



遼寧中醫藥大學

Liaoning University of Traditional Chinese Medicine

硕士学位论文

动物药材商品高效毛细管电泳

指纹图谱的研究 (I)

学位申请人

王成芳

指导教师姓名

李峰

专业名称

生药学

申请学位类型

科学学位

论文提交日期

二〇一〇年六月

辽宁中医药大学学位论文独创性与真实性声明

本人郑重声明：在我呈交的学位论文中，本人经研究所得的数据、原理、结论等一切内容均真实，且经本人认真核对无误；我呈交的与学位论文相关的资料（原始记录、照片、录像片、检查化验报告单等）确为完整的学位论文研究中的原始资料，本人没作任何修改；我呈交的学位论文是我本人在指导教师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中没有其他人已经发表或撰写过的研究成果，其他人对我完成此论文的帮助以及对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确说明并表示谢意。

我呈交的学位论文及与该论文相关的资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

学位论文作者签名

王成芳

日期：2020年6月10日

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解辽宁中医药大学有关保留使用学位论文的规定，同意学校保留或向国家有关部门机构送交论文的印刷版和电子版，允许被查阅和借阅。本人授权辽宁中医药大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复印手段保存和汇编本学位论文。

（保密论文在解密后应遵守此规定）

学位论文作者签名

王成芳

学位论文导师签名

李峰

日期：2020年6月10日

目 录

中文摘要.....	1
Abstract.....	4
文献综述.....	8
前 言.....	14
正 文.....	15
第一章 地龙药材商品高效毛细管电泳指纹图谱的研究.....	15
第二章 土鳖虫药材商品高效毛细管电泳指纹图谱的研究.....	21
第三章 僵蚕药材商品高效毛细管电泳指纹图谱的研究.....	26
第四章 蜈蚣药材商品高效毛细管电泳指纹图谱的研究.....	32
第五章 蛤蚧药材商品高效毛细管电泳指纹图谱的研究.....	37
第六章 蕲蛇药材商品高效毛细管电泳指纹图谱的研究.....	42
第七章 乌梢蛇药材商品高效毛细管电泳指纹图谱的研究.....	47
分析讨论.....	52
结 论.....	55
参考文献.....	57
附 图.....	59
致 谢.....	69
个人简历.....	70

摘要

目的:

1. 建立动物药材商品的高效毛细管电泳 (HPCE) 指纹图谱测定方法。
2. 应用高效毛细管电泳 (HPCE) 指纹图谱, 建立动物药材商品的品质评价模式。

材料与方法:

1.材料: 10 批不同地区地龙、土鳖虫(地鳖)、僵蚕、蜈蚣、蛤蚧、蕲蛇、乌梢蛇药材商品, 地鳖和冀地鳖对照药材。

2.方法

2.1 样品的处理: 各待测样品均以水或稀醇为提取溶剂, 超声提取。

2.2 仪器与试剂: 美国 Agilent 3D 毛细管电泳仪, DAD 检测器, Agilent 化学工作站。

AS5150A 超声波清洗器; TDL-5-A 离心机; AR2140 电子分析天平。

所用试剂均为市售分析纯, 水为三级水; 所用试剂均通过 0.45 μ m 微孔滤膜滤过。

2.3 电泳条件: 毛细管内径分别为 50、75 μ m, 有效长度 40~65cm; 缓冲体系为硼砂-硼酸、硼砂; pH 值在 8~10 之间; 电压在 12~25KV 之间; 柱温为 25 $^{\circ}$ C; 进样方式为压力进样; 检测器为紫外 DAD 检测器。

2.4 指纹图谱建立: 将各样品HPCE测试谱图, 导入中药指纹图谱计算机辅助相似度计算软件, 分别拟合出各药材指纹图谱的对照指纹图谱R, 然后计算各样品与其对照指纹图谱R的相似度。

结果:

1. 以 30mmol/L 硼砂为缓冲溶液, pH 9.45, 分离电压 15kV, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 检测波长 250nm, 测定地龙药材商品 HPCE 指纹图谱, 得到 8 个共有峰, 保留时间分别为 3.985、4.804、5.259、6.255、6.641、6.793、7.537、7.967, 各样品相对于对照图谱的相似度分别为 0.846、0.912、0.719、0.959、0.859、0.932、0.874、0.948、0.949、0.940、0.849、0.853、0.899、0.868、0.928、0.966、0.821、0.968、0.868、0.791、0.825。

2. 以 20mmol/L 硼砂为缓冲溶液, pH 9.44, 分离电压 13kV, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 检测波长 265nm, 测定土鳖虫药材商品 HPCE 指纹图谱, 得到 6 个共有峰, 保留时间分别为 4.336、4.76、5.293、6.189、8.107、8.191, 各样品相对于对照药材图谱的相似度分别为 0.962、0.966、0.997、0.987、0.963、0.950、0.958、0.975、0.982、0.970。

3. 以30mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸为缓冲溶液，pH 8.6，分离电压18KV，柱温25℃，检测波长245nm，测定僵蚕药材商品HPCE指纹图谱，得到8个共有峰，保留时间分别为6.663、7.152、7.305、7.51、8.054、10.925、12.751、13.254，各样品相对于对照图谱的相似度分别为0.997、0.992、0.996、0.973、0.992、0.998、0.996、0.994、0.959、0.982。
4. 以40mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸为缓冲溶液，pH 8.9，分离电压20KV，柱温25℃，检测波长256nm，测定蜈蚣药材商品HPCE指纹图谱，得到7个共有峰，保留时间分别为6.014、7.515、8.93、10.158、12.232、12.458、14.808，各样品相对于对照图谱的相似度分别为0.948、0.981、0.875、0.957、0.883、0.949、0.859、0.956、0.967、0.849。
5. 以10mmol/L硼砂-1%乙腈为缓冲溶液，pH 9.18，分离电压20kV，柱温25℃，检测波长245nm，测定蛤蚧药材商品HPCE指纹图谱，得到7个共有峰，保留时间分别为4.865、6.004、6.348、7.064、8.386、8.692、8.846，各样品相对于对照图谱的相似度分别为0.974、0.987、0.967、0.963、0.976、0.990、0.910、0.961、0.979、0.526。
6. 以20mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸为缓冲溶液，pH 8.4，分离电压19kV，柱温25℃，检测波长245nm，测定蕲蛇药材商品HPCE指纹图谱，得到7个共有峰，保留时间分别为5.908、6.31、6.461、6.758、9.063、10.331、11.174，各样品相对于对照图谱的相似度分别为0.978、0.914、0.978、0.967、0.992、0.982、0.986、0.988、0.985、0.974。
7. 以80mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸为缓冲溶液，pH 8.8，分离电压18KV，柱温25℃，检测波长230nm，测定乌梢蛇药材商品HPCE指纹图谱，得到7个共有峰，保留时间分别为7.806、8.339、8.872、9.092、9.228、10.799、17.803，各样品相对于对照图谱的相似度分别为0.961、0.865、0.891、0.987、0.927、0.942、0.986、0.923、0.914、0.982。

结 论：

1. 在本实验所建立的七种动物药材商品的指纹图谱中，土鳖虫、僵蚕、蕲蛇各样品与其对应的对照药材或拟合的对照图谱比较，得到的相似度均在 0.9 以上，因此，可以认为目前市场上土鳖虫、僵蚕、蕲蛇药材商品的品种具有一致性；蜈蚣、蛤蚧、乌梢蛇药材各样品与其对应拟合的对照图谱比较，个别样品相似度小于 0.9，但除蛤蚧(0.526)外，其他样品的相似度都接近 0.9，表明蜈蚣、乌梢蛇药材商品的品种基本一致；在 21 份地龙药材商品中，10 份为广地龙样品，11 份为沪地龙样品，其中，广地龙除 1[#]、3[#]样品外，其余样品相似度均大于 0.9，表明广地龙样品间的相似性基本

一致，而沪地龙样品中仅 4 份样品在 0.9 以上，4 份样品的相似度接近 0.9，另 3 份样品小于 0.9，表明沪地龙品种来源比较复杂，与实际情况符合；但是否说明广地龙质量优于沪地龙，有待进一步研究。

2. 本研究发现，每种动物药材商品的指纹图谱其相似度小于 0.9 的样品，主要表现为各共有峰相对峰面积的差异（如蛤蚧 10[#]样品的相似度为 0.526，其相对峰面积显著高于整体平均水平），而相对保留时间与同品种其他样品比较基本一致。因此，高效毛细管电泳法不仅可作为动物药材品种鉴别的方法，也可对动物药材进行质量评价。
3. 从七种动物药材商品的HPCE指纹图谱分析结果可见，动物药中的主成分多为蛋白质、核苷等带电物质，而高效毛细管电泳（HPCE）正是分析该类成分的有效方法，故高效毛细管电泳法可作为动物药材指纹图谱的分析方法。

关键词： 动物药材；HPCE；指纹图谱；相似度评价

Abstract

Purpose:

1. To establish measuring method of animal medicinal products fingerprint by using high-performance capillary electrophoresis (HPCE).
2. Apply HPCE fingerprints to establish quality evaluation model of animal medicinal products.

Material and method:

1. **material:** 10 groups in different areas of Pheretima, *Eupolyphaga seu steleophaga* (*Eupolyphaga sinensis* Walker), *Bombyx batryticatus*, *Scolopendra*, Gecko, Agkistrodon, *Zaocys* medicinal products, *Eupolyphaga sinensis* Walker and *Steleophaga plancyi*(Boleny) control medicine.
2. **method**
 - 2.1 **Sample processing:** The samples under test are all extracted by water or dilute alcohol, ultrasonic extraction.
 - 2.2 **Reagents and instruments:** American agilent 3D high-performance capillary electrophoresis instruments, DAD detector, agilent chem workstation; AS5150A ultrasonic cleaning; TDL-5-A centrifuge; AR2140 analytical balance. All the chemical reagents are for AR, purified water; the reagents are all through the membrane filter of 0.45 μm .
 - 2.3 **Electrophoresis conditions:** Capillary diameter is respectively 50,75 μm , effective length 40 ~ 65cm; Buffer system is boric acid – borax or boric acid, pH value between 8 and 10; voltage between 12 ~ 25KV; column temperature is 25 $^{\circ}\text{C}$; way for sample injection is pressure; detector is UV-DAD.
 - 2.4 **The establishment of the each herbs HPCE fingerprint:** Put HPCE fingerprints of samples into traditional Chinese medicine computer-aided similarity calculation software, fit out a control fingerprint, and then calculate the similarity of each sample compared with the control fingerprint.

Results:

1. With 30mmol/L borax buffer solution, pH 9.45, isolating voltage 15KV, column temperature is 25°C, the wavelength is 250nm, determine **Pheretima** medicinal product HPCE fingerprint, received **8 fingerprint peaks**, retention time is respectively 3.985, 4.804, 5.259, 6.255, 6.641, 6.793, 7.537, 7.967, the similarity of every sample compared with its control fingerprint is respectively 0.846, 0.912, 0.719, 0.959, 0.859, 0.932, 0.874, 0.948, 0.949, 0.940, 0.849, 0.853, 0.899, 0.868, 0.928, 0.966, 0.821, 0.968, 0.868, 0.791, 0.825.
2. With 20mmol/L borax buffer solution, pH 9.44, isolating voltage 13KV, column temperature is 25°C, the wavelength is 265nm, determine **Eupolyphaga seu steleophaga** medicinal product HPCE fingerprint, received **6 fingerprint peaks**, retention time is respectively 4.336, 4.76, 5.293, 6.189, 8.107, 8.191, the similarity of every sample compared with its control fingerprint is respectively 0.962, 0.966, 0.997, 0.987, 0.963, 0.950, 0.958, 0.975, 0.982, 0.970.
3. With 30mmol/L borax-0.2mol/L boricacid buffer solution, pH 8.6, isolating voltage 18KV, column temperature is 25°C, the wavelength is 245nm, determine **Bombyx batryticatus** medicinal product HPCE fingerprint, received **8 fingerprint peaks**, retention time is respectively 6.663, 7.152, 7.305, 7.51, 8.054, 10.925, 12.751, 13.254, the similarity of every sample compared with its control fingerprint is respectively 0.997, 0.992, 0.996, 0.973, 0.992, 0.998, 0.996, 0.994, 0.959, 0.982.
4. With 40mmol/L borax-0.2mol/L boricacid buffer solution, pH 8.9, isolating voltage 20KV, column temperature is 25°C, the wavelength is 256nm, determine **Scolopendra** medicinal product HPCE fingerprint, received **7 fingerprint peaks**, retention time is respectively 6.014, 7.515, 8.93, 10.158, 12.232, 12.458, 14.808, the similarity of every sample compared with its control fingerprint is respectively 0.948, 0.981, 0.875, 0.957, 0.883, 0.949, 0.859, 0.956, 0.967, 0.849.
5. With 10mmol/L borax-1% acetonitrile buffer solution, pH 9.18, isolating voltage 20 KV, column temperature is 25°C, the wavelength is 245nm, determine **Gecko** medicinal product HPCE fingerprint, received **7 fingerprint peaks**, retention time is respectively 4.865, 6.004, 6.348, 7.064, 8.386, 8.692, 8.846, the similarity of every sample compared with its control

fingerprint is respectively 0.974, 0.987, 0.967, 0.963, 0.976, 0.990, 0.910, 0.961, 0.979, 0.526.

6. With 20mmol/L borax-0.2mol/L boric acid buffer solution, pH 8.4, isolating voltage 19KV, column temperature is 25°C, the wavelength is 245nm, determine **Agkistrodon** medicinal product HPCE fingerprint, received **7 fingerprint peaks**, retention time is respectively 5.908, 6.31, 6.461, 6.758, 9.063, 10.331, 11.174, the similarity of every sample compared with its control fingerprint is respectively 0.978, 0.914, 0.978, 0.967, 0.992, 0.982, 0.986, 0.988, 0.985, 0.974.
7. With 80mmol/L borax-0.2mol/L boric acid buffer solution, pH 8.8, isolating voltage 18KV, column temperature is 25°C, the wavelength is 230nm, determine **Zaocys** medicinal product HPCE fingerprint, received **7 fingerprint peaks**, retention time is respectively 7.806, 8.339, 8.872, 9.092, 9.228, 10.799, 17.803, the similarity of every sample compared with its control fingerprint is respectively 0.961, 0.865, 0.891, 0.987, 0.927, 0.942, 0.986, 0.923, 0.914, 0.982.

Conclusion:

1. In the established fingerprints of 7 species animal medicinal products, the similarity of each *Eupolyphaga seu steleophaga*, *Bombyx batryticatus*, *Agkistrodon* sample compared with their control fingerprints is all above 0.9. Therefore, we can consider the current market on the variety of *Eupolyphaga seu steleophaga*, *Bombyx batryticatus*, *Agkistrodon* medicinal products having uniformity; Each sample of *Scolopendra*, *Gecko*, *Zaocys* medicinal products compared with its fitting control fingerprint, several similarity is less than 0.9, except *Gecko*(0.526), the other samples' similarity were close to 0.9, it explained that *Scolopendra*, *Zaocys* medicinal products were in general accord; In the 21 samples of *Pheretima* medicinal products, 10 *Pheretima aspergillum*, 11 *Hudilong*, besides 1[#]、3[#] sample of *Pheretima aspergillum*, the other similarity were greater than 0.9 and the similarity between the samples is basically unify, while only 4 samples similarity of *Hudilong* were more than 0.9, 4 samples similarity were close to 0.9, 3 samples similarity were less than 0.9, it demonstrated that *Hudilong* is more complex in the variety of sources, and it was same as the actual situation; But whether the *Pheretima aspergillum* is better than *Hudilong*

or not is still has to get a further study.

2. The study found that the samples of animal medicinal products whose similarity were less than 0.9 have differences on the relative peak area of common peaks (like 10[#] similarity of Gecko is 0.526, its relative peak area is much higher than the average level), but their relative retention time is basically unify compared with the other samples. Therefore, HPCE law will not only be considered as the variety identification method of an animal medicine but also have become its means of quality evaluation.
3. From analytical results of HPCE fingerprints of 7 species animal medicinal products, we can see that the animal medicines are most contained charged compounds of proteins, nucleosides and so on, while HPCE is such an analysis and effective method, so HPCE may be considered as the analytical method for fingerprints of animal medicinal products.

Keyword: Animal medicine; HPCE; fingerprint; similarity evaluation

文献综述

HPCE 技术在中药指纹图谱研究中的应用进展

摘要: HPCE 技术是近几年来发展较快的中药指纹图谱研究方法之一,它具有柱效高、快速、进样体积小等特点,抗污染能力强,前处理简单,分析运行成本低,水溶性样品的“指纹”特征性强,且应用面较 HPLC 广泛。本文通过概括了其在指纹图谱研究上的应用现状,分别从样品提取、电泳条件选择、参照物选择、数据处理等方面做以比较,为 HPCE 技术在中药指纹图谱研究方法中提供参考。

关键词: 中药 高效毛细管电泳 指纹图谱 样品提取 电泳条件 参照物

中药指纹图谱它具有系统性、特征性和稳定性的特点,是一种综合的、宏观的和量化的鉴别手段,用以对中药材和中成药进行鉴别真伪,评价原料药材、半成品和成品质量的均一性和稳定性。

目前,用于中药指纹图谱研究的方法分为色谱法和光谱法两类,以色谱法居多,其中又以HPLC最常用。但孙毓庆^[1]等提到用HPLC进行中药成分分析常遇到一些问题:一是中药成分复杂,色谱柱易受污染,柱寿命短,且难以再生;二是色谱柱上沉积的污染物,经常以杂质峰的形式出现;三是分析运行成本高;四是对于含极性成分较多的中药,其“指纹”的特征性不强。HPCE技术是近几年来发展较快的中药指纹图谱研究方法之一,它刚好可以弥补以上缺点,虽然该技术的应用没有HPLC广泛,但它具有许多潜在的优势^[1],一是它具有柱效高、快速、进样体积小等特点;二是抗污染能力强,前处理简单,甚至于不需要前处理;三是分析运行成本低;四是水溶性样品的“指纹”特征性强,如中药汤剂、注射剂的分析等;五是应用面广。HPCE除可分析小分子酸、碱、盐及中性分子外,还可分析生物大分子(核酸、多肽和蛋白质等)及手性分子等。因此,HPCE法可以完成中药指纹图谱研究的诸多课题。本文就已有的HPCE技术在中药指纹图谱研究的应用方法上作以下总结:

1.样品的提取

1.1 提取方式:(1)超声法^[2-10]以醇或水为提取溶剂超声提取。(2)回流法^[11-19]该法多应用于植物药,尤其是多糖类成分^[15-19]的样品提取。其中,丹参多糖^[16]的提取兼用了超声和回流两种方法。多糖除蛋白的方法中,狗脊多糖和榧子多糖样品^[15、19]采用的是85%乙醇、无水乙醇和丙酮除蛋白,而文献^[16-18]报道的则是Sevage法除蛋白。(3)提取液法 该法主要是针对样品蛋白类成分^[20-26]的提取,专属性较强,为三种蛋白提取液,Tris-甘氨

酸蛋白提取液：Tris 0.6g，甘氨酸2.88g，加蒸馏水溶解至1000ml。碱性蛋白提取液：Tris-HCl 0.1mol/L，0.1%抗坏血酸，巯基乙醇10mmol/L，pH8.0。酸性蛋白提取液：柠檬酸80mmol/L，Na₂HPO₄ 32mmol/L，抗坏血酸5mmol/L，巯基乙醇10mmol/L，pH2.8。其中，李琴韵等^[26]采用酸性蛋白提取液提取了参照物吴茱萸碱。此外，蛋白类成分也有其他的提取方法，如蒙古黄芪多肽^[27]：4℃条件下浸泡提取并用硫酸铵沉淀。太子参中环肽Pseudostellarin B^[28]：以甲醇为溶剂，超声辅助提取。

以上所述的三种提取方式，不难看出超声提取法的应用更为广泛，有报道^[6, 28-29]考察了不同提取方法对提取效率的影响，发现超声法与回流法提取效率相当，但回流法操作复杂，且加热过程中可能会引起药物组分的变化，而超声法简便省时，因而选用超声法进行提取更可行。

1.2 提取溶剂^[2-29]：一般为水、甲醇、乙醇等极性大的溶剂，其加入体积及浓度需要具体的实验考察。

1.3 提取时间：超声法的提取时间通常较短，一般在30min~90min。而回流法的提取时间较长，大约在1.5~2.5h左右，索式回流提取^[14]时间5h，回流加热前药材大多需要浸泡以便提取更加充分。

2. 电泳条件的选择^[2-30]

通常电泳条件主要包括：毛细管规格、背景电解质种类与浓度、电压、柱温、进样方式、检测器等。其中背景电解质的选择尤其重要，主要是缓冲盐的种类、缓冲溶液的浓度及pH等。分述如下：

2.1 毛细管规格：常用内径50μm或75μm的石英毛细管，有效长度一般在40~60cm左右，总长度约50~67cm。

2.2 背景电解质：电解质的种类、浓度及pH对分离的影响较大，因为它直接影响电渗淌度，通常在实验当中要对其进行至少五个水平的实验考察。(1)电解质的种类 一般为磷酸盐或硼酸盐的缓冲溶液，也有硼酸盐和磷酸盐混合体系，此外何琳等^[4]采用了1mmol/L Tris-10mmol/L H₃BO₃-0.5%四乙烯五胺-0.025mmol/L CTAB体系为缓冲体系。为改善电泳峰的峰形及分离情况，有时会在缓冲溶液中加入有机改性剂。如张军等^[3]、黄晟等^[5]的缓冲体系中加入了甲醇，程伟等^[13]、王钢力等^[14]的缓冲体系中加入了乙腈。(2)电解质的pH值 谢培山^[31]提到在pH9的硼砂缓冲液中电渗速度约为2mm/s，而在pH3的背景电解质中电渗速度约减小1个数量级。因此，背景电解质的pH值通常要大于7。当然有时在分析时会用酸性电解质，如张朝辉等^[8]对海马类药材蛋白质的分析就用了pH3.5

的缓冲液。

2.3 电压：范围在10KV~30KV。

2.4 进样方式：压力进样、重力进样、虹吸进样和电动进样。

2.5 检测器：一般是紫外检测器，分为可调波长检测器（VWD）与二极管阵列检测器（DAD）两类。

3. 参照物的选择

3.1 对照品、内标物及内参比峰的选择：(1)通常选择药材或者制剂的活性成分，如阿魏酸和吴茱萸碱^[2, 26]，或指标成分如绿原酸^[7]。复方中药注射剂中的君药的活性成分或指标成分的一个或多个单体作为参照物，要求参照物在毛细管电泳图谱上的电泳峰较大且无干扰。(2)若存在适宜的内标物，可用内标物标定和考察其它电泳组分，如厚朴酚^[5]、对乙酰氨基酚^[13]和槲皮素^[14]。(3)若无适宜的内标物或电泳图谱上无位置插入内标峰，也可选择电泳图谱上无干扰的迁移时间与峰高适宜的电泳峰为内参比峰。用内参比峰替代内标峰，进而标定和考察其它电泳组分，如僵蚕和太子参的指纹图谱研究^[3, 6]。(4)若按所分析成分的种类看，多糖类成分的参照物一般选择鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、果糖、阿拉伯糖等单糖，并且这些单糖需要进行 α -萘胺衍生化，如丹参多糖、野西瓜成熟果实中的多糖和羊栖菜多糖^[16-18]组分的分析。而蛋白质类成分的参照物选择牛血清白蛋白^[30]。核苷类成分则选择腺苷、鸟苷、尿苷和次黄嘌呤等核苷^[9, 11, 32-34]作为参照物。

