

基于 HPCE 指纹图谱的土鳖虫质量控制研究

张月娥¹ 陈伟韬² 罗文汇² 陈 昭²

(1 广州番禺区中医院, 广州, 510000; 2 广东省第二中医院(广东省中医药工程技术研究院), 广州, 510095)

摘要 目的: 在建立基于高效毛细管电泳指纹图谱的基础上, 建立更为全面、准确的土鳖虫药材质量控制与评价方法; 方法: 采用毛细管电泳法(HPCE 法), 使用熔融硅胶毛细管(75 μm i. d., 总长 30 cm, 有效长度 21 cm), 以硼砂为缓冲液(10 mmol/L, pH 9.7), 进样电压 5 kv 10 s, 分离电压 15 kv, 检测波长 214 nm, 建立不同批次、来源土鳖虫药材的指纹图谱。根据所得指纹图谱, 找出其中的共有峰, 并使用峰面积归一化法计算各组分含量; 结果: 土鳖虫药材中存在 7 个共有峰, 含量测定结果显示, 上述成分的含量在不同批次、来源药材中存在统计学意义; 结论: 该法快速、高效、准确度高, 精密度高, 能够更为全面、系统地评价土鳖虫药材的质量。

关键词 土鳖虫; HPCE; 指纹图谱; 质量控制

Research of Quality Control of Ground Beetle by HPCE Fingerprint

Zhang Yue¹, Chen Weitao², Luo Wenhui², Chen Zhao²

(1 Hospital of Traditional Chinese Medicine in Guangzhou Panyu District, Guangzhou 510000, China; 2 Guangdong Second Traditional Chinese Medicine Hospital (Guangdong Provincial Engineering Technology Research Institute of T. C. M.), Guangzhou 510095, China)

Abstract Objective: To establish a comprehensive and precise method for quality control of Ground Beetle by the High Performance Capillary Electrophoresis (HPCE); **Methods:** A fused silica capillary (75 μm i. d., 21 cm effective length, 30cm total length) was used as column, borate solution was used as buffer solution (10 mmol/L, pH 9.7), inject voltage was 5 kv 10 s, separation voltage was 15 kv and detection wavelength was 214 nm, common peaks were extracted from fingerprints of different batches and origins of Ground Beetle, and content of each compound was calculated by area normalization method. **Results:** Total seven peaks from the fingerprint were identified, and as the content determination result indicated, content of each compound had significant differences. **Conclusion:** HPCE is fast, efficient, accurate and precise, which can be used as a comprehensive and systematic method for quality control of Ground Beetle.

Key Words Ground Beetle; HPCE; Fingerprint; Quality control

中图分类号: R 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.03.042

1 资料与方法

1.1 一般资料 土鳖虫又名廔虫、地鳖虫、土元。为鳖蠊科昆虫地鳖 *Eupolyphaga sinensis* Walker 或冀地鳖 *Stelephaga plancyi* (Boleny) 的雌虫全体, 为《中国药典》收录的传统中药品种, 味咸, 性寒, 具有破瘀血, 续筋骨的功效, 中医常用于筋骨折伤、瘀血经闭、癥瘕痞块^[1-3]。土鳖虫在我国境内分布广泛, 其中地鳖分布于全国大部分地区; 冀地鳖分布于河北、河南、陕西、甘肃、青海及湖南等地; 此外, 广东、广西等地还有金边土鳖(特征为背壳边缘呈金色)作为习用药材使用。野生者在夏、秋季捕捉, 人工饲养者随时捕捉, 捕到后用沸水烫死, 晒干或烘干。近年来, 随着分析技术和分析方法的发展, 围绕土鳖虫进行的药材鉴别、含量测定、活性成分提取分离等方面研究多有见诸报道^[4-7]。

由于土鳖虫为动物来源的中药材, 根据文献报道, 其含有的化学成分多为蛋白质、氨基酸、生物碱或多肽类, 其中多数成分尚处于结构未知、功效不明的状态。《中国药典》2015 版“土鳖虫”项下仅记载了性状、显微鉴别与薄层鉴别; 同时, 由于土鳖虫中多数成分存在分子量大、极性高或结构相似等特征, HPLC 等传统分析技术仅能够检测其中少量小分子化合物, 不能准确反映该药材与功效相关的质量信息^[8-10]。

