

PCA 投影分析中,以数据所做的投影图基本没有达到分类的效果,并且 PCA 投影图也未能全面体现出决明子样本之间内在的联系。采用聚类分析方法,结果表明决明子样品确实存在差异,但分类并不明显。

参考文献:

[1] 中国药典[S].一部.2005.

- [2] 王清华,纪玲,丛保忠.高效液相色谱法测定决明子中大黄酚的含量[J].中医药学报,1996,20(5):48-49.
- [3] 冯晓冰.决明子药材中大黄酚含量的反向 HPLC 法测定[J].分析测试学报,1999,18(4):80.
- [4] 裴妙荣,贾宏伟,王世民.生、炒决明子蒽醌含量比较[J].中国中药杂志,1990,15(8):29.
- [5] 张启伟,阴健,张俊.生、炒决明子及其煎剂中部分活性成分的比较[J].中草药,1996,27(2):79-81.

不同产地巴戟天中糖类成分 HPLC-ELSD 指纹图谱研究

刘晓涵,陈永刚,林励*,肖凤霞,刘征,赵红英

(广州中医药大学中药学院,广东 广州 510006)

摘要:目的 建立巴戟天中糖类化学成分 HPLC 指纹图谱的分析方法,研究不同产地的巴戟天药材的质量。方法 采用 HPLC 法。色谱柱为 Inertsil NH₂ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水梯度洗脱;柱温:室温;体积流量:1.2 mL/min,以蒸发光散射检测器(ELSD)检测,检测条件:漂移管温度 100 °C;N₂ 气流速度 2.2 L/min;He 在线脱气,气流速度 20 mL/min。使用计算机辅助相似度评价软件进行数据处理。对不同产地的巴戟天药材指纹图谱的相似度进行比较分析。结果 除两批外,其余 8 批巴戟天与系统生成对照指纹图谱的相似度均在 0.94 以上,归纳出巴戟天 13 个共有峰。通过与对照品的保留时间比较,1、2 号峰分别为 D-果糖、蔗糖。不同产地巴戟天药材中糖类化合物化学组成相似,但相对比例有明显的差异。结论 所用方法稳定、重现性好,可突出巴戟天药材的内在质量特征,为更好地控制巴戟天的内在质量提供了科学依据。

关键词:巴戟天;糖类成分;指纹图谱;HPLC-ELSD

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)10-1641-03

HPLC-ELSD Fingerprint of carbohydrate constituents in *Morinda officinalis* from different habitats

LIU Xiao-han, CHEN Yong-gang, LIN Li, XIAO Feng-xia, LIU Zheng, ZHAO Hong-ying

(College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract : Objective To establish HPLC fingerprint analysis method of carbohydrate constituents in *Morinda officinalis* collected from different habitats. **Methods** HPLC Method was employed and a Columns Inertsil NH₂ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-water as mobile phase by gradient elution was used, the flow rate was 1.2 mL/min, column temperature was room temperature. Detector was ELSD and the temperature of drift tube was 100 °C. The flow rate of N₂ was 2.2 L/min, Helium degasification on-line with flow rate was 20 mL/min. The fingerprints evaluating software by computer-assisted for the similarity was used to process the experiment data and compare the similarity of HPLC fingerprint of *M. officinalis* from different habitats. **Results** Except for two batches, the fingerprint similarity value of other eight batches of herbs was above 0.94 compared with system generation spectrum and 13 common characteristic peaks were demonstrated. The first and second peaks were D-fructose and sucrose, respectively compared with the retention time of standard sample. The results showed that the carbohydrate constituents of *M. officinalis* were similar among herbs from different habitats, but their relative ratios are significantly different. **Conclusion** The method in this experiment is stable and reproducible, which could

* 收稿日期:2008-12-12

作者简介:刘晓涵(1982—),女,湖南省永州市人,广州中医药大学博士生,研究方向为中药资源开发利用与新药研究。

Tel: (020) 39356148 E-mail: liuxia98@163.com

*通讯作者 林励 Tel: (020) 39358270 E-mail: lwyll@gzhtcm.edu.cn

distinguish the internal quality and provide the reference for quality control of *M. officinalis*

Key words: *Morinda officinalis* How; carbohydrate constituents; fingerprint; HPLC-ELSD

巴戟天为茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* How 的干燥肉质根。味甘、辛,性微温,有补肾阳、强筋骨、祛风湿之功效。主要分布在福建、广东、广西、海南等省的热带和亚热带地区,是我国著名的“四大南药”之一,也是出口创汇的名贵药材。主要含糖类、氨基酸、脂类、蒽醌、有机酸等化合物及无机元素^[1,2]。巴戟糖成分具有补肾壮阳作用^[3],并能提高细胞免疫功能^[4],为巴戟天主要有效成分之一。巴戟天一直在广东、福建等地大面积引种,为考察不同产地巴戟天药材质量,笔者对其糖类进行了指纹图谱分析。

1 材料、仪器与试剂

Waters 600 高效液相色谱仪 (Alltech ELSD2000 检测器),Dikma NH₂ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),Millennium 32 工作站;8953 Dietikon 型电子分析天平(瑞士);AS2060B 型超声仪。

