

不同产地蚕蛹的HPLC指纹图谱研究及多组分含量测定^Δ

郑倩倩*, 王小芳, 路丽娟, 张 森, 赵艳普(石家庄市食品药品检验中心, 石家庄 050000)

中图分类号 R284;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)14-1747-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.14.14

摘要 目的:建立蚕蛹指纹图谱和多组分含量测定方法,为全面评价蚕蛹的质量提供参考。方法:以不同产地的18批蚕蛹为样品,采用高效液相色谱法(HPLC)进行测定。色谱柱为资生堂CAPCELL PAK C₁₈ AQ S5,流动相为甲醇-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液(梯度洗脱),检测波长为260 nm,柱温为30 ℃,流速为1.0 mL/min,进样量为10 μL。利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012年版)》进行HPLC指纹图谱分析及相似度评价,并通过与对照品色谱图比对进行色谱峰的指认;测定蚕蛹样品中尿嘧啶、鸟嘌呤、黄嘌呤、尿苷等4个核苷类成分的含量。结果:在18批蚕蛹样品的HPLC指纹图谱中确定了16个共有峰,指认了3号峰为尿嘧啶、6号峰为鸟嘌呤、7号峰为黄嘌呤、8号峰为尿苷;各样品图谱与对照指纹图谱的相似度为0.912~1.000。尿嘧啶、鸟嘌呤、黄嘌呤、尿苷分别在5.34~534、5.28~528、5.06~506、5.195~519.5 μg/mL质量浓度范围内与其峰面积线性关系良好(r 均不低于0.999 8);检测限分别为0.032 4、0.032 0、0.030 7、0.031 2 μg/mL,定量限分别为0.106 8、0.105 6、0.101 2、0.103 0 μg/mL;精密密度、重复性、稳定性(24 h)试验的RSD均小于1.00%($n=6$);平均加样回收率为100.15%~102.95%,RSD均小于2.00%($n=9$)。含量测定结果显示,不同产地蚕蛹中尿嘧啶、鸟嘌呤、黄嘌呤、尿苷的含量分别为0.41%~2.46%、0.37%~1.98%、0.72%~2.63%、0.94%~3.67%。结论:所建蚕蛹HPLC指纹图谱及其4个核苷类成分含量测定方法的专属性较强,且准确、可靠,可用于蚕蛹的质量评价及质量控制。

关键词 蚕蛹;高效液相色谱法;指纹图谱;含量测定;核苷类成分

Study on HPLC Fingerprint of *Bombyx mori* from Different Producing Areas and Content Determination of Multi-component

ZHENG Qianqian, WANG Xiaofang, LU Lijuan, ZHANG Miao, ZHAO Yanpu (Shijiazhuang Food and Drug Inspection Center, Shijiazhuang 050000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the fingerprint of *Bombyx mori* and the method for the content determination of multi-components, and to provide reference for comprehensive quality evaluation of *B. mori*. METHODS: Using 18 batches of *B. mori* from different producing areas as samples, HPLC method was used. The column was Shiseido CAPCELL PAK C₁₈ AQ S5 with mobile phase consisted of methanol-0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 260 nm, and column temperature was set at 30 ℃. The sample size was 10 μL. HPLC fingerprint analysis and similarity evaluation were performed by using *TCM Chromatogram Fingerprint Similarity Evaluation System* (2012 edition), and the chromatographic peak was identified by comparing with the chromatogram of reference substance. The contents of 4 nucleosides as uracil, guanine, xanthine, uridine were determined. RESULTS: A total of 16 common peaks were identified in HPLC fingerprint for 18 batches of *B. mori*, and peaks 3, 6, 7 and 8 were identified as uracil, guanine, xanthine and uridine. The similarity of sample chromatogram with control fingerprint were 0.912-1.000. The linear range of uracil, guanine, xanthine and uridine were 5.34-534, 5.28-528, 5.06-506, 5.195-519.5 μg/mL ($r \geq 0.999 8$). The limits of detection were 0.032 4, 0.032 0, 0.030 7, 0.031 2 μg/mL, and the limits of quantitation were 0.106 8, 0.105 6, 0.101 2, 0.103 0 μg/mL. RSDs of precision, reproducibility and stability tests (24 h) were all lower than 1.00% ($n=6$). Average recoveries were 100.15%-102.95%, and RSDs were all lower than 2.00% ($n=9$). The content determination results showed that the content of uracil, guanine, xanthine and uridine of *B. mori* from different producing areas were 0.41%-2.46%, 0.37%-1.98%, 0.72%-2.63%, 0.94%-3.67%, respectively. CONCLUSIONS: Established HPLC fingerprint and content determination method of 4 nucleosides were specific, accurate and reliable, which can be used for the quality evaluation and control of *B. mori*.

