

不同产地斑蝥超微粉体的HPLC指纹图谱及斑蝥素的含量测定[△]

何杰^{1*}, 张水寒², 李跃辉², 万丹², 黄江波^{2#}(1.长沙市宁乡县中医医院, 湖南宁乡 410600; 2.湖南省中医药研究院, 长沙 410013)

中图分类号 R917; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)35-3302-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.35.13

摘要 目的: 结合斑蝥主要成分斑蝥素的含量测定与指纹图谱, 比较不同产地药材化学成分的差异性, 为科学评价不同产地斑蝥药材及其超微粉体的质量提供依据。方法: 建立斑蝥超微粉体指纹图谱检测方法。采用高效液相色谱(HPLC)法对各产地斑蝥超微粉体进行分析, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件比较指纹图谱的相似度, 采用SPSS 13.0统计软件对10批样品进行聚类分析, 并测定斑蝥素含量。结果: 不同产地斑蝥超微粉体指纹图谱有较大相似性, 但斑蝥素的含量有一定的差异。聚类分析结果表明, 不同产地斑蝥药材存在一定差异, 但差别不大。结论: 所建立的HPLC指纹图谱具有较好的精密性、重复性和稳定性, 结合斑蝥素的含量, 可为斑蝥药材及其超微粉体质量评价提供依据。

关键词 斑蝥; 超微粉体; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 斑蝥素

Study on the HPLC Fingerprints of *Spanish fly* Ultra-fine Powder from Different Producing Areas and Content Determination of Cantharidin

HE Jie¹, ZHANG Shui-han², LI Yue-hui², WAN Dan², HUANG Jiang-bo²(1.Changsha City Ningxiang County Hospital of TCM, Hunan Ningxiang 410600, China; 2.Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare the difference of chemical components in *Spanish fly* from different producing areas on the basis of content determination and fingerprints of cantharidin, and to provide reference for quality control of *S. fly* from different producing areas and its ultra-fine powder. METHODS: Established the fingerprint method of *S. fly* ultra-fine powder. *S. fly* ultra-fine powder were determined by HPLC. Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation software was used to analyze the similarity of HPLC fingerprint. Cluster analysis was conducted in 10 batches of sample by using SPSS 13.0 software, and the content of cantharidin was determined. RESULTS: The fingerprints of *S. fly* ultra-fine powder from different producing areas were similar to each other. The content of cantharidin had little difference. Cluster analysis showed that there was little difference in *S. fly* from different producing areas. CONCLUSIONS: Established HPLC fingerprint is precise, reproducible and stable, and combined with content determination of cantharidin to provide reference for quality evaluation of *S. fly* and its ultra-fine powder.

KEYWORDS *Spanish fly*; Ultra-fine powder; HPLC; Fingerprint; Cantharidin

斑蝥为芫青科昆虫南方大斑蝥 *Mylabris phalerata* Pallas 或黄黑小斑蝥 *M. cichorii* Linnaeus 的干燥体。其性辛、热, 有大毒, 归肝、胃、肾、大肠和小肠经, 具有攻毒蚀疮、逐瘀散结的功效^[1], 主治癰疽、经闭、顽癣、瘰疬、赘疣、痈疽不溃、恶疮死肌

等症。主产于辽宁、河南、广西、安徽、江苏、湖南、贵州等地区, 是我国首先发现的一种具有抗肿瘤作用的昆虫类药物^[2]。入药始载于《神农本草经》, 其体内含有的斑蝥素具有较强的抗肿瘤活性, 为斑蝥药材的主要有效成分与质量评价指标。

- [1] 中成药, 2013, 35(5): 1 070.
- [2] 于鹏霞, 喻婉莹, 阚伟娟, 等. 蛇床子素的抗炎作用及其机制[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(4): 866.
- [3] 王勤, 李华文, 彭新生. 蛇床子素微乳的制备及其透皮能力的研究[J]. 中国药房, 2010, 21(27): 2 529.
- [4] 汪文来, 于智敏, 鞠大宏, 等. 蛇床子化学及药理研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(6): 704.
- [5] 张春梅, 冯霞, 钟艺. 蛇床子的药理研究进展[J]. 实用药物

