

中药龟甲 HPLC 指纹图谱研究

吕晓娜 李 梦 李红霞 陈铭阳 徐 清 张 帆 杨瑶珺 刘春生

(北京中医药大学中药学院,北京,100102)

摘要 目的:建立中药龟甲的 HPLC 指纹图谱,以达到鉴别龟甲与其混伪品的目的。方法:收集不同产地的龟甲及其混伪品 21 批,按上下甲进行分类,共 42 个样品。通过盐酸水解、脱磷、脱钙等前处理,以 6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚胺基-氨基甲酸酯(AQC)进行衍生化反应,采用 C_{18} 色谱柱(3.9 mm×150 mm,3 μ m),柱温 37 $^{\circ}$ C,以乙腈,水,缓冲盐为流动相进行梯度洗脱,流速 1.00 mL/min,检测波长 248 nm。采用“中药指纹图谱相似度评价系统”(《中华人民共和国药典》2012 版)对正品龟甲上甲与下甲、正品与常见混伪品进行相似度分析。结果:所建立的指纹图谱具有较好的精密度、重现性和稳定性。正品龟甲的上下甲相似度为 0.932~0.995。正品与混伪品的相似度在 0.90 以下者占 90.91%。结论:正品上、下甲的 HPLC 图谱差异较小,正品与混伪品差异较明显。所建立的 HPLC 指纹图谱可用于龟甲的质量评价。

关键词 龟甲;混伪品;HPLC 指纹图谱;相似度;评价

HPLC Fingerprint of Carapax et Plastrum Testudinis

Lyu Xiaona, Li Meng, Li Hongxia, Chen Mingyang, Xu Qing, Zhang Fan, Liu Chunsheng, Yang Yaojun

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract Objective: To establish HPLC (High Performance Liquid Chromatography) fingerprint of Carapax et Plastrum Testudinis by identifying tortoiseshells and their adulterants. **Methods:** A total of 21 batches of tortoiseshells and their adulterants from different habitats was collected, and 42 samples were classified by the carapace and plastron. The pre-treatment of acid hydrolysis, dephosphorization and decalcification pretreatment with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate (AQC) derivatization reaction was carried out using the C_{18} column (3.9×150 mm, 3 μ m), the column temperature of 37 $^{\circ}$ C. Acetonitrile, water, salt buffer were used as mobile phase for gradient elution at a flow rate of 1.00 mL/min and a the detection wavelength of 248 nm. The system of similarity evaluation (Pharmacopoeia 2012) was used to analyze tortoiseshells by the carapace and plastron, tortoiseshells and their common adulterants. **Results:** The fingerprint had good precision, reproducibility and stability. The similarity of tortoiseshells was between 0.932-0.995. The percentage was less than 90.91% under the similarity of 0.90 between tortoiseshells of their adulterants. **Conclusion:** The difference of HPLC is relatively small between tortoiseshells' carapaces and plastrons, and the difference between tortoise shells and their adulterants is obvious. The established HPLC fingerprint can be used for the quality evaluation of tortoiseshells.

Key Words Carapax et Plastrum Testudinis; Adulterants; High Performance Liquid Chromatography fingerprint; Similarity evaluation

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.02.012

龟甲始载于《神农本草经》,列为上品^[1]。2015 年版《中华人民共和国药典》规定龟甲为龟科动物乌龟 *Chinemys reevesii*(Gray)的背甲及腹甲。其具有滋阴潜阳、益肾强骨、养血补心等功效^[2],常以龟甲饮片、醋龟甲、龟甲胶等形式入药,需求量大;且正品资源较少,价格较贵,市场上伪品与混淆品泛滥^[3]。然而,龟甲的代表性成分尚不清楚,在质量控制上缺乏具有说服力的指标^[3]。目前龟甲的生药学鉴别主要集中在性状和薄层鉴别上,也有部分学者尝试用比值图示法和相似系数法对其性状进行研究,并取得一定的成效。但上述研究都仅限于 2 个或几个龟

类药材之间的比较,缺乏对龟类药材的系统性比较研究^[4]。同时,龟甲的上甲与下甲是否能够统一使用,仍存在一些争议。对正品上下甲、正品与混伪品的深入研究,不仅有助于制定龟甲质量评价标准,而且对龟甲药材的市场管理有一定的指导意义。

HPLC 适用于成分复杂而不易分离的分析对象,具有分离效能高、灵敏度高、分析速度快等优点,是目前指纹图谱技术中用途最广泛的一种方法。通过 HPLC 对龟甲中羟脯氨酸^[5]、胶原蛋白的含量^[6],龟甲炮制品龟甲胶中 14 种氨基酸含量^[7]等均有研究。而本实验所采用的 AQC 柱前衍生化 HPLC 也较成

