

仿刺参中皂苷类成分的高效液相色谱指纹图谱

于林芳, 董平, 薛长湖*, 王玉明, 徐杰, 李兆杰, 薛勇

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要 :利用高效液相色谱法建立了仿刺参皂苷类成分的指纹图谱,为仿刺参的质量控制提供了新的方法。采用固相萃取制备供试品溶液,选用 Zorbax SB-C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,检测波长为 205 nm,柱温 30 °C。分析了不同产地的 10 批仿刺参样品,采用国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A 版)”处理谱图,确定了 6 个共有峰。计算了 10 个样本间的指纹图谱相似度,所得相似度计算结果均大于 0.97。该方法具有良好的稳定性和重现性,可用于仿刺参的质量控制。

关键词 :高效液相色谱法;皂苷;指纹图谱;仿刺参

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)09-0885-04

High performance liquid chromatographic fingerprints of triterpene glycosides from *Stichopus japonicus*

YU Linfang, DONG Ping, XUE Changhu*, WANG Yuming, XU Jie, LI Zhaojie, XUE Yong

(College of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract : The fingerprint chromatograms of triterpene glycosides in *Stichopus japonicus* were established for its quality control. The samples were prepared by solid phase extraction (SPE). The analysis was performed on a Zorbax SB-C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-water (containing 0.1% phosphoric acid) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min, and at a column temperature of 30 °C. The detection wavelength was set at 205 nm. Ten different original samples were analyzed, and 6 peaks were identified as common fingerprint peaks using the similarity evaluation system for the chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (TCM) recommended by State Pharmacopoeia Committee of China (Version 2004 A). The similarities of the fingerprints were all greater than 0.97. The method is proved to be stable and repeatable and can be utilized as a quality control for *S. japonicus*.

Key words : high performance liquid chromatography (HPLC); triterpene glycoside; fingerprints; *Stichopus japonicus*

仿刺参(*Stichopus japonicus*)属棘皮动物门(Echinodermata)海参纲(Holothurcidea)楯手目(Aspidochirotida)刺参科(Stichopodidae)海洋动物^[1]。自古以来被认为是一种名贵的滋补食品和药材,被冠为“海八珍”之首。近几年国内市场上出现了各种各样的海参产品,有的商家基于不同种类海参的营养价值、经济价值都存在较大的差异,将不同海参故意混淆加工欺骗消费者。由于市场上销售的仿刺参产品均经过一系列的加工处理,外部形态变化较大,靠外表鉴别需要经验较多,所以利用外部

形态特征很难准确识别。因此,迫切需要建立一种快速准确的仿刺参质量控制的方法。

海参皂苷是海参的主要次生代谢产物,也是进行化学防御的物质基础,具有广泛的生理药理活性,如对肿瘤细胞的细胞毒作用^[2]、抗真菌作用^[3]和溶血活性^[4]等,是海参质量的重要评价指标。近年来,对海参中皂苷类化合物的研究主要集中在分离、纯化及结构鉴定方面^[5-7],迄今已有 100 余种海参皂苷的结构得到阐明^[8]。据文献报道,至今共从刺参中分离鉴定出 15 种不同结构的海参皂苷^[9-11]。

* 通讯联系人:薛长湖,教授,主要研究方向为水产品加工和水产化学。E-mail: xuech@ouc.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金项目(30871944).

收稿日期:2010-06-03

作者所在实验室前期已对 8 种海参的皂苷类成分进行了高效液相色谱 (HPLC) 分析比较, 结果证明, 受分类和生长环境的影响, 不同种属海参的皂苷组成差异显著^[12]。在此基础上, 还需研究不同产地的同种海参的皂苷组成是否有显著差异, 从而证明以皂苷作为其质量评价指标来鉴别海参真伪的可行性。目前指纹图谱技术已成为公认的鉴别中药品种和评价中药质量的有效手段, 关于人参、西洋参等药材中皂苷类的指纹图谱研究亦有大量文献报道^[13-15], 但还未见有关海参中皂苷类指纹图谱的研究报道。本文参考中药色谱指纹图谱的评价标准, 采用 HPLC 研究了不同产地的仿刺参的皂苷组成, 建立了 10 批仿刺参样品的总皂苷指纹图谱, 为仿刺参的质量控制提供了依据。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), 配有二极管阵列检测器(DAD); 固相萃取仪(美国 Supelco 公司); 乙腈(色谱纯, 美国 Muskegon 公司); 超纯水(美国 Millipore 公司); 其他试剂为分析纯。皂苷标准品 holotoxin A₁ 由本实验室前期分离纯化所得。