KEYWORDS *Bombyx mori*; HPLC; Fingerprint; Content determination; Nucleosides

蚕蛹又称小蜂儿^[1],为蚕蛾科昆虫家蚕*Bombyx mori* Linnaeus的干燥蛹^[2]。据《本草纲目》记载,蚕蛹炒食可治风及劳瘦,研敷可治恶疮,研末饮服可退热、除蛔虫,

煎煮饮服可止消渴^[1]。蚕蛹在全国各地均有分布,且作为传统的药食同源中药材,其营养和药用价值都很高^[3-4]。现代研究表明,蚕蛹含有丰富的营养成分及蛋白质、多糖等生物活性成分,具有促进肝细胞再生、降低胆固醇、降血脂、降血糖及延缓衰老、抗肿瘤等多种作用^[5-7]。此外,蚕蛹作为动物药,体内还存在多种核苷类

^Δ 基金项目:河北省中医药管理局科研计划项目(No.2020356)

* 主管中药师,硕士。研究方向:中药检验。电话:0311-85215171。

E-mail:2577653098@qq.com

物质(如黄嘌呤、尿嘧啶、鸟嘌呤、尿苷等),其可参与DNA的代谢过程,具有抗肿瘤、抗病毒等多种生物活性,并可调节机体的心血管系统、免疫系统、代谢系统、神经系统等,具有较高的研究价值^[8-9]。在医药领域,目前已研究开发出了多种含核苷类成分的药物,如碘苷、利巴韦林、阿昔洛韦等,且研究、应用范围还在扩大^[10]。中药指纹图谱作为一种可量化的综合性化学鉴定方法,具有整体性和模糊性的特点^[11-13],可用来评价中药材及中成药的整体质量^[14-16]。鉴于此,本研究拟采用高效液相色谱法(HPLC)建立不同产地蚕蛹的指纹图谱,并对黄嘌呤、尿苷、尿嘧啶、鸟嘌呤等4个核苷类成分进行定量分析,以期更科学、全面地评价蚕蛹的质量。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有1260型HPLC仪(美国Agilent公司)、XS105DU型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司)、P180H型超声波清洗机(德国Elmasonic公司)、FW100型高速万能粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

本研究共收集蚕蛹药材18批,分别来自河北(8批)、浙江(5批)和四川(5批);所有药材经石家庄市食品药品检验中心毕飞霞副主任药师鉴定均为蚕蛾科昆虫家蚕*B. mori* Linnaeus的干燥蛹,具体来源信息见表1。尿嘧啶(批号100469-201302,纯度99.6%)、鸟嘌呤(批号140631-201205,纯度99.6%)、黄嘌呤(批号140662-200802,纯度99.1%)、尿苷(批号111887-200202,纯度98.6%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为去离子水(电导率为18.0 MΩ·cm)。