基金项目:公益性行业科研专项经费项目(201507002-4-2)

作者简介:吕晓娜(1992.06—),女,硕士研究生,研究方向:中药鉴定学,E-mail:15188362877@163.com

通信作者:刘春生(1964.12—),男,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:药用植物与分子生药学,E-mail:max_liucs@263.net;杨瑶珺

(1969.05—),女,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:中药质量评价,E-mail:yangyj_bucm@163.com

熟,如应用于人血浆^[8]、阿胶^[9]、稻米^[10]等。

中药指纹图谱建立的目的是全面反映中药所含内在化学成分的种类和数量,进而反映其内在质量^[11-12],已应用于柑橘属中药^[13]、钩藤^[14]、黄芩^[15]等中药的鉴别。本实验采用 HPLC 对不同产地的龟甲药材及其混伪品进行了指纹图谱研究,建立了正品龟甲的 HPLC 指纹图谱,为龟甲药材的质量控制提供有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药材 收集正品龟甲及其混伪品,按上下甲分为 42 个样品,采集地为广州、茂名、南京、无锡等地,经北京中医药大学杨瑶珺教授鉴定其品种。

1.1.2 药物 L-羟脯氨酸(Hyp)对照品(批号 Z26M7H11979,上海源叶生物科技有限公司);17 种氨基酸标准品混合液[天冬氨酸(Asp)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、精氨酸(Arg)、苏氨酸(Thr)、丙氨酸(Ala)、脯氨酸(Pro)、胱氨酸(Cys)、酪氨酸(Tyr)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、赖氨酸(Lys)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe),除 Cys 为 1.25 mmol/L 外,其余均为 2.5 mmol/L;批号 2QL228986, Waters 公司提供]。

1.1.3 试剂与仪器 Waters AccQ. Flour 衍生化试剂盒[包含 Waters AccQ. Flour 缓冲液、AQC 试剂粉、AQC 稀释液,批号:8217860041];AccQ. Tag 流动相浓缩液(乙酸盐-磷酸盐萃取剂)(批号 8114160431);乙腈(色谱纯);盐酸;纯净水;waters 高效液相色谱仪(包括 2695 紫外检测器,Empower 数据工作站);TCQ-250 超声波清洗器(北京医疗设备二厂);分析天平;SHB-Ⅲ循环水式多用真空泵(郑州长城仪器厂);CS101-1C 电热鼓风干燥箱(重庆四达实验仪器厂);旋涡振荡器;中药指纹图谱相似度评价系统 2012 版(国家药典委员会)。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液的制备 取浓度为 2.5 mmol/L (Cys1.25 mmol/L)的 17 种氨基酸对照品 100 μL,放入一小样品瓶中,加 0.9 mL 高纯水稀释,混匀,即得 17 种混合氨基酸对照品溶液。取 Hyp 适量,精密称定,加入 0.1 mol/L 盐酸制成 0.25 mmol/L 的溶液,混匀,即得羟脯氨酸对照品溶液。

1.2.2 供试品溶液的制备 取样品 0.1 g,加入 6 mol/L 盐酸 5 mL,充入高纯氮气 30 s,密封,置于 110 ℃烘箱中水解 8 h,过滤,蒸干,加入 20 mL 70% 乙醇

超声 15 min,过滤,蒸干,加入 0.1 mol/L 草酸 6 mL,超声,定容至 50 mL 容量瓶,用 0.22 μm 滤膜过滤,即得。

1.2.3 空白溶液的制备 在不加入样品的情况下,同供试品溶液的制备方法制备。

1.2.4 衍生方法 分别精密移取空白溶液、对照品溶液和供试品溶液和各 10 μL,置于离心管中,加入 AccQ. Flour 缓冲液 70 μL,漩涡混合,在涡旋状态下加入 AQC 溶液 20 μL,并保持漩涡混合 10 s,密封,置 55 ℃烘箱内 10 min,取出,放凉,转移至微量进样瓶,即得空白、对照品和供试品的衍生化溶液。

1.2.5 色谱条件 色谱柱为 Waters AccQ. Tag 法专用 C₁₈ 色谱柱(3.9 mm × 150 mm,3 μm),流动相 A 为 AccQ. Tag 流动相的 1:10 稀释液,B 为乙腈,C 为水,按表 1 进行梯度洗脱,流速 1.00 mL/min,紫外检测波长 248 nm,柱温 37 ℃,进样量 10 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)	流动相 C(%)	曲线
起始	100	0	0	
0.5	99	1	0	11
18	95	5	0	6
19	91	9	0	6
29.5	83	17	0	6
33	0	60	40	11
36	100	0	0	11
45	100	0	0	6

