

山麦冬的 HPLC/ESI-MS 特征指纹图谱研究

韩凤梅, 李 紫, 蔡 敏, 张 玲, 陈 勇*

(湖北大学 中药生物技术省重点实验室, 湖北 武汉 430062)

摘要:目的 研究山麦冬 *Liriope spicata* 甲醇提取物中的物质组成情况, 建立山麦冬 HPLC/ESI-MS 特征指纹图谱。方法 山麦冬用甲醇超声提取, 提取液经 C₁₈ SPE 固相萃取柱除去多糖成分后, 用高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱 (HPLC/ESI-MS) 分析提取物中的物质组成。结果 山麦冬甲醇提取物色谱图中有 17 个共有峰的重现性与精密度的 RSD < 5%, 建议以此为基础制作山麦冬特征指纹图谱。结论 应用 HPLC/ESI-MS 技术建立的山麦冬指纹图谱特征性强、重现性较好, 可用于山麦冬的品质评价与品种鉴别。

关键词:湖北麦冬; 高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱; 指纹图谱

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2005)09-1395-03

HPLC/ESI-MS fingerprint of *Radix Liriope*s

HAN Feng-mei, LI Zi, CAI Min, ZHANG Ling, CHEN Yong

(Bio-Technology of Traditional Chinese Medicine Key Laboratory of Hubei Province, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: Objective To study the compositions of methanol extracts from *Radix Liriope*s (RL) and establish the characteristic fingerprint of RL by HPLC/ESI-MS. **Methods** First, the samples of RL were extracted by ultra-sonication using methanol as extracting solvent. Then the methanol extracts of RL were pretreated by AICHROM™ Reliz Sil C₁₈ column to remove polysaccharides. Finally, the cleaned samples were injected into a high performance liquid chromatography coupled with electrospray-ionization ion trap mass spectrometry electrospray to analyse their compositions. **Results** In the chromatogram of the methanol extracts from RL, there were 17 common peaks with the RSD of reproducibility and precision less than 5%. **Conclusion** The characteristic fingerprint of the RL established by HPLC/ESI-MS technology is characteristic and reproducible, which could be applied to the quality assessment and variety identification of RL Spicate.

Key words: *Radix Liriope*s (RL); HPLC/ESI-MS; fingerprint

山麦冬为百合科植物湖北麦冬 *Liriope spicata* (Thunb.) Lour. var. *prolifera* Y. T. Ma 和短葶山麦冬 *L. muscari* (Decne.) Bailey 的干燥块根, 主要成分有三萜皂苷、多糖及异黄酮等。由于受产地、气候、生态环境以及采集时间等因素的影响, 不同来源山麦冬药材中所含主要成分差异较大。因此, 仅针对其中某个有效成分进行定性或定量分析并不能有效控制药材的质量。关于山麦冬、麦冬皂苷类成分提取^[1,2]、结构分析^[3~5]及定量测定^[6,7]研究已有许多文献报道, 但未见有关山麦冬皂苷类成分指纹图谱研究的报道。高效液相色谱-质谱联用技术集液相色谱分离能力强和质谱灵敏度高、定性能力强于一体, 是用于中药活性成分研究的最有效的分析手段之

一^[8]。笔者曾研究了麦冬皂苷提取物的电喷雾质谱特征图谱^[9], 本实验应用高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱 (HPLC/ESI-MS) 研究了山麦冬药材甲醇提取物指纹图谱, 该指纹图谱特征性强、重现性良好, 可用于山麦冬药材的鉴别及质量评价。

1 仪器, 材料与试剂

美国 Finnigan 公司 LCQ^{DUO} 型液质联用仪, 包括 ESI (电喷雾电离) 源, TSP4000 泵及 TSP AS3000 自动进样器, Highchem 公司 Mass Frontier 1.0 质谱解析软件。

1~10 号药材来源分别为: 1 号对照药材, 中国药品生物制品检定所, 批号 1136-200001; 2 号药材 2000 年 3 月采于襄阳欧庙山麦冬药材 GAP 种植基

收稿日期: 2004-11-05

基金项目: 科技部“十五”攻关项目 (2001BA701A01); 湖北省青年杰出人才科学基金项目 (2002AC004)

