

# HPCE 法研究土鳖虫镇痛作用与其指纹图谱的关系

陈 昭<sup>1</sup>, 陈伟韬<sup>1</sup>, 罗文汇<sup>1</sup>, 毕晓黎<sup>1,2 \*</sup>

(1. 广东省中医药工程技术研究院, 广东 广州 510095; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405)

**摘要:** **目的** 建立高效毛细管电泳 (HPCE) 法研究土鳖虫 *Eupolyphaga seu Steleophaga* 镇痛作用与其指纹图谱的关系。**方法** 分析采用熔融硅胶毛细管 (75  $\mu\text{m}$ , 30 cm  $\times$  21 cm); 10 mmol/L 硼砂 (pH = 9.7) 为缓冲液; 进样电压 5 kV10 s; 分离电压 15 kV; 检测波长 214 nm。然后, 通过醋酸致小鼠扭体实验来探索各组分对镇痛作用的影响。**结果** 土鳖虫指纹图谱中有 7 个特征峰, 其中有 2 个为尿囊素与氯氮卓。两者的含有量与土鳖虫的镇痛作用成正比关系。**结论** 各批次土鳖虫样品间存在差异, 其镇痛作用可用于质量评价。

**关键词:** 土鳖虫; 镇痛作用; 指纹图谱; 尿囊素; 氯氮卓; HPCE

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2016)05-1074-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.05.023

## Relationship between the analgesia effect and fingerprint of *Eupolyphaga seu Steleophaga* by HPCE

CHEN Zhao<sup>1</sup>, CHEN Wei-tao<sup>1</sup>, LUO Wen-hui<sup>1</sup>, BI Xiao-li<sup>1,2 \*</sup>

(1. Guangdong Provincial Research Institute of Traditional Chinese Medicine Manufacturing Technology, Guangzhou 510095, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To establish a high performance capillary electrophoresis (HPCE) method for investigating the relationship between the analgesia effect and fingerprint of *Eupolyphaga seu Steleophaga*. **METHODS** The analysis was performed on fused silica capillary (75  $\mu\text{m}$ , 30 cm  $\times$  21 cm), buffer was 10 mmol/L borax (pH = 9.7), inject voltage was 5 kV10 s, separation voltage was 15 kV, and detection wavelength was set at 214 nm. Then the influences of various constituents on analgesia effect were studied by frequency body torsion caused by acetic acid in mice. **RESULTS** There were seven characteristic peaks in the fingerprint of *Eupolyphaga seu Steleophaga*, two of which were allantoin and chlordiazepoxide. The contents of these two constituents were proportional to the analgesia effect of *Eupolyphaga seu Steleophaga*. **CONCLUSION** There are differences among various batches of *Eupolyphaga seu Steleophaga* samples, whose analgesia effect can be used for the quality control.

**KEY WORDS:** *Eupolyphaga seu Steleophaga*; analgesia effect; fingerprint; allantoin; chlordiazepoxide; HPCE

土鳖虫又名廩虫、地鳖虫、土元, 为鳖蠊科昆虫地鳖 *Eupolyphaga sinensis* Walker 或冀地鳖 *Stelephaga plancyi* Boleny 的雌虫全体, 前者分布于全国大部分地区, 后者分布于河北、河南、陕西、甘肃、青海及湖南等地, 野生者在夏、秋季捕捉, 人工饲养者随时捕捉, 捕到后用沸水烫死, 晒干或烘

干。土鳖虫为《中国药典》收录的传统中药品种, 味咸, 性寒, 具有破瘀血, 续筋骨的功效, 中医常用于治疗筋骨折伤、瘀血经闭、癥瘕痞块<sup>[1-3]</sup>。近年来, 随着分子生物学、药理学及药物分析学研究的逐步深化, 对于土鳖虫所含活性成分及其药理作用机制等已有部分报道, 见文献[4-7]。

收稿日期: 2015-05-06  
基金项目: 广东省中医局科研课题 (20141027)  
作者简介: 陈 昭 (1985—), 男, 博士, 主管药师, 从事药物活性成分的分析测定研究。Tel: (020) 83482098, E-mail: cz20081331@126.com  
\* 通信作者: 毕晓黎 (1979—), 女, 博士, 主任中药师, 硕士生导师, 从事中药质量评价研究。Tel: (020) 83482098, E-mail: 2335128654@qq.com

