

不同干燥方法对麦冬多元活性成分的影响

谈梦霞¹, 陈佳丽¹, 邹立思¹, 刘训红^{1*}, 唐仁茂², 马继梅², 陈舒妤¹, 石婧婧¹

¹南京中医药大学药学院 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 南京 210023; ²江苏苏中药业集团股份有限公司, 泰州 225500

摘要: 探究不同干燥方法对麦冬多元活性成分的影响。采用超快速液相色谱-三重四极杆/线性离子阱质谱 (UFLC-QTRAP-MS/MS) 同时测定不同干燥方法下麦冬中甾体皂苷、高异黄酮、氨基酸及核苷类共 29 种活性成分的含量; 根据 29 种目标成分的含量, 用聚类分析 (HCA) 及主成分分析 (PCA) 对不同干燥方法下麦冬进行综合评价。结果表明, 29 种目标成分在一定浓度范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.999 0; 精密度、重复性、稳定性良好, RSD 均小于 5%; 平均加样回收率为 97.02% ~ 102.78%, RSD 均小于 5%。PCA 结果显示, 以晒干、无硫烘干的麦冬样品综合质量较优。所建立的方法准确、可靠, 可用于麦冬药材内在质量的综合评价, 该研究可为揭示麦冬传统干燥方法科学内涵提供依据, 同时为麦冬产地加工时干燥方法的优选提供基础资料。

关键词: 麦冬; 干燥方法; 超快速液相色谱-三重四极杆/线性离子阱质谱; 多元活性成分; 聚类分析; 主成分分析
中图分类号: R282.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-6880(2019)1-0100-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.1.016

Effects of different drying methods on multiple bioactive constituents of *Ophiopogonis Radix*

TAN Meng-xia¹, CHEN Jia-li¹, ZOU Li-si¹, LIU Xun-hong^{1*},
TANG Ren-mao², MA Ji-mei², CHEN Shu-yu¹, SHI Jing-jing¹

¹School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing 210023, China;

²SZYY Group Pharmaceutical Limited, Taizhou 225500, China

Abstract: To explore the effects of different drying methods on multiple bioactive constituents in *Ophiopogonis Radix*. A comprehensive analytical method employed with ultra-fast liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry (UFLC-QTRAP-MS/MS) was used for the simultaneous determination of twenty-nine components including steroidal saponins, homoisoflavonoids, amino acids and nucleosides in *Ophiopogonis Radix*. Hierarchical clustering analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) have been applied to comprehensively analyze and evaluate the results of multiple active constituents. The results showed that twenty-nine components had good linearity, and correlation coefficients were more than 0.999 0. The method exhibited good precision, repeatability and stability with the relative standard deviation (RSD) less than 5%, the average recoveries were between 97.02% and 102.78%, and all RSD were less than 5%. In addition, the results of PCA showed that sun drying and non-sulfurized oven drying samples have better quality. The established method was accurate and reliable, which could be used to appraise the quality of *Ophiopogonis Radix*. Our study can provide basis for revealing the scientific connotation of traditional drying method of *Ophiopogonis Radix*, and may lay the way for optimization of drying method during the processing of *Ophiopogonis Radix*.

Key words: *Ophiopogonis Radix*; drying method; UFLC-QTRAP-MS/MS; multiple bioactive constituents; hierarchical clustering analysis; principal component analysis

收稿日期: 2018-06-07 接受日期: 2018-11-19

基金项目: 国家中药标准化项目 (ZYBZH-C-JS-32); 江苏高校优势学科建设工程 (YSXK-2014); 江苏高校品牌专业建设工程 (PPZY2015A070)

* 通信作者 Tel: 86-25-85811511; E-mail: liuxunh1959@163.com

麦冬是常用滋阴中药材之一, 系百合科沿阶草属植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f) Ker-Gawl. 的干燥块根, 始载于《神农本草经》^[1], 列为上品, 其味

甘、微苦,微寒,具有养阴生津,润肺清心之功效,可用于治疗肺燥干咳,阴虚癆嗽,津伤口渴,内热消渴等症^[2]。现代研究表明,麦冬含有甾体皂苷、高异黄酮、氨基酸、核苷、多糖类等活性成分^[3,4],其中甾体皂苷类和高异黄酮类化合物为麦冬的主要活性成分,具有抗心肌缺血、抗心律失常、镇咳、抗氧化等药理活性^[5,6];氨基酸和核苷类成分是维持人体生理活动的重要物质,具有提高机体免疫力、调节中枢神经系统、调节心律失常等多种功效^[7-9]。

药材产地干燥加工是中药材生产和品质形成的重要环节^[10,11]。麦冬的传统干燥方法为晒干,该方法具有操作简单、成本低等优点。但随着中药材市场的逐渐扩大,药材的干燥加工日趋高效,多种干燥设备被应用到中药材产地干燥过程中。目前,有文献报道不同干燥方法对麦冬品质的影响^[12,13],但仅局限于甾体皂苷、高异黄酮类成分的定量研究,未对其他活性成分进行研究。因此,本实验基于超快速液相色谱-三重四级杆/线性离子阱质谱(Ultra-fast liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry, UFLC-QTRAP-MS/MS)技术,建立同时测定不同干燥麦冬药材中甾体皂苷、高异黄酮、氨基酸、核苷类共 29 种指标成分含量的方法,并结合聚类分析和主成分分析方法对不同干燥麦冬药材进行比较分析与综合评价,旨在为麦冬适宜产地干燥方法的优选提供基础资料,同时为麦冬药材内在质量的综合评价和全面控制提供新的方法参考。

