

巴戟天寡糖的高效薄层色谱指纹图谱研究

廖慧君, 赖正权, 仰铁锤, 丁平* (广州中医药大学中药学院, 广州 510405)

摘要: 目的 建立巴戟天寡糖的高效薄层色谱(HPTLC)指纹图谱,并对不同产地巴戟天药材、炮制饮片、混伪品及含巴戟天药材的复方制剂——口服液X中寡糖成分进行分析比较。方法 在湿度40%~55%、温度20~32℃条件下,以乙酸乙酯-甲醇-水-冰醋酸为展开剂二次展开,展距13 cm,α-萘酚试液加热至显色,于可见光下检视。将巴戟天寡糖HPTLC指纹图谱导入指纹图谱系统解决方案软件(CHROMAP 1.5)生成共有模式。结果 巴戟天寡糖指纹图谱由11个特征条带(色谱峰)构成,并指认了其中的果糖、蔗糖、1-蔗果三糖、耐斯糖及1^F-果呋喃糖基耐斯糖5个峰。结论 通过HPTLC指纹图谱考察,炮制后巴戟天寡糖成分出现质与量的改变;来源于4省的巴戟天药材无明显差异;混伪品中不含巴戟天寡糖不能作为巴戟天替代药材入药;含巴戟天药材的制剂仍可采用该HPTLC法进行制剂质量评价与控制。

关键词: 巴戟天; 寡糖; 高效薄层色谱

中图分类号: R284

文献标志码: A

文章编号: 1001-2494(2011)18-1385-04

High-Performance Thin-layer Chromatographic Fingerprint Analysis of *Morinda officinalis* Oligosaccharides

LIAO Hui-jun, LAI Zheng-quan, YANG Tie-chui, DING Ping* (College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the HPTLC fingerprint of *Morinda officinalis* oligosaccharides, and to study the characteristic fingerprints of *Morinda officinalis* How from different producing areas and processed by different methods and its adulterants, and to identify *Morinda officinalis* How in preparations. **METHODS** HPTLC were carried out after twice development with ethyl acetate-methanol-water-glacial acetic acid as developing solvent system and α-naphthol test solution as derivatization reagent. Relative humidity and ambient temperature were 40% - 55% and 20 - 32 °C respectively. The common patterns of HPTLC fingerprint were obtained through (CHROMAP 1.5) solution software. **RESULTS** There were 11 characteristic bands (peaks in the profile), five peaks were identified by chemical reference substances. **CONCLUSION** There are quantitative and qualitative changes in oligosaccharides of *Morinda officinalis* How during processing. There is little difference in the oligosaccharides among *Morinda officinalis* How from 4 provinces. Adulterants can not substitute *Morinda officinalis* How in clinical treatment. The HPTLC method can be applied to assess and control the quality of *Morinda officinalis* How preparations.

KEY WORDS: *Morinda officinalis* How; oligosaccharide; HPTLC

巴戟天为茜草科植物巴戟天(*Morinda officinalis* How)的干燥根,因其干燥根皮易断裂呈节状如动物肠,故又名鸡肠风、兔儿肠等,具补肾壮阳、祛风湿、强筋骨之功效,用于阳痿遗精、宫冷不孕、月经不调、筋骨痠软及风湿痹痛等证^[1],从中药药理的角度来看属于补虚药。巴戟天性喜温暖、湿润、雨量充沛且分布均匀的气候环境,主产于广东省德庆县,是著名的“四大南药”之一。随着现代药理及化学研究的深入,巴戟天被开发成为各种食品、保健品及药品,应用广泛备受关注。巴戟天含有寡糖、多糖、萜醌、

环烯醚萜苷、氨基酸、有机酸及微量元素等化学成分^[2]。寡糖是巴戟天的活性成分之一,具有抗抑郁、生精、抗应激、促血管新生、促进免疫等多种药理活性^[3-5],在巴戟天肉质根中含量丰富,可达根干物质重的10%^[6],因此,建立巴戟天寡糖的质量评价方法是构建巴戟天质量评价体系的重要内容。分子极性大、糖链化学组成相似以及缺乏发色团等因素使得糖类化合物的检测较为困难,目前仍未见简单识别寡糖类的方法,巴戟天寡糖的简单鉴别方法亦属空白,故本实验以采用5种巴戟天糖类化合物为

基金项目: 广东省自然科学基金重点项目(0610506)

