

滇重楼皂苷部位 HPLC 指纹图谱的研究

张海珠, 周浓, 夏从龙 (大理学院药学院, 云南大理 671000)

摘要 [目的] 建立滇重楼皂苷有效部位 HPLC 指纹图谱分析方法, 研究不同产地滇重楼药材的质量。[方法] 采用 HPLC 等度洗脱的方法进行色谱分离, 使用“相似度评价软件”进行数据处理, 对不同产地的滇重楼药材皂苷部位进行指纹图谱的研究。[结果] 确立了滇重楼药材皂苷部位指纹图谱的高效液相分析条件, 确定 8 个共有峰。不同产地的滇重楼药材皂苷部位指纹图谱有一定差异。[结论] 采用 HPLC 法制定滇重楼药材皂苷部位的指纹图谱, 其皂苷类成分得到较好的分离, 方法重现性好, 可用于滇重楼的质量评价。

关键词 滇重楼; HPLC; 皂苷; 指纹图谱; 质量评价

中图分类号 O657.7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)21-09978-02

Study on HPLC-FPS of Saponins from *Pairs polyphylla* Smith var *yunnanensis* (Franch) Hara

ZHANG Hai-zhu et al (College of Pharmacy, Dali University, Dali, Yunnan 671000)

Abstract [Objective] The research aimed to establish a method of HPLC-fingerprint spectrum (HPLC-FPS) for the active part in *Pairs polyphylla* Smith var *yunnanensis* (Franch) Hara in order to control its quality from different palaces. [Method] The isocratic elution mode was applied in chromatographic separation, and data were analysed by “Similarity Evaluation software” to compare its HPLC-FPS from different places. [Result] The conditions for HPLC analysis of *Pairs polyphylla* Smith var *yunnanensis* (Franch) Hara were established and 8 common peaks were separated. [Conclusion] All components in the spectrum were separated well and the HPLC fingerprint method is repeatable. The method can be used in quality assessment of *Pairs polyphylla* Smith var *yunnanensis* (Franch) Hara

Key words *Pairs polyphylla* Smith var *yunnanensis* (Franch) Hara; HPLC; Saponins; Chromatography fingerprint; Quality assessment

滇重楼为百合科植物云南重楼 [*Pairs polyphylla* Smith var *yunnanensis* (Franch) Hara] 的干燥根茎^[1]。重楼的化学成分主要以甾体皂苷类为主, 是其主要活性成分。其苷元主要为异螺甾烷醇类的薯蓣皂苷元和偏诺皂苷元^[2-3]。现已从该属植物中分离鉴定出 50 余种化合物, 其中主要有效成分为甾体皂苷, 约占总化合物数目的 80%, 并含有氨基酸、甾酮、蜕皮激素、黄酮苷等化合物^[4]。现代药理研究表明, 该药具有抗肿瘤、抗菌消炎、止血、镇静镇痛、抑制精子活性、抗细胞毒、免疫调节等广泛的药理活性^[5]。在云南, 重楼又是一些著名中成药如云南白药、宫血宁胶囊、热毒清胶囊等的主要原料之一, 每年仅云南省的用量就达数百吨, 市场需求量较大。由于长期掠夺式的采挖, 缺乏保护, 资源日益减少, 现已列为云南省 30 种稀缺濒危天然药物之一^[6]。因此, 笔者对滇重楼根茎皂苷部位进行 HPLC 指纹图谱研究, 以期对滇重楼药材有效部位的内在质量提供一定的参考依据。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱仪 (Agilent HP 1100), 自动进样器, DAD 检测器。乙腈为色谱纯, 水为自制三重蒸馏水, 其余试剂为分析纯。2008 年 7 月在云南省大理地区的 9 个不同的滇重楼分布区进行多点采集 (表 1), 经大理学院药学院生药学教研室马晓匡教授鉴定为百合科植物云南重楼 (*P. polyphylla* var. *yunnanensis*) 的干燥根茎。

1.2 方 法

1.2.1 色谱条件。 ZorbaxSB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 和保护柱; 流动相: 乙腈-水 (40:60); 检测波长: 203 nm; 柱温 30 °C; 流速: 1.0 ml/min; 进样量 20 μl。

1.2.2 供试品溶液的制备。 精密称取滇重楼根茎 (过三号筛) 约 0.5 g, 加甲醇 30 ml, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液用水

浴蒸干, 残渣加水 20 ml 溶解, 用水饱和的正丁醇萃取 3 次 (20、10、10 ml), 合并正丁醇萃取液, 于水浴上蒸干, 残渣加甲醇溶解并定容至 10 ml, 摇匀, 以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 得滇重楼根茎的供试品溶液。