土鳖虫为动物药，其所含成分多为蛋白、核酸、生物碱等，其中以蛋白、生物碱、核酸及其衍生物为主<sup>[8]</sup>。然而，限于目前技术条件及新药质量标准研究现状，仍然难以对上述化合物进行逐一鉴别和含有量测定，《中国药典》2010 年版“土鳖虫”项下仅收录了性状、显微鉴别与薄层鉴别。同时，由于土鳖虫中多数成分存在分子量大、极性高或结构相似等特征，HPLC 等传统分析技术仅能检测其中一小部分，不能准确反映该药材与功效相关的质量信息<sup>[9]</sup>。

高效毛细管电泳（HPCE）技术是在高压电场作用下，带点组分随着电场方向迁移的一种分离分析方法<sup>[10-11]</sup>，由于这种分离在狭小空间内进行（25~200 μm 内径，30~70 cm 总长的毛细管），加之缓冲液的液流受电场推动而呈平面型，故具有较高的柱效。此外，待测物在该模式下由于带电量的不同，可导致迁移速率的差异，进而实现分离，而且受分子质量与极性影响相对较小。因此，根据土鳖虫中主要化合物的理化特性与结构特征，采用 HPCE 法建立指纹谱所得的化合物信息更为全面与准确。另外，基于 HPCE 法的土鳖虫药材指纹图谱研究虽已见诸报道<sup>[12]</sup>，但对其中大量化合物信息及其与镇痛疗效之间的关系仍未涉及。

目前，市场上的土鳖虫药材不但功效活性存在差异，而且其药材基原也存在较大区别，而药典及现有的分析方法在药材质量控制、药材基原研究及功效评价上仍存在较大局限性。因此，有必要寻找更为适宜的分析测定方法用于土鳖虫药材指纹图谱的建立，并在此基础上，更为客观地评价不同产区、批次药材的疗效差异，同时探索导致这些差异的物质基础。

### 1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 3DCE 高效毛细管电泳仪，配备 DAD 检测器及 Chemstation 工作站（美国 Agilent 公司）；Thermo TSQ Quantum 液相色谱-质谱联用仪（美国 Thermo Fisher 公司）；XS205DU 电子分析天平、pH 计（瑞士 Mettler-Toledo 公司）；超声仪（昆山科学仪器厂）；毛细管（河北永年瑞洋色谱器件有限公司）。

1.2 试剂和试药 硼砂、磷酸二氢钠（德国 Sigma-Aldrich 公司）。土鳖虫样品分别购自广东省各大医药公司，2 个来源，共 5 批，经广东省中医药工程技术研究院刘法锦研究员鉴定为鳖蠊科昆虫地

鳖 *Eupolyphaga sinensis* Walker、金边土鳖 *Opis-thoplata orientalis* Buron 或冀地鳖 *Stelephaga planicyi* Boleny。

### 2 方法与结果

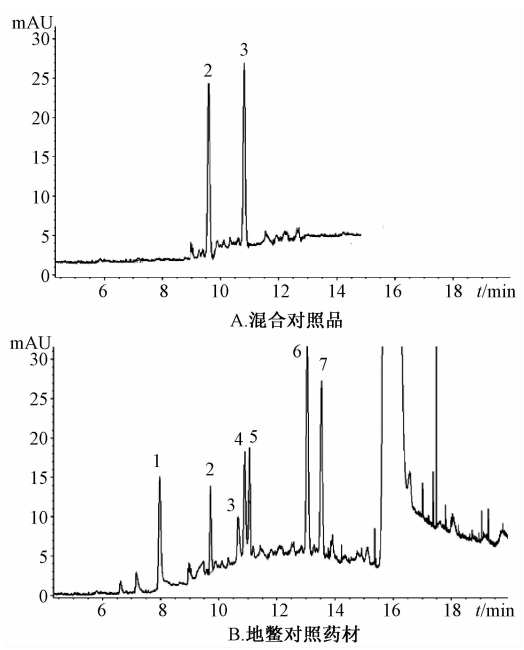
#### 2.1 对照品和供试品溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取土鳖虫 0.2 g，置于 100 mL 锥形瓶中，加入 20% 乙醇 50 mL，超声 30 min，过滤，取滤液 25 mL，即得。

