

巴戟天炮制前后寡糖类成分 HPLC-CAD 指纹图谱研究

景海漪, 史 辑*, 崔 妮, 贾天柱

辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600

摘 要:目的 采用 HPLC-CAD 法研究巴戟天 *Morindae Officinalis Radix* 炮制前后寡糖类成分的 HPLC-CAD 指纹图谱变化, 为科学评价和控制其质量提供可靠依据。方法 采用 Shodex Asahipak NH₂ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈和水为流动相, 梯度洗脱, 柱温为 25 ℃, 进样量为 10 μL。CAD 参数: 气压 241.36 kPa, 量程 100 pA。结果 巴戟天不同炮制品的 HPLC 指纹图谱共有峰特征明显, 不同炮制品指纹图谱有差异。炮制后峰面积显著升高, 表明巴戟天经炮制后, 寡糖的量明显增加, 炮制品共确定了 10 个共有峰。结论 建立了巴戟天寡糖类成分的 HPLC 特征图谱检测方法, 可用于巴戟天及其炮制品的质量控制。

关键词: 炮制; 巴戟天; 寡糖; 指纹图谱; HPLC-CAD; 果糖; 葡萄糖; 蔗糖; 蔗果三糖; 耐斯糖; 蔗果五糖

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)10-1412-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.10.012

Fingerprints of oligosaccharides in *Morinda officinalis* before and after processing by HPLC-CAD

JING Hai-yi, SHI Ji, CUI Ni, JIA Tian-zhu

College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

Abstract: Objective To establish a sensitive and specific HPLC-CAD method which could provide a reliable evidence for the scientific evaluation and quality control of *Morindae Officinalis Radix* (MOR). **Methods** Shodex Asahipak NH₂ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used at column temperature of 25 ℃. The mobile phase was composed of acetonitrile-water by gradient elution. The injection volume was 10 μL. The CAD parameters were pressure of 241.36 kPa and range of 100 pA. **Results** The characteristic of common peaks for fingerprints of different processed products of MOR is distinct, but there are differences among various processed products of MOR. The peak area was enlarged after processing which indicated the obvious increase of oligosaccharides and determination of ten common peaks. **Conclusion** The established HPLC fingerprint method is accurate and reliable, and has a good reproducibility and precision, which could be used for the quality control of MOR and its processed products.

Key words: processing; *Morindae Officinalis Radix*; oligosaccharide; fingerprints; HPLC-CAD; fructose; glucose; sucrose; 1-kestose; nystose; 1,1,1-kestopentaose

巴戟天 *Morindae Officinalis Radix* (MOR) 为茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* How. 的干燥根, 味甘、辛, 性微温, 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿之功效^[1], 是我国著名的“四大南药”之一。巴戟天含有糖类、环烯醚萜苷类、蒽醌类和有机酸类等化学成分^[2-4]。有研究表明, 巴戟天中寡糖类成分较高, 且具有较强的促进免疫和抗抑郁作用^[5], 为巴戟天主要有效成分之一。《中国药典》2010 年

版收载了巴戟天、巴戟肉、盐巴戟天和制巴戟天 4 种饮片规格, 规定了药材按干燥品计算, 含耐斯糖 (C₂₄H₄₂O₂₁) 不得少于 2.0%, 但尚无巴戟天饮片的质量标准。

近年来, 已有巴戟天药材指纹图谱研究的相关文献报道^[6-7], 但关于巴戟天不同炮制品的指纹图谱比较研究较少。鉴于巴戟天生品强筋骨、祛风湿力胜; 盐炙后功专入肾, 增强补肾助阳作用; 甘草炙

收稿日期: 2014-01-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81001635); 国家发改委行业专项 (201107007)

作者简介: 景海漪 (1986—), 女, 硕士在读, 从事中药炮制原理研究。Tel: (0411)87586114 E-mail: jinghaiyi@sina.com

*通信作者 史 辑, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药炮制化学研究。Tel: (0411)87586011 E-mail: lnshiji@163.com