3.2 参照物溶液的制备：制备参照物溶液所使用的溶剂同供试品溶液的要求。

4. 数据处理

4.1 方法学考察：指纹图谱当中的方法学考察一般包括精密度、稳定性和重复性三方面。若涉及到标定对照品含量时，往往以参照物进行线性和精密度考察，如容蓉等^[7]对金银花中绿原酸含量测定，李文龙等^[28]测定太子参环肽 Pseudostellarin B 的含量。若不需要标定含量时，通常直接以对照药材或供试样品的电泳峰^[5-6, 10]进行方法学考察。

4.2 指纹图谱的建立与评价：取供试品溶液按选定的条件进样分析，记录其色谱图。以样品电泳峰与参照物的保留时间和峰面积的比值定性，确定共有指纹峰，以此来建立该药物的对照指纹图谱。评价分析方法一是采用中药色谱指纹图谱计算机辅助相似性评价系统^[5-6, 10]，经校正，将谱峰自动匹配，进行谱峰差异性评价和整体相似性评价。这是中药色谱指纹图谱评价最常用的方法，通常同一品种的指纹图谱相似度一般应大于或接近0.9。二是孙国祥等^[35]提出用色谱指纹图谱指数F和相对指数 F_r 评价色谱指纹图谱，它包括三个方面：(1)有效分离率(β)；(2)指纹信号响应强度(R) R越大越好；(3)指纹信号

均化系数(γ) γ 越接近1, 则信号平均化越好。综合 β , γ 影响, FP信号强度 $R \approx A_0^{n\beta\gamma}$, 令 $F = \log R = n\beta\gamma \log A_0$, 称F为色谱指纹图谱指数。若理想FP时间为50min, 实际为t, t越小表明时间效率越高, 同时考察1 mg药材(或制剂)提取物进样后的F值, 则得到色谱指纹图谱

相对指数 F_r :

$$F_r = \frac{50F}{Qt} = \frac{50n\beta\gamma \lg A_0}{Qt} = \frac{50\beta\gamma \sum_{i=1}^n \lg A_i}{Qt}$$

Q是与一次进样量相当的原生药材(或制剂)质量(mg), t是最后一个指纹峰出完峰时间(min)。该方法法是近年来提出的新的评价色谱指纹图谱的方法, 应用较少, 需要更多的实践来验证。三是在取样量、提取方法和进样量固定前提下, 文献^[36]提出含量相似度(P)评价方法, 此方法应用也并不多见。

5.存在的问题及应用前景

尽管HPCE技术具有快速、高教、简便、高分辨率、样品和溶剂消耗少等优点, 但它也存在一些问题。主要表现在仪器的重现性较差, 这大大降低了HPCE在中药指纹图谱鉴别的可靠性, 限制了其广泛应用。王天松^[37]提出在开发检测指纹图谱时, 最好同时试验HPCE和HPLC, 两种方法择其优者。针对重现性差的问题, 谢莹等^[38]等提出采用滴度比法、对照品校正法、保留指数法等3种方法来提高HPCE的重现性。

[参考文献]

- [1] 孙毓庆, 阮婧华, 马欣. 中药的毛细管电泳指纹图谱研究[J] 色谱 2003,21(4):303-306
- [2] 边晓丽, 张健, 王嗣岑, 等. 川芎药材活性部位的高效毛细管电泳指纹图谱定性分析方法[J] 药物分析杂志 2005,25(12):1520-1523
- [3] 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
- [4] 何琳, 龙晓英. 高效毛细管电泳法测定广地龙饮片中琥珀酸的含量[J] 广东药学院学报 2007,23(2):124-125
- [5] 黄晟, 张国庆, 娄子洋, 等. 虎杖药材高效毛细管电泳指纹图谱研究[J] 药物分析杂志 2006,26(1):24-26
- [6] 李仕海, 刘训红, 黄明辉. 太子参药材的HPCE指纹谱分析[J] 时珍国医国药 2007,18(4):820-821
- [7] 容蓉, 闫斌, 吕青涛, 等. 不同产地金银花药材的HPCE指纹图谱分析[J] 化学分析计量 2006,15(6):66-68

- [8] 张朝辉, 范国荣, 徐国钧, 等. 12种海马、海龙类药材高效毛细管电泳法鉴别[J] 中国中药杂志 1998,23(5):259-260
- [9] 叶斌, 宋丽艳, 于荣敏. 人工蛹虫草药材高效毛细管电泳指纹图谱研究[J] 中药材 2007,30(1):28-30
- [10] 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
- [11] 汪宇, 于荣敏, 杨光照, 等. HPCE法测定蛹虫草及其培养物中核苷类化合物的含量 [J] 解放军药学学报 2003,19(5):331-334
- [12] 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
- [13] 程伟, 梅洁, 肖玉秀. 连钱草药材的高效毛细管电泳指纹图谱研究[J] 氨基酸和生物资源2006,28(2):7-11
- [14] 王钢力, 戴忠, 鲁静, 等. 11种卷柏属药用植物HPCE指纹图谱的研究[J] 中成药 2002,24(7):489-491
- [15] 许重远, 陈振德, 晏媛, 等. 中药狗脊多糖的含量测定及高效毛细管电泳指纹图谱分析[J] 中药材 2004,27(1):22-23
- [16] 汪红, 王强, 罗辉明, 等. 丹参多糖的含量测定及高效毛细管电泳法测定其单糖组分[J] 中华中医药学刊 2007,25(4):827-829
- [17] 季宇彬, 郭守东, 汲晨锋. 野西瓜成熟果实中多糖的含量测定及毛细管电泳分析[J] 中国药学杂志 2006,41(15):1186-1189
- [18] 汲晨锋, 季宇彬, 吴涛, 等. 羊栖菜多糖含量测定及多糖组分分析[J] 世界科学技术—中医药现代化 2006,8(5):49-53
- [19] 陈振德, 谢立, 何英, 等. 云南榧子中多糖的含量测定及其高效毛细管电泳指纹图谱分析[J] 中国药房 2005,16(23):1817-1818
- [20] 许重远, 陈振德, 刘建武, 等. 狗脊及其混淆品蛋白多肽高效毛细管电泳法鉴别[J] 中药材 1999,22(7):337-338
- [21] 陈振德, 许重远, 谢立. 酸枣仁及其混淆品蛋白质高效毛细管电泳法鉴别[J] 中国药学杂志 2001,36(9):625-626
- [22] 古今, 刘萍, 李外. 紫河车及其伪品羊胎盘的高效毛细管电泳鉴别[J] 军医进修学院学报 2006,27(1):46-47

- [23] 陈振德, 许重远, 侯连兵, 等. 穿山甲及其炮制品蛋白多肽高效毛细管电泳法鉴定[J] 广东药学院学报 2000,16(4):302-304
- [24] 侯连兵, 陈振德, 单友亮, 等. 三七及其混淆品菊叶三七的蛋白多肽高效毛细管电泳鉴别[J] 中药材 2000,23(2):76-77
- [25] 陈振德, 许重远, 谢立. 蛋白多肽高效毛细管电泳法鉴别鸡内金与鸭内金[J] 中药材 2002,25(4):246-247
- [26] 李琴韵, 王智华, 洪筱坤. HPLC—FPS技术对吴茱萸质量的研究[J] 中成药 2003,25(7):570-573
- [27] 张志斐, 杨兆勇, 卢志刚. 应用HPLC对蒙古黄芪多肽的定性分析[J] 中国民族医药杂志 2004,4:33-34
- [28] 李文龙, 陈军辉, 韩超, 等. 太子参中环肽Pseudostellarin B含量HPLC测定及其指纹图谱研究[J] 天然产物研究与开发 2007,19:206-210,239
- [29] 孙沂, 隋因, 郭涛, 等. 不同产地红花药材的HPLC指纹图谱研究[J] 中国药学杂志 2003,38(3):176-178
- [30] 袁萍, 洪筱坤. 云芝糖肽的HPLC分析方法的建立[J] 中成药 2002,24(9):698-700
- [31] 谢培山. 中药色谱指纹图谱[M] 人民卫生出版社, 2005: 122
- [32] 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沈阳药科大学学报[J] 2002,19(2):112-114
- [33] 侯晓蓉, 栾连军, 程翼宇. 冬虫夏草中核苷类成分的毛细管区带电泳定量分析研究[J] 中国中药杂志 2005,30(6):447-449
- [34] 戴敬, 鲁静, 林瑞超, 等. 高效毛细管电泳法测定四维灵芝液中核苷类成分的含量[J] 中国中药杂志 2002,27(9):665-668
- [35] 孙国祥, 孙毓庆, 毕开顺, 等. 色谱指纹图谱指数F和相对指数F_r的研究[J] 药学报 2004, 39(11):921-924
- [36] Sun Guoxiang(孙国祥), Wan Yuesheng(万月生), Sun Yuqing(孙毓庆), Bi Kaishun. Analytical Sciences, 2003, 19(10): 1395~1399
- [37] 王天松. 毛细管电泳与中草药指纹图谱[J] 中成药 2000,22(6):397-399
- [38] 谢莹, 林梅, 张正行, 等. 提高毛细管电泳重现性的几种方法[J] 药学进展 1999,23(5):261-264

前 言

动物药作为中药的重要组成部分，具有悠久的药用历史，历代本草中都有动物药的记载。《中国动物药志》收载动物药975种，药用动物1546种^[1]。可见，动物药的应用已成为中药不可缺少的一部分。动物药具有疗效高、活性强、应用广、潜力大的特点，越来越引起国内外学者的关注和重视，但是由于很多动物药近年来因资源日渐匮乏，而需求量又不断增加，其身价倍增。故有大量伪品、劣品、混淆品、习用品出现，严重地影响药材及其制剂的质量。因此，对动物药材品质评价研究势在必行，也是打破中药材质量控制瓶颈的关键。

中药材品质评价包括品种鉴定研究和质量评价研究两个部分。品种鉴定研究是药材品质评价的前提和基础。当前，中药材品种鉴定研究的主要方法是中药指纹图谱研究。目前，用于中药指纹图谱研究的方法分为色谱法和光谱法两类，以色谱法居多。色谱法包括高效液相色谱法(HPLC)、薄层色谱法(TLC)、气相色谱法(GC)及高效毛细管电泳色谱法(HPCE)等，其中以高效液相色谱法最常用，针对其分析特点，孙毓庆等^[2]总结了HPLC进行中药成分分析常遇到的一些问题：一是中药成分复杂，色谱柱易受污染，柱寿命短，且难以再生；二是色谱柱上沉积的污染物，经常以杂质峰的形式出现；三是分析运行成本高；四是对于含极性成分较多的中药，其“指纹”的特征性不强。同时，他提出了毛细管电泳色谱法在中药分析中的潜在优势，如柱效高、快速、进样体积小；抗污染能力强，前处理简单，甚至于不需要前处理；分析运行成本低；水溶性样品的“指纹”特征性强，如中药汤剂、注射剂的分析等；应用面较高效液相色谱法更广泛。HPCE除可分析小分子的酸、碱、盐及中性分子外，还可分析生物大分子(核酸、多肽和蛋白质等)及手性分子等。

动物药材因其化学成分复杂，分析起来难度较大。目前，对其指纹图谱研究较少，且由于动物药材化学成分的特殊性，多为大极性带电成分（如多肽、蛋白质等），使得毛细管电泳色谱指纹图谱更适于其品种鉴定的研究。故本课题选择在药材来源上具有代表性的常用动物药地龙（环节动物）；土鳖虫、僵蚕、蜈蚣（节肢动物）；蛤蚧、蕲蛇、乌梢蛇（爬行动物），收集其不同地区商品药材，采用高效毛细管电泳色谱法测定其指纹图谱，以夹角余弦为测度，应用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件计算相似度，建立各商品药材的共有模式。以期为动物药的品种鉴定、质量评价与控制提供理论依据和实验基础。

第一章 地龙药材商品高效毛细管电泳指纹图谱的研究

地龙 *Pheretima* 为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum*(E.Perrier)、通俗环毛蚓 *Pheretima vulgaris* Chen、威廉环毛蚓 *Pheretima guillelmi*(Michaelsen)或栉 zhi 盲环毛蚓 *Pheretima pectinifera* Michaelsen 的干燥体。前一种习称“广地龙”，后三种习称“沪地龙”。其味咸，性寒；归肝、脾、膀胱经。具有清热定惊，通络，平喘，利尿的功效；用于高热神昏，惊痫抽搐，关节痹痛，肢体麻木，肺热咳喘，尿少水肿等疾病的治疗^[3]。因其商品中品种较多，药材鉴定困难，为有效鉴别地龙药材品种，本实验采用高效毛细管电泳法（HPCE），对 21 批地龙药材商品进行指纹图谱研究，并进行了方法学考察，以期地为地龙的品种鉴定提供实验依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器：美国Agilent 3D毛细管电泳仪，DAD检测器，Agilent化学工作站。未涂层石英毛细管柱(50cm×75μm，有效长度40cm，安捷伦科技有限公司)；AS5150A超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)；TDL-5-A离心机(4000r/min)；PHS-25型pH计(上海盛磁仪器有限公司)；AR2140电子分析天平(METTLE公司)。

1.2 试药与试液：对照品 次黄嘌呤Hypoxanthine(Sigma-H9377，99%，进口分装广州宽林科技有限公司)；磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、硼砂、硼酸等试剂为市售分析纯；水为三级水；所用试剂均通过0.45μm微孔滤膜滤过。

1.3 实验材料：地龙药材为2007~2008年购于不同地区的商品药材，经康庭国教授鉴定，详见表1-1。

表 1-1 地龙药材商品来源及规格

编号	来源	采购地区及规格		
1 [#] ~21 [#]	广地龙 <i>Pheretima aspergillum</i> (E.Perrier)	1 [#] 湖北 (武汉)	6 [#] 海南 (海口)	
		2 [#] 北京	7 [#] 四川 (重庆)	
		3 [#] 山东 (济南)	8 [#] 内蒙古 (赤峰)	
		4 [#] 广东 (广州)	9 [#] 辽宁 (大连)	
		5 [#] 山东 (青岛)	10 [#] 江苏 (徐州)	
	沪地龙 <i>Pheretima vulgaris</i> Chen	11 [#] 山东 (济南)	17 [#] 山东 (青岛)	
		12 [#] 四川 (成都)	18 [#] 浙江 (杭州)	
		<i>Pheretima pectinifera</i> Michaelsen	13 [#] 广西 (南宁)	19 [#] 四川 (重庆)
			14 [#] 福建 (福州)	20 [#] 黑龙江 (哈尔滨)
		<i>Pheretima guillelmi</i> (Michaelsen)	15 [#] 上海	21 [#] 安徽 (亳州)
			16 [#] 江西 (九江)	

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备^[4]: 精密称定次黄嘌呤对照品适量, 用水溶解, 配制成浓度为 0.05mg/ml 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备^[5-7]: 分别称取 50℃ 恒温干燥的各地龙药材样品粉末 0.5g(过 100 目筛), 置具塞三角瓶中, 加 10ml 水, 超声 0.5h, 离心 20 min (3000r/min), 取上清液过 0.45μm 微孔滤膜作为供试品溶液。

2.3 毛细管电泳条件: 毛细管柱 (40 cm×75 μm), 缓冲溶液为 30mmol/L 硼砂 (pH9.45), 分离电压 15kV, 柱温 25℃, 检测波长 250nm, 压力进样: 30mbar×3s。进样前, 毛细管分别以 1 mol/L NaOH、水冲洗 5 min, 以运行缓冲液冲洗 10 min, 静止平衡 2 min。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验: 取同一供试品, 连续进样 5 次, 各共有指纹峰的相对保留时间 RSD≤0.44%, 各共有指纹峰相对峰面积 RSD≤4.3% (指纹图谱方法学考察要求为不大于 5%, 下同), 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验: 按“2.2项”方法平行制备供试液 5 份, 进样分析, 记录电泳图, 各共有指纹峰的相对保留时间 RSD≤0.56%, 各共有指纹峰相对峰面积的 RSD≤4.6% (不大于 5%), 表明方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验: 取一新制备的供试品溶液于 2、4、8、10、24 h 进样分析, 色谱图中各共有峰的相对保留时间 RSD≤0.59%, 各共有峰相对峰面积的 RSD≤4.3% (不大于 5%), 说明样品在 24h 内稳定。

2.5 指纹图谱的测定: 将对照品及各供试品溶液按上述电泳条件进行测试, 对照品测定结果见附图 1-22; 各样品测试结果见附图 1-1~1-21。

2.6 指纹图谱的建立及相似度计算: 将所得色谱图导入国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件, 经多点校正, 色谱峰自动匹配, 得到地龙 HPCE 指纹图谱共有模式 (见图 1-1); 同时生成地龙对照指纹图谱 R (见图 1-2), 以及相应的峰位和峰面积 (见表 1-2); 再导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004B)”软件进行相似度计算, 与对照图谱 R 比较, 21 份地龙药材商品的相似度结果见表 1-3。同理分别得出广地龙、沪地龙的相似度计算结果 (见表 1-4、1-5) 所选取的 8 个共有峰 (编号为 1、2、3、S、4、5、6、7), 作为构建指纹图谱的特征峰; 各样品的相对保留时间和相对峰面积构成了其指纹图谱特征, 结果见表 1-6、1-7。

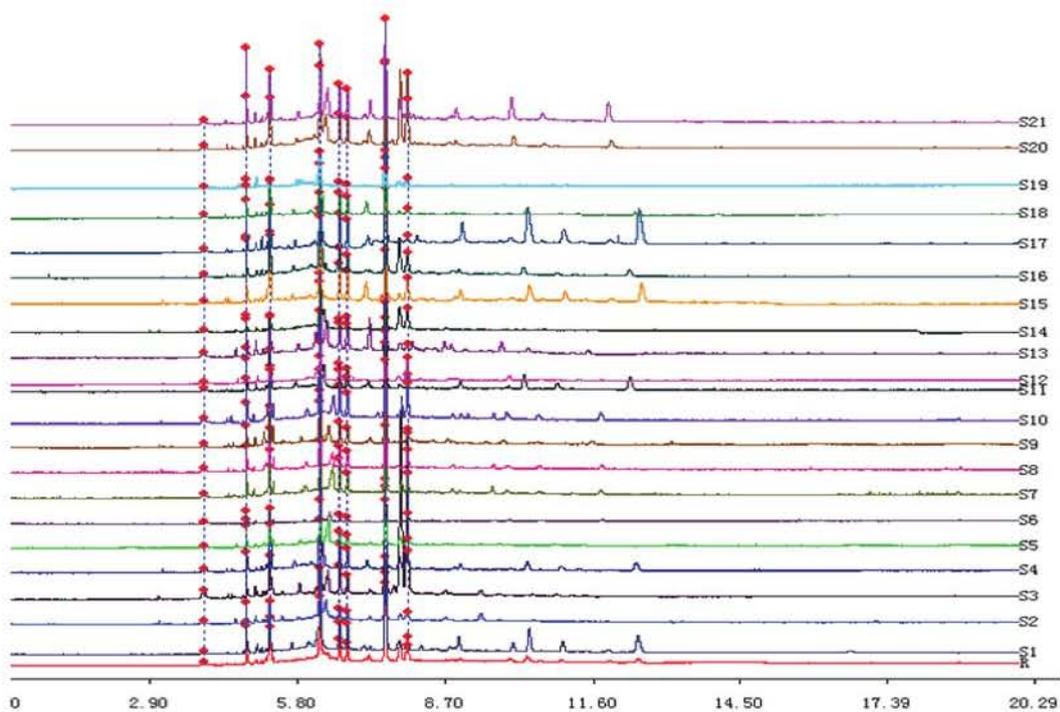


图1-1 地龙HPCE指纹图谱共有模式

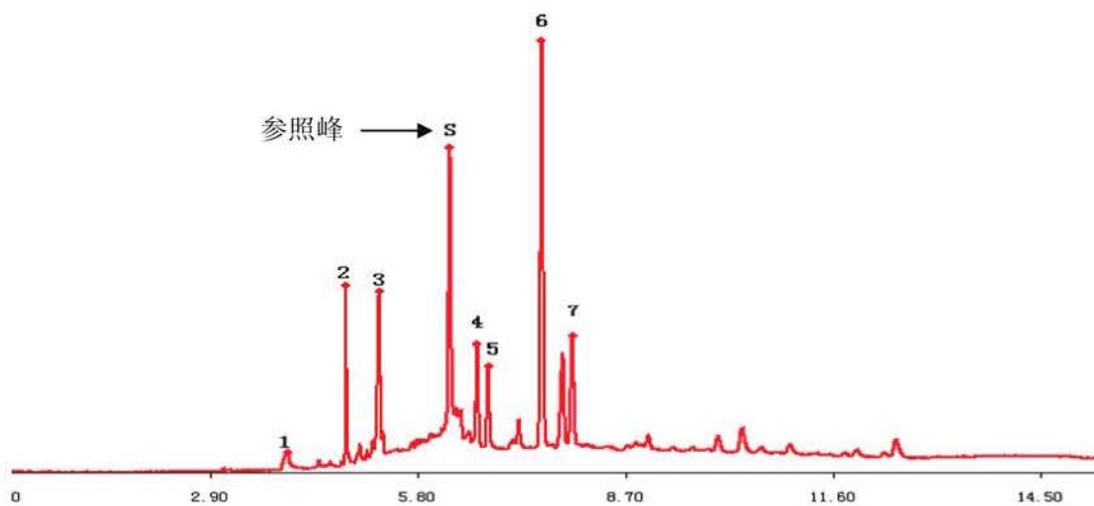


图1-2 地龙对照指纹图谱R

表1-2 地龙对照图谱峰位及峰面积

峰位 t	3.985	4.804	5.259	6.255	6.641	6.793	7.537	7.967
峰面积 A_s	5.6	7.7	20.5	36.8	12.0	10.1	52.1	17.3

表1-3 地龙药材商品相似度计算结果

样品编号	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]	6 [#]	7 [#]	8 [#]	9 [#]	10 [#]	11 [#]
相似度	0.846	0.912	0.719	0.959	0.859	0.932	0.874	0.948	0.949	0.940	0.849
样品编号	12 [#]	13 [#]	14 [#]	15 [#]	16 [#]	17 [#]	18 [#]	19 [#]	20 [#]	21 [#]	
相似度	0.853	0.899	0.868	0.928	0.966	0.821	0.968	0.868	0.791	0.825	

表1-4 广地龙药材商品相似度计算结果

样品编号	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]	6 [#]	7 [#]	8 [#]	9 [#]	10 [#]
相似度	0.828	0.950	0.710	0.907	0.934	0.971	0.915	0.956	0.984	0.936

表1-5 沪地龙药材商品相似度计算结果

样品编号	11 [#]	12 [#]	13 [#]	14 [#]	15 [#]	16 [#]	17 [#]	18 [#]	19 [#]	20 [#]	21 [#]
相似度	0.858	0.880	0.903	0.882	0.933	0.963	0.808	0.965	0.879	0.815	0.839

