



# 广西菲牛蛭药材的高效毛细管电泳指纹图谱研究

姜新刚, 孟作环, 贾继明\*

(石家庄以岭药业股份有限公司, 河北 石家庄 050035)

**[摘要]** 目的:采用高效毛细管电泳法建立广西菲牛蛭药材的指纹图谱。方法:石英毛细管柱(75  $\mu\text{m} \times 56 \text{ cm}$ )作为分离通道,以 25  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4$ -120  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Tris}$ -16  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{SDS}$ (1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaOH}$  调 pH 12.0)为缓冲液,运行电压 17 kV,柱温 25  $^\circ\text{C}$ ,检测波长 254 nm,进样参数 3.4 kPa  $\times$  6 s,运行时间 27 min。结果:建立了广西菲牛蛭药材的高效毛细管电泳指纹图谱,确定了共有峰为 13 个,10 批药材指纹图谱与对照指纹图谱相似度均大于 0.98。结论:该方法具有良好的精密性、稳定性和重复性,为有效控制该药材质量提供了新方法。

**[关键词]** 高效毛细管电泳;指纹图谱;菲牛蛭

菲牛蛭 *Poecilobdella manillensis* 别名马尼拟医蛭,俗称金边蚂蝗,隶属于无吻蛭目、医蛭科、牛蛭属,主要分布于广西、广东、海南和福建等省区<sup>[1]</sup>,野生资源丰富并且可以进行人工养殖<sup>[2]</sup>,其具有显著的抗凝血、抗血栓、溶栓、抗血小板聚集活性<sup>[3-5]</sup>,主要化学成分为脂肪酸、氨基酸和蛋白质<sup>[6-7]</sup>,其中以报道的活性成分为菲牛蛭素 A 和菲牛蛭素 B<sup>[7]</sup>、水蛭素 P6、水蛭素 P18<sup>[8]</sup>,迄今为止作者未见任何关于指纹图谱的报道,高效毛细管电泳技术广泛应用于脂肪酸、氨基酸和蛋白质的分离、分析、鉴定,所以本实验采用高效毛细管电泳法对菲牛蛭药材进行了指纹图谱研究,并同时对其抗凝血酶活性进行了测定。

## 1 仪器与试剂

Beckman Coulter P/ACE™ MDQ 毛细管电泳仪(美国 BECKMAN COULTER 公司),配有 PDA 检测器与控温系统,仪器控制与数据采集通过 Beckman 32 Karat 5.0 工作站进行;未涂层石英毛细管(75  $\mu\text{m} \times 56 \text{ cm}$ ,河北永年锐沣色谱器件有限公司);PH 计(PHS-3C,上海精密科学仪器有限公司);KQ5200B 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);分析天平(AG135, METTLER TO-LEDO);LXJ-

II B 低速大容量多管离心机(上海安亭科学仪器厂);定时可调速漩涡混合器(XW-01,上海医大仪器厂);恒温水浴锅(DK-S26,上海精宏实验设备有限公司)。

磷酸氢二钠(分析纯,批号 1200645,天津市科密欧化学试剂有限公司);三羟甲基氨基甲烷(Tris,纯度  $\geq 99.9\%$ ,批号 1004053,河北博海生物工程开发公司);十二烷基硫酸钠(SDS,分析纯,批号 1003032,河北博海生物工程开发公司);氢氧化钠(分析纯,批号 20100621,北京化工厂);盐酸(分析纯,批号 20100128,北京化工厂);甲醇(色谱级, Fisher);实验用水为超纯水。

菲牛蛭药材由南宁市科康生物科技有限责任公司提供,共 10 批(批号 100501, 100502, 100511, 100602, 100611, 100615, 100709, 100710, 100724, 100805),经黑龙江中医药大学王喜军教授鉴定为 *P. manillensis*;牛血纤维蛋白原(批号 140625-201009)、凝血酶(批号 140626-201009)均为供凝血酶效价测定用,购于中国药品生物制品检定所。