1.2.3 精密度试验。 取同一供试品溶液, 连续进样 6 次。

1.2.4 稳定性试验。 取同一供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样 6 次。

1.2.5 重复性试验。 取同批样品 6 份, 按“1.2.2”供试品溶液的制备方法操作, 测定。

1.2.6 样品检测。 取供试品溶液, 按拟定的方法进行样分析。

表 1 药材来源

Table 1 Sources of test samples

编号 No.	采集地点 Sampling places	栽培方式 Cultivation patterns
1	宾川县鸡足山镇风景管理区	野生
2	云龙县漕涧镇固东平村 1 组 2 号	家种
3	云龙县漕涧镇固东平村 1 组 1 号	家种
4	云龙县漕涧镇固东平村 1 组 3 号	家种
5	云龙县漕涧镇固东平村 2 组	家种
6	鹤庆县黄坪镇水槽村	野生
7	宾川县宾居镇乌龙坝村	野生
8	大理市喜州镇花甸坝药材场	野生
9	大理市下关镇大理学院校园	家种

2 结果与分析

2.1 精密度试验结果 结果表明, 8 个共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 3%, 提示精密度良好。

2.2 稳定性试验结果 结果表明, 8 个共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 3%, 相对峰面积 RSD 均小于 3%, 提示 24 h 内供试品溶液稳定性较好。

2.3 重复性试验结果 结果表明, 8 个共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 3%, 相对峰面积 RSD 均小于 3%, 提示方法的重现性良好。

2.4 指纹图谱的建立及分析

2.4.1 共有峰的标定。 根据 9 批样品结果表明, 滇重楼的正

基金项目 大理学院药物研究所科研项目资助 (2008YY006); 大理学院青年教师科研基金项目资助 (2008DX60)。

作者简介 张海珠 (1983 -), 女, 山东阳谷人, 硕士, 助教, 从事药物质量评价研究。

收稿日期 2009-04-28

丁醇萃取部位共标定 8 个峰作为特征峰构成指纹图谱。共有 8 个峰相对保留时间的结果见表 2, 相对峰面积的结果见表 3。

表 2 不同样品共有指纹峰相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common fingerprint peaks for different samples

样品编号 No. of samples	各指纹峰相对保留时间 Relative retention time of each fingerprint peak							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0.041 3	0.066 0	0.091 5	0.120 2	0.232 9	0.525 9	1.000 0	1.175 5
2	0.041 2	0.065 8	0.094 1	0.119 7	0.227 9	0.520 0	1.000 0	1.164 3
3	0.040 0	0.064 0	0.093 1	0.114 8	0.228 0	0.518 8	1.000 0	1.145 8
4	0.041 0	0.063 4	0.090 0	0.116 9	0.227 7	0.518 3	1.000 0	1.163 4
5	0.041 8	0.066 1	0.093 5	0.119 4	0.226 3	0.526 7	1.000 0	1.162 0
6	0.041 2	0.065 9	0.092 2	0.120 3	0.232 8	0.525 9	1.000 0	1.176 0
7	0.041 1	0.065 8	0.092 7	0.115 6	0.237 9	0.518 7	1.000 0	1.162 2
8	0.040 9	0.063 3	0.090 2	0.117 1	0.227 4	0.518 3	1.000 0	1.163 1
9	0.041 7	0.066 0	0.092 3	0.119 6	0.226 8	0.527 0	1.000 0	1.162 4
RSD//%	1.265 1	1.844 2	1.517 4	1.776 9	1.703 0	0.771 2	0.000 0	0.755 4

表 3 不同样品共有指纹峰相对峰面积

Table 3 Relative peak area of common fingerprint peaks for difference samples

样品编号 No. of samples	各指纹峰相对峰面积 Relative peak area of each fingerprint peak							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0.353 5	0.727 3	2.564 8	7.360 2	0.177 1	0.143 3	1.000 0	2.026 2
2	0.518 7	3.700 9	8.496 7	22.736 8	0.591 6	0.581 8	1.000 0	1.930 4
3	1.104 3	0.884 1	16.262 9	68.729 3	1.825 4	0.755 8	1.000 0	2.776 9
4	0.244 0	0.129 0	0.705 3	1.080 5	0.060 9	0.109 7	1.000 0	0.644 8
5	0.239 3	0.723 2	1.198 7	2.112 2	0.078 9	0.103 7	1.000 0	0.769 6
6	0.578 9	1.588 4	3.319 7	7.900 0	0.222 8	0.328 3	1.000 0	2.337 5
7	0.701 7	7.636 8	10.894 2	25.616 2	0.254 7	0.843 9	1.000 0	1.842 0
8	0.338 0	0.256 9	1.157 5	1.460 1	0.035 9	0.171 5	1.000 0	0.666 1
9	0.370 7	1.553 6	1.489 7	1.912 7	0.094 4	0.224 9	1.000 0	0.534 5