后增强补益作用,补肾益气养血,本实验对巴戟天生品及其不同炮制品各10批次饮片进行寡糖类成分 HPLC-CAD 指纹图谱比较研究,并进行相似度评价,为控制饮片质量及解析炮制机制提供一定的依据。

1 仪器与材料

日本岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪 (SPD—M20A 检测器, LC-20AB 泵, SIL-20A 自动进样器, CTO-20A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LC Solution LC 工作站), Corona CAD 电雾式检测器 (美国 ESA 公司), Shodex Asahipak NH₂ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 日本昭和仪器有限公司); METTLER AE240 电子分析天平 (瑞士 Mettler 公司); KQ-250DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 电热恒温干燥箱 (上海市跃进医疗器械一厂)。

对照品果糖 (批号 100231, 质量分数≥99.0%)、D-无水葡萄糖 (批号 110833, 质量分数≥99.0%)、蔗糖 (批号 292-64121, 质量分数≥99.0%), 购于中国食品药品检定研究院; 蔗果三糖 (批号 DCG6626, 质量分数≥99.0%)、耐斯糖 (批号 292-64121, 质量分数≥99.0%), 购于日本 Wako 公司; 蔗果五糖 (批号 120605, 质量分数≥95.0%), 购于 Megazyme 公司; 乙腈为色谱纯 (瑞典 Oceanpak 公司); 水为娃哈哈纯净水; 其他试剂均为分析纯。

巴戟天样品共 10 批, 采自不同产地, 来源分别为广西、福建永定、广东韶关、广东德庆、广东梅州、福建南靖、广西百色、广西苍梧、福建、广东普宁, 编号分别为 S1~S10, 经辽宁中医药大学中药鉴定教研室翟延君教授鉴定, 为茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* How. 的根, 标本保存在辽宁中医药大学中药炮制工程技术研究中心。

2 方法与结果

2.1 样品制备

巴戟天、巴戟肉、盐巴戟、制巴戟均按照《中国药典》2010 年版所载制备方法制备, 各 10 批。

生巴戟: 取原药材, 除去杂质及木心, 洗净, 晒干。

巴戟肉: 取净巴戟天药材置蒸器内蒸透, 趁热除去木心, 切段干燥。

盐巴戟: 取净巴戟天药材, 用 2% 食盐水拌匀, 闷润, 待盐水被吸尽后蒸透, 趁热除去木心, 切段干燥。

制巴戟: 取甘草煎汤, 去渣, 取净巴戟天药材, 加药材量 6% 甘草汁同置锅内文火煮至甘草汁被吸尽, 趁热除去木心, 切段干燥。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Shodex Asahipak NH₂ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 检测器为 Corona CAD 电雾式检测器, 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱 70 min (表 1), 柱温 25 °C, 进样量 10 μL。CAD 参数: 气压 241.36 kPa, 量程 100 pA。

表 1 流动相梯度洗脱条件

Table 1 Gradient conditions of mobile phase

<i>t</i> / min	体积流量 / (mL·min ⁻¹)	乙腈 / %	水 / %
0.01	1.2	81	19
20.00	1.2	75	25
35.00	1.2	70	30
45.00	1.0	67	33
50.00	0.8	58	42
60.00	0.8	40	60
70.00	0.8	20	80

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液制备 精密称取果糖、D-无水葡萄糖、蔗糖、蔗果三糖、耐斯糖和蔗果五糖对照品适量, 加水配制成质量浓度分别为 1.00、1.03、1.02、1.15、1.06、1.12 mg/mL 混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液制备 精密称取生巴戟及不同炮制品粉末 (过 40 目筛), 各 0.5 g, 加醋酸乙酯 30 mL, 超声提取 30 min, 滤过弃去, 挥干, 残渣加 70% 乙醇 50 mL, 超声提取 30 min, 滤液于 80 °C 水浴蒸干, 残渣用水溶解定容至 25 mL 量瓶, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一份供试品溶液, 连续进样 6 次, 计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 结果显示, 各色谱峰相对保留时间 RSD 在 0.19%~2.89%, 相对峰面积的 RSD 在 0.07%~1.69%, 均小于 3%, 表明仪器性能良好, 符合指纹图谱的要求。