1 仪器与方法

1.1 仪器

超快速液相色谱仪(日本岛津公司); AB QTRAP 4500 型三重四级杆线性离子阱质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); BSA2245 十万分之一电子分析天平(德国赛多利斯公司); ME36S 型百万分之一电子分析天平(德国赛多利斯公司); Milli-Q 超纯水制备仪(美国 Millipore 公司); 湘仪 H1650-W 高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.2 试剂

麦冬皂苷 C(批号 lw16082703),麦冬皂苷 D(批号 lw16073105),麦冬皂苷 D'(批号 lw16032401),甲基麦冬黄烷酮 A(批号 lw16012504),甲基麦冬黄烷酮 B(批号 lw16032004),甲基麦冬黄烷酮 A(批号 lw16122905)购于南京良纬生物科技有限公司,纯度均大于 98%;丙氨酸(批号 S20A6G17672),丝氨酸(批号 SM0503GC13),脯氨酸(批号 S30J6G1),缬氨

酸(批号 081M00551V),苏氨酸(批号 S01F4G1),亮氨酸(批号 SLBB9163V),异亮氨酸(批号 SM0503GD13),天冬氨酸(批号 BCBG3906V),谷氨酸(批号 S27M6G1),赖氨酸(批号 S16A6G2),蛋氨酸(批号 SLBC7548V),组氨酸(批号 O60M821V),苯丙氨酸(批号 J04J7R8481),精氨酸(批号 S16A6G1),2'-脱氧胞苷(批号 N19S7W21266),胸苷(批号 DN1122WB13),胞苷(批号 MM0316YA12),尿苷(批号 TM0313XA13),2'-脱氧鸟苷(批号 N07A7W12580),腺苷(批号 Z23S7J21814),肌苷(批号 TJ0623XA13),鸟苷(批号 AJ0609NA14)购于上海源叶生物有限公司,纯度均大于 98%;鲁斯可皂苷元(批号 4299)购于上海诗丹德生物技术有限公司,纯度大于 98%,甲酸、乙腈为色谱纯,购于德国 Merck 公司;甲醇(批号 143135)为色谱纯,购于江苏汉邦科技有限公司;试验用水为超纯水(Milli-Q 纯水制备仪制备),其余试剂均为分析纯。

1.3 材料

麦冬样品于 2017 年 4 月实地采集于四川省三台县麦冬规范种植基地。样品均经南京中医药大学药学院刘训红教授鉴定四川麦冬均为百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f) Ker-Gawl. 的块根。不同干燥方法样品信息见表 1,留样凭证存放于南京中医药大学中药鉴定实验室,药材凭证标本号为 510722170418023YC。

表 1 样品信息

Table 1 The information of samples

编号 No.	干燥方式 Drying method
S1	晒干 Sun drying
S2	蒸汽干燥 Steam drying
S3	土炕烘干 Adobe kang drying
S4	天然气干燥 Gas drying
S5	无硫烘干(置换热风炉烘干) Non-sulfurized oven drying (Replacement of hot air drying)
S6	电烤烘干 Electric oven drying
S7	滚筒烘干 Roller drying
S8	真空干燥 Vacuum drying
S9	热风恒温干燥(50 °C) Hot air constant-temperature drying (50 °C)

1.4 色谱质谱条件

色谱柱 Synergi™ Hydro-RP 100Å 柱(2.0 mm × 100 mm, 2.5 μm);流动相:0.1% 甲酸水(A)-0.1%

甲酸乙腈(B),梯度洗脱:0~5 min,98% A;5~6 min,98%~40% A;6~8 min,40%~20% A;8~10 min,20% A;10~12 min,20%~98% A;12~15.10 min,98% A;柱温30℃;流速0.4 mL/min;进样量2.0 μL。离子源:Turbo V;电离模式:ESI⁺、ESI⁻;采

集方式:多反应监测离子扫描模式(MRM);离子化温度(TEM):650℃。喷雾电压:5500 V和4500 V;雾化气(GSI):65 L/min;气帘气(CUR):30 L/min。优化质谱条件参数见表2。

表2 29种成分的质谱检测参数

Table 2 Optimized mass spectrometric parameters of twenty-nine components

化合物 Component	分子式 Molecular formula	分子量 Mr	<i>t</i> _R (min)	离子对 Mass data (<i>m/z</i>)	解簇电压 DP (V)	碰撞电压 CE (eV)	离子模式 Ion mode
1	C ₅ H ₉ NO ₄	147.13	0.52	147.08/83.92	83	14	ESI ⁺
2	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146.19	0.52	147.11/83.91	66	14	ESI ⁺
3	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155.00	0.53	156.08/110.03	95	16	ESI ⁺
4	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.20	0.55	175.12/70.02	88	18	ESI ⁺
5	C ₃ H ₇ NO ₃	105.09	0.57	106.05/59.99	67	8	ESI ⁺
6	C ₄ H ₉ NO ₃	119.12	0.57	120.07/74.00	93	20	ESI ⁺
7	C ₄ H ₇ NO ₄	133.10	0.57	134.05/87.96	59	10	ESI ⁺
8	C ₅ H ₇ NO ₂	89.09	0.58	90.06/44.02	79	10	ESI ⁺
9	C ₅ H ₉ NO ₂	115.13	0.65	116.07/70.02	68	10	ESI ⁺
10	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.15	0.71	118.09/72.06	54	10	ESI ⁺
11	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅	243.22	0.93	244.09/112.00	61	10	ESI ⁺
12	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	149.21	1.02	150.06/104.03	91	10	ESI ⁺
13	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₄	227.30	1.07	228.20/112.05	76	13	ESI ⁺
14	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.18	1.36	132.10/86.05	64	10	ESI ⁺
15	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	244.20	1.41	244.90/113.00	103	13	ESI ⁺
16	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.18	1.48	132.11/86.05	98	10	ESI ⁺
17	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	267.24	2.20	268.10/136.07	86	23	ESI ⁺
18	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	268.23	2.47	269.00/137.07	46	15	ESI ⁺
19	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	283.24	2.52	284.30/152.00	62	15	ESI ⁺
20	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.19	3.04	166.10/120.05	56	14	ESI ⁺
21	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	267.20	3.16	268.10/152.10	61	15	ESI ⁺
22	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₅	242.23	4.57	243.10/127.07	61	13	ESI ⁺
23	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₈	886.46	7.74	887.40/393.30	110	45	ESI ⁺
24	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₆	855.02	8.23	855.60/287.30	30	38	ESI ⁺
25	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₆	855.02	8.30	855.60/253.30	130	45	ESI ⁺
26	C ₁₉ H ₁₆ O ₆	340.34	8.71	339.13/130.92	-135	-42	ESI ⁻
27	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	342.34	8.76	341.10/178.00	-110	-46	ESI ⁻
28	C ₁₉ H ₂₀ O ₅	328.36	8.90	327.10/178.00	-90	-41	ESI ⁻
29	C ₂₇ H ₄₂ O ₄	430.31	10.65	431.40/287.10	130	47	ESI ⁺