表1-6 地龙HPCE指纹图谱共有峰的相对保留时间

样品编号	共有峰编号							
	1	2	3	S	4	5	6	7
1	0.617	0.751	0.834	1	1.052	1.077	1.198	1.252
2	0.654	0.777	0.846	1	1.060	1.083	1.198	1.265
3	0.656	0.780	0.848	1	1.062	1.086	1.199	1.272
4	0.619	0.757	0.836	1	1.058	1.083	1.205	1.268
5	0.656	0.778	0.847	1	1.063	1.086	1.200	1.272
6	0.648	0.773	0.841	1	1.073	1.097	1.216	1.299
7	0.653	0.780	0.846	1	1.077	1.100	1.216	1.304
8	0.653	0.781	0.845	1	1.077	1.102	1.218	1.307
9	0.655	0.778	0.846	1	1.067	1.090	1.206	1.281
10	0.654	0.781	0.846	1	1.080	1.104	1.219	1.312
11	0.622	0.756	0.836	1	1.060	1.084	1.207	1.272
12	0.618	0.750	0.833	1	1.051	1.076	1.199	1.253
13	0.652	0.774	0.846	1	1.060	1.084	1.197	1.263
14	0.648	0.771	0.843	1	1.058	1.082	1.198	1.262
15	0.617	0.756	0.837	1	1.055	1.080	1.203	1.263
16	0.621	0.756	0.836	1	1.055	1.080	1.201	1.261
17	0.620	0.755	0.837	1	1.060	1.085	1.208	1.274
18	0.626	0.757	0.836	1	1.055	1.080	1.204	1.265
19	0.630	0.755	0.836	1	1.056	1.080	1.203	1.263
20	0.635	0.767	0.842	1	1.061	1.085	1.204	1.272
21	0.639	0.768	0.843	1	1.063	1.087	1.205	1.276
均值	0.638	0.767	0.841	0	1.062	1.086	1.205	1.274
RSD%	2.5	1.5	0.59	0	0.78	0.74	0.57	1.4

表1-7 地龙HPCE指纹图谱共有峰的相对峰面积

样品编号	共有峰编号							7
	1	2	3	S	4	5	6	
1	0.127	0.263	0.524	1	0.391	0.393	1.097	0.119
2	0.161	0.100	0.348	1	0.271	0.204	1.244	0.227
3	0.103	0.069	0.198	1	0.207	0.170	0.980	1.123
4	0.094	0.223	0.617	1	0.236	0.201	0.781	0.246
5	0.197	0.191	0.514	1	0.377	0.273	2.049	0.208
6	0.143	0.159	0.468	1	0.310	0.175	1.532	0.444
7	0.147	0.174	0.484	1	0.466	0.319	1.975	0.305
8	0.129	0.143	0.428	1	0.263	0.215	1.283	0.261
9	0.094	0.140	0.397	1	0.265	0.195	1.430	0.237
10	0.114	0.157	0.533	1	0.320	0.222	1.049	0.481
11	0.187	0.527	1.320	1	0.660	0.527	2.143	0.187
12	0.195	0.114	0.368	1	0.241	0.073	0.545	0.736
13	0.143	0.176	0.418	1	0.590	0.621	1.292	0.178
14	0.120	0.080	0.362	1	0.150	0.110	0.671	0.542
15	0.076	0.303	0.871	1	0.377	0.306	1.181	0.291
16	0.099	0.146	0.522	1	0.369	0.185	1.218	0.263
17	0.139	0.288	0.820	1	0.484	0.403	2.859	0.360
18	0.081	0.167	0.539	1	0.278	0.229	0.843	0.097
19	0.147	0.054	0.186	1	0.108	0.047	0.495	0.255
20	0.137	0.196	0.620	1	0.308	0.271	0.843	0.912
21	0.151	0.391	1.089	1	0.743	0.716	1.769	0.512
均值	0.133	0.193	0.554	0	0.353	0.278	1.299	0.380
RSD%	26	58	50	0	46	61	45	69

3 小结与讨论

3.1 按照《中药材指纹图谱的技术要求》（以下简称“要求”），相似度大于0.9的样品即可认为是同一品种。由表1-3可知，21份地龙药材商品相对于对照图谱R的相似度大于0.9的9份，小于0.9的12份。可见，各样品间的相似性存在一定差异，说明目前市场上地龙药材商品品种来源较复杂。

3.2 在收集到的21份地龙药材商品中，广地龙10份，沪地龙11份。分别对地龙两个品种的样品进行相似度计算，发现10批广地龙药材商品的相似度（见表1-4）除1[#]、3[#]样品外，其余样品均在0.9以上，说明广地龙的品种差异较小，来源单一；而沪地龙药材商品的相似度（见表1-5）仅4份样品在0.9以上，11[#]、12[#]、14[#]、19[#]样品的相似度接近0.9，表明沪地龙品种差异较大，这与其药材商品来源较多相吻合。因此，传统上认为广地龙质量

优于沪地龙是有道理的。

3.3 由表1-6可以看出，地龙药材指纹峰相对保留时间RSD%均不大于2.5%，可作为地龙商品药材品种鉴定的依据，而表1-7显示，各共有峰相对峰面积的RSD%值在26%~69%之间，表明其水溶性成分存在一定差异，这可能与地龙的品种复杂有关。因此，采用高效毛细管电泳法，不仅可以对地龙药材商品进行品种鉴别，还可以对其进行质量控制。

3.4 参照物的选择：据报道^[8]从地龙当中分离出来的次黄嘌呤具有抗组胺、降血压的作用，是地龙的活性成分之一，因此，本实验选择次黄嘌呤作为地龙指纹图谱的参照物，经过预实验，确定次黄嘌呤为指纹图谱当中的S号峰（保留时间为6.255）。

3.5 缓冲溶液的选择：电泳缓冲液的pH值影响管壁基团的解离度，不同的pH对应不同的 ζ ，对电渗会产生很大影响^[9]。谢培山^[10]提到在pH9的硼砂缓冲液中电渗速度约为2mm/s，而在pH3的背景电解质中电渗速度约减小1个数量级。因此，背景电解质的pH值通常要大于7。但张朝辉等^[11]对12种海马、海龙类药材蛋白质的分析选用了pH3.5的缓冲液。故本实验经对三种（邻苯二甲酸氢钾溶液pH4.00，磷酸二氢钾和磷酸氢二钠混合盐溶液pH6.86，硼砂溶液pH9.18）标准缓冲溶液进行考察，确定只有在碱性缓冲溶液（硼砂缓冲溶液pH9.18）中，基线稳定且色谱峰能够达到基线分离，因此选择硼砂为缓冲溶液。又分别配制浓度为10、20、30、40mmol/L的硼砂，测试结果以30mmol/L的分离效果最佳。

3.6 分离电压的选择^[12-16]：分别考察了电压在13~25KV时对分离效果的影响，发现随着分离电压的增加，迁移时间缩短，柱效提高。但电压在17KV以上时，由于焦耳热的影响，柱效降低，不利于组分分离，综合预实验结果，选择最佳分离电压15KV。

第二章 土鳖虫药材商品高效毛细管电泳指纹图谱的研究

土鳖虫 *Eupolyphaga seu 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, 其味咸, 性寒; 有小毒, 归肝经。具有破瘀血, 续筋骨功效; 用于筋骨折伤, 瘀血经闭, 癥瘕痞块的治疗^[3]。因其商品中存在原动物品种差异, 为有效鉴别土鳖虫药材商品, 本实验采用高效毛细管电泳法 (HPCE), 对 10 批土鳖虫药材商品进行指纹图谱研究, 并进行了方法学考察, 以期土鳖虫药材商品原动物的鉴别提供实验依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器: 见第一章1.1。

1.2 试药与试液: 对照品 尿嘧啶 Uracil(Sigma-U0750, 99%, 进口分装广州宽林科技有限公司); 对照药材 地鳖(中国药品生物制品检定所, 批号121533-200702); 冀地鳖(中国药品生物制品检定所, 批号121489-200602); 磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、硼砂、硼酸等试剂为市售分析纯; 水为三级水; 所用试剂均通过0.45 μ m微孔滤膜滤过。

1.3 实验材料: 土鳖虫药材为2006~2007年购于不同地区的商品药材, 经康庭国教授鉴定, 详见表2-1。

表 2-1 土鳖虫药材商品来源及规格

编号	来源	采购地区及规格
1 [#]	地鳖 <i>Eupolyphaga sinensis</i> Walker	山西太原, 生品
2 [#]	地鳖 <i>Eupolyphaga sinensis</i> Walker	安徽亳州, 生品
3 [#]	地鳖 <i>Eupolyphaga sinensis</i> Walker	辽宁沈阳, 生品
4 [#]	地鳖 <i>Eupolyphaga sinensis</i> Walker	四川成都, 生品
5 [#]	地鳖 <i>Eupolyphaga sinensis</i> Walker	河北安国, 生品
6 [#]	地鳖 <i>Eupolyphaga sinensis</i> Walker	北京, 生品
7 [#]	地鳖 <i>Eupolyphaga sinensis</i> Walker	江苏南京, 生品
8 [#]	地鳖 <i>Eupolyphaga sinensis</i> Walker	河南开封, 生品
9 [#]	地鳖 <i>Eupolyphaga sinensis</i> Walker	黑龙江哈尔滨, 生品
10 [#]	地鳖 <i>Eupolyphaga sinensis</i> Walker	吉林辽源, 生品

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备^[17]: 精密称定尿嘧啶对照品适量, 用水溶解, 配制成浓度为0.5mg/ml 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备^[5-7]:分别称取 50℃ 恒温干燥的各土鳖虫药材样品粉末约 0.5g(过 100 目筛), 置具塞三角瓶中, 加 10 ml 水, 超声 0.5h, 离心 20 min (3000r/min), 取上清液过 0.45 μ m 微孔滤膜作为供试品溶液。冀地鳖、地鳖对照药材制备方法同上。

2.3 毛细管电泳条件:毛细管柱 (40cm \times 75 μ m), 缓冲溶液为 20mmol/L 硼砂 (pH9.44), 分离电压 13kV, 柱温 25℃, 检测波长 265nm, 压力进样: 30mbar \times 3s。进样前, 毛细管分别以 1 mol/L NaOH、水冲洗 5 min, 以运行缓冲液冲洗 10 min, 静止平衡 2 min。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验:取同一供试品, 连续进样 5 次, 各共有峰的相对保留时间 RSD \leq 0.79%, 各共有峰相对峰面积 RSD \leq 4.9% (低于指纹图谱方法学考察要求 5%, 下同), 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验:按“2.2项”方法平行制备供试液 5 份, 进样分析, 记录电泳图, 各共有峰的相对保留时间 RSD \leq 4.0%, 各共有峰相对峰面积的 RSD \leq 4.8% (低于 5%), 表明方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验:取一新制备的供试品溶液于 2、4、8、10、24 h 进样分析, 色谱图中各共有峰的相对保留时间 RSD \leq 0.49%, 各共有峰相对峰面积的 RSD \leq 4.9% (低于 5%), 说明样品在 24h 内稳定。

2.5 指纹图谱的测定:将对照品、对照药材及各供试品溶液按上述电泳条件进行测试。对照品测定结果见附图 2-1; 对照药材测定谱图见图 2-1、2-2, 峰位及峰面积见表 2-2、2-3; 各样品测试结果见附图 2-2~2-11。

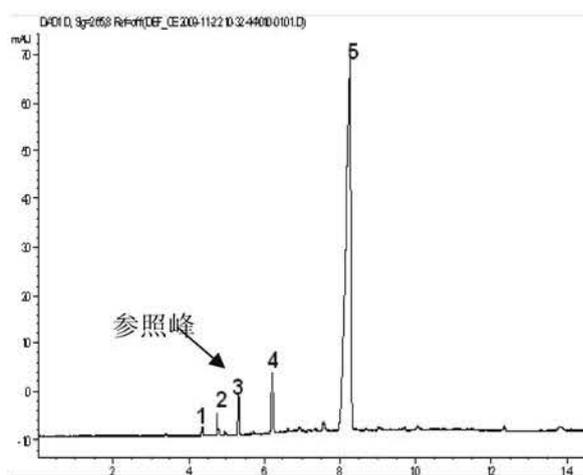


图2-1 冀地鳖对照药材HPLC图谱

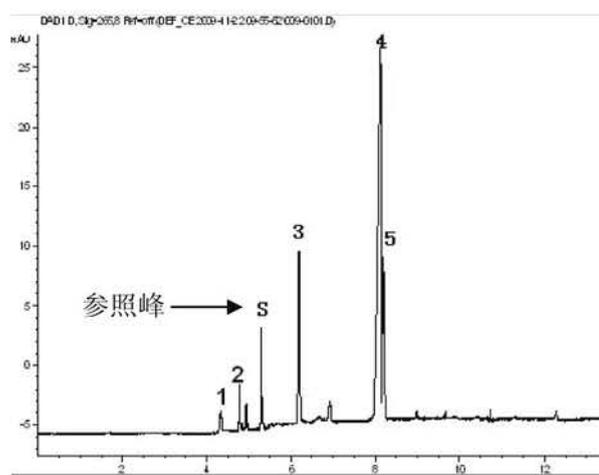


图2-2 地鳖对照药材指纹图谱R

表2-2 冀地鳖对照药材峰位及峰面积

峰位 t	4.352	4.768	5.309	6.204	8.269
峰面积 A_s	5.6	9.1	22.8	30.5	677.4

表2-3 地鳖对照药材峰位及峰面积

峰位 t	4.336	4.76	5.293	6.189	8.107	8.191
峰面积 A_s	6.2	6.7	19.5	32.4	141.9	38.2

2.6 指纹图谱的建立及相似度计算：将所得色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件，经多点校正，色谱峰自动匹配，得到土鳖虫HPCE指纹图谱共有模式（见图2-3）；同时，将各样品与地鳖对照药材图谱R比较，计算出10份土鳖虫药材商品的相似度，结果见表2-4。所选取的6个共有峰（编号为1、2、S、3、4、5），作为构建指纹图谱的特征峰；各样品的相对保留时间和相对峰面积构成了其指纹图谱特征，结果见表2-5、2-6。

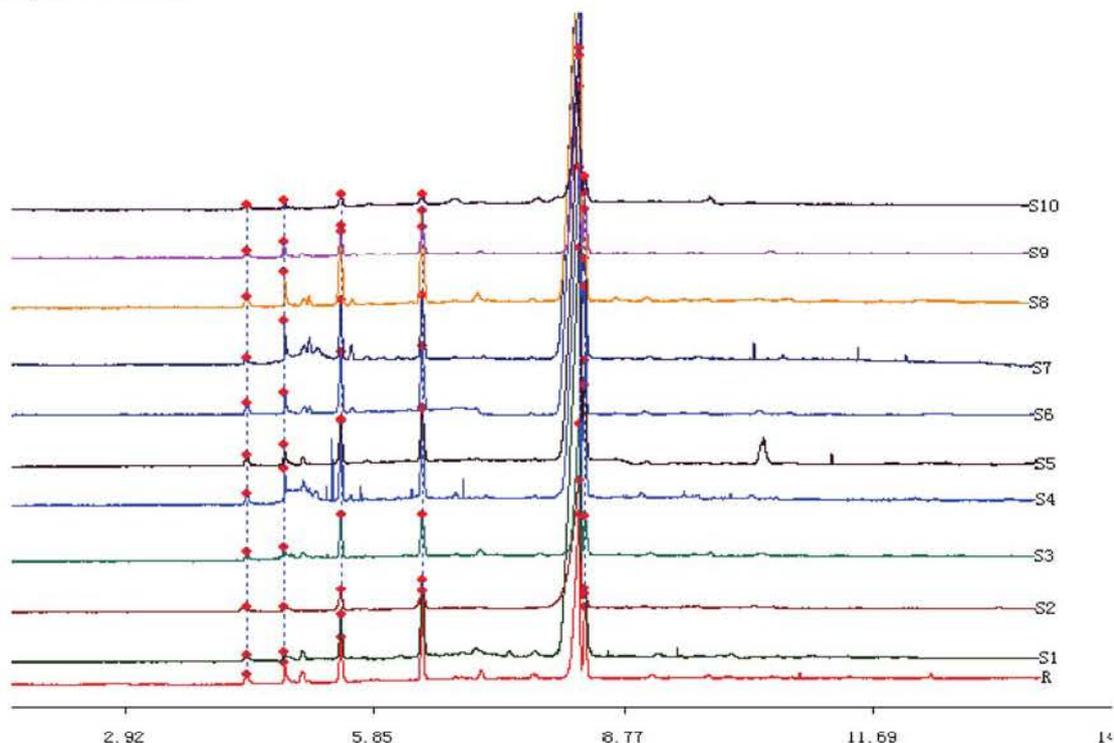


图2-3 土鳖虫HPCE指纹图谱共有模式

表2-4 土鳖虫药材商品指纹图谱相似度计算结果

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
相似度	0.962	0.966	0.997	0.987	0.963	0.950	0.958	0.975	0.982	0.970

表2-5 土鳖虫HPCE指纹图谱共有峰的相对保留时间

样品编号	共有峰编号					
	1	2	S	3	4	5
1	0.786	0.869	1	1.183	1.530	1.538
2	0.806	0.881	1	1.166	1.456	1.473
3	0.791	0.876	1	1.177	1.498	1.518
4	0.800	0.876	1	1.167	1.482	1.493
5	0.793	0.878	1	1.176	1.516	1.525
6	0.795	0.875	1	1.176	1.528	1.536
7	0.796	0.874	1	1.175	1.519	1.526
8	0.796	0.876	1	1.176	1.530	1.538
9	0.798	0.883	1	1.178	1.517	1.533
10	0.802	0.886	1	1.176	1.516	1.534
均值	0.796	0.877	0	1.175	1.509	1.521
RSD%	0.70	0.57	0	0.42	1.6	1.4

表2-6 土鳖虫HPCE指纹图谱共有峰的相对峰面积

样品编号	共有峰编号					
	1	2	S	3	4	5
1	0.267	0.272	1	2.160	20.96	1.646
2	0.450	0.275	1	1.064	19.62	0.936
3	0.230	0.471	1	1.155	21.81	1.342
4	0.236	0.094	1	1.406	18.74	1.744
5	0.286	0.306	1	1.379	23.44	1.621
6	0.221	0.239	1	1.200	24.00	0.319
7	0.132	0.620	1	1.307	21.19	1.202
8	0.163	0.218	1	1.308	13.25	1.120
9	0.321	0.343	1	1.246	19.07	2.164
10	0.574	0.368	1	0.956	21.88	2.794
均值	0.288	0.321	0	1.318	20.40	1.489
RSD%	46	45	0	25	15	46

3 小结与讨论

3.1 由表2-4可知,各土鳖虫药材商品相对于地鳖对照药材的相似度均在0.9以上。按“要求”相似度在0.9以上的样品,即可认为是同一品种,故收集到的10份土鳖虫药材商品品种一致,均为地鳖。

3.2 图2-1、2-2及表2-2、2-3显示，比较冀地鳖与地鳖对照药材的HPCE图谱，发现二者前4个色谱峰的迁移时间基本一致，仅最后一个色谱峰有所变化，地鳖分为两个峰，而冀地鳖此峰未分开。从整体上看，土鳖虫两个品种的对照药材图谱无明显差异，因此，传统中医以地鳖与冀地鳖同等入药使用是科学的。

3.3 由表2-5可以看出，土鳖虫药材各样品指纹峰相对保留时间的RSD%均不大于1.6%，可作为土鳖虫药材商品的鉴定依据，而表2-6显示，各样品共有峰相对保留峰面积的RSD%值在15%~46%之间，说明现有的土鳖虫药材商品，水溶性成分含量存在一定差异，这可能与土鳖虫原动物的品种差异有关，所以，应用HPCE技术不仅可以对土鳖虫药材的品种进行鉴别，还可对其进行质量控制。

3.4 参照物的选择：据报道^[18]，已有人采用高效液相色谱法测定土鳖虫当中尿嘧啶的含量，因此本实验选择尿嘧啶作为土鳖虫指纹图谱的参照物，标定各样品共有峰的相对保留时间及相对峰面积。通过试验，确定尿嘧啶为对照药材指纹图谱R里的S号峰（保留时间为5.293）。

3.5 缓冲溶液的选择^[12-17]：比较了磷酸盐和硼酸盐两种缓冲体系，后者基线平稳，重现性较好；又比较了硼砂和硼砂-硼酸缓冲体系，发现采用硼砂获得的指纹信息更多，因此选择硼砂为背景电解质溶液。分别配制浓度为10、20、30、40mmol/L的硼砂，测试结果以20mmol/L的分离效果最佳。

3.6 分离电压的选择^[12-16]：分别考察了电压在10~18KV时对分离效果的影响，发现随着分离电压的增加，迁移时间缩短，柱效提高。但电压在15KV以上时，由于焦耳热的影响，柱效降低，经比较，选择分离电压13KV。

第三章 僵蚕药材商品高效毛细管电泳指纹图谱的研究

僵蚕 *Bombyx batryticatus* 为蚕蛾科昆虫家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus 4~5 龄的幼虫感染（或人工接种）白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuillant 而致死的干燥体，其味咸、辛，性平；归肝、肺、胃经。具有祛风定惊，化痰散结的功效；用于惊风抽搐，咽喉肿痛，皮肤瘙痒等疾病的治疗^[3]。因其商品中规格较多，为有效鉴别僵蚕药材品种，本实验采用高效毛细管电泳法（HPCE），对 10 批僵蚕药材商品进行指纹图谱研究，并进行了方法学考察，以期为僵蚕的品种鉴定提供实验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂：见第一章 1.1~1.2，未涂层毛细管柱(65 cm×50 μm，有效长度55cm，郑州英诺高科有限公司)。对照品：黄嘌呤Xanthine(Lot: A013646201，98%，ACROS ORGANICS)；次黄嘌呤Hypoxanthine(Sigma-H9377，99%，进口分装广州宽林科技有限公司)；尿嘧啶Uracil(Sigma-U0750，99%，进口分装广州宽林科技有限公司)；腺苷 Adenosine Sigma(Lot: 950753，99%，进口分装上海化学试剂分装厂)。

1.2 实验材料：僵蚕药材为2006~2007年购于不同地区的商品药材，经康庭国教授鉴定，详见表3-1。

表 3-1 僵蚕药材商品来源及规格

编号	来源	采购地区及规格
1 [#]	僵蚕 <i>Beauveria bassiana</i> Vuillant	北京，生品
2 [#]	僵蚕 <i>Beauveria bassiana</i> Vuillant	河北安国，炮制品
3 [#]	僵蚕 <i>Beauveria bassiana</i> Vuillant	辽宁沈阳，生品
4 [#]	僵蚕 <i>Beauveria bassiana</i> Vuillant	安徽亳州，生品
5 [#]	僵蚕 <i>Beauveria bassiana</i> Vuillant	黑龙江哈尔滨，生品
6 [#]	僵蚕 <i>Beauveria bassiana</i> Vuillant	河南开封，生品
7 [#]	僵蚕 <i>Beauveria bassiana</i> Vuillant	江苏南京，生品
8 [#]	僵蚕 <i>Beauveria bassiana</i> Vuillant	吉林辽源，炮制品
9 [#]	僵蚕 <i>Beauveria bassiana</i> Vuillant	四川成都，炮制品
10 [#]	僵蚕 <i>Beauveria bassiana</i> Vuillant	山西太原，炮制品

