

HPLC 指纹图谱技术用于市售刺参质量评价初探

张道来¹, 陈军辉¹, 周明¹, 程红艳¹,
赵恒强¹, 臧家业¹, 王小如^{1,2}, 李国强³

(1. 国家海洋局第一海洋研究所, 海洋生态研究中心, 青岛, 山东 266061; 2. 厦门大学, 化学化工学院化学系, 厦门, 福建 361005;
3. 中国海洋大学, 医药学院, 青岛, 山东 266003;)

摘要: 以 10 批不同产地刺参 HPLC 指纹图谱中的 6 个共有峰为评价指标, 结合相似度分析, 对不同刺参质量进行评价和检验。结果表明: 不同批次刺参样品的 6 个色谱峰在指纹图谱分析过程中色谱行为相同, 峰面积大, 特征性强, 能反映刺参的固有化学特征。结合相似度分析, 可用于刺参质量评价。

关键词: 刺参; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 质量评价

中图分类号: O657.7

文献标志码: A

文章编号: 1673-9159(2009)05-0092-05

Primary Exploration on Quality Evaluation of Holothurian Sold on the Market by HPLC Fingerprint

ZHANG Dao-lai¹, CHEN Jun-hui¹, ZHOU Ming¹, CHENG Hong-yan¹,
ZHAO Heng-qiang¹, ZANG Jia-ye¹, WANG Xiao-ru^{1,2}, LI Guo-qiang³

(1. *Research Center for Marine Ecology, First Institute Oceanography of SOA, Qingdao, 266061;*
2. *Department of Chemistry of College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005;*
3. *School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266063, China*)

Abstract: An optimized high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed for the analysis of holothurian and the HPLC fingerprint was established from 10 batches of the holothurians from different habitats. The HPLC fingerprint showing 6 common characteristic peaks was used to explore the quality evaluation of holothurian and distinguish from the fakes with the similarity analysis. This method is accurate and reliable, providing a scientific basis for the quality control of holothurian and can be used to evaluate the quality of holothurian sold on the market.

Key words: Holothurian; HPLC; fingerprint; quality evaluation

刺参是我国北方海域的一种常见食用海参, 属于棘皮动物门(Echinodermata)刺参纲(Echinoidea)无脊椎动物。刺参含多种活性成分, 具有抗凝血、抗肿瘤、抗菌、抗病毒及提高免疫力等作用^[1-6], 市场需求量大。刺参作为重要海洋食品和药物资源, 需要相应的真伪鉴别和质量控制方法。利用红外光谱图、骨片显微鉴别等评价刺参质量的方法已有报

道^[7,8], 但这些方法特征性差、经验依赖性很强, 在实际应用中存在很大的局限。HPLC 指纹图谱技术在陆源中药的真伪鉴别和质量控制中已得到广泛应用^[9]。而传统海洋药物中, 仅皱瘤海鞘、罗氏海盘车、马粪海胆等以 HPLC 指纹图谱作质量评价^[10-12]。本文采用 HPLC 指纹图谱技术评价刺参质量, 探索刺参真伪鉴别及质量控制新方法。

收稿日期: 2009-00-00

基金项目: 我国近海海洋综合调查与评价 908 专项 (908-02-05-04): 海洋药用生物资源评价和《中华海洋本草》编纂; 海洋一所基本科研业务专项 (GY-022008T32): 海洋绿藻活性成分分析、鉴别。

第一作者: 张道来(1984—), 男, 硕士研究生, 主要从事海洋天然产物分析与评价。E-mail: zhangdaolai@fio.org.cn

通讯作者: 陈军辉, 0532-88966705, E-mail:jhchen@fio.org.cn

1 材料与方 法

1.1 试剂与材料

甲醇(色谱纯)购于美国Tedia公司,乙腈、磷酸(色谱纯)购于德国Merck公司,其余试剂均为分析纯,实验用水为Milli-Q超纯水(18.2 M Ω);本文所采用的刺参、丛足瓜参样品均购自青岛各大商场及海产品专卖店(表1)。

1.2 仪器与设备

1100型高效液相色谱仪,配有四元泵,DAD检测器,自动进样器等(美国Agilent公司);KQ-400KDE型高功率数控超声波仪(昆山市超声仪器有限公司);R201型旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司);FA1104型电子天平(上海精天电子仪器厂);THZ-8恒温水浴锅(中国浙江嘉兴电热仪器厂);Milli-Q(18.2 M Ω)超纯水处理系统(美国Millipore公司)。

