

杭麦冬与川麦冬中高异黄酮类成分和抗氧化活性的比较

童菊华^{1,2}, 庞小存², 王威², 王延杰¹, 李先恩^{2*}, 秦民坚^{1*}

1. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210009

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 目的 比较川麦冬与杭麦冬中3种高异黄酮类活性成分的质量分数差异及麦冬水提物的抗氧化能力的差异。方法 采用超高效液相色谱与二极管阵列检测器技术,测定3种高异黄酮类活性成分。色谱柱为ACQUITY™ UPLC BEH C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),流动相为乙腈-0.2%甲酸水(55:45),体积流量0.2 mL/min,检测波长296 nm。采用紫外分光光度法测定麦冬水提物清除DPPH自由基的活性。结果 川麦冬中甲基麦冬高异黄酮A、甲基麦冬黄烷酮A与甲基麦冬黄烷酮B的平均质量分数分别为(3.06±0.54)、(40.10±5.63)、(29.51±5.06) μg/g;杭麦冬中3种成分平均质量分数分别为(9.22±3.52)、(106.63±27.56)、(256.97±61.79) μg/g。川麦冬水提物清除自由基的IC₅₀平均值为16.59 mg/mL,杭麦冬的IC₅₀平均值为14.48 mg/mL,阳性对照VC的IC₅₀值为7.06 μg/mL。结论 与川麦冬比较,杭麦冬中高异黄酮类成分的量较高,其水提取物对DPPH自由基的清除作用也较强,说明杭麦冬具有较强的抗氧化活性,为麦冬的质量评价及其道地性研究提供依据。

关键词: 麦冬;超高效液相色谱;高异黄酮;抗氧化;甲基麦冬高异黄酮A;甲基麦冬黄烷酮B;甲基麦冬黄烷酮A

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)20-3091-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.20.022

Comparison on homoisoflavones extracted from *Ophiopogon japonicus* in Sichuan and Zhejiang and their anti-oxidative activity

TONG Ju-hua^{1,2}, PANG Xiao-cun², WANG Wei², WANG Yan-jie¹, LI Xian-en², QIN Min-jian¹

1. College of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Institute of Medical Plants and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To compare the contents of three homoisoflavones and their anti-oxidative activity of *Ophiopogon japonicus* in Sichuan (OJS) and Zhejiang (OJZ). **Methods** The determination was performed on ACQUITY™ UPLC BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the Ultra Performance Liquid Chromatography-Photo-Diode Array (UPLC-PDA) technology was applied, and the mobile phase consisted of acetonitrile and 0.2% formic acid aqueous solution (55 : 45) with gradient elution program, flow rate was 0.20 mL/min with 2 μL of sample quantity at 296 nm, and the anti-DPPH radical efficiency of water extract from *Ophiopogonis Radix* were evaluated by UV-photometer. **Results** The average values of methylophiopogonone A, methylophiopogonanone A, and methylophiopogonanone B were (3.06 ± 0.54), (40.10 ± 5.63), and (29.51 ± 5.06) μg/g in OJS, respectively; while those in OJZ were (9.22 ± 3.52), (106.63 ± 27.56), and (256.97 ± 61.79) μg/g, separately. The IC₅₀ value was 16.59 mg/mL in OJS, while that in OJZ was 14.48 mg/mL. The IC₅₀ value of positive control VC was 7.06 μg/mL. **Conclusion** Compared with OJS, the contents of homoisoflavones in OJZ are higher, and the anti-radical efficiency of water extract from OJZ is stronger. It provides the basis for the quality evaluation and geo-authentic research of *Ophiopogonis Radix*.

Key words: *Ophiopogon japonicus* (Linn. f.) Ker-Gawl.; UPLC; homoisoflavone; anti-oxidant; methylophiopogonone A; methylophiopogonanone B; methylophiopogonanone A

麦冬为百合科沿阶草属植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (Linn. f.) Ker-Gawl. 的干燥块根, 具有多种功效, 主要功效为养阴润肺、益胃生津、清心除烦^[1], 其化学成分主要有皂苷、高异黄酮类、多糖、

收稿日期: 2015-04-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81130069)

