

## 金钱白花蛇商品药材的高效毛细管电泳指纹图谱研究

许靖<sup>1</sup>, 王成芳<sup>2</sup>, 杜树山<sup>2</sup>, 孟繁蕴<sup>2</sup>, 李峰<sup>1\*</sup>

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 北京师范大学中药资源保护与利用北京市重点实验室, 北京 100875)

**摘要:** 目的 建立10批金钱白花蛇药材的毛细管电泳指纹图谱。方法 超纯水超声提取,以50 mmol/L 硼砂-200 mmol/L 硼酸 (pH8.64) 作为背景电解质缓冲液,分析在 Beckman P/ACE System MDQ 高效毛细管电泳仪上进行,柱温 25 °C,分离电压 20 kV,检测波长 245 nm,20 min 完全分离。结果 建立的指纹图谱有9个共有峰,且方法学考察达到标准。结论 金钱白花蛇 HPCE 指纹图谱与蕲蛇和乌梢蛇有明显差别。

**关键词:** 金钱白花蛇; 毛细管电泳; 指纹图谱

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2014)03-0563-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2014.03.025

### HPCE fingerprint of *Bungarus Parvus*

XU Jing<sup>1</sup>, WANG Cheng-fang<sup>2</sup>, DU Shu-shan<sup>2</sup>, MENG Fan-yun<sup>2</sup>, LI Feng<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China; 2. Protection and Utilization of Traditional Chinese Medicine of Beijing Area Major Laboratory, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To establish a high-performance capillary electrophoresis (HPCE) method for fingerprint of *Bungarus Parvus* collected from ten different sources. **METHODS** 50 mmol/L borax-200 mmol/L boric acid buffer solution (pH8.64) was used for electrolyte buffer and the analysis was performed on Beckman P/ACE System MDQ at column temperature of 25 °C, isolating voltage 20 kV, and the detection wavelength of 245 nm. **RESULTS** Nine fingerprint peaks were obtained, and the validation of the method met the requirements for SFDA's technical regulations. **CONCLUSION** The high-performance capillary electrophoresis fingerprint shows that the electrophoretogram of *Bungarus Parvus* has a distinct difference from that of *Agkistrodon* and *Wushaoshe*.

**KEY WORDS:** *Bungarus Parvus*; HPCE; fingerprint

金钱白花蛇 *Bungarus Parvus* 为眼镜蛇科动物银环蛇 *Bungarus multicinctus* Blyth 的幼蛇干燥体。具有祛风、通络、止痉的功效,临床上常用于治疗风湿顽痹、麻木拘挛、中风口眼喎斜、半身不遂、抽搐痉挛、破伤风、麻风、疥癣<sup>[1]</sup>。本课题组已经对金钱白花蛇核苷、蛋白质、多胺等类成分的分析,也有报道利用分子生物学技术,对金钱白花蛇进行鉴别<sup>[2-4]</sup>,但关于毛细管电泳指纹图谱的研究未见报道。本实验采用高效毛细管电泳法对11批金钱白花蛇商品药材进行了指纹图谱研究及方法学

考察,以期对金钱白花蛇商品药材的品种鉴定提供实验依据。

#### 1 仪器与试剂

1.1 仪器 Beckman P/ACE System MDQ 高效毛细管电泳仪(美国贝克曼库尔特公司); DAD 检测器; 32Karat 色谱工作站。未涂层石英毛细管柱(50 μm × 65 cm, 郑州应诺高科有限公司); AG204 电子分析天平(METTLER TOLEDO 公司); KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); LG16 型高速离心机(北京雷勃尔公司); Sevenmulti

收稿日期: 2013-05-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973881); 高等学校博士学科点专项科研项目(博导类)(20122133110002)

作者简介: 许靖(1988—),女(满族),硕士生,研究方向: 中药材品质评价。Tel: (0411) 87586318, E-mail: xujing020513@163.com

