

四川盆地麦冬种质资源 RP-HPLC特征图谱的建立*

刘江, 陈兴福**, 叶茂颖, 邹元锋, 刘卫国

(四川农业大学 农学院, 雅安 625014)

摘要 目的: 建立四川盆地麦冬种质资源的 HPLC 特征图谱。方法: 采用高效液相色谱法, 以槲皮素作为内标参照物, 甲醇-乙腈-0.2% 醋酸水溶液为流动相梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 280 nm, 柱温 30 ℃。结果: 24 批四川盆地麦冬资源共有 36 个特征峰, 32~36 号峰分别被鉴定为甲基麦冬黄酮 A、甲基麦冬黄酮 B、大黄酚、麦冬黄酮 A、麦冬黄酮 B。结论: 所建立的四川盆地麦冬种质资源 RP-HPLC 特征图谱特征性及专属性强, 具有可靠性; 不同产区麦冬资源的化学成分差异较大, 可为其优质资源筛选及质量控制研究提供参考。

关键词: 四川麦冬; 高效液相色谱法; 特征图谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2010)02-0247-06

Establishment of HPLC specific chromatograms on the gempasm resource of *Ophiopogon japonicus* in Sichuan basin*

LU Jiang CHEN Xing-fu**, YE Mao-ying ZOU Yuan-feng LU Wei-guo

(College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract Objective To establish chromatographic specific chromatograms of gempasm resource of *Ophiopogon japonicus* in Sichuan basin **Method** HPLC was applied on a C₁₈ column with methanol-acetonitrile-0.2% acetic acid solution by gradient elution at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and the UV absorbance was monitored at 280 nm, the temperature of C₁₈ column was 30 ℃. Quercetin was used as the internal standard **Result** 36 characteristic peaks in the 24 batches of *Ophiopogon japonicus* of Sichuan basin were picked up. The numbers of 32-36 were methylophiopogonanone A (67.49 min), methylophiopogonanone B (68.36 min), chrysophanol (70.63 min), ophiopogonanone A (73.95 min), ophiopogonanone B (74.51 min). **Conclusion** The HPLC specific chromatograms by this method is reliable, feasible in analysis of *Ophiopogon japonicus* in Sichuan basin. To the samples from different habitats, their content of chemistry composition are great differently, and this method can be able to provide a reference to screening for good quality *Ophiopogon japonicus* gempasm resources and control the quality of *Ophiopogon japonicus*.

Key words *Ophiopogon japonicus* of Sichuan basins; RP-HPLC; specific chromatograms

2005年版中国药典收载的麦冬药材为百合科 (Liliaceae) 沿阶草属 (*Ophiopogon*) 多年生草本植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl 的干燥块根, 其主要分布于我国四川、浙江等地。中医临床上常用于肺燥干咳、虚劳咳嗽、津伤口渴、心烦失眠、内热消渴、肠燥便秘等病症^[1]。本文以槲皮素 (quercetin) 作为内标参照物, 采用高效液相色谱法, 对四川盆地不同产区麦冬资源进行了 HPLC 特征图谱的研究, 建立了麦冬醇提物的指纹图谱分析方法。

实验证明, 该方法简便、准确、重现性好, 结合麦冬药材中共有峰和特征峰的信息, 可以为麦冬的资源筛选、质量评价、规范化生产基地建设和发展地道药材提供参考依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 HPLC-UV: Agilent G1311 四元液相色谱泵, Agilent G1314A 可变波长检测器, Agilent 1101LC 色谱工作站, G1316A 自动进样器在线脱气机。MILLI-Q 型超纯水系统, 电子恒温不锈钢水浴

* 四川省育种攻关项目“特色种质资源收集整理与创新利用”(编号 2006yegg12-12)

