

金边土鳖 HPLC 指纹图谱及氨基酸含量测定

刘梦云¹, 毕晓黎^{1,2*}, 陈伟韬², 李养学², 江洁仪²

(1. 广州中医药大学附属广东第二中医院, 广州 510405;

2. 广东省中医药工程技术研究院 广东省中医药研究开发重点实验室, 广州 510095)

[摘要] 目的:建立金边土鳖氨基酸 HPLC 指纹图谱分析方法,并同时定量分析了6种氨基酸成分,为制订金边土鳖的质量标准提供参考。方法:采用异硫氰酸苯酯(PITC)-高效液相色谱(HPLC)柱前衍生化法,以 Waters XBridge C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 为色谱柱;流动相 A 为 0.1 mol·L⁻¹ 乙酸钠 (pH 6.5)-乙腈 (95:5), B 为乙腈-水 (4:1);检测波长 254 nm;流速 0.8 mL·min⁻¹ 梯度洗脱;柱温 40 ℃。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)”和 SPSS 22.0 软件分别对其进行相似度评价和聚类分析。结果:初步建立了金边土鳖游离氨基酸 HPLC 指纹图谱共有模式,确定了 21 个共有峰,并指认了 13 种氨基酸成分;综合 14 批金边土鳖相似度分析、聚类分析和定量分析,结果显示相似度分析和聚类分析基本一致,且发现精氨酸含量的高低可能与产地有一定的关系。结论:建立了金边土鳖 HPLC 指纹图谱分析方法,可较全面反映该药材中氨基酸成分的信息,为金边土鳖药材鉴定和质量标准的制订提供参考。

[关键词] 金边土鳖;氨基酸;指纹图谱;含量测定;柱前衍生化;高效液相色谱

[中图分类号] R284.1;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)14-0063-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181306

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180412.1319.025.html>

[网络出版时间] 2018-04-12 17:58

Fingerprint and Amino Acids Quantitative Determination for *Opisthoptalia orientalis* by HPLC

LIU Meng-yun¹, BI Xiao-li^{1,2*}, CHEN Wei-tao², LI Yang-xue², JIANG Jie-yi²

(1. Guangdong Second Chinese Medicine Hospital Affiliated to Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. Guangdong Research Institute of Traditional Chinese Medicine (TCM) Manufacturing Technology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Research and Development in TCM, Guangzhou 510095, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an analysis method for high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of *Opisthoptalia orientalis*, quantitatively determine six amino acids in *O. orientalis*, and provide reference for the quality standards of *Opisthoptalia orientalis*. **Method:** Pre-column derivitization method with phenyl isothiocyanate (PITC) -HPLC was used on column Waters XBridge C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with 0.1 mol·L⁻¹ natrium aceticum buffer solution (pH 6.5) -acetonitrie (95:5) (A) and acetonitrie-water (4:1) (B) as mobile phases for gradient elution; the detective wave length was set at 254 nm; the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹ and the column temperature was maintained at 40 ℃. The similarity was analyzed with “Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM 2004A” and the cluster analysis was performed by SPSS 22.0 software. **Result:** The fingerprint of *O. orientalis* was established and 21 common peaks

[收稿日期] 20170816(013)

[基金项目] 广东省中医药局科研项目(20162008);广东省科技计划项目(2017A070701017)

[第一作者] 刘梦云, 硕士, 从事中药分析研究, E-mail: liumengyun218@163.com

[通信作者] * 毕晓黎, 主任中药师, 硕士生导师, 从事中药质量评价研究, Tel: 020-83482098, E-mail: 2335128654@qq.com

were found in the fingerprint, 13 of which were identified as amino acid compositions. By considering the similarity analysis, cluster analysis and quantitative analysis of 14 batches of *O. orientalis* samples, it was found that the similarity analysis and cluster analysis were basically consistent in results, and it was found that the content of arginine may be related to the origin. **Conclusion:** The established method for HPLC fingerprint of *O. orientalis*, can comprehensively reflect the amino acid composition of the herbs, providing reference for the identification of medicinal materials and formulation of quality standards for *O. orientalis*.