\* 通信作者: 李峰,博士生导师。Tel: (0411) 87586318, E-mail: zhanglijiaiyi@163.com

pH计 (METTLER TOLEDO 公司)。

1.2 试剂 尿苷 (中国药品生物制品检定所, 批号 887-200001); 所用试剂均为市售分析纯, 水为

超纯水; 所用试剂均通过 0.22 μm 微孔滤膜滤过。

1.3 实验材料 金钱白花蛇商品药材为购于不同地区的商品药材, 经李峰教授鉴定, 详见表 1。

表 1 金钱白花蛇药材商品来源及采购地区

Tab. 1 Samples of *Bungarus Parvus*

编号	来源	采购地区
1 <sup>#</sup>	金钱白花蛇 <i>Bungarus multicinctus</i> 近成蛇干燥体	樟树药材市场
2 <sup>#</sup>	金钱白花蛇 <i>Bungarus multicinctus</i> 幼蛇干燥体	深圳一致药店
3 <sup>#</sup>	金钱白花蛇 <i>Bungarus multicinctus</i> 幼蛇干燥体	亳州药材市场
4 <sup>#</sup>	金钱白花蛇 <i>Bungarus multicinctus</i> 幼蛇干燥体	成都市零售药店
5 <sup>#</sup>	金钱白花蛇 <i>Bungarus multicinctus</i> 幼蛇干燥体	大连药材公司
6 <sup>#</sup>	金钱白花蛇 <i>Bungarus multicinctus</i> 幼蛇干燥体	安国药材市场
7 <sup>#</sup>	金钱白花蛇 <i>Bungarus multicinctus</i> 幼蛇干燥体	上海市零售药店
8 <sup>#</sup>	金钱白花蛇 <i>Bungarus multicinctus</i> 幼蛇干燥体	太原市零售药店
9 <sup>#</sup>	金钱白花蛇 <i>Bungarus multicinctus</i> 幼蛇干燥体	樟树药材市场
10 <sup>#</sup>	金钱白花蛇 <i>Bungarus multicinctus</i> 幼蛇干燥体	杭州市零售药店
11 <sup>#</sup>	金钱白花蛇 <i>Bungarus multicinctus</i> 成蛇干燥体	长春市零售药店

## 2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备<sup>[5]</sup> 取尿苷对照品适量, 精密称定, 加水制成每 1 mL 含 0.05 mg 的溶液, 即得。

2.2 供试品溶液的制备<sup>[6]</sup> 取 50 °C 恒温干燥的各金钱白花蛇样品粉末 (过 100 目筛) 约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入超纯水 10 mL, 密塞, 超声处理 30 min, 离心 10 min (3000 r/min), 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 电泳条件 毛细管柱 (55 cm × 50 μm), 分离电压 20 kV, 柱温 25 °C, 背景电解质为 50 mmol/L 硼砂 - 0.2 mol/L 硼酸 (pH 8.6), 检测波长 245 nm, 以 30 mbar × 5s 压力进样。新毛细管柱以 1 mol/L NaOH 冲洗 30 min 活化, 每次进样前, 分别用 1 mol/L NaOH、水、缓冲液运行冲洗 5 min<sup>[7]</sup>。

### 2.4 方法学考察

2.4.1 精密密度试验 将 9<sup>#</sup> 供试品溶液连续进样 5 次, 测得指纹图谱, 各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 分别小于 0.65% 和 4.96%, 表明仪器精密密度良好。

2.4.2 稳定性试验 新制备的 9<sup>#</sup> 供试品溶液放置 0、2、4、8、12 h 时进样分析, 结果样品在 12 h 内共有电泳峰的相对保留时间 RSD ≤ 0.53%, 相对峰面积的 RSD ≤ 4.89%, 表明供试品在测定的 12 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 取 9<sup>#</sup> 金钱白花蛇样品 5 份, 564

按“2.2”项方法平行制备供试液, 按“2.3”项电泳条件进行进样分析, 记录电泳图, 计算其共有指纹峰的相对保留时间 RSD 均 ≤ 0.63%, 共有指纹峰相对峰面积的 RSD 均 ≤ 4.83%, 说明此方法测定的重复性良好。

### 2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 参照物峰的选择 取尿苷对照品溶液及 8<sup>#</sup> 样品供试品溶液, 按上述电泳条件进样测定, 对照品及 8<sup>#</sup> 样品的 HPCE 谱图见图 1、2, 其峰位及峰面积分别见表 2、3。对比迁移时间确定 S 峰为尿苷, 在供试液中加入对照品溶液, 进样分析, 电泳峰增益结果进一步证实了结论正确, 故选定 S 为参照物峰<sup>[8]</sup>, 以此标定各样品共有峰的相对保留时间及相对峰面积。