## 2 方法与结果

### 2.1 供试品溶液制备

菲牛蛭药材干品粉碎过 4 号筛,每批药材称取样品 1.0 g,精密称定,精密加入去离子水 6 mL,混匀后超声 30 min,离心,取上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜,滤液作为抗凝血酶活性测定及高效毛细管电泳的供试品溶液备用。

### 2.2 抗凝血酶活性测定<sup>[9]</sup>

精密量取 2.1 项下制备的供试品溶液 100  $\mu\text{L}$ ,

**[稿件编号]** 20110527001

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX0901-020)

**[通信作者]** \* 贾继明, Tel: (0311)85901304, E-mail: jjm\_0451@163.com

**[作者简介]** 姜新刚, 生药学硕士, 工程师, Tel: 13832182543, E-mail: jxglyh@126.com



置 5 mL 试管中,参照《中国药典》2010 年版一部水蛭项下含量测定方法,测定抗凝血酶活性,10 批药材抗凝血酶活性测定结果见表 1。

表 1 10 批菲牛蛭药材抗凝血酶活性

Table 1 The antithrombase activity of 10 batches *Poecilobdella manillensis*

批号	抗凝血酶活性/ $U \cdot g^{-1}$
100501(S1)	100
100502(S2)	110
100511(S3)	98
100602(S4)	105
100611(S5)	107
100615(S6)	99
100709(S7)	111
100710(S8)	107
100724(S9)	106
100805(S10)	110

### 2.3 毛细管电泳条件

开机运行前,毛细管依次用甲醇(137.9 kPa, 2 min),水(137.9 kPa, 2 min), $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{HCl}$ (137.9 kPa, 2 min),水(137.9 kPa, 2 min), $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaOH}$ (137.9 kPa, 2 min),水(137.9 kPa, 3 min)冲洗,缓冲液(137.9 kPa, 10 min)平衡,2 次进样间用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaOH}$ (137.9 kPa, 2 min),水(137.9 kPa, 3 min)冲洗,缓冲液(137.9 kPa, 10 min)平衡,每进样 2 次更换 1 次缓冲液;缓冲液为  $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $120 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Tris}$ - $16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{SDS}$ ( $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaOH}$  调 pH 12.0),运行电压 17 kV,柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ ,检测波长 254 nm,进样参数 3.4 kPa,6 s,运行时间 27 min,所有溶液使用前均用  $0.22 \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密性试验** 按 2.1 要求取 100611 批药材样品制备供试品溶液,在上述毛细管电泳条件下重复进样 5 次,直观观察各指纹图谱的全貌无明显变化,重叠良好,各主要色谱峰保留时间基本一致,用相似度计算(中位数相关系数法),在同一台仪器测得的指纹图谱与其共有模式图谱的相似度均大于 0.99,13 个共有峰相对保留时间的 RSD 小于 1.4%,相对峰面积的 RSD 小于 4.5%,表明仪器精密性良好。

**2.4.2 稳定性试验** 按 2.1 要求取 100611 批药材

样品制备供试品溶液,在上述毛细管电泳条件下,分别在 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 进样分析,直观观察各指纹图谱的全貌无明显变化,重叠良好,各主要色谱峰保留时间基本一致,用相似度计算(中位数相关系数法),在同一台仪器测得的指纹图谱与其共有模式图谱的相似度均大于 0.98,13 个共有峰相对保留时间的 RSD 小于 1.7%,相对峰面积的 RSD 小于 5.3%,表明样品在 24 h 内稳定。

**2.4.3 重复性试验** 取 100611 批药材样品 5 份,按 2.1 要求分别制备供试品溶液,在上述毛细管电泳条件下进样分析,直观观察各指纹图谱的全貌无明显变化,重叠良好,各主要色谱峰保留时间基本一致,用相似度计算(中位数相关系数法),在同一台仪器测得的指纹图谱与其共有模式图谱的相似度均大于 0.98,13 个共有峰相对保留时间的 RSD 小于 1.5%,相对峰面积的 RSD 小于 5.7%,表明方法重现性良好。

