测 色谱柱为 Kromasil 100-5C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 203 nm; 进样量 15 μL ; 流动相为乙腈(A)与水(B), 梯度洗脱, 洗脱程序为: 0~20 min, 25%~40% A; 20~50 min, 40%~50% A; 50~60 min, 50%~70% A; 60~70 min, 70% A; 70~80 min, 70%~100% A; 80~90 min, 100% A, 体积流量 1.0 mL/min, 平衡 10 min。

2.3.2 HPLC-ELSD 检测 色谱柱为 Kromasil 100-5C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 漂移管温度 100 $^{\circ}\text{C}$, 气体体积流量 3.0 L/min; 进样量 15 μL ; 流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水(B)溶液, 梯度洗脱: 0~60 min, 35%~65% A, 体积流量 1.0 mL/min; 平衡 10 min。

2.4 方法学考察

2.4.1 空白试验 精密吸取甲醇溶液 15 μL 作为空白溶液, 注入高效液相色谱仪, 分别按“2.3.1”和“2.3.2”项下色谱条件进行测定。结果表明, 空白溶液对 2 种不同检测器测定结果均无干扰。

2.4.2 测定时间的确定 精密吸取麦冬供试品溶液 1 和 2 各 15 μL , 注入高效液相色谱仪, 分别按“2.3.1”和“2.3.2”项下色谱条件进行测定, 分别在 90 min (DAD) 和 60 min (ELSD) 后, 继续保持乙腈洗脱 30 min, 色谱图显示, 保留时间 90 min (DAD) 和 60 min (ELSD) 后无色谱峰, 故将测定时间确定为 90 min (DAD) 和 60 min (ELSD)。

2.4.3 精密度试验 精密吸取同一麦冬供试品溶液 1 和 2 各 15 μL , 分别按“2.3.1”和“2.3.2”项下色谱条件进行测定, 连续进样 6 次, 检测指纹图谱, 结果表明, HPLC-DAD 图谱各共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.26%~1.18%, 相对峰面积 RSD 在 1.23%~2.43%, 运用“中药色谱指纹图谱评价系统 2004A 版”, 以共有模式图为参照, 计算相似度, 均大于 0.99, 表明实验

仪器精密度良好。HPLC-ELSD 图谱各共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.55%~1.20%, 相对峰面积 RSD 在 1.16%~2.03%, 以共有模式图为参照, 计算相似度, 均大于 0.99, 表明实验仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一麦冬供试品溶液 1 和 2 各 15 μL , 分别按“2.3.1”和“2.3.2”项下色谱条件进行测定, 分别在 0、3、6、9、12、24 h 进样, 检测指纹图谱, 结果表明, HPLC-DAD 图谱各共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.05%~0.89%, 相对峰面积 RSD 在 0.98%~1.87%, 运用“中药色谱指纹图谱评价系统 2004A 版”, 以共有模式图为参照, 计算相似度, 均大于 0.99, 表明麦冬供试品溶液 1 在 24 h 内较稳定。

HPLC-ELSD 图谱各共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.67%~1.53%, 相对峰面积 RSD 在 0.89%~1.66%, 以共有模式图为参照, 计算相似度, 均大于 0.99, 表明麦冬供试品溶液 2 在 24 h 内较稳定。

2.4.5 重复性试验 精密称取同一麦冬样品 5 份, 按照“2.2”项中方法分别制备成麦冬供试品溶液 1 和 2, 分别按“2.3.1”和“2.3.2”项下色谱条件进行测定, 结果表明, HPLC-DAD 图谱各共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.06%~1.70%, 相对峰面积的 RSD 在 1.10%~2.50%, 均小于 3.0%, 运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”, 以共有模式图为参照, 计算相似度, 均大于 0.99, 表明该检测方法重复性良好。HPLC-ELSD 图谱各共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.06%~0.93%, 相对峰面积 RSD 在 0.78%~1.88%, 以共有模式图为参照, 计算相似度, 均大于 0.99, 表明该检测方法重复性良好。

3 结果与分析

采用国家药典委员会中药指纹图谱相似度评价系统 2004 (A 版) 进行分析, 确定了不同检测条件下麦冬 HPLC 指纹图谱的特征峰, 麦冬样品在 203 nm 检测条件下可确定 14 个峰(保留时间分别为 5.5、16.2、26.7、38.8、51.5、52.2、58.0、59.9、62.5、68.1、70.2、79.1、82.3、85.6 min), 其代表成分为黄酮类成分, 与对照品比对, 其中峰 7 为麦冬甲基黄烷酮 A 的色谱峰, 峰 8 为甲基麦冬二氢高异黄酮 B 的色谱峰, 分离良好, 峰形稳定, 且各样品中均含有 7 号峰, 故将保留时间约为 58.0 min 的色谱峰(麦冬甲基黄烷酮 A) 作为参照峰。

