

巴戟天不同炮制品 HPLC 指纹图谱研究

崔妮¹, 史辑^{1*}, 贾天柱^{1,2,3}

1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600

2. 国家中医药管理局中药炮制原理重点研究室, 辽宁 大连 116600

3. 辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁 大连 116600

摘要: 目的 建立巴戟天 *Morinda officinalis* 不同炮制品蒽醌类成分指纹图谱, 为巴戟天不同炮制品质量评价及炮制原理提供依据。方法 采用 HPLC 色谱法, 色谱柱 Ecosil ODS C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 柱温 28 ℃, 检测波长 277 nm。对巴戟天 4 种炮制品进行指纹图谱研究, 采用指纹图谱相似度软件进行分析。结果 建立了巴戟天不同炮制品的蒽醌类成分指纹图谱, 分别指认了巴戟天、巴戟肉、盐巴戟 5 个色谱峰, 制巴戟 6 个色谱峰。不同产地巴戟天质量差异显著。巴戟天不同炮制品间蒽醌类成分差异不大, 但其量有变化, 制巴戟由于炮制过程中使用了辅料甘草水溶液, 新增了成分甘草素。结论 本法精密度、重复性、稳定性良好, 利用 HPLC 指纹图谱分析方法, 可较全面地反映巴戟天不同炮制品的差异。

关键词: 巴戟天; 炮制; 蒽醌类; HPLC; 指纹图谱; 1-甲氧基-2-羟基蒽醌; 1, 2-二甲氧基-3-羟基蒽醌; 甲基异茜草素-1-甲醚; 1, 3-二羟基-2-甲氧基蒽醌; 甲基异茜草素; 甘草素

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)13-1871-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.13.012

Research on HPLC fingerprints of different processed *Morinda officinalis*

CUI Ni¹, SHI Ji¹, JIA Tian-zhu^{1,2,3}

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

2. Key Laboratory of Processing Principle for Chinese Materia Medica, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

3. Liaoning Province Processing Engineering Technology Research Center, Dalian 116600, China

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint of anthraquinone components and to provide the basis for quality standard and processing principle of processed *Morinda officinalis* (*Morindae Officinalis Radix*). **Methods** HPLC method was employed and Ecosil ODS C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used at temperature of 28 ℃. The mobile phase was methanol-0.1% phosphoric acid solution with gradient elution. The detection wavelength was 277 nm. The experimental data were analyzed by computer aided similarity evaluation software. **Results** HPLC fingerprint for anthraquinone components of different processed products of *M. officinalis* was established. Five chromatographic peaks of *M. officinalis*, morinda pulp, and salt-steamed *M. officinalis* and six chromatographic peaks of licorice-processed *M. officinalis* were respectively identified. The quality difference of *M. officinalis* among ten-origins reached significant level. The difference of anthraquinone components was not significant among the various processed products, but the content was changed. Liquiritigenin was found in licorice-processed *M. officinalis*. **Conclusion** The method is accurate, repeatable, and reliable, which can be used to identify different processed *M. officinalis*.

Key words: *Morinda officinalis* How.; processing; anthraquinones; HPLC; fingerprint; 1-methoxy-2-hydroxyanthraquinone; 1, 2-dimethoxy-3-hydroxyanthraquinone; rubiadin-1-methylether; 1, 3-dihydroxy-2-methoxyanthraquinone; rubiadin; liquiritigenin

巴戟天 *Morinda officinalis* How. 为茜草科 (Rubiaceae) 巴戟天属 *Morinda* L. 植物。味甘、辛, 性微温。具有补肝肾、强筋骨、祛风湿的功效。用于治疗阳痿遗精、宫冷不孕、月经不调、少腹冷痛、风湿痹痛、筋骨痠软^[1], 是著名的补肾阳药物。《中国药典》2010 年版载有巴戟天、巴戟肉、盐巴戟、

收稿日期: 2014-01-04

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (81001635); 国家发改委行业专项 (201107007)

作者简介: 崔妮, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制原理研究。Tel: (0411)87586114 E-mail: cuini0128@126.com

*通信作者 史辑, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中药炮制化学。E-mail: lnshiji@163.com