表1 18批蚕蛹药材来源信息

Tab 1 Origin of 18 batches of *B. mori*

编号	产地	收集时间	编号	产地	收集时间
CY-1	河北承德	2018-06	CY-10	浙江杭州	2018-09
CY-2	河北承德	2018-06	CY-11	河北承德	2018-10
CY-3	河北承德	2018-06	CY-12	四川成都	2018-10
CY-4	河北承德	2018-06	CY-13	浙江嘉兴	2018-10
CY-5	河北承德	2018-08	CY-14	浙江嘉兴	2018-10
CY-6	河北承德	2018-08	CY-15	四川成都	2018-10
CY-7	河北承德	2018-09	CY-16	四川成都	2018-10
CY-8	浙江嘉兴	2018-09	CY-17	四川成都	2018-09
CY-9	浙江嘉兴	2018-10	CY-18	四川成都	2018-10

2 方法与结果

2.1 色谱条件

以资生堂CAPCELL PAK C₁₈ AQ S5(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,以甲醇(A)-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~13 min, 100% B; 13~30 min, 100% B→85% B; 30~50 min, 85% B→40% B; 50~55 min, 40% B);流速为1.0 mL/min;柱温为30 ℃;检测波长为260 nm;进样量为10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取蚕蛹样品,粉碎(过三号筛),精密称取上述粉末0.5 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入水25 mL,密塞,称定质量,超声(功率250 W,频率40 kHz)处理40 min,放冷至室温;再次称定质量,用水补足减失的质量,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.2 混合对照品溶液 称取黄嘌呤对照品10.12 mg、鸟嘌呤对照品10.56 mg、尿苷对照品10.39 mg、尿嘧啶对照品10.68 mg,置于同一10 mL量瓶中,加50%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品贮备液。将上述贮备液用50%甲醇稀释20倍,制成每1 mL中含黄嘌呤50.6 μg、鸟嘌呤52.8 μg、尿苷51.9 μg、尿嘧啶53.4 μg的混合对照品溶液。

2.2.3 空白溶液 以样品的提取溶剂(水)作为空白溶液。

2.3 专属性试验

取“2.2”项下供试品溶液(编号CY-5)、混合对照品溶液以及空白溶液,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,各待测成分的色谱峰与相邻色谱峰间的分离度均大于1.5,以各成分计的理论板数均大于6 000,且空白溶液对测定无干扰,说明此方法专属性良好。专属性试验的HPLC色谱图见图1。

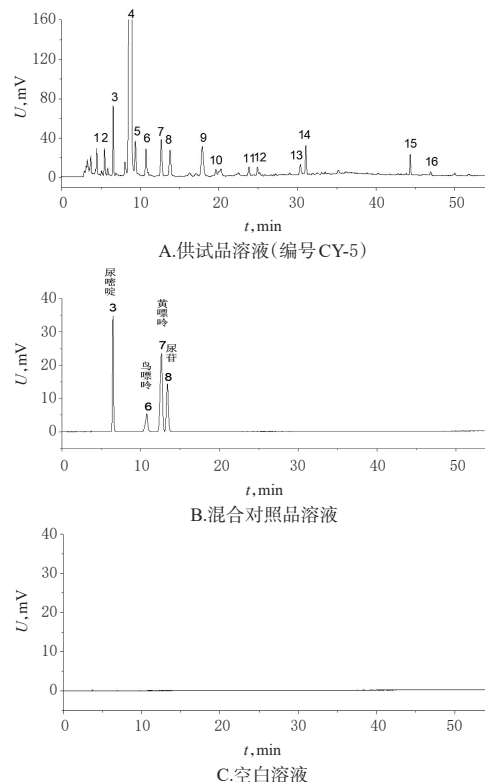


图1 专属性试验的HPLC图

Fig 1 HPLC chromatograms of specificity tests

2.4 指纹图谱的建立及分析

2.4.1 精密度试验 精密称取蚕蛹样品(编号CY-5)0.5 g,按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,然后按照“2.1”