高效毛细管电泳(High Performance Capillary Electrophoresis, HPCE)技术是在高压电场作用下, 带点组分随着电场方向迁移的一种分离分析方法^[11-17]。由于这种分离在狭小空间内进行(25~200 μm 内径, 30~70 cm 总长的毛细管), 加之缓冲液液流受电场推动而呈平面型, 故具有较高的柱效; 此

基金项目: 广东省中医药局建设中医药强省科研课题(编号: 20141027)

作者简介: 张月娥(1973—), 女, 学士, 主管技师, 研究方向: 主要从事生物指标检测诊断技术应用研究, E-mail: 364374130@qq.com

通信作者: 陈昭, Tel: (020)83482098, E-mail: cz20081331@126.com

外,待测物在该模式下,由于带电量的不同可导致迁移速率的差异,进而实现分离,且受分子量与极性影响相对较小,更有利于分析氨基酸、蛋白质、多肽等传统液相色谱难以分离的化合物。李峰等^[18]报道了采用 HPCE 指纹谱对土鳖虫药材进行鉴别研究,但目前为止,仍未见到基于该技术进行的指纹图谱含量测定研究。

1.2 方法

1.2.1 仪器 毛细管电泳分析采用 Agilent 3DCE 高效毛细管电泳仪(美国 Agilent 公司),配备 DAD 检测器及 Chemstation 工作站。化合物结构鉴定所用质谱仪为 Thermo TSQ Quantum(美国 Thermo Fisher 公司)液相色谱-质谱联用仪。称量采用 METTLER XS205DU 型电子分析天平(瑞士),pH 测定采用 METTLER TOLEDO pH 计,超声采用昆山科学仪器厂生产的超声仪,毛细管购自河北永年瑞洋色谱器件有限公司。

1.2.2 试剂和试药 缓冲液所使用的硼砂及调节 pH 的磷酸二氢钠购自德国 Sigma-Aldrich 公司,土鳖虫样品分别购自广东省各大医药公司,共两个来源 5 批,所有样品经广东省中医药工程技术研究院刘法锦研究员鉴定为鳖蠊科昆虫地鳖 *Eupolyphaga sinensis* Walker,金边土鳖 *Opisthoplata Orientalis* Buron 或冀地鳖 *Stelephaga plancyi* (Boleny)。

1.2.3 对照品和供试品的制备 对照品的制备方法为,精密称取土鳖虫对照药材 2 g,置于 100 mL 圆底烧瓶中,加入 20% 乙醇 50 mL,加热至微沸,回流 1 h,过滤,取滤液蒸干,残渣加 20% 乙醇 10 mL 复溶,即得。

供试品的制备方法为,取土鳖虫药材 2.0 g,采用与对照品相同的方法处理,即得。

1.2.4 毛细管电泳分析 采用熔融硅胶毛细管(75 μm i. d., 总长 30 cm,有效长度 21 cm);缓冲液:10 mmol 硼砂(以磷酸二氢钠调节 pH 至 9.7),检测波长 314 nm,进样电压 5 kv10 s,分离采用电压梯度:0-15 min 5-15 kv,0-30 min15-20 kv,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果

2.1 方法学考察

2.1.1 标准曲线与线性 分别精密称取同一批次地鳖药材 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10 g,分别置于 100 mL 圆底烧瓶中,按“1.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“1.2.4”项下方法进行测定,记录各共有峰的总峰面积,计为 y,已药材取样量为 x,计算得标准曲线为 $y = 274.89x - 8.149$ ($r^2 = 0.9995$)。结果显示,

该方法线性良好,可在生药量 0.1 ~ 10 g 范围内对土鳖虫中指标性成分进行准确定量。

2.1.2 检测限和定量限 精密吸取对照品溶液适量,加甲醇逐级稀释,按“1.2.4”项下方法进行测定,记录各共有峰的峰面积。结果显示,各主要峰的最低检测限(LOD, $S/N \geq 3$)为 0.005 g 生药量,定量限(LOQ, $S/N \geq 10$)为 0.02,显示该方法灵敏度良好。