2.4.2 非共有峰面积的比值。计算各样品中非共有峰占总峰面积的比值,结果表明,其比值均小于 5%,符合指纹图谱的技术要求。

2.4.3 各地滇重楼药材皂苷部位指纹图谱相似度。9 批样品的相似度分别为:0.926、0.929、0.953、0.796、0.870、0.883、0.877、0.855、0.840。

3 结论与讨论

(1) 由于皂苷类成分是滇重楼药材的有效成分,故该研究采用高效液相色谱法制定了滇重楼根茎皂苷有效部位的指纹图谱,取得了较满意的研究结果,共标定了 8 个共有指纹峰。方法可靠,重现性、稳定性良好。这为滇重楼皂苷部位的质量评价与开发利用奠定了一定的基础。

(2) 通过对溶剂超声后萃取法和大孔吸附树脂法制备样品的比较研究可知,溶剂萃取法所得供试品溶液的色谱图比大孔吸附树脂法制得的供试品溶液色谱图有较多的色谱峰,且前者重楼皂苷色谱峰的峰面积大于后者。因此,该试验采用超声后用正丁醇溶剂萃取法进行供试品溶液的制备。

(3) 通过对梯度洗脱和等度洗脱方法的比较研究可知,由于皂苷的 UV 吸收波长为末端吸收,采用梯度洗脱时溶剂吸收使基线漂移严重,影响色谱图参数的计算,而采用等度洗脱过程基线平稳。所以采用等度洗脱方法进行。

(4) 选用乙腈-水系统作为流动相,流动相中乙腈和水的比例大于 40:60 时,出峰时间较晚,小于 40:60 时,出峰太早,各组分分离不完全,所以采用此比例较合适,此结果与吴珊等^[7]的试验结果一致。

(5) 通过对 9 批滇重楼药材皂苷部位指纹图谱各共有指纹峰相对峰面积的计算和比较,发现栽培滇重楼中皂苷的总含量高于野生滇重楼,可能是因为滇重楼是喜肥的物种,不但需要大量的农家肥作底肥,而且每年需要多次人畜粪水作追肥^[8],但也有野生品皂苷含量高于栽培品,但栽培品是否优于野生品,需结合药理药效学、临床应用等对其进一步的研究。

(6) 对不同采样地点的滇重楼根茎中皂苷部位的指纹图谱的研究表明,不同来源地的滇重楼的指纹图谱有一定的差异,同一采样地点云龙县漕涧镇固东平村的指纹图谱也有一定差异,可能与中药材成分复杂、不同地区的滇重楼药材生长的生态环境、采样年限等不同有关,也可能与滇重楼不同居群间遗传背景存在一定差异有关。因此,今后应进一步加强滇重楼药材的种质资源及种植的规范化技术研究,以确保滇重楼药材用药质量的优质、稳定、可控。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典, 1 部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 183.
- [2] 陈昌祥, 周俊, 张玉童, 等. 滇重楼地上部分的甾体皂甙[J]. 云南植物研究, 1990, 12(3): 323-329.
- [3] 汤海峰, 赵越平, 蒋永培. 重楼属植物的研究概况[J]. 中草药, 1998, 29(12): 839-842.
- [4] 边洪荣, 李小娜, 王会敏. 重楼的研究及应用进展[J]. 中药材, 2002, 25(3): 218.
- [5] 武姗姗, 高文远, 段宏泉, 等. 重楼化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(3): 110-113.
- [6] 陆辉, 许继宏, 陈锐平, 等. 云南重楼属植物资源现状与保护对策[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2006, 28(S1): 307-310.

(下转第 10328 页)

根据这个映射关系可以生成扫描仪特征文件。

显示器的特性化方法类似,不再赘述。

2.2 色彩转换的实现 色彩转换主要完成读指定 Profile 文件的标签信息,先查找 AtoBi 标签,若找到,则使用查找表模型算法;若找不到,则从 Profile 文件头读取颜色空间信息,若颜色空间为 RGB,则可以使用矩阵模型算法。

2.2.1 查找表模型算法的实现。查找表算法中输入的颜色分量经过一个 3×3 矩阵,一组一维输入查找表,一个多维查找表和一组一维输出查找表而转换为输出颜色分量。其中,3×3 矩阵是专门针对输入数据是 XYZ 值的;每个一维输入表将输入的颜色值规化到 0~65 535,分别存储到一维数组里;通过多维表完成从扫描仪 RGB 色彩空间向 PCS 色彩空间的转换;每个输出表把输出颜色值转换成输出设备范围的颜色值,也存储到一维数组中。