仿刺参样品及来源: S1, 大连-1(2009-05); S2, 大连-2(2009-12); S3, 大连-3(2009-05); S4, 威海-1(2009-05); S5, 威海-2(2009-12); S6, 烟台-1(2009-05); S7, 烟台-2(2009-12); S8, 青岛(2009-05); S9, 宁德(2009-12); S10, 温州(2009-05)。

1.2 样品溶液的制备

分别称取海参样品粉末 2.0 g, 加入 60% 乙醇 20 mL 回流提取 3 次, 每次 1 h; 合并提取液并减压旋转蒸发至干, 残渣溶于 10 mL 水中, 用等体积的水饱和正丁醇萃取 3 次, 合并正丁醇提取液, 减压旋转蒸发至干。残渣加水溶解后上样至已处理好的 SPE-C18 固相萃取小柱, 依次用 5 mL 水、5 mL 甲醇洗脱, 收集甲醇洗脱液, 水浴中蒸干, 用 30% (v/v) 乙腈定量转移至 5 mL 容量瓶中, 经 0.45 μm 有机滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

1.3 色谱条件

Zorbax SB-C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 0.1% 磷酸水溶液; 梯度洗脱程序: 0 ~ 5 min, 30% A; 5 ~ 30 min, 30% A ~ 50% A。流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL; 检测波长 205 nm; 柱温 30 ℃。

2 结果与讨论

通过对不同种属海参皂苷的组成进行 HPLC 分析比较, 结果发现, 每种海参都有其特征性的皂苷组成(见图 1), 可用于不同海参之间的品种鉴别^[12]。但同种海参之间不同的生长环境对其皂苷的结构及组成是否会产生影响, 相应产生的皂苷图谱是否会有差异, 尚需进一步研究。因此, 本文分析了不同产地的 10 批仿刺参样品的皂苷指纹图谱, 以期解决上述问题, 同时为仿刺参的质量控制提供依据。

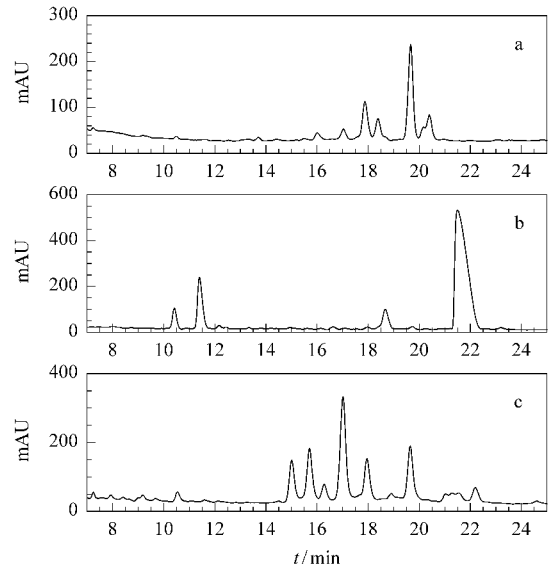


图 1 不同海参皂苷的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of triterpene glycosides from different sea cucumbers

Mobile phases: acetonitrile (A), 0.1% aqueous phosphoric acid (B). Gradient elution: 0 - 5 min, 30% A; 5 - 30 min, 30% A - 60% A.

a. *Stichopus japonicus*; b. *Pearsonothria graeffei*; c. *Isostichopus badiionotus*.

