

[中药指纹图谱]

## 土鳖虫超微粉体中游离氨基酸的测定及指纹图谱研究

蔡萍, 万丹, 肖娟, 张水寒\*, 蔡光先\*

(湖南省中医药研究院, 湖南省中药粉体与创新药物省部共建重点实验室, 湖南省教育厅中药粉体技术创新团队, 湖南长沙 410013)

**摘要:**目的 建立土鳖虫超微粉体的游离氨基酸的 HPLC 指纹图谱, 考察其主要氨基酸的量。方法 采用异硫氰酸苯酯 (PITC) 柱前衍生, 梯度洗脱进行色谱分离, 固定相为依利特 Hypersil BDS C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 A 乙腈-水 (4:1), 流动相 B 醋酸钠缓冲溶液 (pH = 6.5) -乙腈 (97:3), 检测波长为 254 nm, 体积流量为 1 mL/min, 柱温为 30℃。结果 初步建立了土鳖虫超微粉体中游离氨基酸的 HPLC 指纹图谱, 标定了 24 个共有峰, 同时定量分析了 6 种氨基酸成分。结论 建立的方法分离效果好, 灵敏、准确、简单, 可作为土鳖虫超微粉体质量评价的方法。

**关键词:** 土鳖虫; 超微粉体; 指纹图谱; 定量测定; 柱前衍生化

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2011)10-1645-04

## HPLC fingerprint of free amino acids in micropowder of *Eupolyphaga*

CAI Ping, WAN Dan, XIAO Juan, ZHANG Shui-han, CAI Guang-xian

(Hunan Provincial Teachs Hall Medicine Powder Technology Innovation Team, Hunan Provincial Chinese Medicine Powder and Innovation Drug Department Co-construction and Key Laboratories, Ministry of Education, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To determine the HPLC fingerprint of free amino acids in ultramicro powder of *Eupolyphaga*, and test its contents. **METHODS** Derived pre-column derivitization with phenyl isothiocyanate (PITC), Chromatographic conditions were as follows: column Hypersil BDS C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase was (A) acetonitrie-water (4:1), (B) natrium aceticum buffer solution (pH = 6.5) -acetonitrie (97:3); the detective wavelength was set at 254 nm, column tempepture maintained at 30℃ and the flow rate was 1 mL/min. **RESULTS** The fingerprint of micropowder *Eupolyphaga* was established, and 24 common peaks were found in the fingerprint, and six kinds of amino acids contents were quantitatively analysed. **CONCLUSION** The method is sensitive, accurate, simple, thereby can be used specifically for the quality control of ultramicro powder of *Eupolyphaga*.

**KEY WORDS:** *Eupolyphaga*; micropowder; fingerprint; assay; pre-column derivitization

土鳖虫, 又称地鳖虫, 在我国具有悠久的药用历史。其雌虫体具有散血瘀、消坚结、解凝活血、接骨续筋、消肿止痛、下乳通经等功效。在我国, 常用于入药的土鳖虫有地鳖 *Eupolyphaga sinensis* Walker、冀地鳖 *Steleophaga plancyi* (Boleny) 和金边土鳖 *Opishoplatia orientalis* Bur meister<sup>[1]</sup>。土鳖虫中含有丰富的氨基酸<sup>[2-4]</sup>。目前, 用柱前衍生化法分析土鳖虫氨基酸的报道还未见, 本实验采用 PITC 柱前衍生

化高效液相色谱法检测土鳖虫中的游离氨基酸, 为评价土鳖虫超微粉体内在质量提供一定的参考依据。

### 1 实验仪器、试剂与药材

1.1 仪器 岛津 LC-10ATVP 高效液相色谱仪, 配置 SPD-M10AVP 型二极管阵列检测器、CTO-10ASVP 柱温箱, CLASS-VP 岛津工作站; KQ3200 型超声波清洗器 (220V, 40KHz); BFM-T6BI “贝利”微

收稿日期: 2011-04-29

基金项目: 中医药行业科研专项项目赤芍、马钱子等 40 种中药粉体行业标准 (200807054)

作者简介: 蔡萍 (1975—), 女, 实验师, 从事中药新制剂与新工艺研究。Tel: (0731) 88881651, E-mail: chenjiewan@163.com