作者简介: 童菊华, 硕士研究生。Tel: 13651375405 E-mail: sweetgirltong@163.com

*通信作者 秦民坚, 教授, 博士生导师, 主要从事药用植物资源与质量、中药资源与新药开发等研究。

Tel: (025)85391290 E-mail: minjianqin@163.com

李先恩, 博士, 研究员。主要从事药用植物生理学方向研究。Tel: (010)2810019 E-mail: xeli@implad.ac.cn

氨基酸等^[2-4],其中高异黄酮类为其主要的活性成分,甲基麦冬高异黄酮 A、甲基麦冬黄烷酮 A、甲基麦冬黄烷酮 B 的量在麦冬黄酮类成分中较高。麦冬的主流商品主要产自于浙江和四川,分别称为杭麦冬和川麦冬^[5]。国内外很多相关文献报道对麦冬高异黄酮类化学成分进行测定^[6-8],而本研究主要利用 UPLC-PDA 测定杭麦冬和川麦冬中 3 种高异黄酮类成分的量,比较杭麦冬和川麦冬 3 种活性成分的量差异;近年来,对麦冬黄酮类成分的抗氧化研究也有报道^[9-10],同时麦冬水提物中也含有黄酮、多糖等活性成分,具有抗氧化、抗衰老等作用^[11],通过比较其抗氧化能力的差异性,从体外药效学角度评价 2 个产地药材的质量差异,为麦冬药材的质量控制及道地性研究提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

麦冬样品分别采自四川、浙江麦冬种植地,经中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所李先恩研究员鉴定为百合科沿阶草属植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (Linn. f.) Ker-Gawl. 的干燥块根。麦冬挖出后,取下块根,洗净,烘干。干燥后粉碎,过 60 目筛,待用,样品的来源见表 1。

表 1 麦冬样品来源

Table 1 Resource of *Ophiopogonis Radix*

编号	产地	采收年份
OJS-1	四川三台县花园镇宝林村	2013
OJS-2	四川三台县花园镇法源寺村	2013
OJS-3	四川三台县三九雅安	2013
OJS-4	四川三台县老马乡小围村	2013
OJS-5	四川三台县老马乡小围村	2014
OJS-6	四川三台县三九雅安(施用多效唑)	2014
OJS-7	四川三台县三九雅安(无多效唑)	2014
OJZ-1	浙江慈溪逍林农垦场	2013
OJZ-2	浙江慈溪 3 年生绿叶型	2013
OJZ-3	浙江慈溪 3 年生黄叶型	2013
OJZ-4	浙江慈溪 2 年生绿叶型	2013
OJZ-5	浙江慈溪 2 年生黄叶型	2013
OJZ-6	浙江慈溪逍林农垦场	2014
OJZ-7	浙江正大青春宝药业公司	2014

1.2 仪器与试剂

美国 Waters Acquity 超高效液相色谱仪, PDA 检测器;百万分之一天平(Mettled Toledo); NV752N 紫外可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司), KQ-5200DV 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

色谱乙腈(美国 Fisher 公司),实验用水为娃哈哈纯净水,甲酸(色谱级,美国 Fisher 公司);其余试剂均为分析纯(北京化学工业公司)。对照品:甲基麦冬高异黄酮 A(质量分数≥98%)、甲基麦冬黄烷酮 A(质量分数≥98%),购自上海永恒生物科技有限公司;甲基麦冬黄烷酮 B(质量分数≥98%),购自上海一林生物科技有限公司;1,1-二苯基-2-苦肟基自由基(DPPH,质量分数≥98.0%批号 KD1212YC13,上海源叶生物科技有限公司);维生素 C(VC,批号 20131210,上海源叶生物科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 ACQUITY™ UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, Waters Corp., Milford, 美国);流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液,以 55:45 等度洗脱 12 min,柱温 30 ℃,体积流量 0.2 mL/min,检测波长 296 nm,进样量 2 μL。

2.2 对照品溶液的制备

分别取对照品甲基麦冬高异黄酮 A、甲基麦冬黄烷酮 A、甲基麦冬黄烷酮 B,精密称定,加甲醇溶解,分别制成含甲基麦冬高异黄酮 A 0.054 mg/mL、甲基麦冬黄烷酮 A 0.97 mg/mL、甲基麦冬黄烷酮 B 1.33 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 DPPH 溶液的配制

准确称取 25 mg 的 DPPH 无水乙醇定容至 100 mL 量瓶中,配成 250 μg/mL 的母液,储存于 4 ℃ 低温冰箱,从母液中取 20 mL 于 100 mL 量瓶中, DPPH 质量浓度为 50 μg/mL。

