

巴戟天药材寡糖化学成分的高效阴离子交换色谱-脉冲安培电化学检测器指纹图谱研究

丁平,邵艳华,应鸽,廖慧君,仰铁锤(广州中医药大学中药学院,广州 510405)

摘要:目的 建立巴戟天药材寡糖化学成分的高效阴离子交换色谱-脉冲安培电化学检测器(HPAEC-PAD)特征指纹图谱,为制定巴戟天药材质量标准提供参考数据。方法 利用 HPAEC-PAD,色谱条件为 Hamilton RCX-10 (4.1 mm × 250 mm, 7 μm), 100 mmol · L⁻¹ NaOH 溶液(A) 400 mmol · L⁻¹ NaOH 500 mmol · L⁻¹ NaAc 混合溶液(B) 流动相 梯度洗脱,流速为 0.8 mL · min⁻¹,柱温为 30 ℃,检测电压 0.1 V,分析时间为 40 min。结果 建立了巴戟天药材寡糖化学成分的 HPAEC-PAD 指纹图谱,并标定出巴戟天药材 20 个共有峰,其中 3 个峰经与对照品比对为蔗糖三糖、耐斯糖(nystose)、1F-果呋喃糖基耐斯(1F-fructofuranosylnystose)经指纹图谱系统解决方案软件(Chromafinger™)生成共有模式,并进行相似度和主成分分析。不同产地巴戟天药材均含有以上共有峰,但在共有峰的峰高上有差异,并可用于区别巴戟天及其常见混伪品。结论 利用该方法建立的巴戟天寡糖类化学成分的指纹图谱特征性和专属性强,且该方法快速、灵敏、可靠,可用于控制巴戟天药材的质量。

关键词:巴戟天;寡糖;高效阴离子交换色谱-脉冲安培电化学检测器;指纹图谱

中图分类号:R284 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2011)22-1707-05

Study on HPAEC-PAD Fingerprint Analysis of Oligosaccharides from *Morinda officinalis*

DING Ping, SHAO Yan-hua, YING Ge, LIAO Hui-jun, YANG Tie-chui (College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the chromatographic fingerprint of oligosaccharides by high performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) method for the quality control of *Morindae officinalis* Radix. **METHODS** The HPAEC-PAD method was performed on a Hamilton RCX-10 (4.1 mm × 250 mm, 7 μm) by gradient elution with a mixed mobile phase of 100 mmol · L⁻¹ NaOH water solution(A) 400 mmol · L⁻¹ NaOH and 500 mmol · L⁻¹ NaAc water solution(B) at a flow rate of 0.8 mL · min⁻¹. The detection was done at 0.1 V and 30 ℃. The analysis time was 40 min. **RESULTS** The HPAEC-PAD fingerprint chromatogram of *Morinda officinalis* was built and 20 characteristic peaks were pointed out, of which 3 peaks were identified as kestose, nystose, and 1F-fructofuranosylnystose by comparison with chemical reference substance. The common pattern of HPAEC-PAD fingerprints from the 10 batches of *Morinda officinalis* samples from GAP bases were obtained through 'Chromafinger 2005' solution software, and authentication and quality assessment were analyzed by Similarity and Principle Component Analysis. **CONCLUSION** The method is simple, rapid and specific. It can be used to identify *Morindae officinalis* Radix and evaluate its quality.

KEY WORDS: *Morinda officinalis*; oligosaccharide; HPAEC-PAD; chromatographic fingerprint

巴戟天为茜草科植物巴戟天(*Morinda officinalis* How)的干燥根,具有补肾阳,强筋骨,祛风湿的作用^[1],主要活性成分为蒽醌、环烯醚萜、寡糖、多糖等。随着现代科学的发展,巴戟天的化学和药理研究愈来愈深入,尤其是现代化学及药理学研究表明,巴戟天寡糖为菊淀粉型低聚糖系列,具抗抑郁、增强免疫、促进生精、治疗心血管疾病等作用的揭示^[2-5],巴戟天及其相关健康产品的开发和临床应用越来越受到人们的欢迎,市场需求量激增,但由于缺乏相关

的品质评价指标和方法,造成巴戟天质量下降。因此,本实验以巴戟天寡糖为指标,开展巴戟天药材 HPLC 指纹图谱的研究,旨在为制定巴戟天药材及其制剂的质量标准奠定基础。