制巴戟 4 种炮制品。传统认为生品味辛而温,以补肝肾、祛风湿力强,适用于肾虚兼有风湿之证;盐制巴戟天功专入肾,温而不燥,增强了补肾助阳的作用,多用于阳痿,宫冷不孕等证;制巴戟天甘味更浓,增强补益作用,能补肾助阳、益气养血,多用于脾肾亏损之证^[2]。炮制品功效各异,其根源是炮制前后化学成分的组成和含量比发生了变化。巴戟天主要含有蒽醌类、环烯醚萜类、多糖、寡糖等多种化学成分。蒽醌类化合物具有抗菌、降压、调脂、抗癌、抗病毒、凝血等生物活性^[3],是巴戟天中种类最多、量最多的化合物。因此研究不同产地巴戟天不同炮制品蒽醌类化合物的 HPLC 指纹图谱,为不同炮制品质量评价提供依据,并为揭示巴戟天炮制原理奠定科学基础。

1 仪器与材料

Waters2695 型高效液相色谱仪, Waters2998 检测 PDA 器; KQ—250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);十万分之一电子分析天平(上海精密仪器科学有限公司);磷酸(色谱级),甲醇(色谱级),纯净水,其他试剂均为分析纯。

甘草素对照品(购自成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-13050901,质量分数 $\geq 98\%$);甲基异茜草素、甲基异茜草素-1-甲醚、1,2-二甲氧基-3-羟基蒽醌、1,3-二羟基-2-甲氧基蒽醌、1-甲氧基-2-羟基蒽醌均由本炮制研究室分离纯化得到,质量分数 $\geq 98\%$ 。从各药材产地先后收集 10 批巴戟天药材,经辽宁中医药大学药学院翟延君教授鉴定,均为茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* How. 的干燥肉质根,见表 1。10 批药材按照《全国中药炮制规范》1988 版^[4]炮制方法,制得巴戟天、巴戟肉、盐巴戟、制巴戟,10 批样品编号为 S1~S10。

表 1 巴戟天药材产地及来源

Table 1 Origins and sources of *Morindae Officinalis Radix*

编号	产地	购买时间	编号	产地	购买时间
S1	广东普宁	2012.06	S6	广东梅州	2012.07
S2	广西南宁	2012.06	S7	福建漳州	2012.07
S3	福建永定	2012.06	S8	广西百色	2012.07
S4	广东韶关	2012.06	S9	广西梧州	2012.07
S5	广东肇庆	2012.07	S10	福建南靖	2012.07

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Ecosil ODS C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,

5 μ m);流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液,梯度洗脱:0.01~5 min, 50%甲醇;5~13 min, 50%~58%甲醇;13~20 min, 58%~58.7%甲醇;20~30 min, 58.7%甲醇;30~53 min, 58.7%~60%甲醇;53~70 min, 60%~68%甲醇;70~73 min, 68%~70%甲醇;73~100 min, 70%~85%甲醇;体积流量为 0.8 mL/min;柱温为 28 $^{\circ}$ C;进样量为 20 μ L;检测波长为 277 nm。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取甘草素、甲基异茜草素、甲基异茜草素-1-甲醚、1,2-二甲氧基-3-羟基蒽醌、1,3-二羟基-2-甲氧基蒽醌、1-甲氧基-2-羟基蒽醌,加甲醇分别制成 1 mg/mL 对照品储备液,各取 50 μ L 混合,0.45 μ m 滤膜滤过,即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取各批次巴戟天炮制品粉末(过 60 目筛)2 g,置圆底烧瓶内,加氯仿 100 mL 回流提取 2 次,每次 2 h,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇使溶解,并定容至 5 mL,0.45 μ m 微孔滤膜滤过,摇匀,即得。

2.4 精密度试验

取同一份供试品溶液,按“2.1”项色谱条件连续测定 6 次,记录指纹图谱,测得各主要色谱峰的保留时间和峰面积的 RSD 均小于 3%,表明本方法精密度良好。

2.5 重复性试验

取同一批药材样品 6 份,按“2.3”项方法平行制备,按“2.1”项色谱条件测定,记录指纹图谱,测得各主要色谱峰的保留时间和峰面积的 RSD 均小于 3%,表明本方法重复性良好。