项下色谱条件连续进样6次,记录色谱图。以8号峰(尿苷峰)为参照峰(S,该峰的保留时间相对居中且与其余色谱峰的分度良好),计算得16个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.3% ($n=6$)、相对峰面积的RSD均小于0.5% ($n=6$),表明该方法的精密度良好。

2.4.2 重复性试验 精密称取蚕蛹样品(编号CY-5)0.5 g,共6份,分别按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,然后按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以8号峰为参照峰,计算得16个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.8% ($n=6$)、相对峰面积的RSD均小于0.9% ($n=6$),表明该方法的重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 精密称取蚕蛹样品(编号CY-5)0.5 g,按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,分别在室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以8号峰为参照峰,计算得16个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2% ($n=6$),表明该供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.4.4 指纹图谱建立及相似度评价 精密称取18批蚕蛹样品各0.5 g,按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,然后分别按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将18批蚕蛹样品的HPLC图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》中,以样品CY-1的图谱为参照图谱,设置时间窗宽度为0.1 min,通过多点校正和色谱峰匹配生成样品叠加指纹图谱,采用中位数法生成对照指纹图谱(R);然后以对照指纹图谱为参照,进行各样品图谱的相似度评价。同时,通过将对照指纹图谱与对照品色谱图(图1B)进行比对,进行色谱峰的指认。结果,18批蚕蛹样品中共标定了16个共有峰;通过与对照品色谱图比对,指认了其中4个共有峰,分别为尿嘧啶(3号峰)、鸟嘌呤(6号峰)、黄嘌呤(7号峰)和尿苷(8号峰)。各样品图谱与对照指纹图谱的相似度为0.912~1.000,说明18批蚕蛹样品具有很高的相似性。18批蚕蛹样品的HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱见图2,相似度评价结果见表2。

2.5 4个核苷类成分的含量测定

2.5.1 线性关系考察 分别精密量取“2.2.2”项下混合对照品贮备液0.5、5、10、25、50 mL,置于不同的100 mL量瓶中,加50%甲醇稀释并定容,摇匀,制成5个不同质量浓度的线性工作液。将上述线性工作液分别按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分的质量浓度为横坐标($x, \mu\text{g/mL}$)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归。结果,各待测成分均在其相应质量浓度范围内与其峰面积的线性关系良好(r 均不低于0.999 8),详见表3。

2.5.2 检测限和定量限考察 取“2.2.2”项下混合对照品贮备液,以50%甲醇倍比稀释,然后按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。分别以信噪比3:1、10:1计算待测成分的检测限和定量限,结果见表3。