[**Key words**] *Opisthoptalia orientalis*; amino acids; fingerprint; quantitative determination; pre-column derivitization; HPLC

虫类药材是我国特色的医药资源,具有疗效高、活性强、应用广、潜力大的特点,是动物中药材的重要组成部分^[1]。土鳖虫为传统中药材中典型的“虫类”药材,具有多种功效并被广泛应用于中药处方中^[2]。在我国,药用土鳖虫主要有地鳖、冀地鳖和金边土鳖,其中金边土鳖为昆虫纲蜚蠊目姬蠊科昆虫金边土鳖,性寒、味咸,有小毒,归肝经;主产于广东、广西、福建及台湾等沿海地区,在日本、印度、印度尼西亚也有分布;具有破血逐瘀、续筋接骨之功效,临床上对抗血栓、祛风湿、抗肿瘤等都具有良好的作用^[3-4]。在《神农本草经》,《金匱药略》,《本草纲目》等古代医药著作中均以“蟪虫”入药,已有近两千年的入药历史,目前已被收载于《广东省中药材标准》(第二册)^[5]。国外对其研究报道较少,国内仅对其生物学、生殖系统及抗癌抗菌等药理作用进行过研究^[6-7]。据报道,氨基酸是土鳖虫的主要组成成分之一,直接参与各种酶、激素的合成,在活血化瘀功效中起着一定的作用^[8-9]。目前,氨基酸 HPLC 柱前衍生化的方法主要有邻苯二甲醛(OPA),异硫氰酸苯酯(PITC),氯甲酸苄甲酯(FMOC)等方法,其中 PITC 法柱前衍生化后的产物稳定,且采用常规的 C₁₈ 色谱柱、紫外检测器就可以检测,操作简便^[10-11],是检测氨基酸常用的方法之一。由于金边土鳖是华南特有的药用昆虫^[12],而现行地方中药材标准缺乏专属性和内控指标,无法有效控制药材质量,保证用药的安全性和有效性。故本实验拟采用 PITC-HPLC 柱前衍生化法对不同产地 14 批金边土鳖药材中的游离氨基酸进行指纹图谱研究,并同时定量考察 6 种氨基酸成分,从整体上对金边土鳖药材质量进行评价,为下一步金边土鳖质量标准的制订提供实验依据。

1 材料

2695-2489 型高效液相色谱仪(包括四元梯度泵,DAD 二极管阵列检测器,在线脱气机,柱温箱和自动进样器 Empower 2 数据处理软件系统,美国

Waters 公司);KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山舒美);XS205DU 型电子分析天平(瑞士梅特勒),涡旋振荡器(美国 Thermo 公司)。

14 批金边土鳖从各中药材批发市场购买,均由广东省第二中医院(广东省中医药工程技术研究院)研究员刘法锦研究员鉴定为姬蠊科昆虫金边土鳖 *Opisthoptalia orientalis* 的干燥虫体,来源信息见表 1。对照品缬氨酸(批号 0874-9701),甘氨酸(批号 735-9001),苏氨酸(批号 889-200102),精氨酸(批号 0872-9701),丙氨酸(批号 0873-9701),脯氨酸(批号 111659-200301),组氨酸(批号 890-200001),赖氨酸(批号 140673-201408),亮氨酸(批号 110876-200204)购于中国食品药品检定研究院;对照品异亮氨酸(批号 Y-146-150801),色氨酸(批号 S-083-150731),蛋氨酸(批号 D-038-150728),丝氨酸(批号 S-101-150731)购于成都瑞芬思生物科技有限公司;所有对照品均供含量测定用。异硫氰酸苯酯(山东西亚化学股份有限公司),三乙胺、乙腈(色谱纯),液相用水(超纯水),其他试剂均为分析纯。