作者简介: 廖慧君,女,博士 研究方向: 中药质量评价研究

* 通讯作者: 丁平,女,教授

研究方向: 中药资源有效成分与中药质量

Tel: (020) 39358063

E-mail: dingpinggz@126.com

对照品建立巴戟天寡糖薄层色谱指纹图谱,为评价巴戟天药材及其制剂的质量提供科学依据。

1 仪器与试剂

仪器: ATS 全自动薄层色谱点样仪、双槽展开缸、SCANNER3 薄层色谱扫描仪(Camag 公司)、IX-US50 型数码相机(Canon 公司)、硅胶 G 铝板(Merck 公司, 1. 05553. 0001)、BS124S 型万分之一电子天平(Sartorius 公司)、CHROMAP 1. 5 色谱指纹图谱系统解决方案软件(珠海科曼中药研究有限公司)。

试剂: 乙醇、乙酸乙酯、甲醇、冰醋酸、硫酸、 α -萘酚等均为分析纯。

对照品: 果糖(Fructose, 中国药品生物制品检定所, 1504-200001)、蔗糖(Sucrose, 分析纯, 广东省光华化学厂有限公司)、1-蔗果三糖(1-kestose, 295-64111)、耐斯糖(Nystose, 292-64121)、1^F-果呋喃糖基耐斯糖(1^F-Fructofuranosylnystose, 299-64131) (日本 Wako 公司, 纯度 > 98%)。

样品: 均经广州中医药大学资源教研室丁平教授鉴定拉丁学名分别为 *Morinda officinalis* How(巴戟天)、*Morinda umbellata* Linn(羊角藤)、*Morinda parvifolia* Bartl. et DC(鸡眼藤)、*Morinda shuanghuaensis* C. Y. Chen et M. S. Huang(假巴戟), 凭证标本存于广州中医药大学资源教研室。巴戟天各炮制品均按照《中国药典》规范炮制。以上样品均于 80 °C 烘干打粉, 过 120 目筛。含巴戟天药材的口服液 X 及阴性对照口服液由生产厂家提供。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

取果糖、蔗糖、1-蔗果三糖、耐斯糖、1^F-果呋喃糖基耐斯糖对照品适量, 精密称定, 加水制得果糖为 1 mg · mL⁻¹ 的对照品溶液, 其余各糖均为 1. 5 mg · mL⁻¹ 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

分别取巴戟天药材、炮制饮片及混伪品约 0. 5 g, 加体积分数 50% 乙醇 60 mL 超声 30 min。滤过, 滤液蒸干, 加蒸馏水 10 mL 使溶解, 即得巴戟天药材、炮制品及混伪品供试液。取口服液 X 及阴性对照口服液各 10 mL, 缓慢加无水乙醇 40 mL, 10 °C 封藏 24 h。弃去上清液, 残渣用蒸馏水定容至 10 mL, 即得含巴戟天药材的口服液及阴性样品供试液。

2.3 薄层色谱条件

采用自动点样仪, 将各对照品及供试液适量

(化学对照品各 2 μ L、样品各 1 μ L) 点条带于高效薄层色谱硅胶 G 铝板, 条带长 5 mm, 间距 5 mm, 点样速度为 10 μ L · min⁻¹。将板置于有 P₂O₅ 的干燥器中减压干燥 2 h, 以乙酸乙酯-甲醇-水-冰醋酸一次(8: 3: 2: 3); 二次(12: 3: 2: 3) 为展开剂, 在 20 ~ 32 °C 及 40% ~ 55% 温湿度条件下, 两次展开, 展距均为 13 cm, 取出, 晾干, 喷以 α -萘酚试液, 105 °C 加热至斑点显色清晰。立即至可见光下检视。

2.4 巴戟天寡糖指纹图谱共有模式的建立

将 10 批采自广东高良镇巴戟天 GAP 基地的巴戟天样本显色后获得的薄层色谱图导入 CHROMAP 1. 5 指纹图谱解决方案软件, 生成灰度扫描图并积分。将巴戟天代表性样本数据采用中位数法确定特征峰, 中位数法计算特征值, 共获得 11 个特征峰构成巴戟天寡糖薄层色谱指纹图谱共有模式(图 1), 并与化学对照品保留时间比对后, 指认了其中的 5 个糖峰分别是果糖(R_f ≈ 0. 66)、蔗糖(R_f ≈ 0. 57)、1-蔗果三糖(R_f ≈ 0. 40)、耐斯糖(R_f ≈ 0. 32)、1^F-果呋喃糖基耐斯糖(R_f ≈ 0. 25)。