### 2.5 指纹图谱的建立及相似度分析

**2.5.1 指纹图谱的建立** 取 10 批菲牛蛭药材样品,按 2.1 要求制备供试品溶液,在上述毛细管电泳条件下进样分析,得到 10 批药材的指纹图谱见图 1,并采用国家药典委员会开发的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”软件对 10 批药材的指纹图谱进行分析,以 S3 为参照指纹图谱见图 2,采用中位数相关系数法对各指纹图谱色谱峰进行了多点校正和自动匹配,其中共有色谱峰 13 个,以出峰稳定,峰面积较大的 5 号色谱峰为参照峰。

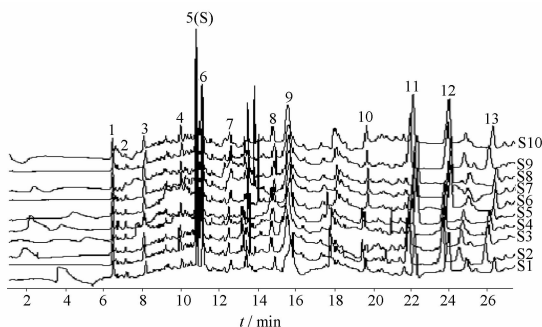


图 1 10 批菲牛蛭药材 HPCE 指纹图谱

Fig. 1 The HPCE fingerprints of the 10 batches *Poecilobdella manillensis*

**2.5.2 指纹图谱相似度分析** 采用国家药典委员会开发的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”软件对 10 批药材的指纹图谱进行分析,

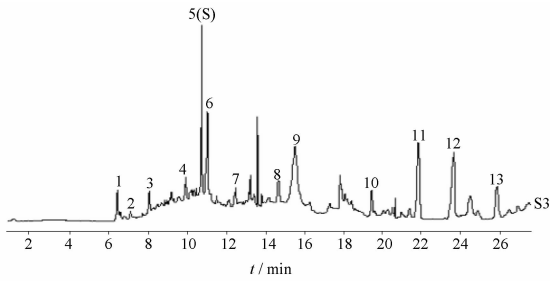


图2 菲牛蛭药材 HPCE 参照指纹图谱 S3  
Fig. 2 The HPCE referential fingerprint (S3) of *Poecilobdella manillensis*

以 S3 为参照指纹图谱见图 2,采用中位数相关系数法对各指纹图谱色谱峰进行了多点校正和自动匹配,生成广西菲牛蛭药材共有模式的对照指纹图谱 (R),然后进行了匹配数据计算见表 2 和相似度计算,10 批菲牛蛭药材指纹图谱与对照指纹图谱的相似度见表 3。

### 3 讨论

#### 3.1 高效毛细管电泳分析条件的选择

**3.1.1 缓冲溶液 pH 的选择** 缓冲溶液的 pH 是影响毛细管电泳的首要因素,本实验以  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

表 2 10 批菲牛蛭药材指纹图谱与对照指纹图谱匹配数据

Table 2 The matching data of HPCE fingerprints and HPCE referential fingerprint (R) from the 10 batches *Poecilobdella manillensis*