2.4.2 重复性试验 取同一批次巴戟天粉末, 平行制备 6 份供试品溶液, 按上述色谱条件进样, 计算各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 结果显示, 各色谱峰相对保留时间的 RSD 在 0.19%~1.36%, 相对峰面积的 RSD 在 0.05%~1.42%, 均小

于3%,表明方法重复性良好,符合指纹图谱的要求。

2.4.3 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别在0、2、4、8、12、24 h进样,按上述色谱条件进行测定,计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD,结果显示,各色谱峰相对保留时间RSD在0.40%~2.51%,相对峰面积的RSD在0.37%~1.53%,均小于3%,表明供试品溶液在常温24 h

之内稳定,符合指纹图谱的要求。

2.5 样品测定

分别将10批巴戟天生品、巴戟肉、盐巴戟和制巴戟按照“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,取10 μ L注入高效液相色谱仪,记录70 min色谱图,供试品色谱中以耐斯糖(S)的色谱峰的保留时间为1,计算共有峰的相对保留时间。色谱图见图1。

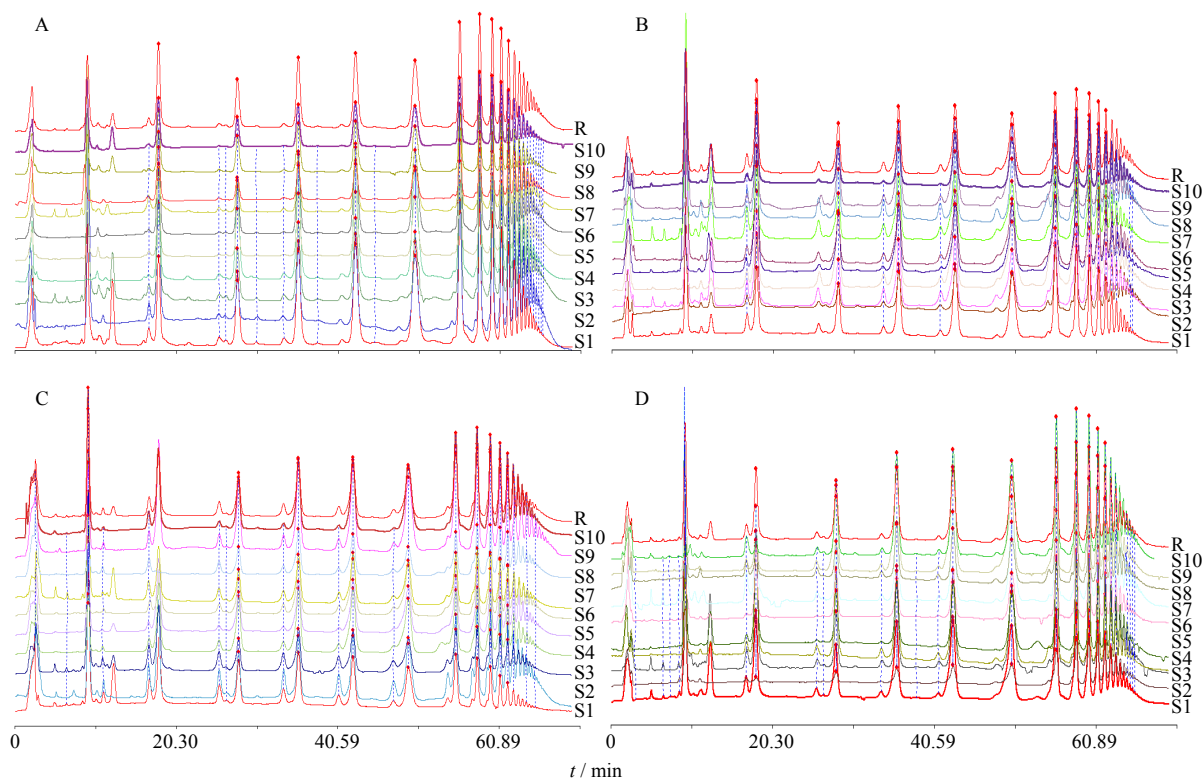


图1 10批巴戟天生品(A)、巴戟肉(B)、盐巴戟(C)和制巴戟天(D)的HPLC-CAD指纹图谱

Fig. 1 HPLC-CAD fingerprints of 10 batches of crude MOR (A), MOR without duramen (B), salt-broiled MOR (C), and MOR *Preparatum* (D)