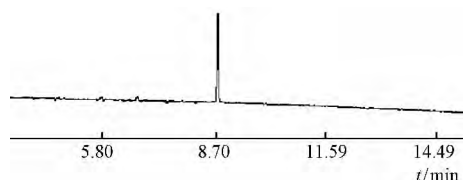


图 1 尿苷 HPCE 图

Fig. 1 HPCE fingerprint of uridine

2.5.2 指纹图谱的建立 取“2.2”项下方法制备的各供试品溶液, 按筛选好的电泳条件进行测试, 测得各供试品的 HPCE 谱图。除 11<sup>#</sup> 样品的 HPCE 色谱图外 (见图 3), 各样品的 HPCE 色谱指纹图谱具有相似性。将 1<sup>#</sup> ~ 10<sup>#</sup> 测试结果导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系

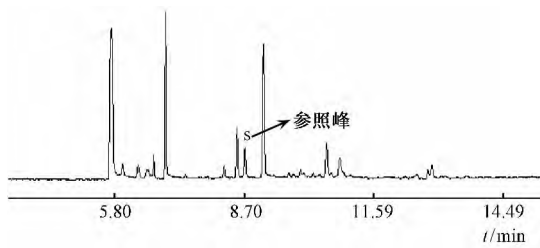


图2 8#样品 HPCE 图

Fig. 2 HPCE fingerprints of 8#

统 A 版”软件，选择多点校正，色谱峰自动匹配，同时生成对照图谱 R（图 4），选取 9 个共有峰，作为构建的指纹图谱特征峰，得到金钱白花蛇药材 HPCE 色谱指纹图谱共有模式（图 5）。金钱白花蛇供试样品的相对保留时间和相对峰面积构成了其指纹特征<sup>[9]</sup>，结果见表 2、3。

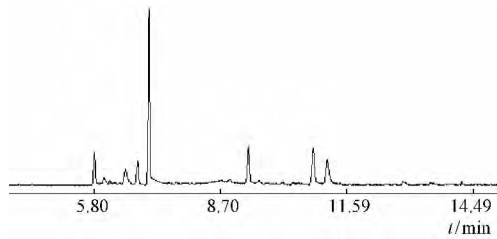


图3 11#样品的 HPCE 图

Fig. 3 HPCE fingerprints of 11#

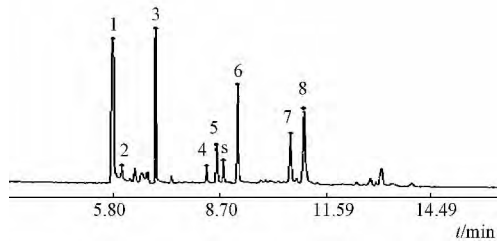


图4 金钱白花蛇药材 HPCE 对照指纹图谱 R

Fig. 4 HPCE reference fingerprints of *Bungarus Parvus*

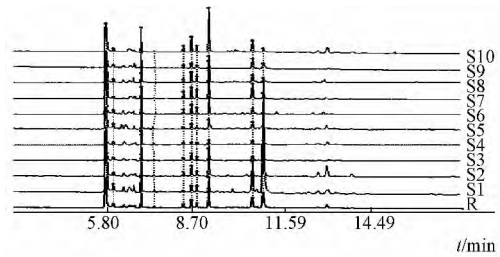


图5 金钱白花蛇药材 HPCE 指纹图谱共有模式

Fig. 5 Mutual mode HPCE fingerprints of *Bungarus Parvus*

2.6 指纹图谱的分析与评价 将测得的 1# ~ 10# 样品指纹图谱结果及生成的对照图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 B 版”软件，以对照图谱 R 为基准，1# ~ 10# 金钱白花蛇药材商品的相似度结果见表 4。

### 3 小结与讨论

3.1 由表 4 结果可见，1# ~ 10# 金钱白花蛇药材商品的 HPCE 图谱相对于对照图谱 R 的相似度，除 1# 样品 (0.635) 外均大于 0.9。按照《中药材指纹图谱的技术要求》，大于 0.9 的样品即认为是同一品种<sup>[10]</sup>，故 2# ~ 10# 金钱白花蛇药材样品品种一致。

