

浙麦冬黄酮类成分指纹图谱及 2 种黄酮类化合物的含量测定

朱海花¹, 祝明^{2*}, 蒋慧莲³, 陈勇²

(1. 浙江中医药大学, 杭州 310053; 2. 浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052;
3. 芜湖市中医医院, 安徽 芜湖 241000)

[摘要] 目的:建立浙麦冬黄酮类成分的 HPLC 指纹图谱,并同时测定甲基麦冬二氢高异黄酮 A 和甲基麦冬二氢高异黄酮 B 的含量,为浙麦冬药材的质量控制提供依据。方法:采用 Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液(58:42),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃。结果:建立了浙麦冬黄酮类成分的 HPLC 指纹图谱,检出共有峰 7 个,各批次药材的相似度均 >0.9;通过 HPLC-MS 分析和对照品比对,确定了 1 号峰和 2 号峰分别为甲基麦冬二氢高异黄酮 A 和甲基麦冬二氢高异黄酮 B,并对其进行定量分析,结果浙麦冬中甲基麦冬二氢高异黄酮 A 的线性范围 31.47 ~ 786.8 ng,平均回收率 101.5%,甲基麦冬二氢高异黄酮 B 的线性范围 53.05 ~ 1 326.25 ng,平均回收率 103.0%。结论:HPLC 指纹图谱方法与含量测定方法简便,结果准确,重复性好,可作为浙麦冬的质量控制方法。

[关键词] 浙麦冬; 甲基麦冬二氢高异黄酮 A; 甲基麦冬二氢高异黄酮 B; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)07-0085-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016070085

HPLC Fingerprints of Flavonoids in *Ophiopogonis Radix* of Zhejiang and Quantitative Analysis of Two Moisoflavonoids

ZHU Hai-hua¹, ZHU Ming^{2*}, JIANG Hui-lian³, CHEN Yong²

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;
2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China;
3. Wuhu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhu 241000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprints of flavonoids in *Ophiopogonis Radix* of Zhejiang and simultaneously determine the contents of methylophiopogonanone A and methylophiopogonanone B. **Method:** The chromatographic method was carried out on Kromasil 100-5 C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) using acetonitrile-0.1% phosphoric acid (58:42) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹; and the column temperature was 30 ℃. **Result:** The HPLC fingerprints of *Ophiopogonis Radix* of Zhejiang were established and 7 common peaks were defined in the HPLC fingerprints. The similarity among different batches was above 0.9. By HPLC-MS analysis and comparison with standard reference substance, No. 1 peak was determined as methylophiopogonanone A and No. 2 peak was determined as methylophiopogonanone B. In the quantitative analysis of these two compounds, we found that the linear range was 31.47-786.8 ng for methylophiopogonanone A ($R^2 = 1.0000$) and 53.05-1 326.25 ng for methylophiopogonanone B ($R^2 = 1.0000$), and the average recovery rate ($n = 6$) was 101.5% for methylophiopogonanone A and 103.0% for methylophiopogonanone B. **Conclusion:** The HPLC fingerprint method and content determination method are simple, accurate with good reproducibility, and can be applied in the quality control of *Ophiopogonis Radix* of Zhejiang.

[收稿日期] 20150813(020)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2014ZX09304307-002)

[第一作者] 朱海花,在读硕士,从事中药质量评价及新药开发研究, Tel:0571-86459414, E-mail:1182709954@qq.com

[通讯作者] *祝明,主任中药师,从事中药有效成分及质量控制研究, Tel:0571-86734991, E-mail:zhumingd@hotmail.com

[Key words] *Ophiopogonis Radix* of Zhejiang; methylophiopogonanone A; methylophiopogonanone B; HPLC fingerprint