** 通讯作者 Tel: (0835) 8563892; E-mail: chenxf64@sohu.com

锅, 索氏提取器, 万分之一电子天平, DHG-9146A 型电热恒温鼓风干燥箱, DZF-6050 真空干燥箱, KQ-400KDE 高功率数控超声波清洗器, 医用循环水真空泵, 有机相针式过滤器 (SCAA-103 13 mm × 0.45 μm), 旋转蒸发仪和实验用万能粉碎机。

1.2 试药 色谱纯乙睛、甲醇、冰乙酸 (Fisher 公司), 分析纯甲醇; 槲皮素对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 10081-200406); 甲基麦冬黄烷酮

A、甲基麦冬黄烷酮 B、麦冬黄烷酮 A、麦冬黄烷酮 B、大黄酚对照品由上海海灿生物科技公司制备。

1.3 试验材料 根据文献资料, 结合麦冬地道产区生态气候特征, 选择资源搜集地区并搜集野生资源。于 2007 年 3 月至 5 月主要从四川丘陵区、盆周山区、川西平原区及重庆地区等地搜集麦冬野生资源 (表 1)。

表 1 麦冬样品来源

Tab 1 Source of the *Ophiopogon japonicus*

序号 (No.)	产区 (source)	序号 (No.)	产区 (source)
1	乐山市市中区 (Shizhong Leshan)	13	乐山市峨眉市 (Emeishan Leshan)
2	乐山市市中区 (Shizhong Leshan)	14	绵阳市三台县 (Santai Mianyang)
3	自贡市市中区 (Shizhong Zigong)	15	绵阳市三台县 (Santai Mianyang)
4	宜宾市长宁县 (Changning Yibin)	16	自贡市富顺县 (Fushun Zigong)
5	宜宾市南溪县 (Nanxi Yibin)	17	广安市武胜县 (Wusheng Guang'an)
6	宜宾市市中区 (Shizhong Yibin)	18	南充市南部县 (Nanbu Nanchong)
7	泸州市市中区 (Shizhong Luzhou)	19	广安市市中区 (Shizhong Guang'an)
8	内江市市中区 (Shizhong Neijiang)	20	巴中市市中区 (Shizhong Bazhong)
9	资阳市简阳市 (Jianyang Ziyang)	21	达州市市中区 (Shizhong Dazhou)
10	资阳市市中区 (Shizhong Ziyang)	22	南充市仪陇县 (Yilong Nanchong)
11	重庆市涪陵区 (Fuling Chongqing)	23	达州市大竹县 (Dazu Dazhou)
12	重庆市涪陵区 (Fuling Chongqing)	24	德阳市旌阳区 (Jingyang Deyang)

注 (note): 14号样品为直立型麦冬, 15号样品为匍匐型麦冬 (the sample of No. 14 is erective plant and the sample of No. 15 is creopy plant)

2 条件与方法

2.1 色谱条件 色谱柱 VP-ODS (250 mm × 4.6 μm, 5 μm); 流动相为溶剂 A: 0.2% 醋酸水溶液, B: 甲醇, C: 乙睛进行梯度洗脱, 梯度程序为: 0~30 min 溶剂 A 100% → 75%, 溶剂 B 0 → 15%; 30~50 min 溶剂 A 75% → 40%, 溶剂 B 15% → 20%; 50~75 min 溶剂 A 40% → 20%, B 20%。流速: 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长: 280 nm, 进样量: 15 μL, 柱温: 30 °C。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取干燥至恒重的槲皮素及其他麦冬黄酮类对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 用色谱纯甲醇定容, 置超声清洗器 (80 kHz) 中混匀, 过 0.45 μm 一次性滤膜, 滤液即为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取药材粉末 (过 60 目筛) 5 g 精密称定, 甲醇索氏提取 8 h, 提取液蒸干, 残渣用甲醇溶解, 用甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 过 0.45 μm 一次性滤膜; 精密量取上述溶液, 以适当比例加入槲皮素对照品溶液, 混匀即得。