近年来糖类化合物的研究越来越受到国内外日益广泛的重视,并且逐渐认识到中药中含有大量的水溶性物质,与寡糖和多糖的作用密不可分^[6-8]。但由于寡糖和多糖分子缺乏生色团或荧光团,且寡糖有相似的化学组成,多种可能的异构体,多种连接

基金项目:广东省自然科学基金重点项目(06105061)

作者简介:丁平,女,教授 研究方向:中药资源与中药质量评价研究

Tel: (020) 36586905

E-mail: dingpinggz@126.com

方式和分支形式,检测较为困难,目前寡糖的常见的检测方法主要有:质谱、核磁共振、气相或液相色谱、电泳技术、酶学技术等^[9-11],其中 HPLC 用于糖类分析已有很多年时间,检测器大多为示差折光检测器、蒸发光检测器、电化学检测器、荧光检测器、质量检测器等,所用柱子多为氨基柱、离子交换色谱柱、凝胶色谱柱等^[10]。由于 HPLC 电化学检测的灵敏度、可靠性、简易性,特别适合分析宽范围的化合物,因此目前已广泛用于中药分析以及中药药动学的研究中^[12-13]。本实验利用高效阴离子交换色谱-脉冲安培电化学检测器(HPAEC-PAD),对巴戟天药材寡糖类化合物进行系统的指纹图谱的研究,结果报道如下。

1 仪器与试剂

ICS2500 离子色谱仪(美国 Dionex 公司),主要包括 ED50 电化学检测器,GP50 四元泵,LC25 柱温箱等;安培检测器用 Au 工作电极, pH-Ag/AgCl 复合参比电极,氧化模式;检测电压:0.1 V;色谱数据采集和处理采用 Chromeleon 色谱工作站。所用溶液均用电阻率为 18.3 MΩ·cm 水配制。化学对照品蔗糖、耐糖糖及 1F-果呋喃糖基耐糖糖(日本 Wako 公司,批号: 298-64101, 292-64121, 299-64131)。基地样品 10 批[2009 年 12 月采自广东省(GD)德庆高良镇规范化种植(GAP)基地],并采集和保存不同生长年限的样品(1~5 年生样品 5 份,约 10 年野生样品 2 份),其他样品采自福建(FJ)、广西(GX)、海南(HN)等省的 21 个样品,经丁平教授鉴定为巴戟天(*Morinda officinalis* How)的干燥根;常见混伪品鸡眼藤(*Morinda parvifolia* Bartl. et DC.)、羊角藤(*Morinda umbellate* Linn. subsp. *Obovata* Y. Z. Ruan)和假巴戟天(*Morinda shuanghuaensis* C. Y. Chen et M. S. Huang)购于广州市清平市场,凭证标本存于广州中医药大学中药资源研究室。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Hamilton RCX-40 (4.1 mm×250 mm 7 μm,美国 Hamilton 公司)。淋洗液: A 为 100 mmol·L⁻¹ NaOH 溶液, B 为 100 mmol·L⁻¹ NaOH 和 500 mmol·L⁻¹ NaAc 混合溶液,梯度洗脱程序见表 1。淋洗流速: 0.8 mL·min⁻¹,柱温: 30℃;进样体积: 25 μL。对照品和样品的色谱图见图 1。

2.2 脉冲安培检测条件

糖的四电位脉冲安培检测波形见表 2。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取蔗糖、耐糖糖、1F-果呋喃糖基耐糖糖对照品适量,加水配制成质量浓度为 0.40, 0.48, 0.50 mg·mL⁻¹ 的混合对照品储备溶液。取混合对照品储备溶液 0.5 mL,以水定容至 5 mL,作为混合对照品溶液,冷藏备用。

2.4 供试品溶液的制备

取各样品粉末 0.5 g(过 120 目筛),精密称定,置具塞锥形瓶中,加乙酸乙酯 30 mL,超声提取 30 min,过滤弃去,挥干,残渣精密加入体积分数 70% 乙醇 50 mL,称定质量,超声处理(功率 300 W,频率 25 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,以体积分数 70% 乙醇补足减失的质量,摇匀,过 0.2 μm 微孔滤膜,取续滤液,得供试品溶液。