麦冬样品在 ELSD 检测条件下可确定 11 个峰(保留时间分别为 13.5、14.9、16.2、22.5、24.5、27.7、

30.8、34.2、37.4、39.3、49.6 min)。其中峰 9 为麦冬皂苷 D 的色谱峰, 分离良好, 峰形稳定, 且各样品中均含有此峰, 故将保留时间为 39.30 min 的色谱峰(麦冬皂苷 D)作为参照峰。

以传统采收期 (CK14、D16) 麦冬特征图谱为参照 (将各峰面积设定为 1), 计算其他不同时期麦冬特征图谱峰的相对峰面积。从表 2、3 和图 1 中可以看出, 在 203 nm 检测条件下各特征峰所代表

表2 不施用多效唑麦冬药材的 HPLC-DAD 特征图谱相对峰面积

Table 2 HPLC characteristic peak's relative peak area of *Ophiopogonis Radix*

[illegible]

表3 施用多效唑麦冬药材的 HPLC-DAD 特征图谱相对峰面积

Table 3 HPLC characteristic peak's relative peak area of *Ophiopogonis Radix*

[illegible]

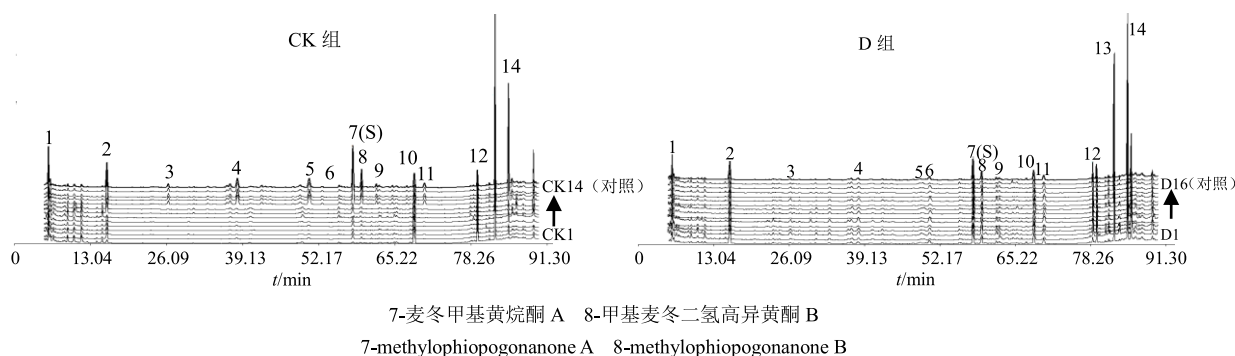


图 1 麦冬样品 HPLC-DAD 特征图谱

Fig. 1 Characteristic spectrum of HPLC-DAD of *Ophiopogonis Radix* samples

化学组分在麦冬块根不同膨大时期的积累动态变化特征整体呈现出上升趋势,到麦冬采收期时各有效组分含量基本达到最大平衡,部分峰值出现回落。从表 4、5 和图 2 可以看出,各有效组分的积累动态变化特征呈整体上升趋势,半数峰所代表组分的检出时间在块根膨大中后期。

麦冬不定根在 10 月底至 11 月初开始膨大形成块根, 至 12 月底为麦冬块根快速膨大第一时期, 1 月间进入半休眠状态, 2 月上中旬气温回升, 麦冬块根进入第 2 个快速膨大时期, 至清明节前后 (传统采收期), 施用多效唑则会促使麦冬块根提前近 1 个月开始膨大, 其有效组分积累也相应提前, 麦冬有效组分的积累规律整体趋势和麦冬块根膨大规律基本一致, 对麦冬中皂苷、黄酮和多糖含量的积

累规律研究结果也进一步验证本研究结果[7]。

4 讨论

中医药防病治病的特殊性决定了中药材质量控制的复杂性,目前多以测定单一组分或者大类成分的含量作为评价和控制药材质量的依据^[8-9],具有片面性和不确定性,要在中医药整体观理论指导下实现中药材质量的有效保证,采用不同测定方法,建立不同组分特征的图谱,从多方面对药材质量进行分析评价是一种行之有效的技术手段。中药材治病的有效组分主要为其生长过程中产生的次生代谢产物,这些代谢产物在植物组织中的积累规律决定着药材质量的优劣,中药材生产的目标是实现产量最大化和质量最优化^[10],而中药材的产量和其有效组分含量的动态变化往往是不一致的,这就在一

表4 不施用多效唑麦冬药材的 ELSD-HPLC 特征图谱相对峰面积

Table 4 HPLC-ELSD characteristic peak's relative peak area of *Ophiopogonis Radix*

[illegible]

表 5 施用多效唑麦冬药材的 ELSD-HPLC 特征图谱相对峰面积
Table 5 HPLC-ELSD characteristic peak's relative peak area of *Ophiopogonis Radix*