D-果糖生化试剂(BR,批号:F20050414,国药集团化学试剂有限公司)、蔗糖(分析纯,批号:20060717,广东光华化学厂有限公司),水为自制重蒸水,乙腈(色谱纯,Dikma 公司)。巴戟天样品共 10 批,2008 年 7 月采自不同产地,来源见表 1。经广州中医药大学中药学院林励研究员鉴定为巴戟天 *M. officinalis* How 的根。以上凭证标本存于广州中医药大学中药学院实验中心。

表 1 巴戟天药材来源

Table 1 Source of *M. officinalis*

样品号	产地	采集日期
1	广西	2008-08-05
2	福建和溪	2008-08-25
3	广东德庆	2008-09-10
4	广东高要	2008-09-08
5	广东郁南	2008-09-10
6	广东广宁	2008-09-09
7	福建和溪	2008-08-25
8	广东高要	2008-09-08
9	福建龙岩	2008-08-27
10	福建龙岩	2008-08-27

2 方法与结果

2.1 色谱条件:Inertsil NH₂ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B);梯度洗脱:0 ~ 15 min, 86 % A ~ 81 % A;15 ~ 20 min, 81 % A ~ 75 % A;20 ~ 35 min, 75 % A ~ 70 % A;35 ~ 50 min, 70 % A ~ 58 % A;50 ~ 60 min, 58 % A ~ 40 %

A;60 ~ 65 min, 40 % A ~ 20 % A;柱温:室温;体积流量:1.2 mL/min;漂移管温度:100 °C;N₂ 气流速度 2.2 L/min;He 在线脱气,气流速度 20 mL/min。

2.2 对照品溶液制备:精密取果糖、蔗糖对照品适量,加 50 %乙醇制成 1 mg/mL 的溶液,作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备:取巴戟天药材(60 干燥)粉碎成细粉,过 60 目筛。精密称取粉末 2 g,置圆底烧瓶中,以蒸馏水 20 mL 加热提取 2 次,每次 1 h(经方法学考察已基本将糖类化学成分提取干净),取出提取液,滤过,合并两次滤液,用氯仿萃取 3 次,每次 20 mL,弃去氯仿层,水层定容至 25 mL 量瓶中,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,滤液作供试品溶液。

2.4 精密度试验:取同一份供试品溶液,重复进样 5 次,用相似度计算,所测得的指纹图谱与其所得共有模式图谱的相似度分别为 0.992 7、0.993 2、0.987 2、0.996 8、0.995 8,均大于 0.95,其共有峰的保留时间的 RSD 和峰面积的 RSD 均小于 1.5 %,符合指纹图谱技术的要求^[5]。

2.5 重现性试验:精密称取 5 份同一批药材粉末,制得 5 份供试品溶液,同法进行检测。5 份供试品溶液所测色谱指纹图谱直观观察,显示指纹图谱的全貌无明显变化;用相似度计算,测得的指纹图谱与其所得共有模式图谱的相似度分别为 0.988 4、0.983 3、0.991 5、0.996 9、0.987 5,均大于 0.95,并考察保留时间和峰面积的一致性,各色谱峰峰面积的 RSD 在 0.8 % ~ 1.6 %,保留时间的 RSD 在 1.1 % ~ 2.6 %,符合指纹图谱的技术要求。

2.6 稳定性试验:取同一份供试品溶液,于 0、1、2、4、8、16、24 h 进样检测,直观观察指纹图谱的全貌无明显变化,用相似度计算,测得的指纹图谱与其所得共有模式图谱的相似度分别为 0.990 2、0.991 1、0.987 6、0.994 9、0.985 0,均大于 0.95,并考察保留时间和峰面积的一致性,各色谱峰峰面积 RSD 和保留时间 RSD 均小于 1.8 %,表明供试品溶液稳定。

2.7 样品测定:分别吸取上述供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,测定,记录色谱图。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版(药典委员会)”软件对各样品色谱图的原始数据文件进行分析,以 10 批样品生成的对照图谱(中位数法)作为对照模版,计算各色谱图的整体相似度,结果见表 2。

表 2 与共有模式比较的巴戟天样品的相似度

Table 2 Similarity of *M. officinalis* compared with common patterns

样品号	指纹图谱相似度(以对照谱图为模版,中位数法)	样品号	指纹图谱相似度(以对照谱图为模版,中位数法)
1	0.474 0	6	0.983 0
2	0.980 0	7	0.986 6
3	0.958 0	8	0.853 0
4	0.970 0	9	0.985 0
5	0.945 0	10	0.962 3

2.8 指纹图谱的建立和辨认:对样品的供试品溶液进行 HPLC-ELSD 检测,得到不同批次巴戟天 HPLC 色谱图(图 1)。对巴戟天 HPLC 色谱图进行解析,确定有 13 个共有峰,构建了巴戟天药材的 HPLC 色谱图的指纹特征,作为巴戟天鉴别的依据(图 2)。取 D-果糖、蔗糖对照品混合液 20 μ L 进样测定,比较相应色谱峰的保留时间和峰面积的变化,确定指纹色谱图中的 1 号峰为果糖,2 号峰为蔗糖(图 3)。

