

不同生长年限的巴戟天化学成分的指纹图谱

郭念欣, 李颖春, 蔡佳良, 姬生国*

(广东药学院中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:建立巴戟天 RP-HPLC 指纹图谱的分析方法,研究不同生长年限来源的巴戟天药材化学成分的变化。方法:采用 RP-HPLC 梯度洗脱技术进行分离分析,采用 ODS-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm 5 μm);流动相甲醇-0.4% 磷酸水的线性梯度洗脱,洗脱时间为 85 min,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,检测波长 360 nm,记录不同生长年限巴戟天的 RP-HPLC 指纹图谱。结果:巴戟天药材指纹图谱相似度较好,但不同生长年限采集的巴戟天药材指纹图谱有明显差异。结论:方法稳定,重复性好,可用于评价不同采集年限的巴戟天药材的质量;不同年限采集的巴戟天药材中化学组成相似,但相对比例有明显差异。

[关键词] 巴戟天;不同采收期;化学成分;指纹图谱;高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0065-04

Chromatographic Fingerprint of Components of *Morinda officinalis* in Different Harvest Period

GUO Nian-xin, LI Ying-chun, CAI Jia-liang, JI Sheng-guo*

(School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** The aim is to establish chromatographic fingerprint of *Morinda officinalis* in different harvest period by HPLC in order to control its quality. **Method:** A gradient elution mode was applied on a column ODS-C₁₈ (4.6 mm×250 mm 5 μm) at 30 ℃ with methanol-0.4% phosphoric acid as mobile phase. The detection wavelength was at 360 nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** Samples from different harvest period were high similarity but fingerprint graphics showed evident difference. **Conclusion:** The results of peak areas were in accordance with the request of fingerprint. The established fingerprint can be used for the quality control *M. officinalis* in different harvest period. But their ratios between each other are difference.

[Key words] *Morinda officinalis*; different harvest period; chemical composition; fingerprint; HPLC

巴戟天为广东省常见中药,为四大南药之一,有补肾阳、强筋骨、祛风湿之功效,临床多用于治疗阳痿遗精、宫冷不孕、月经不调等症^[1]。现代药理研究表明巴戟天具有增强性腺功能,同时促进皮质酮分

泌,促进细胞免疫等作用^[2]。传统的采收方法认为巴戟天栽培种植 3~5 年可以收获,常在秋冬季挖取,洗去泥沙,剪去茎和须根,日晒或火烘至 6~7 成干后,用木槌轻轻打遍,切成 2~4 寸的小段,再进行干燥。以肉质粗壮、心木细、色紫红、无杂物者为佳。但多数人认为,巴戟天生长时间越长,其质量越好,通过对不同生长年限巴戟天糖类物质^[3]及挥发性成分^[4]的研究,发现年久的巴戟天含有更多种的成分。为了进一步的研究巴戟天适宜的采收时间,本文特对同一产区、不同采收时间的巴戟天药材采用 HPLC 指纹图谱技术对其质量进行研究,以期解决巴戟天采收期与其质量的关系问题。

[收稿日期] 20110220(010)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2009B030801044),广东药学院博士启动基金项目(2007ZYX09)

[第一作者] 郭念欣,硕士研究生

[通讯作者] * 姬生国,教授,博士,从事中药资源、中药质量标准及中药新药研究, Tel: 020-39352327, E-mail: shengguo_ji@yahoo.cn

1 材料

1.1 药材 样品采集于广东省德庆市高良镇的巴戟天种植区,采收时间分别为 2 年、3 年、5 年、7 年生,每个样品均为 9 批,经广东药学院中药学院姬生国教授鉴定为茜草科(Rubiaceae)植物巴戟天 *M. officinalis* 的干燥根。

1.2 仪器 Aglient 高效液相色谱仪、色谱柱为 ODS- C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m 美国迪马公司), BP211b 电子天平(日本岛津公司), KP3200 型超声波清洗器(上海科岛超声仪器有限公司), 试验所用试剂除流动相为色谱纯外其余均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件 迪马 ODS- C_{18} 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m); 流动相甲醇-0.4% 磷酸水的线性梯度洗脱, 洗脱时间为 85 min, 流动相比比例 (32:74) 至 (40:60)。流速 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 360 nm, 进样量 10 μ L。