2.4 特征图谱的方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液, 连续进样 5 次, 在上述色谱条件下测定、记录, 结果表明, 各色谱峰的相对保留时间和其相对峰面积基本一致, RSD 均小于 3.0%, 符合特征图谱技术要求。

2.4.2 重复性试验 取同一批药材, 按“供试品溶液的制备”项下的方法操作, 在上述色谱条件下进样测定、记录, 结果表明, 各色谱峰的相对保留时间和其相对峰面积基本一致, RSD (n = 6) 均小于 3.0%, 符合特征图谱技术要求。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于第 0, 3, 6, 9, 12 h 在上述色谱条件下进样测定、记录, 结果表明, 各色谱峰的相对保留时间和其相对峰面积基本一致, RSD 均小于 3.0%, 符合特征图谱技术要求。

2.5 数据处理方法 特征图谱相似度评价采用国家药典委员会中药特征图谱相似度评价系统 2004 (A 版); 系统聚类分析等数理统计工作由 SPSS 数据处理系统完成。

3 结果与分析

3.1 特征图谱的建立

3.1.1 主要色谱峰的鉴定及参照峰的选择

分别精密吸取甲基麦冬黄烷酮 A、甲基麦冬黄烷酮 B、麦冬黄烷酮 A、麦冬黄烷酮 B、大黄酚等麦冬黄酮类化学成分与槲皮素的混合对照品溶液及供试品溶液各 15 μL，注入液相色谱仪，在“2.1”项色谱条件下，记录色谱图（详见图 1）。

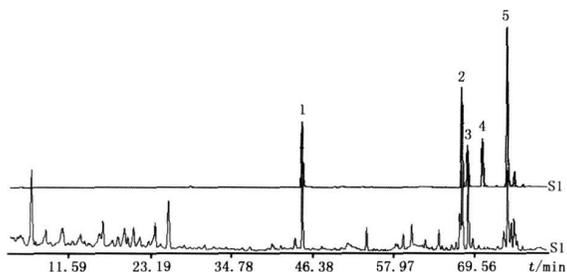


图 1 混合对照品 (S1) 与麦冬药材 + 槲皮素 (S2) 对照图谱

Fig 1 The peaks of mixed reference substances (S1) and the reference fingerprint of *Ophiopogon japonicus* + quercetin (S2)

1. 槲皮素 (quercetin)
2. 甲基麦冬黄烷酮 A (methyl ophiopogonanone A)
3. 甲基麦冬黄烷酮 B (methyl ophiopogonanone B)
4. 大黄酚 (chrysophanol)
5. 麦冬黄烷酮 A (ophiopogonanone A)
6. 麦冬黄烷酮 B (ophiopogonanone B)

由图 1 可知，65 min 以后的 5 个对照品峰的出峰先后顺序为：甲基麦冬黄烷酮 A (67.49 min)、甲基麦冬黄烷酮 B (68.36 min)、大黄酚 (70.63 min)、麦冬黄烷酮 A (73.95 min)、麦冬黄烷酮 B (74.51 min)，并可于样品图谱中 65~75 min 内的 5 个色谱峰一一对应。

对以上 5 个对照品和在供试样品中所对应峰的 MS 谱图分析 (见图 2) 可知，样品中 67.49 min 对应的峰产生 6 个主要的特征性碎片离子 m/z 40, 55, 77, 121, 135, 152；样品中 68.36 min 对应的峰产生 7 个主要的特征性碎片离子 m/z 41, 64, 81, 107, 135, 151, 173；样品中 70.63 min 对应的峰产生 6 个主要的特征性碎片离子 m/z 57, 71, 95, 105, 226, 254；样品中 73.95 min 对应的峰产生 5 个主要的特征性碎片离子 m/z 40, 55, 77, 121, 135；样品中 74.51 min 对应的峰产生 7 个主要的特征性碎片离子 m/z 41, 64, 81, 107, 135, 151, 173。参考相关文献并配合离子扫描数据，验证了样品中这 5 个特征成分分别为：甲基麦冬黄烷酮 A、甲基麦冬黄烷酮 B、大黄酚、麦冬黄烷酮 A、麦冬黄烷酮 B。