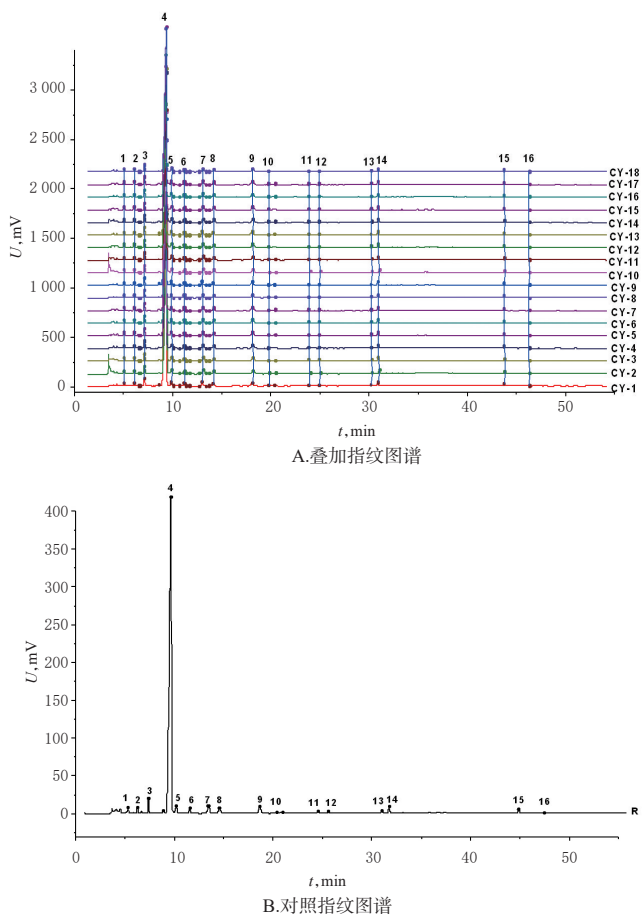


图2 18批蚕蛹样品的HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱(R)

Fig 2 HPLC superimposed fingerprint and control fingerprint (R) of 18 batches of *B. mori*

表2 18批蚕蛹样品指纹图谱的相似度评价结果

Tab 2 Results of similarity evaluation of 18 batches of *B. mori*

编号	相似度	编号	相似度
CY-1	1.000	CY-10	0.912
CY-2	0.921	CY-11	0.997
CY-3	0.929	CY-12	0.996
CY-4	0.921	CY-13	0.929
CY-5	0.919	CY-14	0.958
CY-6	0.939	CY-15	0.987
CY-7	0.941	CY-16	0.958
CY-8	0.912	CY-17	0.946
CY-9	0.997	CY-18	0.949

表3 4个待测成分的回归方程、相关系数、线性范围、检测限和定量限

Tab 3 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges, limits of detection and limits of quantitation of 4 components to be tested

待测成分	回归方程	r	线性范围, $\mu\text{g/mL}$	检测限, $\mu\text{g/mL}$	定量限, $\mu\text{g/mL}$
尿嘧啶	$y=6176.6x+8084.9$	0.999 8	5.34~534	0.032 4	0.106 8
鸟嘌呤	$y=2145.8x+7347.1$	0.999 9	5.28~528	0.032 0	0.105 6
黄嘌呤	$y=9957.3x-31845$	0.999 8	5.06~506	0.030 7	0.101 2
尿苷	$y=5427.1x-31723$	0.999 9	5.195~519.5	0.031 2	0.103 0

2.5.3 精密度试验 精密称取蚕蛹样品(编号CY-5)0.5 g,按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,然后按照“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,尿嘧啶、鸟嘌呤、黄嘌呤、尿苷峰面积的RSD分别为0.21%、0.35%、0.24%、0.53% ($n=6$),表明该方法的精密度良好。

2.5.4 重复性试验 精密称取蚕蛹样品(编号CY-5)0.5 g,共6份,分别按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,然后按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并采用外标法计算各成分的含量。结果,尿嘧啶、鸟嘌呤、黄嘌呤、尿苷含量的RSD分别为0.51%、0.65%、0.44%、0.59% ($n=6$),表明该方法的重复性良好。

2.5.5 稳定性试验 精密称取蚕蛹样品(编号CY-5)0.5 g,按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,在室温下放置0、2、4、8、12、24 h时分别按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,尿嘧啶、鸟嘌呤、黄嘌呤、尿苷峰面积的RSD分别为0.71%、0.75%、0.64%、0.79% ($n=6$),表明该供试品溶液在室温放置24 h的稳定性良好。

2.5.6 准确度考察 取已知含量的蚕蛹样品(编号CY-5)样品9份,每份0.25 g,精密称定,分别按已知量的50%、100%、150%加入相应混合对照品溶液,每个质量浓度平行操作3份,按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,然后按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算4个成分的加样回收率。结果,尿嘧啶、鸟嘌呤、黄嘌呤、尿苷的平均加样回收率分别为102.95% ($RSD=1.79%$, $n=9$)、102.05% ($RSD=1.74%$, $n=9$)、101.70% ($RSD=1.73%$, $n=9$)、100.15% ($RSD=1.82%$, $n=9$),表明本方法的准确度良好,结果见表4。