1.5 对照品溶液制备

精密称取谷氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸、胞苷、蛋氨酸、2'-脱氧胞苷、异亮氨酸、尿苷、亮氨酸、腺苷、肌苷、鸟苷、苯丙氨酸、2'-脱氧鸟苷、胸苷、麦冬皂苷C、麦冬皂苷D、麦冬皂苷D'、甲基麦冬黄酮

A、甲基麦冬黄酮A、甲基麦冬黄酮B、鲁斯可皂苷元的对照品适量于5 mL容量瓶中,加70%甲醇溶液超声溶解制成质量浓度分别为1.086、0.986、1.022、0.926、0.812、1.087、0.992、1.044、0.587、0.958、1.017、0.525、1.084、0.650、1.004、0.832、0.568、0.877、0.757、1.061、0.749、1.103、

1. 015、1. 115、0. 825、1. 250、0. 985、1. 050、0. 890 mg/mL 的对照品储备液,置于 4 ℃ 冰箱,以备使用。取各对照品储备液适量,加 70% 甲醇溶液定容至 10 mL 制成混合对照品溶液,并逐级稀释,得到一系列不同浓度的混合对照品溶液,存于 4 ℃,以备使用。

1.6 供试品溶液制备

取样品粉末(40 目)1.0 g,精密称定,置于 50 mL 具塞锥形瓶,精密量取加入 70% 甲醇 30 mL,密闭,称重,超声处理(功率 500 W,频率 40 kHz)60 min,放置冷却,再次称重,用 70% 甲醇溶液补足质量损失,过滤,取续滤液,离心(12 000 rpm,10 min),

取上清液,0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液即得。

1.7 方法学考察

1.7.1 线性关系考察

精密吸取“1.5”项下一系列浓度的混合对照品溶液,按“1.4”条件进样分析,以对照品的峰面积为纵坐标(Y),其浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,计算回归方程、相关系数和线性范围;以信噪比(S/N)≈3,计算出各目标化合物的检测限(LOD),以信噪比(S/N)≈10,计算出各目标化合物的定量限(LOQ)(见表3、图1)。

表3 29种目标化合物回归方程、相关系数、线性范围、检测限、定量限

Table 3 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges, LOD and LOQ of twenty-nine target components

化合物 Component	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	线性范围 Linear range (ng/mL)	检测限 LOD (ng/mL)	定量限 LOQ (ng/mL)
1	$Y = 20.6X + 12\ 300$	0.999 2	7.60 ~ 76 000	2.16	7.20
2	$Y = 220X + 22\ 000$	0.999 9	3.05 ~ 30 500	0.82	2.73
3	$Y = 153X + 2\ 410$	0.999 6	0.47 ~ 4 700	0.14	0.46
4	$Y = 170X + 90\ 400$	0.999 3	74.9 ~ 749 000	1.50	5.00
5	$Y = 31.8X + 20\ 600$	0.999 6	7.54 ~ 75 400	1.51	5.03
6	$Y = 7.34X + 4\ 190$	0.999 5	14.60 ~ 146 000	1.46	4.87
7	$Y = 76.8X + 3\ 960$	0.999 1	3.26 ~ 32 600	0.33	1.10
8	$Y = 5.03X + 3\ 390$	0.999 6	73.10 ~ 731 000	2.92	9.73
9	$Y = 801X + 24\ 800$	0.999 8	58.70 ~ 587 000	1.17	3.90
10	$Y = 2\ 440X + 112\ 000$	0.999 7	9.58 ~ 95 800	0.96	3.20
11	$Y = 802X + 470$	0.999 8	1.31 ~ 13 100	0.30	1.00
12	$Y = 27.8X + 301$	0.999 5	1.05 ~ 10 500	0.26	0.87
13	$Y = 495X - 3\ 180$	0.999 4	7.03 ~ 70 300	0.22	0.73
14	$Y = 930X + 25\ 300$	0.999 4	0.78 ~ 7 800	0.25	0.75
15	$Y = 5.59X + 598$	0.999 8	10.04 ~ 100 400	1.04	3.47
16	$Y = 27.7X + 8\ 910$	0.999 7	4.57 ~ 45 700	1.32	4.40
17	$Y = 6\ 300X + 129\ 000$	0.999 6	4.54 ~ 45 400	0.44	1.47
18	$Y = 1\ 880X + 1\ 400$	1.000 0	1.75 ~ 17 500	0.17	0.57
19	$Y = 349X + 3\ 180$	0.999 5	45.42 ~ 454 200	0.45	1.50
20	$Y = 4\ 320X - 47\ 700$	0.999 7	14.85 ~ 148 500	0.74	2.47
21	$Y = 1\ 010X + 456$	0.999 7	1.50 ~ 15 000	0.15	0.50
22	$Y = 35.3X + 477$	0.999 6	0.44 ~ 4 400	0.13	0.23
23	$Y = 17.9X + 107$	0.999 2	1.76 ~ 17 600	0.45	1.50
24	$Y = 175X + 268\ 000$	0.999 6	36.80 ~ 368 000	0.74	2.47
25	$Y = 271X + 2\ 270$	0.999 7	2.06 ~ 20 600	0.42	1.40
26	$Y = 578X + 2\ 360$	0.999 2	0.63 ~ 6 300	0.13	0.43
27	$Y = 2\ 550X + 121\ 000$	0.999 2	4.93 ~ 49 300	0.23	0.77
28	$Y = 4\ 730X + 91\ 300$	0.999 3	3.15 ~ 31 500	0.11	0.37
29	$Y = 5\ 080X + 28\ 100$	0.999 8	0.53 ~ 5 300	0.13	0.43