2.1 流动相的选择

进行 HPLC 分析时, 选择合适的流动相能提高样品各色谱峰之间的分离度, 增强响应值, 同时降低基线噪声。本实验考察了乙腈-0.1% 磷酸水、乙腈-0.1% 乙酸水、乙腈-0.1% 乙酸铵水和乙腈-0.1% 氨水 4 种流动相对色谱峰的影响。由图 2 可知, 以乙腈-0.1% 磷酸水为流动相时, 各皂苷的响应度较高, 分离度较好, 且基线平稳, 无其他杂质峰干扰。以乙腈-0.1% 乙酸水为流动相的分离效果仅次于乙腈-0.1% 磷酸水; 而以乙腈-0.1% 乙酸铵水为流动相时, 皂苷的响应度极低, 基线漂移严重; 以乙腈-0.1% 氨水为流动相时, 出现较多未知杂质峰, 且基线漂移, 不能得到较好的峰形。因此本文决定选用乙腈-0.1% 磷酸水作为流动相。

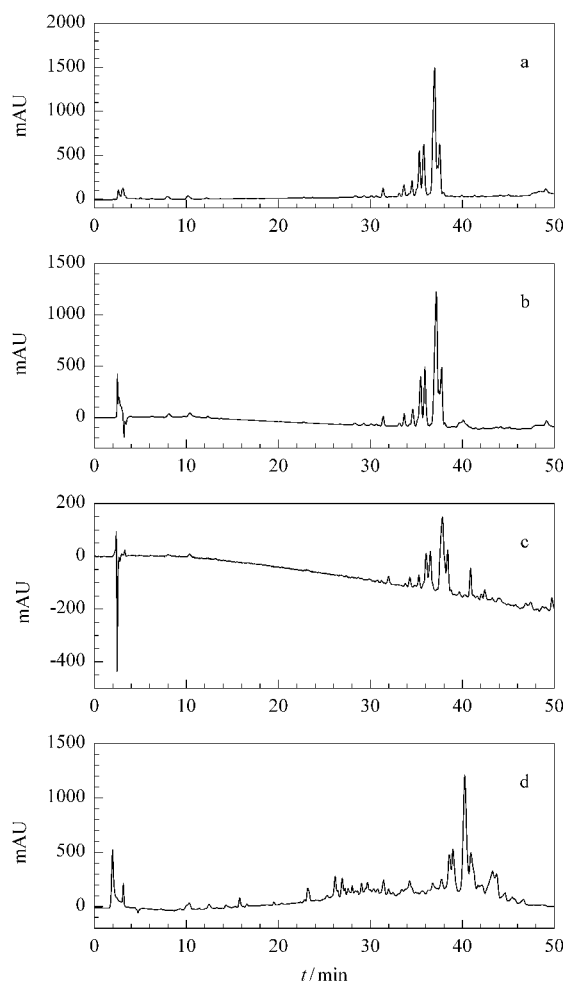


图 2 仿刺参总皂苷提取物在不同流动相条件下的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of the extract of triterpene glycosides from *S. japonicus* with different mobile phases

Gradient elution: 0 - 5 min, 20% acetonitrile; 5 - 50 min, 20% acetonitrile - 50% acetonitrile.

Mobile phases: a. acetonitrile-0.1% aqueous phosphoric acid; b. acetonitrile-water containing 0.1% acetic acid; c. acetonitrile-water containing 0.1% ammonium acetate; d. acetonitrile-water containing 0.1% ammonia.

2.2 洗脱程序的选择

本实验考察了不同梯度洗脱程序对样品各色谱峰分离度的影响,结果发现,梯度洗脱程序的变化仅对各色谱峰的保留时间产生较大的影响,对各色谱峰的分离度影响不大,因此在保证基线达到较好分离的同时又节省分析时间的前提下,最终选择 1.3 节所述的色谱条件进行指纹图谱分析。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度

取同一供试品溶液,按 1.3 节的色谱条件连续进样 6 次,记录色谱图,考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,其相对标准偏差(RSD)分别小于 0.2% 和 1.7%,表明仪器的精密度良好。

2.3.2 稳定性

取同一供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进行测定,考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,其 RSD 分别小于 0.2% 和 2.4%,表明样品在 24 h 内稳定。