\* 通信作者: 张水寒, 硕士生导师。E-mail: zhangshuihan0220@126.com; 蔡光先, 博士生导师。E-mail: hn-chaowei@163.com

粉机( 济南贝利粉碎技术工程有限公司);旋涡混合器: 金坛市大地自动化仪器厂; T-214 型电子分析天平( 北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.2 试剂 甲醇、乙腈( 色谱纯, Tedia 公司生产), 冰醋酸( 色谱纯, 天津市科密欧化学试剂开发中心), 异硫氰酸苯酯( PITC) ( 上海金山亭新化工试剂厂), 无水乙酸钠、三乙胺、正己烷均为恒兴试剂, 水为重蒸馏水, 其它试剂均为分析纯。

1.3 对照品 天冬氨酸 Asp, 谷氨酸 Glu, 丝氨酸 Ser, 甘氨酸 Gly, 组氨酸 His, 精氨酸 Arg, 丙氨酸 Ala, 脯氨酸 Pro, 缬氨酸 Val, 酪氨酸 Tyr, 异亮氨酸

Ile, 亮氨酸 Leu, 色氨酸 Trp, 苯丙氨酸 Phe, 赖氨酸 Ly, 上述氨基酸对照品均购于 Sigma 公司。

1.4 药材 10 批土鳖虫药材分别购自四川、广西、湖南、陕西、江西、安徽等地( 见表1), 经湖南中医药研究院生药鉴定室鉴定为地鳖、冀地鳖及金边土鳖虫雌体, 加工成超微粉体。土鳖虫对照药材( 批号: 121489-200602)。土鳖虫经贝利粉碎机超微粉碎后, 粒径检测采用 Winner 3001 干粉激光粒径仪, 结果  $D_{50}$  均值为 12.285  $\mu\text{m}$ , 小于 75  $\mu\text{m}$  的颗粒累积在 95% 以上。

表 1  
Tab. 1 10 批土鳖虫的来源  
Ten batches of *Eupolyphaga* from different sources

批号	来源	批号	来源
20100803	湖南海川医药公司	20100901	成都荷花池药材市场
20100605	长沙老百姓大药房	20100403	太极中药饮片厂
20100806	陕西万寿路药材市场	20100508	湖南九旺医药有限公司
20100608	亳州市新兴饮片厂	20100902	广西玉林药材市场
20100603	安徽海鑫中药饮片公司	20100602	樟树中药饮片有限公司

## 2 实验方法与结果

2.1 色谱条件<sup>[5-7]</sup> 色谱柱为依利特 Hypersil  $C_{18}$  BDS 柱( 4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相 A 乙腈-水( 4 : 1), B 醋酸钠缓冲溶液( pH = 6.5) -乙腈( 97 : 3) 检测波长为 254 nm, 体积流量为 1 mL/min, 柱温为 30  $^{\circ}\text{C}$ 。按表 2 进行梯度洗脱。

表 2 梯度洗脱程序

时间/ min	A/ %	B/ %
0	0	100
8	7.5	92.5
20	7.5	92.5
22	24	76
37	24	76
40	30	70
45	30	70
52	100	0

2.2 供试品溶液的制备及衍生化 称取样品及对照药材各 0.4 g, 精密称定, 准确加入 25 mL 50% 甲醇, 称定质量, 超声提取 30 min, 放至室温, 再称定质量, 补足减失的质量, 离心, 取上层液 2 mL, 置于 10 mL 离心管内, 加入 0.1 mol/L 异硫氰酸苯酯( PITC) -乙腈溶液( 12 : 988) 1 mL, 1.0 mol/L 三乙胺-乙腈溶液( 139 : 861) 1 mL, 漩涡混合 1 min, 暗处放置 1 h, 再加入正己烷 4 mL, 漩涡混合 1 min, 静置 10 min, 吸取下层溶液过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 备用。

2.3 对照品溶液的制备及衍生化 分别称取各氨基酸对照品适量, 用 50% 甲醇溶解配制成混合对照品溶液, 吸取对照品溶液 2 mL, 照上法进行衍生化处理, 即得。

