

蜚螂有效部位毛细管电泳指纹图谱的建立及其总量统计矩分析

马家骅^{1,2}, 谭承佳³, 赵云生^{2,4}, 贺福元⁵, 杨明²

1. 西南科技大学 生物科学实验中心, 四川 绵阳 621010

2. 成都中医药大学, 四川 成都 611137

3. 绵阳师范学院, 四川 绵阳 621000

4. 宁夏医科大学, 宁夏 银川 750004

5. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410004

摘要: **目的** 建立蜚螂有效部位的毛细管电泳(CE)指纹图谱, 探讨利用总量统计矩法分析指纹图谱的可行性。**方法** 采用毛细管区带电泳法(CZE), 以弹性石英毛细管柱(60 cm×75 μm)为分离通道, 75 mmol/L 硼砂溶液(pH 9.8)作缓冲液, 运行电压+20 kV, 检测波长 200 nm, 指纹图谱的评价采用药典委员会相似度分析软件与总量统计矩法。**结果** 建立了蜚螂有效部位的 CE 指纹图谱, 药典委员会的相似度软件与总量统计矩法计算的相似度基本一致, 显示蜚螂有效部位批间差异小。**结论** 建立的 CE 指纹图谱准确简便、重现性好, 可作为蜚螂提取物的质量控制方法, 而总量统计矩法可以作为指纹图谱的分析方法。

关键词: 蜚螂; 有效部位; 毛细管电泳; 指纹图谱; 总量统计矩

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)10-1263-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.10.010

Establishment of fingerprint of active fraction from dried body of *Catharsius molossus* by capillary electrophoresis and analysis by its total quantum statistical moment

MA Jia-hua^{1,2}, TAN Cheng-jia³, ZHAO Yun-sheng^{2,4}, HE Fu-yuan⁵, YANG Ming²

1. Experimental Center of Biological Sciences, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

3. Mianyang Normal University, Mianyang 621000, China

4. Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

5. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410004, China

Abstract: Objective To establish capillary electrophoresis (CE) fingerprint of active fraction from the dried body of *Catharsius molossus* and to explore the feasibility of fingerprint evaluation by total quantum statistical moment method. **Methods** Capillary zone electrophoresis (CZE) was used. The electrophoretic conditions were as follows: fused silica capillary column (60 cm × 75 μm), borate solution (75 mmol/L, pH 9.8) as the running buffer, applied voltage of +20 kV, and the detection wavelength of 200 nm. Fingerprint was evaluated by similarity analysis software of Pharmacopeia Committee and total quantum statistical moment method. **Results** The CE fingerprint of active fraction from the dried body of *C. molossus* was established. The similarities in six batches of the active fractions evaluated by similarity analysis software of Pharmacopeia Committee and total quantum statistical moment method had no significant difference. **Conclusion** The method is accurate, simple, and reproducible. It could be used for the quality control of active fraction from the dried body of *C. molossus*. The total quantum statistical moment method could be used to analyze the fingerprint.

Key words: dried body of *Catharsius molossus*; active fraction; capillary electrophoresis; fingerprint; total quantum statistical moment

蜚螂为金龟子科昆虫屎壳螂 *Catharsius molossus* Linn. 的干燥体, 又名推屎爬、黑牛儿、铁甲将军, 始载于《神农本草经》, 具破瘀通便之功效。课题组前期研究^[1-4]发现蜚螂在治疗良性前列

收稿日期: 2012-11-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30902005); 西南科技大学博士基金资助项目(10zx7153)

作者简介: 马家骅(1979—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为中药新制剂与物理药剂学。Tel: (0816)6089531 E-mail: jiahuama@163.com

网络出版时间: 2013-02-22 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130222.1651.005.html>