2.3.3 重复性

取同一批海参样品,按 1.2 节的方法分别制备供试品 6 份,按 1.3 节的色谱条件进行测定,记录色谱图,考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,其 RSD 分别小于 0.2% 和 3.5%,说明方法具有良好的重复性和可靠性。

2.4 指纹图谱的建立

取不同产地的 10 批仿刺参样品,按 1.2 节的方法制备供试品溶液,按 1.3 节的色谱条件进行测定,其典型的 HPLC 指纹图谱见图 3a,最后确定仿刺参皂苷色谱图中含有 6 个共有峰,其中含量最高的 5 号峰为 holotoxin A₁;图 3b 是 holotoxin A₁ 对照品的色谱图。

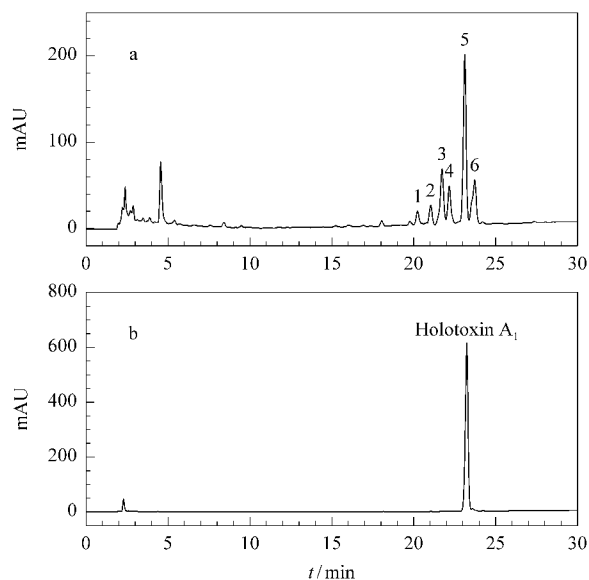


图 3 (a)仿刺参总皂苷提取物和(b)对照品 holotoxin A₁ 的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of (a) the extract of triterpene glycosides from *S. japonicus* and (b) holotoxin A₁ control

采用国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A 版)”处理数据,将 10 批样品的色谱图导入该软件后,剪切掉前 5 min 的溶剂峰,通过色谱峰的多点校正,对 10 个样品的色谱峰进行匹配并自动生成对照指纹图谱 R(见图 4)。比较 10 批样品的指纹图谱后发现,收集来的不同产地的仿刺参样品皂苷的指纹图谱中主要峰群的整体图貌基本一致。

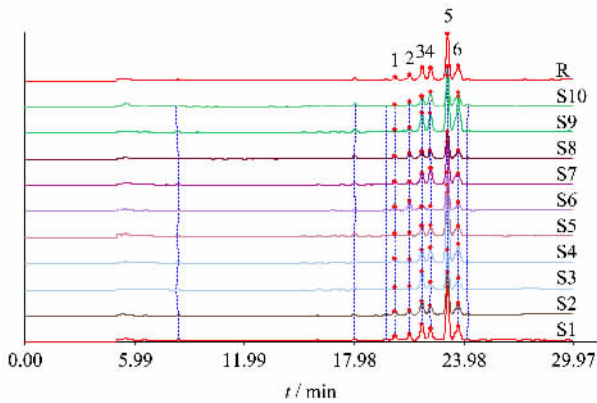


图 4 10 批仿刺参样品的 HPLC 指纹图谱

Fig. 4 HPLC fingerprints of 10 *S. japonicus* samples S1 - S10 : samples ; R : reference fingerprint.

2.5 指纹图谱的相似度评价

指纹图谱的评价指标是对供试品的指纹图谱与该品种的对照指纹图谱(共有模式图谱)之间的相似度进行比较和计算。对照共有指纹图谱,以含量最高的 5 号峰 holotoxin A₁ 作为参照峰,各峰的相对保留时间、相对峰面积结果见表 1,相似度计算结果见表 2。

综合表 1 和表 2 可以看出,10 批样品指纹图谱的相似度均在 0.97 以上。虽然不同产地的样品中各皂苷含量的相对比值有所差别,但这种在共性特征基础上存在的个体差异是常见的现象。推测其变化的原因,可能是由于仿刺参的生长环境、年龄以及加工方式不同等诸多不确定因素造成的。