- 与临床, 2006, 9(1): 55.
- [6] 周军, 周丽, 侯德仁, 等. 丹皮酚对 $\text{A}\beta$ 诱导的AD模型大鼠脑细胞凋亡因子的影响及作用机理[J]. 中药材, 2011, 5(5): 758.
- [7] 黄茂芳, 刘玉梅, 朱慧兰, 等. 丹皮酚软膏对老年性皮肤瘙痒症免疫偏移的影响[J]. 中国老年学杂志, 2012, 7(32): 2 928.
- [8] 宋丹. 丹皮酚体外抑菌作用研究[J]. 医药导报, 2012, 9(31): 1 135.
- [9] 开伟华, 桂双英. O/W型丹皮酚微乳处方设计及质量评价[J]. 中成药, 2012, 34(12): 2 313.

[△] 基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目(No.C190710)
* 药师, 硕士研究生。研究方向: 中药新制剂与新技术。电话: 0731-87899212。E-mail: 469948971@qq.com
通信作者: 主任医师, 硕士研究生导师。研究方向: 中医内科。电话: 0731-84135156。E-mail: 1915954707@qq.com

(收稿日期: 2013-09-02 修回日期: 2013-12-25)

探讨斑蝥超微粉体的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,对考察目前市场上的斑蝥质量,保证临床用药的稳定性、安全性和有效性具有一定意义^[3]。指纹图谱可评价原药材、半成品和成品质量的专一性和稳定性^[4-5]。本试验针对不同产地斑蝥超微粉体,建立了HPLC指纹图谱,并对不同产地斑蝥药材中斑蝥素的含量进行测定,以期为斑蝥的质量评价提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

F-400型柴田式粉碎机(天津朋群粉碎机设备有限公司);BFM-T6BI型贝利微粉机(济南倍力粉碎技术工程有限公司);LC-10AT型HPLC仪(日本岛津公司);KQ3200型超声清洁器(昆山市超声仪器有限公司);T-214型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);旋涡混合器(金坛市大地自动化仪器厂)。

1.2 试剂

斑蝥素(中国食品药品检定研究院,批号:110783-200604);甲醇为色谱纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

试验用10批斑蝥药材来源见表1,均经湖南省中医药研究院生药室温俊达副研究员鉴定为芫青科昆虫南方大斑蝥(大斑芫青)*M. phalerata* Pallas。

表1 10批斑蝥样品的来源

Tab 1 Source of 10 batches of *S. fly*

编号	购买地点	批次	产地
S1	长沙市中医院	20110421	广西桂林
S2	湖南省中医院	20110307	湖南邵阳
S3	宁乡县中医院	20110503	贵州安顺
S4	浏阳市中医院	20110205	河南信阳
S5	湖南中医药大学附属一医院	20110327	江苏江阴
S6	湖南中医药大学附属一医院	20110410	河南新乡
S7	湖南省中医院	20110421	湖南湘潭
S8	湖南省肿瘤医院	20110711	江苏扬州
S9	湖南省中医药研究院附属医院	20110404	安徽六安
S10	湖南省中医药研究院附属医院	20110425	安徽蚌埠

2 方法与结果

2.1 超微粉体的制备^[6]

称取斑蝥细粉200 g,置贝利粉碎机中,在入磨水分约6%、介质填充率70%、温度-10~10℃条件下,超微粉碎16 min,即得。

2.2 色谱条件

色谱柱:Hypersil ODS(250 mm×4.6 mm, 5 μm);检测波长:230 nm;流速:1.0 L/min;柱温:30℃;流动相:甲醇(A)-水(B),梯度洗脱(0~30 min, 8%→10% A; >30~40 min, 10%→12% A; >40~50 min, 12%→14% A; >50~60 min, 14%→16% A);进样量:10 μl。在此色谱条件下,各峰之间分离度良好。色谱见图1。