从图 1 中还可以看出，这 4 个特征峰在麦冬图谱中分离度较差，且峰位偏后，不利于准确定位；而

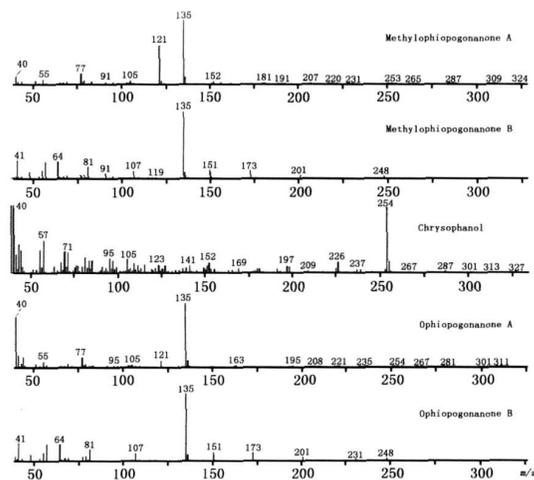


图 2 麦冬 5 个特征峰质谱图

Fig 2 The mass spectra of the five characteristic peaks of *Ophiopogon japonicus*

以槲皮素 (44.44 min) 为内标参照物测定，在相同的色谱条件下，槲皮素与麦冬药材中各成分有较好的分离，且峰位居中，因此，采用以槲皮素作为内标参照物的内标法进行测定。

3.1.2 共有指纹峰的标定及特征图谱的建立

按“2.1”项下条件测定 24 批样品的色谱图，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，结果有 36 个峰是所有样品共有的峰，综合共有峰和对照峰的信息，确定了四川盆地麦冬种质资源的特征图谱 (图 3)。

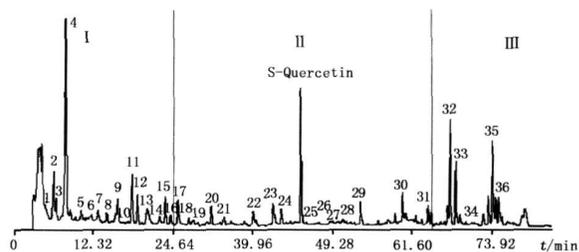


图 3 四川盆地麦冬种质资源标准 HPLC 特征图谱

Fig 3 The HPLC standard specific chromatograms of *Ophiopogon japonicus* in Sichuan basin

整个图谱可分为 3 个部分：保留时间 3~25 min 出现 16 个色谱峰，其主要特征峰 2, 4, 7, 9, 11, 12, 14, 16 在此区域；保留时间 25~65 min 出现 15 个色谱峰，其主要特征峰 17, 23, 29, 30, 31 及内标物槲皮素 (44.43 min) 在此区域；保留时间 65~85 min 出现 5 个色谱峰，其主要色谱峰甲基麦冬黄烷酮 A (67.49 min)、甲基麦冬黄烷酮 B (68.36 min)、大黄酚 (70.63 min)、麦冬黄烷酮 A (73.95 min)、麦

冬黄烷酮 B (74.51 min) 在此区域。

3.2 各产区药材特征图谱相似度评价

3.2.1 共有特征峰相对峰面积及相对保留时间分析

根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求

(暂行)》^[2], 以参照峰 (S) 的相对保留时间和相对峰面积为 1, 计算 24 批四川盆地麦冬种质资源特征图谱中 36 个共有特征峰的相对保留时间和相对峰面积, 并计算其 RSD (表 2)。