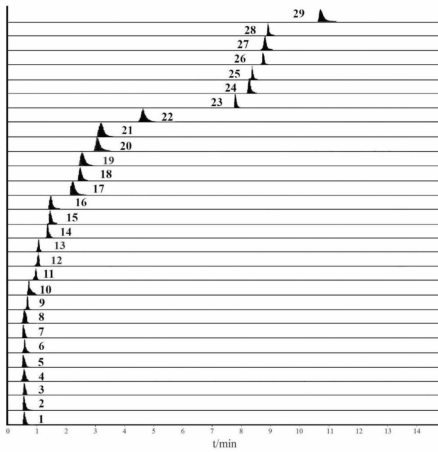


图1 29种目标成分的MRM图

Fig. 1 MRM chromatograms of twenty-nine components

注:1. 谷氨酸;2. 赖氨酸;3. 组氨酸;4. 精氨酸;5. 丝氨酸;6. 苏氨酸;7. 天冬氨酸;8. 丙氨酸;9. 脯氨酸;10. 缬氨酸;11. 胞苷;12. 蛋氨酸;13. 2'-脱氧胞苷;14. 异亮氨酸;15. 尿苷;16. 亮氨酸;17. 腺苷;18. 肌苷;19. 鸟苷;20. 苯丙氨酸;21. 2'-脱氧鸟苷;22. 胸苷;23. 麦冬皂苷C;24. 麦冬皂苷D;25. 麦冬皂苷D';26. 甲基麦冬黄酮A;27. 甲基麦冬黄酮A;28. 甲基麦冬黄酮B;29. 鲁斯可皂苷元。

Note: 1. Glutamic acid 2. Lysine 3. Histidine 4. Arginine 5. Serine 6. Threonine 7. Aspartic acid 8. Alanine 9. Proline 10. Valine 11. Cytidine 12. Methionine 13. 2'-Deoxycytidine 14. Isoleucine 15. Uridine 16. Leucine 17. Adenosine 18. Inosine 19. Guanosine 20. Phenylalanine 21. 2'-Deoxyguanosine 22. Thymidine 23. Ophiopogonin C 24. Ophiopogonin D 25. Ophiopogonin D' 26. Methylophiopogonone A 27. Methylophiopogonone A 28. Methylophiopogonone B 29. Ruscogenin.

1.7.2 精密度试验

精密吸取“1.5”项下混合对照溶液 2 μL , 在“1.4”项条件下重复进样 6 次, 记录 29 种目标化合物峰面积, 计算其 RSD, 结果见表 4。

1.7.3 重复性试验

取 S1 样品, 按“1.6”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“1.4”项下方法进样, 记录 29 种目标化合物峰面积, 计算各目标化合物含量的 RSD, 结果见表 4。

1.7.4 稳定性试验

取 S1 样品, 按“1.6”项下方法制备供试品溶液, 按“1.4”项下方法分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 记录 29 种目标化合物峰面积, 并计算其 RSD, 结果见表 4。

1.7.5 加样回收率试验

取 0.5 g 已知含量的麦冬样品 S1 (9 份), 精密称定, 置锥形瓶中, 分别加入低、中、高 3 个水平 (80%、100%、120%) 对照品适量, 每个水平 3 份, 按“1.6”项方法制备加样回收率供试品溶液, 进样测定后, 计算各成分的平均回收率及 RSD, 结果见表 4。

1.8 样品测定

取麦冬待测样品各 3 份, 分别称取 1.0 g, 精密称定, 按“1.6”项下方法制备麦冬供试品溶液, 按照“1.4”项下色谱质谱条件测定, 根据相应线性方程计算供试品溶液中 29 种目标成分的含量。

表4 方法学结果

Table 4 The results of methodology

化合物 Component	精密度 Precision	重复性 Repeatability	稳定性 Stability	加样回收率 Recovery	
		RSD(%)		Mean (%)	RSD(%)
1	2.24	3.63	2.14	101.07	0.77
2	1.00	2.98	1.06	100.35	1.49
3	3.04	3.98	3.38	99.25	2.93
4	0.46	0.66	1.00	98.59	1.59
5	1.47	1.72	1.22	98.08	1.16
6	2.72	2.48	2.87	99.06	1.45
7	2.46	1.11	0.82	101.55	1.76
8	2.08	1.05	1.60	98.56	2.17
9	2.33	1.34	1.33	102.57	1.71
10	2.46	2.31	1.11	99.61	1.54
11	2.90	3.23	3.20	99.57	2.83
12	1.93	3.01	1.20	98.16	2.84