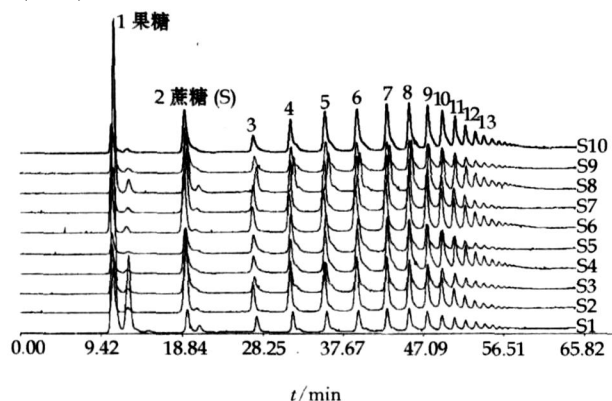


图 1 10 批不同产地的巴戟天药材水提液的 HPLC-ELSD 指纹图谱

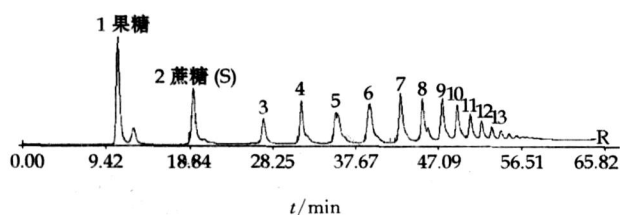
Fig. 1 HPLC-ELSD Fingerprint of water extract in ten batches of *M. officinalis* from different habitats

图 2 巴戟天 HPLC-ELSD 色谱图的标准图谱

Fig. 2 HPLC-ELSD Chromatogram of *M. officinalis*

3 讨论

本实验对供试品溶液的制备、色谱条件进行了优化选择,对不同提取溶剂、提取方法所得指纹图谱进行反复考察,结果选择水为提取溶剂,采用回流提取法进行提取,所得到的信息量最多,所包含的小极

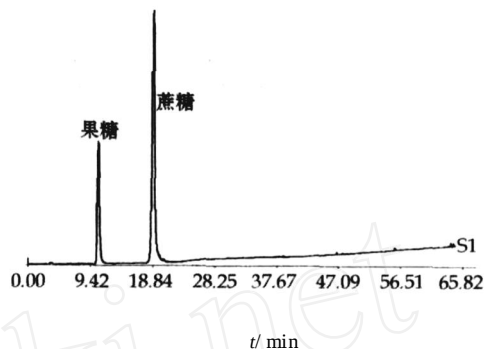


图 3 D-果糖与蔗糖对照品 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC Chromatogram of D-fructose and sucrose

性杂质最少;选择乙腈-水为流动相,能较好地使样品中各色谱峰分离且出峰最多;对漂移管温度进行考察,优选的最佳温度为 100 $^{\circ}$ C;对 N_2 气流速度进行考察,优选的最佳气流速度为 2.2 L/min;分别选择 Dikma 公司、Mecherey-nagel 的氨基柱,Grace 的 C_{18} 分析柱进样分析,结果表明,Dikma 公司的氨基柱效果较好。

由表 1 可见,其中 8 批巴戟天药材的相似度在 0.94 以上,这可能与这些产地的生态环境相似以及种质资源相近有关;但有 1 批为 0.853 0;而广西产巴戟天与对照指纹图谱的相似度在 0.5 以下,这或许与其加工、采收季节、贮存时间和方式有关。其差异的产生是否缘于产地关系,是否导致药效和质量差异,均有待进一步研究。

图 1 显示,不同产地巴戟天成分组成基本一致,且均以果糖和蔗糖为主要的色谱峰,但各成分的量有一定的差异。果糖质量分数在所分析的药材中均较高,但在不同来源的药材中差异很大。其中以广西产巴戟天果糖质量分数最高,广东高要产者果糖最低;从指纹图谱相似度来看,也正是这两者与其余 8 批药材出现了显著差异。运用 HPLC-ELSD 法制作巴戟天药材指纹图谱,可直观比较不同产地巴戟天药材的差别,有助于揭示巴戟天药材的内在质量特征。

参考文献:

- [1] 肖新霞,潘胜利. 巴戟天属植物化学成分、药理活性与临床应用 [J]. 国外医药:植物药分册, 2003, 18(6): 243-248.
- [2] 何传波,陈玲,李琳,等. 巴戟天多糖的分级纯化及结构分析 [J]. 华南理工大学学报, 2005, 33(12): 29-30.
- [3] 肖凤霞,林励. 巴戟天补肾壮阳作用的初步研究 [J]. 食品与药品, 2006, 5(8): 45-46.
- [4] 徐超斗,张永祥,杨明,等. 巴戟天寡糖的促免疫活性作用 [J]. 解放军药学报, 2003, 19(6): 466-467.
- [5] 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)的通知 [S]. 2000.