2.2 供试品溶液的制备 新鲜巴戟天药材, 纯净水清洗干净, 50 $^{\circ}$ C 烘干, 粉碎, 过 60 目筛, 精密称取 5 g, 置锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇溶液 50 mL, 超声提取 50 min, 放冷至室温后补足损失的溶剂量, 滤过, 滤液用分别用 30 mL 氯仿萃取 2 次, 合并氯仿溶液, 水浴蒸干, 残渣加甲醇定容至 2 mL 量瓶中, 经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤。

2.3 测定方法 精密吸取供试品溶液 10 μ L 注入液相色谱仪, 记录 85 min 色谱图。

2.4 巴戟天指纹图谱的方法学考察

2.4.1 精密度 取不同年份的 1 号药材, 按 2.1 项下条件重复进样 6 次, 共有峰 t_R 及峰面积比值的 RSD 均 $<3\%$, 符合指纹图谱要求。

2.4.2 稳定性 取不同年份的 1 号药材, 按 2.1 项下条件于 0、2、4、6、12、24 h 进样检测, 共有峰 t_R 及峰面积比值的 RSD 均 $<3\%$, 符合指纹图谱要求, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性 精密称取 6 份同一批药材粉末, 按 2.2 项下方法平行制得 6 份供试品溶液共有峰 t_R 及峰面积比值的 RSD 均 $<5\%$, 符合指纹图谱要求。

2.5 样品的测定 不同年限采集的巴戟天样品各 9 份, 按 2.2 项下制得供试品溶液, 在 2.1 项下条件进行测定 HPLC 图谱。见图 1。

2.6 各年份巴戟天 HPLC 指纹图谱的构建

2.6.1 各年份巴戟天 HPLC 指纹图谱的共有峰的

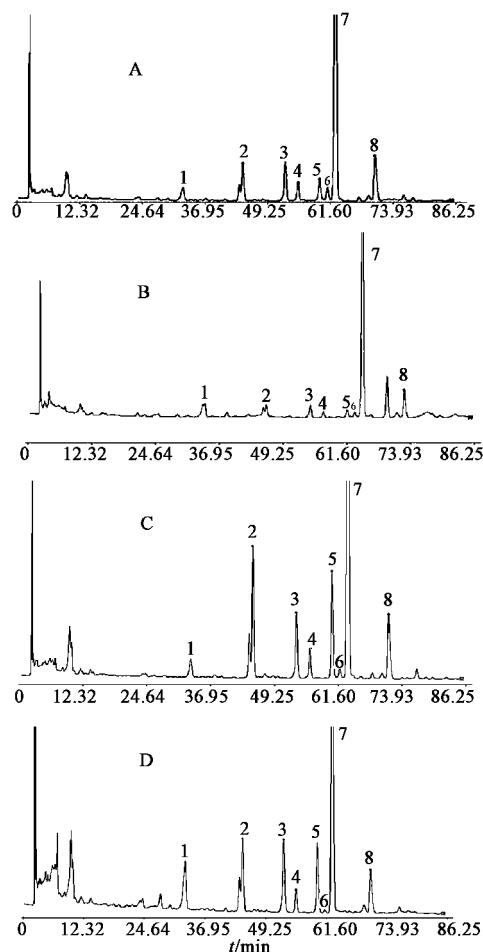


图 1 不同年份巴戟天指纹图谱

A. 2 年生; B. 3 年生; C. 5 年生; D. 7 年生

标定 将不同批次的 2 年、3 年、5 年、7 年巴戟天样品的 HPLC 指纹图谱分别进行匹配, 利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版 (2004A)》对指纹图谱数据进行评价。结果可见各年份巴戟天的 HPLC 指纹图谱中分别有 8 个共有色谱峰, 分别选择各年份的巴戟天指纹图谱中的 7 号色谱作为参照峰来计算相对保留时间和相对峰面积。叠加峰见图 2。

2.6.2 共有峰保留时间和峰面积 各年份的巴戟天指纹图谱以 7 号峰的保留时间和峰面积为 1, 计算其他各峰的相对保留时间和相对峰面积。相对保留时间的 RSD $<3\%$, 不同年份的指纹图谱的重现性较好, 但各批样品之间共有指纹峰的相对峰面积存在一定的差异, 证明不同批次的样品在含量上存在一定的差异。