续表 4 (Continued Tab. 4)

化合物 Component	精密度 Precision	重复性 Repeatability	稳定性 Stability	加样回收率 Recovery	
	RSD(%)			Mean(%)	RSD(%)
13	2.16	1.04	2.24	100.50	2.67
14	2.64	1.51	1.26	98.76	2.50
15	2.36	1.02	1.09	101.35	2.54
16	2.70	1.17	1.11	97.02	1.28
17	2.62	1.83	2.08	99.46	3.26
18	2.58	2.63	2.14	101.68	2.76
19	2.56	1.04	2.81	102.11	1.56
20	2.35	1.09	2.61	101.29	1.25
21	2.67	2.97	2.90	101.87	2.48
22	1.61	1.82	1.21	99.47	2.20
23	1.98	1.32	1.15	101.11	1.88
24	2.67	1.02	1.29	99.72	1.63
25	2.13	3.43	2.27	99.43	2.20
26	1.74	2.74	2.17	101.47	1.30
27	2.56	1.19	1.81	102.78	2.20
28	0.67	2.19	2.57	98.77	2.02
29	1.91	2.79	1.61	99.86	1.60

1.9 统计分析

根据含量测定结果,用 SPSS 16.0 软件对不同干燥方法麦冬样品进行聚类分析和主成分分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件优化

实验考察了 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Thermo Acclaim™ RSLC 120 C₁₈ 柱(150 mm × 2.1 mm, 2.2 μm)、Synergi™ Hydro-RP 100Å 柱(2.0 mm × 100 mm, 2.5 μm)、XBridge™ C18 柱(4.6 mm × 100 mm, 3.5 μm) 4 种色谱柱,实验结果发现,采用 Synergi™ Hydro-RP 100Å 柱(2.0 mm × 100 mm, 2.5 μm) 可以提高待测成分的分度、灵敏度,故本实验选择 Synergi™ Hydro-RP 100Å 柱(2.0 mm × 100 mm, 2.5 μm) 作分离柱。

实验考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 甲酸水、乙腈-0.1% 甲酸水、0.1% 甲酸乙腈-0.1% 甲酸水等几种流动相体系,结果发现乙腈-水分离效果优于甲醇-水,且甲醇-水出峰时间靠后;当两相中加入 0.1% 的甲酸时,各成分能获得较好的分离效果且峰形较好,因此本实验选择 0.1% 甲酸乙腈-0.1% 甲酸水溶液作为流动相梯度洗脱。

2.2 质谱条件优化

实验研究了甾体皂苷类、高异黄酮类、核苷类和氨基酸类成分在电喷雾正负离子条件下的响应情况,实验结果表明,甾体皂苷类成分(麦冬皂苷 C、D、D'、鲁斯可皂苷元)、核苷类和氨基酸类成分在正离子条件下响应较高并且具有良好的峰形,而在负离子模式下响应较低或无响应;高异黄酮类成分(甲基麦冬黄酮 A、甲基麦冬黄酮 A、B)在负离子模式下响应明显高于正离子模式,且峰形较好。故本实验甾体皂苷类、核苷类和氨基酸类成分采用正离子模式进行检测分析,而高异黄酮类成分采用负离子模式进行检测分析。

2.3 提取条件优化

实验对提取溶剂(60%、70%、80%、90%、100% 甲醇、乙醇)、料液比(1:10、1:20、1:30)和提取时间(30、60、90 min)进行单因素考察,结果表明,70% 甲醇为最适宜溶剂可以提取出较多的待测成分,料液比和提取时间优化为 1:30 和 60 min。

2.4 样品含量测定

按照“1.4”项下色谱质谱条件测定不同干燥方法麦冬中 29 种成分的含量,测定结果见表 5。

表5 不同干燥方法麦冬中29种成分的含量测定结果($\mu\text{g/g}$, mean \pm SD, $n=3$)Table 5 Determination of 29 constituents in *Ophiopogonis Radix* by different drying methods($\mu\text{g/g}$, mean \pm SD, $n=3$)