2.4 空白溶液的制备及衍生化 取 50% 甲醇溶液 2 mL, 照上法进行衍生化处理, 即得。

### 2.5 方法学考察

2.5.1 指纹图谱的建立 分别精密吸取混合对照品溶液、空白溶液、对照药材溶液、供试品溶液各 5  $\mu\text{L}$ , 分别注入高效液相色谱仪, 记录 52 min 的色谱图, 见图 1。

2.5.2 精密度试验 精密吸取 2.3 项下的混合对照品溶液, 连续重复进样 5 次, 其相似度大于 0.99, 符合指纹图谱的要求。

2.5.3 稳定性试验 取 2.2 项下的同一份供试品溶液( NO.1 海川), 分别在制备后 0、2、4、6、8、12、24 h 进样 5  $\mu\text{L}$ , 结果显示, 其相似度大于 0.98, 表明样品 24 h 内稳定, 符合指纹图谱的检测要求。

2.5.4 重复性试验 取同一批土鳖虫超微粉体样品( NO.1 海川) 5 份, 分别按 2.2 项下供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 进样 5  $\mu\text{L}$ , 结果显示, 其相似度大于 0.97。表明此方法的重复性良好。

### 2.6 指纹图谱的建立

2.6.1 共有指纹峰的标定 按《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求( 暂行) 》规定<sup>[8]</sup>, 采用相对保

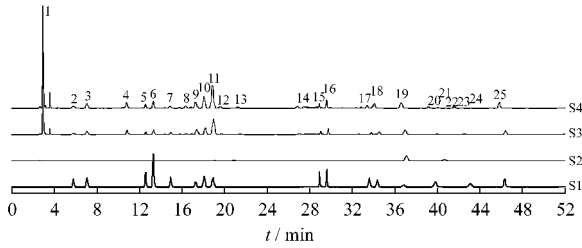


图1 土鳖虫游离氨基酸 HPLC 图谱

S1. 混合对照品溶液 S2. 空白溶液 S3. 对照药材溶液 S4. 供试品溶液  
2. 天冬氨酸 3. 谷氨酸 5. 丝氨酸 6. 甘氨酸 7. 组氨酸 9. 精氨酸 10. 丙氨酸 11. 脯氨酸 15. 缬氨酸 16. 酪氨酸 17. 异亮氨酸 18. 亮氨酸 20. 苯丙氨酸 24. 色氨酸 25. 赖氨酸

Fig. 1 HPLC chromatogram of free amino acids in *Eupolyphaga*

S1. reference mixture S2. blank sample S3. reference sample S4. sample  
2. Asp 3. Glu 5. Ser 6. Gly 7. His 9. Arg 10. Ala 11. Pro 15. Val 16. Tyr 17. Ile 18. Leu 20. Phe 24. Trp 25. Ly

留时间标定共有指纹峰,以图谱中11号峰(脯氨酸)作为参照峰,计算各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的比值,共有色谱峰24个,共有峰峰面积占总峰面积均在80%以上,各峰相对保留时间的RSD%分别为0.49%、0.63%、0.39%、0.43%、0.32%、0.29%、0.22%、0.13%、0.13%、0.08%、0.00%、0.03%、0.18%、0.24%、0.25%、0.25%、0.30%、0.35%、0.52%、0.85%、0.43%、0.38%、0.45%、0.32%。

2.6.2 指纹图谱的相似度计算 采用中国药典委员会出版的《中药色谱指纹图谱相似度评价》软件(2.0版)对10批不同产地土鳖虫超微粉体进行相似度评价。设置第一批样品图谱为参照物图谱,时间窗0.5,中位数法,多点校正后自动匹配,生成对照指纹图谱(见图2),10批样品的相似度达到0.95以上,相似度计算结果见表3。

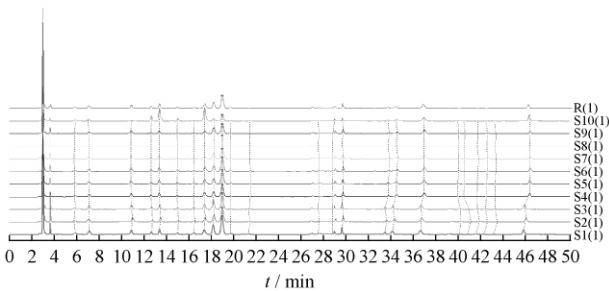


图2 10批土鳖虫超微粉体的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of 10 batches of samples