麦冬^[1]依据产地不同分为浙麦冬和川麦冬,具有养阴生津,润肺清心的功效。用于肺燥干咳,阴虚癆嗽,喉痹咽痛,津伤口渴,内热消渴,心烦失眠,肠燥便秘。浙麦冬与川麦冬在生长年限上有较大不同,浙麦冬为生长三到四年后采挖,而川麦冬为生长一年后采挖,传统上认为浙麦冬质量较佳,为麦冬的道地药材,也是著名的“浙八味”之一。现代研究表明二者在成分上有较大区别^[2-3],经查阅文献,现有的关于麦冬质量评价多为针对川麦冬^[4-6],而针对浙麦冬的研究报道则较少。目前麦冬收载于 2015 年版《中国药典》,只对麦冬中总皂苷进行了含量测定,而现代研究发现黄酮类成分具有抗氧化、抗肿瘤和心肌保护的作用等^[7-8],是麦冬主要活性成分之一。为使道地药材浙麦冬的质量得到更好控制和持续发展,笔者选取了浙麦冬样品 10 批,针对浙麦冬的黄酮类成分进行指纹图谱研究,并同时测定其中含量较高的甲基麦冬二氢高异黄酮 A 和甲基麦冬二氢高异黄酮 B 的含量,为浙麦冬药材的全面质量控制与道地药材的发展提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 LC20AT 型高效液相色谱仪(DGU-20AS 型在线脱气机, SIL-10AT 型自动进样器, SPD-M20A 型二极管阵列检测器, CTO-20AT 型柱温箱, LC Solution 色谱工作站, 日本岛津), AG-285 型电子天平(Mettler Toledo 公司), USC-802 型超声波清洗器(上海波龙), Milli Q Advantage A10 型超纯水仪(Millipore 公司)。

1.2 试药 甲基麦冬二氢高异黄酮 A(批号, 纯度 > 99%), 甲基麦冬二氢高异黄酮 B(批号, 纯度 > 99%), 均购于四川维克奇公司。甲醇、乙腈色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为杭州娃哈哈桶装纯净水。

浙麦冬药材 10 批, 由浙江正大青春宝有限公司提供, 产地浙江慈溪, 经浙江省食品药品检验研究院郭增喜主任中药师鉴定为百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* 的干燥块根, 并符合 2015 年版《中国药典》一部麦冬项下有关规定。

2 方法与结果

2.1 浙麦冬指纹图谱的建立

2.1.1 对照品溶液的制备 分别精密称取甲基麦冬二氢高异黄酮 A 及甲基麦冬二氢高异黄酮 B 对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 31.47, 53.05 μg

的混合对照品溶液, 即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 取麦冬样品适量, 粉碎后过 3 号筛, 取约 3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入乙醇 25 mL, 水浴回流 60 min, 冷却, 过滤, 取续滤液, 即得。

2.1.3 色谱条件 Kromasil 100-5 C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液(58:42), 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积 10 μL , 检测波长 280 nm。

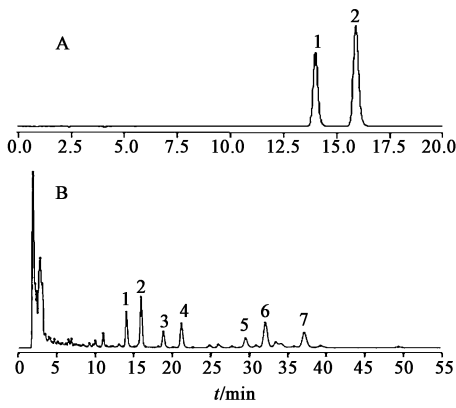
2.1.4 精密度试验 取同一供试品溶液, 按 2.1.3 项下色谱条件, 重复进样 6 次, 记录色谱图, 以甲基麦冬二氢高异黄酮 B 为参照峰, 计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.1%, 相对峰面积的 RSD 均 < 3.2%, 表明本方法精密度较好。