2.1.3 精密度与回收率 精密度的测定方法为:取同一批的地鳖对照药材 2 g,精密称定,按“1.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“1.2.4”项下方法进行测定,记录总峰面积,连续测定 6 次,根据所得结果计算 RSD 值。结果显示,6 次测定中 7 个指标性成分峰面积总和的精密度分别 2.3%,证明仪器精密度良好。

回收率的测定方法为:精密称取已知含量的同批土鳖虫药材 2 g 9 份,记为低、中、高 3 个浓度组,每组 3 份。样品分别按表 1 所述加入一定量的已知含量的地鳖对照药材,按“1.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“1.2.4”项下方法进行测定,每份样品平行测定三次,根据所测得指标性成分的总峰面积计算回收率(结果见表 1)。结果显示,方法回收率良好,能够对土鳖虫药材进行准确定量。

表 1 回收率测定结果($n = 3$)

样品名	称样量 (g)	原有峰 面积	加入量 (g)	测得峰 面积	回收率 (%)	R. S. D (%)	
尿囊素	低	1.013	236.7	0.866	436.5	100.1	3.1
	中	1.056	238.3	1.015	488.5	100.3	2.7
	高	1.004	235.9	1.372	552.1	105.6	2.5

2.1.4 重复性试验 取同一批的土鳖虫药材 6 份,每份 2 g,精密称定,按“1.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“1.2.4”项下方法进行测定,记录总峰面积,根据所得结果计算 RSD 值。结果显示,6 次测定中 7 个指标性成分峰面积总和的精密度分别 3.1%,证明方法重复性良好。

2.1.5 稳定性试验 取同一批的土鳖虫药材 2 g,精密称定,按“1.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“1.2.4”项下方法,分别在 0,1,2,4,6,8,12 h 进行测定,记录总峰面积,根据所得结果计算 RSD 值。结果显示,结果显示,6 次测定中 7 个指标性成分峰面积总和的精密度分别 2.8%,证明供试品稳定性良好。

2.1.6 不同批次、来源样品的 HPCE 含量测定 取“1.2”项下五批药材,按“1.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“1.2.4”项下方法进行测定,记录峰面积,

选取指纹图谱中响应较大且共同存在的色谱峰作为监控指标峰。经过与地鳖和冀地鳖对照药材进行比对,确定其中 7 个成分作为质量标准的候选指标。之后,采用峰面积归一化法,计算上述 7 个成分所占比例,结果见表 2。

表 2 不同批次、来源土鳖虫含量测定结果

保留时间 (min)	峰面积比(%)						
	7.9	9.7	10.6	10.9	11.0	12.8	13.2
地鳖对照	15.48	8.099	5.696	10.87	9.91	27.92	22.02
冀地鳖对照	21.60	6.72	7.867	18.28	6.191	15.24	24.10
金边土鳖 1	未检出	18.89	10.99	13.91	10.83	33.35	12.03
金边土鳖 2	12.43	11.40	11.77	12.00	9.54	29.69	13.17
金边土鳖 3	19.69	8.197	7.435	8.852	10.40	23.12	22.30
地鳖	24.89	10.41	5.551	19.06	25.88	8.928	5.277
中华土鳖	16.72	6.074	4.518	20.68	14.13	27.58	10.30

3 讨论

3.1 HPCE 条件优化 根据文献报道,样品使用 HPCE 分离分析时,其峰响应受溶剂、缓冲液种类与比例影响显著;此外,分离电压对指纹图谱各峰分离度影响较大。因此,本研究对上述因素进行了较为系统、全面的考察。

3.1.1 提取溶剂与缓冲液的影响 本研究选取水、20% 乙醇溶液、50% 乙醇溶液和 100% 乙醇溶液,对提取所得浸膏进行复溶,复溶后进 HPCE 分析,记录各指标峰峰面积。结果显示,20% 乙醇所得指纹图谱响应最高,干扰最小,故选用。缓冲液方面,本研究选取了硼砂及磷酸二氢钠作为缓冲盐。结果显示,采用 10 mmol 硼砂-磷酸二氢钠缓冲对(pH = 9.7)时各峰分离度及响应最佳;而单用磷酸二氢钠时,待测样品出峰较少,响应较低。产生这种现象的原因,可能是土鳖虫药材中所含氨基酸及多肽类成分多带有酸性基团,在磷酸二氢钠所提供的弱酸性环境下无法解离所致。而硼砂溶液本身 pH 较高,也需采用磷酸二氢钠调至弱碱性才有助于待测组分的解离。

