

短葶山麦冬药材定性与定量分析方法研究

张萍¹, 张南平¹, 汗克孜², 程显隆¹, 肖新月¹, 林瑞超¹

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 新疆喀什地区药品检验所, 喀什 844000)

摘要 目的: 建立短葶山麦冬药材主要药用成分的定性与定量分析方法。方法: 采用薄层色谱法对短葶山麦冬药材中甾体皂苷类成分进行定性鉴别; 采用紫外-可见分光光度法对短葶山麦冬药材中多糖成分进行含量测定, 以苯酚-硫酸显色, 在 490 nm 的波长处测定吸收度。结果: 应用所建立的方法对 14 批药材进行定性与定量分析, 结果在 TLC 图谱中均可检出短葶山麦冬药材的特征斑点; 14 批样品多糖含量测定结果以无水葡萄糖计为 6.34% ~ 13.69%。结论: 本方法操作简便, 重复性好, 结果准确可靠, 可用于该药材的定性与定量分析。

关键词: 短葶山麦冬; 薄层色谱法; 紫外-可见分光光度法; 山麦冬多糖; 甾体皂苷

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)01-0035-04

Studies on the quality and quantity analysis methods of *Liriope muscari*(Decne.) Bailly

ZHANG Ping¹, ZHANG Nan-ping¹, HAN Ke-zhi², CHENG Xian-long¹,
XIAO Xin-yue¹, LIN Rui-chao¹

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

(2. Xinjiang Kashi Institute for Drug Control, Kashi 844000, China)

Abstract Objective To establish the quality and quantity analysis methods of *Liriope muscari* (Decne.) Bailly. **Method** With TLC to identify steroid glycoside of *Liriope muscari* (Decne.) Bailly; Ultraviolet spectrophotometry and colourimetry was used to determine polysaccharide contents of *Liriope muscari* (Decne.) Bailly, and the detected wavelength was 490 nm. **Result** 14 samples were determined by the new method. The characteristic spots of *Liriope muscari* (Decne.) Bailly could be easily examined by TLC. The polysaccharide contents of *Liriope muscari* (Decne.) Bailly were 6.34% - 13.69%. **Conclusion** These methods are simple, accurate and can be used for the quality and quantity analysis of *Liriope muscari* (Decne.) Bailly.

Key words *Liriope muscari* (Decne.) Bailly; TLC; ultraviolet spectrophotometry and colourimetry; polysaccharides of *Liriope muscari* (Decne.) Bailly; steroid glycosides

短葶山麦冬为百合科植物山麦冬属短葶山麦冬 *Liriope muscari*(Decne.) Bailly 的干燥块根, 具有养阴生津、润肺清心的功效。短葶山麦冬主产于福建泉州、惠安、仙游等地, 多为栽培品^[1], 收载于中国药典 2005 年版一部“山麦冬”项下, 标准中收载有性状、显微鉴别、浸出物等检测项目, 缺乏具体的定性及定量检测指标。

据报道^[2,3], 短葶山麦冬药材中含有甾体皂苷类、多糖类等成分, 有改善心血管、免疫调节、呼吸系统调节的功能, 可降低血糖、抗肿瘤、抗炎、抗心律失常

常及抗疲劳等, 而麦冬总多糖具有较强的抗心肌缺血、降血糖、耐缺氧、增强免疫、抗过敏及保护胃肠道等作用, 是其活性成分之一^[4,5]。为此, 本文研究建立短葶山麦冬药材中甾体皂苷类成分定性鉴别方法, 同时对其所含的多糖类成分进行定量分析。

1 仪器与试剂

Agilent 8453 紫外-可见分光光度仪, Mettler AE240 电子天平, SB 3200 Branson 超声仪 (上海必能信超声有限公司, 220 V, 50 kHz)。