腺增生方面效果颇佳,其有效成分主要为多肽与氨基酸,作为制剂中间体,为保证制剂质量,有必要对其质量加以严格控制,但这类成分质量控制难度相对较大,为了有效评价其质量,本实验采用灵敏度高、样品处理简单、运行成本低、抗污染能力强的毛细管区带电泳(CZE)法对蜚螂有效部位进行指纹图谱研究^[5-7],并以药典委员会相似度计算软件与总量统计矩法评价了不同批次有效部位的相似度,以期对蜚螂有效部位的质量控制提供更加完备的方法,同时为总量统计矩法用于指纹图谱相似度的评价提供实验依据。

1 仪器与材料

Beckman P/ACE MDQ 型高效毛细管电泳仪(32 Karat Software 工作站),BP211D 电子天平(德国 Sartorius 公司),pH—25 酸度计(上海雷磁仪器厂),弹性石英毛细管柱(河北永年锐沣色谱器件有限公司)。蜚螂为鞘翅目金龟子科昆虫屎壳郎 *Catharsius molossus* Linn. 的干燥体,购于成都五块石药材市场,经成都中医药大学杨明教授鉴定,符合部颁药材标准;蜚螂有效部位(取蜚螂粗粉加 85% 乙醇渗漉,渗漉液回收乙醇,冷藏除脂后,通过 DA201-C 大孔树脂柱,收集 70%乙醇洗脱物,处理即得^[2],批号分别为 1、2、3、4、5、6),实验用水为重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

精密称取蜚螂有效部位 0.5 g,置具塞锥形瓶中,加水 25 mL,超声处理 20 min,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.2 电泳条件

弹性石英毛细管柱(60 cm×75 μm),电泳缓冲液为 75 mmol/L 硼砂缓冲液(pH 9.8),温度 25℃,电压为+20 kV,检测波长 200 nm,压差进样(3 447.5 Pa×5 s)。开机后先用 0.10 mol/L 氢氧化钠溶液冲洗毛细管 2 min,再用去离子水冲洗 5 min,然后用缓冲液冲洗至基线平稳后开始进样,每 2 次进样之间设定缓冲液冲洗 2 min。

2.3 方法学考察

2.3.1 检测波长选择 对 190~600 nm 各波长扫描下的色谱图进行分析比较,结果 200 nm 处各色谱峰分离良好,峰数目也比较多,故选择 200 nm 作为检测波长。

2.3.2 精密度试验 取蜚螂有效部位(批号 1)溶

液作为供试样品,分别连续进样 6 次,检测供试样品溶液的指纹图谱。结果表明,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%。

2.3.3 稳定性试验 取蜚螂有效部位(批号 1)供试品溶液,分别在 0、2、4、10、24 h 检测指纹图谱。结果显示,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.4 重复性试验 取同一批号(批号 1)的供试样品 6 份,按照供试品溶液的制备和检测方法制备样品溶液并进行检测。结果表明,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%。