1.3 供试品溶液的制备

从贮藏的各批海参样品中随机抽取海参数个,切片、粉碎、过筛(0.425mm),混合均匀,制备成海参干粉样品,封装于样品瓶中,备用。

准确称取0.5g海参干粉样品,置于100mL具塞三角瓶中,加入30mL乙醇、氯仿混合液(体积比7:3),在30℃水温条件下超声提取30min,静置1h,过滤,取上清液,重复提取1次,两次滤液合并旋蒸至干,用乙腈定容至5mL,过0.45 μ m滤膜后作为供试品溶液。

1.4 色谱条件

Agilent Zorbax Bonus-RP C₁₈色谱柱(4.6mm \times 250mm,5 μ m),以体积分数0.1%磷酸水溶液为流动相A,乙腈为流动相B,流速为0.8mL/min,柱温25℃,检测波长为202nm,进样量为20 μ L,梯度洗脱程序为:0-10-30-40-60min,B的体积分数:60%-70%-90%-100%-100%。

2 结果与讨论

2.1 样品溶液制备方法优化

对5种不同提取溶剂及其混合液(甲醇、乙醇、乙酸乙酯、正丁醇、氯仿)制备刺参提取物进行了比较,结果表明,不同溶剂提取物HPLC指纹特征差异显著,乙醇、氯仿混合液提取物HPLC指纹图谱效果最好,提取溶剂相对毒性较小、价格便宜,

因此选择乙醇、氯仿混合液(体积比7:3)做刺参HPLC指纹图谱制备提取溶剂。

对超声波提取法、水浴加热回流法与冷浸提取法进行了比较,结果表明,超声提取法方便、快捷、提取效率高、便于操作,是较好提取方法。超声过程中,确定30℃时提取效果最好,故提取过程控温在30℃。比较不同体积提取剂、不同提取时间对提取效率的影响,以30mL提取剂在30℃下超声提取30min为宜。以上条件下,两次提取即可提取出大部分目标化合物。

2.2 色谱条件优化

采用线性梯度洗脱方式进行淋洗。对4根不同生产厂家的色谱柱进行了比较,结果表明,Zorbax Bonus-RP C₁₈色谱柱获得的刺参提取物指纹图谱各峰分离度高,色谱峰分布均匀,峰型对称,具有很好的代表性,因此选择Zorbax Bonus-RP C₁₈柱用于刺参药材的指纹图谱研究。比较了不同流动相对色谱效果的影响,以体积分数0.1%磷酸水溶液、乙腈混合体系为流动相时,选定梯度条件下色谱指纹图谱效果最好。通过DAD检测器全波段扫描(190~400nm),考察了不同检测波长对指纹图谱的影响,结果表明,UV 202nm条件下检测获得的色谱指纹图谱信息足,信号响应强,指纹峰特征性明显,因此选择202nm作为刺参HPLC指纹图谱研究的检测波长。在选定的最佳色谱条件下对供试品溶液进行分析,得色谱图(图1),由图1可以看出色谱图指纹特征明显,各峰分离度高,能满足HPLC指纹图谱的要求。

表1 样品情况

Tab. 1 Samples used in this work

样本号	来源	采购时间	样品标名
1	青岛诚晟堂	2007.04	关西刺参
2	青岛诚晟堂	2007.09	田横岛刺参
3	青岛尊品金刺参店	2008.02	尊品金刺参
4	青岛薛家岛刺参店	2008.03	薛家岛刺参
5	青岛老尹家海产店	2008.04	日本红刺参
6	青岛尊品金刺参店	2008.05	大关西刺参
7	青岛海滨食品店	2008.05	刺参
8	青岛海滨食品店	2008.05	肉刺参
9	青岛佳世客	2008.05	刺参
10	青岛佳世客	2008.05	红刺参
11	青岛中山路海产品店	2008.11	丛足硬瓜参
12	青岛抚顺路海产品店	2008.11	丛足硬瓜参

说明:1~10,海参纲手目刺参科仿刺参属刺参;