2 结果

2.1 指纹图谱方法学考察

2.1.1 精密度实验 取同一供试品的衍生化溶液,连续进样 6 次,结果 15 个主要色谱峰(His、Cys、Met 含量较低,未纳入计算)的相对保留时间的 RSD 均 <0.68%,相对峰面积的 RSD 均 <2.04%,各色谱图的相似度值不低于 0.99,表明仪器等整个检测系统的精密度良好。

2.1.2 稳定性实验 取同一供试品的衍生化溶液,分别于 0、3、6、12、24、72 h 进行检测,结果 15 个主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 均 <0.90%,相对峰面积的 RSD 均 <2.87%,各色谱峰的相似度值不低于 0.97,表明供试品在室温下 72 h 内稳定。

2.1.3 重复性实验 取同一正品龟甲样品,按实验方法平行制备 6 份供试品溶液并衍生化,分别进样检测。结果 15 个主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 均 <1.0%,相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%,各色谱峰的相似度值不低于 0.98,表明该方法的重复性良好。

2.2 中药龟甲指纹图谱的建立

2.2.1 各龟甲样品与其混伪品的 HPLC 图谱采集
在本实验色谱条件下,15 种氨基酸得到有效分离。按羟脯氨酸衍生物峰计算,理论板数在 4 000 以上。所得空白、羟脯氨酸、17 种混合氨基酸和样品的 HPLC 图谱见图 1。

2.2.2 正品上甲与下甲 HPLC 图谱的相似度 取 10 批正品下甲药材,按上述试验方法制备供试品衍生化溶液,进行 HPLC 分析,所得图谱导入“中药指纹图谱相似度评价系统”(中华人民共和国药典 2012 版)进行相似度分析,其相似度为 0.927 ~ 0.995,将生成的下甲对照图谱与各上甲样品进行相似度分析,结果见表 2;10 批正品上甲药材的相似度为 0.917 ~ 0.985,上甲对照图谱与各下甲样品的相似度结果见表 3。由表 2 可知,下甲对照图谱与各上甲样品的相似度为 0.932 ~ 0.995,上甲对照图谱与各下甲样品的相似度为 0.949 ~ 0.989。表明:上甲与下甲的相似度基本均在 0.950 以上,差异较小。因此采用龟甲上甲与下甲的 HPLC 图谱统一建立龟甲药材 HPLC 指纹图谱。

2.2.3 龟甲药材指纹图谱的建立 实验中,正品上甲与下甲样品均一一对应,根据上述实验结果,考虑将对应的上甲与下甲样品合并,共 10 个批次。利用相似度软件,对色谱峰进行剪切、校正等处理,采用平均数法生成对照指纹图谱。见图 2、表 3。由表中数据可知,批次间的相似度在 0.900 以上的占 95.56%,在 0.950 以上的占 91.11%。各批次与所得龟甲的对照指纹图谱的相似度在 0.964 ~ 0.999,显示其与对照指纹图谱有良好的相似性。

2.3 龟甲及其混伪品的相似度分析 将所收集的 22 个混伪品按试验方法制备供试品衍生化溶液,以色谱条件对其进行检测。用 2.2.3 项所得的对照指纹图谱与各混伪品的 HPLC 图谱进行相似度评价。见表 4。可知相似度值在 0.85 以下的占 81.82%;相似度值在 0.90 以下的占 90.91%。其中地龟下甲、鹰龟下甲与正品龟甲的相似度值在 0.90 以上,巴西龟、黄喉拟水龟、中华花龟等品种与正品龟甲的相似度值均在 0.90 以下。这表明在一定程度上,龟甲药材的对照指纹图谱能够作为鉴别龟甲正伪品的参考方法之一。