D - 无水葡萄糖对照品 (批号: 110833 -

200302 含量测定用, 中国药品生物制品检定所), 对照药材麦冬 (批号: 121013-200607) 及湖北麦冬 (批号: 121136-200302) 均由中国药品生物制品检定所提供。

正丁醇、甲醇、乙酸乙酯、冰醋酸、无水乙醇、苯酚、硫酸等均为分析纯, MilliQ 超纯水。

样品均由福建泉州东南中药材种植有限公司提供, 经中国药品生物制品检定所张南平副主任药师鉴定为短葶山麦冬 *Liriope muscari* (Decne.) Baily 的干燥块根。

2 甾体皂苷类薄层色谱鉴别

参照文献 [6], 对短葶山麦冬药材中的甾体皂苷类成分进行薄层色谱分析, 同时用对照药材麦冬 (*Radix Ophiopogonis*) 和湖北麦冬 (*Radix Liriope*) 为对照进行了比较实验, 发现短葶山麦冬药材薄层色谱与麦冬对照药材和湖北麦冬对照药材的薄层色谱有差异, 短葶山麦冬有其特征斑点, 此法的专属性较强。

2.1 供试品溶液的制备 取本品粉末 (过 4 号筛) 1 g 加正丁醇 20 mL, 摇匀, 放置过夜, 超声 (220 V, 50 kHz) 处理 30 min, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 2 mL 使溶解, 即得。

2.2 对照药材溶液制备 取对照药材麦冬、湖北麦冬粉末各 1 g 分别按“2.1”项下方法操作, 即得麦冬对照药材溶液和湖北麦冬对照药材溶液。

2.3 薄层色谱条件 照薄层色谱法 (中国药典 2005 年版一部附录 VI B) 试验, 吸取供试品溶液及麦冬对照药材和湖北麦冬对照药材溶液各 10 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板 (青岛海洋化工厂) 上, 以正丁醇-乙酸乙酯-水 (4:1:5) 上层液为展开剂, 展开至 10 cm, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 加热至斑点显色清晰。置日光下检视, 结果在样品色谱中, 在与麦冬对照药材和湖北麦冬对照药材色谱相应的位置上, 未显相同颜色的斑点; 置紫外光灯 (365 nm) 下检视, 结果在样品色谱中, 在与麦冬对照药材及湖北麦冬对照药材色谱相应的位置上, 也未显相同颜色的荧光斑点。样品色谱中, 在 R_f 值为 0.45 处有 1 个深绿色斑点, 而麦冬对照药材和湖北麦冬对照药材的色谱相应位置上没有此斑点, 见图 1。

3 短葶山麦冬多糖含量测定

3.1 对照品溶液的制备 精密称取 105 $^{\circ}$ C 干燥至恒重的无水葡萄糖对照品 10 mg 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液