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备^[5-7,17]: 分别称取 50℃ 恒温干燥的各僵蚕药材样品粉末 0.5g(过 100 目筛), 置具塞三角瓶中, 加 10 ml 水, 超声 0.5h, 离心 20 min (3000r/min), 取上清液过 0.45μm 微孔滤膜作为供试品溶液。

2.2 毛细管电泳条件: 毛细管柱(55 cm×50 μm), 缓冲溶液为30mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸(pH8.6), 分离电压18KV, 柱温25℃, 检测波长245nm, 压力进样: 30mbar×3s。进样前, 毛细管分别以1 mol/L NaOH、水冲洗5 min, 以运行缓冲液冲洗10 min, 静止平衡2 min。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验: 取同一供试品, 连续进样5次, 各共有指纹峰的相对保留时间RSD≤3.4%, 各共有指纹峰相对峰面积RSD≤4.0% (指纹图谱方法学考察要求为不大于5%, 下同), 表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验: 按“2.1项”方法平行制备供试液5份, 进样分析, 记录电泳图, 各共有指纹峰的相对保留时间RSD≤3.8%, 各共有指纹峰相对峰面积的RSD≤4.7% (不大于5%), 表明方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验: 取一新制备的供试品溶液于2、4、8、10、24 h进样分析, 色谱图中各共有峰的相对保留时间RSD≤1.2%, 各共有峰相对峰面积的RSD≤4.3% (不大于5%), 说明样品在24h内稳定。

2.4 指纹图谱的测定: 将各供试品溶液按上述电泳条件进行测试, 测试结果见附图3-1~3-10。

2.5 指纹图谱的建立及相似度计算: 将所得色谱图导入国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件, 经多点校正, 色谱峰自动匹配, 得到僵蚕HPCE指纹图谱共有模式 (见图3-1); 同时生成僵蚕对照指纹图谱R (见图3-2), 以及相应的峰位和峰面积 (见表3-2); 再导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004B)”软件进行相似度计算, 与对照图谱R比较, 10批僵蚕药材商品的相似度结果见表3-3。所选取的8个共有峰 (编号为1、2、3、4、S、5、6、7), 作为构建指纹图谱的特征峰; 各样品的相对保留时间和相对峰面积构成了其指纹图谱特征, 结果见表3-4、3-5。

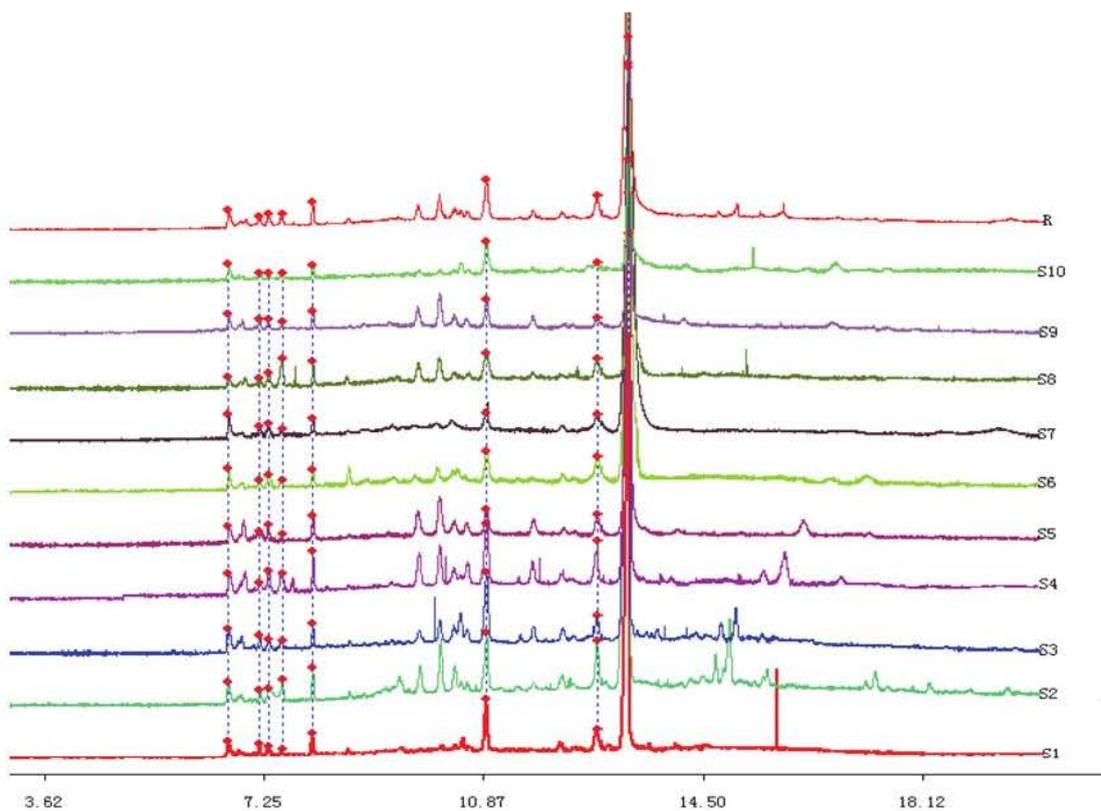


图3-1 僵蚕HPCE指纹图谱共有模式

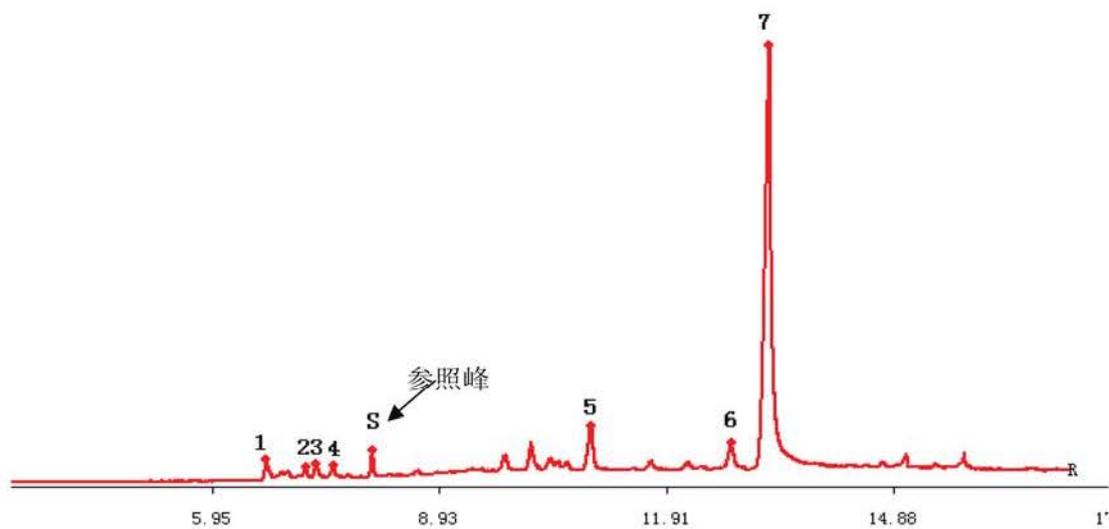


图3-2 僵蚕对照指纹图谱R

表3-2 僵蚕对照图谱峰位及峰面积

峰位 t	6.663	7.152	7.305	7.51	8.054	10.925	12.751	13.254
峰面积 A_s	3.6	2.3	2.7	2.4	3	9.6	6.1	120.7

表3-3 僵蚕药材商品指纹图谱相似度计算结果

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
相似度	0.997	0.992	0.996	0.973	0.992	0.998	0.996	0.994	0.959	0.982

表3-4 僵蚕HPCE指纹图谱共有峰的相对保留时间

共 有 峰 编 号								
样品编号	1	2	3	4	S	5	6	7
1	0.852	0.910	0.926	0.953	1	1.301	1.511	1.548
2	0.843	0.914	0.934	0.947	1	1.305	1.481	1.536
3	0.844	0.907	0.924	0.951	1	1.303	1.478	1.530
4	0.827	0.884	0.898	0.916	1	1.350	1.559	1.615
5	0.822	0.882	0.899	0.941	1	1.350	1.568	1.623
6	0.816	0.887	0.908	0.939	1	1.376	1.631	1.700
7	0.808	0.880	0.899	0.936	1	1.419	1.656	1.727
8	0.821	0.889	0.904	0.944	1	1.401	1.669	1.683
9	0.821	0.885	0.903	0.941	1	1.362	1.598	1.652
10	0.826	0.895	0.915	0.946	1	1.380	1.617	1.683
均值	0.828	0.893	0.911	0.942	1	1.355	1.577	1.63
RSD%	1.7	1.4	1.4	1.1	0	3.1	4.4	4.4

表3-5 僵蚕HPCE指纹图谱共有峰的相对峰面积

共 有 峰 编 号								
样品编号	1	2	3	4	S	5	6	7
1	1.136	0.636	0.682	0.259	1	3.227	2.000	35.95
2	1.467	0.567	0.900	0.900	1	3.867	2.800	64.67
3	2.125	0.875	0.792	0.625	1	5.750	2.417	60.25
4	0.941	0.706	0.804	1.078	1	3.314	1.667	26.96
5	1.000	1.171	0.829	0.246	1	2.029	1.629	27.20
6	1.360	0.480	1.400	0.560	1	3.880	3.600	71.72
7	1.419	0.903	1.226	0.645	1	1.903	2.452	37.55
8	0.667	0.590	1.462	0.282	1	2.769	1.897	24.51
9	1.125	0.958	0.792	0.458	1	2.667	1.125	14.33
10	1.706	0.647	0.706	0.647	1	5.118	1.882	29.65
均值	1.295	0.753	0.959	0.570	1	3.452	2.147	39.28
RSD%	32	29	30	48	0	36	33	49

表3-6 僵蚕生品HPCE指纹图谱共有峰的相对峰面积

共有峰编号								
样品编号	1	2	3	4	S	5	6	7
1	1.136	0.636	0.682	0.259	1	3.227	2.000	35.95
3	2.125	0.875	0.792	0.625	1	5.750	2.417	60.25
4	0.941	0.706	0.804	1.078	1	3.314	1.667	26.96
5	1.000	1.171	0.829	0.246	1	2.029	1.629	27.20
6	1.360	0.480	1.400	0.560	1	3.880	3.600	71.72
7	1.419	0.903	1.226	0.645	1	1.903	2.452	37.55
均值	1.330	0.795	0.956	0.569	1	3.351	2.294	43.27
RSD%	33	30	30	54	0	42	32	43

表3-7 僵蚕制品HPCE指纹图谱共有峰的相对峰面积

共有峰编号								
样品编号	1	2	3	4	S	5	6	7
2	1.467	0.567	0.900	0.900	1	3.867	2.800	64.67
8	0.667	0.590	1.462	0.282	1	2.769	1.897	24.51
9	1.125	0.958	0.792	0.458	1	2.667	1.125	14.33
10	1.706	0.647	0.706	0.647	1	5.118	1.882	29.65
均值	1.241	0.691	0.965	0.572	1	3.605	1.926	33.29
RSD%	36	26	35	46	0	32	36	66

3 小结与讨论

3.1 由表3-3相似度计算结果，得到各僵蚕样品的HPCE指纹图谱相对于对照图谱R的相似度均大于0.9。按“要求”相似度大于0.9的样品，即可认为其品种一致。因此，收集的10份僵蚕药材商品间的相似性一致，表明目前市场上僵蚕药材商品为同一品种。

3.2 在收集的10个僵蚕药材商品中，2[#]、8[#]、9[#]、10[#]样品为炮制品，其余为生品。由表3-3相似度计算结果可知，生品的相似度普遍高于制品，且几乎都在0.99以上，说明生品间的相似程度更高，而制品间的相似性差异是否与其炮制方法和程度有关，有待进一步研究。

3.3 由表3-4可以看出，僵蚕各样品指纹峰相对保留时间RSD%均不大于4.4%，可作为僵蚕品种鉴定的依据；而表3-5显示，各样品共有峰的相对峰面积RSD%值在29%~49%之间，又分别对生品和制品共有峰相对峰面积进行计算，结果见表3-6、3-7，发现生品共

有峰相对峰面积的平均值接近或大于制品，且相对峰面积RSD%值（30%~54%）的差异要小于制品（26%~66%）。说明10批僵蚕药材商品水溶性成分存在一定差异，其含量生品高于制品，这可能与药材的炮制程度有关，同时也表明，采用高效毛细管电泳法，不仅可以对僵蚕药材商品进行品种鉴别，也可以进行质量控制。

3.4 缓冲溶液的选择：根据已有文献报道，张军等^[19]以10mmol/L磷酸二氢钠-20mmol/L硼砂溶液（pH8.62）作为僵蚕的缓冲溶液，本实验以该条件测试，发现基线不稳定，且干扰较大，故为10mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸溶液（pH8.6），该缓冲体系基线的稳定性和分离效果更理想；又分别配制20、30、40mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸缓冲液，经比较，结果以30mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸（pH8.6）分离效果最好。

3.5 分离电压的选择：本实验分别考察了电压在15~20KV时对分离效果的影响，综合预实验结果，选择最佳分离电压18KV。

第四章 蜈蚣药材商品高效毛细管电泳指纹图谱的研究

蜈蚣 *Scolopendra* 为蜈蚣科动物少棘巨蜈蚣 *Scolopendra subspinipes mutilans* L.Koch 的干燥体，其味辛，温；有毒，归肝经。具有息风镇痉、攻毒散结、通络止痛的功效；用于小儿惊风，抽搐痉挛，半身不遂，破伤风，风湿顽痹等疾病的治疗^[3]。为有效鉴别蜈蚣药材商品，本实验采用高效毛细管电泳法（HPCE），对 10 批蜈蚣药材商品进行指纹图谱研究，并进行了方法学考察，以期为蜈蚣药材商品鉴定提供实验依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器与试剂：见第三章**1.1**，未涂层毛细管柱（65 cm×50 μm，有效长度55cm，郑州英诺高科有限公司）。

1.2 实验材料：蜈蚣药材为2006~2007年购于不同地区的商品药材，经康庭国教授鉴定，详见表4-1。

表 4-1 蜈蚣药材商品来源及规格

编号	来源	采购地及规格
1 [#]	少棘巨蜈蚣 <i>Scolopendra subspinipes mutilans</i> L. Koch	北京，干燥品
2 [#]	少棘巨蜈蚣 <i>Scolopendra subspinipes mutilans</i> L. Koch	河南开封，干燥品
3 [#]	少棘巨蜈蚣 <i>Scolopendra subspinipes mutilans</i> L. Koch	黑龙江哈尔滨，干燥品
4 [#]	少棘巨蜈蚣 <i>Scolopendra subspinipes mutilans</i> L. Koch	江苏南京，干燥品
5 [#]	少棘巨蜈蚣 <i>Scolopendra subspinipes mutilans</i> L. Koch	辽宁大连，干燥品
6 [#]	少棘巨蜈蚣 <i>Scolopendra subspinipes mutilans</i> L. Koch	河北安国，干燥品
7 [#]	少棘巨蜈蚣 <i>Scolopendra subspinipes mutilans</i> L. Koch	四川成都，干燥品
8 [#]	少棘巨蜈蚣 <i>Scolopendra subspinipes mutilans</i> L. Koch	吉林辽源，干燥品
9 [#]	少棘巨蜈蚣 <i>Scolopendra subspinipes mutilans</i> L. Koch	安徽亳州，干燥品
10 [#]	少棘巨蜈蚣 <i>Scolopendra subspinipes mutilans</i> L. Koch	辽宁沈阳，干燥品

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备^[4-7]：分别称取 50℃恒温干燥的各蜈蚣药材样品粉末约 0.5g（过 100 目筛），置具塞三角瓶中，加 10 ml 水，超声 30 min，离心 20 min（3000r/min），取上清液过 0.45μm 微孔滤膜作为供试品溶液。

2.2 毛细管电泳条件：毛细管柱（55 cm×50 μm），缓冲溶液为40mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸（pH8.9），分离电压20KV，柱温25℃，检测波长256nm，压力进样：30mbar×3s。进样前，毛细管分别以1 mol/L NaOH、水冲洗5 min，以运行缓冲液冲洗10 min，静止平衡2 min。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验：取同一供试品，连续进样5次，各共有峰的相对保留时间RSD≤0.81%，各共有峰相对峰面积RSD≤4.3%（指纹图谱方法学考察要求为不大于5%，下同），表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验：按“2.1项”方法平行制备供试液5份，进样分析，记录电泳图，各共有峰的相对保留时间RSD≤0.23%，各共有峰相对峰面积的RSD≤4.8%（不大于5%），表明方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验：取一新制备的供试品溶液于2、4、8、10、24 h进样分析，色谱图中各共有峰的相对保留时间RSD≤0.24%，各共有峰相对峰面积的RSD≤4.6%（不大于5%），说明样品在24h内稳定。

2.4 指纹图谱的测定：将各供试品溶液按上述电泳条件进行测试，测试结果见附图4-1~4-10。

2.5 指纹图谱的建立及相似度计算：将所得色谱图导入国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件，经多点校正，色谱峰自动匹配，得到蜈蚣HPCE指纹图谱共有模式（见图4-1）；同时生成蜈蚣对照指纹图谱R（见图4-2），以及相应的峰位和峰面积（见表4-2）；再导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004B)”软件进行相似度计算，与对照图谱R比较，10批蜈蚣药材商品的相似度结果见表4-3。所选取的7个共有峰（编号为1、2、S、3、4、5、6），作为构建指纹图谱的特征峰；各样品的相对保留时间和相对峰面积构成了其指纹图谱特征，结果见表4-4、4-5。

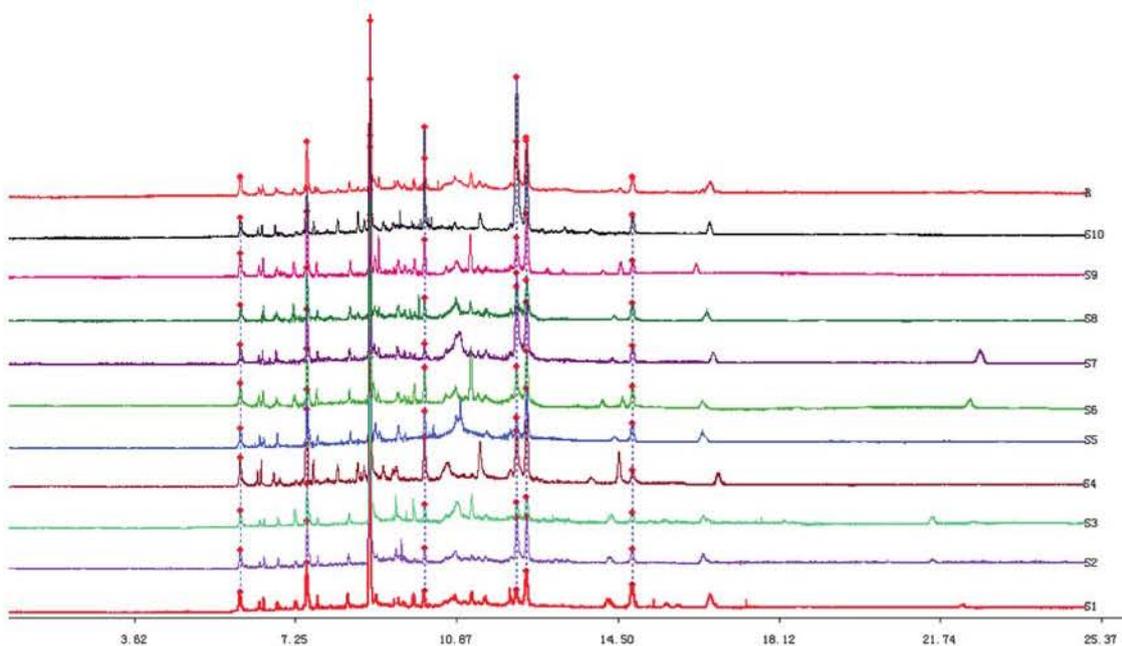


图4-1 蜈蚣HPLC指纹图谱共有模式

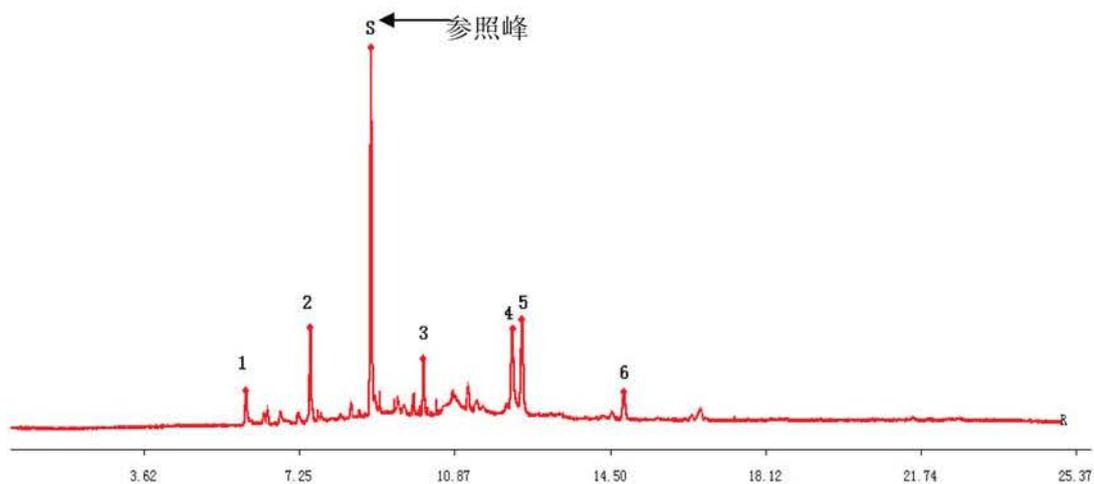


图4-2 蜈蚣对照指纹图谱R

表4-2 蜈蚣对照图谱峰位及峰面积

峰位 t	6.014	7.515	8.93	10.158	12.232	12.458	14.808
峰面积 A_s	3.8	7.9	28.8	3.8	11.6	11.4	3.9

表4-3 蜈蚣药材商品指纹图谱相似度计算结果

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
相似度	0.948	0.981	0.875	0.957	0.883	0.949	0.859	0.956	0.967	0.849

表4-4 蜈蚣HPCE指纹图谱共有峰的相对保留时间

样品编号	共有峰编号						
	1	2	S	3	4	5	6
1	0.673	0.838	1	1.141	1.644	1.675	1.983
2	0.678	0.841	1	1.139	1.632	1.661	1.957
3	0.678	0.841	1	1.141	1.634	1.664	1.958
4	0.680	0.842	1	1.142	1.633	1.663	1.952
5	0.682	0.845	1	1.144	1.634	1.664	1.949
6	0.678	0.843	1	1.144	1.643	1.673	2.007
7	0.678	0.843	1	1.146	1.649	1.678	1.980
8	0.680	0.845	1	1.145	1.639	1.668	1.961
9	0.682	0.846	1	1.145	1.638	1.667	1.996
10	0.655	0.838	1	1.114	1.579	1.610	1.944
均值	0.676	0.842	1	1.140	1.632	1.662	1.969
RSD%	1.1	0.33	0	0.82	1.2	1.2	1.1