2.4 阳性对照的配制

准确称取 24.5 mg 的 VC,用新煮沸冷却后的蒸馏水定容至 25 mL,即得到 980 mg/mL 的 VC 母液,待测时再稀释至所需的质量浓度。

2.5 供试品溶液的制备

精确称取麦冬粉末 1.000 0 g,用 50 mL 甲醇超声提取 30 min,滤过,减压蒸干,加甲醇溶解,定容至 5 mL 的量瓶中,即得供试品溶液。

2.6 标准曲线的绘制

分别精密吸取上述对照品溶液适量,按不同比例稀释,配制含甲基麦冬高异黄酮 A 0.5、1.6、2.7、3.8、4.9、5.9 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液;含甲基麦冬黄烷酮 A 4.9、9.7、14.6、19.4、24.3、29.1 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液;含甲基麦冬黄烷酮 B 5.3、10.6、16.0、21.3、26.6、31.9 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,记录色谱图及峰面积。以各对照品的质量浓度对数为横坐标,峰面积对数为纵坐标绘制标准曲线,得甲基麦冬高异黄酮 A 的回归方程 $Y=1.075\ 3\ X+4.060\ 8$, $R^2=0.998\ 3$,在 0.24~7.1 $\mu\text{g/mL}$ 内线性关系良好;甲基麦冬黄烷酮 A 的回归方程 $Y=0.995\ 9\ X+4.542\ 2$, $R^2=0.997\ 7$,在 2.1~43.6 $\mu\text{g/mL}$ 内线性关系良好;甲基麦冬黄烷酮 B 的回归方程 $Y=1.284\ 6\ X+4.073\ 2$, $R^2=0.999\ 2$,在 2.5~47.8 $\mu\text{g/mL}$ 内线性关系良好。

2.7 方法学考察

2.7.1 精密度试验 精密吸取供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,连续进样 6 次,每次进样量 2 μL 。测得甲基麦冬高异黄酮 A、甲基麦冬黄烷酮 A、甲基麦冬黄烷酮 B 峰面积的 RSD 为 1.28%、1.67%、1.72%,表明仪器精密度良好。

2.7.2 重复性试验 取同一批样品,按“2.5”项制备方法平行制备 6 份供试品溶液,进样 2 μL ,测定计算各成分的量。甲基麦冬高异黄酮 A、甲基麦冬黄烷酮 A、甲基麦冬黄烷酮 B 质量分数的 RSD 依次为 0.13%、1.91%、1.09%,RSD 均小于 2%。

2.7.3 稳定性试验 取同一份供试品溶液在 0、2、4、8、12、24 h 进样,在“2.1”项下色谱条件测定。测得甲基麦冬高异黄酮 A、甲基麦冬黄烷酮 A、甲基麦冬黄烷酮 B 峰面积的 RSD 依次为 0.16%、1.75%、1.79%。

2.7.4 加样回收率试验 称取 6 份已测定的麦冬药材,每份约 1 g,精密称定,分别加入 3 种对照品溶液适量,按“2.5”项方法制备供试品溶液,在“2.1”项下色谱条件测定,计算回收率,结果甲基麦冬高异黄酮 A、甲基麦冬黄烷酮 A、甲基麦冬黄烷酮 B 的平均回收率分别为 100.85%、101.54%、96.59%。

2.8 样品的测定

取不同产地的麦冬样品,按照“2.5”项方法制备供试品溶液,按“2.1”项的色谱条件,采用外标法计算,色谱图见图 1,测定结果见表 2。杭麦冬高异黄酮的量均高于川麦冬,具有显著性差异;同一产地的麦冬 2014 年的量均比 2013 年的量高,同一产地不同时间采收的麦冬高异黄酮的量无明显差