No.	保留时间 /min	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R	保留时间 RSD/%	峰面积 RSD/%	匹配 数目
1	6.471	10.961	9.189	8.712	9.284	11.834	10.222	11.778	11.797	10.079	8.492	10.235	0.30	12.73	10
2	7.143	3.188	2.529	2.020	2.822	2.939	1.924	2.141	2.498	2.376	1.864	2.430	0.35	18.57	10
3	8.115	6.504	7.746	7.312	7.882	4.960	7.172	9.031	9.296	7.143	6.318	7.336	0.48	17.37	10
4	9.996	5.362	7.406	6.639	6.497	6.009	8.274	7.554	6.678	7.194	8.038	6.965	0.32	12.97	10
5	10.834	31.737	34.698	33.127	36.037	33.476	35.601	37.754	34.306	33.993	34.110	34.484	0.28	4.85	10
6	11.120	33.086	36.136	34.339	34.706	32.637	37.644	39.250	38.317	36.415	35.484	35.801	0.27	6.10	10
7	12.584	5.615	6.104	6.420	6.910	4.629	5.747	6.264	4.284	6.036	5.702	5.771	0.36	13.77	10
8	14.815	8.745	10.196	10.012	9.531	8.715	9.996	9.184	7.935	9.260	10.008	9.358	0.38	7.84	10
9	15.623	76.366	68.287	63.146	65.576	49.150	66.364	70.931	67.264	67.684	64.186	65.895	0.53	10.57	10
10	19.638	5.932	7.321	4.848	7.886	7.179	5.655	5.406	4.912	6.389	6.598	6.213	0.61	16.74	10
11	22.145	42.549	48.003	48.916	47.866	46.495	47.737	47.746	48.800	43.551	47.448	46.911	0.75	4.60	10
12	23.957	41.152	48.393	46.531	49.474	43.772	49.098	44.213	49.994	47.626	48.895	46.915	0.67	6.27	10
13	26.269	13.715	21.957	21.351	24.215	16.241	20.882	14.036	16.397	21.245	21.240	19.128	0.73	19.240	10

表 3 10 批菲牛蛭药材指纹图谱与对照指纹图谱相似度

Table 3 The similarity of HPCE fingerprints and HPCE referential fingerprint (R) from the 10 batches *Poecilobdella manillensis*

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1.000	0.990	0.987	0.986	0.971	0.989	0.994	0.990	0.992	0.987	0.989
S2	0.990	1.000	0.999	0.999	0.991	0.999	0.995	0.997	0.999	0.999	1.000
S3	0.987	0.999	1.000	0.999	0.993	0.999	0.994	0.997	0.998	0.999	1.000
S4	0.986	0.999	0.999	1.000	0.993	0.999	0.992	0.996	0.998	0.999	0.999
S5	0.971	0.991	0.993	0.993	1.000	0.993	0.987	0.992	0.989	0.993	0.993
S6	0.989	0.999	0.999	0.999	0.993	1.000	0.996	0.998	0.999	1.000	1.000
S7	0.994	0.995	0.994	0.992	0.987	0.996	1.000	0.997	0.996	0.994	0.996
S8	0.990	0.997	0.997	0.996	0.992	0.998	0.997	1.000	0.997	0.997	0.998
S9	0.992	0.999	0.998	0.998	0.989	0.999	0.996	0.997	1.000	0.999	0.999
S10	0.987	0.999	0.999	0.999	0.993	1.000	0.994	0.997	0.999	1.000	1.000
对照指纹图谱	0.989	1.000	1.000	0.999	0.993	1.000	0.996	0.998	0.999	1.000	1.000

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$  为基准缓冲液,分别用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{PO}_4$  和  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaOH}$  调 pH 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0,

13.0,发现在 pH 12.0 条件下色谱图出峰多,峰形较好,故确定缓冲溶液最佳 pH 为 12.0。

**3.1.2 缓冲溶液体系的选择** 在本实验中利用正



交设计优选缓冲体系,分别以磷酸氢二钠、三羟甲基氨基甲烷、四硼酸钠为缓冲液,进行3因素3水平正交实验,结果表明,磷酸氢二钠和三羟甲基氨基甲烷的混合缓冲体系效果最好,其次为磷酸氢二钠缓冲体系,接着又进行了单因素考察,以磷酸氢二钠为基准缓冲液,对其浓度进行考察,确定了磷酸氢二钠的最佳浓度为 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,在此基础上对混合缓冲体系中的三羟甲基氨基甲烷浓度进行了考察,最终确定缓冲体系为 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-}120\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Tris}(1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH调pH}12.0)$ 。