表 1 糖分离的梯度淋洗条件

Tab. 1 Chromatographic gradient elution condition for the separation of sugars

t/min	A/%	B/%
0	90	10
5	90	10
15	80	20
30	50	50
35	50	50
40	100	0

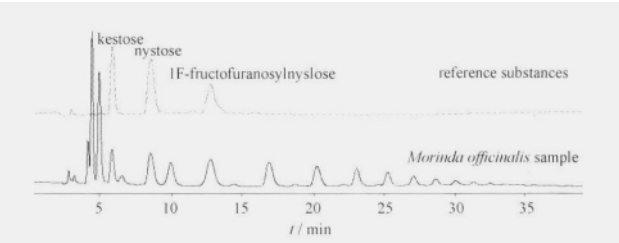


图 1 对照品和巴戟天样品溶液的 HPLC 色谱指纹图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substances and samples

表 2 糖的电化学检测的四电位波形

Tab. 2 Detection waveform for sugar detection

t/s	Potential/V	Integration
0	0.10	
0.20	0.10	Start
0.40	0.10	End
0.41	-2.00	
0.42	-2.00	
0.43	0.60	
0.44	-0.10	
0.50	-0.10	

2.5 测定方法

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 25 μL 注入离子色谱仪测定,记录 40 min 的色谱图。

3 结果

3.1 精密度考察

精密吸取巴戟天样品(No. 001)溶液 25 μL 连续进样 5 次,考察色谱峰保留时间的一致性,各主要色谱峰保留时间和峰面积基本一致。在同一台仪器所测得的指纹图谱与其共有模式图谱相似度大于 0.98(中位数)符合指纹图谱操作技术的要求。

3.2 重复性考察

取同一批号的样品 5 份,按“2.1”项下方法操作,考察色谱峰保留时间的一致性,各样品指纹图谱与其共有模式图谱相似度大于 0.99,符合指纹图谱操作技术的要求。

3.3 稳定性考察

精密吸取巴戟天样品(No. 001)溶液 25 μL ,分别在 1, 6, 8, 12, 24 h 连续测定 5 次,以选定的色谱峰为主要观测指标,考察色谱峰保留时间的一致性,各主要色谱峰保留时间和峰面积基本一致,与其共有模式图谱相似度大于 0.99,表明在 24 h 内供试品溶液稳定性良好。

3.4 巴戟天药材寡糖 HPAEC-PAD 指纹图谱的特征峰

根据 10 批广东省德庆高良镇规范化种植基地(GAP)巴戟天药材指纹图谱的检测结果,利用指纹图谱系统解决方案软件(Chromafinger™)生成巴戟天药材寡糖共有模式的指纹图谱(图 2),其中主要共有色谱峰 20 个,经与化学对照品对比,4, 6, 8 号峰分别为蔗果三糖、耐斯糖、1F-果呋喃糖基耐斯糖,2~3 号峰则为葡萄糖、蔗糖,9~20 号峰则分别呈梯度下降,巴戟天寡糖的基质辅助激光解吸附飞行时间质谱 MALDI-TOFMS 表明^[14],巴戟天菊淀粉型低聚糖系列中每一种寡糖相对分子质量相差为 162,即每高一级的寡糖为比前一种寡糖多一个果糖的寡糖,并且呈有规律性的递增,这种规律性的变化为评价巴戟天寡糖的质量奠定了基础。

3.5 不同产地巴戟天药材寡糖 HPAEC-PAD 指纹图谱的相似度评价

不同产地的巴戟天药材样品,记录指纹图谱(图 3),并按照指纹图谱系统解决方案软件(Chromafinger™)对各产地的巴戟天药材指纹图谱进行数据处理,与指纹图谱共有模式相对比,相似度见表

3 除广东省以及福建省几个样品的相似度大于 0.95,其他产地的巴戟天药材寡糖指纹图谱相似度均差别较大,这可能与巴戟天为多年生药材,采收季节、采收时间、贮藏方式等因素对其次生代谢产物影响较大有关。因此,要保证巴戟天药材质量,必须对巴戟天进行规范化种植和管理(GAP)。