样品编号	相对峰面积										
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 5	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11
D1	0.20	0.09	0.13	0.05	0.18	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00	1.04
D2	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.78
D3	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.09	0.02	0.66
D4	0.00	0.00	0.00	0.06	0.12	0.00	0.13	0.00	0.15	0.07	0.53
D5	0.00	0.00	0.23	0.07	0.00	0.00	0.07	0.20	0.16	0.13	0.46
D6	0.00	0.00	0.16	0.20	0.17	0.00	0.26	0.70	0.21	0.19	0.55
D7	0.35	0.27	0.39	0.20	0.54	0.04	0.14	0.29	0.22	0.24	0.79
D8	0.00	0.34	0.32	0.23	0.95	0.05	0.24	0.00	0.35	0.18	0.46
D9	0.18	0.23	0.72	0.19	0.45	0.06	0.34	0.30	0.46	0.25	0.49
D10	1.02	0.17	0.61	0.25	0.73	0.09	0.24	1.07	0.46	0.21	0.43
D11	0.63	0.42	0.91	0.23	0.57	0.12	0.30	1.25	0.48	0.46	0.22
D12	0.00	0.57	0.45	0.38	1.20	0.17	0.24	0.25	0.65	0.43	0.21
D13	0.70	0.57	0.66	0.44	1.23	0.35	0.53	0.00	0.72	0.46	0.17
D14	0.32	0.73	0.96	0.78	0.95	0.21	0.50	0.39	0.76	0.48	0.89
D15	1.10	1.47	1.50	0.66	1.29	0.16	0.52	0.61	0.89	0.53	0.98
D16	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

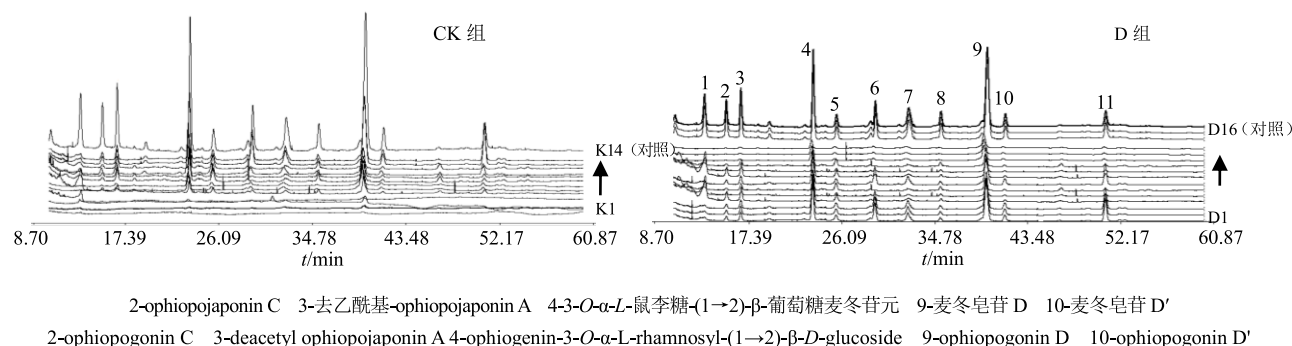


图 2 麦冬样品 HPLC-ELSD 特征图谱

Fig. 2 Characteristic spectrum of HPLC-ELSD of *Ophiopogonis Radix* samples

一定程度上增加了中药材最佳采收期选择的难度。将多张特征图谱进行重叠，能够比较全面地反映药材中化学组分的特征信息，为药材质量的评价和控制提供丰富的信息。

通过建立指纹图谱对麦冬块根（药材）整个发育阶段中组分的积累动态进行研究，可为麦冬的生产和质量控制提供可靠的方法依据和理论参考。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 孙志国, 程东来, 钟学斌, 等. 麦冬道地药材的国家地理标志产品保护现状分析 [J]. 贵州农业科学, 2010, 38(1): 57-59.
- [3] 王庆慧, 李 锐, 王金辉, 等. 麦冬化学成分研究 [J]. 中国现代中药, 2009, 11(11): 21-22.
- [4] 张义萍, 陈建真, 敖志辉, 等. 麦冬不同种属、产地和部位的活性成分研究进展 [J]. 中国实用医药, 2008, 3(10): 191-193.

- [5] 俞建平, 马月光, 邵建峰, 等. ELSD-HPLC 法测定浙麦冬、川麦冬中麦冬皂苷 D 含量的方法研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(4): 253-255.
- [6] 林以宁, 志田保夫, 袁 博, 等. 不同产地麦冬的指纹图谱比较研究 [J]. 中国药科大学学报, 2005, 36(6): 538-542.
- [7] 吴发明, 蔡晓洋, 陈 辉, 等. 麦冬块根发育过程中主要化学组分积累动态研究 [J]. 中国药学杂志, 2016, 51(7): 533-537.
- [8] 姚令文, 王钢力, 王 峰, 等. HPLC-ELSD 法测定麦冬皂苷 D 的含量 [J]. 中草药, 2004, 35(12): 1419-1420.
- [9] 唐晓清, 余伯阳, 徐德然, 等. HPLC-ELSD 法测定麦冬中甾体皂元的含量 [J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(4): 270-272.
- [10] 苏文华, 张光飞, 李秀华, 等. 浅谈药用植物人工种植中产量与质量的关系 [A] // 全国第二届中药资源生态学学术研讨会论文集 [C]. 北京: 中华中医药学会糖尿病分会, 2006.