

高效毛细管电泳指纹图谱鉴别天然药物研究进展

叶能胜, 谷学新*

(首都师范大学 化学系, 北京 100037)

摘要: 简介高效毛细管电泳(HPCE)技术的基本原理, 综述了 HPCE 近年来在天然药物指纹鉴别中的应用, 并讨论该技术在天然药物指纹图谱鉴别的应用前景。

关键词: HPCE; 天然药物; 指纹图谱; 指纹鉴别

中图分类号: R 282.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)03-0274-02

Progress in studies on fingerprint of nature medicine by HPCE

YE Neng-sheng, GU Xue-xin

(Department of Chemistry, Capital Normal University, Beijing 100037, China)

Key words: high performance capillary electrophoresis (HPCE); nature medicine; fingerprint; identification by fingerprint

随着现代自然科学技术的发展, 许多新学科理论和实验技术不断渗透到中药鉴别领域, 极大地推动了中药鉴别的发展^[1], 其中高效毛细管电泳(HPCE)是近十几年迅速发展起来的一种新型分离分析技术, 具有分离效率高、分析速度快、分离模式多、所需样品少、应用范围广、自动化程度高的特点, 在生命科学、生物技术、医学药物和环境科学等领域显示了极其重要的应用前景, 目前正广泛应用于天然药物研究之中。本文结合国内文献综述近年来 HPCE 技术在中药指纹鉴别中的应用进展。

1 基本原理和分析特点

HPCE 是以高压电场为驱动力, 以毛细管为分离通道, 依据样品中各组分之间的淌度和分配行为的差异而实现分离的一类液相分离技术。仪器装置通常包括高压电源、进样系统、毛细管柱、检测器和记录系统 5 部分, 其中毛细管柱是分离的核心部分。

研究与实践表明, HPCE 与 HPLC 相比具有以下特点:

(1) 分离效率高, 理论塔板数高达 $10^6 \sim 10^7/\text{m}$; (2) 分析速度快, 一般在 20~30 min 内可完成一次电泳操作; (3) 应用模式多样, 已经发展了毛细管区带电泳(CZE)、胶束电动毛细管色谱(MECC)等分离模式, 扩大了 HPCE 的应用范围; (4) 样品用量少, 仅为纳升级; (5) 灵敏度高, 用激光诱导荧光检测器可达 10^{-24} 的超低检出限。

2 天然药材 HPCE 指纹鉴别

2.1 蛋白多肽: 天然药材细胞中普遍存在多肽和蛋白质类物质, 这些物质受遗传基因控制, 其 HPCE 图谱具有特征性, 可以作为指纹图谱鉴别天然药材。有关蛋白质多肽

HPCE 方法用于指纹鉴别中药药材的相关报道见表 1。

为了得到满意的指纹图谱, 必须对蛋白质多肽的提取方法和有关实验参数进行优化。由于天然药物含有多多种蛋白质多肽, 不同蛋白的等电点不同, 单一提取液很难将所有蛋白质一次完全提取出来。为了更全面反映其特征图谱, 在提取蛋白时, 可以分别用酸性抽提液、碱性抽提液及 Tris-甘氨酸蛋白抽提液来提取蛋白, 它们的组成分别是: 碱性提取液为 0.1 mol/L Tris-HCl、0.5 mol/L 蔗糖、0.1% 抗坏血酸、10 mmol/L 巯基乙醇, pH 8.0; 酸性提取液为 80 mmol/L 柠檬酸、32 mmol/L Na_2HPO_4 、5 mmol/L 抗坏血酸、10 mmol/L 巯基乙醇, pH 2.8; Tris-甘氨酸蛋白抽提液为 0.6 g Tris、2.88 g 甘氨酸加水溶解至 1 000 mL, pH 8.5。在酸性、碱性提取液中常常加入抗氧化性的巯基乙醇和抗坏血酸, 目的在于防止蛋白质的活性基团受到破坏。一般情况下采用 3 种蛋白质抽提液提取天然药物中蛋白质和多肽, 结合 3 种不同提取液的 HPCE 指纹图谱, 基本上就可以实现对药材的指纹鉴别。邢旺兴^[6]认为分别提取方法繁琐, 同时抽提液中高强度的离子容易导致焦耳热的生成, 于是尝试用水作为抽提液, 结果表明水提取液能够客观反映水溶性蛋白的情况。还有采用大孔树脂法^[5]进行粗分后直接进行 HPCE 分析, 也可达到满意的分离效果。