2.6 稳定性试验

取同一份供试品溶液,置室温条件下,按“2.1”项中色谱条件,分别 0、2、4、8、12、24、48 h 进样测定,记录指纹图谱,测得各主要色谱峰的保留时间和峰面积的 RSD 均小于 3%,表明样品溶液于 48 h 内保持稳定。

2.7 巴戟天不同炮制品 HPLC 指纹图谱的建立及相似度评价

2.7.1 10 批巴戟天药材 HPLC 指纹图谱的建立及相似度评价 将 10 批巴戟天药材分别按“2.3”项方法制备,按“2.1”项色谱条件测定并建立 HPLC 指纹图谱。将所得指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”,计算各样品指纹图谱

与生成的对照图谱的相似性系数。从各批巴戟天的 HPLC 图谱与相似性系数都可以看出：以蒽醌类成分评价药材质量，S1、S2、S6、S8 4 个产地相似度均在 0.900 以上，成分差异不明显；而 S3、S4、S5、S10 相似度均低于 0.800，成分差异显著。不同产地的同一药材各成分量是有差异的，说明巴戟天具有

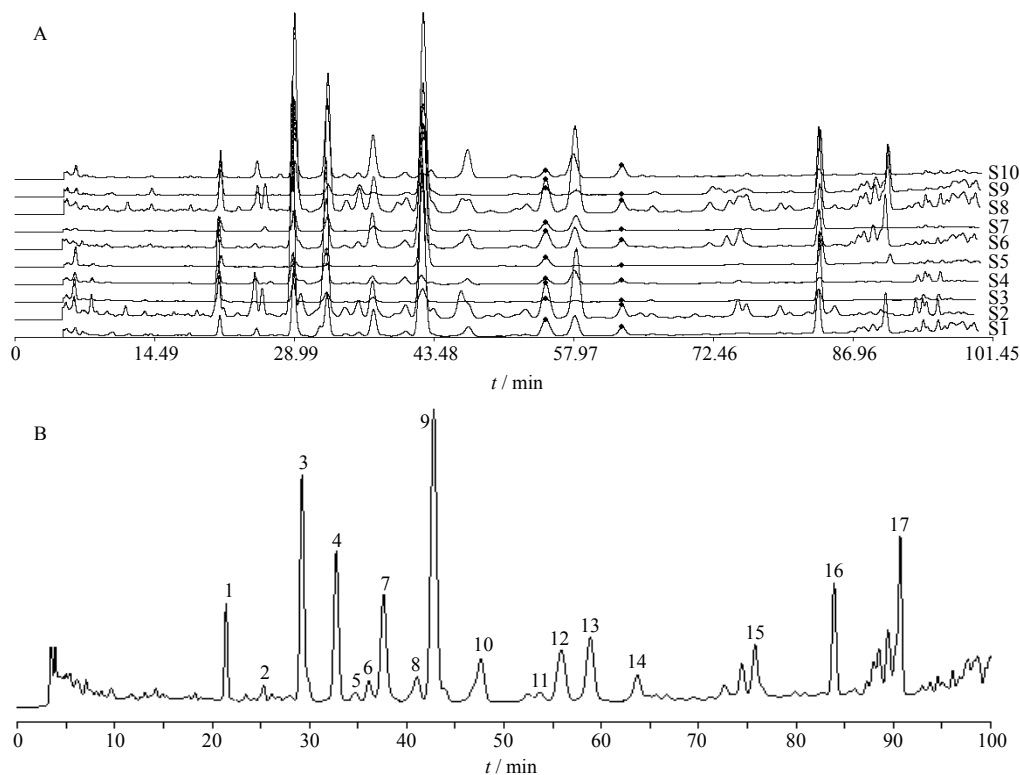
明显的地域性，优质品种、生态环境、物种资源和栽培条件均可能影响药材品质。还是主要产地的药材为优。结果见表 2、图 1。