2.6 对照指纹图谱的建立

根据国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》,选取10批巴戟天生品的指纹图谱,以中位数法筛选峰面积,建立巴戟天生品对照指纹图谱。其中保留时间为 (35 ± 1) min的峰为耐斯糖的指纹峰,与相邻峰分离度较好,出峰位适中,其峰高与峰面积适中,故选定耐斯糖色谱峰为参照峰(S),标定10个共有峰,采用已知的对照品对共有峰进行指认,确定1~6号峰(1号峰为果糖,2号峰为葡萄糖,3号峰为蔗糖,4号峰为蔗果三糖,5号峰为耐斯糖,6号峰为蔗果五糖)为主要特征峰;巴戟肉、盐巴戟和制巴戟对照指纹图谱建立方法同生品,也确定10个共有峰,见图2。

2.7 巴戟天生品及其炮制品相关技术参数与相似度计算

参考《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》^[8]对指纹图谱进行相关技术参数的计算,结果显示,10批巴戟天生品(SS1~10)指纹图谱中共有峰的相对保留时间的RSD均小于0.38%;10批巴戟肉(RS1~10)指纹图谱中共有峰的相对保留时间的RSD均小于1.32%;10批盐巴戟(YS1~10)指纹图谱中,共有峰的相对保留时间的RSD均小于0.60%;10批制巴戟(ZS1~10)指纹图谱中共有峰的相对保留时间的RSD均小于0.20%。通过《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》计算巴戟天生品、巴戟肉、盐巴戟天和制巴戟天指纹图谱相似度,结

