

· 基础研究 ·

全蝎质量评价及标准提高研究[△]

刘凯娜*, 王晓云, 潘赢, 程雅婷, 庞静, 王健, 郭金颖

(河北省秦皇岛市食品药品检验中心, 河北 秦皇岛 066004)

[摘要] 目的: 建立全蝎的质量控制方法用于质量评价。方法: 对全蝎水分、总灰分、酸不溶性灰分进行检查; 考察不同浸出物溶剂对测定结果的影响; 采用 TLC 法对全蝎中脂类成分进行定性鉴别; 采用 HPLC 法测定全蝎中特征氨基酸的含量。结果: 拟定了水分、总灰分、酸不溶性灰分限量; 浸出物测定以乙醇为溶剂更为科学; TLC 色谱斑点清晰; 甘氨酸、精氨酸、L-脯氨酸、亮氨酸分别在 0.509 1~5.091 0 μg ($r=1.000\ 0$)、0.502 5~5.025 0 μg ($r=1.000\ 0$)、0.348 2~3.482 0 μg ($r=1.000\ 0$)、0.508 8~5.088 0 μg ($r=1.000\ 0$) 与峰面积呈良好的线性关系, 平均回收率分别为 102.5% (RSD=2.7%, $n=9$), 104.1% (RSD=2.8%, $n=9$), 102.5% (RSD=2.2%, $n=9$), 102.3% (RSD=2.9%, $n=9$)。结论: 本法简便、准确、重复性好, 可用于全蝎的质量控制。

[关键词] 全蝎; 检查项; 浸出物; TLC; HPLC; 质量评价

Standard Improvement of Scorpion and Quality Evaluation

LIU Kaina*, WANG Xiaoyun, PAN Ying, CHENG Yating, PANG Jing, WANG Jian, GUO Jinying

(Qinhuangdao Institute for Food and Drug Control of Hebei Province, Qinhuangdao 066004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quality standard for scorpion used for quality evaluation. **Methods:** The contents of moisture, total ash and acid insoluble ash were determined. The effect of different extract solvents on the determination was investigated. Lipid components of scorpion were identified by TLC, the contents of characteristic amino acids were determined by HPLC. **Results:** The content of moisture, total ash and acid insoluble ash had been measured. The extract determination was more reasonable with ethanol as the solvent. The developed TLC spots were obvious. The method had good linear relationship within the range of 0.509 1-5.091 0 μg for glycine ($r=1.000\ 0$), 0.502 5-5.025 0 μg for arginine ($r=1.000\ 0$), 0.348 2-3.482 0 μg for L-proline ($r=1.000\ 0$) and 0.508 8-5.088 0 μg for leucine ($r=1.000\ 0$). The average recoveries were 102.5%, 104.1%, 102.5% and 102.3% with RSD of 2.7%, 2.8%, 2.2% and 2.9% ($n=9$), respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate and specific, and can be used in the quality control of scorpion.

[Keywords] scorpion; check items; extract; TLC; HPLC; quality evaluation

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.2.010

全蝎为钳蝎科动物东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch 的干燥体。性平, 味辛, 有熄风止痉、通络止痛、攻毒散结的功能^{[1]143}。市售品多为咸全蝎^[2]。现代研究表明蝎毒为全蝎的主要活性成分^[3]。

全蝎现行法定检验标准为《中华人民共和国药典》(《中国药典》)2015年版一部, 包括性状、显微鉴别、浸出物、黄曲霉毒素, 鉴于当前标准较简单, 不足以全面反映药品质量, 为了系统地评价全蝎的质量特性, 本文考察了水分、总灰分、酸不溶性灰分等检查项; 考察了不同浸出物溶剂对测定结

果的影响; 建立了全蝎的 TLC 鉴别方法; 建立了全蝎中特征氨基酸的 HPLC 含量测定方法, 为全蝎质量标准的提高提供依据。

1 材料

岛津 LC-20A 高效液相色谱仪, BHW-09 恒温电加热器(成都广普科学仪器有限公司), TG16-WS 台式高速离心机(湘仪离心机仪器有限公司), AG-135 电子天平(METTLER TOLEDO, $d=0.01\ \text{mg}$), PHS-3C pH 计(上海雷磁仪器厂), HX113489 硅胶 G 薄

[△] [基金项目] 河北省食品药品监督管理局科技计划项目(ZC2015004)