3.1.2 分离电泳的考察 作为待测组分分离和运动的主要驱动力,分离电压也是 HPCE 指纹图谱研究中的重要影响因素。本研究首先选取 10、15、20、25、30 kV 五个恒定电压,对土鳖虫对照药材提取液进行分析。结果显示,所得指纹图谱中不同程度存在峰重叠或拖尾的现象,这可能与同一电压下,不同化合物因带电性相近而导致迁移速率相近有关。之后,经优化,选用了“2.2”项下所述的电压梯度,各组分得到了基线分离。

3.2 结论 本研究采用 HPCE 法,建立了土鳖虫药材的指纹图谱,并确定其中 7 个共有峰为质量控制指标性成分。该方法快速、高效、灵敏,质量评价标准更为准确、全面,为今后土鳖虫及其他动物类药材的质量控制提供了参考和借鉴。但是,由于目前尚未有更多土鳖虫药材中活性成分的报道,因此,在本研究的基础上,还应继续深入对所测定的指标峰进行提取分离和结构确证。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2015:19.

[2] 刘丹,李兴暖,秦仲君. 土鳖虫多肽的制备及免疫调节作用研究[J]. 中药材,2012,35(9):1382-1385.

[3] 贺卫和,成细华,徐爱良. 土鳖虫提取液对家兔抗凝血作用的实验研究[J]. 湖南中医学院学报,2003,23(2):7-9.

[4] 曹艳玲,李文兰,伍水龙. 土鳖虫胰酶酶解物抗凝活性部位分离纯化及组成分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(3):52-55.

[5] 杨红莲,刘梅. 土鳖虫的化学成分及药理研究[J]. 陕西中医学院学报,2005,28(2):48-50.

[6] 邓登华. 中医活血化瘀法治疗早期肝硬化临床研究[J]. 亚太传统医药,2015,11(24):115-116.

[7] 张立群. 观察冠心方治疗老年冠心病心绞痛的临床疗效[J]. 中国实用医药,2016,11(3):178-179.

[8] 景晶,曹红. HPLC 法测定土鳖虫中尿嘧啶和尿囊素的含量[J]. 药学实践杂志,2010,28(2):134-136.

[9] 窦家聪,徐莉,柏道明. 土鳖虫酶解液 DA201-C 不同洗脱部位溶栓活性药效学筛选[J]. 辽宁中医药大学学报,2016,18(1):50-52.

[10] 丁志军,张后富,罗美兰. 土鳖虫酶解物镇痛作用的研究[J]. 实用中西医结合临床,2014,14(11):88-89.

[11] Kapnissi-Christodoulou CP, Zhu X, Warner IM. Analytical separations in open-tubular capillary electrochromatography[J]. Electrophoresis,2003,24(22-23):3917-3934.

[12] Sebastiaan E, Rozing GP, Th KW. Recent applications in capillary electrochromatography[J]. Electrophoresis,2006,24(1):3935-3961.

[13] 王晓倩,赵新颖,屈锋. 2014 年毛细管电泳技术年度回顾[J]. 色谱,2015,33(1):4-9.

[14] 董亚蕾,陈晓姣,陈兴国. 高效毛细管电泳在食品安全检测中的应用进展[J]. 色谱,2012,30(11):1117-1126.

[15] 孙毓庆,孙国祥,金郁. 毛细管电泳指纹图谱及毛细管电泳-质谱联用在中药质量控制中的作用[J]. 色谱,2008,26(2):160-165.

[16] 黄林芳,何蔓,胡斌. 毛细管电泳分析中的富集技术及其应用[J]. 色谱,2014,32(10):1066-1078.

[17] 马晓年,邵娅婷. 秋秋娥毛细管电泳分离检测茶叶中五种多酚类化合物[J/OL]. 食品科学,http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20150424.1332.019.html.

[18] 李峰,王成芳,包永睿. 土鳖虫药材高效毛细管电泳指纹图谱鉴别研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(11):1471-1473.