3.6 不同生长年限巴戟天药材寡糖 HPAEC-PAD 指纹图谱的相似度评价

不同生长年限巴戟天药材样品,记录指纹图谱,并按照指纹图谱系统解决方案软件(Chromafinger™)对生长年限巴戟天药材指纹图谱进行数据处理,与指纹图谱共有模式相对比,见图 4。从图 4 中可看出,相似度分别为 0.473 5、0.558 3、0.646 8、0.860 6、0.972 9、0.334 6、0.365 6,不同生长年限巴戟天药材指纹图谱差别较大,其中以 5 年生指纹图谱峰高较明显,而野生 10 年以上的样品则寡糖含量逐渐减少,单糖的含量却明显增加,可能与年限长的样品在生长发育过程中是否寡糖发生降解有关。这与文献报道相似^[15],随着种植年限的增加,巴戟天寡糖的量也逐渐增高,因此,巴戟天采收年限以

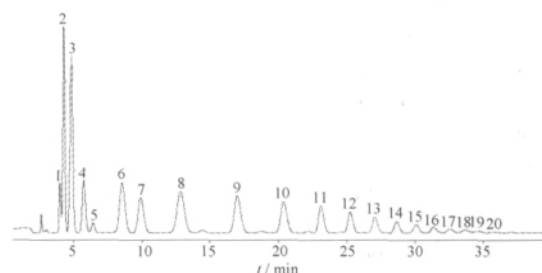


图 2 巴戟天寡糖指纹图谱共有模式(CP,双高斯曲线图)

4-蔗果三糖;6-耐斯糖;8-1F-果呋喃糖基耐斯糖

Fig. 2 Typical fingerprint chromatogram of *Morinda officinalis* oligosaccharides

4-kestose;6-nystose;8-1F-fructofuranosylnystose

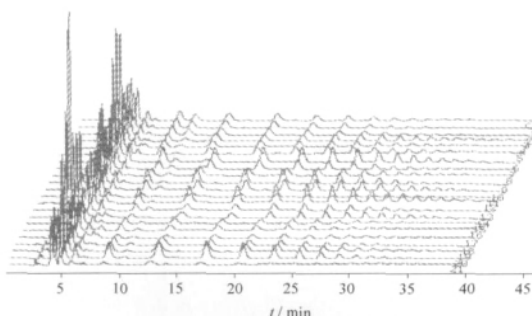


图 3 不同产地巴戟天药材寡糖 HPAEC-PAD 指纹图谱

Fig. 3 HPAEC-PAD Fingerprints of oligosaccharide in samples from different areas

5~6 年为宜。

3.7 巴戟天药材寡糖 HPAEC-PAD 指纹图谱与常见混伪品的对比研究

不同产地的常见混伪品样品,按“2.3”制备供试品溶液,记录指纹图谱,并按照指纹图谱系统解决方案软件(Chromafinger™)对常见巴戟天混伪品药材指纹图谱进行数据处理,与巴戟天指纹图谱共有模式相对比,见图5。通过软件相似度分析,这4种混伪品 HPAEC-PAD 指纹图谱相似度值分别为0.293 9、0.157 9、0.149 7、0.181 2,仅鸡眼藤含有单糖类成分。因此,可以很明显地区别巴戟天及其常见混伪品。

4 讨论

4.1 近几年,随着分子生物学、生物化学、药物化学等前沿交叉学科快速发展,人们对中药中所含糖的种类尤其是对寡糖的构效关系的认识逐渐提高,

使寡糖的应用和开发成为近期研究的热点^[7]。由于糖类化合物水溶性强,极性较高,为其分离分析带来了困难。HPAEC-PAD 所用金电极,是碳水化合物分析的理想电极,逐渐受到中药研究人员的重视。本实验利用该方法对巴戟天所含系列寡糖进行指纹图谱的研究,不仅分离得到20个专属性较强的特有峰(部分峰应是多糖类化合物),且在短时间内使各个化合物达到较好的分离度,为巴戟天寡糖类化合物质量标准的制定奠定了良好的基础。

4.2 由于脉冲安培检测器的高灵敏度和选择性,在测定糖类化合物时应注意,对流动相的温度、溶液用水、pH 等因素的变化比较敏感,因此在实验操作中要严格控制实验条件。脉冲安培检测器在测定和分析巴戟天寡糖指纹图谱时,具有灵敏度高、分析速度快,样品不需要前处理,且检测下限可达到 ng · L⁻¹ 级的特点,因此,该方法可满足对巴戟天质量检测的要求。