2.7 氨基酸测定 土鳖虫超微粉体线性关系考察、

表3 10批土鳖虫超微粉体指纹图谱相似度结果

Tab. 3 The similarity evaluation of *Eupolyphaga* for 10 batches of samples

编号	相似度	编号	相似度
1	0.994	6	0.996
2	0.987	7	0.996
3	0.998	8	0.997
4	0.998	9	0.956
5	0.997	10	0.997

加样回收试验及定量测定 分别取甘氨酸、精氨酸、丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、赖氨酸对照品,配制成质量浓度分别为0.012 6、0.068 0、0.019 5、0.072 0、0.015 2、0.015 6 mg/mL的对照品溶液,按2.3项进行处理,按上述色谱条件进样,以氨基酸对照品峰面积为纵坐标,进样质量为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程。见表4。精密称取已知氨基酸量的土鳖虫超微粉体6份,分别加入适量的甘氨酸、精氨酸、丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、赖氨酸,按2.2项下方法制备供试品溶液,计算回收率。结果,甘氨酸、精氨酸、丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、赖氨酸的平均回收率分别为90.26%、92.53%、91.22%、96.20%、95.57%和98.27%。RSD%分别为2.1%、1.8%、2.5%、2.4%、3.2%、1.2%。根据线性回归方程,计算10批土鳖虫超微粉体中6种氨基酸。见表5。

表4 6种氨基酸线性关系

Tab. 4 Linear relationship of six kinds of free amino acids

	线性回归方程	线性范围/ng	R
甘氨酸	$Y = 4.924.8X - 8.113.3$	25.2 ~ 126	0.999 8
精氨酸	$Y = 1.840.3X - 16.960$	136 ~ 680	0.999 5
丙氨酸	$Y = 3.690.6X - 11.341$	39 ~ 195	0.999 8
脯氨酸	$Y = 3.585.4X - 38.679$	144 ~ 720	0.999 5
酪氨酸	$Y = 2.965.3X + 486.0.4$	30.4 ~ 152	0.999 6
赖氨酸	$Y = 2.576.2X - 6.995.6$	31.2 ~ 156	0.999 4

表5 10批土鳖虫超微粉体的6种氨基酸测定结果

Tab. 5 Content of six kinds of free amino acids in 10 batches of samples

	甘氨酸/ (mg/g)	精氨酸/ (mg/g)	丙氨酸/ (mg/g)	脯氨酸/ (mg/g)	酪氨酸/ (mg/g)	赖氨酸/ (mg/g)
1	0.69	2.62	2.12	4.62	1.81	1.43
2	0.61	2.39	1.68	3.78	0.89	1.29
3	0.65	2.68	2.13	4.16	1.58	1.42
4	0.48	2.22	1.20	3.29	0.93	1.03
5	0.58	2.66	1.35	3.89	0.84	1.36
6	0.57	2.72	1.33	3.95	0.76	1.09
7	0.37	1.27	1.32	2.84	0.63	0.71
8	0.44	1.68	1.59	3.03	0.76	0.83
9	1.90	5.98	0.69	1.73	0.51	1.80
10	0.36	1.35	1.41	2.72	0.64	0.72

### 3 讨论

3.1 测定方法的选择 柱前衍生化高效液相色谱法分析氨基酸分析时间较短、方法灵活多样、灵敏度高,据报道目前主要的柱前衍生试剂有邻苯二甲醛(OPA)、异硫氰酸苯酯(PITC)、氯甲酸苄甲酯(FMOC)等<sup>[9-11]</sup>。其中用PITC柱前衍生采用常规C<sub>18</sub>柱、UV检测器就可以检测,且产物稳定。所以本实验采用此试剂进行柱前衍生化进行氨基酸的检测。

3.2 提取方法的考察 分别用回流及超声的提取方法对样品进行处理,但回流后的样品与衍生化试剂反应后有白色浑浊物生成,影响实验结果,所以本实验采用超声的提取方法;提取溶剂分别考察水、50%甲醇、乙醇,考虑到氨基酸易长菌降解<sup>[12]</sup>,且用50%甲醇提取液衍生化后,分离效果好,出峰数多,故采用50%甲醇溶液作为提取溶液。