表4-5 蜈蚣HPCE指纹图谱共有峰的相对保留峰面积

样品编号	共有峰编号						
	1	2	S	3	4	5	6
1	0.108	0.236	1	0.071	0.108	0.236	0.179
2	0.108	0.233	1	0.066	0.306	0.288	0.094
3	0.134	0.217	1	0.111	0.127	0.182	0.091
4	0.134	0.256	1	0.095	0.161	0.268	0.118
5	0.116	0.242	1	0.109	0.159	0.368	0.162
6	0.174	0.348	1	0.211	0.409	0.478	0.194
7	0.162	0.262	1	0.076	0.738	0.467	0.139
8	0.170	0.296	1	0.109	0.275	0.312	0.174
9	0.151	0.354	1	0.185	0.358	0.495	0.126
10	0.128	0.278	1	0.222	0.545	0.658	0.150
均值	0.139	0.272	1	0.125	0.319	0.375	0.143
RSD%	18	17	0	47	64	39	25

3 小结与讨论

3.1 按“要求”相似度大于0.9的样品即可认为其品种一致。由表4-3可知，各蜈蚣药材商品HPCE指纹图谱相对于对照图谱R的相似度除3[#]（0.875）、5[#]（0.883）、7[#]（0.859）、10[#]（0.849）样品外均大于0.9，但该4份样品的相似度接近0.9，因此，可认为收集到的10份蜈蚣药材商品品种基本一致。

3.2 由表4-4可以看出，蜈蚣各样品指纹峰相对保留时间的RSD%均不大于1.2%，可作为蜈蚣药材商品品种鉴定的依据；表4-5各共有峰相对峰面积的RSD%值在17%~64%之间，其中，相对峰面积差异最大的为4号共有峰（64%），对其影响显著的为7[#]与10[#]样品的相对峰面积，同时二者又是相似度最低的两个样品，说明样品相似度的大小对样品相对峰面积的差异有一定的影响，现有的蜈蚣药材商品其水溶性成分含量存在差异。故采用高效毛细管电泳法，不仅可以对蜈蚣药材商品进行品种鉴别，同时也可以作为其质量控制的方法。

3.3 缓冲溶液的选择^[13-17]：比较了磷酸盐和硼酸盐两种缓冲体系，后者基线平稳，重现性较好；又比较了硼砂盐和硼砂-硼酸缓冲液，结果后者的分离效果好，故选择硼砂-硼酸缓冲液为背景电解质。比较了pH在8.4~9.0的缓冲液，结果以pH8.9分离效果较理想。分别配制20mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸、40mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸、60mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸的缓冲液，经比较，结果以40mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸分离效果最好。

3.4 分离电压的选择^[12-16]：分别考察了电压在15~24KV时对分离效果的影响，综合预实验结果，选择最佳分离电压20KV。

第五章 蛤蚧药材商品高效毛细管电泳指纹图谱的研究

蛤蚧 *Gekko* 为传统中药材，来源于壁虎科动物蛤蚧 *Gekko gekko* Linnaeus 的干燥去内脏全体。其味咸，性平。归肺、肾经，具有补肺益肾、纳气定喘、助阳益精的功效；用于虚喘气促，劳嗽咳血，阳萎遗精^[3]。据报道，蛤蚧中含核苷类^[5]和磷脂类^[20]等多种成分，为有效鉴别蛤蚧药材商品，本实验采用高效毛细管电泳法（HPCE），对 10 批蛤蚧药材商品进行指纹图谱研究，并进行了方法学考察，以期为蛤蚧药材商品的品质评价提供实验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂：见第三章 1.1，未涂层石英毛细管柱(60 cm×50μm，有效长度 50cm，郑州英诺高科有限公司)；乙腈为色谱纯。

1.2 实验材料：蛤蚧药材商品为2006~2007年购于不同地区，经康庭国教授鉴定，详见表5-1。

表 5-1 蛤蚧药材商品来源及规格

编号	来源	采购地区及规格
1 [#]	蛤蚧 <i>Gekko gekko</i> Linnaeus	黑龙江哈尔滨，干燥品
2 [#]	蛤蚧 <i>Gekko gekko</i> Linnaeus	吉林辽源，干燥品
3 [#]	蛤蚧 <i>Gekko gekko</i> Linnaeus	河南开封，干燥品
4 [#]	蛤蚧 <i>Gekko gekko</i> Linnaeus	内蒙古赤峰，干燥品
5 [#]	蛤蚧 <i>Gekko gekko</i> Linnaeus	河北安国，干燥品
6 [#]	蛤蚧 <i>Gekko gekko</i> Linnaeus	北京，干燥品
7 [#]	蛤蚧 <i>Gekko gekko</i> Linnaeus	山西太原，干燥品
8 [#]	蛤蚧 <i>Gekko gekko</i> Linnaeus	江苏南京，干燥品
9 [#]	蛤蚧 <i>Gekko gekko</i> Linnaeus	辽宁大连，干燥品
10 [#]	蛤蚧 <i>Gekko gekko</i> Linnaeus	安徽亳州，干燥品

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备^[5-7]：分别称取 50℃恒温干燥的各蛤蚧药材样品粉末约 1g（过 100 目筛），置具塞三角瓶中，加 15ml 水，超声 30min，离心 20min（3000r/min），取上清液过 0.45μm 微孔滤膜作为供试品溶液。

2.2 毛细管电泳条件：毛细管柱（50cm×50μm），缓冲溶液为10mmol/L硼砂-1%乙腈（pH9.18），分离电压20kV，柱温25℃，检测波长245nm，压力进样：30mbar×3s。进样前，毛细管分别以1 mol/L NaOH、水冲洗5min，以运行缓冲液冲洗10min，静止平衡2min。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验：取同一供试品，连续进样5次，各共有峰的相对保留时间RSD≤0.26%，各共有峰相对峰面积RSD≤4.9%（指纹图谱方法学考察要求为不大于5%，下同），表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验：按“2.1项”方法平行制备供试液5份，进样分析，记录电泳图，各共有峰的相对保留时间RSD≤0.25%，各共有峰相对峰面积的RSD≤3.9%（不大于5%），表明方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验：取一新制备的供试品溶液于2、4、8、10、24 h进样分析，色谱图中各共有峰的相对保留时间RSD≤0.09%，各共有峰相对峰面积的RSD≤4.2%（不大于5%），说明样品在24h内稳定。

2.4 指纹图谱的测定：将各供试品溶液按上述电泳条件进行测试，测试结果见附图5-1~5-10。

2.5 指纹图谱的建立及相似度计算：将所得色谱图导入国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件，经多点校正，色谱峰自动匹配，得到蛤蚧HPCE指纹图谱共有模式（见图5-1）；同时生成蛤蚧对照指纹图谱R（见图5-2），以及相应的峰位和峰面积（见表5-2）；再导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004B)”软件进行相似度计算，与对照图谱R比较，10批蛤蚧药材商品的相似度评价结果见表5-3。所选取的7个共有峰（编号为S、1、2、3、4、5、6），作为构建指纹图谱的特征峰；各样品的相对保留时间和相对峰面积构成了其指纹图谱特征，结果见表5-4、5-5。

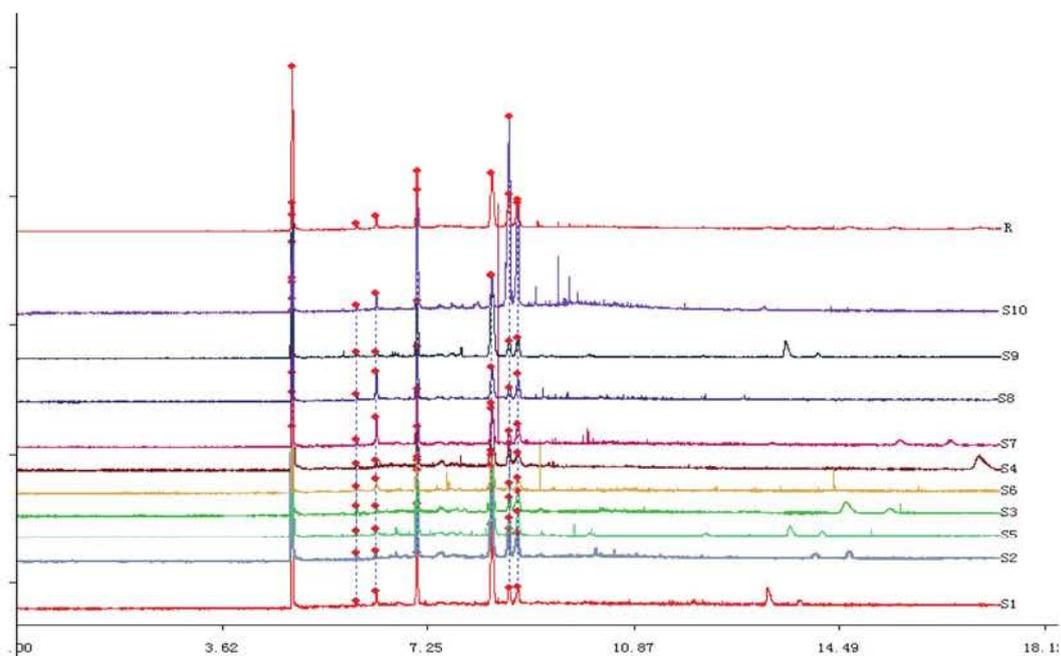


图5-1 蛤蚧HPLC指纹图谱共有模式

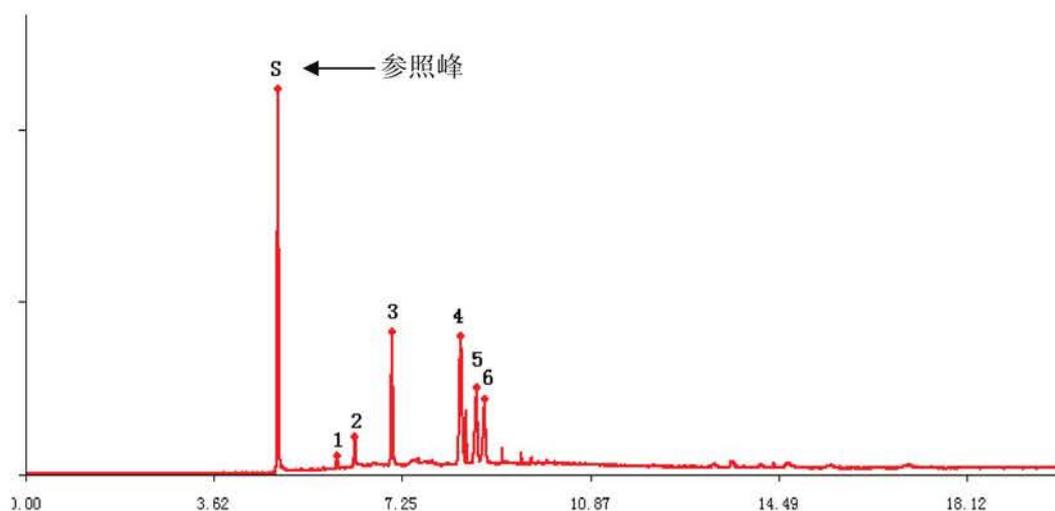


图5-2 蛤蚧对照指纹图谱R

表5-2 蛤蚧对照图谱峰位及峰面积

峰位 t	4.865	6.004	6.348	7.064	8.386	8.692	8.846
峰面积 A_s	40.9	1.5	3.4	15.6	26.4	12.9	11.7

表5-3 蛤蚧药材商品指纹图谱相似度计算结果

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
相似度	0.974	0.987	0.967	0.963	0.976	0.990	0.910	0.961	0.979	0.526

表5-4 蛤蚧HPCE指纹图谱共有峰的相对保留时间

共 有 峰 编 号							
样品编号	S	1	2	3	4	5	6
1	1	1.231	1.301	1.423	1.668	1.725	1.753
2	1	1.186	1.241	1.443	1.709	1.772	1.803
3	1	1.244	1.319	1.453	1.732	1.801	1.834
4	1	1.198	1.258	1.486	1.805	1.888	1.927
5	1	1.244	1.314	1.439	1.688	1.741	1.770
6	1	1.266	1.348	1.496	1.809	1.877	1.916
7	1	1.257	1.336	1.475	1.767	1.831	1.866
8	1	1.248	1.324	1.456	1.730	1.790	1.822
9	1	1.241	1.312	1.434	1.680	1.732	1.760
10	1	1.229	1.296	1.412	1.643	1.701	1.723
均值	0	1.234	1.305	1.452	1.723	1.786	1.818
RSD%	0	2.0	2.5	1.9	3.3	3.6	3.8

表5-5 蛤蚧HPCE指纹图谱共有峰的相对保留峰面积

共 有 峰 编 号							
样品编号	S	1	2	3	4	5	6
1	1	0.036	0.074	0.289	0.699	0.129	0.160
2	1	0.031	0.040	0.335	0.722	0.264	0.285
3	1	0.050	0.040	0.312	0.606	0.122	0.226
4	1	0.027	0.033	0.237	0.651	0.193	0.176
5	1	0.022	0.023	0.297	0.507	0.108	0.167
6	1	0.049	0.152	0.420	0.875	0.163	0.288
7	1	0.046	0.163	0.601	0.597	0.166	0.350
8	1	0.049	0.198	0.579	0.567	0.154	0.344
9	1	0.027	0.027	0.285	0.694	0.116	0.153
10	1	0.049	0.159	1.204	0.612	3.423	1.587
均值	0	0.039	0.091	0.456	0.653	0.484	0.374
RSD%	0	29	76	64	16	214	116

3 小结与讨论

3.1 由表5-3可知, 10份蛤蚧药材商品的HPCE图谱相对于对照图谱R的相似度除10[#]样品(0.526)外均大于0.9。按“要求”大于0.9的样品即可认为是同一品种, 但从各样品共有峰相对保留时间来看, 10[#]样品与其他样品并无差异, 表明其成分是相对一致的。因此, 可认为收集的10个蛤蚧样品品种基本一致。

3.2 由表5-4可以看出，蛤蚧各样品指纹峰的相对保留时间RSD%均不大于3.8%，可作为蛤蚧商品药材品种鉴定的依据；表5-5各共有峰相对峰面积的RSD%值在16%~214%之间，差异较大。其中，10[#]样品3、5、6号峰的相对峰面积显著高于其他样品，且其余共有峰的相对峰面积也高于整体平均水平，表明该样品水溶性成分与其他样品比较，含量较高。而该样品在蛤蚧商品药材相对关联度质量优劣排序中^[21]，10份样品排列第五位，质量中等，说明10[#]样品水溶性成分的含量对其整体质量有一定的影响。所以，采用HPCE法，不仅可以对蛤蚧药材商品进行品种鉴别，也可以对其进行质量控制。

3.3 在目前蛤蚧活性成分或指标性化学成分尚不是十分明确的情况下，制定指纹图谱时，没有适宜的对照品或内标物作为参照物，因此，以供试品中峰面积相对较大、出峰时间较稳定的电泳峰作为内参比峰，用它来代替内标峰，标定其他各共有指纹峰的相对迁移时间，以及计算其他各共有指纹峰面积的比值^[9]。

3.4 缓冲溶液的选择：在确定以硼砂为缓冲剂的基础上，分别考察了10、20、30mmol/L的硼砂溶液，虽然随着离子强度的增加，色谱峰迁移时间拉开，但是浓度过高会使分离度下降，因此，确定缓冲溶液浓度为10mmol/L。同时为改善电泳峰的峰形及分离度，本实验中又在硼砂缓冲液中添加了1%乙腈^[12-15, 22]，结果分离效果较好。

3.5 分离电压的选择^[12-16]：本实验分别考察了电压在15~24KV时对分离效果的影响，发现随着分离电压的增加，迁移时间缩短，柱效提高。但电压在22KV以上时，由于焦耳热的影响，柱效降低，不利于组分分离，综合预实验结果，选择最佳分离电压20KV。

第六章 蕲蛇药材商品高效毛细管电泳指纹图谱的研究

蕲蛇 *Agkistrodon* 为蝰科动物五步蛇 *Agkistrodon acutus* (Guenther) 的干燥体, 其味甘、咸, 温; 有毒, 归肝经。具有祛风, 通络, 止痉的功效; 用于风湿顽痹, 麻木拘挛, 中风口眼喎斜, 半身不遂, 破伤风等疾病的治疗^[3]。因其商品中混淆品较多, 药材鉴定较困难, 为有效鉴别蕲蛇药材商品, 本实验采用高效毛细管电泳法 (HPCE), 对 10 批蕲蛇药材商品进行指纹图谱研究, 并进行了方法学考察, 以期获得较为理想的效果。

1 仪器与试药

1.1 仪器与试剂: 见第三章 1.1, 未涂层毛细管柱(65 cm×50 μm, 有效长度55cm, 郑州英诺高科有限公司)。

1.2 实验材料: 蕲蛇药材为2006~2007年购于不同地区的商品药材, 经康庭国教授鉴定, 详见表6-1。

表 6-1 蕲蛇药材商品来源及规格

编号	来源	采购地区及规格
1 [#]	蕲蛇 <i>Agkistrodon acutus</i>	河南开封, 干燥品
2 [#]	蕲蛇 <i>Agkistrodon acutus</i>	上海, 干燥品
3 [#]	蕲蛇 <i>Agkistrodon acutus</i>	河北安国, 干燥品
4 [#]	蕲蛇 <i>Agkistrodon acutus</i>	辽宁大连, 干燥品
5 [#]	蕲蛇 <i>Agkistrodon acutus</i>	吉林敦化, 干燥品
6 [#]	蕲蛇 <i>Agkistrodon acutus</i>	辽宁沈阳, 干燥品
7 [#]	蕲蛇 <i>Agkistrodon acutus</i>	北京, 干燥品
8 [#]	蕲蛇 <i>Agkistrodon acutus</i>	江苏南京, 干燥品
9 [#]	蕲蛇 <i>Agkistrodon acutus</i>	辽宁抚顺, 干燥品
10 [#]	蕲蛇 <i>Agkistrodon acutus</i>	山东青岛, 干燥品

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备^[6-7]: 分别称取 50℃恒温干燥的各蕲蛇药材样品粉末约 0.5g (过 100 目筛), 置具塞三角瓶中, 加 10 ml 水, 超声 0.5h, 离心 20 min (3000r/min), 取上清液过 0.45μm 微孔滤膜作为供试品溶液。

2.2 毛细管电泳条件：毛细管柱（55 cm×50 μm），缓冲溶液为20mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸（pH8.4），分离电压19kV，柱温25℃，检测波长245nm，压力进样：30mbar×3s。进样前，毛细管分别以1 mol/L NaOH、水冲洗5 min，以运行缓冲液冲洗10 min，静止平衡2 min。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验：取同一供试品，连续进样5次，各共有峰的相对保留时间RSD≤0.83%，各共有峰相对峰面积RSD≤4.8%（指纹图谱方法学考察要求为不大于5%，下同），表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验：按“2.1项”方法平行制备供试液5份，进样分析，记录电泳图，各共有峰的相对保留时间RSD≤1.0%，各共有峰相对峰面积的RSD≤4.9%（不大于5%），表明方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验：取一新制备的供试品溶液于2、4、8、10、24 h进样分析，色谱图中各共有峰的相对保留时间RSD≤0.91%，各共有峰相对峰面积的RSD≤4.1%（不大于5%），说明样品在24h内稳定。

2.4 指纹图谱的测定：将各供试品溶液按上述电泳条件进行测试，测试结果见附图6-1~6-10。

2.5 指纹图谱的建立及相似度计算：将所得色谱图导入国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件，经多点校正，色谱峰自动匹配，得到蕲蛇HPCE指纹图谱共有模式（见图6-1）；同时生成蕲蛇对照指纹图谱R（见图6-2），以及相应的峰位和峰面积（见表6-2）；再导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004B)”软件进行相似度计算，与对照图谱R比较，10批蕲蛇药材商品的相似度结果见表6-3。所选取的7个共有峰（编号为1、2、3、S、4、5、6），作为构建指纹图谱的特征峰；各样品的相对保留时间和相对峰面积构成了其指纹图谱特征，结果见表6-4、6-5。

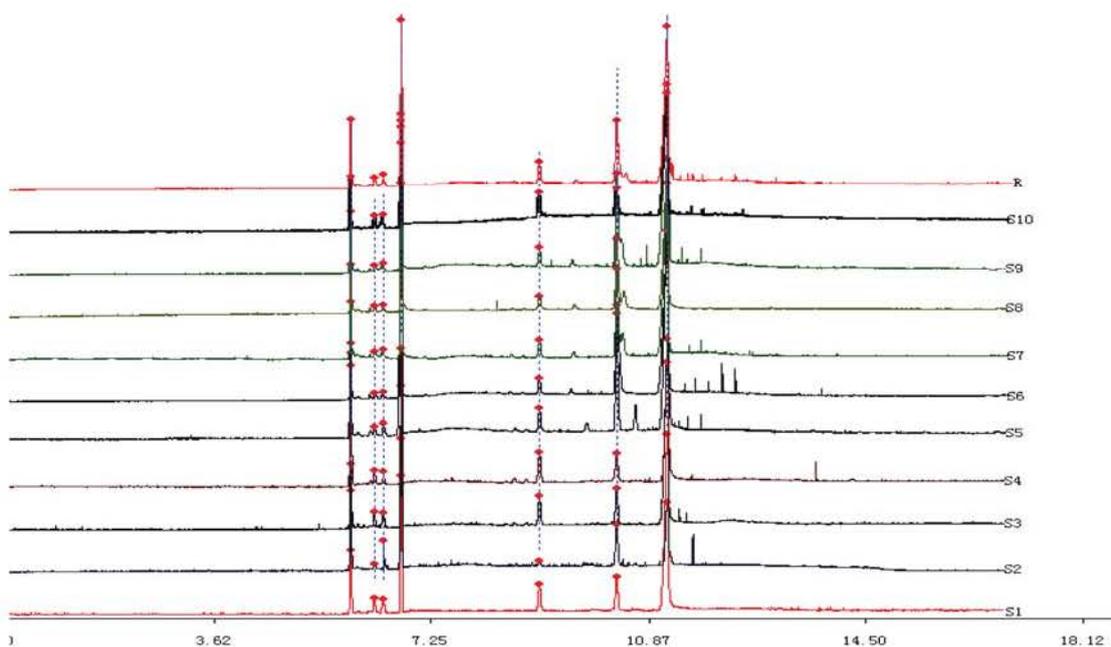


图6-1 蕪蛇HPCE指纹图谱共有模式

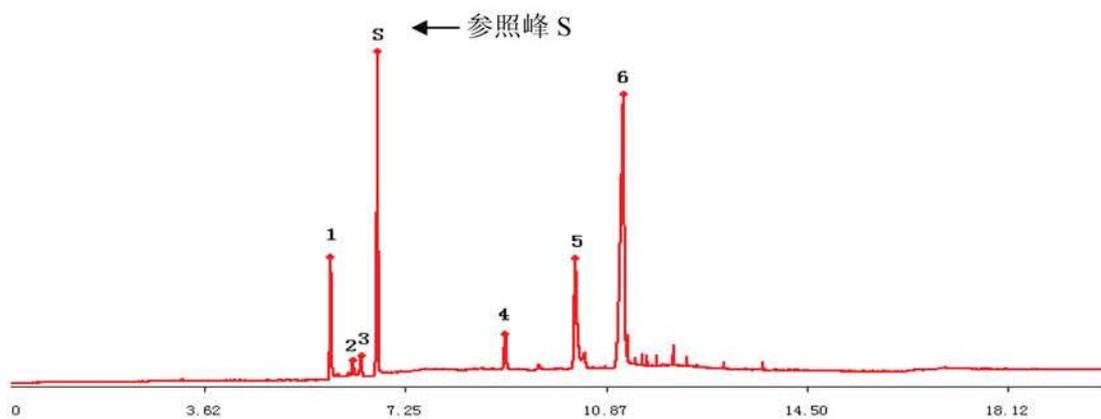


图6-2 蕪蛇对照指纹图谱R

表6-2 蕪蛇对照图谱峰位及峰面积

峰位 t	5.908	6.31	6.461	6.758	9.063	10.331	11.174
峰面积 A_s	18.1	3.9	4.0	42.1	8.4	26.5	97.6