2.3 供试品溶液的制备

取10批斑蝥药材,分别按“2.1”项下方法制备超微粉体。

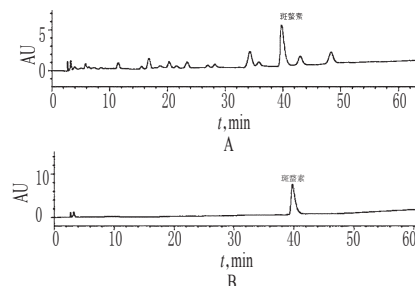


图1 高效液相色谱图

A.斑蝥超微粉体;B.对照品

Fig 1 HPLC chromatograms

A. *S. fly* ultra-fine powder; B. substance control

取超微粉体约1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加三氯甲烷60 ml,水浴加热(温度控制在70℃以下)回流3 h,滤过,用少量三氯甲烷分次洗涤容器,洗液与滤液合并,低温(温度控制在70℃以下)水浴挥干,残渣加甲醇使溶解,并转移至10 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 对照品溶液的制备

精密称取斑蝥素对照品7.0 mg,置10 ml量瓶中,用甲醇溶解并定容,配制成1 ml甲醇含斑蝥素0.70 mg的对照品溶液。

2.5 精密度的试验

取同一批次斑蝥超微粉体,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件连续进样测定5次。结果,各共有峰相对保留时间的RSD<1.0%,相对峰面积的RSD<3%,表明本方法精密度的良好。

2.6 稳定性试验

取同一批次斑蝥超微粉体,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别于制备后0、2、4、8、24 h,按“2.2”项下色谱条件进样测定。结果,各共有峰相对保留时间的RSD<1.0%,相对峰面积的RSD<3%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批次斑蝥超微粉体6份,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样测定。结果,各共有峰相对保留时间的RSD<1.0%,相对峰面积的RSD<3%,表明本方法重复性良好。

2.8 指纹图谱相似度分析

利用国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件,使用中位数法对所得的HPLC指纹图谱全谱进行相似度计算^[7],指纹图谱见图2。经计算,10批斑蝥药材的相似度分别为0.920、0.904、0.923、0.924、0.925、0.908、0.923、0.922、0.924、0.922,均>0.900,说明药材品质基本一致。

2.9 10批斑蝥药材的共有峰峰面积聚类分析^[8]

从图2可以看出,匹配后共有9个共有峰,其中7号峰为斑蝥素色谱峰。对所有共有峰峰面积与称样量加以量化,用SPSS 13.0统计软件进行聚类分析,以欧氏距离平方作为度量

方法,离差平方和作为聚类方法。选择凝聚状态表,生成聚类树形图。结果显示,2号峰和6号峰与其他峰距离较远,这与相似度分析结果一致。

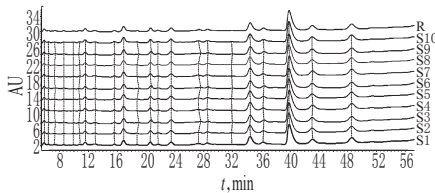


图2 10批斑蝥超微粉体指纹图谱

Fig 2 HPLC Fingerprint of 10 batches of *S. fly* ultra-fine powder

2.10 斑蝥素的含量测定

分别量取“2.3”项下方法制备的供试品溶液适量,按下述色谱条件进样测定。色谱柱:Hypersil ODS(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(18:82, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:230 nm;柱温:30 ℃。记录峰面积,计算斑蝥素含量,结果见表2。由表2可见,10个产地斑蝥中斑蝥素含量均高于《中国药典》规定的0.35%。广西桂林、河南信阳、湖南湘潭产含量高于其余产地;同为湖南产斑蝥,斑蝥素含量也有一定差异。

表2 不同产地斑蝥超微粉体中斑蝥素含量测定结果

Tab 2 Content determination of cantharidin in *S. fly* ultra-fine powder from different producing areas