表 1 10 批仿刺参样品共有峰的相对保留时间及相对峰面积
Table 1 Relative retention times (RRT) and relative peak areas (RPA) of 6 common peaks of 10 *S. japonicus* samples

Peak No.	RRT		RPA	
	Average	RSD/%	Average	RSD/%
1	0.875	0.19	0.074	32.46
2	0.910	0.20	0.112	42.16
3	0.940	0.20	0.316	32.93
4	0.959	0.20	0.277	37.94
5	1	0.20	1	31.52
6	1.026	0.21	0.413	51.06

表 2 10 批仿刺参样品的相似度分析结果
Table 2 Similarity analysis of 10 *S. japonicus* samples

Sample No.	Similarity	Sample No.	Similarity
S1	0.997	S7	0.993
S2	0.993	S8	0.991
S3	0.985	S9	0.980
S4	0.992	S10	0.970
S5	0.991	R	1.00
S6	0.971		

3 结论

本实验对不同产地、不同季节的 10 批仿刺参样品中的总皂苷进行了指纹图谱研究,在“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A 版)”的辅助下,得到了仿刺参总皂苷的 HPLC 指纹图谱。同时,本实验对提取条件、色谱条件等进行了优化,结果表明,所建立的方法的精密度、稳定性与重现性均较好,符合指纹图谱研究的技术要求,可作为仿刺参质量评价的依据。但对于仿刺参不同的生长环境、采集时间、年龄以及加工方式等复杂因素对指纹图谱产生的影响还不能做出明确的结论,还需进一步研究。

参考文献:

[1] Liao Y L. Bulletin of Biology (廖玉麟. 生物学通报), 2001, 35(9): 1

[2] Nguyen H D, Nguyen V T, Phan V K, et al. Arch Pharm Res, 2007, 30(11): 1387

[3] Cong R S, Yuan W P, Fan T J, et al. Periodical of Ocean University of China (丛日山, 袁文鹏, 樊廷俊, 等. 中国海洋大学学报), 2006, 36(6): 959

[4] Kalinin V I, Prokofieva N G, Likhatskaya G N, et al. Toxicon, 1996, 34 : 475

[5] Alexandra S S, Valentin A S, Sergey A A, et al. J Nat Prod, 2005, 68 : 564

[6] Weng Y Y, Yi Y H, Li L, et al. Chinese Journal of Natural Medicines (翁怡毅, 易杨华, 李玲, 等. 中国天然药物), 2007, 5(2): 96

[7] La M P, Yi Y H, Li L, et al. Chinese Journal of Natural Medicines (喇明平, 易杨华, 李玲, 等. 中国天然药物), 2008, 6(4): 254

[8] Zou Z R, Yi Y H, Zhang S Y, et al. Chinese Journal of Marine Drugs (邹峥嵘, 易杨华, 张淑瑜, 等. 中国海洋药物), 2004(1): 46

[9] Kitagawa I, Yamanaka H, Kobayashi M, et al. Chem Pharm Bull, 1978, 26 : 3722

[10] Maltsev I I, Stonik V A, Kalinovskiy A I, et al. Comp Biochem Physiol, 1984, 78(2): 421

[11] Wang Z L. [PhD Dissertation]. Shanghai : Second Military Medical University (王增蕾. [博士学位论文]. 上海 : 第二军医大学), 2009

[12] Yu L F, Xue C H, Dong P, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (于林芳, 薛长湖, 董平, 等. 分析实验室), accepted

[13] Chen Y H, Jiang R Z, Luo H M, et al. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae (陈英红, 姜瑞芝, 罗浩铭, 等. 中国实验方剂学杂志), 2009, 15(11): 12

[14] Jia X B, Shi Y F, Huang Y P, et al. Journal of Chinese Medicinal Materials (贾晓斌, 施亚芳, 黄一平, 等. 中药材), 2001, 24(10): 722

[15] Chen J H, Xie M Y, Wang H Q, et al. Food Science (陈军辉, 谢明勇, 王慧琴, 等. 食品科学), 2005, 26(11): 200