表 1 14 批金边土鳖来源

Table 1 14 batches of *Opisthoptalia orient*

编号	批号	产地	编号	批号	产地
S1	20170103	浙江	S8	20150526	浙江
S2	20170107	广西	S9	20150820	广西
S3	20170218	湖北	S10	20170112	广西
S4	20161217	广东	S11	20170113	广西
S5	20150619	广西	S12	20150813	广西
S6	20150717	广西	S13	20150909	安徽
S7	20170215	浙江	S14	20170123	广东

2 方法和结果

2.1 色谱条件 采用 Waters XBridge C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 A 为 0.1 mol · L⁻¹

乙酸钠(pH 6.5)-乙腈(95:5),B 为乙腈-水(4:1),梯度洗脱(0~22 min,100% A;22~23 min,100%~99.9% A;23~23.5 min,99.9%~99.8% A;23.5~25 min,99.8%~99.7% A;25~28 min,99.7%~98% A;28~35 min,98%~91% A;35~55 min,91%~80% A;55~65 min,80%~70% A;65~75 min,70%~60% A);检测波长 254 nm;柱温 40 ℃;进样体积 5 μL。

2.2 对照品储备溶液的制备 分别精密称取各氨基酸对照品适量,置 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并定容至刻度,即得甘氨酸 445 mg·L⁻¹,赖氨酸 109.75 mg·L⁻¹,缬氨酸 241 mg·L⁻¹,苏氨酸 171 mg·L⁻¹,精氨酸 242 mg·L⁻¹,异亮氨酸 140 mg·L⁻¹的各对照品储备溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取金边土鳖样品(过二号筛)约 0.3 g,精密称定,准确加入 50% 甲醇 25 mL,称定质量,超声处理提取 30 min,取出,放冷,用 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀,离心(3 000 r·min⁻¹),取上清液备用。

2.4 衍生方法 精密吸取样品或对照品溶液 1 mL 于 10 mL 离心管中,加入 0.1 mol·L⁻¹ PITC-乙腈溶液(12:988)500 μL,1.0 mol·L⁻¹ 三乙胺-乙腈溶液(139:861)500 μL,漩涡混合 1 min,暗处放置 1 h,再加入正己烷 2 mL,漩涡混合 1 min,暗处静置 10 min,吸取下层溶液过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.5 空白溶液的制备 取 50% 甲醇溶液 1 mL,按 2.4 项下方法衍生操作即得。

2.6 方法学考察

2.6.1 重复性试验 精密称定金边土鳖样品 S11 约 0.3 g,称取 6 份,按照 2.3 项下方法制备供试品溶液经衍生化处理后,分别进样,以 15 号(缬氨酸)峰为参照峰,计算出 1~21 号指纹共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,并采用相似度评价软件计算出各色谱指纹图谱峰的相似度均 > 0.99,表明该方法的重复性较好。

2.6.2 精密度试验 取重复性试验中制备的供试品溶液 1 份,连续进样 6 次,以 15 号(缬氨酸)峰为参照峰,计算出 1~21 号指纹共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,采用相似度评价软件计算出各色谱指纹图谱的相似度均 > 0.99,表明该仪器的精密度较好。

2.6.3 稳定性试验 取重复性试验中制备的供试品溶液 1 份,分别于 0,2,4,8,12,24 h 进样,以 15 号(缬氨酸)峰为参照峰,计算出 1~21 号指纹共有

峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,并用相似度评价软件计算出各色谱指纹图谱的相似度均 > 0.99,表明制备的供试品溶液在 24 h 内较稳定。