2.2 其他成分: 王寅^[2]等对不同居群大青叶药材的理化特征差异进行研究, 结果表明异地栽培的不同居群大青叶药材的酸性提取部位的化学成分及含量有显著差异, 依据电泳图特征峰的迁移时间和峰面积, 能有效地鉴别不同居群大青叶药材。马晓强^[3]等对萱草、黄花菜、红花、番红花等 4 种药材

* 收稿日期: 2001-08-13

基金项目: 北京市自然科学基金项目(2972003)

作者简介: 叶能胜(1975-), 男, 湖北蕲春人, 在读硕士研究生, 主要从事天然药物中有效成分的高效毛细管电泳分析研究。

Tel: (010) 68902854

中的水溶性成分进行定性分析,结果显示种间有明显的差别,认为方法速度快,灵敏度高,重现性好,可作为“红花”类药材的定性鉴别方法。纪秀红^[18]等发现枸骨叶与十大功劳叶的紫外-可见光谱有明显区别,可用此方法鉴别枸骨叶与

十大功劳叶,通过 HPCE 法证实两者间紫外-可见光谱的差异是由于化学成分的含量及其比例不同所致。王德先^[19]等对中药天麻及其 4 种常见伪品商陆、黄精、天花粉和十九股牛进行了鉴别,发现伪品均不存在天麻素,方法简便可行。

表 1 蛋白多肽 HPCE 指纹鉴别天然药材的条件和方法

药 材	检测成分	运行缓冲液 (mmol/L)	毛细管柱 (cm×μm)	电 压 (kV)	检测方式 (nm)	文 献
同属不同种菟丝子	酸溶蛋白、碱溶蛋白、 Tris-甘氨酸提取蛋白	pH 8.5 硼酸盐 300	57×75	30	200	4
12 种海马、海龙类药材	大孔树脂提取蛋白质	pH 3.5 磷酸盐 50	20×20	11	200	5
红曲	水溶性蛋白	pH 9.11 硼酸盐 20	57×75	20	214	6
蝎毒	水溶性蛋白质	pH 6.0 磷酸盐 25	—	20	DAD* 检测	7
云芝糖肽	水溶性提取物	pH 9.3 硼酸盐 20或 pH 2.5 磷酸盐 50	50×75	30	DAD 检测 全波长扫描	8
生药狗脊、药材狗脊、黑狗脊和龙眼肉及其混淆品	酸溶蛋白、碱溶蛋白、 Tris-甘氨酸提取蛋白	pH 8.5 硼酸盐 300	60×75	20	200	9, 11
槿子,三七及其混淆品菊叶三七、宁夏枸杞子与枸杞子	酸溶蛋白、碱溶蛋白、 Tris-甘氨酸提取蛋白	pH 8.5 硼酸盐 150	60×75	20	200	10, 13, 14, 16
乌梅与混淆品李子和紫苏子及其混淆品	酸溶蛋白、碱溶蛋白、 Tris-甘氨酸提取蛋白	pH 8.5 硼酸盐 30	60×75	20	200	12, 17
娑罗子	酸溶蛋白	pH 8.5 硼酸盐 20	49×50	30	200	15

* DAD: 二极管阵列检测器

值得注意的是,天然药物中成分复杂多样化,小到阴阳离子,大到多糖、蛋白质,应用 HPCE 技术可以对其中已知成分同时进行分析^[20],但是如果样品处理过程中可能将多数未知成分除去,图谱中所含峰数较少,缺乏特征性,就不能作为其指纹图谱鉴别天然药物。

3 存在的问题和应用前景

HPCE 指纹图谱分析中存在的不足之处主要是重现性差,降低了 HPCE 在药物指纹鉴别的可靠性。因此在指纹鉴别过程中,必须提供标准样品才能对待检样品进行指纹鉴别,在某种程度上限制了 HPCE 指纹鉴别的广泛应用。王天松^[21]提出在开发检测指纹图谱时,最好同时试验 HPCE 和 HPLC,择其优者。针对重现性差的问题,谢莹^[22]等提出采用淌度比法、对照品校正法、保留指数法等 3 种方法来提高 HPCE 的重现性。

真正实现对天然药物的快速指纹鉴别,必须建立不同品种药材的标准指纹图谱库和数据库。标准指纹图谱库的建立需要结合不同的分析手段,包括相关生物技术和化学计量学中的人工神经网络技术等。标准指纹图谱库和数据库的建立天然药物的指纹鉴别和中药制剂的质量控制中将会发挥十分重要的作用。

参考文献:

[1] 汪仁望,吕 扬. 现代中药鉴定方法研究进展[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(12): 757-759.