2.4 不同批次指纹图谱的测定

取不同批次蜚螂有效部位,分别制备供试品溶液,按“2.2”项电泳条件测定。

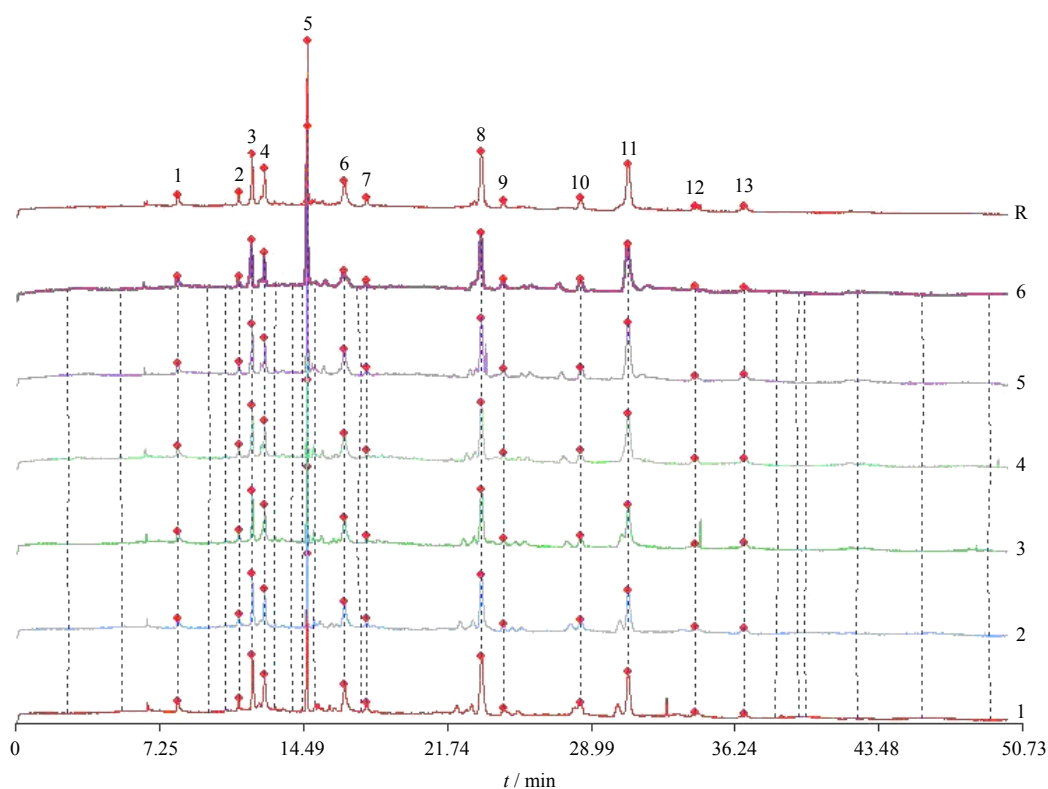
2.5 指纹图谱的分析评价

本实验的指纹图谱分析除采用药典委员会指纹图谱分析软件评价外,尝试采用总量统计矩法进行评价。

2.5.1 药典委员会指纹图谱分析软件分析结果 比较 6 批蜚螂有效部位供试品的色谱图,选取其中 13 个峰面积较大的共有峰作为特征峰,以样品中容易获得且量较高的 8 号峰作为参照峰,采用平均数法生成对照指纹图谱,各共有峰与参照峰的相对保留时间分别为 0.35(峰 1)、0.48(峰 2)、0.54(峰 3)、0.56(峰 4)、0.63(峰 5)、0.71(峰 6)、0.79(峰 7)、1.00(峰 8)、1.04(峰 9)、1.22(峰 10)、1.39(峰 11)、1.48(峰 12)、1.66(峰 13),相对峰面积分别为 0.16(峰 1)、0.16(峰 2)、0.52(峰 3)、0.43(峰 4)、1.05(峰 5)、0.66(峰 6)、0.20(峰 7)、1.00(峰 8)、0.10(峰 9)、0.34(峰 10)、0.76(峰 11)、0.19(峰 12)、0.16(峰 13),并对蜚螂有效部位供试样品的色谱图进行叠加比较,结果见图 1 和表 1。

由图 1 和表 1 可看出,各批样品与对照指纹图谱的相似度均大于 0.9,说明各批样品间的指纹图谱具有较高的一致性,同时,各批次间的相似度亦接近 0.9,表明 6 批有效部位的批间差异小,工艺稳定可行,该指纹图谱可作为蜚螂有效部位质量控制的必要条件之一。

2.5.2 总量统计矩法指纹图谱分析结果 指纹图谱总量统计矩分析法^[8-10]是不以指纹图的特征峰为信息单元,不采用峰峰相应的多维向量分析法,而是将指纹图谱看成是由众多高斯曲线叠加而成的概率



R-对照指纹图谱 1~6-批蜈蚣有效部位指纹图谱
R-reference fingerprint 1—6-fingerprint of six batches of active fractions

图1 蜈蚣有效部位CE指纹图谱

Fig. 1 CE fingerprint on different batches of active fractions from dried body of *C. molossus*