表 2 四川盆地麦冬种质资源共有峰指纹谱

Tab 2 The parameters of common peaks of *Ophiopogon japonicus* in Sichuan Basin

峰号 (No)	保留时间 (retention time)	相对保留时间 (relative retention time)	峰面积 (peak area)	相对峰面积 (relative peak area)	RSD %	
					保留时间 (retention time)	峰面积 (peak area)
1	4.26	0.1	153.52	0.14	0.65	53.0
2	6.32	0.14	1020.93	0.96	0.24	51.1
3	6.78	0.15	42.02	0.04	0.64	70.8
4	8.23	0.19	193.80	0.18	0.28	81.6
5	11.36	0.26	95.97	0.09	0.15	85.0
6	11.98	0.27	118.53	0.11	0.31	57.8
7	13.11	0.3	352.76	0.24	0.20	55.4
8	13.65	0.31	61.97	0.06	0.47	84.0
9	16.26	0.37	199.52	0.19	0.25	78.7
10	17.61	0.4	109.97	0.10	0.21	78.1
11	18.38	0.41	201.92	0.19	0.32	46.5
12	19.28	0.43	264.44	0.25	0.42	99.5
13	19.76	0.44	117.07	0.11	0.11	50.0
14	20.58	0.46	192.33	0.18	0.17	72.4
15	22.68	0.51	149.06	0.14	0.21	50.7
16	23.6	0.53	218.63	0.21	0.15	94.6
17	25.52	0.57	511.72	0.48	0.16	50.5
18	27.7	0.62	45.43	0.04	0.10	67.2
19	28.51	0.64	37.26	0.04	0.08	70.9
20	30.58	0.69	66.43	0.06	0.27	73.1
21	32.64	0.73	39.34	0.04	0.10	54.5
22	37.01	0.83	37.98	0.04	0.17	72.5
23	40.25	0.91	167.24	0.16	0.18	40.0
24	43.39	0.98	101.71	0.10	0.04	49.9
S	44.43	1	1063.32	1.00	0.00	0.83
25	47.21	1.06	50.54	0.05	0.14	81.7
26	49.07	1.1	43.76	0.04	0.02	37.8
27	49.97	1.12	48.77	0.05	0.03	35.7
28	50.92	1.15	92.22	0.09	0.05	51.6
29	52.48	1.18	26.57	0.02	0.12	50.9
30	59.6	1.34	45.66	0.04	0.12	56.3
31	62.15	1.4	96.08	0.09	0.06	69.9
32	67.49	1.52	801.15	0.75	0.03	63.4
33	68.36	1.54	498.59	0.47	0.03	79.3
34	70.63	1.63	75.93	0.07	0.05	44.3
35	73.95	1.67	667.88	0.63	0.08	71.6
36	74.51	1.72	34.77	0.03	0.05	95.2

3.2.2 相似度评价 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) 对上述批次麦冬的指纹图谱进行了相似度分析, 以麦冬道地产区

绵阳三台所产的 14 号样品为参照图谱, 以相关系数 (中位数) 代表其相似度, 确定比较窗口范围值为 1%, 得 24 批四川盆地麦冬种质资源的相似度分别

为: 0.907, 0.944, 0.952, 0.935, 0.900, 0.945, 0.904, 0.928, 0.911, 0.909, 0.923, 0.903, 0.918, 0.946, 0.906, 0.906, 0.900, 0.928, 0.943, 0.905, 0.901, 0.934, 0.951, 0.931, 其 HPLC 指纹图谱叠加图如图 4 所示。由表 2 可知, 24 批不同产区野生麦冬资源间, 其 36 个共有峰保留时间的 RSD 均小于 3%, 各批次麦冬样品特征图谱与系统程序生成的对照特征图谱间的相似度均达到 90% 以上, 未发现离群样本, 同时, 以槲皮素峰面积为参照指标, 其峰面积的 RSD 为 0.83%, 说明该方法测定的结果准确、精密度高、重现性好, 所制定的川麦冬指纹图谱具有可靠性, 符合国家食品药品监督管理局对中药指纹图谱相似度的要求。