2.1.5 稳定性试验 取同一供试品溶液, 按 2.1.3 项下色谱条件, 分别在 0, 4, 8, 12, 16, 18 h 进样测定, 记录色谱图, 以甲基麦冬二氢高异黄酮 B 为参照峰, 计算指纹图谱中各共有峰相对保留时间和相对峰面积, 结果各共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 0.2%, 相对峰面积的 RSD 均 < 3.3%, 表明供试品溶液在室温下放置 18 h 稳定。

2.1.6 重复性试验 取同一批号浙麦冬 6 份, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.3 项下色谱条件进样, 记录色谱图, 以甲基麦冬二氢高异黄酮 B 为参照峰, 计算指纹图谱中各共有峰相对保留时间和相对峰面积, 结果各共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 0.1%, 相对峰面积的 RSD 均 < 2.3%, 表明本方法具有较好的重复性。

2.1.7 浙麦冬指纹图谱的生成 按上述方法测定 10 批浙麦冬的指纹图谱, 采用国家药典委员会提供的“中药指纹图谱相似度评价系统”2012.1 版, 建立浙麦冬黄酮类物质的对照指纹图谱, 结果所有批次的浙麦冬均能检测到 7 个共有峰, 经 HPLC-MS 确证和对照品比对, 确定 1 号峰为甲基麦冬二氢高异黄酮 A, 2 号峰为甲基麦冬二氢高异黄酮 B, 3 号峰为 6-醛基-7-甲氧基异麦冬黄烷酮 B, 4 号峰为 ophiopogonanone D, 混合对照品色谱图和对照指纹图谱见图 1。

2.1.8 浙麦冬样品指纹图谱相似度的测定 以上述生成的浙麦冬黄酮类物质对照指纹图谱作为对



A. 混合对照品; B. 对照指纹谱品; 1. 甲基麦冬二氢高异黄酮 A; 2. 甲基麦冬二氢高异黄酮 B; 3. 6-醛基-7-甲氧基异麦冬黄酮 B; 4. ophiopogonanone D

图 1 浙麦冬黄酮类物质对照指纹谱
Fig. 1 Chromatography of mixed standards and reference fingerprint of flavonoids in *Ophiopogonis Radix* of Zhejiang

照, 采用国家药典委员会提供的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2012.1 版软件, 计算各色谱图的相似度, 10 批样品与对照指纹图谱之间的相似度依次为 0.957, 0.936, 0.984, 0.994, 0.991, 0.988, 0.947, 0.989, 0.980, 0.924, 表明 10 批样品的指纹图谱与对照图谱有较高的相似度, 见图 2。

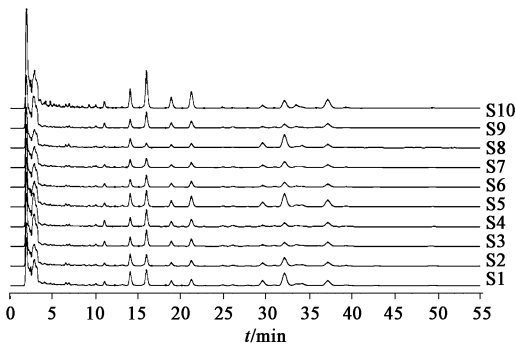


图 2 浙麦冬黄酮类物质 HPLC 指纹谱
Fig. 2 HPLC fingerprints of flavonoids in *Ophiopogonis Radix* of Zhejiang

2.2 浙麦冬中甲基麦冬二氢高异黄酮 A 和甲基麦冬二氢高异黄酮 B 的含量测定

2.2.1 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 μL , 依次进样, 以进样量 (ng) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 求得甲基麦冬二氢高异黄酮 A 和甲基麦冬二氢高异黄酮 B 的回归方程分别为 $Y = 3\ 686.2X - 200$ ($R^2 = 1.000\ 0$) 和 $Y = 3\ 223.7X - 1\ 251$ ($R^2 = 1.000\ 0$), 结果表明甲基麦冬二氢高异黄酮 A 和甲基麦冬二氢高异黄酮 B 分别在 31.47 ~ 786.75, 53.05 ~ 1 326.25 ng 呈良好

