

土鳖虫及其混淆品 HPLC 指纹图谱分析

王欣丽, 李清, 李博惠, 回音, 陈媛媛, 毕开顺*

沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘要: 目的 通过 OPA-FMOC 在线自动衍生化, 建立土鳖虫的 HPLC 指纹图谱分析方法。方法 色谱柱为 Durashell-AA 柱 (150 mm×4.6 mm, 3 μm); 流动相组成为 A: 0.01 mol/L 磷酸氢二钠及四硼酸钠水溶液 (盐酸调节 pH 值至 8.2); 流动相 B: 甲醇-乙腈-水 (45:45:10); 体积流量 1.6 mL/min; 检测波长: 0~24 min, 338 nm; 24~27 min, 228 nm; 柱温 45 °C; 梯度洗脱。结果 共得到 28 个共有峰, 指认了其中 15 个化学成分, 建立了土鳖虫及其混淆品 HPLC 指纹图谱并计算相似度, 根据 SPSS 聚类分析结果, 将其分为 2 类, 第 I 类药材为地鳖或冀地鳖, 第 II 类为金边地鳖。结论 所建立的土鳖虫 HPLC 指纹图谱快速、准确、重复性好, 为土鳖虫的质量控制提供科学依据。

关键词: 土鳖虫; 在线自动衍生化; 指纹图谱; HPLC; 混淆品

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)10-1780-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.10.025

HPLC fingerprint analysis for *Eupolyphaga steleophaga* and its adulterants

WANG Xin-li, LI Qing, LI Bo-hui, HUI Yin, CHEN Yuan-yuan, BI Kai-shun

School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To establish the chromatographic fingerprint analysis for the quality control of *Eupolyphaga steleophaga* with OPA-FMOC by on-line derivatization. **Methods** Analysis was completed with a gradient elution of 0.01 mol/L sodium dihydrogen phosphate and 0.01 mol/L sodium tetraborate, pH = 8.2 (A) and methanol-acetonitrile-water was 45:45:10 (B). The wavelength was set at 338 nm from 0–24 min, and at 228 nm from 24–27 min. Efficient and symmetrical peaks were obtained with data flowrate of 1.6 mL·min. **Results** A total of 28 peaks were detected, while 15 ingredients were identified. The 18 batches of samples were classified into two groups based on the results of cluster analysis. The first category was *E. sinensis* and *Steleophaga plancyi*; The second category was *Opisthoplata orientalis* and it was identified as the adulterants. **Conclusion** The HPLC fingerprint method is repeatable, feasible in analysis of *E. steleophaga* and could be used scientifically to evaluate the quality of *E. steleophaga* with quality control.

Key words: *Eupolyphaga steleophaga* Walker; on-line derivatization; fingerprint; HPLC; adulterants

土鳖虫 *Eupolyphaga Steleophaga* 为鳖蠊科昆虫地鳖 *Eupolyphaga sinensis* Walker 或冀地鳖 *Steleophaga plancyi* Boleny 的雌虫干燥体^[1]。地鳖主产于北京、华中、华东、华南和西部各省区; 冀地鳖分布于黄河北侧省地; 赤边水蠊 *Opisthoplata orientalis* Burm (习称金边地鳖) 未被《中国药典》2015 年版收录^[2], 为土鳖虫混淆品, 但在浙江、福建、台湾、广东、海南等地^[3]常被作为土鳖虫入药。土鳖虫味咸, 性寒, 有小毒, 归肝经, 具破血逐瘀、续筋接骨的功效, 用于闭经、不孕不育、产后瘀阻、

症瘕等症; 亦可用于骨折损伤、瘀滞疼痛、腰部扭伤等症^[4]。氨基酸是土鳖虫的主要组成成分之一, 总量约占土鳖虫的 40%, 直接参与合成各种酶、激素, 在活血化瘀疗效中起着一定的作用^[5]。土鳖虫中共含有 18 种氨基酸, 种类齐全, 几乎包含了构成蛋白质的所有氨基酸, 其中人体必需的 8 种氨基酸 (包括婴儿必需的组氨酸) 占氨基酸总量的 34.5%。传统的氨基酸衍生化方法主要有柱前衍生法^[6]和柱后衍生法^[7], 但以上 2 种方法操作繁琐、费时。本实验建立了 OPA-FMOC^[8]在线衍生化方法, 测定了