表6-3 蕪蛇药材商品指纹图谱相似度计算结果

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
相似度	0.978	0.914	0.978	0.967	0.992	0.982	0.986	0.988	0.985	0.974

表6-4 蕲蛇HPCE指纹图谱共有峰的相对保留时间

样品编号	共有峰编号						
	1	2	3	S	4	5	6
1	0.880	0.932	0.963	1	1.360	1.554	1.707
2	0.886	0.938	0.963	1	1.340	1.519	1.652
3	0.881	0.933	0.963	1	1.355	1.545	1.694
4	0.876	0.935	0.962	1	1.377	1.583	1.743
5	0.880	0.938	0.962	1	1.354	1.538	1.696
6	0.863	0.929	0.947	1	1.316	1.514	1.603
7	0.870	0.936	0.949	1	1.316	1.495	1.587
8	0.875	0.933	0.954	1	1.321	1.498	1.597
9	0.864	0.934	0.948	1	1.329	1.520	1.622
10	0.868	0.932	0.952	1	1.328	1.514	1.610
均值	0.874	0.934	0.956	0	1.340	1.528	1.651
RSD%	0.90	0.31	0.74	0	1.6	1.8	3.3

表6-5 蕲蛇HPCE指纹图谱共有峰的相对保留峰面积

样品编号	共有峰编号						
	1	2	3	S	4	5	6
1	0.650	0.222	0.276	1	0.455	0.623	4.899
2	0.666	0.046	0.106	1	0.109	0.595	1.180
3	0.649	0.297	0.266	1	0.456	0.622	4.776
4	1.337	0.219	0.137	1	0.533	0.596	3.074
5	0.260	0.045	0.047	1	0.115	0.645	2.016
6	0.265	0.040	0.056	1	0.106	0.769	1.840
7	0.286	0.053	0.068	1	0.111	0.575	1.790
8	0.267	0.071	0.049	1	0.111	0.562	1.789
9	0.260	0.039	0.029	1	0.114	0.634	1.821
10	0.668	0.211	0.300	1	0.521	0.532	3.042
均值	0.531	0.124	0.133	0	0.263	0.615	2.623
RSD%	65	81	80	0	75	10	50

3 小结与讨论

3.1 由表6-3可知, 10份蕲蛇药材商品相对于对照图谱R的相似度在0.914~0.992之间, 按“要求”相似度大于0.9者为同一品种。可见, 10批蕲蛇样品与对照图谱R的相似程度一致, 表明收集的蕲蛇药材商品为同一品种。

3.2 由表6-4可以看出，蕲蛇药材商品各样品指纹峰的相对保留时间RSD%均不大于3.3%，可作为蕲蛇药材商品品种鉴定的依据；而表6-5各共有峰相对峰面积的RSD%值在10%~81%之间，表明现有的蕲蛇药材商品水溶性成分含量存在较大差异，这是否与原动物生活饲养条件及药材加工方法等有关，还有待进一步研究，同时也表明，HPCE技术不仅可以作为蕲蛇药材商品定性鉴别的方法，还可以对其进行质量控制。

3.3 缓冲溶液的选择^[16]：本实验比较了磷酸盐和硼酸盐两种缓冲体系，后者基线平稳，重现性较好；又比较了硼砂盐和硼砂-硼酸缓冲液，结果后者的分离效果好，故选择硼砂-硼酸缓冲液为背景电解质。比较了pH在8.0~9.0的缓冲液，结果以pH8.4分离效果较理想。分别配制20mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸、40mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸、60mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸的缓冲液，经比较，结果以20mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸分离效果最好。

3.4 分离电压的选择：分别对15~25KV电压进行考察，经比较其结果以电压19KV时分离效果最佳。

第七章 乌梢蛇药材商品高效毛细管电泳指纹图谱的研究

乌梢蛇 *Zaocys* 为游蛇科动物乌梢蛇 *Zaocys dhumnades* (Cantor) 的干燥体。其味甘，性平，归肝经，具有祛风，通络，止痉的功效；用于风湿顽痹，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，瘰疬恶疮^[3]。但因商品中混淆品较多，药材鉴定困难，为有效鉴别乌梢蛇药材品种，本实验采用高效毛细管电泳法（HPCE），对 10 批乌梢蛇药材商品进行指纹图谱研究，并进行了方法学考察，以期为乌梢蛇的品种鉴定提供实验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂：见第三章1.1，未涂层毛细管柱规格（70 cm×50 μm，有效长度60cm，郑州英诺高科有限公司）。

1.2 实验材料：乌梢蛇药材为2006~2007年购于不同地区的商品药材，经康庭国教授鉴定，详见表7-1。

表 7-1 乌梢蛇药材商品来源及规格

编号	来源	采购地区及规格
1 [#]	乌梢蛇 <i>Zaocys dhumnades</i>	北京，干燥品
2 [#]	乌梢蛇 <i>Zaocys dhumnades</i>	辽宁抚顺，干燥品
3 [#]	乌梢蛇 <i>Zaocys dhumnades</i>	安徽亳州，干燥品
4 [#]	乌梢蛇 <i>Zaocys dhumnades</i>	河南开封，干燥品
5 [#]	乌梢蛇 <i>Zaocys dhumnades</i>	河北安国，干燥品
6 [#]	乌梢蛇 <i>Zaocys dhumnades</i>	黑龙江哈尔滨，干燥品
7 [#]	乌梢蛇 <i>Zaocys dhumnades</i>	江苏南京，干燥品
8 [#]	乌梢蛇 <i>Zaocys dhumnades</i>	吉林辽源，干燥品
9 [#]	乌梢蛇 <i>Zaocys dhumnades</i>	辽宁大连，干燥品
10 [#]	乌梢蛇 <i>Zaocys dhumnades</i>	山西太原，干燥品

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备^[4-7,23]：分别称取 50℃恒温干燥的各乌梢蛇药材样品粉末约 0.5g（过 100 目筛），置具塞三角瓶中，加 10ml 50%乙醇，超声 25 min，离心 20 min（3000r/min），取上清液作为供试品溶液。

2.2 毛细管电泳条件：毛细管柱（60 cm×50 μm），缓冲溶液为80mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸（pH8.8），分离电压18KV，柱温25℃，检测波长230nm，压力进样：30mbar×3s。进样前，毛细管分别以1 mol/L NaOH、水冲洗5 min，以运行缓冲液冲洗10 min，静止平衡2 min。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验：取同一供试品，连续进样5次，各共有峰的相对保留时间RSD≤0.23%，各共有峰相对峰面积RSD≤4.7%（指纹图谱方法学考察要求为不大于5%，下同），表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验：按“2.1项”方法平行制备供试液5份，进样分析，记录电泳图，各共有峰的相对保留时间RSD≤0.26%，各共有峰相对峰面积的RSD≤4.7%（不大于5%），表明方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验：取一新制备的供试品溶液于2、4、8、10、24 h进样分析，色谱图中各共有峰的相对保留时间RSD≤0.63%，各共有峰相对峰面积的RSD≤5.0%（不大于5%），说明样品在24h内稳定。

2.4 指纹图谱的测定：将各供试品溶液按上述电泳条件进行测试，测试结果见附图7-1~7-10。

2.5 指纹图谱的建立及相似度计算：将所得色谱图导入国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件，经多点校正，色谱峰自动匹配，得到乌梢蛇HPCE指纹图谱共有模式（见图7-1）；同时生成乌梢蛇对照指纹图谱R（见图7-2），以及相应的峰位和峰面积（见表7-2）；再导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004B)”软件进行相似度计算，与对照图谱R比较，10批乌梢蛇药材商品的相似度结果见表7-3。所选取的7个共有峰（编号为1、S、2、3、4、5、6），作为构建指纹图谱的特征峰；各样品的相对保留时间和相对峰面积构成了其指纹图谱特征，结果见表7-4、7-5。

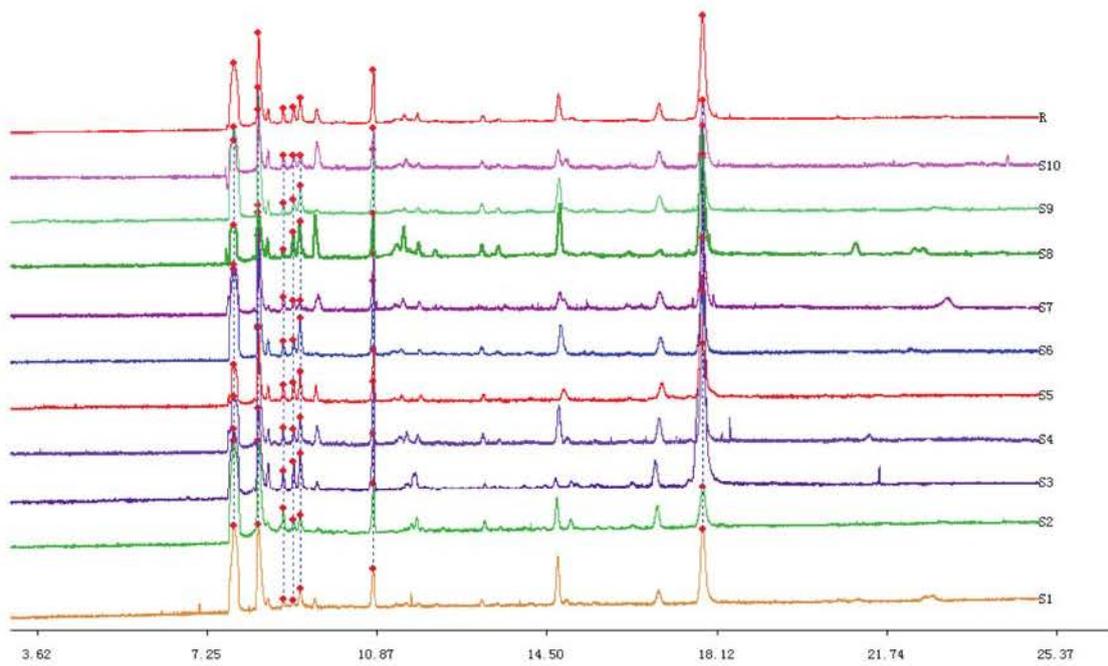


图7-1 乌梢蛇HPLC指纹图谱共有模式

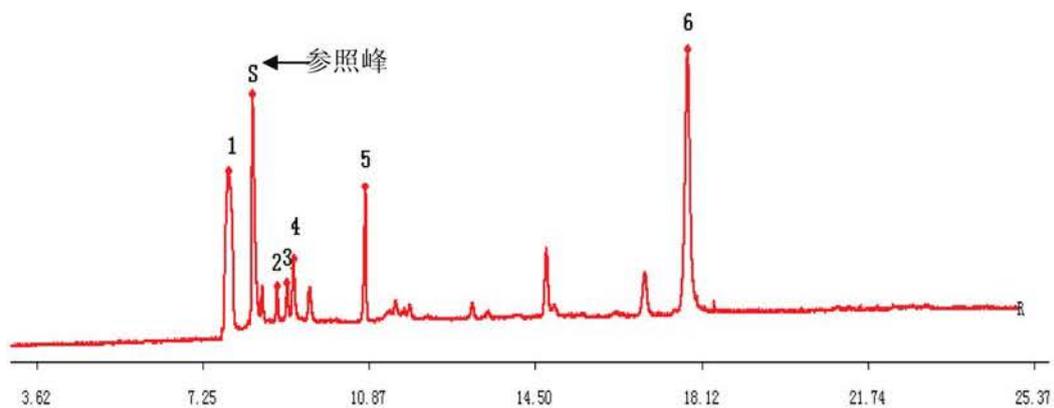


图7-2 乌梢蛇对照指纹图谱R

表7-2 乌梢蛇对照图谱峰位及峰面积

峰位 t	7.806	8.339	8.872	9.092	9.228	10.799	17.803
峰面积 A_s	31.9	20.8	2.2	2.5	4.9	8.1	38.4

表7-3 乌梢蛇药材商品指纹图谱相似度计算结果

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
相似度	0.961	0.865	0.891	0.987	0.927	0.942	0.986	0.923	0.914	0.982

表7-4 乌梢蛇HPCE指纹图谱共有峰的相对保留时间

样品编号	共有峰编号						
	1	S	2	3	4	5	6
1	0.933	1	1.063	1.089	1.107	1.289	2.166
2	0.932	1	1.062	1.089	1.107	1.284	2.149
3	0.934	1	1.061	1.087	1.105	1.285	2.137
4	0.938	1	1.066	1.092	1.108	1.294	2.134
5	0.939	1	1.063	1.089	1.104	1.294	2.064
6	0.934	1	1.065	1.091	1.107	1.303	2.133
7	0.937	1	1.066	1.095	1.111	1.306	2.167
8	0.940	1	1.090	1.105	1.146	1.296	2.114
9	0.934	1	1.066	1.092	1.107	1.300	2.143
10	0.941	1	1.066	1.093	1.109	1.302	2.194
均值	0.936	1	1.067	1.092	1.111	1.295	2.138
RSD%	0.32	0	0.78	0.48	1.1	0.59	1.7

表7-5 乌梢蛇HPCE指纹图谱共有峰的相对保留峰面积

样品编号	共有峰编号						
	1	S	2	3	4	5	6
1	1.870	1	0.073	0.063	0.160	0.317	0.880
2	1.949	1	0.122	0.063	0.126	0.319	0.594
3	1.465	1	0.167	0.194	0.325	0.393	5.472
4	1.089	1	0.085	0.098	0.234	0.379	1.413
5	1.041	1	0.171	0.203	0.341	0.553	3.211
6	1.928	1	0.090	0.112	0.305	0.480	1.063
7	1.137	1	0.104	0.081	0.085	0.403	1.318
8	1.271	1	0.287	0.512	0.597	0.442	3.395
9	1.911	1	0.069	0.105	0.223	0.364	0.842
10	1.467	1	0.100	0.133	0.161	0.361	1.439
均值	1.512	1	0.127	0.156	0.256	0.401	1.963
RSD%	25	0	52	86	58	18	80

3 小结与讨论

3.1 由表7-3可知, 10份乌梢蛇样品HPCE指纹图谱相对于对照图谱R的相似度除2[#]、3[#]样品外均大于0.9。按“要求”相似度大于0.9的样品被认为品种一致, 可见, 2[#]、3[#]样品(0.865、0.891)与对照图谱R的相似程度略低于其他样品, 因二者相似度接近0.9, 故目前市场上乌梢蛇药材商品的品种基本一致。

3.2 由表7-4可以看出，乌梢蛇药材各指纹峰相对保留时间RSD%均不大于1.7%，可作为乌梢蛇药材商品品种鉴定的依据；表7-5各共有峰相对峰面积的RSD%值在18%~86%之间，其中，2[#]样品的3号共有峰相对峰面积显著小于平均值，而3[#]样品的6号共有峰相对峰面积显著大于平均值，且这两个样品相似度低于0.9，说明样品的相似度与各共有峰相对峰面积值存在一定的相关性，现有的乌梢蛇药材商品在极性成分含量上存在一定差异。所以，HPCE色谱法不仅可以用于乌梢蛇药材商品的品种鉴别，也可用于其质量控制。

3.3 药材提取溶剂的选择^[4-7, 23]：分别以水及20%、40%、50%、60%乙醇为溶剂提取样品，进样分析，发现50%乙醇提取的样品所测得的电泳图谱较理想。因此，选50%乙醇作提取溶剂。

3.4 缓冲溶液的选择^[16]：在选定硼砂为缓冲剂的前提下，比较了硼酸盐和硼砂-硼酸混合液，结果后者的分离效果好；又比较了pH为8.4、8.6、8.8、9.0的缓冲液，结果以pH8.8分离效果较理想。分别配制40mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸、60mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸、80mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸、100mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸的缓冲液，经比较，结果以80mmol/L硼砂-0.2mol/L硼酸分离效果最好。

3.5 分离电压的选择：对15~20KV电压进行考察，综合预实验结果，以电压18KV时分离效果最佳。

分析讨论

1 对照药材及参照物的选择

依据中药材指纹图谱的技术要求，在制定药材指纹图谱时，应选择对照药材的图谱为对照指纹图谱，同时设定参照物，用以标定其他共有峰的相对保留时间，以及共有峰相对峰面积比值的计算，参照物可以是对照品、内标物或内参比峰。

1.1 在本实验所选用的地龙等七种动物药材商品中，2010 版药典规定了地龙、土鳖虫、蛤蚧有对照药材，而中国药品生物制品检定所仅提供了土鳖虫的对照药材，因此，除土鳖虫以外，其余动物药材的对照指纹图谱 R 均是由“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件拟合而成的。

1.2 土鳖虫、地龙药材商品的指纹图谱分别选择了尿嘧啶和次黄嘌呤为参照物。

1.3 依据僵蚕、蜈蚣、蛤蚧、蕲蛇、乌梢蛇中黄嘌呤、次黄嘌呤、尿嘧啶等核苷类成分含量测定的研究^[21, 24]，本实验在上述各药材商品测定指纹图谱的同时，分别进行了黄嘌呤、次黄嘌呤、尿嘧啶和腺苷对照品的测定，所得图谱与样品图谱比较，均未找到与各对照品对应的色谱峰，电泳图谱上又无位置插入内标峰，因此，僵蚕、蜈蚣、蛤蚧、蕲蛇、乌梢蛇药材商品指纹图谱均选择的是内参比峰，即电泳图谱上无干扰的迁移时间与峰高适宜的电泳峰，用它来代替内标峰，进而标定和考察其它电泳组分。

2 HPCE 模式的选择

在高效毛细管电泳中，为达到最佳的分离效果，首先需选好分离模式。由于所要分析研究的对象为极性范畴，而并非特指某一类极性成分，因此，以简单性、通用性为原则，首先考虑自由溶液分离模式，而其中，毛细管区带电泳（CZE）又是 HPCE 中最基本的电泳方式，且大部分已报道的相关文献^[4, 6, 9-14, 22, 25-30]也都是应用该模式，其介质的选择与控制方法也是其他分类模式的基础。所以，本实验选择了毛细管区带电泳作为指纹图谱的分析模式。

3 HPCE 缓冲溶液的选择

缓冲溶液的选择是影响待测样品分离效果的重要因素，它直接影响电渗淌度，对获得色谱峰的分离效果影响较大，包括电解质的种类、浓度及 pH 值。

3.1 pH 值范围: 一般来说, pH 值决定了电解质种类的选择, 因此, 应首先通过实验分别考察酸性 (pH3~5)、中性 (pH6~7)、碱性 (pH8~14) 环境的分离效果, 在此基础上, 进一步优化选出更好的 pH 值和电解质种类。本实验所筛选出的 pH 范围是在 8~10 之间。

3.2 电解质种类: 一般最常用的电解质为磷酸盐或硼酸盐的缓冲溶液, 也有硼酸盐和磷酸盐混合体系。本实验的缓冲体系基本上采用的是硼酸盐, 因磷酸盐含金属离子较多, 分离所需时间长, 且基线不稳定, 分离效果也远不如硼酸盐。

3.3 电解质浓度^[9]: 通常情况下, 分离度会随着电解质浓度的增加而增加, 但浓度太高, 会产生过多的焦耳热, 导致分离度下降。因此, 缓冲试剂的浓度一般控制在 10~200mmol/L 之间, 硼酸盐电导率较高, 多控制在 20mmol/L 左右, 而电导小的试剂如硼酸, 其浓度可在 100 mmol/L 以上。而本实验大多是选用 20 mmol/L 的硼酸盐及 200 mmol/L 的硼酸进行缓冲系统的筛选。

4 指纹图谱相似度评价方法

指纹图谱相似度的评价方法^[31]主要有峰重叠率法(Nei系数法)、距离系数法、夹角余弦法、相关系数法、指数相似系数等方法。

4.1 本实验是应用国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件来计算各药材的相似度, 原理为夹角余弦法, 即把每个色谱指纹图谱都可以看作一组对应保留时间下的峰面积或谱图数据点的数值, 可将这组数值看作多维空间中的向量, 使两个指纹图谱间相似性的问题转化为多维空间的两个向量的相似性问题, 利用 $\cos\theta$ 值来定量表征指纹图谱的相似性, $\cos\theta$ 越接近1说明两个向量越相似。

4.2 在指纹图谱研究中, 是以药材各样品的共有峰与参照物的保留时间和峰面积的比值, 作为其指纹图谱特征及定性依据, 本实验所选择的地龙等七种动物药材中, 各药材样品共有峰的相对保留时间, RSD%均在5%以内, 可作为各药材商品的品种鉴定依据; 而各药材样品共有峰的相对峰面积, RSD%值差异较大, 表明所选的七种动物药材商品其极性成分含量存在差异, 由于未能明确各样品共有峰为何种成分, 因此, 本实验的研究结果仅能说明七种动物药材商品的某些极性成分含量存在差异, 而不能判定各药材商品质量的优劣, 但能说明HPCE色谱技术除可用于动物药材的品种鉴别外, 还可作为其质量控制方法。

4.3 按照中药材指纹图谱的技术要求，相似度大于0.9的药材被认为是同一品种。从本实验得到的相似度计算结果中，发现可分为以下三种情况：

4.3.1 土鳖虫、僵蚕、蕲蛇各药材商品HPCE指纹图谱相对于其对照图谱的相似度均在0.9以上，表明这三种动物药材样品与其对照指纹图谱的相似程度一致，说明现有的这三种动物药材商品的品种具有一致性。其中，僵蚕的生品相似度普遍高于制品，且几乎都在0.99以上，说明生品间的相似程度更高，而制品间的相似性差异是否与其炮制方法和程度有关，有待进一步研究。

4.3.2 蜈蚣、蛤蚧、乌梢蛇商品药材部分样品的相似度未达到0.9。其中，蛤蚧除10[#]样品的相似度（0.526）明显低于其他样品外，其余样品的相似度均大于0.9，但10[#]样品与其他样品的相对保留时间是一致的，因相对峰面积高于其他样品，导致对其相似度有较大影响，因此，10[#]样品与其他样品比较品种基本一致；蜈蚣3[#]（0.875）、5[#]（0.883）、7[#]（0.859）、10[#]（0.849）样品，乌梢蛇2[#]、3[#]样品（0.865、0.891）的相似度均接近0.9，表明与同类样品相比，这些样品与其对应的对照指纹图谱相似程度差异不大。表明目前市场上蜈蚣、蛤蚧、乌梢蛇药材商品的品种基本一致。