2.7 指纹图谱的建立 分别精密吸取 2.2 项下的对照品储备液及经 2.4 项下衍生化方法处理后的溶液各 5 μL,注入 HPLC 色谱仪中,记录 14 个不同产地金边土鳖样品的 HPLC 色谱图。通过与对照品色谱峰比对,确认了 3 号峰为丝氨酸,4 号峰为甘氨酸,6 号峰为组氨酸,8 号峰为精氨酸,9 号峰为苏氨酸,10 号峰为丙氨酸,11 号峰为脯氨酸,15 号峰为缬氨酸,16 号峰为蛋氨酸,17 号峰为异亮氨酸,18 号峰为亮氨酸,20 号峰为色氨酸,21 号峰为赖氨酸。将 14 不同批次金边土鳖样品的色谱图谱导入中国药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(A 版)”中,以样品 S1 为参照,采用中位数对照图谱生成法,时间窗宽度为 0.5,进行色谱指纹峰的匹配见图 1,生成金边土鳖对照指纹图谱见图 2,以 15 号峰(缬氨酸)为参照,最后确定了样品中 21 个共有峰构成了金边土鳖指纹图谱的特征峰,金边土鳖样品共有峰的相对保留时间 RSD 分别为 0.8%,0.9%,0.7%,0.7%,0.7%,1.0%,0.8%,0.9%,0.4%,0.6%,0.6%,0.1%,0.1%,0.0%,0.0%,0.0%,0.1%,0.1%,0.1%,0.1% 及相对峰面积 RSD 分别为 16.4%,17.2%,22.7%,22.3%,19.8%,28.4%,26.6%,25.1%,38.5%,11.1%,16.1%,28.4%,22.6%,26.7%,0.00%,8.0%,11.2%,16.3%,24.9%,26.8%,29.4%。14 批金边土鳖样品与对照指纹图谱的相似度计算结果分别为 0.956,0.979,0.986,0.997,0.968,0.997,0.971,0.964,0.994,0.914,0.983,0.956,0.970,0.980。

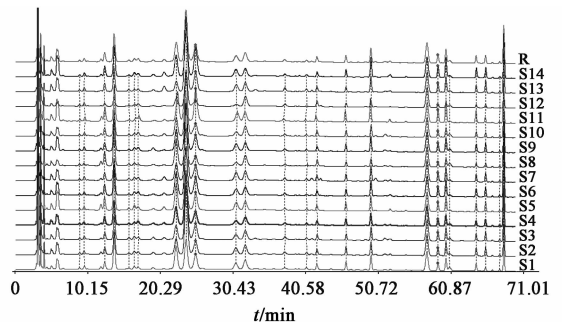
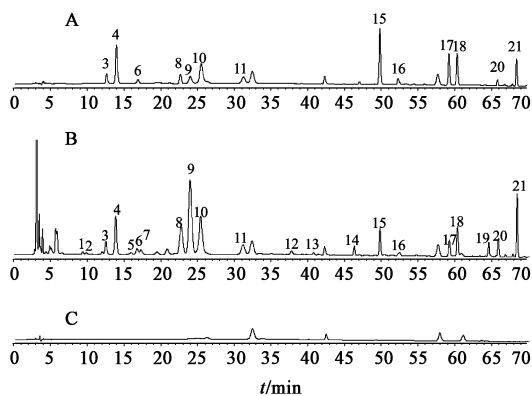


图 1 14 批金边土鳖样品 HPLC 指纹谱叠加

Fig.1 HPLC fingerprints for 14 batches of *Opisthoptalia orientalis*

2.8 6 种氨基酸的含量测定

2.8.1 供试品溶液的制备 同 2.3 和 2.4 项下方



A. 混合对照品; B. 对照指纹谱; C. 空白对照; 3. 丝氨酸; 4. 甘氨酸; 6. 组氨酸; 8. 精氨酸; 9. 苏氨酸; 10. 丙氨酸; 11. 脯氨酸; 15. 缬氨酸; 16. 蛋氨酸; 17. 异亮氨酸; 18. 亮氨酸; 20. 色氨酸; 21. 赖氨酸

图 2 金边土鳖 HPLC 指纹谱共有模式

Fig. 2 HPLC of common peak attribution in fingerprint of *Opisthoptalia orientalis*