3.3 进样量的选择 试验中曾尝试进样量10 μL、8 μL,但对照品溶液及供试品溶液中天冬氨酸和谷氨酸峰都会分叉,其他峰均正常,当进样量改为5 μL时,未出现这种情况,可能是因为色谱柱超载<sup>[13]</sup>。

3.4 记录时间的选择 按上述色谱条件进样,参照混合对照图谱及空白图谱,可知在52 min后均为衍生化试剂峰,且峰形杂乱,故确定记录时间为52 min。

### 参考文献:

- [1] 王凤霞,吉爱国.药用土鳖虫化学成分及药理作用研究进展[J].中国生化药物杂志,2009,30(1):61-63.
- [2] 付英杰,田景振,郭之平.土鳖虫化学成分制取方法及药理作用研究概况[J].食品与药品,2005,7(4A):28-30.
- [3] 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):49-50.
- [4] 刘丽敏,王海敏,虞海霞,等.柱前衍生反相高效液相色谱测定西洋参中游离氨基酸[J].中成药,2009,31(2):275-278.
- [5] 金维维,赵钟兴,刘旭辉,等.蚕蛹蛋白氨基酸含量的高效液相色谱法测定[J].时珍国医国药,2010,21(3):537-539.
- [6] 程显隆,肖新月,邹秦文,等.柱前衍生化HPLC法同时测定阿胶中4种主要氨基酸的含量[J].药物分析杂志,2008,28(12):1997-2000.
- [7] 景晶,曹红.HPLC法测定土鳖虫中尿酸和尿囊素的含量[J].药学实践杂志,2010,28(3):134-136.
- [8] 中药注射剂色谱指纹图谱实验研究的技术要求(试行)[S].2000.
- [9] 丁永胜,牟世芬.氨基酸的分析方法及其应用进展[J].色谱,2004,22(3):210-215.
- [10] 曾念辉.氨基酸的分析方法综述[J].江西化工,2007,3(1):49-51.
- [11] 宋志峰,王丽,纪锋,等.氨基酸分析中的柱前衍生技术[J].吉林农业科学技术,2004,29(6):54-58.
- [12] 何悦,张红飞.含0.1%苯甲酸钠的17种氨基酸对照品水溶液的稳定性考察[J].中国药品标准,2008,9(6):447-450.
- [13] 李惠芬,骆达,张庆伟,等.柱前衍生化RP-HPLC法分析龟板中氨基酸[J].中草药,2005,36(11):1637-1639.

## 心脉隆注射液 HPLC 指纹图谱建立方法的研究

焦春香, 张成桂\*, 刘光明, 李树楠  
(大理学院药学院, 云南 大理 671000)

摘要:目的 研究心脉隆注射液(美洲大蠊)HPLC指纹图谱的测定方法。方法 心脉隆注射液中有效成分利用强碱性阴离子交换树脂纯化,再利用反相高效液相色谱法分析,以尿酸为参照物。色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(4.6 mm × 150 mm 5 μm);柱温30℃;检测波长254 nm;分析时间15 min;体积流量0.8 mL/min。结果 建立了心脉隆注射液指纹图谱,确定了12个共有峰,测定了10批心脉隆注射液,与共有模式间具有良好的相似性。结论 建立的HPLC指纹图谱可以作为心脉隆注射液质量控制的重要依据之一。

关键词:核苷碱基;指纹图谱;心脉隆注射液;美洲大蠊

中图分类号:R286

文献标志码:A

文章编号:1001-1528(2011)10-1648-05

收稿日期:2010-08-09

基金项目:云南省教育厅(06Y287C);云南省重点产业创新工程项目(2008IF012);大理学院博士启动基金(KYBS200912)

作者简介:焦春香(1981—),女,硕士,讲师。研究方向:昆虫药物化学成分研究。Tel:13087419321, E-mail: jiaocx\_123@163.com

\* 通信作者:张成桂,男,博士,讲师。研究方向:昆虫药物化学成分研究。Tel:(0872)6685623, E-mail: chenggui\_zcg@163.com