4.3.3 在收集到的21份地龙样品中，仅9份样品相对于对照图谱的相似度大于0.9，说明了地龙药材商品的品种差异较大。分别对地龙两个商品规格（广地龙、沪地龙）的样品进行相似度计算，发现10份广地龙的相似度，除1[#]、3[#]样品外，其余样品均在0.9以上，说明广地龙的品种差异较小，来源单一；而11份沪地龙的相似度，仅4份样品在0.9以上，11[#]、12[#]、14[#]、19[#]样品的相似度接近0.9，表明沪地龙药材商品品种存在差异，这与其药材商品原动物品种较多相吻合。由此可见，因广地龙来源于一种原动物，其品种与质量较易控制，故传统中医认为广地龙质量优于沪地龙是具有理论依据的。

结 论

1 七种动物药材商品 HPCE 指纹图谱

在上述各自电泳条件下,分别测定七种动物药材商品 HPCE 指纹图谱,方法学考察均达到中药材指纹图谱技术要求,且各药材样品共有峰相对保留时间一致,可作为品种鉴定的依据。

1.1 地龙药材商品 HPCE 指纹图谱:标定了 8 个共有峰,各样品相对于对照图谱 R 的相似度大于 0.9 的 9 份,小于 0.9 的 12 份。

1.1.1 10 份广地龙药材商品的相似度除 1[#]、3[#]样品外,其余样品均在 0.9 以上,表明广地龙的品种差异较小,来源单一。

1.1.2 11 份沪地龙药材商品的相似度仅 4 份样品在 0.9 以上,11[#]、12[#]、14[#]、19[#]样品的相似度接近 0.9,表明沪地龙品种具有差异性,这与其药材商品来源较多相吻合。

1.2 土鳖虫药材商品HPCE指纹图谱:标定了6个共有峰,10份土鳖虫药材商品相对于地鳖对照药材的相似度均在0.9以上,表明收集到的土鳖虫药材商品品种一致,均为地鳖,传统中医以地鳖与冀地鳖同等入药使用相吻合。

1.3 僵蚕药材商品HPCE指纹图谱:标定了8个共有峰,10份僵蚕样品的HPCE指纹图谱相对于对照图谱R的相似度均大于0.9。其中,4份炮制品,6份生品,生品的相似度普遍高于制品,且几乎都在0.99以上,表明生品间的相似程度更高,而制品间的相似性差异是否与其炮制方法和程度有关,有待进一步研究。

1.4 蜈蚣药材商品HPCE指纹图谱:标定了7个共有峰,各蜈蚣药材商品HPCE指纹图谱相对于对照图谱R的相似度除3[#](0.875)、5[#](0.883)、7[#](0.859)、10[#](0.849)样品外均大于0.9,但该4份样品的相似度接近0.9,因此,可认为收集的10份蜈蚣药材商品品种基本一致。

1.5 蛤蚧药材商品HPCE指纹图谱:标定了7个共有峰,10份蛤蚧药材商品的HPCE图谱相对于对照图谱R的相似度除10[#]样品外均大于0.9,但从各样品共有峰相对保留时间来看,10[#]样品与其他样品并无差异,表明其成分是相对一致的。因此,可认为收集的10个蛤蚧样品品种基本一致。

1.6 蕲蛇药材商品HPCE指纹图谱:标定了7个共有峰,10份蕲蛇药材商品相对于对照图谱R的相似度均大于0.9,表明收集到的蕲蛇样品品种具有一致性。

1.7 乌梢蛇药材商品HPCE指纹图谱：标定了7个共有峰，10份乌梢蛇样品HPCE指纹图谱相对于对照图谱R的相似度除2[#]、3[#]样品外均大于0.9，说明目前市场上乌梢蛇药材商品的品种基本一致。

2. 本研究发现，每种动物药材商品的指纹图谱其相似度小于 0.9 的样品，主要表现为各共有峰相对峰面积的差异（如蛤蚧 10[#]样品的相似度为 0.526，其相对峰面积显著高于整体平均水平），而相对保留时间与同品种其他样品比较基本一致，因此，高效毛细管电泳法不仅可作为动物药材品种鉴别的方法，也可对动物药材进行质量评价。

3. 从七种动物药材商品的HPCE指纹图谱分析结果可见，动物药中的主成分多为蛋白质、核苷等带电物质，而高效毛细管电泳（HPCE）正是分析该类成分的有效方法，故高效毛细管电泳法可作为动物药材指纹图谱的分析方法。

参考文献

- [1] 姜大成, 王永生. 动物药的鉴定研究状况[J]. 中药材, 2000, 23 (4) : 237-239
- [2] 孙毓庆, 阮婧华, 马欣. 中药的毛细管电泳指纹图谱研究[J] 色谱 2003, 21(4): 303-306
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) 北京: 化学工业出版社 2005: 240,
- [4] 李坚, 龙晓英, 何琳, 等. HPLC 测定不同产地广地龙中次黄嘌呤含量[J]. 中药材, 2006(5): 448-449
- [5] 张阳, 李峰, 孟凡科. HPLC 法测定商品蛤蚧中核苷类成分的含量[J] 中药材 2008, 21(2): 37-239
- [6] 叶斌, 宋丽艳, 于荣敏. 人工蛹虫草药材高效毛细管电泳指纹图谱研究[J]. 中药材, 2007, 30(1): 28-30
- [7] 叶斌, 宋丽艳, 于荣敏, 等. 人工蛹虫草核苷类成分的超声提取工艺优化研究[J]. 中药材, 2007, 30(9): 1156-1157
- [8] 张理平, 李如辉. 地龙药理研究及临床应用的概况[J]. 福建中医药, 1990, 21 (6) : 52-54
- [9] 陈义. 毛细管电泳技术及应用[M] 化学工业出版社, 2000: 48-49, 80-81
- [10] 谢培山. 中药色谱指纹图谱[M] 人民卫生出版社, 2005: 120-122
- [11] 张朝辉, 范国荣, 徐国钧, 等. 12 种海马、海龙类药材高效毛细管电泳法鉴别[J] 中国中药杂志 1998, 23(5): 259-260
- [12] 黄晟, 张国庆, 娄子洋, 等. 虎杖药材高效毛细管电泳指纹图谱研究[J] 药物分析杂志 2006,26(1):24-26
- [13] 容蓉, 闫斌, 吕青涛, 等. 不同产地金银花药材的HPCE指纹图谱分析[J] 化学分析计量 2006,15(6):66-68
- [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] 程伟, 梅洁, 肖玉秀. 连钱草药材的高效毛细管电泳指纹图谱研究[J] 氨基酸和生物资源2006,28(2):7-11
- [16] 苗文娟, 杨蕾, 吴大蓉, 等. 益母草注射液的毛细管电泳指纹图谱研究[J]. 中草药, 2007, 38(8): 1171-1174

- [17] 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
- [18] 张洁, 李成网. 反相高效液相色谱法测定冬虫夏草等6味动物药中尿嘧啶含量[J]. 安徽中医学院学报. 2009, 28(3): 56-58
- [19] 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
- [20] 许益民, 俞莲, 吴丽文, 等. 蛤蚧脂类成分的研究[J] 中药材 1991, 14(10): 33-35
- [21] 张阳, 李峰. 鹿茸等四种商品药材质量评价模式研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2008.
- [22] 魏凤环, 肖亚聪, 罗庆群, 等. 川芎水提液化学成分谱 HPCE 方法学研究[J]. 中药材, 2008, 31(8): 1149-1151
- [23] 张阳, 吴宏丽, 李峰, 等. HPLC 法测定商品乌梢蛇中核苷类成分的含量[J] 辽宁中医杂志. 2008, 35(4): 581-582
- [24] 乔歌, 李峰. 基于灰色关联度模型的动物药材质量评价模式研究(II)—全蝎、蜈蚣、土鳖虫、僵蚕四种药材的质量评价 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2009.
- [25] 李仕海, 刘训红, 黄明辉. 太子参药材的HPCE指纹谱分析[J] 时珍国医国药, 2007, 18(4): 820-821
- [26] 许重远, 陈振德, 晏媛, 等. 中药狗脊多糖的含量测定及高效毛细管电泳指纹图谱分析[J] 中药材 2004,27(1):22-23
- [27] 汪红, 王强, 罗辉明, 等. 丹参多糖的含量测定及高效毛细管电泳法测定其单糖组分[J] 中华中医药学刊 2007,25(4):827-829
- [28] 季宇彬, 郭守东, 汲晨锋. 野西瓜成熟果实中多糖的含量测定及毛细管电泳分析[J] 中国药学杂志 2006,41(15):1186-1189
- [29] 汲晨锋, 季宇彬, 吴涛, 等. 羊栖菜多糖含量测定及多糖组分分析[J] 世界科学技术—中医药现代化 2006,8(5):49-53
- [30] 陈振德, 谢立, 何英, 等. 云南榧子中多糖的含量测定及其高效毛细管电泳指纹图谱分析[J] 中国药房 2005,16(23):1817-1818
- [31] 梁宗锁, 杨东风. 中药指纹图谱相似性评价研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20(5): 55-59

附图 1: 药材图



地龙 1#样品原药材



地龙 2#样品原药材



地龙 3#样品原药材



地龙 4#样品原药材



地龙 5#样品原药材



地龙 6#样品原药材



地龙 7#样品原药材



地龙 8#样品原药材



地龙 9#样品原药材图



地龙 10#样品原药材



地龙 11#样品原药材



地龙 12#样品原药材图



地龙 13#样品原药材



地龙 14#样品原药材



地龙 15#样品原药材



地龙 16#样品原药材



地龙 17#样品原药材



地龙 18#样品原药材



地龙 19#样品原药材



地龙 20#样品原药材



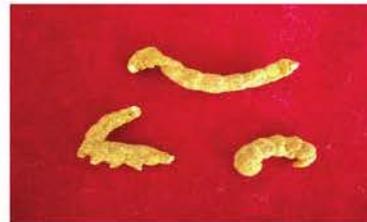
地龙 21#样品原药材



土鳖虫原药材



僵蚕原药材 (生品)



僵蚕原药材 (炮制品)