11~12,海参纲手目硬瓜参科硬瓜参属丛足硬瓜参

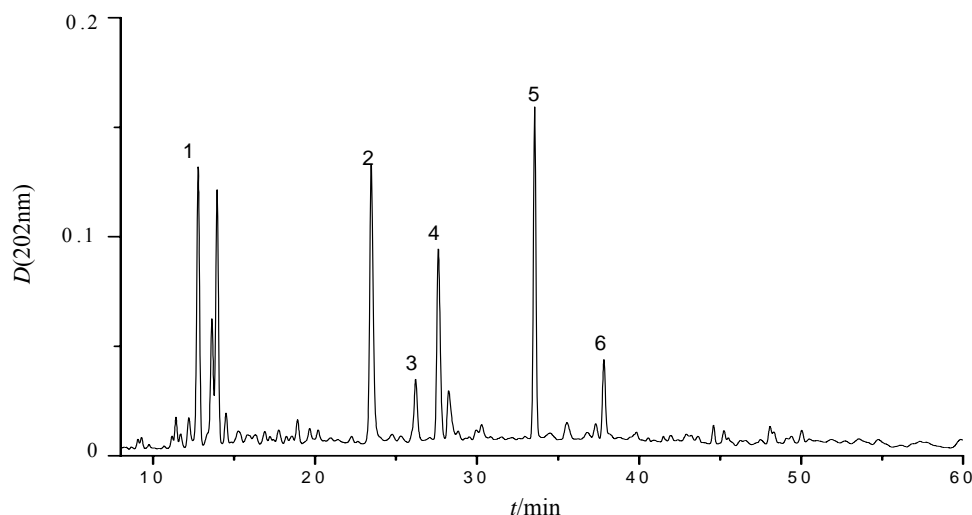


图1 刺参 HPLC 指纹图谱
Fig.1 HPLC fingerprint of Holothurian

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度 按色谱条件,对同一供试品溶液重复进样6次测定,分别测得其中6个主峰的峰面积和保留时间,计算其相对标准偏差(RSD)。6个主峰峰面积和保留时间 RSD 值分别在 0.93% ~ 2.43% 和 0.49% ~ 1.00%范围之内,表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性 精密称取同一刺参样品6份,按处理方法制成供试品溶液,按照色谱条件进样测定,

测得6个主峰的峰面积和保留时间,并计算其相对标准偏差,6个主峰峰面积和保留时间的RSD值分别在 2.76% ~ 4.80%和 0.78% ~ 1.01%范围内,表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性 将供试品溶液按照色谱条件,分别在 0、1、3、6、12、24、48 h 进样测定,结果显示6个主峰的峰面积和保留时间的 RSD 值分别在 2.67% ~ 4.90%和 1.59% ~ 2.19%范围内,说明供试品溶液在 48 小时内化学性质稳定。

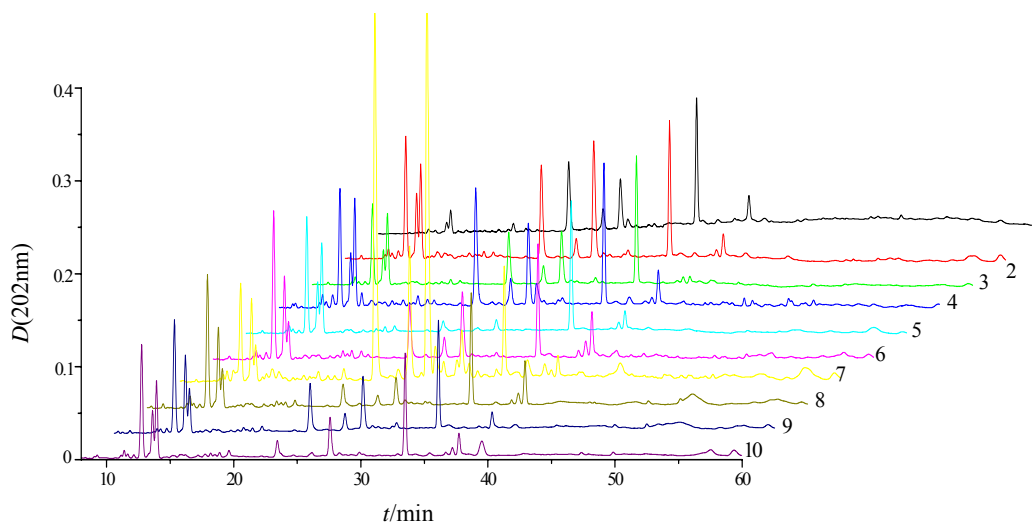


图2 10批刺参HPLC指纹图谱
Fig.2 HPLC fingerprints of ten different Holothurians

2.4 市售刺参指纹图谱的建立

为了保证所建立的刺参指纹图谱具有足够的代表性,笔者从市场上随机购取 10 批刺参样品,按供试品溶液制备方法进行制备,按 HPLC 色谱条

件进样分析图谱(图2),从图中可以看出 10 批刺参样品的指纹图谱总体上比较相似,图谱中各峰分离度良好。10 批刺参样品的 HPLC 指纹图谱中特征性明显的共有峰(扣除溶剂峰)6 个(图1),并