[2] 王 寅,乔传卓,尹 茶. 高效毛细管电泳法用于不同居群大青叶药材的鉴别[J]. 中草药, 2000, 31(7): 547-549.

[3] 马晓强,董婷霞,詹华强. “红花”类药材的高效毛细管电泳法鉴别[J]. 药学实践杂志, 2000, 18(5): 310-311.

[4] 胡 平,罗国安,王如锦,等. 中药菟丝子的高效毛细管电泳法鉴别[J]. 药学报, 1997, 32(7): 549-552.

[5] 张朝辉,范国荣,徐国钧,等. 12 种海马、海龙类药材高效毛细管电泳法鉴别[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(5): 259-260.

[6] 邢旺兴,尹 茶,宓鹤鸣,等. 中药红曲基原真菌的高效毛细管电泳色谱法鉴别[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(1): 59-61.

[7] 孙保国,张宗显,赵 辉,等. 一种新的鉴别蝎毒的方法[J]. 食品理化检验, 1999, (1): 11-14.

[8] 朱丽玢,洪筱坤. 云芝糖肽高效毛细管电泳分析[J]. 中药材, 2000, 23(4): 227-229.

[9] 许重远,陈振德,刘建武,等. 狗脊及其混淆品蛋白多肽高效毛细管电泳法鉴别[J]. 中药材, 1999, 22(7): 337-338.

[10] 陈振德,陈志良,侯连兵,等. 槿子蛋白高效毛细管电泳法鉴别[J]. 中草药, 2000, 31(5): 377-379.

[11] 谢 立,陈振德,陈志良,等. 龙眼肉及其混淆蛋白多肽高效毛细管电泳法鉴别[J]. 中成药, 2000, 22(6): 436-437.

[12] 贾江滨,陈振德,侯连兵,等. 乌梅及其混淆品李子的蛋白多肽高效毛细管电泳法鉴别[J]. 第一军医大学学报, 2000, 20(4): S24-S25.

[13] 侯连兵,陈振德,陈志良,等. 三七及其混淆品蛋白多肽高效毛细管电泳法鉴别[J]. 中草药, 2000, 31(11): 859-860.

[14] 侯连兵,陈振德,单友亮,等. 三七及其混淆品菊叶三七的蛋白多肽高效毛细管电泳鉴别[J]. 中药材, 2000, 23(2): 76-77.

[15] 张 新,王志伟,王 珍,等. 高效毛细管电泳-聚类分析法鉴别娑罗子品种[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(5): 31-33.

[16] 陈志良,陈振德,侯连兵,等. 枸杞子蛋白多肽的高效毛细管电泳法鉴别[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(3): 192-194.

[17] 杨西晓,陈振德,许重远,等. 蛋白多肽高效毛细管电泳法鉴别紫苏子及其混淆品[J]. 中药材, 2000, 23(10): 605-607.

[18] 纪秀红,阎玉凝,李 奕,等. 枸骨叶与十大功劳叶紫外光谱鉴别[J]. 中药材, 2000, 23(3): 137-139.

[19] 王德先,杨更亮,刘海光,等. 天麻及其伪品的毛细管电泳鉴别及天麻素的测定[J]. 中草药, 2001, 32(4): 351-352.

[20] 叶能胜,王英锋,邹 洪,等. 毛细管电泳技术及其在天然药物分析中的应用进展[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(增刊): 53-57.

[21] 王天松. 毛细管电泳与中草药指纹图谱[J]. 中成药, 2000, 22(6): 397-399.

[22] 谢 莹,林 梅,张正行,等. 提高毛细管电泳重现性的几种方法[J]. 药学进展, 1999, 23(5): 261-264.