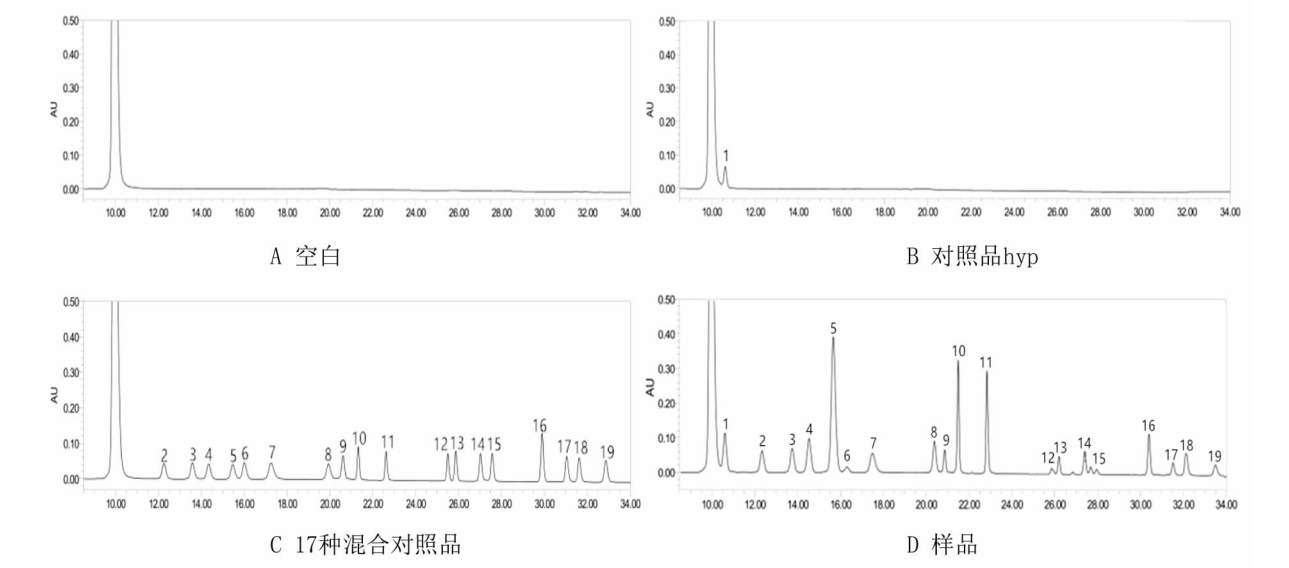


图1 各龟甲样品与其混伪品衍生化后 HPLC 图谱

注:1:Hyp;2:Asp;3:Ser;4:Glu;5:Gly;6:His;7:NH3;8:Arg;9:Thr;10:Ala;11:Pro;12:Cys;13:Tyr;14:Val;15:Met;16:Lys;17:Ile;18:Leu;19:Phe

表2 上、下甲对照图谱与各样品的相似度

样品号	1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	8a	9a	10a
相似度	0.994	0.963	0.959	0.995	0.966	0.979	0.961	0.932	0.981	0.945
样品号	1b	2b	3b	4b	5b	6b	7b	8b	9b	10b
相似度	0.986	0.980	0.986	0.954	0.988	0.985	0.988	0.989	0.949	0.951

注:1a~10a 均为正品乌龟甲上甲;1b~10b 均为正品乌龟甲下甲

表 3 10 批龟甲样品的 HPLC 图谱相似度结果

样品名称	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1.000	0.980	0.953	0.955	1.000	1.000	0.993	1.000	1.000	0.997	0.999
S2	0.980	1.000	0.890	0.891	0.978	0.977	0.996	0.981	0.978	0.992	0.976
S3	0.953	0.890	1.000	1.000	0.955	0.956	0.920	0.951	0.955	0.934	0.964
S4	0.955	0.891	1.000	1.000	0.957	0.958	0.922	0.953	0.956	0.935	0.965
S5	1.000	0.978	0.955	0.957	1.000	1.000	0.992	1.000	1.000	0.996	0.999
S6	1.000	0.977	0.956	0.958	1.000	1.000	0.991	1.000	1.000	0.996	0.999
S7	0.993	0.996	0.920	0.922	0.992	0.991	1.000	0.994	0.992	0.999	0.990
S8	1.000	0.981	0.951	0.953	1.000	1.000	0.994	1.000	1.000	0.998	0.999
S9	1.000	0.978	0.955	0.956	1.000	1.000	0.992	1.000	1.000	0.997	0.999
S10	0.997	0.992	0.934	0.935	0.996	0.996	0.999	0.998	0.997	1.000	0.995
对照指纹图谱	0.999	0.976	0.964	0.965	0.999	0.999	0.990	0.999	0.999	0.995	1.000

注:S1~S10 为 10 批龟甲样品的 HPLC 图谱

表 4 龟甲及其混伪品的相似度值

样品名	巴西龟 1 号	巴西龟 2 号	黄喉拟水龟	安布闭壳龟	缅甸陆龟	锯缘摄龟	鳄龟	中华花龟	地龟	鹰龟	齿缘摄龟
上甲	0.713	0.858	0.754	0.813	0.643	0.574	0.844	0.656	0.374	0.532	0.499
下甲	0.799	0.873	0.533	0.683	0.321	0.341	0.741	0.782	0.906	0.935	0.733
平均值	0.7560	0.8655	0.6435	0.7480	0.4820	0.4570	0.7925	0.7190	0.640	0.7335	0.6160