查找表方法的关键是建立一张多维查找表,即建立起输出和输入数据的对照表,对于每一个输入数据,在输入表中找到其位置,根据其相近的数据用插值的方法求出相应的输出数据。为了尽量减少特性文件的大小,多维查找表并没有列出所有可能的输入值对应的输出值,而仅仅在每个输入通道上取色值相同数量的格点,并在此格点上列出相应的输出值。但是不完全的颜色查找表增加了色彩空间之间转换的复杂度。因此,多维查找表的使用成了整个转换过程性能的关键,采用合适的插值算法既可以提速度又可以减少色彩的失真。目前最常用的算法有:线性插值、四面体插值和棱锥插值。

插值的实现首先要获取 Profile 文件中的 AtoBi 标签或 BtoAi 标签的信息。AtoBi 标签是从设备空间到 PCS 空间转换所用的标签,标签类型可以是 lut8Type、lut16Type 或 lutAtoBType^[5],每种类型都定义了各自的处理过程。BtoAi 标签是从 PCS 空间到设备空间转换所用的标签。标签类型与 AtoBi 标签相同,处理过程正好相反。

2.2.2 矩阵模型算法的实现。由于大多数扫描仪不是标准的线性设备,所以变换算法先进行线性化。先从扫描仪的 Profile 文件中读取 RedTRCTag、GreenTRCTag、BlueTRCTag 标签。这 3 个标签是专门存放阶调再生曲线 (TRC) 的,ICC 为它提供了 2 种可选的类型:曲线类型 (curveType) 和参数曲线类型 (parametricCurveType)。

curveType 包括 4 个字节的计数值 n ,来说明用多少个点来描述这条曲线,另外还有一个一维表来记录这些描述曲线的点。

当 $n = 0$ 时,曲线为一条斜率为 1.0 的直线;当 $n = 1$ 时,

用一个 gamma 值来表示曲线;当 $n = 2$ 时,应该设置一个表示曲线的点的个数,这样当用线性插值来产生中间值时可以得到正确结果。

parametricCurveType 通过记录一个用参数预定义的函数来描述一维曲线,它提供了多种曲线的类型^[5],用户可根据实际情况来选择。函数的定义域和值域都应在 0~1.0,任何超出值域范围将会被剪切掉,输入和输出值都应该归一化。

TRC 曲线在 Profile 中是点的坐标值,横坐标是颜色分量 (r 或 g 或 b),纵坐标是亮度 Y 。进行颜色管理时,需要找出输入颜色值在 TRC 中的位置范围,确定输入颜色分量与亮度 Y 的对应关系,此即线性化的过程。然后通过乘以 3×3 矩阵,转换成 PCS 空间的值。3×3 矩阵 (由 profile 中的 redMatrixColumnTag, greenMatrixColumnTag, blueMatrixColumnTag 标签获得)把线性 RGB 值转换成相对的 PCS 空间的 XYZ 或 LAB 值。利用逆变换可将 PCS 空间的值转换成显示器空间的颜色值,此时所使用的 Profile 为显示器的 Profile。

2.2.3 不同模型转换算法对比。矩阵模型适用于色彩空间是 RGB 的线性设备,其算法较简单,但处理精度偏低。查找表模型适于任何设备,特别适合于非线性输出设备,要求更多的存储空间,处理精度较高。表 1 给出了 2 种模型转换效果的色差对比。

表 1 转换效果比较
Table 1 The comparison of converting effects

方法	平均色差	最大色差
Methods	Average chromatism	Maximum chromatism
矩阵模型 Matrix model	5.67	21.33
查找表模型 CLUT model	3.41	17.19

3 结语

对农业专题图从扫描仪输入到显示器显示的过程进行色彩管理,可以保证色彩失真尽可能的小,从而保证了符号颜色特征的稳定性,进而保证了专题图的自动识别效果。所以,对农业专题图识别前的颜色管理是不可或缺的。

参考文献

[1] 王秀芳,陈飞,农宇,等. 农业专题图信息自动获取系统[J]. 农业机械学报,2008,39(5):99-102.

[2] 何敏丽,成刚虎. ICC Profile 及基于 ICC 的色彩管理技术[J]. 广东印刷,2006(6):14-16.

[3] 胡承伟,万晓霞. 图像系统中的色彩管理[J]. 包装工程,2004,25(5):27-29.

[4] 张帆. 基于 ICC 设备特征文件的色彩管理(一)[J]. 印刷杂志,2005(2):4-7.

[5] INTERNATIONAL COLOR CONSORTIUM. Specification ICC File Format for Color Profiles Version 4.0.0[Z]. 2001:1-83.

[8] 高文学,杨宇华,王志和,等. 草乌、黄芩、重楼、党参仿生态栽培试验研究[J]. 林业调查规划,2006,31(1):100-105.

(上接第 9979 页)

[7] 吴珊,吴卫,郑有良. 反相高效液相色谱法同时测定重楼药材中 4 种皂苷的含量[J]. 时珍国医国药,2007,18(8):1896-1897.