的线性关系。

2.2.2 精密度试验 取同一供试品溶液, 按 2.1.3 项下色谱条件, 重复进样 6 次, 测定, 甲基麦冬二氢高异黄酮 A 和甲基麦冬二氢高异黄酮 B 峰面积的 RSD 分别为 0.4%, 1.1%, 表明仪器精密度较好。

2.2.3 稳定性试验 取同一供试品溶液, 按 2.1.3 项下色谱条件, 分别在 0, 4, 8, 12, 16, 18 h 进样测定, 结果甲基麦冬二氢高异黄酮 A 和甲基麦冬二氢高异黄酮 B 峰面积的 RSD 分别为 1.0%, 2.7%, 表明供试品溶液在室温下放置 18 h 稳定。

2.2.4 重复性试验 取同一批号浙麦冬 6 份, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.3 项下色谱条件进样测定, 结果甲基麦冬二氢高异黄酮 A 和甲基麦冬二氢高异黄酮 B 的平均质量分数分别为 0.11, 0.15 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 2.7%, 1.5%, 表明本方法具有较好的重复性。

2.2.5 加样回收率试验 取已知含量的浙麦冬样品粉末 1.5 g, 精密加入对照品溶液适量, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.3 项下色谱条件测定, 结果见表 1。

表 1 浙麦冬中 2 种成分的加样回收率试验

Table 1 Results of recovery determination of flavonoids in *Ophiopogonis Radix* of Zhejiang

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 (RSD)/%
甲基麦冬	1.525 8	0.175 0	0.094 4	0.271 1	101.8	101.5
	1.532 4	0.175 8	0.094 4	0.273 6	103.6	(2.4)
二氢高异黄酮 A	1.527 5	0.175 2	0.094 4	0.273 4	104.0	
	1.500 4	0.172 1	0.188 8	0.355 8	97.3	
二氢高异黄酮 B	1.501 0	0.172 2	0.188 8	0.359 1	99.0	
	1.500 3	0.172 1	0.188 8	0.362 7	100.9	
黄酮 B	1.510 9	0.173 3	0.283 2	0.465 3	103.1	
	1.524 0	0.174 8	0.283 2	0.469 4	104.0	
甲基麦冬	1.511 8	0.173 4	0.283 2	0.457 0	100.1	
	1.525 8	0.228 3	0.106 1	0.340 9	106.1	103.0
二氢高异黄酮 B	1.532 4	0.229 2	0.106 1	0.338 6	103.1	(2.2)
	1.527 5	0.228 5	0.106 1	0.340 5	105.6	
黄酮 A	1.500 4	0.224 5	0.212 2	0.438 2	100.7	
	1.501 0	0.224 5	0.212 2	0.440 5	101.8	
黄酮 B	1.500 3	0.224 4	0.212 2	0.435 4	99.4	
	1.510 9	0.226 0	0.318 3	0.559 6	104.8	
黄酮 A	1.524 0	0.228 0	0.318 3	0.552 5	101.9	
	1.511 8	0.226 2	0.318 3	0.557 0	103.9	

2.2.6 样品含量测定 分别取 10 批浙江慈溪产浙麦冬样品,按照上述方法测定,结果浙麦冬样品中甲基麦冬二氢高异黄酮 A 的含量范围为 0.10 ~ 0.18 mg·g⁻¹,甲基麦冬二氢高异黄酮 B 的含量范围为 0.12 ~ 0.23 mg·g⁻¹,见表 2。

表 2 浙麦冬中 2 种黄酮类化合物含量测定

Table 2 Analytical results of two moisoflavonoids in *Ophiopogonis Radix* of Zhejiang mg·g⁻¹