3.2 关于相似度小于 0.9 的 1# 样品，该批药材除个体较大不符合《中国药典》的规定外，品种上与其他样品并无差异；其指纹图谱共有峰的相对保留时间也与其他样品并无异，仅 8 号峰的相对峰面积明显高于其他样品。由图谱上也可看出峰面积较其他样品大，表明金钱白花蛇商品药材其水溶性成分含有量存在差异。故采用高效毛细管电泳法，不仅可以对金钱白花蛇商品药材进行品种鉴别，同时也可以作为其质量控制的方法。

表 2 金钱白花蛇 HPCE 指纹图谱共有峰的相对保留时间

Tab. 2 Relative retention time of common peaks of HPCE fingerprints of *Bungarus Parvus*

样品编号	共有峰编号								
	1	2	3	4	5	S	6	7	8
1#	0.653	0.679	0.840	0.946	0.978	1.000	1.046	1.212	1.254
2#	0.656	0.685	0.786	0.949	0.979	1.000	1.044	1.208	1.254
3#	0.656	0.685	0.785	0.949	0.979	1.000	1.043	1.208	1.256
4#	0.655	0.683	0.785	0.949	0.979	1.000	1.043	1.208	1.256
5#	0.657	0.685	0.787	0.951	0.980	1.000	1.043	1.207	1.256
6#	0.658	0.687	0.798	0.946	0.979	1.000	1.048	1.209	1.293
7#	0.655	0.685	0.787	0.948	0.979	1.000	1.044	1.208	1.252
8#	0.656	0.686	0.796	0.946	0.979	1.000	1.047	1.210	1.243
9#	0.654	0.683	0.788	0.947	0.979	1.000	1.046	1.212	1.252
10#	0.654	0.682	0.789	0.947	0.979	1.000	1.045	1.210	1.251
RSD%	0.223	0.323	1.991	0.156	0.039	0.000	0.149	0.133	0.994

表3 金钱白花蛇 HPCE 指纹图谱共有峰的相对峰面积

Tab. 3 Relative peak areas of common peaks of HPCE fingerprints of *Bungarus Parvus*

样品编号	共有峰编号								
	1	2	3	4	5	S	6	7	8
1 <sup>#</sup>	18.819	2.247	7.846	0.176	1.085	1.000	2.740	0.790	31.804
2 <sup>#</sup>	9.917	0.814	3.340	0.965	2.222	1.000	6.439	1.460	3.851
3 <sup>#</sup>	9.954	0.800	5.057	0.666	1.958	1.000	5.218	1.637	0.353
4 <sup>#</sup>	27.350	1.769	17.633	1.126	1.204	1.000	3.830	3.857	5.429
5 <sup>#</sup>	52.056	10.644	35.237	2.503	6.119	1.000	11.966	11.723	6.209
6 <sup>#</sup>	13.843	0.424	4.071	0.783	1.352	1.000	2.681	0.981	0.469
7 <sup>#</sup>	6.981	0.278	2.156	0.804	1.256	1.000	3.401	2.322	0.999
8 <sup>#</sup>	8.948	0.594	4.236	0.410	1.656	1.000	4.898	1.428	1.028
9 <sup>#</sup>	11.634	1.260	4.385	0.865	1.889	1.000	3.052	5.114	3.861
10 <sup>#</sup>	7.785	0.542	2.653	0.941	2.249	1.000	7.118	2.384	0.933

表4 金钱白花蛇商品药材 HPCE 指纹图谱与共有模式的相似度

Tab. 4 Similarity judgment validation of HPCE fingerprints from different samples

样品编号	1 <sup>#</sup>	2 <sup>#</sup>	3 <sup>#</sup>	4 <sup>#</sup>	5 <sup>#</sup>	6 <sup>#</sup>	7 <sup>#</sup>	8 <sup>#</sup>	9 <sup>#</sup>	10 <sup>#</sup>
相似度	0.635	0.932	0.989	0.945	0.944	0.979	0.981	0.994	0.955	0.931

3.3 由图3可见,金钱白花蛇成蛇(11<sup>#</sup>号样品)的HPCE色谱图中,3号峰明显高于其他峰,而4、5、S号峰无响应值,表明金钱白花蛇其成蛇和幼蛇的水溶性成分差异明显。故采用高效毛细管电泳法,不仅可以对金钱白花蛇药材商品进行品种鉴别,同时对不同生长期的金钱白花蛇进行鉴别。