2.5.7 蚕蛹样品中4个成分的含量测定 取18批蚕蛹样品,分别按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,然后按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并采用外标法分别计算各成分的含量。结果,浙江产蚕蛹中尿嘧啶、鸟嘌呤、黄嘌呤、尿苷的平均含量最高,分别为2.28%、1.56%、2.45%、3.20%;其次是四川产蚕蛹,4个成分的平均含量分别为1.09%、1.11%、2.00%、2.53%;河北产蚕蛹中上述4个成分的含量最低,平均含量分别为0.57%、0.50%、0.85%、1.41%。可见,不同产地蚕蛹样品中4个核苷类成分的含量差异较大。18批蚕蛹样品中4个核苷类成分的含量测定结果见表5。

3 讨论

3.1 样品提取方法的选择

在前期研究中,笔者分别采用甲醇、水、乙醇、30%乙醇为提取溶剂进行蚕蛹样品的提取。结果显示,以甲醇、乙醇、30%乙醇为样品的提取溶剂时,色谱图中色谱峰信息量较少;而以水为提取溶剂时,色谱图中各色谱峰的分度度均较好,且信息量较多,因此最终选用水作为蚕蛹样品的提取溶剂。在此基础上,笔者又分别考察了回流提取和超声提取两种提取方法对蚕蛹样品色谱

表4 4个待测成分的加样回收率测定结果($n=9$)

Tab 4 Results of recovery tests of 4 components to be tested ($n=9$)

成分	已知量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%			
尿嘧啶	3.069 1	1.588 1	4.727 4	104.42	102.95	1.79			
	3.047 2	1.588 1	4.722 1	105.47					
	3.050 9	1.588 1	4.703 6	104.07					
	3.066 7	3.176 2	6.324 5	102.57					
	3.056 9	3.176 2	6.335 9	103.24					
	3.048 4	3.176 2	6.365 1	104.42					
	3.058 2	4.764 2	7.837 6	100.32					
	3.036 3	4.764 2	7.825 2	100.52					
	3.020 5	4.764 2	7.856 4	101.50					
	鸟嘌呤	2.006 3	1.099 1	3.126 6			101.93	102.05	1.74
		2.025 6	1.099 1	3.158 8			103.10		
		2.028 0	1.099 1	3.175 1			104.37		
		2.038 5	2.198 3	4.221 5			99.30		
		2.032 1	2.198 3	4.210 8			99.11		
		2.026 4	2.198 3	4.301 5			103.49		
2.032 9		3.297 1	5.404 3	102.25					
2.018 3		3.297 1	5.388 6	102.22					
1.989 8		3.297 1	5.375 1	102.68					
黄嘌呤	3.621 3	1.874 2	5.552 1	103.02	101.70	1.73			
	3.595 5	1.874 2	5.539 8	103.74					
	3.599 8	1.874 2	5.478 7	100.25					
	3.618 4	3.748 3	7.439 0	101.93					
	3.607 0	3.748 3	7.469 6	103.05					
	3.596 9	3.748 3	7.481 3	103.63					
	3.608 4	5.622 1	9.180 4	99.11					
	3.582 6	5.622 1	9.195 7	99.84					
	3.564 0	5.622 1	9.226 5	100.72					
	尿苷	8.863 3	4.487 2	13.188 7			96.39	100.15	1.82
8.800 1		4.487 2	13.251 0	99.19					
8.810 7		4.487 2	13.387 9	102.01					
8.856 3		8.974 3	17.995 4	101.84					
8.828 2		8.974 3	17.962 5	101.78					
8.803 6		8.974 3	17.838 5	100.67					
8.831 7		13.461 1	22.145 9	98.91					
8.768 6		13.461 1	22.185 7	99.67					
8.722 9		13.461 1	22.298 5	100.85					