果见表 2~5。

2.8 巴戟天生品及其炮制品特征图谱的比较

通过对同一产地巴戟天 (S4) 炮制前后的特征图谱比较, 研究发现巴戟天炮制品与原药相比, 特征图谱差异很小。但其原药材经炮制后, 主要成分

量均有显著的增加, 其中盐巴戟中寡糖类成分的量增加幅度最大。结果见表 6。

3 讨论

本实验中引入的电雾式检测器 (CAD), 又称荷电气溶胶检测器, 是一种新型通用型检测器, 基

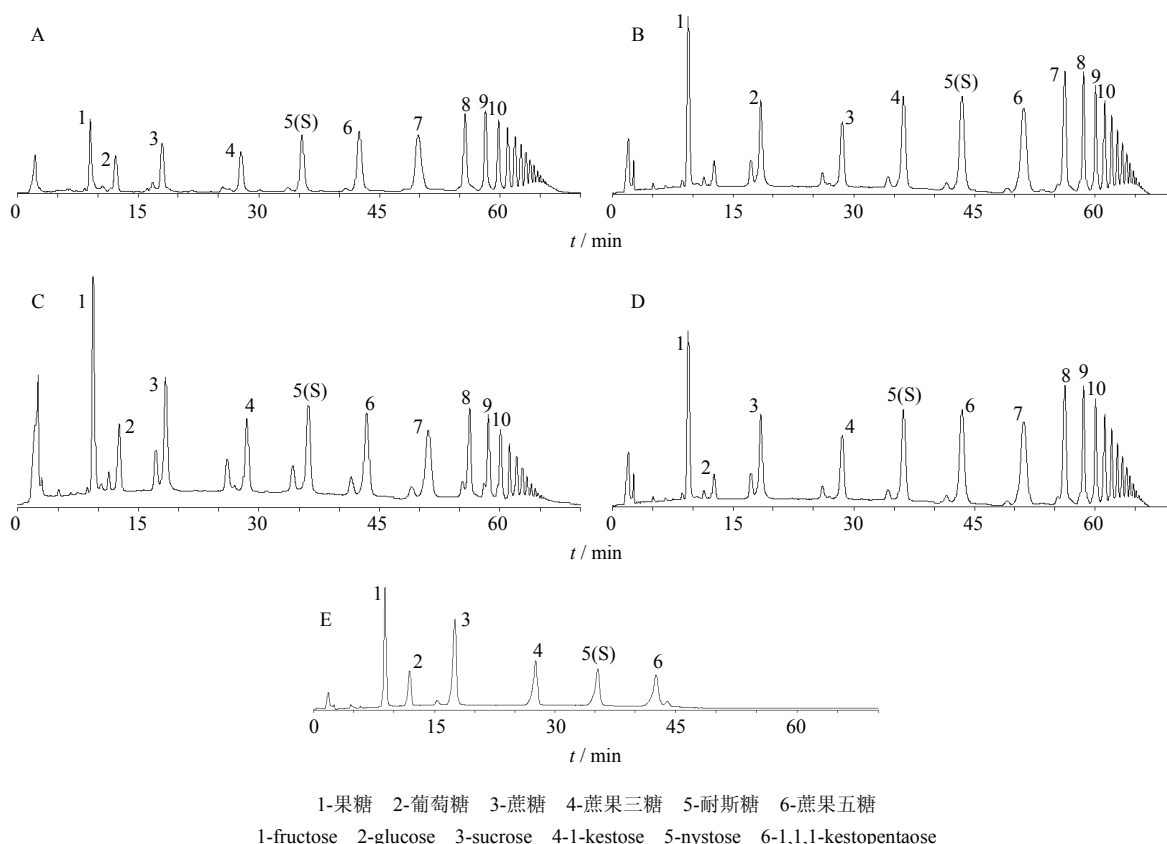


图 2 巴戟天生品 (A)、巴戟肉 (B)、盐巴戟 (C)、制巴戟 (D) 的对照指纹图谱及混合对照品 (E) 的 HPLC 色谱图
Fig. 2 Reference fingerprint of crude MOR (A), MOR without duramen (B), salt-broiled MOR (C), and MOR Preparatum (D), and HPLC of mixed reference substances (E)

表 2 10 批巴戟天生品相似度

Table 2 Fingerprint similarity of 10 batches of crude MOR

编号	SS1	SS2	SS3	SS4	SS5	SS6	SS7	SS8	SS9	SS10	对照指纹图谱
SS1	1.000	0.707	0.908	0.940	0.950	0.936	0.949	0.884	0.979	0.975	0.966
SS2	0.707	1.000	0.712	0.770	0.793	0.787	0.678	0.789	0.770	0.765	0.843
SS3	0.908	0.712	1.000	0.811	0.907	0.832	0.946	0.825	0.891	0.942	0.920
SS4	0.940	0.770	0.811	1.000	0.966	0.984	0.855	0.927	0.969	0.920	0.962
SS5	0.950	0.793	0.907	0.966	1.000	0.982	0.921	0.949	0.979	0.967	0.988
SS6	0.936	0.787	0.832	0.984	0.982	1.000	0.870	0.948	0.974	0.937	0.972
SS7	0.949	0.678	0.946	0.855	0.921	0.870	1.000	0.838	0.926	0.957	0.933
SS8	0.884	0.789	0.825	0.927	0.949	0.948	0.838	1.000	0.942	0.895	0.942
SS9	0.979	0.770	0.891	0.969	0.979	0.974	0.926	0.942	1.000	0.970	0.985
SS10	0.975	0.765	0.942	0.920	0.967	0.937	0.957	0.895	0.978	1.000	0.978
对照指纹图谱	0.966	0.843	0.920	0.962	0.988	0.972	0.933	0.942	0.985	0.978	1.000