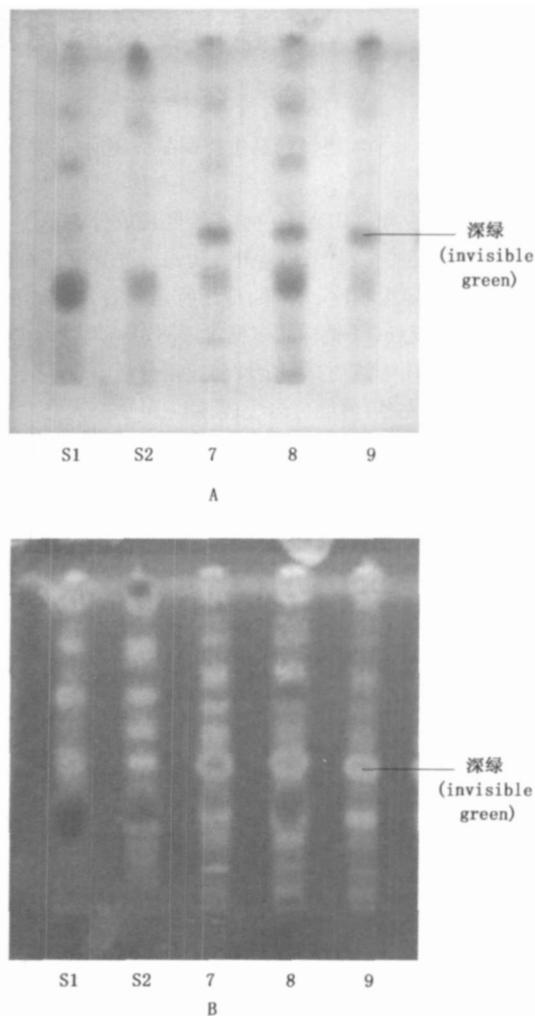


图 1 在可见光下检视 (A) 及在紫外光灯 365 nm 下检视 (B) 的短葶山麦冬药材薄层色谱图

Fig 1 TLC chromatograms of *Liriope muscari* (Decne.) Baily detected by vis (A) and by UV 365 nm (B)

S1. 麦冬对照药材 (*Radix Ophiopogonis* reference drug) S2. 湖北麦冬对照药材 (*Radix Liriope* reference drug) 7~9. 7~9 号样品 (samples No. 7~9)

(每 1 mL 中含无水葡萄糖 0.1 mg)。

3.2 测定法 取本品粗粉约 0.2 g 精密称定, 加入 80% 乙醇溶液 100 mL, 加热回流 1 h 趁热滤过, 滤渣与滤器用 80% 乙醇溶液 30 mL 分次洗涤, 滤渣连同滤纸一并移入烧瓶中, 加水 80 mL, 加热回流 2 h 趁热滤过, 用少量热水洗涤滤器, 合并滤液与洗液, 放冷, 移入 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。精密量取 0.3 mL, 置具塞试管中, 加水至 2.0 mL, 摇匀, 精密加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 摇匀, 迅速加入浓硫酸 5.0 mL, 摇匀, 于 40 $^{\circ}$ C 水浴中保持 25 min 取出后迅速冷却至室温。以相应的试剂为空白, 照紫外-可见分光光度法 (中国药典 2005 年版一部附录 V A), 在 490 nm 的波长处测

定吸收度,从标准曲线上读出供试品溶液中葡萄糖的浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),以 $\frac{8 \times C}{3 \times W} \times 100\%$ (C : 测定样品浓度, $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; W : 样品重量, g) 计算样品中山麦冬多糖的含量。

3.3 方法学验证

3.3.1 线性关系考察 精密量取对照品溶液 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 mL, 分别置具塞试管中, 加水至 2.0 mL, 摇匀, 按“3.2”项下方法自“精密加入 5% 苯酚溶液 1 mL”起操作, 测定吸收度。以吸收度为纵坐标, 浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 绘制标准曲线, 得到线性方程为:

$$Y = 6.825X - 0.0029 \quad r = 0.9998$$

3.3.2 重复性试验 分别取 9 号样品 6 份, 按“3.2”项下方法操作, 测得样品中山麦冬多糖平均含量 ($n = 6$) 为 8.9%, RSD 为 5.0%。

3.3.3 精密度试验 取 9 号样品 1 份, 按“3.2”项下方法操作 6 次, 测定吸收度, 计算其 RSD ($n = 6$) 为 1.4%。

3.3.4 加样回收试验 分别取“3.3.2”项下制备的供试品溶液 6 份各 0.15 mL, 分别加入每 1 mL 含无水葡萄糖 0.05 mg 的溶液 0.5 mL, 加水至 2 mL, 摇匀, 按“3.2”项下方法自“精密加入 5% 苯酚溶液 1 mL”起操作, 从标准曲线上读出供试品溶液中葡萄糖的浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 并计算回收率 ($n = 6$) 为 100.7%, RSD 为 3.7%。