收稿日期: 2015-10-29

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目 (212032); 辽宁省教育厅创新团队—中药质量控制关键技术 (LT2012018)

作者简介: 王欣丽 (1987—), 硕士在读, 研究方向为中药质量控制。Tel: 13840122035 E-mail: wangxinli0703@163.com

*通信作者 毕开顺 Tel: (024)23986012 E-mail: bikaisun@126.com

不同来源的土鳖虫及其混淆品中氨基酸的指纹图谱, 为其质量评价提供了一定参考依据。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 包括四元泵、在线脱气机、柱温箱、DAD 检测器、全自动进样(美国 Agilent 公司); AB135-S 十万分之一天平(Mettler Toledo 仪器有限公司); BP210S 电子天平(Sartorius 公司); HC-2516 高速离心机(科大创新股份有限公司)。

甲醇、乙醇、乙腈(色谱纯, 山东禹王有限公司); 磷酸、盐酸、磷酸氢二钠(分析纯, 天津科密欧化学试剂开发中心); 纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司); 四硼酸钠(天津博迪化工股份有限公司); 邻苯二甲醛(OPA)、9-芴基氯甲酸甲酯(FMOC)、硼酸盐缓冲液(天津博纳艾杰尔科技有限公司); 15 种氨基酸对照品(批号 624-200104)购自中国食品药品检定研究院。本实验收集土鳖虫样品共 18 批, 由沈阳药科大学药学教授贾英鉴定为土鳖虫 *Eupolyphaga Steleophaga* 及其混淆品金边地鳖雌虫干燥体。药材信息见表 1。药材经粉碎后, 过 60 目筛, 置于干燥阴凉处保存备用。

表 1 18 批药材来源
Table 1 Sources of 18 samples

批次	名称	产地
1	地鳖	山东临沂
2	地鳖	江苏常州
3	金边地鳖	广西南宁
4	冀地鳖	河北安国
5	金边地鳖	海南澄迈
6	地鳖	江苏常州
7	地鳖	安徽亳州
8	地鳖	安徽亳州
9	地鳖	江苏常州
10	冀地鳖	北京
11	地鳖	浙江苏州
12	地鳖	河南南阳
13	金边地鳖	河南洛阳
14	冀地鳖	河南洛阳
15	金边地鳖	广西钦州
16	地鳖	江苏淮安
17	地鳖	浙江杭州
18	地鳖	上海

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Durashell-AA (150 mm×4.6 mm, 3 μm); 流动相组成为 A: 0.01 mol/L 磷酸氢二钠及的四硼酸钠水溶液(盐酸调节 pH 值至 8.2); 流动相 B: 甲醇-乙腈-水(45:45:10); 体积流量 1.6 mL/min; 检测波长: 0~24 min, 338 nm; 24~27 min, 228 nm; 柱温 45 °C; 进样量 1 μL。梯度洗脱程序: 0~6 min, 5%~8% A; 6~11 min, 8%~13% A; 11~19 min, 13%~28% A; 19~22 min, 28%~36% A; 22~27 min, 36%~75% A。

2.2 在线自动衍生化方法

2.2.1 衍生化试剂的配制 稀盐酸(0.1 mol/L): 取 36%盐酸 4.16 mL, 加水稀释至 500 mL; 衍生试剂(OPA): 取 A 试剂 1 支, 加入 B 试剂 60 μL, 混匀; 稀释剂: 取 100 mL 流动相 A, 加磷酸 0.5 mL, 混匀。

2.2.2 在线自动衍生化程序的设置 取进样瓶 6 个, 编号 1~6, 并依此加入硼酸盐缓冲液、水、OPA 衍生剂、FMOC 衍生剂、稀释剂、待测样品。设置自动衍生化程序为分别从 1 号瓶中吸取硼酸盐缓冲液 5 μL, 从 6 号瓶中吸取样品 1 μL, 在空气中以最大速度混合 6 次。等待 0.5 min, 从 2 号瓶中吸取水 10 μL, 从 3 号瓶中吸取 OPA 衍生剂 1 μL, 在空气中以最大的速度混合 6 次。从 2 号瓶中吸取水 10 μL, 从 4 号瓶中吸取 FMOC 衍生剂 1 μL, 在空气中以最大的速度混合 10 次。从 5 号瓶中吸取稀释剂 32 μL, 在空气中以最大的速度混合 8 次后进样。