作者简介: 韩凤梅 (1967—), 女, 天津市人, 副教授, 理学学士, 研究方向为药物分析。E-mail: chenhanzz@163.com

* 通讯作者 陈 勇 Tel/Fax: (027) 88663590 E-mail: cy101610@npc.gov.cn

地;3~10 号药材于 2001 年 11 月采于襄阳欧庙,地点分别为欧庙张东一组、欧庙李塍村一组、欧庙张东三组、欧庙桃园村一组、欧庙肖州村二组、欧庙肖州村四组、欧庙大洲村二组和欧庙李湾村二组。上述药材经本院植物分类学王万贤教授鉴定为湖北麦冬 *L. spicata* (Thunb.) Lour. var. *prolifera* Y. T. Ma。乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 测定条件:色谱条件:AICHRON™ Reliz Sil C₁₈ 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 5 μm),流动相 10 mmol/L 乙酸铵-乙腈 (60 min 内乙腈体积分数变化为 25%→60%),体积流量 0.2 mL/min,进样量 15 μL。质谱条件:扫描范围 *m/z* 300~1 200,离子源喷射电压 4.5 kV,毛细管电压 -45 V,毛细管温度 230 ℃,鞘气 (N₂) 流速 50 个单位,辅助气 (N₂) 流速 10 个单位,负离子检测。

2.2 供试液的制备:精密称取山麦冬对照药材粉末 0.3 g 于离心管中,超声提取 2 次 (每次 15 min),每次加甲醇溶液 5 mL,离心取上清液,合并两次提取液并用甲醇定容至 10 mL。取甲醇提取液 1 mL 稀释至 20 mL 后,加压通过已活化的 C₁₈ SPE 固相萃取柱,先用 10 mL 水洗除去多糖等成分,后用甲醇 1 mL 洗脱。收集甲醇洗脱液作为山麦冬对照药材供试液。其他产地药材同法制备。在计算各峰强度时,将各样品中每个峰的峰面积除以对照药材中相应峰的峰面积,得到的比值作为样品中该峰的相对峰面积 (*Ar*)。

2.3 供试液 HPLC/ESI-MS 特征图谱:分别取各山麦冬药材供试液 15 μL 进样分析,对照药材和 2 号药材的色谱图见图 1。取对照品药材供试液连续进样 5 次,在峰强大于 10% 的色谱峰中,保留时间 (*t_R*) 及 *Ar* 的 RSD 均小于 5% 的共有峰有 17 个。分析 5 份平行提取的山麦冬对照药材供试液,上述 17 个共有峰的 *t_R* 及 *Ar* 的 RSD 亦小于 5%。取空白溶剂 15 μL,在同样条件下进样分析,没有发现上述 17 个共有峰。样 1 (对照药材) 中 17 个共有峰的实验数据见表 1。

3 讨论

3.1 共有峰初步定性分析:根据山麦冬样品的 ESI-MS 负离子全扫描质谱和源碰撞诱导解离

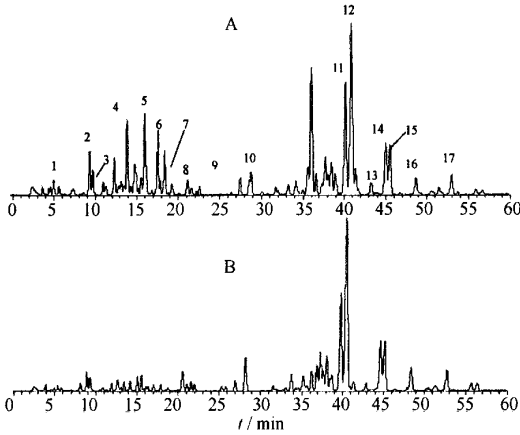


图 1 山麦冬对照药材 (A) 和 2 号药材 (B) 的色谱图
Fig. 1 Chromatograms of RL reference substances (A) and No. 2 sample (B)