法制备供试品溶液并经衍生化处理, 即得。

2.8.2 线性关系考察 精密吸取各氨基酸对照品 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mL, 分别置 1 mL 量瓶中, 加 50% (甲醇溶解并至刻度, 摇匀, 按 2.4 项进行衍生化处理, 按上述色谱条件进样, 以氨基酸对照品峰面积为纵坐标 (Y), 进样质量为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 计算回归方程, 见表 2。结果表明, 甘氨酸、精氨酸、赖氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、缬氨酸分别在各自的线性范围内具有良好的线性关系。

表 2 6 种氨基酸线性关系

Table 2 Linearity relationship of 6 amino acids

名称	线性回归方程	线性范围/ng	r
甘氨酸	$Y = 5.73 \times 10^3 X - 1.00 \times 10^4$	11.13 ~ 1112.50	0.999 9
精氨酸	$Y = 3.29 \times 10^3 X - 5.45 \times 10^3$	6.05 ~ 605.00	0.999 8
苏氨酸	$Y = 6.54 \times 10^3 X - 4.50 \times 10^4$	4.28 ~ 427.50	0.999 6
缬氨酸	$Y = 6.88 \times 10^3 X - 2.55 \times 10^4$	3.50 ~ 1506.25	0.999 4
异亮氨酸	$Y = 2.44 \times 10^3 X + 3.76 \times 10^3$	3.50 ~ 350.00	0.999 7
赖氨酸	$Y = 4.17 \times 10^3 X - 1.01 \times 10^5$	2.75 ~ 274.38	0.999 6

2.8.3 重复性试验 取金边土鳖样品 S11 约 0.3 g, 精密称定 6 份, 按照 2.3, 2.4 项下方法制备供试品溶液并经衍生化处理, 分别进样测定。甘氨酸、精氨酸、苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、赖氨酸平均质量分数 (RSD) 分别为 $1.44 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (1.2%), $5.79 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (0.9%), $8.22 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (1.5%), $1.24 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (1.4%), $1.91 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (1.5%), $4.30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (1.8%), 表明该方法重复性良好。

2.8.4 精密度试验 取重复性试验中制备的供试

品溶液 1 份, 连续进样 6 次。结果测得甘氨酸、精氨酸、苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、赖氨酸的峰面积 RSD 分别 0.5%, 0.7%, 1.3%, 0.7%, 1.2%, 0.9%, 表明仪器精密度良好。

2.8.5 稳定性试验 取重复性试验中制备的供试品溶液 1 份, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样。结果测得甘氨酸、精氨酸、苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、赖氨酸含量的 RSD 分别为 0.7%, 0.7%, 1.1%, 1.3%, 1.6%, 1.6%, 表明供试品中各氨基酸成分在 24 h 内稳定性良好。

2.8.6 加样回收率试验 精密称取 S11 样品 54 份于锥形瓶中, 每份约 0.15 g, 平行分为 3 组, 每组分别加入 6 种氨基酸对照品的量约为样品含量的 50%, 100% 和 150%, 按照 2.3, 2.4 项下的方法进行制备并衍生化, 根据峰面积计算 6 种氨基酸的平均加样回收率, 见表 3。结果表明, 6 种氨基酸成分的加样回收率良好。

2.8.7 样品 6 种氨基酸含量测定 取 14 批金边土鳖, 按 2.3, 2.4 项下方法制备供试品溶液并经衍生化处理, 按 2.1 项下色谱条件进样分析, 分别计算 6 种氨基酸成分的量, 结果见表 4。