3.4 本课题组已建立了蕲蛇、乌梢蛇商品药材的HPCE指纹图谱<sup>[7,11]</sup>。比较金钱白花蛇与蕲蛇、乌梢蛇商品药材的HPCE指纹图谱(仅缓冲溶液的摩尔浓度稍有差异,这仅影响电泳图谱的分离度,而对峰的数量影响较小),三种不同来源的蛇类其指纹峰有明显的差异,说明毛细管电泳指纹图谱对其品种的鉴别是有一定意义的。

3.5 参照物峰的选择,已报道金钱白花蛇药材含有尿苷<sup>[2]</sup>,且尿苷是构成动物细胞核酸的主要成分,并具有多种生物活性<sup>[12-13]</sup>。因此,本实验选择尿苷作为金钱白花蛇HPCE指纹图谱的参照物。

3.6 电泳条件的选择

3.6.1 本实验比较了硼酸盐和磷酸盐两种缓冲体系对电泳的影响<sup>[14-15]</sup>,结果硼酸盐缓冲体系的电泳图谱基线平稳,重复性较好;同时,又分别比较了浓度为20、30、50、70 mmol/L的硼砂缓冲溶液的电泳结果,发现适当的提高缓冲溶液的浓度有利于分离,但因浓度过高产生的焦耳热多,影响其分离效率,故选用浓度50 mmol/L缓冲溶液为宜。

3.6.2 本实验还分别考察了电压在15~25 kV时,对分离效果的影响,结果发现随着分离电压的增加,虽迁移时间相应缩短,但由于电流增加,焦耳热增多,基线噪音变大<sup>[16]</sup>。故综合考虑选择电压为20 kV。

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  
566

[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 204.

[2] 王义权, 周开亚, 徐珞珊, 等. 金钱白花蛇及其伪品的Cyt b基因片段序列分析和PCR鉴别研究[J]. 药学报, 1998, 33(12): 941-947

[3] 冯成强, 唐晓晶, 黄璐琦, 等. 金钱白花蛇及其混淆品高特异性PCR的鉴别[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(13): 1050-1053.

[4] 赵静雪, 崔光红, 辛敏通, 等. 金钱白花蛇快速PCR鉴别方法的建立[J]. 药学报, 2010, 45(10): 1327-1332

[5] 阮婧华, 孙毓庆. 毛细管区带电泳法同时测定冬虫夏草中多种核苷及其碱基成分含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19(2): 112-114.

[6] 王成芳, 包永睿, 李峰, 等. 蕲蛇药材高效毛细管电泳指纹图谱的研究[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(5): 893-894.

[7] 李峰, 王成芳, 包永睿. 地龙商品药材高效毛细管电泳特征图谱[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(23): 1916-1919.

[8] 孙国祥, 慕善学, 侯志飞, 等. 大青叶的毛细管电泳指纹图谱研究[J]. 分析化学, 2005, 33(6): 853-856.

[9] 张军, 穆莉, 刘朝良, 等. 白僵蚕高效毛细管电泳指纹图谱研究[J]. 中国农学通报, 2007, 23(7): 91-94.

[10] 王成芳, 包永睿, 李峰, 等. 蛤蚧药材高效毛细管电泳指纹图谱研究[J]. 中药材, 2010, 33(3): 337-339.

[11] 王成芳. 动物药材商品高效毛细管电泳指纹图谱的研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2010.

[12] 张雪梅, 杨丰庆, 夏之宁. 食品中核苷类成分的药理作用研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(9): 277-282.

[13] 吴耀文, 蒋宇扬, 付华, 等. 抗癌核苷类似物[J]. 有机化学, 2003, 23(10): 1091-1098.

[14] 曾艳萍, 刘训红, 李俊松. 沙苑子的HPCE指纹图谱鉴别[J]. 现代中药研究与实践, 2007, 21(4): 18-20.

[15] 吴浩, 顾晓风, 辛妮, 等. 续断高效毛细管电泳指纹图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(7): 1259-1263.

[16] 杨秀伟, 赵陆华, 季一兵, 等. 中药毛细管电泳分析技术与应用[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2009.