2.3 供试品溶液的制备

取药材粉末 5.0 g, 置于锥形瓶中, 加入乙醇-水(50:50) 25 mL, 混匀, 超声提取 30 min, 涡旋 5 min, 10 000 r/min 离心机离心 2 次, 每次 3 min。取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 续滤液作为供试品溶液。

2.4 对照品溶液的制备

分别精密称取 15 种氨基酸对照品适量, 加入浓度为 0.1 mol/L 稀盐酸溶解并摇匀, 制得浓度分别为丝氨酸 0.21 mol/L、组氨酸 0.52 mol/L、甘氨酸 0.37 mol/L、苏氨酸 0.18 mol/L、精氨酸 0.685 mol/L、丙氨酸 1.52 mol/L、酪氨酸 0.27 mol/L、缬氨酸 0.46 mol/L、色氨酸 0.18 mol/L、异亮氨酸 0.61 mol/L、苯丙氨酸 0.28 mol/L、赖氨酸 0.45 mol/L、亮氨酸 0.49 mol/L、脯氨酸 0.83 mol/L、天冬氨酸 0.76 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取第 15 批药材供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下重复进样 6 次,记录各色谱峰的保留时间和峰面积。计算各共有峰相对于内参比峰(13 号峰)的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.2%,相对峰面积的 RSD 均小于 1.7%。表明仪器的精密度良好。

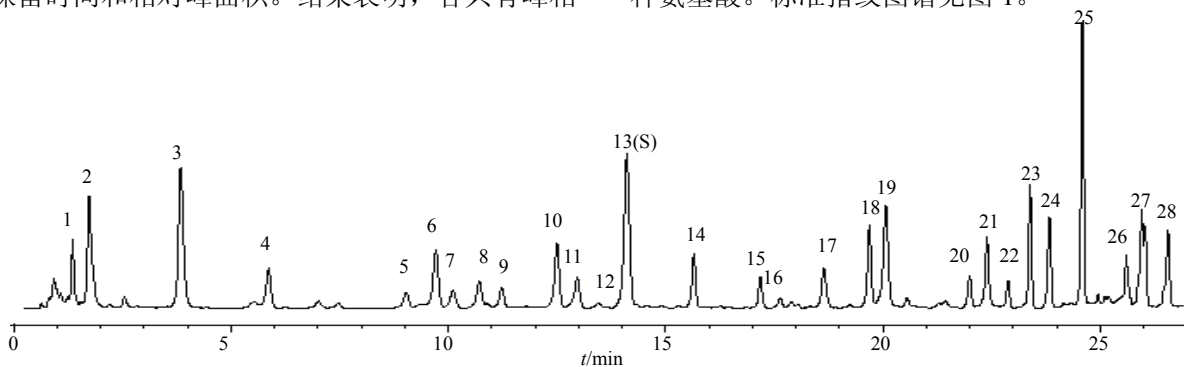
2.5.2 重复性试验 取第 15 批药材 6 份,精密称定。按“2.3”条件制备供试品溶液,在上述色谱条件下进行 HPLC 分析,记录各色谱峰的保留时间和峰面积。计算各共有峰相对于内参比峰(13 号峰)的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各共有峰相

对保留时间的 RSD 均小于 0.9%,相对峰面积的 RSD 均小于 3.7%。表明方法的重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 取第 15 批药材供试品溶液,室温下分别在 0、2、4、6、8、12 h 进样分析,记录各色谱峰的保留时间和峰面积。计算各共有峰相对于内参比峰(13 号峰)的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.6%,相对峰面积的 RSD 均小于 4.4%。表明供试品溶液室温下 12 h 内稳定。

2.6 HPLC 指纹图谱的建立

2.6.1 样品 HPLC 指纹图谱的建立 HPLC 指纹图谱共标定 28 个共有峰。以对照品对照,指认了 15 种氨基酸。标准指纹图谱见图 1。



2-天冬氨酸 4-丝氨酸 5-组氨酸 6-甘氨酸 7-苏氨酸 10-精氨酸 13-丙氨酸(S) 15-酪氨酸 18-缬氨酸 20-色氨酸 21-异亮氨酸 22-苯丙氨酸 23-赖氨酸 24-亮氨酸 28-脯氨酸
2-Asp 4-Ser 5-His 6-Gly 7-Thr 10-Arg 13-Ala(S) 15-Tyr 18-Val 20-Trp 21-Ile 22-Phe 23-Lys 24-Leu 28-Pro