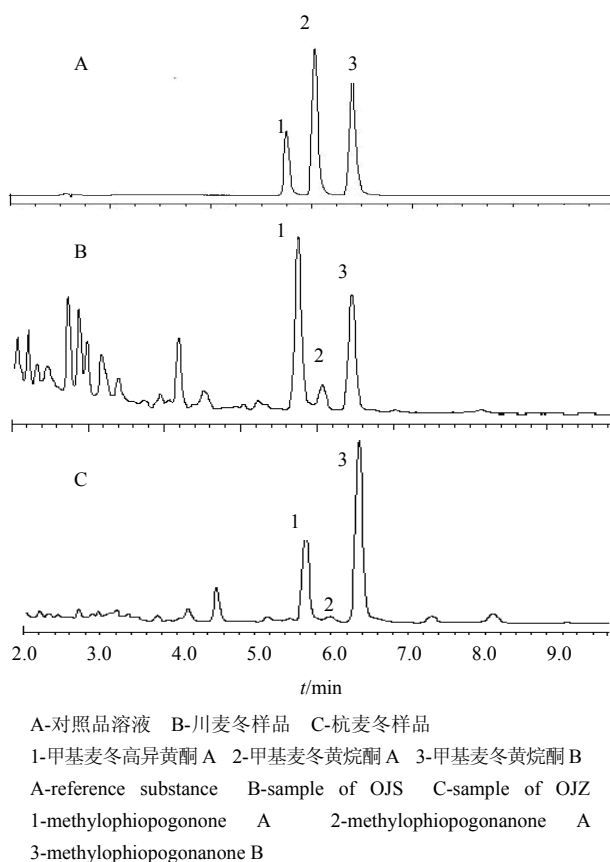


图1 麦冬样品的 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC of *O. japonicus* samples

异。其中 OJS-6 中高异黄酮量低于 OJS-7,说明施用膨大剂会影响麦冬有效成分的量。

2.9 DPPH 法测定麦冬水提物清除自由基能力

2.9.1 麦冬水提物的配制 取不同产地的麦冬干燥块根。粉碎过筛,第 1 次加入 12 倍量水浸泡 30 min,超声提取 40 min,15 000 r/min 离心 10 min,取上清液,第 2 次加入 10 倍量水超声提取 30 min,离心,取上清液,合并 2 次上清液,减压浓缩至干,加水定容至 10 mL 量瓶中,制得麦冬水提物供试品溶液的质量浓度为 0.1 g/mL,再从母液中分别吸取 1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 mL 于 10 mL 量瓶中,制成不同质量浓度的麦冬水提物溶液。

2.9.2 麦冬水提物清除 DPPH 自由基 IC_{50} 值的测定 取 2 mL 不同质量浓度的麦冬水提物溶液,加入 2 mL DPPH 溶液,涡旋混合后,在室温下避光反应 30 min,517 nm 处测其吸光度 (A) 值,以 A_0 表示空白对照吸光度,按公式计算各麦冬水提物对 DPPH 自由基的清除率 (IR)。采用 SPSS 19.0 软件计算,根据清除率曲线求得 IC_{50} 值,结果见表 2。

表2 川麦冬与杭麦冬中3种高异黄酮的定量测定结果及麦冬水提物清除DPPH自由基的IC₅₀值Table 2 Determination of three homoisoflavones and scavenging effects for DPPH (IC₅₀) of water extract from OJS and OJZ

编号	甲基麦冬高异黄酮 A/(μg·g ⁻¹)	甲基麦冬黄烷酮 A/(μg·g ⁻¹)	甲基麦冬黄烷酮 B/(μg·g ⁻¹)	IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)
OJS-1	2.65±0.08	32.38±0.04	29.30±0.10	15.00
OJS-2	3.09±0.35	40.27±6.22	23.83±4.33	16.40
OJS-3	3.98±0.01	43.56±0.37	38.03±0.46	17.50
OJS-4	3.09±0.19	47.22±1.03	32.49±1.11	16.15
OJS-5	2.96±0.17	56.22±1.43	30.16±0.25	13.40
OJS-6	2.29±0.06	35.59±0.40	23.23±0.56	18.28
OJS-7	3.38±0.06	36.18±0.46	29.53±0.32	19.40
OJZ-1	8.79±0.15	78.62±0.04	212.38±2.29	13.05
OJZ-2	9.01±0.77	94.30±3.27	223.43±2.64	13.61
OJZ-3	9.92±0.08	102.48±1.14	262.08±5.41	13.83
OJZ-4	4.87±0.71	97.53±3.51	285.78±3.19	15.92
OJZ-5	9.96±0.47	83.79±1.27	251.74±2.96	13.43
OJZ-6	15.88±0.35	151.06±0.17	375.82±0.67	16.79
OJZ-7	6.11±0.18	138.63±2.31	187.79±1.75	14.70

$$IR=1-(A_1-A_2)/A_0$$

A₀为2 mL DPPH+2 mL 无水乙醇的吸光度, A₁为2 mL 样品+2 mL DPPH的吸光度, A₂为2 mL 样品+2 mL 无水乙醇的吸光度

2.9.3 测定结果

从表2中可知川麦冬水提物IC₅₀平均值(16.59 μg/mL)高于杭麦冬水提物的IC₅₀平均值(14.48 μg/mL), 阳性对照VC的IC₅₀值为7.06 μg/mL。结果表明浙江地区表现出较强的抗氧化活性, 同一产地的抗氧化活性也有差异但不显著。