表 1 对照药材供试液中 17 个共有峰特性

Table 1 Characteristics of 17 common peaks of RL in reference substances

序号	<i>m/z</i>	精密度				重现性			
		<i>t_R</i> /min	RSD/%	<i>Ar</i>	RSD/%	<i>t_R</i> /min	RSD/%	<i>Ar</i>	RSD/%
1	901.6	4.92	1.3	1.13	4.9	4.49	3.0	1.00	3.9
2	1 047.5	9.01	1.6	1.00	3.7	9.17	2.4	1.00	4.7
3	915.5	9.43	1.6	1.03	4.9	9.48	3.8	0.94	4.6
4	915.6	13.61	1.2	1.00	4.9	13.61	3.6	1.00	4.7
5	1 047.6	15.74	1.0	1.02	4.5	15.74	3.4	1.00	4.0
6	1 089.5	17.26	1.1	1.09	0.5	17.28	2.6	1.00	5.0
7	1 089.5	18.10	1.0	1.11	4.8	18.15	2.4	1.00	5.0
8	655.6	20.89	0.9	1.06	4.8	20.94	1.8	1.00	4.5
9	841.6	27.24	0.6	1.00	3.6	27.25	1.8	1.00	4.9
10	843.6	28.51	0.6	1.03	5.0	28.53	1.9	1.00	4.2
11	853.5	39.78	0.6	0.99	4.5	39.87	1.1	1.00	4.9
12	721.4	40.48	0.6	1.03	3.6	40.59	1.2	1.00	4.8
13	895.3	42.89	0.5	1.09	4.9	42.98	1.0	1.00	3.9
14	895.3	44.60	0.6	1.08	5.0	44.70	1.0	1.00	4.6
15	895.5	45.28	0.5	1.11	4.8	45.00	1.4	1.00	3.2
16	895.4	48.28	0.5	1.09	4.0	48.39	0.8	1.00	4.4
17	937.2	52.60	0.4	1.03	4.5	52.72	0.6	1.00	5.0

(source collision-induced dissociative, SCID) 实验,上述 17 个共有峰均为准分子离子峰 $[M-H]^-$ 。进一步进行 MS-MS 分析表明,除了 m/z 655.9 峰外。各子离子峰均是母离子峰失去糖基的碎片峰,故初步推断上述共有成分为山麦冬皂苷成分。其中 m/z 721.5、853.5、895.4 和 1 047.5 与文献报道^[9,10]的山麦冬皂苷成分的相对分子质量及质谱碎裂规律相同(分别为麦冬皂苷 A、薯蓣皂苷元-1-O-β-吡喃夫糖-3-O-α-吡喃鼠李糖苷、25(S)-鲁斯可皂苷元-1-O-[α-吡喃鼠李糖基(1→2)[β-吡喃木糖基(1→3)]-β-吡喃夫糖苷和薯蓣皂苷元-3-O-α-吡喃鼠李糖苷-(1→2)]-α-L-吡喃鼠李糖苷-(1→3)-β-吡喃葡萄糖苷)。因此,可以选择上述 17 个共有峰作为山麦冬 HPLC/ESI-MS 指纹图谱的主要分析对象。

3.2 指纹图谱的聚类分析:聚类分析法可通过数学的方法来替代人们主要靠经验和专业知识来进行的

传统分类工作,将它用于中药指纹图谱分析,不仅可以鉴别出药材的真伪,而且可以对同品种不同产地的药材进行品质评价。本实验选择多元统计分析中的聚类分析方法对各共有峰 Ar 实验数据(相应的共有峰峰面积数据见表 2)进行分析,采用 Euclidean 距离法计算样品间的距离,用 Ward 方法进行系统聚类,结果见图 2。聚类图中纵坐标是样品,横坐标表示样品间的相似程度。以 1 号山麦冬对照药材为标准,2~10 号样品与之比较进行品质评价,连接它们的纵向线越短,说明这两样品间的差距越小。从该聚类图中可以得到以下结论:样 1 为对照药材,样 2 与之距离最短,说明样 2 药材与对照药材最相似;样 4、8、10 可聚为一类,与对照药材 1 的相似性较大;样 3、5、6、7、9 可聚为一类,其药材均采集于 11 月,说明采集时间相同的药材具有一定程度的相似性。