2.9 聚类分析 以 21 个共有峰的相对峰面积为变量, 运用 SPSS 22.0 数据处理软件对 14 批样品进行系统聚类分析, 聚类方法为 Ward's method, 利用欧氏距离作为样品的测度, 得到样品的系统聚类树状图, 见图 3。根据树状图结果, 可将 14 批金边土鳖药材大致分为 2 类, 样品 S1, S4, S7, S8, S10, S13, S14 聚为一类, 样品 S2, S3, S5, S6, S9, S11, S12 聚为一类, 该结果与样品相似度分析结果基本一致。聚类分析和精氨酸定量分析结果显示, 除样品 S10, 广西和湖北产聚为一类, 精氨酸质量分数均在 $5.30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 以上; 浙江、广东、安徽产聚为一类, 精氨酸质量分数均低于 $5.30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 表明金边土鳖中精氨酸的含量高低可能与产地有一定的关系。样品 S10 离散的原因, 可能是储存不当, 导致样品含量下降; 也有可能是市场上药材产地来源混淆所致。

3 讨论

3.1 衍生化试剂的选择 结合文献, 本实验考察了邻苯二甲醛 (OPA) 和异硫氰酸苯酯 (PITC) 两种试剂的柱前衍生化, 结果表明, PITC 柱前衍生化后的产物稳定、衍生化操作方便、且不需要氨基酸专用分析柱和仪器就可以检测。

3.2 提取方法的考察 本实验分别考察了加热回流提取、超声提取、索氏提取 3 种方式的提取效率,

表 3 6 种氨基酸平均加样回收率

Table 3 Average recovery of 6 amino acids

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%	成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
甘氨酸	0.150 1	0.217 4	0.108 7	0.320 8	95.12	99.47	2.9	缬氨酸	0.150 6	0.188 6	0.094 3	0.285 2	102.44	99.82	3.3
	0.150 5	0.218 0	0.109 0	0.328 8	101.65				0.150 2	0.188 1	0.094 1	0.279 7	97.34		
	0.150 4	0.217 9	0.109 0	0.328 8	101.74				0.150 1	0.188 0	0.094 0	0.277 4	95.11		
	0.150 3	0.217 7	0.217 7	0.435 6	100.09				0.150 3	0.188 3	0.188 3	0.379 9	101.75		
	0.150 2	0.217 6	0.217 6	0.439 9	102.16				0.150 4	0.188 4	0.188 4	0.368 5	95.59		
	0.150 3	0.217 7	0.217 7	0.441 0	102.57				0.150 5	0.188 5	0.188 5	0.376 8	99.89		
	0.150 0	0.217 3	0.326 0	0.537 3	98.16				0.150 6	0.188 6	0.282 9	0.485 3	104.88		
	0.150 1	0.217 4	0.326 1	0.539 1	98.65				0.150 5	0.188 5	0.282 8	0.475 8	101.59		
	0.150 3	0.217 7	0.326 6	0.528 3	95.10				0.150 2	0.188 1	0.282 2	0.469 6	99.75		
精氨酸	0.150 2	0.873 0	0.436 5	1.309 5	100.00	100.88	1.7	异亮氨酸	0.150 3	0.281 8	0.140 9	0.425 1	101.70	98.20	2.4
	0.150 4	0.874 2	0.437 1	1.308 5	99.36				0.150 6	0.282 4	0.141 2	0.417 0	95.33		
	0.150 2	0.873 0	0.436 5	1.312 0	100.57				0.150 2	0.281 6	0.140 8	0.422 9	100.36		
	0.150 1	0.872 5	0.872 5	1.776 9	103.66				0.150 3	0.281 8	0.281 8	0.565 6	100.71		
	0.150 0	0.871 9	0.871 9	1.769 9	102.99				0.150 0	0.281 3	0.281 3	0.549 3	95.27		
	0.150 4	0.874 2	0.874 2	1.769 1	102.37				0.150 4	0.282 0	0.282 0	0.558 3	97.98		
	0.150 5	0.874 8	1.312 2	2.186 7	99.98				0.150 3	0.281 8	0.422 7	0.696 6	98.13		
	0.150 3	0.873 6	1.310 4	2.174 2	99.25				0.150 5	0.282 2	0.423 3	0.690 5	96.46		
	0.150 3	0.873 6	1.310 4	2.181 0	99.77				0.150 3	0.281 8	0.422 7	0.695 1	97.78		
苏氨酸	0.150 2	1.236 4	0.618 2	1.841 1	97.82	97.90	2.4	赖氨酸	0.150 2	0.637 3	0.318 7	0.941 2	95.36	99.10	3.6
	0.150 3	1.237 3	0.618 7	1.843 9	98.04				0.150 6	0.639 0	0.319 6	0.963 9	101.66		
	0.150 4	1.238 0	0.619 0	1.843 7	97.85				0.150 5	0.638 6	0.319 3	0.942 4	95.14		
	0.150 1	1.235 6	1.235 6	2.495 4	101.96				0.150 2	0.637 3	0.637 3	1.295 3	103.25		
	0.150 2	1.236 4	1.236 4	2.490 4	101.42				0.150 1	0.636 9	0.636 9	1.289 1	102.40		
	0.150 0	1.234 7	1.234 7	2.436 6	97.34				0.150 0	0.636 5	0.636 5	1.295 5	103.53		
	0.150 4	1.238 0	1.857 0	3.017 6	95.83				0.150 3	0.637 7	0.956 6	1.557 8	96.18		
	0.150 3	1.237 3	1.856 0	3.003 5	95.16				0.150 4	0.638 1	0.957 2	1.564 3	96.76		
	0.150 2	1.236 4	1.854 6	3.010 9	95.68				0.150 6	0.639 0	0.958 5	1.575 1	97.66		