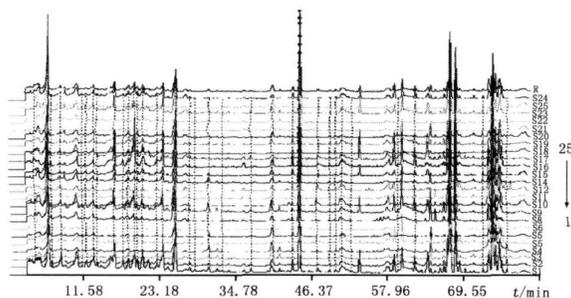


图 4 24 批四川盆地麦冬种质资源 HPLC 指纹图谱叠加图
Fig 4 The matched chromatograms of 24 patches of *Ophiopogon japonicus* in Sichuan basin
1~ 24. 样品 (samples) 25 对照品 (reference substance)

3.2.3 系统聚类分析 根据不同资源麦冬样品的相对峰面积信息, 采用欧式距离, 组间联接聚类法对 24 个麦冬资源样品进行系统聚类分析 (详见图 5), 由图 5 可知, 当临界值 $T > 5$ 时, 24 个麦冬样品被分为 2 大类, 其中, 来自道地产区绵阳三台县的不同株型麦冬 14 和 15 号样品被划为一类, 其余样品被划为另一类; 当临界值 $T < 5$ 时, 第二大类继续被划分为若干小类, 其中可以比较明显地看出 1, 16, 9, 22 号样品被划为性质相近的一类, 11, 5, 10, 12 号样品被划为另外一类, 其余性质相近的 14 个样品被划为一类。

4 讨论

本试验搜集了四川盆地不同产区野生麦冬资源, 建立了四川盆地麦冬种质资源甲醇提取部位的 HPLC 特征图谱, 标定了甲基麦冬黄烷酮 A、甲基麦冬黄烷酮 B、大黄酚、麦冬黄烷酮 A、麦冬黄烷酮 B 等 5 种麦冬黄酮类成分, 反映了四川盆地麦冬种质资源的化学成分及其相对含量的比例, 既可用于定性鉴别, 也可用于定量分析, 亦为科学客观地鉴定、

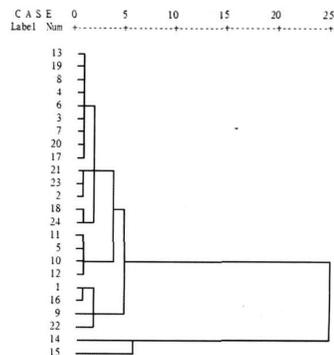


图 5 麦冬种质资源 HPLC 图谱信息聚类分析图
Fig 5 Results of the hierarchical clustering analysis of HPLC information for the samples of *Ophiopogon japonicus* 1~ 24 样品 (samples)

评价、控制川产麦冬质量提供了一定参考。

从药材整体色谱图入手, 选取特征峰, 并大致判断其峰位和比例关系, 构成该药材特有的色谱指纹图谱全貌, 可以为药材质量的分析与控制提供可靠的依据, 这比以单一化学对照品作为鉴别标准全面得多。24 批不同产区野生麦冬资源间, 其峰群的整体面貌基本一致, 但共有峰峰面积的 RSD 均较大 (35.69% ~ 99.50%), 说明四川盆地不同产区麦冬种质资源丰富, 由于产地的不同, 各成分含量的相对比值有所不同, 为鉴别区分不同来源的药材提供了科学的依据, 亦可从中筛选优质野生麦冬资源, 为麦冬质量控制及种植、开发利用提供参考。