图的影响,发现这两种样品提取方式对结果的影响差异不大,但鉴于超声提取操作更简便,故本研究最终选取超声提取的方式进行蚕蛹样品的处理。此外,笔者通过考察不同料液比(1:25、1:50、1:100, g/mL)、不同提取时间(30、40、50 min)对结果的影响,最终选择料液比1:50 (g/mL)、提取时间40 min。

3.2 色谱条件的选择

在前期研究中,笔者先后采用两种流动相体系(甲醇-水、甲醇-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液)进行了分离条件的探索。结果发现,以甲醇-水为流动相进行梯度洗脱时,样品的色谱峰达不到基线分离,且样品图谱的信息量较少;而采用甲醇-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液为流动相进行梯度洗脱时,样品图谱中的色谱峰数量多、峰形对称性和分离度均较好,图谱所反映的样品信息量较大,故本研究最终以甲醇-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液为流动相进行梯度洗脱。此外,笔者前期利用二极管阵列

表5 18批蚕蛹样品中4个核苷类成分的含量测定结果 (%)

Tab 5 Results of content determination of 4 nucleosides in 18 batches of *B. mori* (%)

编号	产地	尿嘧啶	鸟嘌呤	黄嘌呤	尿苷
CY-1	河北	0.52	0.46	0.88	1.35
CY-2	河北	0.48	0.43	0.85	1.86
CY-3	河北	0.41	0.59	0.97	0.98
CY-4	河北	0.56	0.52	0.79	0.99
CY-5	河北	0.61	0.39	0.72	1.77
CY-6	河北	0.62	0.37	0.86	1.83
CY-7	河北	0.61	0.52	0.75	0.94
CY-8	浙江	1.90	0.97	2.08	2.69
CY-9	浙江	2.35	1.36	2.44	3.06
CY-10	浙江	2.32	1.68	2.57	3.51
CY-11	河北	0.78	0.74	0.99	1.55
CY-12	四川	0.88	1.45	1.64	2.38
CY-13	浙江	2.39	1.79	2.63	3.05
CY-14	浙江	2.46	1.98	2.52	3.67
CY-15	四川	1.32	1.21	1.76	2.77
CY-16	四川	1.24	0.99	1.97	2.46
CY-17	四川	1.07	0.98	2.29	3.01
CY-18	四川	0.96	0.94	2.38	2.05

检测器在200~400 nm波长范围内扫描,发现鸟嘌呤、尿苷、尿嘧啶、黄嘌呤分别在258、260、266、274 nm波长处有最大吸收。经分析后发现,在260 nm波长处,供试品溶液中各待测成分色谱峰与其余色谱峰分离良好,故本研究最终选择260 nm作为测定波长。接着,笔者又对不同柱温(25、30、35 ℃)和不同流速(0.8、1.0、1.2 mL/min)进行了考察,结果当柱温为30 ℃、流速为1.0 mL/min时各色谱峰的峰形最好。

3.3 指纹图谱及含量测定结果分析

指纹图谱作为整体、稳定的化学鉴别手段,在中药材及中成药质量控制中具有重要作用。本研究建立了18批蚕蛹样品的HPLC指纹图谱,并进行了相似度评价。结果,本研究共确认了16个共有峰,并指认了尿嘧啶、鸟嘌呤、黄嘌呤、尿苷等4个成分;18批样品的相似度均大于0.900,表明河北、四川、浙江产蚕蛹的成分具有较高的相似性。蚕蛹作为动物药,体内存在的核苷类物质是其代表性成分,具有重要的作用^[8-10]。其中,黄嘌呤可作用于中枢神经系统、心血管系统,具有扩张支气管的作用,可作为支气管扩张剂治疗哮喘;尿苷具有免疫调节等功能,可用于治疗巨型红血球贫血以及肝脑血管、心血管等疾病;尿嘧啶可抑制肿瘤细胞增殖,可用于肿瘤的治疗;鸟嘌呤可拮抗代谢调控,具有信号传递作用,常被作为痛风症研究的生理指标^[17-19]。笔者对18批蚕蛹样品中尿嘧啶、鸟嘌呤、黄嘌呤、尿苷等4个核苷类成分进行定量分析发现,不同产地样品中上述4个成分的含量差异较大,其中以浙江产蚕蛹的平均含量最高,其次是四川产蚕蛹,而河北产蚕蛹的平均含量最低,这可能与各产地的气候、地理位置等不同有关。