4 样品含量测定

按“3.2”项下方法测定了 14 批样品中山麦冬多糖的含量。每批样品平行制备 2 份供试品溶液, 每份平行显色 2 次, 结果见表 1。

5 讨论

5.1 薄层色谱鉴别 曾采用乙酸乙酯-甲醇-冰醋酸 (8:2:5:1)、甲苯-甲醇-冰醋酸 (8:5:0.1) 作展开剂展开, 主要斑点展开效果均不好, 换用正丁醇-醋酸乙酯-水 (4:1:5) 上层液^[6]作展开剂, 展开效果较好, 并且可以有效地鉴别短葶山麦冬、麦冬及湖北麦冬药材, 该方法操作简便, 重复性好, 结果准确可靠。

5.2 特征斑点初步确证 由短葶山麦冬药材的 TLC 图谱可见, 在 R_f 值为 0.45 处有 1 个深绿色斑点。经大量制备, 在薄层板上条带点样, 展开, 刮取 R_f 值为 0.45 相应位置处的硅胶粉末, 甲醇洗脱得到甲醇溶液, 经 HPLC-MS/MS 初步确证, 推测此斑点化学成分可能为 Lm-3, 即 ruscogenin-1-O-

表 1 山麦冬多糖含量测定结果 ($n = 4$)

Tab 1 Contents of polysaccharides of *Liriope muscari* (Decne.) Bailey

来源 (resource)	样品编号 (sample No.)	含量 (content) %	RSD %
泉州 (Quanzhou)	1	11.60	0.8
	2	11.12	1.7
	3	6.34	3.8
	4	9.84	4.2
	5	10.11	0.2
	6	8.70	1.4
	7	8.81	2.8
	8	11.90	1.5
	9	13.69	1.4
莆田 (Putian)	10	9.84	5.2
	11	8.22	3.7
	12	9.72	3.5
	13	9.54	7.6
	14	11.74	6.7

[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)] [β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-fucopyranoside 该化学成分为短葶山麦冬药材所特有, 进一步的结构确证及裂解规律验证尚在进行中。

5.3 麦冬多糖含量测定方法的确定 本文参照文献 [7], 建立了紫外-可见分光光度法测定山麦冬多糖含量的方法。由紫外光谱图可见山麦冬多糖溶液在 490 nm 处有最大吸收 (见图 2), 故紫外测定波长选定为 490 nm。苯酚-硫酸比色法和蒽酮-硫酸比色法是测定多糖含量的 2 种经典方法, 据文献报道均能得到理想的结果^[8], 但由于苯酚相对价廉, 且重蒸馏苯酚液配制后置于冰箱 (5℃) 中保存, 一般不会影响测定结果^[9], 因此本文以苯酚-硫酸显色, 采用紫外-可见分光光度法在 490 nm 处对短葶山麦冬药材中多糖成分进行测定。

5.4 样品用量的确定 本实验曾采用 2 g 样品提取多糖类成分, 定容至 100 mL 量瓶中, 发现滤过较为困难, 滤液浑浊, 再精密吸取 1 mL 置 50 mL 量瓶中测定, 测得的吸收度值偏低, 经反复摸索最终确定样品取样量定为 0.2 g 较为合理。

5.5 小结 由表 1 可以看出, 收集到的来自福建省泉州及莆田两地的 14 批短葶山麦冬样品中多糖含量 (以无水葡萄糖计) 为 6.34% ~ 13.69%, 2 个产地的样品中山麦冬多糖的含量差异不显著。3 号样品含量较低, 从药材外观性状看, 3 号样品表面为深灰黄色, 多干瘪, 具不规则粗纵纹, 认为药材质量较