国家药典委员会推荐使用的中药指纹图谱相似度评价软件, 其原理采用夹角余弦作为相似度的评价指标, 能准确地反映中药化学成分分布比例的相似性而不具有任何定量评价功能, 其受大指纹峰影响严重, 存在大峰严重掩盖小峰缺陷无定量评价功能; 应用 SPSS 软件, 对样品色谱图中特征峰信息采用相对峰面积矩阵进行定量分析, 能够从宏观上准确地反映中药多元指纹化学成分整体含量情况, 解决不同样品的化学成分总体含量差异的评判问题。本试验在使用中药色谱指纹图谱相似度评价软件作相似度评价分析的同时, 结合使用 SPSS 软件作聚类分析, 不仅仅对样品进行了定性评价, 而且进行了定量分析, 阐述全定性相似度和全定量相似度质控体系是利用色谱指纹图谱技术控制中药和植物药质量的切合实际的合理方法^[3]。

根据川产道地麦冬的外观株型可将其分为直立型和匍匐型两类, 现在, 在道地产区实际生产中, 由于直立型麦冬便于栽培且颗粒较大、外观品质较优,

药农大多选择直立型麦冬作为栽培品种, 试验以麦冬道地产区绵阳三台所产的直立型麦冬样品(S14)为参照图谱计算相似度, 由聚类分析图可以看出, 2个不同株型麦冬样品被划为性质最接近的一类, 这说明, 不同株型麦冬的化学成分基本一致, 其也在一定程度上验证了聚类分析的可靠性。

试验对索氏提取法、超声波振荡法、热回流提取法3种方法进行了考察, 结果发现, 索氏提取法所得图谱的色谱峰最多、峰形最好; 在对供试品溶液进行指纹图谱条件探索时, 参考了陈有根^[4]等测定麦冬块根黄酮类成分, 考察了298、280、305 nm等不同波长下的色谱图, 发现, 在280 nm检测波长下检测色谱峰最多, 麦冬中高异黄酮类成分在此波长下多有最大吸收, 分离度可以达到指纹图谱要求, 因此选择280 nm为检测波长。

在本试验中, 采用了内标法进行图谱定位测定, 该方法具有色谱条件对结果影响不大, 准确度、精度较高等优点, 但是其对加入的内标物质的分离要求更高, 即它应该与其他色谱峰有较好的分离, 且出峰的位置不能靠前, 也不能靠后, 而应居中, 因为在色谱分析的整个过程中, 尽管所有的条件都是受控的, 但难免会有波动, 如果参照峰太靠前或太偏后, 则会降低试验的精度, 也即影响相对保留值的精度。采

用峰位居中的参照峰可以减少波动性而增加相对保留值的可比性^[5]。本试验以同为黄酮类成分的槲皮素作为内标参照物, 其峰位居中、分离度好, 且来源稳定(由中国药品生物制品检定所提供), 此方法简便、准确、重现性好, 较外标法具有更大的优势。

参考文献

- 1 ChP (中国药典). 2005. Vol I (一部): 106
- 2 Technical Requirements of Traditional Chinese Medicine Injection Fingerprint (provisional) [国家药品监督管理局中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)]. 2000 7
- 3 SUN Guo-xiang(孙国祥), SONG Yang(宋杨). Quality control system of overall qualitative similarities and overall quantitative similarities of chromatographic fingerprints(色谱指纹图谱全定性相似度和全定量相似度质控体系研究). *Cent South Pharm* (中南药学), 2007, 5(3): 263
- 4 CHEN You-gen(陈有根), DAI Jun-dong(戴俊东). Determination of methylphenanthrone A and B in Radix Ophiopogonis and its extracts by HPLC(麦冬药材及其提取物中甲基麦冬黄酮 A 和 B 的 HPLC 法测定). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2007, 38(11): 1640
- 5 HONG Xiao-kun(洪筱坤), WANG Zhi-hua(王智华). Chromatographic digitized Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (中药数字化色谱指纹谱). Shanghai(上海): Shanghai Science and Technology Publishers(上海科学技术出版社), 2003. 70

(本文于 2009 年 3 月 26 日收到)