综上所述,本研究所建立的不同产地蚕蛹HPLC指

纹图谱及多组分含量测定方法的专属性较强,且准确、可靠。结合指纹图谱和核苷类成分的定量研究,可以为区分蚕蛹的产地以及全面、准确地控制蚕蛹的质量提供参考。

参考文献

- [1] 李时珍.本草纲目:校点本:下册[M].2版.北京:人民卫生出版社,2013:2251.
- [2] 王伟,何国庆,金英哲,等.蚕蛹蛋白的综合利用现状分析和开发前景展望[J].食品与发酵工业,2006,32(9):112-115.
- [3] 吴娉明,邹宇晓,廖森泰,等.蚕蛹油的降血糖机制初探[J].蚕业科学,2007,33(4):694-697.
- [4] ZHANG M, HAGA A, SEKIGUCHI I, et al. Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silk worm (*Bombyx mori*) pupa exuvia[J]. Int J Biol Macromolecules, 2000, 27(16):99-105.
- [5] PEREIRA N, FERRARESE-FILHO O, MATSUSHITA M, et al. Proximate composition and fatty acid profile of *Bombyx mori* L. chrysalis toast[J]. J Food Compos Anal, 2003, 16(4):451-457.
- [6] 宋燕青,邓树海,隋志义,等.蚕蛹药用成分及其提取工艺研究概况[J].中国生化药物杂志,2006,27(5):306-309.
- [7] 周建军,赵桦.一种简便的提取蚕蛹蛋白新方法[J].天然产物研究与开发,2001,13(4):44-46.
- [8] 吕爱娟,吴皓.中药中核苷类成分的研究进展[J].中国中医药信息杂志,2006,13(7):94-97.
- [9] 王锐.嘧啶核苷的研究进展[J].生物技术通讯,2007,18(3):539-542.
- [10] 丁兴杰,熊亮,周勤梅,等.天然核苷类成分的化学结构和药理活性研究进展[J].成都中医药大学学报,2018,41(6):102-108.
- [11] 张钧.指纹图谱研究现状的分析[J].中国医药导报,2007,4(27):150-151.
- [12] 谢培山.中药色谱指纹图谱鉴别的概念、属性、技术与应用[J].中国中药杂志,2001,26(10):653-655.
- [13] 江俊.中药质量评价新方法:中药指纹图谱[J].湖北中医学院学报,2001,3(4):11.
- [14] 赵宇新,李曼玲.模式识别在中药质量评价中的应用进展[J].中国中药杂志,2002,27(11):808-811.
- [15] 赵秋龙,卞晓坤,钱大玮,等.基于UPLC指纹图谱及化学计量学的不同产地白芍差异比较研究[J].中国中药杂志,2019,44(15):3316-3322.
- [16] 曹虹虹,严维花,郭爽,等.基于多成分测定及指纹图谱评价不同产地栀子质量[J].中国中药杂志,2019,44(18):4026-4033.
- [17] 王镜岩,朱圣庚,徐长法.生物化学:上册[M].3版.北京:高等教育出版社,2002:478-482.
- [18] 汤雁波,李卓荣.核苷类抗病毒药物研究进展[J].中国生化药物杂志,2004,25(1):44-47.
- [19] 王楠,蔡夏夏,李勇.外源核苷酸与免疫功能研究进展[J].食品科学,2016,37(5):278-282.

(收稿日期:2021-04-09 修回日期:2021-06-15)

(编辑:林 静)