化合物 Component	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
1	408.1 \pm 1.8	209.0 \pm 1.2	264.0 \pm 1.0	226.0 \pm 0.6	399.2 \pm 1.8	205.5 \pm 0.7	327.1 \pm 2.7	234.9 \pm 0.8	292.0 \pm 1.2
2	199.3 \pm 1.9	103.5 \pm 1.0	114.3 \pm 0.6	98.1 \pm 1.0	201.7 \pm 1.1	113.4 \pm 0.5	159.0 \pm 0.7	93.9 \pm 0.4	181.8 \pm 0.9
3	48.3 \pm 0.8	29.4 \pm 0.4	24.6 \pm 0.4	27.0 \pm 0.4	45.6 \pm 0.7	30.0 \pm 0.3	37.2 \pm 0.3	20.7 \pm 0.2	34.5 \pm 0.4
4	2553.8 \pm 11.8	1598.5 \pm 3.5	4379.1 \pm 10.4	2355.5 \pm 5.3	3481.4 \pm 8.0	1760.7 \pm 5.5	2541.5 \pm 5.3	2520.3 \pm 6.2	2560.5 \pm 7.8
5	1440.4 \pm 8.5	788.8 \pm 1.4	1160.8 \pm 6.5	633.1 \pm 2.8	1170.5 \pm 4.8	938.8 \pm 2.5	810.2 \pm 2.2	615.1 \pm 2.0	1435.2 \pm 4.3
6	1041.3 \pm 5.2	848.8 \pm 2.1	875.8 \pm 3.0	813.2 \pm 2.8	885.4 \pm 3.2	800.8 \pm 2.0	876.2 \pm 3.3	708.1 \pm 2.5	1015.1 \pm 2.9
7	336.1 \pm 3.4	222.2 \pm 1.7	222.3 \pm 1.9	212.7 \pm 1.8	239.2 \pm 1.4	244.1 \pm 1.1	253.0 \pm 0.9	258.3 \pm 1.5	235.8 \pm 1.0
8	1740.5 \pm 4.9	1193.6 \pm 2.4	1709.7 \pm 2.9	921.2 \pm 2.0	1131.5 \pm 3.1	845.8 \pm 2.2	1083.2 \pm 3.2	885.1 \pm 1.9	1421.2 \pm 4.2
9	408.1 \pm 3.4	662.8 \pm 2.3	1208.8 \pm 3.4	402.1 \pm 2.3	759.3 \pm 2.4	707.9 \pm 2.0	372.1 \pm 0.9	210.9 \pm 0.6	1293.1 \pm 3.5
10	160.0 \pm 1.7	88.2 \pm 1.2	126.6 \pm 1.2	87.6 \pm 0.7	131.2 \pm 0.8	55.5 \pm 0.3	145.5 \pm 0.7	88.2 \pm 0.7	144.0 \pm 1.0
11	3.2 \pm 0.0	1.7 \pm 0.0	1.6 \pm 0.0	3.2 \pm 0.0	2.5 \pm 0.0	1.8 \pm 0.0	7.0 \pm 0.0	4.9 \pm 0.0	2.9 \pm 0.0
12	102.9 \pm 1.9	23.7 \pm 0.4	56.1 \pm 0.7	38.4 \pm 0.4	50.4 \pm 0.8	16.1 \pm 0.2	60.9 \pm 1.0	40.8 \pm 0.4	171.3 \pm 1.9
13	0.9 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.6 \pm 0.0	0.7 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.9 \pm 0.0	0.8 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0
14	183.7 \pm 1.5	95.7 \pm 1.1	138.0 \pm 1.3	100.5 \pm 0.8	170.8 \pm 1.4	55.5 \pm 0.3	155.7 \pm 0.8	82.2 \pm 0.3	192.3 \pm 1.6
15	282.7 \pm 1.4	136.5 \pm 0.9	129.3 \pm 0.9	160.8 \pm 0.7	192.4 \pm 1.1	147.9 \pm 0.8	236.2 \pm 0.9	124.2 \pm 0.8	139.5 \pm 0.7
16	633.2 \pm 4.0	284.9 \pm 1.6	356.9 \pm 1.4	342.1 \pm 2.2	438.2 \pm 1.6	202.2 \pm 0.7	591.1 \pm 2.1	321.0 \pm 2.0	644.1 \pm 2.9
17	30.0 \pm 0.5	17.7 \pm 0.2	17.1 \pm 0.2	54.3 \pm 0.9	19.2 \pm 0.3	20.7 \pm 0.3	65.1 \pm 0.6	51.9 \pm 0.6	27.2 \pm 0.2
18	7.5 \pm 0.0	4.2 \pm 0.0	2.1 \pm 0.0	2.8 \pm 0.0	5.1 \pm 0.0	3.7 \pm 0.0	3.6 \pm 0.0	2.2 \pm 0.0	4.3 \pm 0.0
19	129.0 \pm 0.5	59.7 \pm 0.2	90.3 \pm 0.4	168.3 \pm 0.5	80.4 \pm 0.4	57.6 \pm 0.4	261.4 \pm 1.0	153.6 \pm 0.9	150.6 \pm 0.6
20	105.9 \pm 0.5	37.8 \pm 0.2	60.0 \pm 0.3	62.4 \pm 0.4	56.7 \pm 0.3	25.9 \pm 0.2	100.8 \pm 0.6	58.5 \pm 0.2	97.5 \pm 0.5
21	4.7 \pm 0.1	2.0 \pm 0.0	1.4 \pm 0.0	4.1 \pm 0.1	2.7 \pm 0.0	1.9 \pm 0.0	7.2 \pm 0.1	4.2 \pm 0.0	2.7 \pm 0.0
22	7.3 \pm 0.1	2.3 \pm 0.0	3.2 \pm 0.1	4.5 \pm 0.1	2.1 \pm 0.0	1.7 \pm 0.0	7.0 \pm 0.0	4.7 \pm 0.0	5.9 \pm 0.0
23	38.8 \pm 0.1	38.1 \pm 0.2	36.0 \pm 0.2	28.8 \pm 0.1	35.7 \pm 0.1	35.7 \pm 0.1	27.2 \pm 0.1	28.4 \pm 0.1	34.5 \pm 0.1
24	50.7 \pm 0.1	146.7 \pm 0.6	132.3 \pm 0.7	93.3 \pm 0.6	130.6 \pm 0.7	143.7 \pm 0.4	45.9 \pm 0.1	54.6 \pm 0.2	56.4 \pm 0.3
25	3.7 \pm 0.0	5.8 \pm 0.0	5.3 \pm 0.1	3.9 \pm 0.0	4.4 \pm 0.1	5.4 \pm 0.1	3.6 \pm 0.0	2.8 \pm 0.0	4.5 \pm 0.0
26	1.7 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	1.8 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.0	0.8 \pm 0.0	1.3 \pm 0.0
27	64.5 \pm 0.4	61.5 \pm 0.2	65.7 \pm 0.3	51.9 \pm 0.3	64.5 \pm 0.4	64.5 \pm 0.4	51.0 \pm 0.2	33.0 \pm 0.1	39.9 \pm 0.2
28	30.0 \pm 0.2	41.1 \pm 0.3	42.6 \pm 0.3	34.8 \pm 0.3	39.0 \pm 0.2	38.7 \pm 0.2	19.9 \pm 0.1	17.0 \pm 0.1	59.9 \pm 0.3
29	0.3 \pm 0.0	0.6 \pm 0.0	0.6 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.7 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0