No.	甲基麦冬二氢高异黄酮 A	甲基麦冬二氢高异黄酮 B
S1	0.15	0.17
S2	0.17	0.23
S3	0.11	0.12
S4	0.10	0.16
S5	0.18	0.23
S6	0.11	0.23
S7	0.11	0.22
S8	0.16	0.16
S9	0.18	0.22
S10	0.12	0.16

3 讨论

采用二极管阵列检测器对浙麦冬进行测试,检测波长 200 ~ 400 nm,比较了三维谱图以及等吸收图,发现在 280 nm 处样品信息量大,响应值较高,因此最终选择 280 nm 为本品的检测波长。

比较了超声、回流以及冷浸 2 h 后再回流 3 种提取方法,其中水浴回流提取与冷浸 2 h 后再回流的样品含量相当,均比超声处理高,从操作简便角度考虑,选择直接水浴回流的方式制备供试品溶液。比较了甲醇、乙醇、70% 乙醇 3 种提取溶剂,结果甲醇与乙醇提取的样品含量差异不大,70% 乙醇为提取溶剂的样品含量略低,从安全角度,最终选择乙醇作为提取溶剂。

以乙腈-水、甲醇-0.1% 磷酸、乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相进行测试,发现采用乙腈-0.1% 磷酸溶液,各色谱峰峰形对称,分离较好。分别对多种梯度及等度洗脱条件进行考察,结果等度条件各色谱峰就能进行较好分离,综合考虑洗脱时间及各色谱峰分离效果最终选定乙腈-0.1% 磷酸溶液(58:42)等度洗脱条件。

比较了 Kromasil 100-5 C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Amethyst C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),

BOSTON-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), SB-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), HC-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 5 种不同的色谱柱,结果各色谱柱均能对主要色谱峰进行较好分离,且不同色谱柱测定下样品的含量基本一致。通过对不同柱温(25, 30, 40 ℃)和流速(0.8, 1.0, 1.2 mL·min⁻¹)进行考察,发现样品均可较好的分离。表明方法的耐用性较好。

专属性试验,溶剂与阴性样品对试验均无干扰。试验中以浙麦冬对照指纹图谱作对照,对 10 批川麦冬样品进行了指纹图谱相似度分析,结果 10 批川麦冬的相似度均 < 0.85,而浙麦冬的相似度均 > 0.9,说明本文建立的浙麦冬中黄酮类成分的 HPLC 指纹图谱方法具有较好的专属性,可用于区分浙麦冬和川麦冬。

本试验建立了浙麦冬黄酮类成分的 HPLC 指纹图谱,同时可用于测定浙麦冬中甲基麦冬二氢高异黄酮 A 和甲基麦冬二氢高异黄酮 B 的含量。方法简便,结果准确,重复性好,能够较为全面反应浙麦冬药材的质量,可为浙麦冬药材质量控制方法与道地药材的发展提供参考依据。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:155-156.
- [2] 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.
- [3] 陈有根,邬国庆,戴俊东,等. 麦冬指纹图谱研究[J]. 中国中医药信息杂志,2008,15(4):56-58.
- [4] 车晓彦,伍丕娥,周娟,等. 麦冬药材 TLC 及 HPLC 特征图谱研究[J]. 药物分析杂志,2012,32(12):2262-2266.
- [5] 贾诚,叶正良,姜秀晶,等. 川麦冬药材中黄酮类成分 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 辽宁中医杂志,2011,38(6):1182-1184.
- [6] 王进,刘汉清,刘霖,等. HPLC 定量指纹图谱法评价川麦冬质量研究[J]. 中药材,2013,36(5):721-725.
- [7] 白晶. 麦冬甾体皂苷和高异黄酮类成分的研究进展[J]. 北京联合大学学报,2014,28(2):9-12.
- [8] 周一峰,戚进,朱丹妮,等. 麦冬须根高异黄酮类成分及其清除氧自由基作用[J]. 中国天然药物,2008,6(3):201-204.

[责任编辑 顾雪竹]