结果表明,3 种方法提取效率无明显差异,故选择操作简便的超声提取方法;分别对提取时间 20,30,40 min 进行考察,结果表明,超声 30 min 就可以提取完全;分别对提取溶剂甲醇,50% 甲醇,乙醇,50% 乙醇,水进行了考察。文献报道,氨基酸在以水为溶媒中易长菌降解^[6],故选择 50% 甲醇为溶媒,且经衍生化后的色谱峰多且分离度较好。

3.3 进样量和色谱图记录时间的选择 本实验分别对进样量 5,10 μL 进行了考察,结果进样量为 5 μL 时,精氨酸、苏氨酸和丙氨酸的分离度较好,故选择进样量为 5 μL;按照拟定的色谱条件进样,并结合混合对照品色谱图和空白溶剂色谱图,可知

70 min 后为衍生峰,峰多且杂乱,故本次实验的记录时间为 70 min。

3.4 结论 本次实验对 14 个不同产地的金边土鳖样品进行了氨基酸指纹图谱研究,以 15 号峰(缬氨酸)为参照峰,标示出 21 个共有特征峰、指认了 13 种氨基酸成分,并同时定量分析了 6 种氨基酸成分。通过相似度评价、系统聚类 and 定量分析可知,14 批金边土鳖样品相似度均在 0.9 以上,相似度较高,表明不同产地药材质量较稳定。可在某些氨基酸成分含量上还是存在一定的差异,本次实验结果显示,精氨酸含量的高低可能与产地有一定的关系。而精氨酸是否能够成为评判金边土鳖药材质量的指标性成

表 4 14 批金边土鳖样品 6 种氨基酸含量测定

Table 4 Content of six kinds of amino acids in 14 batches of *Opisthoptatia orientalis* mg·g⁻¹