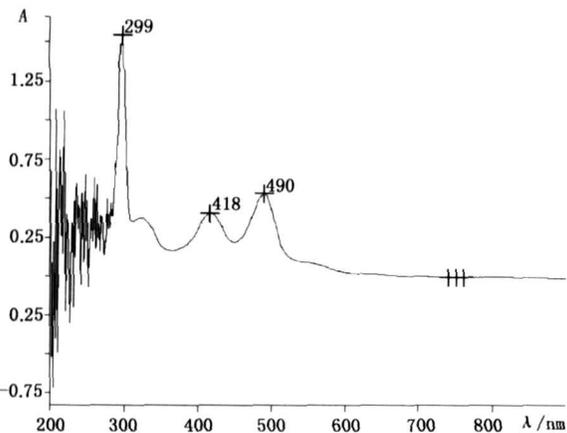


图 2 短葶山麦冬光谱图

Fig 2 Spectrogram of Radix Liriope

差。根据其他 13 批样品的含量结果, 建议短葶山麦冬药材多糖含量暂定为以无水葡萄糖计, 不得少于 7.0%。按中国药典 2005 年版一部“山麦冬”项下浸出物的测定方法测定出本文 14 批样品中水溶性浸出物的含量为 91.1% ~ 94.5%, 远远高于标准中规定的不得少于 75.0% 范围, 说明短葶山麦冬药材的糖类成分含量较高, 其临床疗效得到越来越广泛的关注, 在福建当地民间多用短葶山麦冬泡水服用, 以滋阴润肺, 且效果明显, 因此该类成分值得进一步研究。

参考文献

1 XU Guo-jun(徐国钧), XU Luo-shan(徐珞珊). Species Systematization and Quality Evaluation of Commonly Used Chinese Traditional Drugs(常用中药材品种整理和质量研究). South-China Edition

Voll (南方协作组 第一册). Fujian(福建): Fujian Science and Technology Publishing House(福建科学技术出版社), 1994: 56

2 YU Bo-yang(余伯阳), XU Guo-jun(徐国钧). Studies on resource utilization of Chinese drug *Ophiopogon japonicus*(中药麦冬的资源利用研究). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 1995, 26(4): 205

3 JIANG Tao(姜涛), QIN Lu-ping(秦路平). Research on the chemical constituents and pharmacological activities of *Liriope Lour* (山麦冬属植物化学成分和药理活性研究). *J Chin Integr Med* (中西医结合学报), 2007, 5(4): 465

4 XU De-sheng(徐德生), FENG Yi(冯怡), ZHOU Yue-hua(周跃华), *et al*. Active components of polysaccharide of *Ophiopogon japonicus* on acute myocardial ischemia(麦冬多糖中抗急性心肌缺血部位研究). *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2004, 26(10): 832

5 QI Jian-hong(齐建红), TAO Gui-rong(陶贵荣), GUO Xin-jun(郭新军), *et al*. Research progress of biological activities of *Ophiopogon japonicus* polysaccharides(麦冬多糖的生物活性研究进展). *J Xi'an Univ Arts Sci(Nat Sci Ed)* (西安文理学院学报 自然科学版), 2008, 11(1): 44

6 ZHANG Li-yan(张砾岩), PAN Rong(潘蓉). Identification of Radix *Ophiopogon* and Radix *Liriope* by TLC and UV(麦冬与山麦冬的薄层色谱及紫外光谱鉴别). *J Xinjiang Tradit Chin Med* (新疆中医药), 2006, 24(4): 56

7 ChP(中国药典). 2005. Vol I (一部): 174

8 TANG Jun(汤军), HUANG Qi(黄琦), XU Zhi-ying(徐志瑛). Extraction and analysis of polysaccharides of Radix *Liriope*(麦冬多糖的提取分离与初步分析). *J Zhejiang Tradit Chin Med Coll* (浙江中医学院学报), 1999, 23(1): 59

9 CHEN Fang(陈芳), ZHOU L-yan(周侣艳). Investigation of stability of phenol standard solution(苯酚标准溶液的稳定性探讨). *Environ Res Monit* (环境研究与监测), 2004, 17(3): 24

(本文于 2007 年 12 月 12 日收到)