表3 不同产地巴戟天药材 HPAEC-PAD 指纹图谱共有峰的相似度

Tab. 3 Similarity of HPAEC-PAD fingerprints of samples from different areas

No.	Production places	Similarity	No.	Production places	Similarity
001	GAP base of Gaoliang zhen, GD	0.953 3	012	Nanqiao village, Hexi zhen, FJ	0.585 3
002	GAP base of Gaoliang zhen, GD	0.957 6	013	Lixing village, Fushi zhen FJ	0.560 1
003	Linban village, Hexi zhen, FJ	0.951 4	014	Longyan shi, FJ	0.770 9
004	Guzhu village, Rongding country, FJ	0.660 3	015	Dashi zhen, Qinzhou shi GX	0.914 0
005	Hushan village Rongding country, FJ	0.964 5	016	Yaozu village, Nanping country, GX	0.744 5
006	Hushan village Rongding country, FJ	0.865 1	017	Shiwandashan, Shangxi country, GX	0.716 4
007	Linban village, Hexi zhen, FJ	0.569 2	018	Jianfengling nanya forest farms, HN	0.921 0
008	Linban village, Hexi zhen, FJ	0.963 5	019	Jianfengling nanya forest farms, HN	0.947 6
009	Hexi village, Hexi zhen, FJ	0.860 5	020	Jianfengling nanya forest farms, HN	0.784 3
010	Yingxin village, Hexi zhen, FJ	0.692 0	021	Jianfengling nanya forest farms, HN	0.676 6
011	Yuanwei village, Hexi zhen, FJ	0.895 1			

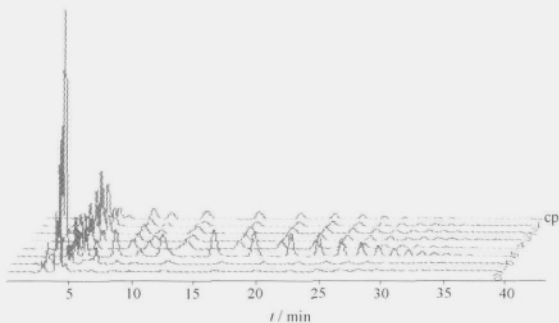


图4 不同生长年限及野生巴戟天寡糖 HPAEC-IPAD 色谱图

1 - CP 共有模式;2~6 - 1~5 年生巴戟天;7~8 - 约 10 年野生巴戟天

Fig. 4 HPAEC-IPAD Fingerprints of oligosaccharidse in *Morinda officinalis* at different stages

1 - typic mode;2~6 - 1~5 years samples;7~8 - about 10 years samples

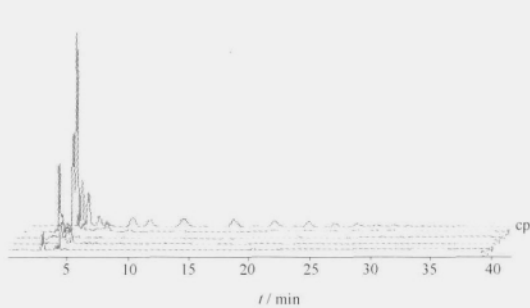


图5 巴戟天及其常见混伪品寡糖 HPAEC-IPAD 色谱图

1 - CP 共有模式;2 - 鸡眼藤(广东);3 - 鸡眼藤(福建);4 - 羊角藤;5 - 假巴戟天

Fig. 5 HPAEC-IPAD Fingerprints of oligosaccharidse in adultants

1 - typic mode;2 - *Morinda parvifolia* (Guangdong);3 - *Morinda parvifolia* (Fujian);4 - *Morinda umbellata*;5 - *Morinda shuanghuaensis*