2.1.2 供试品溶液 精密称取土鳖虫 2.0 g，按“2.1.1”项下方法处理，即得。

2.2 毛细管电泳分析条件 熔融硅胶毛细管色谱柱（75 μm，30 cm×21 cm）；缓冲液 10 mmol/L 硼砂（以磷酸二氢钠调节 pH 至 9.7）；检测波长 327 nm；进样电压 5 kV10 s；分离电压 15 kV；柱温 25 ℃。

2.3 HPCE 指纹图谱测定 取 6 批药材，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项条件下进行测定，选取其中响应值较大、共同存在的色谱峰作为监控指标峰，用于建立指纹图谱，见图 1 和表 1。与地鳖和冀地鳖进行比对后，确定其中 7 个成分作为质量标准的候选指标。



2. 尿囊素 3. 氯氮卓 1、4~7 未知  
2. allantoin 3. chlordiazepoxide 1, 4~7 unknown

图 1 土鳖虫 HPCE 图谱

Fig. 1 HPCE chromatograms of *Eupolyphaga* seu *Steleophaga*

2.4 活性成分鉴别 根据文献调研结果可知，在最优 HPCE 条件下，土鳖虫指纹图谱中的 7 个特

表 1 不同来源土鳖虫中指标成分峰面积

Tab. 1 Peak areas of index constituents in *Eupolyphaga* seu *Steleophaga* from different sources

| 来源               | 峰面积     |        |        |        |         |         |         |
|------------------|---------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
|                  | 1       | 2      | 3      | 4      | 5       | 6       | 7       |
| $t_R/\text{min}$ | 7.9     | 9.7    | 10.6   | 10.9   | 11.0    | 12.8    | 13.2    |
| 地鳖对照             | 77.245  | 40.411 | 28.426 | 54.234 | 49.457  | 139.342 | 109.864 |
| 冀地鳖对照            | 72.709  | 22.616 | 26.476 | 61.512 | 20.838  | 51.298  | 81.110  |
| 金边土鳖(省药材 1)      | —       | 83.605 | 48.639 | 61.575 | 47.961  | 147.615 | 53.271  |
| 金边土鳖(省药材 2)      | 47.654  | 43.709 | 45.132 | 46.026 | 36.576  | 113.827 | 50.502  |
| 金边土鳖(省药材 3)      | 102.266 | 42.571 | 38.613 | 45.971 | 53.994  | 120.098 | 115.828 |
| 地鳖中芝园            | 117.538 | 49.166 | 26.213 | 89.979 | 122.214 | 42.156  | 24.919  |
| 中华土鳖             | 106.134 | 38.557 | 28.679 | 131.27 | 89.721  | 175.074 | 65.366  |

征峰与对照品和保留时间比对，确认峰 2 为尿囊素。另外田君鹏<sup>[13]</sup>报道，土鳖虫中含有生物碱类成分氯氮卓，经与对照品比对后，确认峰 3 为氯氮卓。

为进一步对各特征峰进行鉴定，本实验将药材提取液进行 LC-MS 分析。正、负离子模式下全扫描；电压 3 000 V（负离子模式下 -2 500 V）；汽化温度 300 ℃；毛细管温度 300 ℃；鞘气压力 207 kPa；辅气压力 69 kPa。正离子模式下，以 0.1% 甲酸-乙腈（30：70）为流动相；负离子模式下，以 10 mmol/L 乙酸胺-乙腈（30：70）为流动相，观察 60 min 内出峰情况，然后与文献进行比对。结果，仅正离子模式下  $m/z=299$  的峰可与文献 [11] 报道的化合物信息一致，而其他化合物因未有对照品而无法用 HPCE 进行确认。由于目前仅能获得峰 2 与峰 3 的对照品，故本实验选取两者作为土鳖虫药材的指标性成分。

2.5 土鳖虫指标性成分含有量测定

2.5.1 标准曲线和线性关系 精密称取尿囊素与氯氮卓对照品各 10.0 mg，置于 10 mL 量瓶中，甲醇定容，即得含两者质量浓度均为 1.0 mg/mL 的对照品溶液。精密量取适量，置于 10 mL 量瓶中，逐级稀释，得质量浓度为 5、10、20、50、100、200 μg/mL 的对照品溶液，在“2.2”项条件下进行测定，记录峰面积，以峰面积为纵坐标（ $y$ ），质量浓度为（ $x$ ），计算尿囊素标准曲线为  $y=2.045\ 6x+2.359\ 5$ （ $r=0.999\ 6$ ），氯氮卓为  $y=2.309\ 3x+6.666\ 3$ （ $r=0.999\ 4$ ）。结果显示，该方法线性关系良好，可在 5~200 μg/mL 范围内对两者进行准确定量。