2.6.3 相似度的计算 通过《中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版 (2004A)》软件计算各样品间

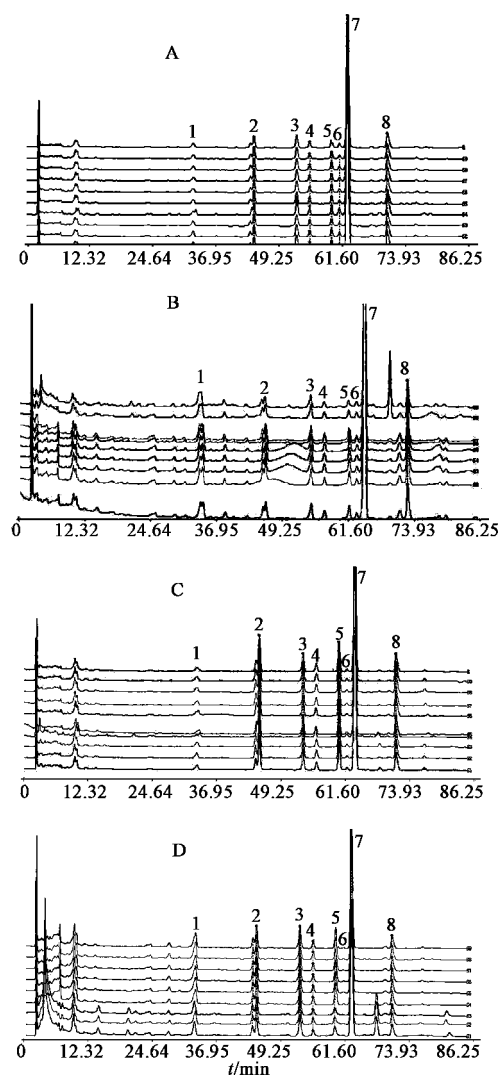


图2 不同年份巴戟天指纹图谱叠加

A. 2年生; B. 3年生; C. 5年生; D. 7年生

的相似度。以不同年份的巴戟天测定结果拟定各自的 HPLC 指纹图谱的共有模式,并以此共有模式为对照计算各年份巴戟天的相似度,从指纹图谱相似程度结果来看,各样品间相似程度达到 0.95 以上,这表明所建立的指纹图谱的技术指标稳定,重现性好。见表 1。

2.7 各样品测定及各图谱比较 通过对不同年份的巴戟天指纹图谱的对比(图 3),发现化学物质比例相差甚远。 S_1-S_4 分别代表 2 年 3 年 5 年 7 年生巴戟天的对照指纹图谱,对此进行相似度分析,依次为 0.996 0.949 0.993 0.975,发现不同年份相似程度达 0.9 以上,相似程度比较高,有良好相关性。7 号峰在各个图谱中,峰面积比例最大,可认为是主要成分;但其他色谱峰年份增长呈现不同的变化,如 1 号

表 1 不同年份巴戟天指纹图谱的相似度

No.	2 年生	3 年生	5 年生	7 年生
S_1	0.999	0.999	0.997	0.984
S_2	0.999	0.999	1.000	0.992
S_3	0.999	0.999	0.999	0.969
S_4	0.999	0.997	0.997	0.996
S_5	0.999	0.999	0.999	0.996
S_6	0.999	0.999	1.000	0.997
S_7	0.999	0.999	1.000	0.994
S_8	0.999	0.989	1.000	0.979
S_9	0.999	0.977	1.000	0.981

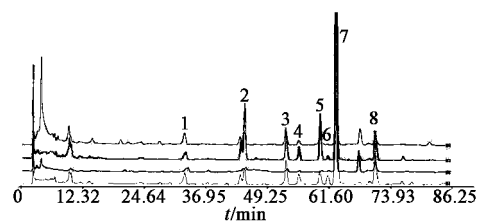


图3 4种不同年生巴戟天的指纹图谱叠加

峰的峰面积与时间呈正比例增长,而 6 号峰的峰面积随时间增长而衰减;在不同年份的指纹图谱中,明显 5 年生的巴戟天相对其他年份,其各峰峰面积较大,各成分含量更高,质量最优;各指纹图谱显示各个物质也不一定与年份呈线性关系,在 8 号峰前的色谱峰,在各年份的不同批次间不稳定的出现,此物质可能不稳定。