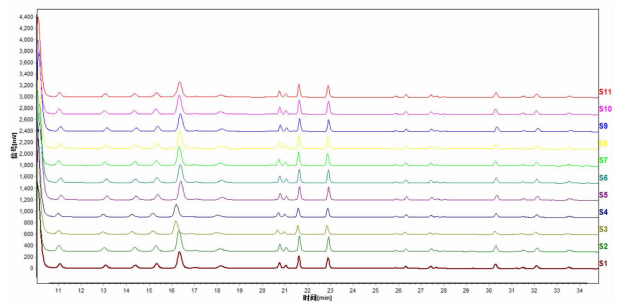


图 2 10 批龟甲样品与对照指纹图谱的叠加图

注:S1~S10 为 10 批龟甲样品的 HPLC 图谱;S11 为对照指纹图谱

3 讨论

龟甲药材中主要有效成分为蛋白质,通过蛋白质水解、AQC 试剂衍生化的方法对检测氨基酸的种类和含量有较好的效果。然而,图谱中羟脯氨酸与衍生化副产物的出峰时间较接近,且色谱峰保留时间对图谱相似度有较大影响,因此,在色谱柱分离效果和仪器灵敏度良好的情况下,需严格控制流动相 A 稀释液的比例,而本实验采用的是 1:10 的稀释比例。通过笔者市场走访发现,龟甲混伪品众多,而未鉴别出的地龟下甲、鹰龟下甲在性状上与正品龟甲差异较大,且目前养殖量和野生量均较少,因此对正品龟甲的鉴别影响较小。故根据龟甲对照指纹图谱及其混伪品的相似度值,可以用于鉴别正伪品龟甲,为扩大龟甲药源提供参考。

目前,在龟甲的药效成分尚未完全阐明的情况下,利用龟甲指纹图谱作为质量控制指标或龟甲中多种氨基酸的含量范围为指标,并结合化学模式识别如主成分分析、聚类分析以及人工神经网络等,整

个评价研究将是一种更有效的质量控制方法。

参考文献

[1]陈修园. 神农本草经读[M]. 北京:人民卫生出版社,1959:26.

[2]国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京. 中国医药科技出版社,2015:180-181.

[3]杜沛霖,周雨晴,朱华. 龟甲的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2014,42(32):11319-11320,11338.

[4]顾迎寒. 龟甲的生药学研究[D]. 成都:成都中医药大学,2007.

[5]王新雨,谭晓梅,陈飞龙,等. HPLC-ELSD 法测定醋龟甲中羟脯氨酸[J]. 中草药,2011,42(7):1338-1340.

[6]骆达,李惠芬,李秀兰. 异硫氰酸苯醋衍生化 HPLC 法测定龟甲中胶原蛋白[J]. 中草药,2009,39(6):851-852.

[7]江东龙,陈芳,熊丹丹,等. 柱前衍生化 HPLC 法同时测定龟甲胶中 14 种水解氨基酸含量[J]. 药物分析杂志,2015,35(10):1790-1795.

[8]陈蓉,董吉,缪丽燕. AccQ. Tag 法测定人血浆中的 17 种氨基酸[J]. 华西药理学杂志,2013,28(5):534-536.

[9]谢谔,易艳,刘阳,等. 柱前衍生 HPLC 测定阿胶中 17 种水解氨基酸含量[J]. 湖南中医药大学学报,2012,32(5):46-49.

[10]周新跃,刘红梅,李海林,等. AccQ-Tag 柱前衍生法测定稻米中氨基酸的含量[J]. 生命科学仪器,2008,6(11):55-57.

[11]郭秋平,高英,李卫民. 中药百合 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药,2011,33(8):1280-1285.

[12]祝明,陈碧莲,石上梅. 中国指纹图谱技术在中国药典 2015 年版一部中的应用[J]. 中国现代应用药学,2016,33(5):611-614.

[13]陈永刚,林励. 柑橘属常用中药黄酮类成分 HPLC 指纹图谱研究与比较[J]. 中国中药杂志,2011,36(19):2660-2665.

[14]谭超元,王海波,邸学,等. 中药钩藤生物碱部位 HPLC 指纹图谱[J]. 光谱实验室,2012,29(4):2313-2316.

[15]王丹,张秋燕,徐风,等. 中药黄芩 HPLC 指纹图谱的化学轮廓及其影响因素的研究[J]. 药品检验,2013,10(5):96-102.