2.5.2 精密度与回收率

2.5.2.1 精密度的测定 精密吸取“2.5.1”项下 50 μg/mL 的混合对照品溶液 1 μL，在“2.2”项条件下进行测定，记录峰面积，连续测定 6 次。结

果，2 个指标性成分的峰面积 RSD 分别为 1.3% 和 1.7%，表明仪器精密度良好。

2.5.2.2 回收率的测定 精密称取含有量已知的土鳖虫药材 0.2 g，共 9 份，分为低、中、高 3 个质量浓度组，每组 3 份。加入一定量 1 mg/mL 的混合对照品溶液（低、中、高质量浓度分别取 800、1 000、1 200 μL），按“2.1”项下方法进行处理，尿囊素和氯氮卓质量浓度均为 36~44 μg/mL（以该批药材制成供试品后，尿囊素质量浓度约为 20 μg/mL，氯氮卓质量浓度约为 19 μg/mL 计）的溶液，在“2.2”项条件下进行测定，平行 3 次，计算回收率，结果见表 2。由表可知，该方法回收率良好，能够对土鳖虫药材进行准确定量。

表 2 回收率与精密度测定结果（ $n=3$ ）

Tab. 2 Determination results of recoveries and precisions（ $n=3$ ）

| 成分  | 称样量/  | 原有量/  | 加入量/  | 测得量/  | 回收率/  | RSD/ |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|------|
|     | mg    | mg    | mg    | mg    | %     | %    |
| 尿囊素 | 202.5 | 1.007 | 0.800 | 1.836 | 103.6 | 3.5  |
|     | 201.3 | 1.000 | 1.000 | 2.034 | 103.4 | 3.7  |
|     | 201.8 | 0.998 | 1.200 | 2.208 | 100.8 | 4.3  |
| 氯氮卓 | 203.7 | 1.002 | 0.800 | 1.811 | 101.1 | 3.2  |
|     | 200.6 | 1.000 | 1.000 | 1.966 | 96.57 | 4.2  |
|     | 202.1 | 0.992 | 1.200 | 2.241 | 104.1 | 3.9  |

2.5.3 不同来源土鳖虫药材含有量测定 精密称取不同来源的土鳖虫药材 0.2 g，按“2.1”项下方法进行处理，在“2.2”项条件下进行测定，平行 3 次，记录峰面积，并计算含有量，结果见表 3。

2.6 药理实验 采用醋酸致小鼠扭体实验，分为对照组、化药（对乙酰氨基酚）组和土鳖虫药材组，其中土鳖虫药材组又根据药材不同批次分为 5 组，每组 5 只，通过观察扭体次数来评价镇痛效果，结果见图 2。由图可知，金边土鳖虫组的镇痛

作用最为显著,其中组分2与3的峰面积对其有显著影响( $P<0.05$ )。

表3 含有量测定结果 ( $n=3$ )

Tab. 3 Results of content determination ( $n=3$ )

| 样品         | 称样量/    | 水分/  | 质量浓度/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) |        | 含有量/% |      |
|------------|---------|------|-------------------------------------------|--------|-------|------|
|            | g       | %    | 尿囊素                                       | 氯氮卓    | 尿囊素   | 氯氮卓  |
| 地鳖对照       | 0.209 3 | 7.58 | 18.602                                    | 9.423  | 0.48  | 0.24 |
| 冀地鳖对照      | 0.204 5 | 9.63 | 9.902                                     | 8.578  | 0.27  | 0.23 |
| 金边土鳖(省药材1) | 0.201 8 | 8.81 | 39.717                                    | 18.176 | 1.08  | 0.49 |
| 金边土鳖(省药材2) | 0.207 4 | 7.55 | 20.214                                    | 16.657 | 0.53  | 0.43 |
| 金边土鳖(省药材3) | 0.205 5 | 9.10 | 19.658                                    | 13.834 | 0.53  | 0.37 |
| 地鳖中芝园      | 0.203 6 | 8.59 | 22.882                                    | 8.464  | 0.61  | 0.23 |
| 中华土鳖       | 0.202 2 | 7.32 | 17.695                                    | 9.532  | 0.47  | 0.25 |