2.5 薄层色谱指纹图谱的测定与评价

按“2. 3”项下薄层色谱条件进行展开, 获得巴戟天不同产地(广东、福建、广西、海南)、不同炮制饮片(巴戟天、巴戟肉、制巴戟、盐巴戟)、混伪品(羊角藤、鸡眼藤、假巴戟) 及含巴戟天口服液 X 的 HPTLC 指纹图谱(图 2)。以上产地的巴戟天药材在外观性状及寡糖 HPTLC 指纹图谱中均无明显差异(图 3)。各混伪品中均未检出相应的寡糖成分, 不能作为巴戟天的替代药材入药。两批巴戟天的寡糖成分炮制规律高度一致, 聚类分析显示生巴戟与制巴戟聚为一簇, 巴戟肉与盐巴戟聚为一簇(图 4)。无论加盐与否, 蒸制后的巴戟天寡糖发生了质与量的改变, 寡糖含量减少, 果糖含量增加, 并出现了一系列新成分(图 5)。

3 讨论

3.1 化学及波谱学研究^[8-9] 揭示巴戟天寡糖均为菊

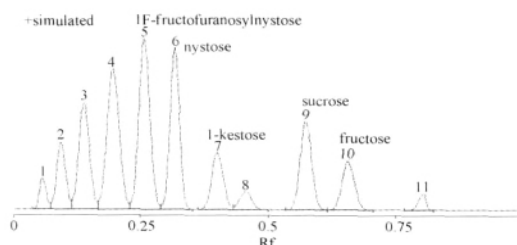


图 1 巴戟天寡糖 HPTLC 色谱指纹图谱共有模式

Fig. 1 Common pattern of HPTLC fingerprints of *Morinda officinalis* oligosaccharides

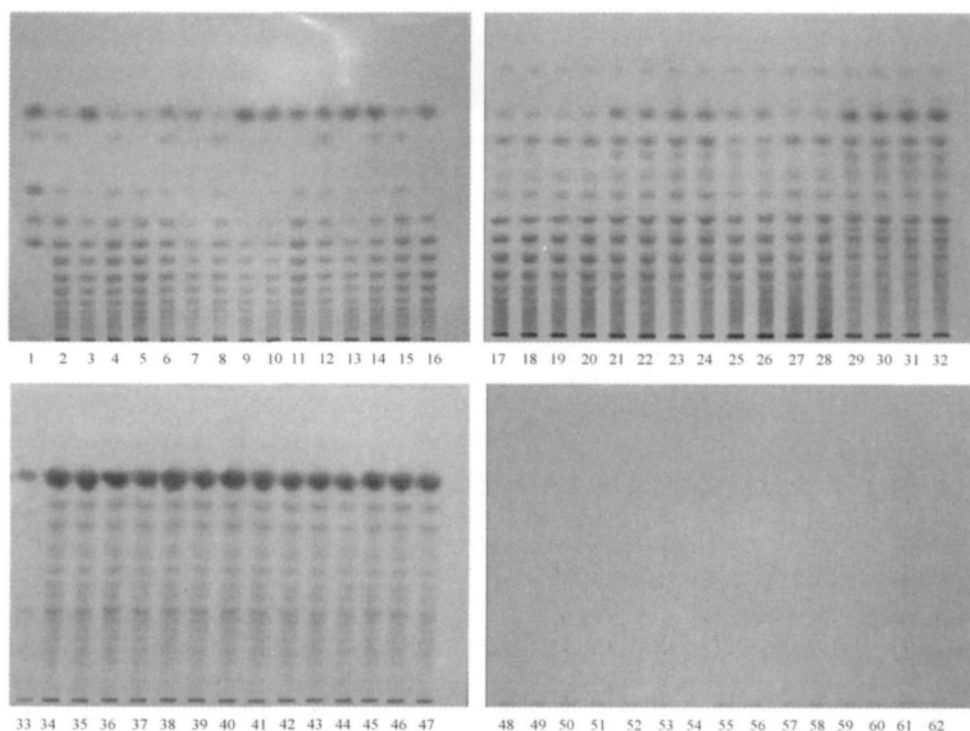


图2 巴戟天寡糖的 HPTLC 指纹图谱

1 - 混合对照品(自上而下分别是果糖、蔗糖、1-蔗果三糖、耐斯糖、1^F-果呋喃糖基耐斯糖); 2~16 - 不同产地的巴戟天(2~9 - 广东产; 10~12 - 福建产; 13~15 - 广西产; 16 - 海南产); 17~32 - 不同炮制巴戟天(17~24 依次为第一批巴戟天的生巴戟、制巴戟、巴戟肉及盐巴戟, 每种饮片各 2 个样品; 25~32 依次为第二批巴戟天的生巴戟、制巴戟、巴戟肉及盐巴戟, 每种饮片各 2 个样品); 33~47 - 口服液 X(33 - 口服液 X 阴性对照; 34~47 - 8 批口服液 X); 48~62 - 巴戟天混伪品(48~52 - 羊角藤; 53~57 - 鸡眼藤; 58~62 - 假巴戟)