表3 10批巴戟肉相似度

Table 3 Fingerprint similarity of 10 batches of MOR without duramen

编号	RS1	RS2	RS3	RS4	RS5	RS6	RS7	RS8	RS9	RS10	对照指纹图谱
RS1	1.000	0.890	0.969	0.956	0.894	0.942	0.938	0.916	0.898	0.953	0.983
RS2	0.890	1.000	0.930	0.858	0.780	0.934	0.884	0.927	0.821	0.952	0.930
RS3	0.969	0.930	1.000	0.922	0.825	0.946	0.972	0.923	0.851	0.986	0.973
RS4	0.956	0.858	0.922	1.000	0.910	0.921	0.886	0.883	0.916	0.912	0.967
RS5	0.894	0.780	0.825	0.910	1.000	0.843	0.773	0.808	0.872	0.808	0.905
RS6	0.942	0.934	0.946	0.921	0.843	1.000	0.950	0.96	0.897	0.952	0.977
RS7	0.938	0.884	0.972	0.886	0.773	0.950	1.000	0.932	0.822	0.958	0.952
RS8	0.916	0.927	0.923	0.883	0.808	0.960	0.932	1.000	0.864	0.917	0.953
RS9	0.898	0.821	0.851	0.916	0.872	0.897	0.822	0.864	1.000	0.841	0.928
RS10	0.953	0.952	0.986	0.912	0.808	0.952	0.958	0.917	0.841	1.000	0.966
对照指纹图谱	0.983	0.930	0.973	0.967	0.905	0.977	0.952	0.953	0.928	0.966	1.000

表4 10批盐巴戟相似度

Table 4 Fingerprint similarity of 10 batches of salt-broiled MOR

编号	YS1	YS2	YS3	YS4	YS5	YS6	YS7	YS8	YS9	YS10	对照指纹图谱
YS1	1.000	0.905	0.936	0.866	0.912	0.713	0.940	0.840	0.859	0.887	0.930
YS2	0.905	1.000	0.909	0.908	0.938	0.793	0.937	0.874	0.933	0.942	0.966
YS3	0.936	0.909	1.000	0.874	0.935	0.665	0.939	0.786	0.850	0.868	0.923
YS4	0.866	0.908	0.874	1.000	0.965	0.843	0.910	0.886	0.959	0.936	0.969
YS5	0.912	0.938	0.935	0.965	1.000	0.806	0.953	0.856	0.944	0.940	0.978
YS6	0.713	0.793	0.665	0.843	0.806	1.000	0.796	0.872	0.834	0.839	0.860
YS7	0.940	0.937	0.939	0.910	0.953	0.796	1.000	0.893	0.915	0.957	0.973
YS8	0.840	0.874	0.786	0.886	0.856	0.872	0.893	1.000	0.885	0.910	0.925
YS9	0.859	0.933	0.850	0.959	0.944	0.834	0.915	0.885	1.000	0.969	0.970
YS10	0.887	0.942	0.868	0.936	0.940	0.839	0.957	0.910	0.969	1.000	0.978
对照指纹图谱	0.930	0.966	0.923	0.969	0.978	0.860	0.973	0.925	0.970	0.978	1.000

表5 10批制巴戟相似度

Table 5 Fingerprint similarity of 10 batches of MOR Preparatum

编号	ZS1	ZS2	ZS3	ZS4	ZS5	ZS6	ZS7	ZS8	ZS9	ZS10	对照指纹图谱
ZS1	1.000	0.869	0.963	0.957	0.927	0.918	0.914	0.856	0.928	0.847	0.979
ZS2	0.869	1.000	0.837	0.814	0.724	0.935	0.873	0.850	0.864	0.825	0.896
ZS3	0.963	0.837	1.000	0.936	0.937	0.911	0.922	0.841	0.885	0.796	0.964
ZS4	0.957	0.814	0.936	1.000	0.945	0.876	0.897	0.908	0.946	0.875	0.977
ZS5	0.927	0.724	0.937	0.945	1.000	0.825	0.851	0.799	0.842	0.723	0.922
ZS6	0.918	0.935	0.911	0.876	0.825	1.000	0.931	0.826	0.863	0.777	0.932
ZS7	0.914	0.873	0.922	0.897	0.851	0.931	1.000	0.844	0.876	0.819	0.946
ZS8	0.856	0.850	0.841	0.908	0.799	0.826	0.844	1.000	0.923	0.901	0.920
ZS9	0.928	0.864	0.885	0.946	0.842	0.863	0.876	0.923	1.000	0.963	0.966
ZS10	0.847	0.825	0.796	0.875	0.723	0.777	0.819	0.901	0.963	1.000	0.905
对照指纹图谱	0.979	0.896	0.964	0.977	0.922	0.932	0.946	0.920	0.966	0.905	1.000