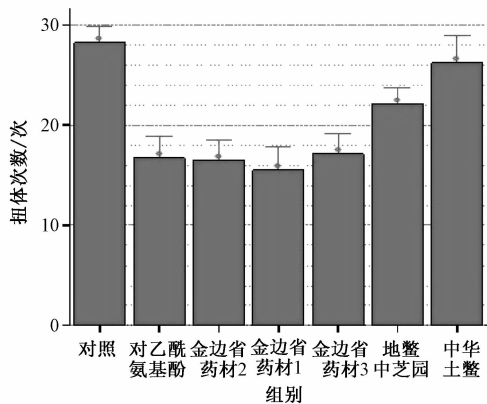


图2 药理实验结果

Fig. 2 Results of pharmacological experiments

### 3 讨论与结论

3.1 提取方法优化 由于土鳖虫药材中成分较多,而且结构、理化性质差异较大,故本实验考察了不同提取溶剂、比例及超声时间下7个共有峰的总面积,同时规定,各条件下所得峰面积不得低于该峰平均数的20%,确定最优提取条件。结果,采用20%乙醇,超声提取30 min时提取效率最高。根据电泳条件可知,指纹图谱中的共有峰很可能为生物碱类化合物,由于在该溶剂比例下,药材中所含的化合物更易于溶出,故最终采用这一提取条件。

3.2 谱效关系初步研究 将药理实验结果与HPCE指纹图谱中各特征峰的峰面积进行综合比对,可知土鳖虫镇痛作用与尿囊素和氯氮卓(峰2和峰3)的含有量成正比关系,可能是因为两者具有镇痛、促进皮肤溃疡面和伤口愈合以及生肌等生物活性。因此,在制定土鳖虫质量标准时,可考虑

以尿囊素及氯氮卓为活性成分,并通过测定其含有量来评估药材质量的优劣。

3.3 结论 本实验采用HPCE法,结合药效学试验,对土鳖虫镇痛作用的机理与物质基础进行了初步探索,同时根据文献调研及实验结果,确定尿囊素和氯氮卓这2个化合物作为指标性成分。该方法快速、准确、高效,并且以疗效为导向,可作为药材标准的参考与补充,同时也为动物药的研究及质量控制提供了借鉴。但是,由于该类药物存在成分复杂、结构与理化性质特异、功效多样等特点,故仍需要在后续研究中对所得特征峰作进一步确认。

#### 参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 18.

[2] 刘丹, 李兴暖, 秦仲君, 等. 土鳖虫多肽的制备及免疫调节作用研究[J]. 中药材, 2012, 35(9): 1382-1385.

[3] 贺卫和, 成细华, 徐爱良. 土鳖虫提取液对家兔抗凝血作用的实验研究[J]. 湖南中医学院学报, 2003, 23(2): 7-9.

[4] 曹艳玲, 李文兰, 伍水龙, 等. 土鳖虫胰酶酶解物抗凝活性部位分离纯化及组成分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3): 52-55.

[5] 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): 48-50.

[6] 张微, 邹玺, 钱晓萍, 等. 土鳖虫含药血清对肝癌HepG-2细胞增殖的抑制作用[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(4): 257-259.

[7] 黄镇林, 何亮颖, 王宏涛, 等. 土鳖虫活性组分F2-2体内抗凝药效实验[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2014, 16(6): 1359-1363.

[8] 龙子江, 盛炎炎, 董宏超. 土鳖虫总生物碱对家兔心泵功能的影响[J]. 安徽中医学院学报, 1989, 8(3): 84-86.

[9] 景晶, 曹红. HPLC法测定土鳖虫中尿嘧啶和尿囊素的含量[J]. 药实践杂志, 2010, 28(2): 134-136.

[10] Kapnissi-Christodoulou C P, Zhu X, Warner I M. Analytical separations in open-tubular capillary electrochromatography[J]. Electrophoresis, 2003, 24(22-23): 3917-3934.

[11] Eeltink S, Rozing G P, Kok W T. Recent applications in capillary electrochromatography[J]. Electrophoresis, 2003, 24(22-23): 3935-3961.

[12] 李峰, 王成芳, 包永睿. 土鳖虫药材高效毛细管电泳指纹图谱鉴别研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(11): 1471-1473.

[13] 田君鹏. 地鳖虫生物碱的提取分离、结构鉴定及急性毒理研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.