Fig. 2 HPTLC fingerprints of *Morinda officinalis* oligosaccharides

1 - mixed reference substances (namely fructose, sucrose, 1-kestose, nystose, 1^F-fructofuranosylnystose from top to bottom); 2 - 16 - *Morinda officinalis* How from different producing areas (2 - 9 - cultivated in Guangdong province, 10 - 12 - cultivated in Fujian province, 13 - 15 - cultivated in Guangxi province, 16 - cultivated in Hainan province); 17 - 32 - *Morinda officinalis* How by different processing methods (17 - 24 - sequence of 2 samples of crude drug, liquorice-processing products; steaming processing products; steaming with salt-water products of batch I; 25 - 32 - sequence of 2 samples of crude drug, liquorice-processing products; steaming processing products; steaming with salt-water products of batch II); 33 - 47 - preparation containing *Morinda officinalis* How (33 - negative preparation sample, 34 - 47 - 8 batches of preparation containing *Morinda officinalis* How); 48 - 64 - adulterants of *Morinda officinalis* How (48 - 52 - *Morinda umbellata* Linn.; 53 - 57 - *Morinda parvifolia* Bartl. et DC.; 58 - 62 - *Morinda shuanghuaensis* C. Y. Chen et M. S. Huang)

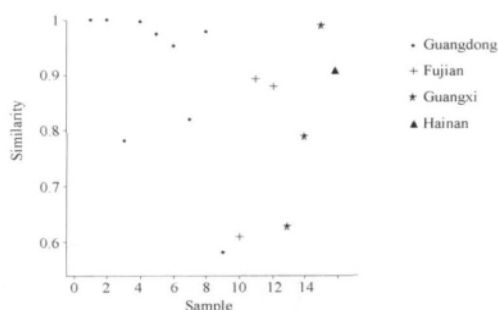


图3 不同产地巴戟天相似度

Fig. 3 similarities of *Morinda officinalis* How from different producing areas

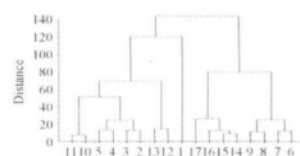


图4 巴戟天各炮制饮片聚类树状图

1 - 混合对照品; 2~3 - 批次 I 的生巴戟; 4~5 - 批次 I 的制巴戟; 6~7 - 批次 I 的巴戟肉; 8~9 - 批次 I 的盐巴戟; 10~11 - 批次 II 的生巴戟; 12~13 - 批次 II 的制巴戟; 14~15 - 批次 II 的巴戟肉; 16~17 - 批次 II 的盐巴戟

Fig. 4 Clustering analysis of processed slices of *Morinda officinalis* How

1 - mixed reference substances; 2 - 3 - crude drug of batch I; 4 - 5 - liquorice-processing product of batch I; 6 - 7 - steaming processing product of batch I; 8 - 9 - steaming with salt-water product of batch I; 10 - 11 - crude drug of batch II; 12 - 13 - liquorice-processing product of batch II; 14 - 15 - steaming processing product of batch II; 16 - 17 - steaming with salt-water product of batch II