2.5 聚类分析

按照“1.9”项下方法对不同干燥方法麦冬样品进行聚类分析,结果见图2。由图2可知,当临界值介于10~15时,可将干燥方法分为4大类,其中,S2(蒸汽干燥)、S6(电烤烘干)样品划为第1类,麦冬

皂苷C、麦冬皂苷D、麦冬皂苷D'等成分含量相近且略高于其他样品;S3(土炕烘干)、S5(无硫烘干)、S9[热风恒温干燥(50℃)]样品划为第2类,精氨酸、丝氨酸、苏氨酸等成分含量相近且较高;S4(天然气干燥)、S7(滚筒烘干)、S8(真空干燥)样品划为第3

类,其中精氨酸、麦冬皂苷 C 等成分含量较为相近稍低于第 2 类;S1(晒干)样品单独聚为一类,谷氨酸、组氨酸、丝氨酸等成分含量均高于其他类群。

2.6 主成分分析

主成分分析法是将多个变量通过线性变化筛选出少数重要变量的多元统计分析方法,是一种处理数据降维的方法,该方法克服了层次分析法等评价方法中人为确定指标权重的主观影响,通过综合多指标来评价药材品质^[14,15],其结果较为客观、公正。

按照“1.9”项下方法对不同干燥麦冬样品进行主成分分析。主成分分析中特征值及贡献率见表 6。由表 6 可见,前 4 个主成分特征值均大于 1,说明前 4 个主成分在麦冬质量评价中起着主导作用,4

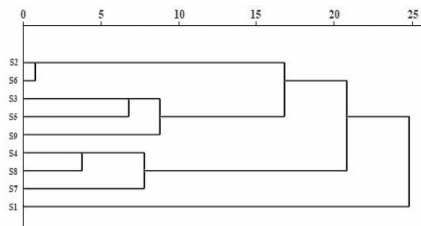


图 2 不同干燥方法麦冬样品聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrograms of hierarchical cluster analysis for *Ophiopogonis Radix* with different drying methods

个主成分的累积贡献率达 89.838% (>85%),能够较客观地反映不同干燥方法麦冬药材的综合质量,故选取前 4 个主成分进行分析。

表 6 旋转后的主成分的特征值及贡献率

Table 6 Rotated eigenvalue of principal component and contribution rate

主成分 Principal component	特征值 Characteristic value	方差贡献率 Contribution rate (%)	累积方差贡献率 Cumulative contribution rate (%)
1	12.416	42.815	42.815
2	8.633	29.77	72.585
3	3.308	11.408	83.993
4	1.695	5.845	89.838

每个主成分包含的各因子其载荷系数综合反映了所测成分对各主成分的影响。由表 7 可知,缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸对主成分 1 有明显的正负荷,而鲁斯可皂苷元对主成分 1 有较强的逆负荷;腺苷、

麦冬皂苷 C、甲基麦冬黄烷酮 B 的因子载荷量在第 2 主成分中较大,甲基麦冬黄烷酮 A 和甲基麦冬黄烷酮 A 的载荷因子分别在第 3、4 主成分中较大,说明上述化合物对麦冬药材品质影响较大。

表 7 麦冬药材中各成分旋转变换后的因子载荷矩阵

Table 7 Rotated factor load matrix of each constituent in *Ophiopogonis Radix*

化合物 Compound	主成分 Principal component			
	1	2	3	4
1	0.851	0.256	0.280	0.185
2	0.812	0.417	0.146	-0.111
3	0.734	0.374	0.464	-0.076
4	0.204	0.316	-0.314	0.762
5	0.563	0.778	-0.088	-0.099
6	0.727	0.620	-0.089	-0.141
7	0.692	0.002	0.488	-0.138
8	0.504	0.650	-0.155	0.272
9	-0.113	0.782	-0.561	-0.006
10	0.905	0.254	-0.172	0.188
11	0.886	-0.005	-0.029	-0.344

续表 7 (Continued Tab. 7)

化合物 Compound	主成分 Principal component			
	1	2	3	4
12	0.688	0.331	-0.542	-0.328
13	0.587	-0.586	0.497	0.127
14	0.854	0.396	-0.227	0.077
15	0.808	-0.030	0.511	0.117
16	0.952	0.106	-0.238	-0.107
17	0.302	-0.912	-0.158	0.086
18	0.633	0.434	0.547	-0.285
19	0.575	-0.685	-0.377	0.084
20	0.945	-0.081	-0.277	-0.004
21	0.638	-0.719	0.105	0.051
22	0.838	-0.341	-0.234	-0.073
23	-0.035	0.891	0.343	-0.138
24	-0.763	0.502	0.276	0.186
25	-0.559	0.705	0.043	-0.038
26	0.245	0.325	-0.214	0.598
27	-0.116	0.618	0.576	0.401
28	-0.138	0.801	-0.449	-0.269
29	-0.921	0.008	-0.034	0.020