表1 指纹图谱相似度计算结果
Table 1 Similarities of fingerprint

批次	1	2	3	4	5	6	R
1	1.000	0.902	0.909	0.911	0.886	0.896	0.957
2	0.902	1.000	0.911	0.897	0.879	0.91	0.954
3	0.909	0.911	1.000	0.927	0.884	0.906	0.961
4	0.911	0.897	0.927	1.000	0.917	0.937	0.971
5	0.886	0.879	0.884	0.917	1.000	0.908	0.951
6	0.896	0.91	0.906	0.937	0.908	1.000	0.964
R	0.957	0.954	0.961	0.971	0.951	0.964	1.000

密度函数曲线,用统计学的方法来分析指纹图谱的内在特征。按一维随机向量统计原理,可用总量零阶矩(area under curve of total quantum, AUC_T)、总量响应率(area under curve of total quantum per weight, $AUCPW_T$)、总量一阶矩(mean chromatographic retention time of total quantum, $MCRT_T$)、总量二阶矩(variance of chromatographic retention time of total quantum, $VCRT_T$) 4个参数来对指纹图谱进行全面的定性、定量分析。蜈蚣有效部位指纹图谱

的总量统计矩法分析结果见表2、3。

由上述结果可知,各批指纹图谱间的相似度基本都在0.9以上,表明有效部位批间差异小。以显著性水平为0.05计,则0~43.4 min为整个指纹图谱平均保留时间的置信区间,即在上述时间范围内包含了约95%的成分信息,而整个实际指纹图谱约

表2 不同批次的蜈蚣有效部位指纹图谱参数

Table 2 Fingerprint parameters for different batches of active fractions from dried body of *C. molossus*

批次	$AUC_T /$ (AU·min)	$AUCPW_T /$ (AU·min·mL·mg ⁻¹)	$MCRT_T /$ min	$VCRT_T /$ min ²
1	718.847	35.942	20.029	126.100
2	545.907	27.295	20.746	139.322
3	584.166	29.208	22.387	112.611
4	568.512	28.426	22.006	107.964
5	639.660	31.983	20.314	161.029
6	556.599	27.830	21.949	125.596
平均值	602.282	30.114	21.239	128.770
RSD / %	10.943	10.943	4.696	14.991

表3 不同批次的蜚螂有效部位指纹图谱总量统计矩相似度

Table 3 Similarity in different batches of active fractions from dried body of *C. molossus* by total quantum statistical moment

批 次	相似度					
	1	2	3	4	5	6
1	1.000	0.967	0.911	0.921	0.940	0.932
2	0.967	1.000	0.926	0.927	0.963	0.953
3	0.911	0.926	1.000	0.983	0.893	0.970
4	0.921	0.927	0.983	1.000	0.891	0.963
5	0.940	0.963	0.893	0.891	1.000	0.923
6	0.932	0.953	0.970	0.963	0.923	1.000
平均值	0.945	0.956	0.947	0.948	0.935	0.957
RSD / %	3.484	2.910	4.540	4.380	4.503	2.913

50 min, 表明成分在指纹图谱中均匀分散。

综上表明, 由药典委员会的相似度软件与总量统计矩法计算的相似度基本一致, 均显示有效部位批间差异小, 工艺稳定可行。

3 讨论

由于蜚螂有效部位中间体的批量有限, 暂只对6批蜚螂有效部位进行了全谱的相似度评价及共有图谱的拟合, 结果6批蜚螂有效部位供试样品的CE指纹图谱中峰群的整体形状基本一致, 说明各批次有效部位无明显差异。本法精密度、重现性、稳定性均较好, 可作为蜚螂有效部位的的质量控制依据之一, 为快速评价不同批次蜚螂有效部位质量的稳定性提供了科学依据。在目前蜚螂有效部位活性成分或指标性化学成分尚不完全明确的情况下, 建立指纹图谱时, 因没有适当的对照品或内标物作为参照物, 暂时无法确定各峰的归属, 故初步以供试样品中峰面积相对较大、较稳定的共有峰作为特征峰。这方面的工作还有待对蜚螂有效部位化学成分、药物作用深入研究后进一步完善。