且6个色谱峰的相对保留时间极为相近,相对保留时间的相对标准偏差范围为0.07~1.22(以3号峰为标准峰作参考)(表2),可见各批刺参样品的6个色谱峰在指纹图谱分析过程中色谱行为相同,可认为是相同物质。由于这6个峰在各批刺参样品的指纹图谱中均出现,色谱行为相同,并且峰面积大、特征性强,能反映刺参的固有化学特征,因此,这6个峰可作为刺参鉴别、质量评价的主要依据。

2.5 相似度分析用于刺参质量评价

单靠肉眼观察指纹图谱之间的差别对样品进行分析比较,容易造成主观偏差。相似度分析可以定量描述指纹图谱之间的差异,评价更为客观。利用EXCEL可实现中药指纹图谱的谱峰匹配和相似度计算^[14,15]。本文采用EXCEL 2002办公软件(夹角余弦法),以刺参指纹图谱中6个共有特征峰为

变量,以10批刺参样品各共有峰峰面积的平均值为对照指纹图谱,对10批刺参指纹图谱与对照指纹图谱之间的相似度进行计算,结果见表3。可以看出10批刺参样品与对照指纹图谱之间相似度值均高于0.80(在中药指纹图谱相似度分析研究中,一般认为相似度在0.80以上的两个样品相似度较高,在0.90以上非常相似);1、2、3、5、8号样品的相似度值在0.90以上,4、6、7、9、10号样品相似度值在0.80~0.90之间,样品的相似度值存在一定差别。采用HPLC指纹图谱结合相似度分析,可以辨别不同批次市售刺参间的质量差异。与传统方法相比^[7,8,13],本研究建立的市售刺参HPLC指纹图谱分析鉴别方法,特征性强,可量化,操作简便,重现性好。

表2 10批刺参样品6个共有峰的相对保留时间及相对标准偏差

Tab. 2 relative retention time and relative standard deviation of six common peaks for ten samples

峰号	刺参样品批次										RSD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	0.543	0.541	0.544	0.543	0.545	0.544	0.544	0.547	0.544	0.544	0.28
2	0.582	0.592	0.594	0.594	0.594	0.593	0.575	0.583	0.581	0.581	1.22
3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
4	1.118	1.117	1.117	1.117	1.116	1.116	1.116	1.118	1.117	1.117	0.07
5	1.177	1.178	1.176	1.177	1.177	1.177	1.176	1.176	1.178	1.178	0.07
6	1.438	1.433	1.431	1.428	1.431	1.430	1.430	1.437	1.431	1.431	0.22

RSD: 相对标准偏差

表3 10批刺参样品6个共有峰的峰面积及相似度计算结果

Tab. 3 Result of similarity analysis and peaks area of six common peak for ten samples

峰号 相似度	刺参样品批次										平均值
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	1042.80	1541.30	1512.60	1523.10	1940.90	1302.80	1751.20	1515.40	1517.68	1375.80	1365.78
2	857.80	1479.20	1989.70	194.10	918.40	6010.10	474.00	800.10	330.30	1094.80	1414.85
3	307.40	343.70	459.30	87.50	309.40	2081.50	205.60	286.70	100.40	350.40	453.19
4	780.90	1868.60	1275.50	157.70	1025.50	6536.60	422.80	816.40	582.70	764.40	1423.11
5	1580.20	1645.50	1724.70	1575.90	1353.60	1436.00	1312.60	1296.40	1221.90	1492.50	1463.93
6	111.50	359.70	467.40	235.40	560.90	393.50	581.00	283.40	312.70	359.00	366.45
相似度	0.96	0.99	0.99	0.87	0.95	0.84	0.86	0.96	0.88	0.81	-

烟台、青岛沿海一带,与刺参外观相似的丛足瓜参(*Cucumaria multipes*)分布也较广,其外形相似,市场有以丛足瓜参充刺参出售。为验证本研究使用的刺参质量评价技术,笔者建立了丛足瓜参市场样品的HPLC指纹图谱(图4)。与图1比较可以看出,优质刺参与丛足瓜参色谱图色谱峰数目、峰保留时间均不同,优质刺参的色谱峰数目要比丛足瓜参多,依色谱图易将丛足瓜参与刺参区分。两批丛足瓜参样品与刺参的相似度值分别为0.42、0.51,远低于0.80,可见丛足瓜参与刺参之间的固