编号	购买地点	批次	产地	斑蝥素质量分数, %
S1	长沙市中医院	20110421	广西桂林	0.639
S2	湖南省中医院	20110307	湖南邵阳	0.405
S3	宁乡县中医院	20110503	贵州安顺	0.378
S4	浏阳市中医院	20110205	河南信阳	0.625
S5	湖南中医药大学附属一医院	20110327	江苏江阴	0.362
S6	湖南中医药大学附属一医院	20110410	河南新乡	0.592
S7	湖南省中医院	20110421	湖南湘潭	0.611
S8	湖南省肿瘤医院	20110711	江苏扬州	0.420
S9	湖南省中医药研究院附属医院	20110404	安徽六安	0.448
S10	湖南省中医药研究院附属医院	20110425	安徽蚌埠	0.490

3 讨论

从斑蝥超微粉体的HPLC指纹图谱可以看出,三氯甲烷提取物的HPLC图峰形基本一致,化学成分无明显变化,表明超微粉碎属于物理粉碎过程,故斑蝥超微粉体HPLC指纹图谱既可以控制斑蝥超微粉体的内在质量,也可以控制斑蝥药材的内在质量。按相同方法制备供试品溶液,超微粉体中斑蝥素的溶出量较斑蝥药材有所增加,可能是因为粉体粒径的减少导致体表面积增大,增加了与溶媒的有效接触面积,同时缩短了溶剂进入颗粒中心的距离。

斑蝥超微粉的成分较多,但斑蝥素是斑蝥的主要成分且较稳定,出峰时间居中,且峰面积比较大,故选择其作为参照物。本试验曾分别采用超声波振荡法和热回流提取法提取斑蝥素,结果表明,热回流提取法效果更好。笔者利用二极管阵列检测器对样品进行分析,观察全谱的分离与吸收情况,结果在230 nm检测波长下,基线较平稳,包含的信息量最大,能充分反映样品组分全貌,最终选择230 nm作为本试验的检测波长。

指纹图谱研究结果表明,10批斑蝥超微粉体的特征吸收基本一致,表明此色谱条件与分析方法用于控制斑蝥粉体的质量基本可行。相似度计算结果表明,不同产地斑蝥药材的相似度均>0.900,说明地域性差异不明显。

不同产地斑蝥超微粉体中斑蝥素含量有较明显的差别,这可能与斑蝥药材采收季节和加工方法不同等多种因素有关。本试验仅标示出一个斑蝥素特征峰,后期研究将结合液-质联用等现代技术对其他共有峰加以指认。

对10批斑蝥聚类分析的结果显示,由于均来源于斑蝥药材的主产区,故其质量较为接近,这与相似度和聚类分析结果也基本一致。

参考文献

- [1] 颜增光,蒋国芳.斑蝥及其药理研究概述[J].广西科学院学报,1998,14(1):10.
- [2] 何太平,何振辉,莫丽儿,等.斑蝥素抑制NF-κB(P65)及Smad3在高转移卵巢癌细胞株HO-8910PM中的表达[J].广东医学院学报,2005,23(2):111.
- [3] 张贝贝,方婧,许海玉,等.HPLC测定道地产地和主产地茅苍术中β-桉叶醇及其他成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(8):116.
- [4] 刘永利,李冬梅,冯丽,等.银黄系列品种高效液相指纹图谱[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(20):102.
- [5] 刘布鸣,刘偲翔,林霄,等.十大功劳HPLC指纹图谱及聚类分析[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(4):95.
- [6] 何杰,向丽,张水寒,等.不同粒径的防风粉体外溶出度研究[J].中国药房,2012,23(47):4 449.
- [7] 聂磊,曹进,罗国安,等.中药指纹图谱相似度评价方法的比较[J].中成药,2005,27(3):249.
- [8] 欧阳臻,杨凌,宿树兰,等.茅苍术挥发油的气相色谱-质谱指纹图谱研究[J].药学报,2007,42(19):968.

(收稿日期:2013-09-01 修回日期:2013-12-19)