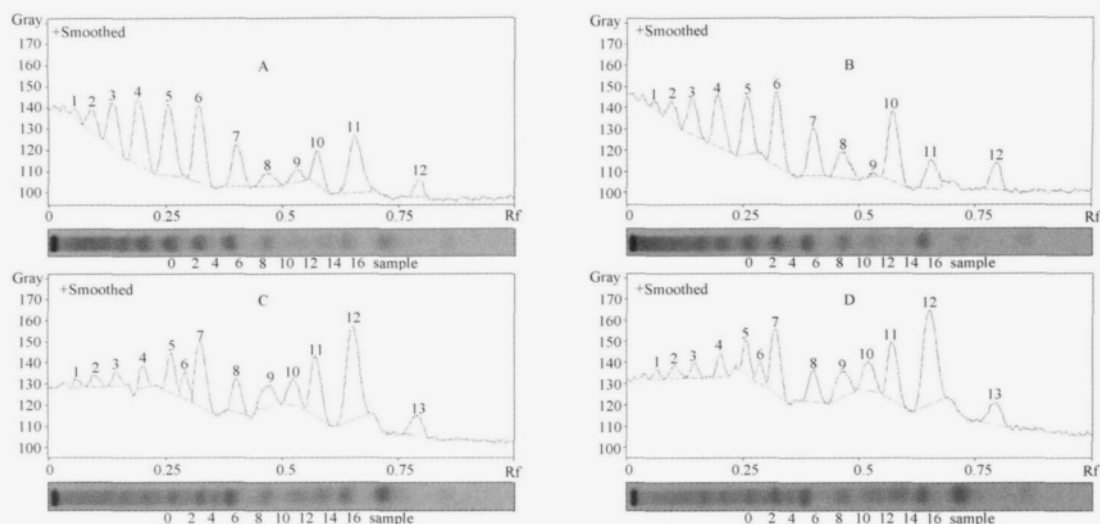


图5 炮制品的代表性样本 HPTLC 图像数码扫描轮廓图

A - 巴戟天; B - 制巴戟; C - 巴戟肉; D - 盐巴戟

Fig. 5 Typical HPTLC images and corresponding digital scanning profiles of *Morinda officinalis* How processed by different methods

A - crude drug; B - liguorice-processing product; C - steaming processing product; D - steaming with salt-water product

淀粉型结构: α -D-葡萄糖(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-果糖-(2 $\rightarrow$ 1)- β -D-果糖] n -(2 $\rightarrow$ 1)- β -D-果糖。本巴戟天寡糖 HPTLC 指纹图谱条带分布均匀,间隔有序即是此规律性的直观表现。结合文献可判断 HPTLC 图谱中随着展距的加大,新分离的糖较上一个糖增加一个果糖分子,相对分子质量增加 362,故应用本法可以分离九糖以下的寡糖。本实验所用展开系统、温湿度条件均经多次筛选后确定,所获图谱信息丰富,分离度良好,专属性强,取样量小,可用于药材及制剂中巴戟天的鉴别,为巴戟天质量标准的制定奠定了基础,也为 HPTLC 快速鉴别寡糖填补了空白。

3.2 蒸制后的巴戟天寡糖发生了质与量的改变,并出现了一系列新成分,其原因可能是高温作用下寡糖通过 2 种途径发生了降解,一是断裂端基果糖分子,使果糖含量显著增加,另一种是断裂另一端基的葡萄糖分子而生成了与菊淀粉型寡糖交错排列的新成分群。而甘草制后,巴戟天寡糖并无明显差异。由此可见巴戟天炮制饮片应制定有别于药材的质量标准,为药品质量提供保障。

3.3 巴戟天是复方制剂的常用药材,口服液 X 中含有 15 味中药材,巴戟天为其臣药,成分复杂干扰严重,因此制剂的前处理是巴戟天寡糖成分检出的重点与难点。在口服液 X 中果糖是最主要的干扰源,本实验采用醇沉法能使果糖与目标成分得到有效分离,从而鉴别其中的巴戟天药材。口服液 X 的

寡糖指纹图谱与巴戟肉及盐巴戟更为接近,推测该制剂中巴戟天是以这 2 种饮片形式入药,与其组方吻合。

REFERENCES

- [1] Ch. P (2010) Vol II (中国药典 2010 年版,一部) [J]. 2010:75.
- [2] ZHAO Y, GUO S H. A concise review of compounds of *Morinda officinalis* How [J]. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2007, 19(2): 59-60.
- [3] CUI C B, YANG M, YAO Z W, et al. Studies on the antidepressant 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.
- [4] DING P, LIANG Y J, LIU J, et al. Effect of *Morinda officinalis* oligosaccharides on sperm product in mice [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2008, 43(19): 1467-1470.
- [5] LI Y F, YUAN L, YANG M, et al. Antistress effect of oligosaccharide extracted from *Morinda officinalis* in mice and rats [J]. *At-ca Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2001, 22(12): 1084-1088.
- [6] YANG J K, FENG G Q, YU S, et al. Angiogenesis promoting effect of *Morinda officinalis* oligosaccharides on chicken embryo chorioallantoic membrane [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 35(3): 360-363.
- [7] XU C D, ZHANG Y X, YANG M. Immunopotentiating effect of *Morinda officinalis* oligosaccharides [J]. *Pharm J Chin PLA* (解放军药学报), 2003, 19(6): 466-468.
- [8] YANG Z M, YI Y T, GAO C C, et al. Isolation of inulin-type oligosaccharides from Chinese traditional medicine: *Morinda officinalis* How and their characterization using ESI-MS/MS [J]. *J Separ Sci*, 2010, 33(1): 120-125.
- [9] 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): 32-38.

(收稿日期: 2011-04-09)