本实验建立的具有 17 个共有峰的不同产地巴戟天蒽醌类成分 HPLC 共有模式，可确定为巴戟天蒽醌类成分指纹图谱共有模式。将 10 批巴戟天指纹

表 2 10 批巴戟天药材相似度结果

Table 2 Similarities of 10 batches of *Morindae Officinalis Radix*

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.798	0.677	0.549	0.917	0.921	0.947	0.906	0.928	0.461	0.957
S2	—	1.000	0.780	0.891	0.552	0.874	0.653	0.939	0.686	0.826	0.932
S3	—	—	1.000	0.695	0.530	0.723	0.561	0.720	0.664	0.579	0.765
S4	—	—	—	1.000	0.245	0.706	0.354	0.785	0.403	0.908	0.743
S5	—	—	—	—	1.000	0.729	0.981	0.699	0.882	0.116	0.791
S6	—	—	—	—	—	1.000	0.780	0.940	0.870	0.674	0.961
S7	—	—	—	—	—	—	1.000	0.783	0.898	0.229	0.857
S8	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.824	0.701	0.979
S9	—	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.249	0.877
S10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.000	0.660
R	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.000



3-1-甲氧基-2-羟基蒽醌 4-1, 2-二甲氧基-3-羟基蒽醌 9-甲基异茜草素-1-甲醚 13-1, 3-二羟基-2-甲氧基蒽醌 16-甲基异茜草素
 3-1-methoxy-2-hydroxyanthraquinone 4-1, 2-dimethoxy-3-hydroxyanthraquinone 9-rubiadin-1-methylether
 13-1, 3-dihydroxy-2-methoxyanthraquinone 16-rubiadin

图 1 10 批巴戟天 HPLC 指纹图谱 (A) 和共有模式 (B)

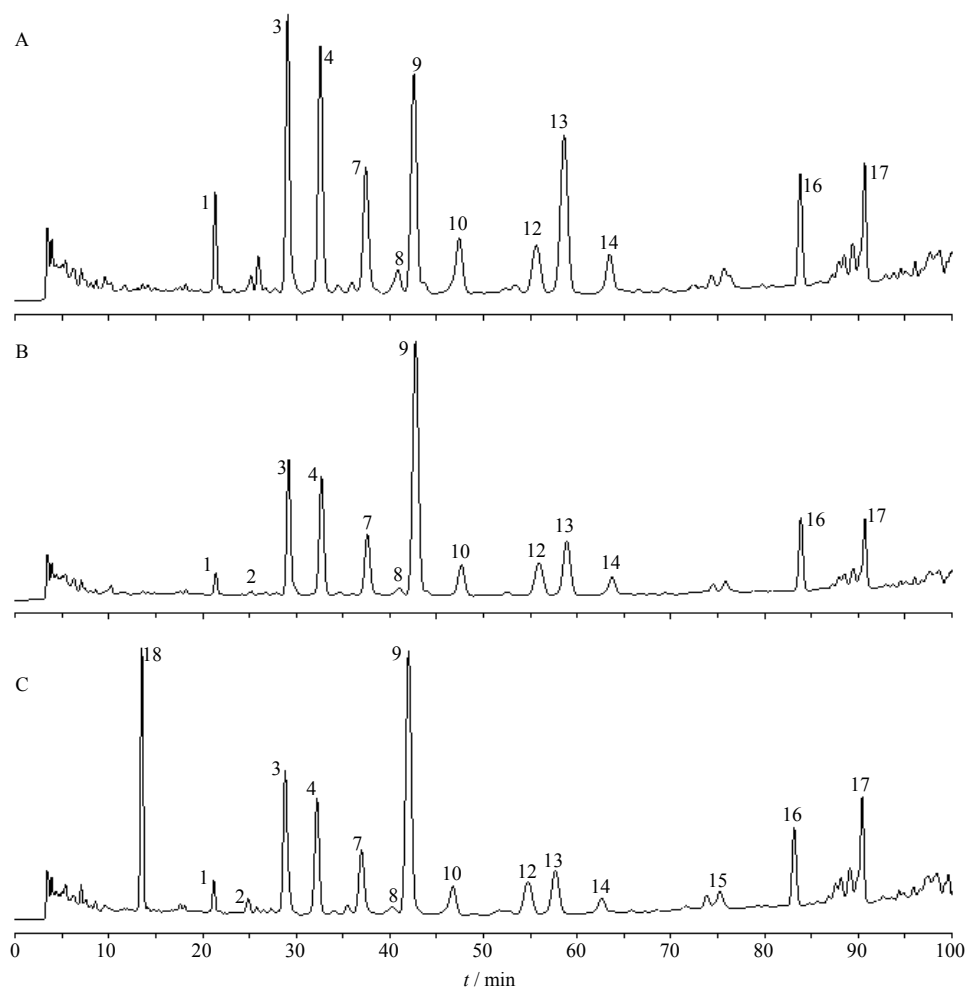
Fig. 1 Fingerprint (A) and common patterns (B) of 10 batches of *Morindae Officinalis Radix*