REFERENCES

- [1] Ch. P (2010) Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 75-76.
- [2] CUI C B, YANG M, YAO Z W, *et al.* Studies on the antipressant active constituents in the roots of *Morinda officinalis* How [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1995, 20 (1): 36-39.
- [3] DING P, LIANG Y J, LIU J, *et al.* Effect of morinda officinalis oligosaccharides on sperm product in mice [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志) 2008, 43(19): 1467-1470.
- [4] FENG G Q, YANG J K, YU S, *et al.* Angiogenesis promoting effect of *Morinda officinalis* oligosaccharides on chicken embryo chorioallantoic membrane [J]. *Chin Pharmacol* (中国药理通讯) 2007, 24(3): 26-26.
- [5] CUI C B, YANG M, YAO Z W, *et al.* Studies on proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance of inulin-type oligosaccharides [J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 1995, 5 (1): 32-39.
- [6] SHI J L, YANG J, XU X L, *et al.* The effect of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharides on the damage induced by glutamate in hippocampal neurons [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2009, 26(3): 357-361.
- [7] HAO L H, CHEN L, ZHONG N, *et al.* Separation, purification and structure of burdock oligosaccharide [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2005, (7): 1242-1247.
- [8] CHEN L H, LI W D, YANG J, *et al.* Ganoderma lucidum polysaccharides accelerated IEC-6 cells proliferation, migration and differentiation [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2009, 44 (4): 270-273.
- [9] YAO X S, WU L J. *The Spectram Analysis of Organic Compounds* (有机化合物的光谱分析) [M]. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press 2006.
- [10] SEIDEL V, BAILLEUL F, WATERMAN P G. Novel oligosaccharides from the stem bark of *Cleistopholis glauca* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(1): 716-720.
- [11] LIU H, BAI X F, DU Y G, *et al.* Recent advances in study on bioactivities of oligosaccharide [J]. *Fine Special Chem* (精细与专用化学品) 2005, 13(9): 1-6.
- [12] PANG Y Y, LIANG L N, CAI Y Q, *et al.* Analyse of sugars in beer and wort using high performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection [J]. *Chin J Chrom* (色谱), 2008, 26(5): 626-630.
- [13] YUAN Z Z, LIU X X, ZHENG X H, *et al.* Simultaneous determination of quercetin and luteolin in dried flowers by multivariate HPLC-ECD calibration [J]. *Chromatographia*, 2007, 66(7-8): 354-360.
- [14] DING P. Study on the systematic establishment of quality control method of *Morinda officinalis* How [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine 2004.
- [15] XU J Y, LIANG Y J, DING P. Study on the different stages of monotropein contents in the roots of *Morinda officinalis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2007, 38(5): 772-774.

(收稿日期: 2011-01-04)

鱼腥草花药发育的组织化学

林美珍¹, 蔡扬帆¹, 马燕², 田惠桥^{2*} (1. 漳州卫生职业学院药学系 福建 漳州 363000; 2. 厦门大学生命科学学院 福建 厦门 361005)

摘要:目的 揭示鱼腥草花药发育中营养成分的分布和转化特征。方法 花药做半薄切片经植物组织化学染色后, 进行显微观察。结果 鱼腥草花药发育中, 花药壁的表皮、药室内壁始终分布着一些淀粉颗粒; 绒毡层细胞在小孢子母细胞时期出现了质壁分离的异常现象; 成熟的花粉粒积累的脂类物质不丰富。结论 花粉贮藏的营养物质是脂类物质, 但不丰富, 造成花粉粒败育。

关键词:鱼腥草; 花药发育; 淀粉; 脂类物质

中图分类号: R282.7 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)22-1711-04

Phytohistochemistry on Developing Anthers of *Houttuynia cordata*

LIN Mei-zhen¹, CAI Yang-fan¹, MA Yan², TIAN Hui-qiao^{2*} (1. Department of Pharmacy, Zhangzhou Health Vocational College, Zhangzhou 363000, China; 2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To reveal the feature of distribution and conversion of the nutritional ingredients during anther development of *Houttuynia cordata*. **METHODS** Semithin sections of anthers by phytohistochemistry were observed under light-microscope. **RESULTS** Some starches distributed in epidermis and endothecium. The abnormality of plasmolysis appeared in tapetal cells at the period of microspore mother cell. Lipids accumulation was not abundant in mature pollen grains during the anther development.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30970275)

作者简介: 林美珍, 女, 硕士, 副教授 研究方向: 药用植物学 * 通讯作者: 田惠桥, 男, 教授, 博士生导师 研究方向: 植物发育生殖学
Tel: (0592) 2186486 E-mail: htqian@xmu.edu.cn