**3.1.3 缓冲溶液添加剂的选择** 毛细管电泳中添加剂的加入,有时会对分离效果产生很大的影响,本实验在缓冲体系 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-}120\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Tris}(1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH调pH}12.0)$ 基础上,对甲醇、乙腈、十二烷基硫酸钠3种常用添加剂进行了考察,结果表明,分别加入2%甲醇,1%乙腈均使分析时间延长,各色谱峰的分离效果没有得到较大的改善,十二烷基硫酸钠的加入使分析时间缩短,出峰数量增多,各色谱峰的分离效果及峰形得到改善,在此基础上考察了4, 8, 12, 16, 20, 24  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  SDS,最终确定 $16\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  SDS效果最好,故缓冲体系为 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-}120\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Tris-}16\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{SDS}(1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH调pH}12.0)$ 。

**3.1.4 分离电压、柱温、进样时间、不同内径毛细管柱及检测波长的选择** 本实验以分离电压、柱温、进样时间为考察因素,进行3因素3水平正交实验,以即要有较短的分析时间,又要有较好的分离度为原则,比较各色谱图,最终确定分离电压17 kV,柱温 $25\text{ }^\circ\text{C}$ ,进样参数为3.4 kPa,6 s,在此基础上考察了内径为50,75  $\mu\text{m}$ 的毛细管柱,结果表明,内径为75  $\mu\text{m}$ 毛细管柱的分析效果好,在检测波长214,254,280 nm下,比较各色谱图,结果表明,检测波长为254 nm时出峰多,峰强度适中。

### 3.2 提取溶剂及提取时间的选择

由于菲牛蛭药材中主要化学成分为脂肪酸、氨基酸和蛋白质,所以考察水和0.9%生理盐水超声提取,提取时间考察了超声10, 20, 30 min,结果表明,水超声30 min,所得到的色谱图出峰数量多、峰形较好、峰强度适中,所以确定水超声30 min。

### 3.3 广西菲牛蛭药材质量评价

本实验首次建立了菲牛蛭药材的高效毛细管电泳指纹图谱,并对该药材的抗凝血酶活性进行了测定。10批广西菲牛蛭药材抗凝血酶活性均不低于 $98\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ,指纹图谱相似度均高于0.98,表明10批菲牛蛭药材既具有稳定的抗凝血活性,又具有良好的相似度,将生物活性测定和化学分析相关联,采用抗凝血酶活性测定和指纹图谱方法,可以从整体上控制菲牛蛭药材的质量,为该药材质量标准的建立提供了新方法,为该药材的开发利用提供了质量保障。

#### [参考文献]

- [1] 杨潼. 中国动物志环节动物门蛭纲[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 120.
- [2] 周维官, 周维海, 覃国森. 菲牛蛭的人工养殖方式试验[J]. 广西科学, 2008, 15(3): 317.
- [3] 欧兴长, 张秋海, 丁家欣, 等. 四种水蛭抗凝血酶作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 1996, 8(2): 54.
- [4] 吴志军, 于立华. 菲牛蛭及其制品的抗血栓、溶血栓作用[J]. 中成药, 2007, 29(4): 591.
- [5] 李文, 廖福龙, 殷晓杰, 等. 七种水蛭抗血小板聚集与抗凝血研究[J]. 中药药理与临床, 1997, 13(5): 32.
- [6] 苗艳丽, 方福永, 宋文东. 中药菲牛蛭化学成分的分析[J]. 中成药, 2007, 29(8): 1248.
- [7] 黄爱民. 广西菲牛蛭中菲牛蛭素的分离纯化及体内外抗凝血实验[D]. 南宁: 广西医科大学, 2005.
- [8] Verena Steiner, Rene Knecht, Markus Gruetter, et al. Isolation and purification of novel hirudins from the leech *Hirudinaria manillensis* by high performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr B, 1990, 530: 273.
- [9] 中国药典. 一部[S]. 2010: 77.