蜈蚣原药材



蛤蚧 1#样品原药材



蛤蚧 2#样品原药材



蛤蚧 3#样品原药材



蛤蚧 4#样品原药材



蛤蚧 5#样品原药材



蛤蚧 6#样品原药材



蛤蚧 7#样品原药材



蛤蚧 8#样品原药材



蛤蚧 9#样品原药材



蛤蚧 10#样品原药材



蕲蛇 1#样品原药材



蕲蛇 2#样品原药材



蕪蛇 3#样品原药材



蕪蛇 4#样品原药材



蕪蛇 5#样品原药材



蕪蛇 6#样品原药材



蕪蛇 7#样品原药材



蕪蛇 8#样品原药材



蕪蛇 9#样品原药材



蕪蛇 10#样品原药材



乌梢蛇 1#样品原药材



乌梢蛇 2#样品原药材



乌梢蛇 3#样品原药材



乌梢蛇 4#样品原药材



乌梢蛇 5#样品原药材



乌梢蛇 6#样品原药材



乌梢蛇 7#样品原药材



乌梢蛇 8#样品原药材



乌梢蛇 9#样品原药材



乌梢蛇 10#样品原药材

附图 2：高效毛细管电泳色谱图

1. 地龙药材样品的 HPCE 色谱图

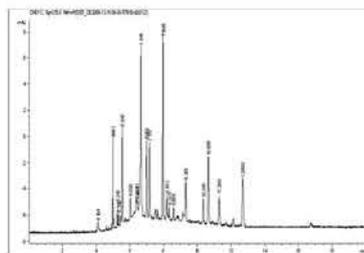


图 1-1 1#地龙样品图

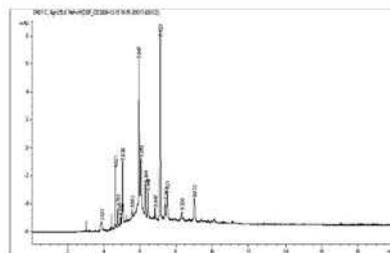


图 1-2 2#地龙样品图

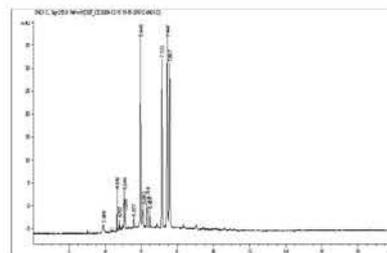


图 1-3 3#地龙样品图

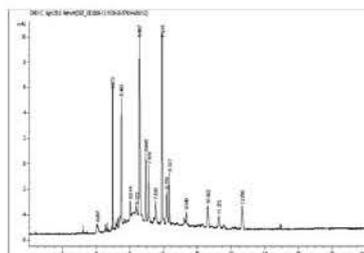


图 1-4 4#地龙样品图

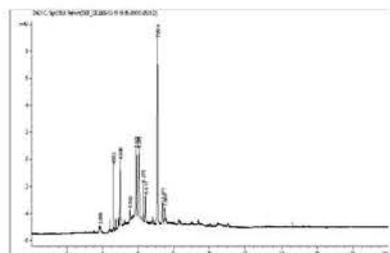


图 1-5 5#地龙样品图

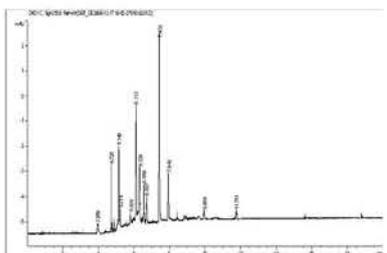


图 1-6 6#地龙样品图

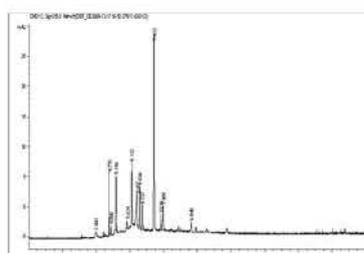


图 1-7 7#地龙样品图

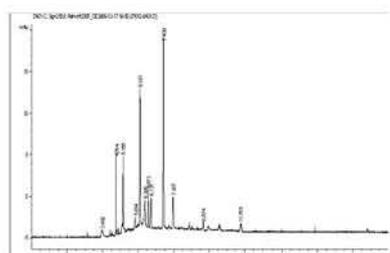


图 1-8 8#地龙样品图

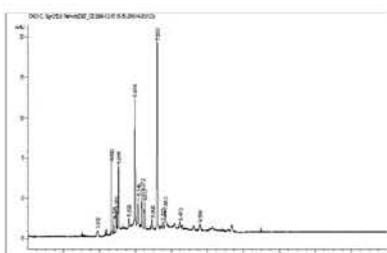


图 1-9 9#地龙样品图

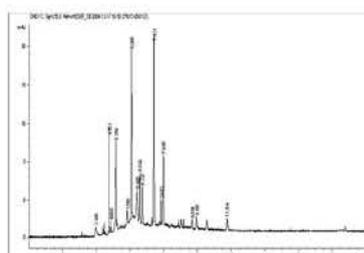


图 1-10 10#地龙样品图

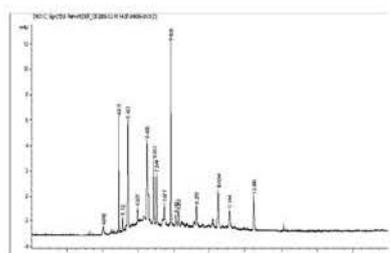


图 1-11 11#地龙样品图

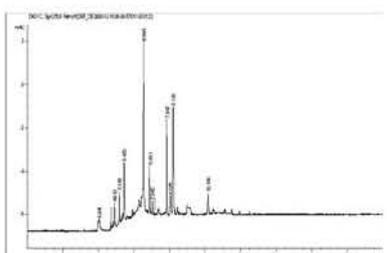


图 1-12 12#地龙样品图

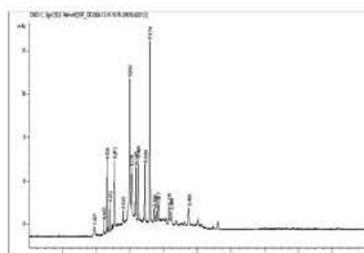


图 1-13 13#地龙样品图

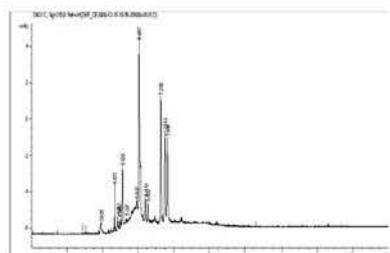


图 1-14 14#地龙样品图

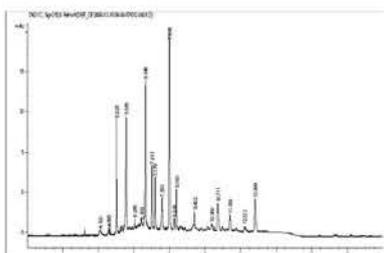


图 1-15 15#地龙样品图

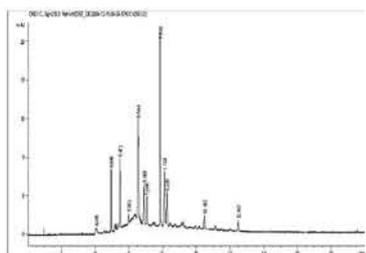


图 1-16 16#地龙样品图

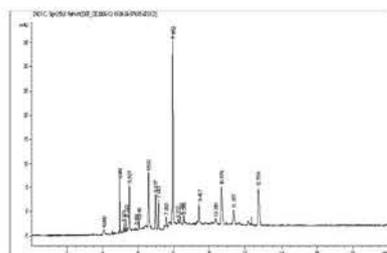


图 1-17 17#地龙样品图

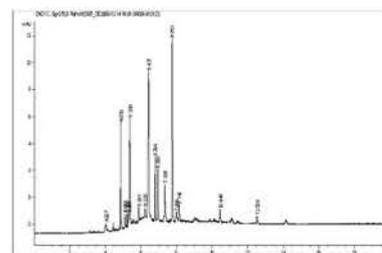


图 1-18 18#地龙样品图

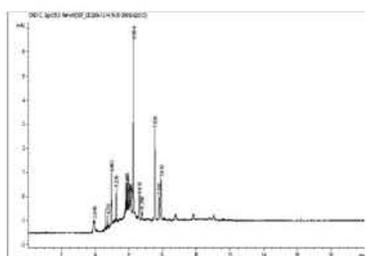


图 1-19 19#地龙样品图

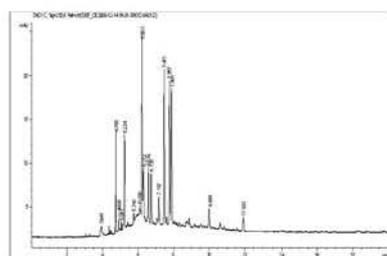


图 1-20 20#地龙样品图

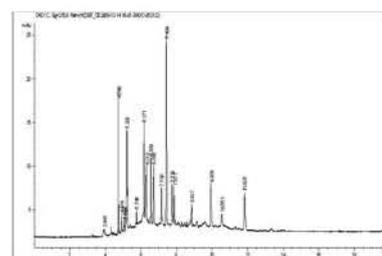


图 1-21 21#地龙样品图

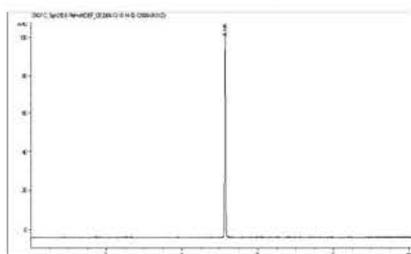


图 1-22 次黄嘌呤对照品

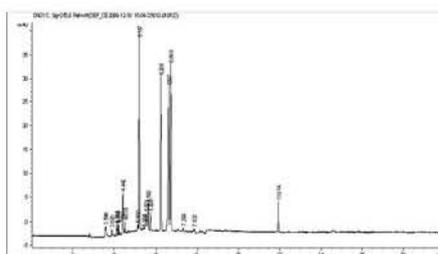


图 1-23 对应 1-22 地龙样品图

2. 土鳖虫药材样品的 HPCE 色谱图

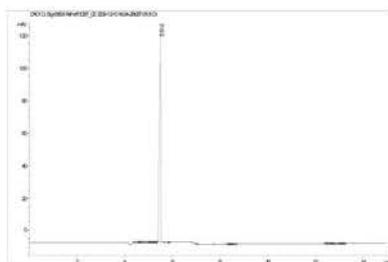


图 2-1 尿嘧啶对照品

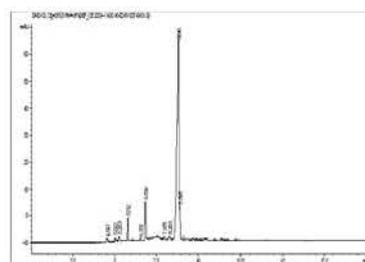


图 2-2 1#土鳖虫样品图

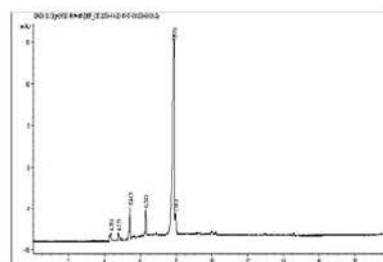


图 2-3 2#土鳖虫样品图

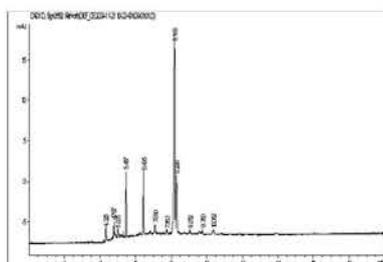


图 2-4 3#土鳖虫样品图

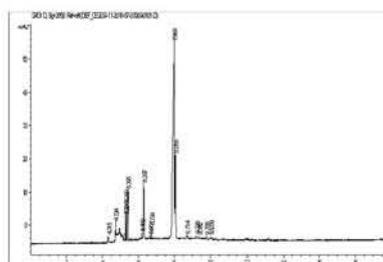


图 2-5 4#土鳖虫样品图

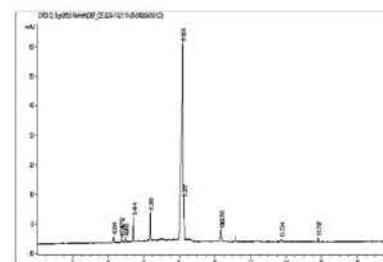


图 2-6 5#土鳖虫样品图

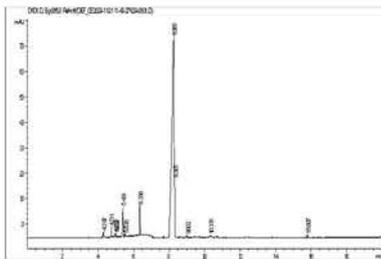


图 2-7 6[#]土鳖虫样品图

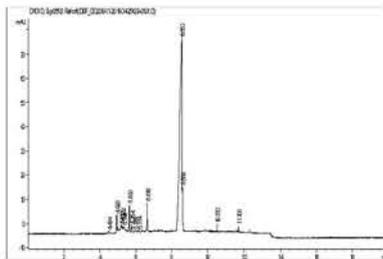


图 2-8 7[#]土鳖虫样品图

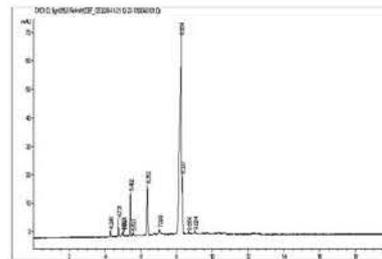


图 2-9 8[#]土鳖虫样品图

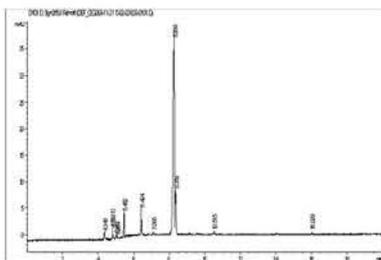


图 2-10 9[#]土鳖虫样品图

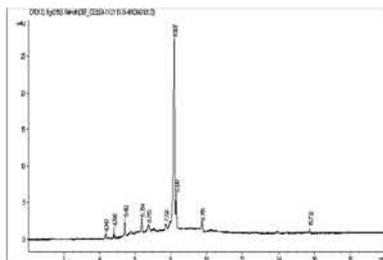


图 2-11 10[#]土鳖虫样品图

3. 僵蚕药材样品的 HPCE 色谱图

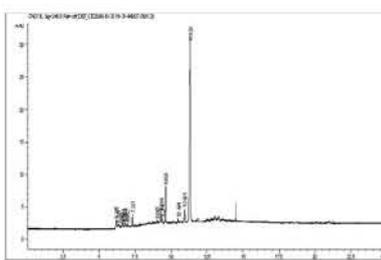


图 3-1 1[#]僵蚕样品图

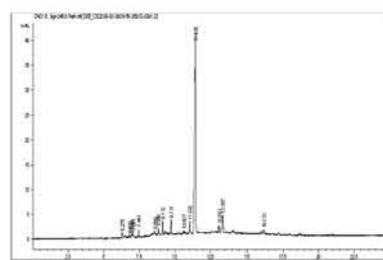


图 3-2 2[#]僵蚕样品图

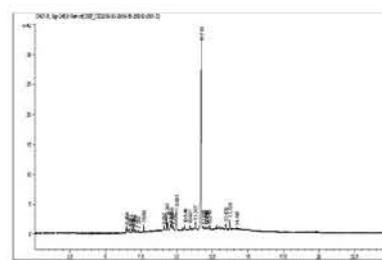


图 3-3 3[#]僵蚕样品图

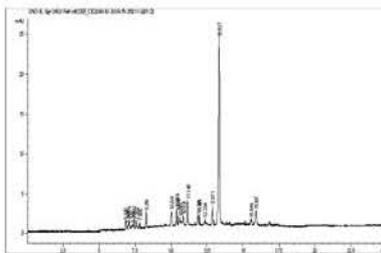


图 3-4 4[#]僵蚕样品图

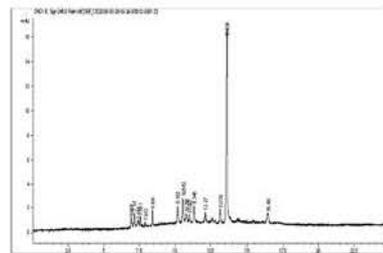


图 3-5 5[#]僵蚕样品图

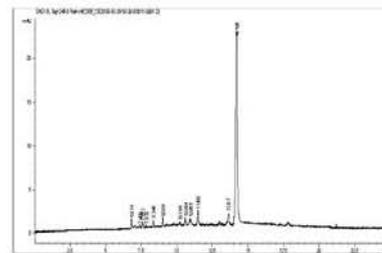


图 3-6 6[#]僵蚕样品图

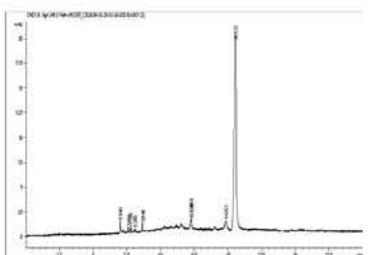


图 3-7 7[#]僵蚕样品图

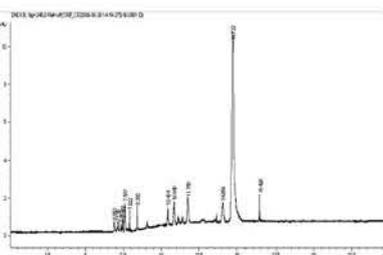


图 3-8 8[#]僵蚕样品图

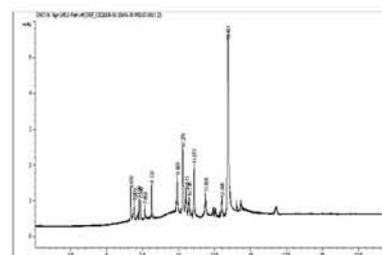


图 3-9 9[#]僵蚕样品图

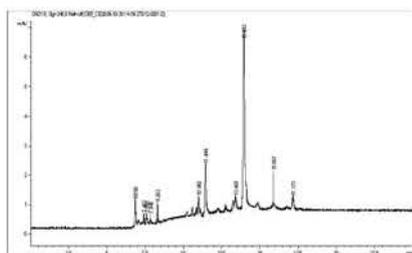


图 3-10 10[#]僵蚕样品图

4. 蜈蚣药材样品的 HPCE 色谱图

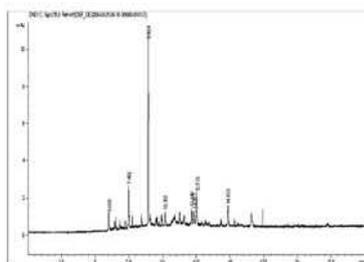


图 4-1 1[#]蜈蚣样品图

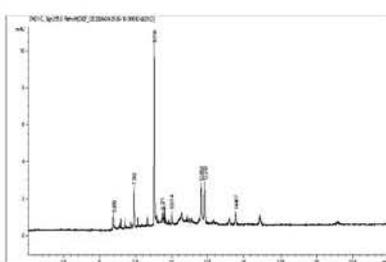


图 4-2 2[#]蜈蚣样品图

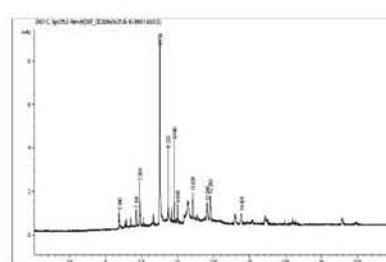


图 4-3 3[#]蜈蚣样品图

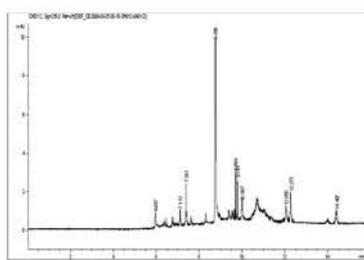


图 4-4 4[#]蜈蚣样品图

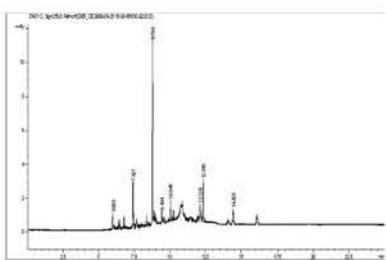


图 4-5 5[#]蜈蚣样品图

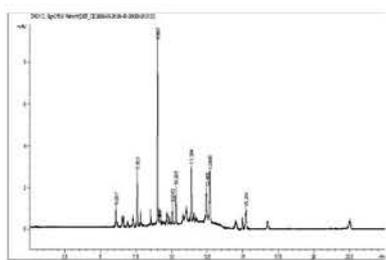


图 4-6 6[#]蜈蚣样品图

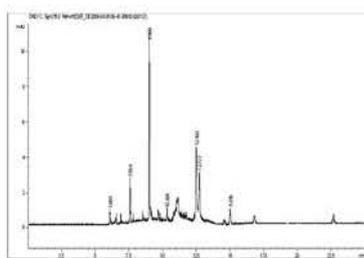


图 4-7 7[#]蜈蚣样品图

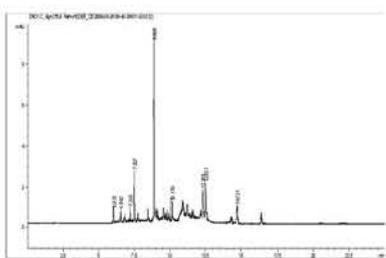


图 4-8 8[#]蜈蚣样品图

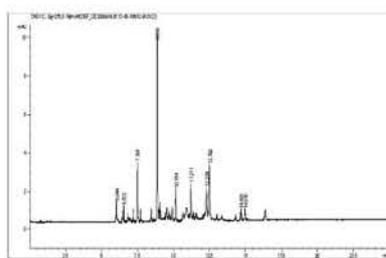


图 4-9 9[#]蜈蚣样品图

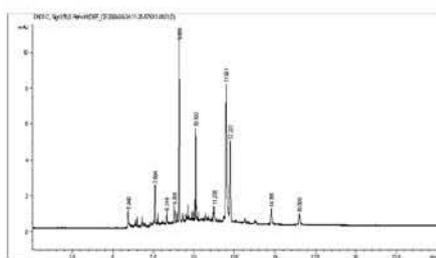


图 4-10 10[#]蜈蚣样品图

5. 蛤蚧药材样品的 HPCE 色谱图

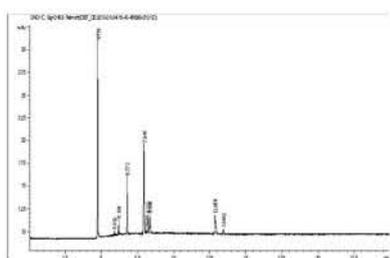


图 5-1 1#蛤蚧样品图

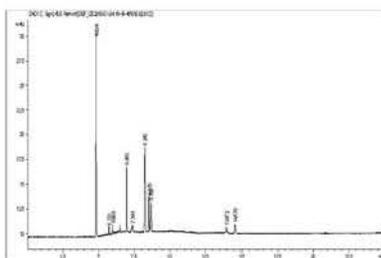


图 5-2 2#蛤蚧样品图

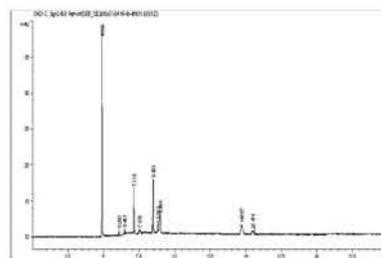


图 5-3 3#蛤蚧样品图

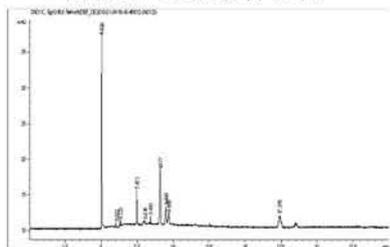


图 5-4 4#蛤蚧样品图

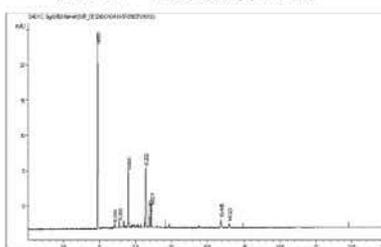


图 5-5 5#蛤蚧样品图

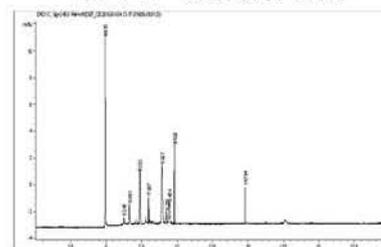


图 5-6 6#蛤蚧样品图

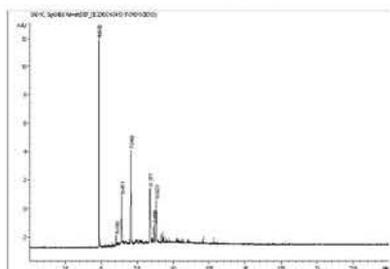


图 5-7 7#蛤蚧样品图

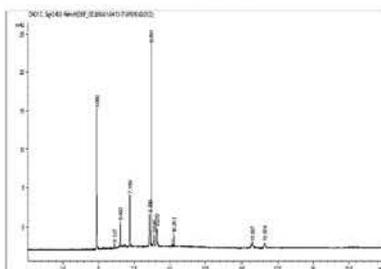


图 5-8 8#蛤蚧样品图

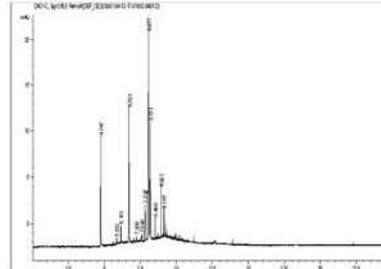


图 5-9 9#蛤蚧样品图

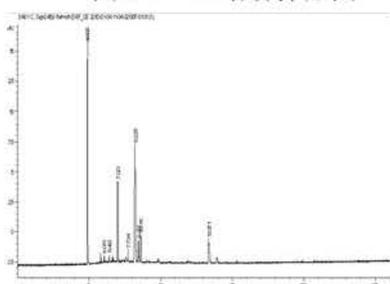


图 5-10 10#蛤蚧样品图

6. 蕲蛇药材样品的 HPCE 色谱图

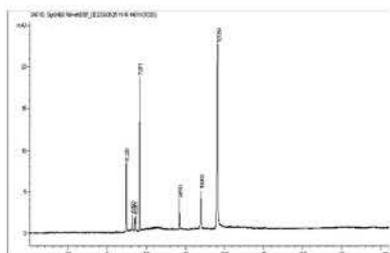


图 6-1 1#蕲蛇样品图

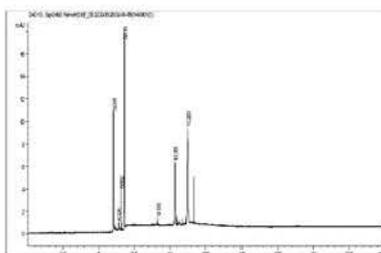


图 6-2 2#蕲蛇样品图

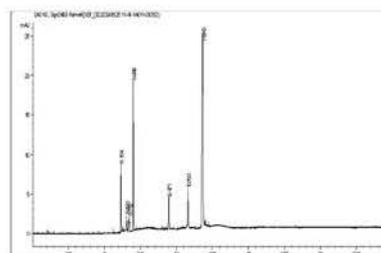


图 6-3 3#蕲蛇样品图

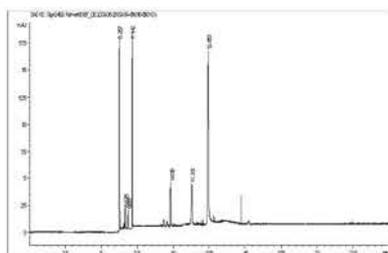


图 6-4 4#蕲蛇样品图

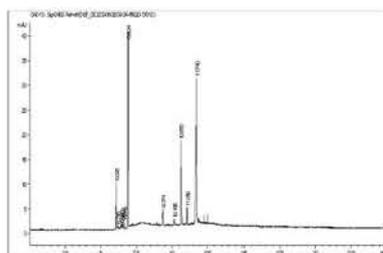


图 6-5 5#蕲蛇样品图

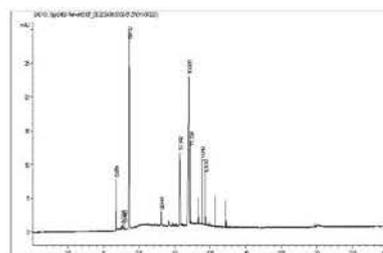


图 6-6 6#蕲蛇样品图

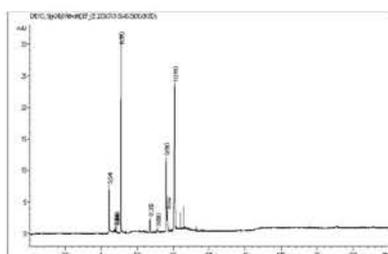


图 6-7 7#蕲蛇样品图

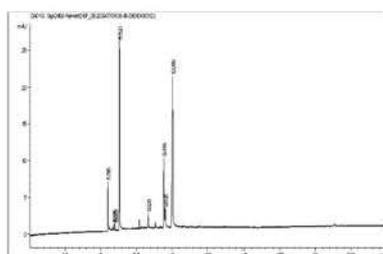


图 6-8 8#蕲蛇样品图

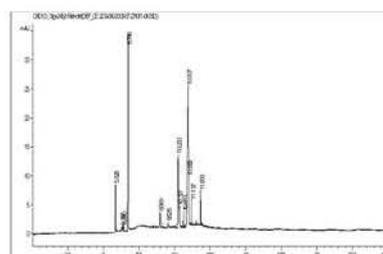


图 6-9 9#蕲蛇样品图

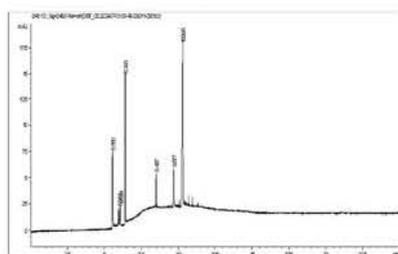


图 6-10 10#蕲蛇样品图

7. 乌梢蛇药材样品的 HPCE 色谱图

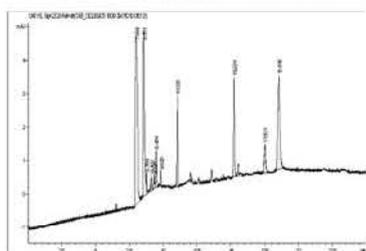


图 7-1 1#乌梢蛇样品图

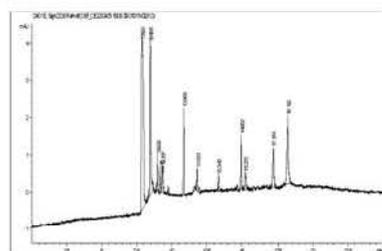


图 7-2 2#乌梢蛇样品图

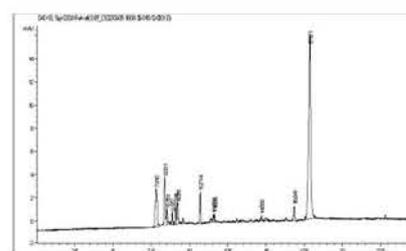


图 7-3 3#乌梢蛇样品图

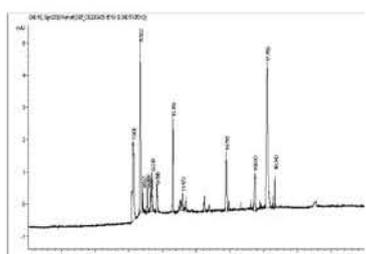


图 7-4 4#乌梢蛇样品图

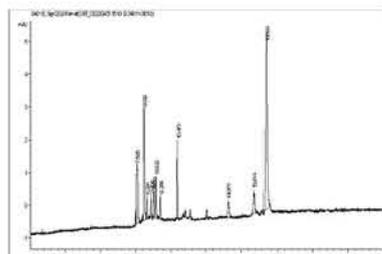


图 7-5 5#乌梢蛇样品图

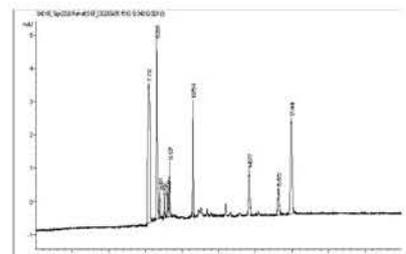


图 7-6 6#乌梢蛇样品图

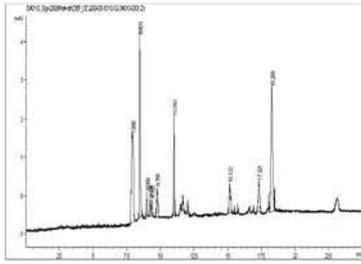


图 7-7 7[#]乌梢蛇样品图

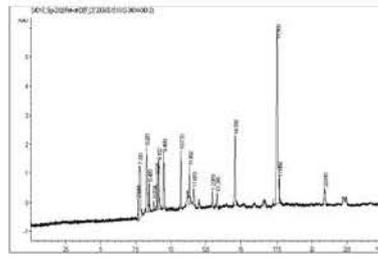


图 7-8 8[#]乌梢蛇样品图

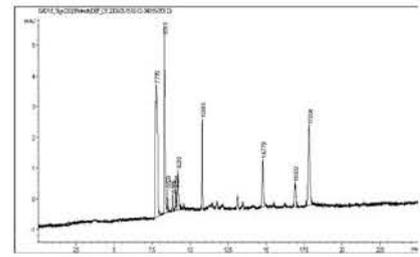


图 7-9 9[#]乌梢蛇样品图

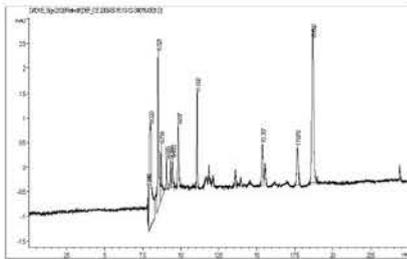


图 7-10 10[#]乌梢蛇样品图

致 谢

首先我要诚挚地感谢我的导师李峰教授。三年来，导师的辛勤培育和亲切关怀，使我对本专业以及课题所涉及的理论知识和实验技能都有了很大提高。导师严谨治学、精益求精的工作作风，让我终身受益。在此，我向恩师表示深深的谢意！谢谢！

感谢中药鉴定教研室全体教师，特别感谢实验中心的孟宪生老师、包永睿老师，在我学习期间的鼎力支持和帮助！

感谢分析教研室、药分教研室、中心教研室、植物教研室、药理教研室及基础化学教研室老师，以及其他所有给予我精心指导和全力帮助的领导和老师！

感谢中药鉴定教研室的研究生、本科专题学生的大力协助！

最后感谢所有曾经帮助过我的人们！

衷心的感谢大家！

个人简历

个人情况

姓名：王成芳

性别：女

民族：满

出生日期：1983年11月25日

籍贯：辽宁省盘锦市

学校：辽宁中医药大学

地址：辽宁省大连市双D港生命一路77号

教育背景

2002.9-2007.7 辽宁中医药大学药学院中药学（英语）班学习获学士学位

2007.9-至今 辽宁中医药大学药学院攻读生药学硕士学位

研究工作

2007.3-2007.7 辽宁中医药大学药学院鉴定实验室

商品药材蛤蚧中总磷脂含量的比较研究（本科毕业论文）

2007.9-至今 辽宁中医药大学药学院生药实验室

动物药材商品高效毛细管电泳指纹图谱的研究（I）（研究生毕业论文）

发表论文

1. 王成芳, 李峰. **HPCE** 技术在中药指纹图谱研究中的应用进展. 中华中医药学刊 2009, 27 (7): 1481-1483

2. 王成芳, 包永睿, 孟宪生, 李峰. 蛤蚧药材高效毛细管电泳指纹图谱的研究. 中药材 2010, 33 (3): 337-339

3. 王成芳, 包永睿, 孟宪生, 李峰. 蕲蛇药材高效毛细管电泳指纹图谱的研究. 辽宁中医杂志 2010, 37 (5)