图谱中的主要共有峰与“2.2”项混合对照品储备液的色谱峰进行对照, 鉴别出 5 个共有成分: 1-甲氧基-2-羟基蒽醌、1,2-二甲氧基-3-羟基蒽醌、甲基异茜草素-1-甲醚、1,3-二羟基-2-甲氧基蒽醌、甲基异茜草素。

2.7.2 10批巴戟天不同炮制品 HPLC 指纹图谱的建立及相似度评价 将 10 批巴戟肉、盐巴戟、制巴戟分别按“2.3”项方法制备, 按“2.1”项色谱条件测定并建立 HPLC 指纹图谱。实验建立了巴戟肉、盐巴戟、制巴戟的共有模式并指出巴戟肉、盐巴戟各 5 个共有成分(分别为 1-甲氧基-2-羟基蒽醌、1,2-二甲氧基-3-羟基蒽醌、甲基异茜草素-1-甲醚、1,3-二羟基-2-甲氧基蒽醌、甲基异茜草素), 制巴戟 6

个共有成分(分别为甘草素、1-甲氧基-2-羟基蒽醌、1,2-二甲氧基-3-羟基蒽醌、甲基异茜草素-1-甲醚、1,3-二羟基-2-甲氧基蒽醌、甲基异茜草素)。巴戟天经甘草水炙后, HPLC 图谱上新增 1 个保留时间为 13 min 的峰面积较大的 18 号峰, 经混合对照品验证, 与甘草素的保留时间一致, 初步认定该新增成分为甘草素。10 批巴戟肉、盐巴戟、制巴戟共有模式及混合对照品指纹图谱, 见图 2、3。

将各个批次的巴戟天、巴戟肉、盐巴戟、制巴戟所得指纹图谱分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”, 计算各个批次炮制品指纹图谱与各自生成的对照图谱的相似性系数。结合指纹图谱, 巴戟天不同炮制品间蒽醌类成分差异不大,



3-1-甲氧基-2-羟基蒽醌 4-1,2-二甲氧基-3-羟基蒽醌 9-甲基异茜草素-1-甲醚 13-1,3-二羟基-2-甲氧基蒽醌
16-甲基异茜草素 18-甘草素, 图 3 同
3-1-methoxy-2-hydroxyanthraquinone 4-1,2-dimethoxy-3-hydroxyanthraquinone 9-rubiadin-1-methylether
13-1,3-dihydroxy-2-methoxyanthraquinone 16-rubiadin 18-liquiritigenin Fig. 3 is same

图 2 10 批巴戟肉 (A)、盐巴戟 (B) 和制巴戟 (C) 共有模式

Fig. 2 Common patterns of 10 batches of morinda pulp (A), salt-steamed *M. officinalis* (B), and licorice-processed *M. officinalis* (C)

但其量有变化。制巴戟与其他炮制品相似度差异较大,是由于在炮制过程中使用了辅料甘草和水,新增了成分甘草素。见图4、表3。

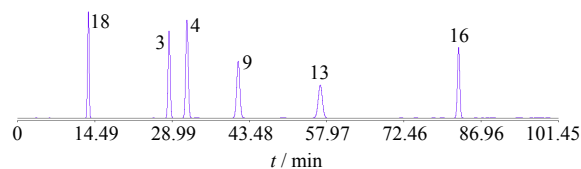


图3 混合对照品色谱图

Fig. 3 Chromatogram of hybrid reference substances

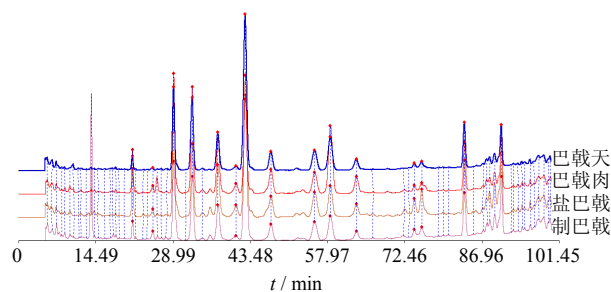


图4 巴戟天不同炮制品 HPLC 指纹图谱

Fig. 4 HPLC fingerprints of different processed *M. officinalis*

表3 各个批次4种炮制品相似度值与其各自对照图谱相比(中位数法)