编号	甘氨酸	精氨酸	苏氨酸	缬氨酸	异亮氨酸	赖氨酸
S1	1.296 4	4.912 7	9.417 4	0.869 1	1.231 2	3.935 6
S2	2.021 7	7.413 0	7.323 3	1.070 4	1.554 1	5.751 5
S3	1.518 0	6.344 1	8.300 5	1.119 8	1.649 2	4.386 1
S4	1.180 3	4.924 2	12.723 9	1.069 1	1.632 7	4.006 3
S5	1.218 1	5.357 5	7.344 7	1.188 1	1.388 3	2.954 3
S6	1.516 3	6.113 4	6.439 8	1.102 0	1.492 9	3.377 0
S7	1.230 2	4.774 2	8.289 8	0.881 4	1.170 3	3.590 2
S8	1.182 2	5.083 1	6.987 7	0.850 5	1.123 2	3.710 3
S9	1.834 9	8.084 2	4.655 0	1.590 5	2.288 6	4.096 3
S10	1.213 6	3.056 9	13.309 1	1.164 3	1.724 8	4.358 3
S11	1.448 5	5.812 5	8.231 9	1.252 5	1.875 1	4.243 0
S12	1.781 3	6.495 5	5.531 0	1.192 7	1.635 8	3.292 4
S13	1.147 1	4.140 4	9.130 8	0.976 3	1.321 7	3.349 9
S14	1.080 3	3.854 8	8.942 7	0.863 9	1.320 5	3.809 4

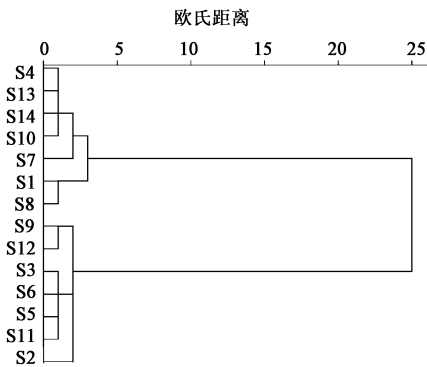


图 3 14 批金边土鳖药材聚类分析树状关系

Fig.3 Hierarchical cluster analysis for 14 batches of *Opisthoptatia orientalis* medicinal materials

分或其他氨基酸含量是否也与产地有关尚需进一步深入研究。本次实验建立的金边土鳖游离氨基酸

HPLC 指纹图谱分析方法,能够较为全面的反映药材中氨基酸成分信息,为下一步金边土鳖质量标准的制订提供实验依据。

[参考文献]

[1] 罗亚虹,张治军. 动物类中药材质量控制研究新进展[J]. 海峡药学,2016,28(8):55-57.
 [2] 丁晴,仇雅静,房克慧,等. 动物来源中药材、饮片质量现状及原因分析[J]. 中国中药杂志,2015,40(21):4309-4312.
 [3] 王凤霞,吉爱国. 药用土鳖虫化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国生化药物杂志,2009,30(1):61-64.
 [4] 陈昭,陈伟韬,罗文汇,等. HPLC 法研究土鳖虫镇痛作用与其指纹图谱的关系[J]. 中成药,2016,38(5):1074-1077.
 [5] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准(第二册)[M]. 广州:广东科技出版社,2011.
 [6] 陈绮丽,杨承焯. 金边土鳖虫(*Opisthoptatia orientalis* Burmister.)提取物抗癌作用的实验研究[J]. 中山大学学报:自然科学版,1986(1):100-102.
 [7] 李坤,戴仁怀. 两种地鳖虫总生物碱的提取及其抗菌活性研究[J]. 时珍国医国药,2015,26(6):1353-1354.
 [8] 王欣丽,李清,李博惠,等. 土鳖虫及其混淆品 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中草药,2016,47(10):1780-1784.
 [9] 李永超,李坤,戴仁怀. 金边地鳖营养成分分析与评价[J]. 环境昆虫学报,2013,35(4):466-472.
 [10] 蔡萍,万丹,肖娟,等. 土鳖虫超微粉体中游离氨基酸的测定及指纹图谱研究[J]. 中成药,2011,33(10):1645-1648.
 [11] 苏建坤,王雪,卢建秋,等. OPA-FMOC 在线衍生化法测定氨基酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):135-138.
 [12] 卢爱平. 金边土鳖消化道扫描电镜观察[J]. 动物学研究,1983,4(1):61-63,100.

[责任编辑 顾雪竹]