采用 4 个主成分对不同干燥条件麦冬进行评价。由表 8 可知,不同干燥麦冬样品主成分各因子总得分,根据各主要因子的权重系数进行累积,权重系数依据其方差贡献的大小计算,即各主成分的贡献率与 4 个主成分的总贡献之比,各主成分的权重分别为:0.4766、0.3314、0.1270、0.0651。各主成分因子得分与其权重乘积之和相加,得出各麦冬样品的总因子得分,其值越高,综合质量越好。根据特

征向量,得到主成分线性组合表达式 $F = 0.4766F_1 + 0.3314F_2 + 0.1270F_3 + 0.0651F_4$ 。由综合得分可知,不同干燥方法麦冬样品中以 S1(晒干)综合质量较好,这与麦冬产地加工中广泛使用的传统干燥方法一致;S5(无硫烘干)综合质量次之,且该方法耗时较短、生产效率高,根据天气等实际情况,该方法可在产地加工中作为辅助干燥方法。

表 8 不同干燥方法麦冬药材的主成分因子及品质综合评价

Table 8 Principal component factors and quality evaluation for *Ophiopogon Radix* by different drying methods

样品 Sample	F_1	F_2	F_3	F_4	F	排序 Sorting
S1	1.706	0.572	1.220	-0.031	1.155	1
S2	-1.045	0.442	0.592	-0.784	-0.328	6
S3	-0.551	0.996	-0.954	1.893	0.070	4
S4	-0.447	-0.802	-0.453	-0.690	-0.491	8
S5	0.276	0.738	0.847	0.503	0.516	2
S6	-1.303	0.233	0.861	-0.779	-0.485	7
S7	1.041	-1.369	-0.045	0.339	0.059	5
S8	-0.379	-1.638	-0.184	-0.334	-0.768	9
S9	0.702	0.828	-1.884	-1.496	0.273	3

3 结论

本实验建立了超快速液相色谱-串联四级杆/线性离子阱质谱(UFLC-QTRAP-MS/MS)同时测定麦冬中甾体皂苷、高异黄酮、氨基酸和核苷类共29种活性成分含量的方法,并结合聚类分析以及主成分分析方法对不同干燥麦冬药材进行分析与综合评价。含量测定结果显示,甾体皂苷类成分以麦冬皂苷C、D的含量较高,高异黄酮类成分以甲基麦冬黄酮A、B的含量较高,氨基酸类成分以精氨酸、丝氨酸的含量较高,核苷类成分以鸟苷、尿苷的含量较高,不同干燥方法麦冬中29种活性成分含量具有一定差异。PCA结果显示麦冬晒干品(S1)综合质量较好。本实验所建立的方法可用于麦冬药材内在质量的综合评价,该研究可为麦冬适宜产地干燥方法的优选提供基础资料。

参考文献

- Gu GG, Yang PJ. Shennong's materia medica classic(神农本草经)[M]. Beijing: Xue Yuan Press, 2007: 44-46.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 155-156.
- Lun W, Jiang XL, Zhang WM, et al. Homo-aro-cholestane, fu-rostane and spirostane saponins from the tubers of *Ophiopogon japonicus*[J]. Phytochemistry, 2017, 136: 125-132.
- Chen MH, Chen XJ, Wang M, et al. *Ophiopogon japonicus*-A phytochemical, ethnomedicinal and pharmacological review [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 181: 193-213.
- Zhao JW, Chen DS, Deng CS, et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of compounds isolated from the rhizome of *Ophiopogon japonicus* [J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1): 7-18.
- Wang Y, Liu F, Liang Z, et al. Homoisoflavonoids and the antioxidant activity of *Ophiopogon japonicus* root [J]. Iranian J of Pharm Research Ijpr, 2017, 16: 357-365.
- Zhang HQ, Liu P, Zhu ZH, et al. Analysis and evaluation of

- amino acids and nucleosides in different parts of ripe fruit of *Trichosanthes rosthornii* harm [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2017, 19: 1683-1687.
- Wang GK, Zheng J, Yu Y, et al. Determination and evaluation of heavy metal elements in *Kalimeris indica* by ICP-MS coupled with principal component analysis and cluster analysis [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2015, 27: 2084-2089.
- Gao Q, Tang F, Sun J, et al. Simultaneous determination of nucleosides and amino acids in bamboo shoots by HPLC [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2016, 28: 1409-1413.
- Zhao RH, Duan JA, Gao ZJ, et al. Analysis and evaluation of traditional and modern drying technologies and methods of primary processing of traditional chinese medicinal materials [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2013, 15: 1026-1035.
- Duan JA, Su SL, Lv JL, et al. Traditional experiences and modern cognition on primary processing of traditional chinese medicinal materials [J]. Chin Mater Med(中国中药杂志), 2009, 34: 3151-3157.
- Wu FM, Zhang FF, Li M, et al. Study on comprehensive evaluation of drying methods of sichuan *Ophiopogon japonicus* at production area [J]. Chin Medicinal Mater(中药材), 2015, 38: 1400-1402.
- Wu FM, Zeng J, Li M, et al. Effect of drying temperature on quality of *Ophiopogonis Radix* based on the appearance character characteristics and content of chemical components [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2016, 36: 1310-1315.
- Xie M, Wang J, Zhang QL, et al. Correlation and principal component analyses of inorganic elements in *Gentiana officinalis* H. Smith. from different areas of Gansu province [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2016, 28: 1402-1408.
- Liu XY, Li JP, Chen XY, et al. Determination of eight active components in *Radix Hedysari* by HPLC and its cluster analysis [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2016, 51: 786-791.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

广西壮族自治区药用植物园

昆明医科大学药学院

西南交通大学生命科学与工程学院

西南交通大学期刊社