Table 3 Similarities of four different processed *M. officinalis* in each batch compared with each reference chromatogram (median method)

饮片名称	相似度									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
生巴戟	0.998	0.834	0.973	0.972	0.999	0.985	0.988	0.939	0.978	0.992
巴戟肉	0.999	0.965	0.959	0.928	0.999	0.951	0.978	0.997	0.956	0.990
盐巴戟	0.962	0.995	0.974	0.974	0.996	0.982	0.988	0.994	0.979	0.978
制巴戟	0.621	0.930	0.671	0.595	0.882	0.918	0.933	0.955	0.804	0.865

3 讨论

在所建立的色谱条件下,色谱峰分离比较理想。巴戟天不同炮制品 HPLC 指纹图谱方法的精密度、稳定性和重复性实验结果表明此法稳定、可靠、重复性好,可以满足指纹图谱分析测试的要求。并通过10批次各炮制品的测定分析,建立了巴戟天4种炮制品的标准指纹图谱,并对不同炮制品间相似度进行了比较分析,且指认了6个指标成分:甘草素、1-甲氧基-2-羟基蒽醌、1,2-二甲氧基-3-羟基蒽醌、甲基异茜草素-1-甲醚、1,3-二羟基-2-甲氧基蒽醌、甲基异茜草素。相对于已有的图谱^[5-9]更加全面地阐述了不同炮制品之间的差异,为不同炮制品质量评价提供依据,并为揭示巴戟天炮制原理奠定科学基础。

本实验从各药材产地先后收集的10批巴戟天药材,通过测试,不同产地巴戟天质量差异显著。巴戟天具有明显的地域性,优质品种、生态环境、物种资源和栽培条件均可能影响药材品质。亟待优化物种资源,并建立简便、可靠的鉴别方法。巴戟天不同炮制品间蒽醌类成分差异不大,但其量有变化,制巴戟由于在炮制过程中使用了辅料甘草和水,出现新增成分甘草素,差异较大。甘草素是甘草中重要的黄酮类物质之一,具有抑菌、抗真菌、抗肿瘤、抗诱变、抗病毒、抗氧化、保肝等广泛的药理作用。对于研究制巴戟的药理作用具有指导意义。

《中国药典》2010年版载有巴戟天、巴戟肉、盐巴戟、制巴戟四种炮制品种。“补汤宜用熟”,“盐制引药入肾经”,“去心者免烦”等传统中医药理论认为,炮制品功效各异。但现今临床使用区分不是很明显,亟需找到巴戟天炮制前后化学成分差异,再结合药理药效,进一步揭示其炮制原理,为临床规范用药提供科学依据。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2010.
- [2] 陈美燕, 郭素华, 高佳, 等. 炮制方法对南靖巴戟天蒽醌含量的影响[J]. 实用中医药杂志, 2009, 25(12): 840-841.
- [3] 段淑娥, 李敏. 中草药中蒽醌化合物的研究进展[J]. 西安文理学院学报, 2005, 8(1): 24-28.
- [4] 全国中药炮制规范[S]. 1988.
- [5] 丁平, 楚桐丽, 徐吉银. 不同种质资源的巴戟天化学成分指纹图谱研究[J]. 华西药理学杂志, 2006, 21(1): 12-14.
- [6] 丁平, 徐吉银, 楚桐丽, 等. 不同农家类型巴戟天DNA与HPLC指纹图谱的质量评价研究[J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(13): 974-976.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 钟成, 许晓峰. 炮制方法对巴戟天蒽醌类成分指纹的影响研究[J]. 中药材, 2012, 43(7): 1049-1053.