有化学特征差异明显。

3 结论

应用刺参HPLC指纹图谱,以刺参固有的化学成分峰作为刺参质量评价指标,结合相似度分析用于市售刺参的质量评价,能客观的、量化的反应刺参内在的化学特性差异,可辨别不同批次市售刺参间的质量差异,还可区分劣质海参与优质刺参。该方法具有较好的重复性、稳定性和专属性,实验过

程简单、规范,对于刺参质量评价有较大参考价值,为海洋食品及药用生物质量控制提供了一种新思路。

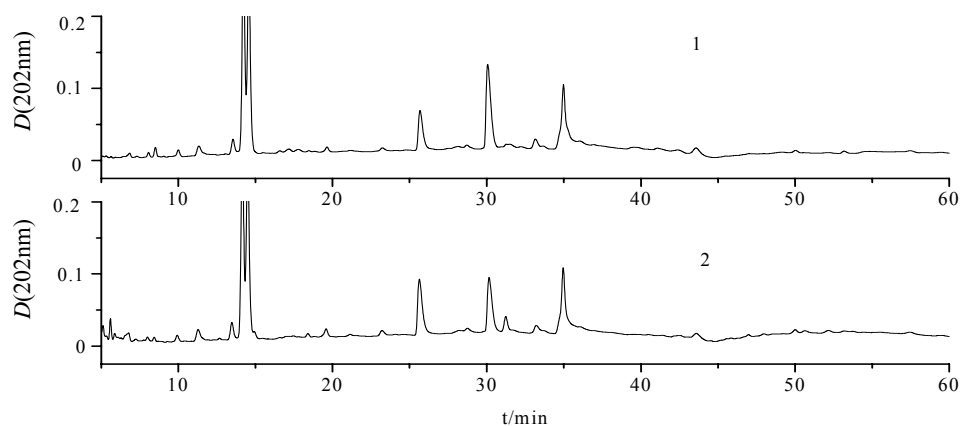


图4 2批丛足硬瓜参HPLC指纹图谱

Fig.4 HPLC fingerprints of two different *Cucumaria multiples*

中国海洋大学水产学院曾晓起教授为本研究鉴定样品,特此鸣谢!

参考文献

- [1] 张朝晖, 蔡宝昌. 海洋药物研究与开发[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 197-199.
- [2] 李八方. 海洋生物活性物质[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2007: 90-100.
- [3] 盛文静, 薛长湖, 赵庆喜, 等. 不同海参多糖的化学组成分析比较[J]. 中国海洋药物, 2007, 26 (1): 44-49.
- [4] Wang F Z, Fang Y CH, Zhu T J, et al. Seven new prenylated indole diketopiperazine alkaloids from holothurian-derived fungus *Aspergillus fumigatus*[J]. *Tetrahedron*, 2008, 64 (34): 7986-7991.
- [5] Fredalina B D, Ridzwan B H, Zainal A. A, et al. Fatty acid compositions in local sea cucumber, *Stichopus chloronotus*, for wound healing [J]. *General Pharmacology*, 1999, 33: 337-340.
- [6] 韩玉谦, 冯晓梅, 管华诗. 海参皂甙的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(5): 669-672.
- [7] 李贇, 费来华, 陈家鑫. 十五种海参骨片的形态学研究[J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38(2): 211-216.
- [8] 姜波, 关紫峰, 范圣第. 傅里叶变换光谱法快速鉴别海参质量[J]. 食品科技, 2006, 7: 230-231.
- [9] 陈培栋. 天然药物 HPLC 指纹图谱的研究进展[J]. 中国药房, 2007, 18(36): 2871-2872.
- [10] 赵恒强, 陈军辉, 王虹, 等. 马粪海胆高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国海洋药物, 2009, 28(3): 34-38.
- [11] 李春荣, 万新祥. 皱瘤海鞘有效部位 HPLC 指纹图谱的初步研究[J]. 中药材, 2006, 29(3): 221-224.
- [12] 张道来, 陈军辉, 王虹, 等. HPLC-ESI-MS 鉴定罗氏海盘车中的多种化合物及相关指纹图谱研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2009, 11(1): 173-178.
- [13] 陈军, 周群, 郁露, 等. 海刺参及其产品红外光谱的分析与鉴定 [J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(9): 1723-1726.
- [14] 王龙星, 肖红斌, 梁鑫森, 等. 一种评价中药色谱指纹谱相似性的新方法: 向量夹角法[J]. 药学学报, 2002, 37(9): 713-717.
- [15] 苗爱东, 孙殿甲. Excel 2002 在中药指纹谱相似度计算中的应用[J]. 药学进展, 2003, 27(1): 51-54.