3 讨论

麦冬种质资源丰富, 作用范围广, 是重要的药用资源植物。四川和浙江为主要麦冬产区, 种植历史悠久, 川麦冬的生长周期短, 仅栽培1年后便可收获, 而且产量大, 杭麦冬的生长周期长, 需种植2到3年收获, 在浙江道地药材中列为“浙八味”之一^[12], 由于杭麦冬的生长周期长, 如今杭麦冬的种植逐渐减少, 生产量逐渐下降^[13]。

本实验从麦冬高异黄酮量的角度比较杭麦冬与川麦冬的质量差异性, 采用HPLC法测定麦冬高异黄酮量的研究已有文献报道^[14-15], 而本实验比较了UPLC-PDA与普通的液相色谱法, 结果显示, 超高效液相色谱法的分离效果好, 分析时间短, 灵敏度高, 节约溶剂, 与液质联用技术相比成本低, 适合样品的定量测定。采用DPPH法测定麦冬水提物清除自由基

的作用, 麦冬的水提取物以水为溶媒, 更为环保, 无害; 传统中药主要以水煎液入药, 并且水提物中含有多糖、黄酮等成分, 具有一定的抗氧化作用。但本研究对杭麦冬及川麦冬质量评价的研究存在着局限性, 单从一类成分的量及体外的药效上不足以全面地评价中药材的产地差异性, 应综合药效学, 分子遗传性, 显微、性状鉴定等多方面, 多角度去评价, 为进一步对麦冬质量评价的研究提供参考依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 马海波. 麦冬化学成分的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [3] 蒋慧莲. 麦冬特征性成分及其质量标准研究 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2013.
- [4] 陈屏, 徐东铭, 雷军. 麦冬化学成分及药理作用的研究现状 [J]. 长春中医学院学报, 2004, 20(1): 35-36.
- [5] 余伯阳, 徐国钧. 中药麦冬的资源利用研究 [J]. 中草药, 1995, 26(4): 205-225.
- [6] 陈有根, 戴俊东, 古海峰. 麦冬药材及其提取物中甲基麦冬黄烷酮A和B的HPLC法测定 [J]. 中草药, 2007, 38(11): 1640-1643.
- [7] Lin Y N, Zhu D N, Qi J, et al. Characterization of homoisoflavonoids in different cultivation regions of *Ophiopogon japonicus* and related antioxidant activity [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 52(5): 757-762.
- [8] Tran M H, Cao Van T, Nguyen T D, et al. Homoisoflavonoid

- derivatives from the roots of *Ophiopogon japonicus* and their *in vitro* anti-inflammation activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 8(20): 2412-2416.
- [9] De Mey E, De Maere H, Dewulf L, *et al.* Assessment of the N-nitrosopiperidine formation risk from piperine and piperidine contained in spices used as meat product additives [J]. *Eur Food Res Tech*, 2014, 238(3): 477-484.
- [10] Yi F Z, Jin Q I, Zhu D N, *et al.* Homoisoflavonoids from *Ophiopogon japonicus* and its oxygen free radicals (OFRs) scavenging effects [J]. *Chin J Nat Med*, 2008, 6(3): 201-204.
- [11] 张易水, 刘祥忠, 李 华. 麦冬对衰老模型大鼠抗衰老作用的研究 [J]. 深圳中西医结合杂志, 1999, 19(6): 26-27.
- [12] 翟胜利. “道地药材”是保证中药疗效的根源 [J]. 首都医药, 2006(15): 34-37.
- [13] 简美玲, 李 荷, 毛润乾. 麦冬种质资源的研究进展 [J]. 广东药学院学报, 2011, 27(5): 549-551.
- [14] 金 虹, 王化东, 何 礼, 等. 川产麦冬及其须根组织学与麦冬皂苷量的对比研究 [J]. 中草药, 2014, 45(7): 1002-1005.
- [15] 贾 诚, 叶正良, 姜秀晶, 等. HPLC 同时测定麦冬药材中 3 种黄酮类成分的含量 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(15): 1209-1211.