图 1 土鳖虫标准指纹图谱

Fig. 1 Standard fingerprint of *E. steleophaga*

2.6.2 指纹图谱相似度计算 将 18 批药材 HPLC 指纹图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2009 版)进行处理,获得土鳖虫及其混淆品的标准指纹图谱,以此为基准,计算样品共有色谱峰与共有模式的相似度,对 18 批供试品进行评价,其相似度见表 2,指纹图谱相似性比对见图 2。相似度分析结果显示,第 3、5、13、15 批相似度为 0.909~0.923,较其他各批次低;其余各批次的相似度均高于 0.941。其中,相似度略低的 4 批均属于金边地鳖。根据各色谱峰之间响应值高低可判断,缬氨酸在各批次中质量分数差别较大,相差约 11 倍,其余各氨基酸在不同批次中质量分数差别约为 5~8 倍。第 2、6、11、17 批次中,各氨基酸响应值整体较其他批次略高。

2.6.3 系统聚类分析 实验中应用 SPSS 软件,以

表 2 18 批药材相似度结果

Table 2 Results of similarity of 18 batches of samples

批次	相似度	批次	相似度
1	0.970	10	0.948
2	0.969	11	0.974
3	0.913	12	0.963
4	0.941	13	0.911
5	0.906	14	0.944
6	0.966	15	0.902
7	0.965	16	0.950
8	0.949	17	0.968
9	0.967	18	0.943

组间平均联接法聚类(between-group),利用欧式距离平方(squared euclidean distance)作为样品相似度的测度^[9]。18 批药材可分为 2 类,样品 1、2、4、

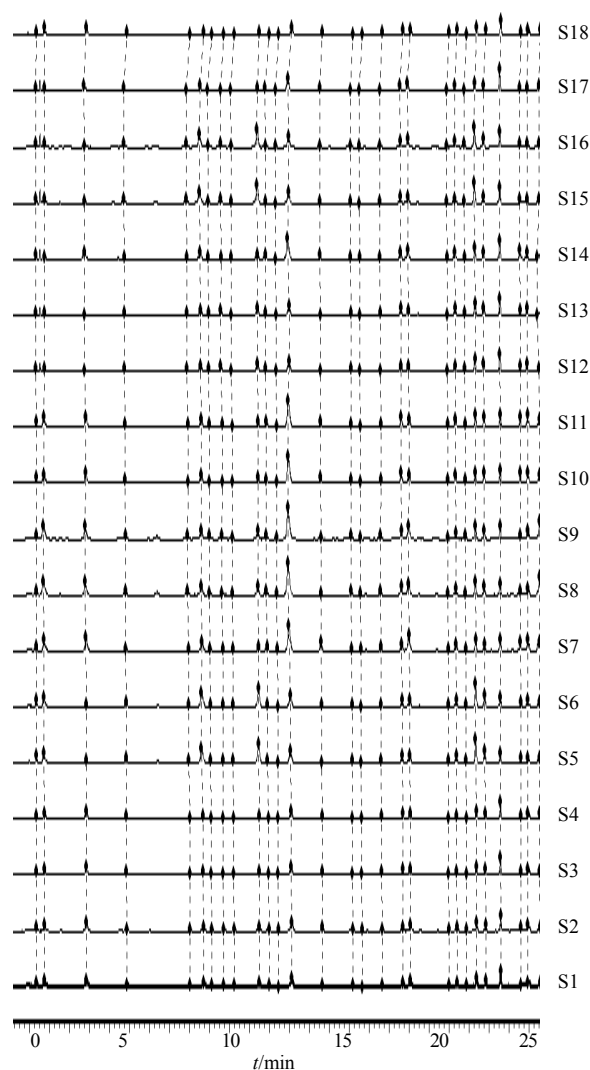


图 2 土鳖虫及其混淆品 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of *E. steleophaga* and its adulterants