表6 巴戟天生品与不同炮制品中寡糖测定结果
Table 6 Determination of oligosaccharides in crude MOR and MOR *Preparatum*

品种	质量分数 / (mg·g ⁻¹)					
	果糖	葡萄糖	蔗糖	蔗果三糖	耐斯糖	蔗果五糖
生品	64.70	9.81	41.43	28.82	40.54	44.72
巴戟肉	77.44	22.60	58.60	32.98	45.74	52.24
盐巴戟	105.62	42.42	69.02	37.24	45.86	50.17
制巴戟	75.30	17.09	52.10	30.78	41.88	46.11

于其独特的检测原理,它不依赖于被检测物的化学结构,对不同结构的化合物有统一的响应,对无紫外吸收化合物的检测,与UV、折光指数检测器(RID)和ELSD相比,更加灵敏、准确。因此,巴戟天药材的寡糖类成分指纹图谱制备采用CAD检测器为宜。

本实验选用了Agilent、Dismond和Thermo C₁₈色谱柱以及Shodex Asahipak NH₂色谱柱,考察了甲醇-水(等度洗脱)、乙腈-水(等度洗脱)、乙腈-水(梯度洗脱),最终优选出了Shodex Asahipak NH₂色谱柱,乙腈-水(梯度洗脱),能较好地使样品中各色谱峰分离且出峰最多。

果糖(1号峰)、葡萄糖(2号峰)、蔗糖(3号峰)、蔗果三糖(4号峰)和蔗果五糖(6号峰)均为巴戟天药材中的指标性成分,但耐斯糖(5号峰)在指纹图谱中峰位适中,峰形对称性好,相对稳定,且《中国药典》2010年版又选取耐斯糖为指标进行定量测定,因此选其作为参照峰。

通过对巴戟天药材及炮制品的HPLC指纹图谱的研究,可以看出巴戟天炮制前后其主要峰群有一定的相似性,表明巴戟天炮制后,其主要成分无明显变化。但是炮制品HPLC图谱共有峰1、2、3、4、5、6号峰面积增大,其原因是采用不同辅料炮制后,使溶出率改变。其中盐巴戟天中寡糖类成分量增加

幅度最大,说明盐炙巴戟天有利于寡糖类成分的溶出,制巴戟天寡糖量较生品明显增加,可能是因为甘草中糖量也较高,起到了叠加的作用,巴戟肉寡糖量也明显高于生品,说明炮制时除去木心具有实验依据,具体原因及炮制过程中成分的变化有待结合药效学进行深入研究。

本实验首次建立了巴戟天不同炮制品寡糖类成分的HPLC-CAD特征图谱检测方法,该方法精密性、重复性良好,为巴戟天不同炮制品的鉴别及巴戟天加工炮制过程中的质量控制提供依据。因此,笔者建议巴戟天饮片质量标准研究应充分考察不同产地及生品与各炮制品之间的差异,建立科学、合理的质量评价体系。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2010.
- [2] Masayuki Y, Shoko Y, Hirokonish I, et al. Chemical constituents of Chinese natural medicine, *Morindae Radix*, the dried roots of *Morinda officinalis* How.: Structures of morindolide and morofficinaloside [J]. *Chem Pharm Bull*, 1995, 43(9): 1462-1472.
- [3] 史辑,姜永粮,贾天柱.巴戟天属植物化学成分研究进展[J].广州化工,2009,37(9): 46-51.
- [4] 朱孟勇,赫长胜,王彩娇.巴戟天多糖对骨质疏松大鼠骨密度及血清微量元素的影[J].中草药,2010,41(9): 1513-1515.
- [5] 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): 466-468.
- [6] 程学仁,罗文汇,孙冬梅,等.巴戟天药材高效液相色谱指纹图谱初步研究[J].中国药业,2010,19(13): 8-9.
- [7] 郭念欣,李颖春,蔡佳良,等.不同生长年限的巴戟天化学成分的指纹图谱[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(11): 65-68.
- [8] 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)的通知[S].2001.