3 结论

通过对比加热回流提取与超声波提取,发现相同色谱条件下的指纹图谱基本无差别,因此选用超声波提取的方法。通过对不同浓度的提取溶剂,包括对比了 50%、70%、90% 的乙醇作为提取溶剂进行提取,最后得出各个图谱,对比各个图谱后,发现用 70% 甲醇提取的样品溶出率高,峰型尖锐,肩峰出现较小,基线比较平直,因此选择 70% 乙醇作为提取溶剂。

通过对不同比例甲醇-0.4% 磷酸溶液的流动相进行反复试验,尝试了等度洗脱以及多种梯度洗脱的比例最后确定以甲醇-0.4% 磷酸水溶液(32:74)洗脱至甲醇-0.4% 磷酸溶液(40:60)为最佳,各色谱峰分离度好,峰型尖锐,保留时间适中。

HPLC 测定复方止呕颗粒剂中 6-姜酚的含量

冯果¹, 刘文^{1*}, 张永萍¹, 马雯雯², 冯泳¹

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 中国人民解放军第一医院药剂科, 兰州 730030)

[摘要] 目的: 建立复方止呕颗粒剂中 6-姜酚含量的测定方法。方法: 采用高效液相色谱法测定复方止呕颗粒剂中 6-姜酚含量。色谱柱 Agilent C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水 (65:35), 流速 0.8 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL, 检测波长 280 nm。结果: 6-姜酚在 0.113 5 ~ 2.270 0 μg 与峰面积呈良好的线性关系, 回归方程为 $Y = 540\,646X - 1\,188$ ($r = 0.999\,9$, $n = 6$), 平均回收率为 99.90%, RSD 1.14%。结论: 方法简便可行、重复性好, 可作为复方止呕颗粒剂中 6-姜酚的含量测定方法。

[关键词] 高效液相色谱; 复方止呕颗粒剂; 6-姜酚; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0068-03

Content Determination of 6-gingerol in Antiemetic Compound Particles by HPLC

FENG Guo¹, LIU Wen^{1*}, ZHANG Yong-ping¹, MA Wen-wen², FENG Yong¹

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;

2. People's Liberation Army First Hospital Pharmacy, Lanzhou 730030, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determining 6-gingerol in Antiemetic compound particles.

Method: 6-gingerol in decoction of Antiemetic compound particles was determined by HPLC. The column was Agilent

[收稿日期] 20110121(006)

[基金项目] 贵州省中药现代化专项研究课题(黔科合社字[2008]5025号)

[第一作者] 冯果, 药学工程师, 执业药师, 研究方向: 中药新制剂、新剂型研究, Tel: 13985498136, E-mail: 453989352@qq.com

[通讯作者] * 刘文, 教授, 研究方向: 中药新制剂研究, E-mail: Liuwen16258@sina.com

本实验建立了 2 年、3 年、5 年、7 年生各 9 批的巴戟天 HPLC 指纹图谱, 相似度在 0.95 以上, 说明该指纹图谱可以代表各年生巴戟天的鉴别特征。通过不同年份的 HPLC 指纹图谱比较, 可以直观的对其进行区分。因此, 该方法可以从整体性、特征性等科学地判断药材或药物的真假伪劣。该方法稳定, 可靠, 重现性好, 对保证巴戟天的质量提供了参考依据。根据实验结果显示, 5 年生长的巴戟天的质量优于 2 年、3 年以及 7 年生的巴戟天, 因此, 最适宜采收巴戟天的时间为第 5 年。

研究过程中我们发现巴戟天质量受其原料、炮制时间、炮制工艺、含水量等因素的影响很大, 因此

需要建各个因素的分析方案, 以实现准确的定性分析和判别。

[参考文献]

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 573.
- [2] 徐超斗, 张永祥, 杨明, 等. 巴戟天寡糖的促免疫活性作用[J]. 解放军药学学报, 2003, 19(6): 466.
- [3] 王卫平. 不同生长年限巴戟天中巴戟多糖含量比较[J]. 广东药学, 1996(4): 31.
- [4] 洪祖灿, 胡军, 伊勇涛, 等. 不同生长年份巴戟天挥发性成分的比较[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(9): 4115.

[责任编辑 蔡仲德]