表 2 2~10 号山麦冬药材 17 个共有峰的相对峰面积
Table 2 Peak area of 17 common peaks of No. 2—10 RL samples

样品	相对峰面积 (Ar)																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2	0.27	0.64	0.96	0.15	0.24	0.27	0.26	1.84	0.76	2.54	1.05	3.27	0.86	1.69	1.50	2.05	2.04
3	2.98	1.25	3.34	1.56	0.61	1.78	2.15	3.18	6.69	8.82	0.90	3.88	1.26	4.30	2.44	1.07	3.91
4	2.57	0.95	1.40	1.57	0.71	2.10	2.42	2.03	2.91	3.53	0.73	2.48	1.45	2.83	1.90	1.01	2.76
5	8.10	0.91	1.32	1.61	0.48	2.57	2.82	2.00	4.76	4.51	0.62	2.69	2.74	2.83	1.75	1.02	3.01
6	4.39	1.58	2.13	2.78	0.78	3.82	5.28	2.41	4.01	3.98	0.60	3.28	1.85	3.36	1.92	0.90	4.40
7	4.51	1.96	2.21	2.31	0.60	2.55	3.28	2.27	3.86	3.18	0.43	3.21	1.46	2.30	1.56	0.89	3.26
8	2.47	0.72	2.05	1.00	0.35	1.38	1.80	1.34	1.96	1.96	0.43	2.56	1.01	2.43	1.43	0.66	2.43
9	3.74	2.26	2.94	2.77	0.94	3.13	3.90	2.20	3.30	3.70	0.71	3.40	1.72	3.61	2.10	1.12	4.68
10	1.63	1.45	2.27	0.63	0.33	1.02	1.20	2.11	4.11	3.51	0.83	4.34	2.10	4.15	3.13	1.73	5.06

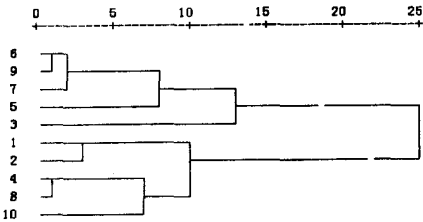


图 2 样品的聚类分析图

Fig. 2 Dendrogram of sample clustering analysis

References:

[1] Zhou Y H, Xu D S, Peng Y, et al. Investigation on extract process for total saponins in root of *Ophiopogon japonicus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(12): 1076-1078.

[2] Zhou Y H, Wu X R, Xu D S, et al. Study on the extraction and purification of total saponins in root of *Ophiopogon japonicus* by macroreticular resins [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(12): 1089-1091.

[3] Cheng Z H, Wu T, Li L Z, et al. Studies on the liposoluble components from tuber of *Ophiopogon japonicus* [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2005, 40(5): 337-341.

[4] Cheng Z H, Wu T, Yu B Y. Chemical constituents in the tubers of *Ophiopogon japonicus* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17(1): 1-3.

[5] Dai H F, Zhou J, Tan L H, et al. New steroidal glycosides from *Ophiopogon japonicus* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2001, 43(1): 97-100.

[6] Yao L W, Wang G L, Wang F, et al. Determination of *Ophiopogon* saponin D' by HPLC-ELSD [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(12): 1419-1420.

[7] Yu B Y, Dai S J, Xu G J. Determination of saponins in *Mai Dong* by dual-wavelength spectrophotometry [J]. *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1996, 27(5): 316-318.

[8] Guo J F, Zhong D F, Qiao S Y, et al. Studies on the ginsenosides by HPLC-ESI-MS [J]. *J Chin Mass Spect Soc* (质谱学报), 2003, 24(4): 477-479.

[9] Chen Y, Li Z, Cai M, Han F M. Character spectra analysis of *Radix Ophiopogonis* by electrospray mass spectrometry [J]. *Acta Chin Med and Pharm* (中医药学报), 2003, 31(2): 23-25.

[10] Watanbe Y. Studies on the constituents of ophiopogonis tuber. IV. on the structures of ophiopogonin A, B', C, C', and D' [J]. *Chem Pharm Bull*, 1997, 25(11): 3049-3051.