## Study on HPCE fingerprints of *Poecilobdella manillensis* from Guangxi province

JIANG Xingang, MENG Zuohuan, JIA Jiming\*

(Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China)

[Abstract] **Objective:** To establish fingerprints for *Poecilobdella manillensis* from Guangxi province using the high performance capillary electrophoresis (HPCE) method. **Method:** Electrophoresis was performed on a fused silica capillary column (75  $\mu\text{m} \times 56 \text{ cm}$ ), with 25  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4$ -120  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Tris}$ -16  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{SDS}$  (adjusted to pH 12.0 with 1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaOH}$ ) as the running buffer. The applied voltage was 17 kV, the temperature was 25  $^\circ\text{C}$  and the detection wavelength was 254 nm. The sample's hydrodynamic injection was 3.4 kPa  $\times$  6 s and the duration was 27 min. **Result:** HPCE fingerprint was established with 13 common peaks. The similarity between fingerprints of *P. manillensis* in 10 batches and control fingerprints was more than 0.98. **Conclusion:** The method is so precise, reproducible and stable that it could be used as a new means for the quality control of *P. manillensis*.

[Key words] HPCE; fingerprints; *Poecilobdella manillensis*

doi:10.4268/cjmm20120417

[责任编辑 孔晶晶]

### 2012 海峡两岸暨 CSNR 全国第十届中药及天然药物资源学术研讨会通知(第1轮)

2012 海峡两岸暨 CSNR 全国第十届中药及天然药物资源学术研讨会拟定于 2012 年 8 月 3-6 日在甘肃兰州市召开,会期 4 天。本届学术研讨会由 CSNR 天然药物资源专业委员会、中国药材 GAP 研究促进会(香港)、甘肃省人民政府主办,甘肃中医药大学、兰州大得利生物化学制药有限公司、南京中医药大学承办。现在开始进行学术研讨会报名和学术论文征集工作。会议的具体事项将在第 2 轮通知中发出。欢迎踊跃报名参加本次会议!

#### 一、时间

2012 年 8 月 3~6 日。研讨会报名及论文提交截止时间:2012 年 6 月 30 日。

#### 二、地点

会议地点为甘肃省兰州市,专题调研及生产基地考察为甘肃省陇南和定西地区。

#### 三、主题

政产学研结合,促进中药材规范化生产与中药资源科学利用和可持续发展——甘肃陇药发展及中医药文化产业论坛

#### 四、交流研讨内容

①中药及天然药物资源调查与保护利用;②中药材规范化生产(GAP)与产业化发展;③中药及天然药物资源化学研究与综合利用;④中医药文化传播与产业化;⑤中药及天然药物资源学科建设与人才培养。

#### 五、组织形式

1. 学术研讨会开幕式和大会特邀报告,届时将邀请我国中药及天然药物资源科学领域院士、著名专家和主管部门领导到会并作学术报告。2. 分会场学术交流(①中药资源调查与保护利用;②中药材规范化生产(GAP)与产业化发展;③中医药文化传播与产业化三个分会场)。3. 大会期间组织赴甘肃省陇南和定西地区中药材 GAP 基地考察。4. 会议期间将召开第五届中国自然资源学会天然药物资源专业委员会委员、第三届中国药材 GAP 研究促进会(香港)委员及《中国现代中药》编委会委员会议,请委员、委员单位准时参会,不另行文。

#### 六、联系方法

江苏省南京仙林大学城仙林大道 138 号,南京中医药大学药学院 CSNR 天然药物资源专业委员会办公室;邮政编码:210046;电子信箱:tryw2010@126.com。

联系人:单鸣秋:15951802806,严辉:13512537853。

详情请登录中国中药杂志网站 www.cjmm.com.cn 查询。