目前指纹图谱的分析方法主要有向量夹角法、相似度分析法、模式识别、人工神经网络等^[9-10], 这些方法大多将指纹图谱的特征峰响应值分割为不连续的数据信息元, 采用相应特征峰的多维向量方法进行计算判断。由于中药特征峰的信息元易受色谱条件、仪器噪声、积分条件及进样量的干扰, 同一组合成分难能出现完全相同的峰形和峰数, 这给以特征峰为基础分割计算信息元的方法分析指纹图谱带来一定的难度。而总量统计矩分析法^[11-12]是不以指纹图谱的特征峰为信息单元, 根据统计学中多维

随机向量(连续型)求数学期望及方差的思路来找到这群成分的中心, 分析这群成分离中心距离的偏差, 即方差。由于指纹图谱以峰(谷)的形式体现, 描述这些谱线特性变量所对应响应值的中心和偏差, 就能正确描述一张指纹图谱, 自然与之相对的色谱条件下的成分组的特点就能描述, 成分的定性分析就能建立。再根据曲线下的面积可表示一定总量下的响应总值, 以相同构成比的标准混合物为对照品, 可用来对总成分进行定量分析。因其具有抗干扰性、加合性与偶联性, 能消除操作方法的干扰, 能与多维向量偶联构成谱学的特点, 可作为指纹图谱分析评价的一种有效方法。本实验蜚螂有效部位的指纹图谱对比评价也初步表明, 总量统计矩法可以作为指纹图谱的一种有效分析方法。

参考文献

- [1] 蒋巧梅, 谭承佳, 马家骅, 等. 蜚螂抗良性前列腺增生症活性部位的筛选 (I) [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(6): 100-103.
- [2] 马家骅, 谭承佳, 衣文娇, 等. 基于有效组分检测与理化表征相结合的蜚螂有效部位制备工艺研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(9): 1123-1126.
- [3] 谭承佳, 马家骅, 吴利凌, 等. 蜚螂有效部位的初步表征 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 84-87.
- [4] 马家骅, 谭承佳, 韩 丽, 等. 泡沫分离法用于蜚螂蛋白分离的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1223-1225.
- [5] 孙毓庆, 阮婧华, 马 欣. 中药的毛细管电泳指纹图谱研究 [J]. 色谱, 2003, 21(4): 303-306.
- [6] 孔 毅, 吴如金, 吴梧桐. 高效毛细管电泳及其在蛋白质、多肽分析中的应用 [J]. 药学进展, 2000, 24(4): 204-208.
- [7] 叶能胜, 谷学新. 高效毛细管电泳指纹图谱鉴别天然药物研究进展 [J]. 中草药, 2002, 33(3): 274-275.
- [8] 贺福元, 罗杰英, 邓凯文, 等. 中药(复方)药动学研究现状及研究方法探讨 [J]. 中草药, 2005, 36(10): 1582-1586.
- [9] 黄 胜, 贺福元, 刘文龙, 等. 总量统计矩相似度法对左金缓释片多成分释放相似度的评价研究 [J]. 中成药, 2009, 31(1): 35-39.
- [10] 贺福元, 周宏灏, 邓凯文, 等. 指纹图谱的一种定性定量研究新方法: 总量统计矩分析法 [J]. 药学报, 2008, 43(2): 195-201.
- [11] 王龙星, 肖红斌, 梁鑫淼, 等. 一种评价中药色谱指纹图谱相似性的新方法: 向量夹角法 [J]. 药学报, 2002, 37(9): 713-717.
- [12] 孙国祥, 侯志飞, 张春玲, 等. 色谱指纹图谱定性相似度和定量相似度的比较研究 [J]. 药学报, 2007, 42(1): 75-80.