6、7、8、9、10、11、12、14、16、17、18 号为第 I 类，样品 3、5、13、15 号为第 II 类。第 I 类药材均为地鳖或冀地鳖，其中第 4、10、14 批为冀地鳖，其余批次为地鳖；第 II 类均为金边地鳖。通过聚类分析结果（图 3）显示，不同批次的药材主要按照不同属来聚类区分，与产地关系较小。说明土鳖虫主要成分及量受遗传及进化影响大于其受土壤、水分、温度等生长环境差别。地鳖、冀地鳖为《中国药典》2015 年版中收录的土鳖虫药材，聚类分析结果显示，地鳖、冀地鳖的质量相近；金边地鳖尚未被《中国药典》2015 年版收录，且通过其氨基酸指纹图谱相似度及系统聚类分析结果显示，金边地鳖与其他 2 类药材相比，相似度较低，进一步证实金边地鳖为土鳖虫混淆品。因此，建议禁止金边地鳖作为土鳖虫入药。

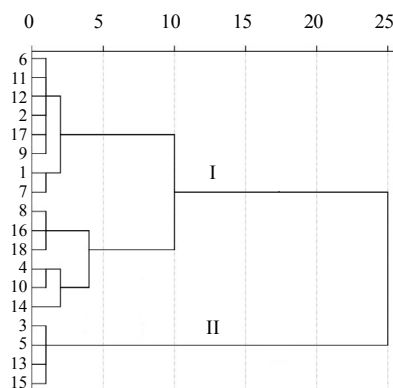


图 3 18 批药材系统聚类分析结果

Fig. 3 Dendrogram of hierarchical clustering analysis of 18 batches of samples

3 讨论

3.1 检测波长的选择

采用二极管阵列检测器考察了 190~370 nm 不同检测波长处的色谱图，结果表明一级氨基酸和二级氨基酸分别在在 338 nm 和 228 nm 处有最大吸收，因此采用切换波长法进行检测：0~24 min，338 nm；24~27 min，228 nm。

3.2 流动相的选择

实验中考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇乙腈-加盐水溶液等多种流动相系统，结果表明采用流动相组成为 A：0.01 mol/L 磷酸氢二钠及 0.01 mol/L 的四硼酸钠水溶液，盐酸调节 pH 值至 8.2；流动相 B：甲醇-乙腈-水（45：45：10）时，各色谱峰分离度较好。

3.3 色谱柱的选择

实验中考察了普通 C₁₈ 色谱柱与 Venusil AA 氨基酸分析专用柱。Venusil AA 氨基酸分析专用柱基线平稳，色谱峰数目较多，分离度和峰形较好，因此选用 Venusil AA 氨基酸分析专用柱进行指纹图谱研究。

3.4 衍生化方法及衍生剂的选择

本实验采用在线衍生化方法，在巯基试剂 *N*-乙酰半胱氨酸存在下，一级氨基酸首先与 OPA 反应生成 1-硫代-2-烷基异吲哚一级氨基酸产物^[7]，而二级氨基酸不和 OPA 反应，然后再用 FMOC 与二级氨基酸反应生成 FMOC-二级氨基酸衍生物^[10]。相比于传统柱前衍生化更加简便、快捷、误差小。使用 OPA 和 FMOC 作为衍生剂，样品制备简单、衍生化反应迅速、分析时间短、灵敏度高。本实验采用非挥发性的巯基试剂 *N*-乙酰半胱氨酸，与常用的 3-巯基丙酸（MPA）相比，具有无毒、无臭等优点。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 暴 昕, 林 晶. 中药地鳖虫药用价值介绍 [J]. 中国城乡企业卫生, 2011(4): 119-120.
- [3] 蒋三俊. 药用地鳖虫种类及螨虫的防治 [J]. 特种经济动植物, 2001, 4(4): 9.
- [4] 江寒沁, 钟伟才, 朱国福. 土鳖虫抗肿瘤作用研究进展 [J]. 河北中医, 2012, 34(3): 455-457.
- [5] 刘仁权, 卢 颖. 主成分分析法对土鳖虫质量的评估 [J]. 中国中药杂志, 1993, 18(8): 463-465.
- [6] 邵 旭, 牛海军, 李晓亮, 等. 柱前衍生 RP-HPLC 法测定芦笋中门冬氨酸的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(1): 8-10.
- [7] 高晓燕. 清开灵注射液生产在线检测与质量评价方法研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2006.
- [8] 苏建坤, 王 雪, 卢建秋, 等. OPA-FMOC 在线衍生化法测定氨基酸的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 135-138.
- [9] 卢纹岱. SPSS for Windows 统计分析 [M]. 北京: 电子工业出版社, 2002.
- [10] 吕莹果, 张 晖, 孟祥勇, 等. 氨基酸分析测定及衍生化方法 [J]. 粮食与油脂, 2009(7): 35-38.