* [通信作者] 刘凯娜, 主管中药师, 研究方向: 中药材检验及质量控制; E-mail: 258252940@qq.com

层板(MERCK, Silica gel 60), DL-1028H 超声波清洗器(BANDELIN)。

全蝎对照药材(批号: 121044-200903), 对照品油酸(批号: 111621-201205, 纯度: 99.6%)、甘氨酸(批号: 140689-201103, 纯度: 100.0%)、精氨酸(批号: 140685-201305, 105 ℃干燥 3 h, 纯度: 100.0%)、L-脯氨酸(批号: 140677-200405, 含量测定用)、亮氨酸(批号: 140687-201102, 纯度: 100.0%)购于中国食品药品检定研究院, 异硫氰酸苯酯(PITC)(西亚试剂, 批号: 201203014, 含量为 98%), 乙腈(MREDA, USA, 色谱纯), 水为超纯水(Milli-Q), 其他试剂均为分析纯。

124 批全蝎样品为河北省省级评价抽验品种, 覆盖全国 7 个省市 57 家生产企业。经秦皇岛市食品药品检验中心主任药师邸立杰鉴定为钳蝎科动物东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch 的干燥体。样品信息见表 1。

表 1 全蝎样品来源信息表

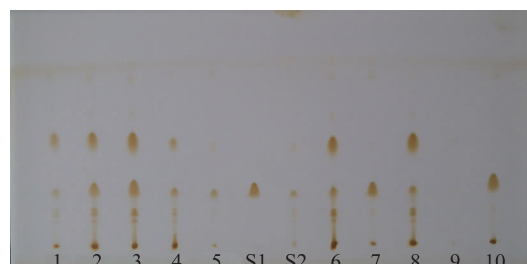
产地	生产单位数量/家	抽样批次
河北	37	96
安徽	9	12
北京	5	5
吉林	2	3
山东	2	4
江苏	1	1
哈尔滨	1	2
无生产厂家信息	1	1

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

取本品 1 g, 剪碎, 加石油醚(60~90 ℃) 20 mL, 超声处理 20 min, 滤过, 滤液作为供试品溶液。另取全蝎对照药材 1 g, 同法制成对照药材溶液。再取油酸对照品, 加石油醚(60~90 ℃) 制成每 1 mL 含 5 mg 油酸的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2015 年版四部 通则 0502) 试验, 吸取供试品和对照药材溶液各 5 μ L, 对照品溶液 2 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚(60~90 ℃)-乙醚-冰醋酸(36:9:0.9) 为展开剂, 展缸预平衡 20 min, 展开, 取出, 晾干, 置碘蒸气中熏至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。见

图 1。124 批全蝎样品斑点清晰程度各不相同。



注: S1. 油酸对照品; S2. 全蝎对照药材; 1~10. 样品。

图 1 全蝎 TLC 图谱

2.2 水分

依法测定 124 批样品(《中国药典》2015 年版四部 通则 0832 第二法), 结果在 6%~50%。造成水分含量高低有别的可能原因为炮制过程中干燥的程度不同, 包装以及存储环境导致样品吸潮程度不同。根据测定结果, 拟规定限度为不得过 20.0%。

2.3 总灰分、酸不溶性灰分

依法测定 124 批样品(《中国药典》2015 年版四部 通则 2302), 总灰分最高为 39%, 酸不溶性灰分最高为 3.5%, 纯净度差别较大主要缘于含盐、含土量不同, 结合性状分析可知, 含盐分高者, 如混有盐粒, 总灰分会相对偏高。建议总灰分不得过 20.0%, 酸不溶性灰分不得过 3.0%。

2.4 不同浸出物溶剂对测定结果的影响

现行标准浸出物所用溶剂稀乙醇(52.9%)能够溶解全蝎中的盐分, 测得数据不够科学, 本实验采用乙醇(95%)作溶剂, 分别挑选高盐分及低盐分的样品, 测定其浸出物的含量, 考察不同体积分数乙醇对浸出物测定结果的影响。表 2 结果表明, 含盐分较高的样品采用乙醇为溶剂浸出物测定结果约降低 60%, 低盐分样品测定结果几乎无变化。可见以乙醇为浸出物溶剂能够消除盐分的影响, 且不影响有效成分的溶出。

2.5 特征氨基酸的含量测定

2.5.1 色谱条件 色谱柱 Wondasil C₁₈-WR(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相 A 为乙腈-0.1 mol·L⁻¹ 醋酸钠溶液(用冰醋酸调节 pH 值至 6.5)(7:93), 流动相 B 为乙腈-水(4:1), 梯度洗脱条件见表 3; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 254 nm; 柱温为 40 ℃; 进样量为 5 μ L。

表 2 不同体积分数的乙醇对浸出物测定结果的影响

样品类型	批号	乙醇(%)	稀乙醇(%)
低盐样品	131002	16.7	18.4
	H12080101	18.2	20.3
	140339	21.6	26.8
	M130930-1	25.2	32.4
	20131101	19.9	20.0
	14021164	28.9	27.2
	300007051	25.4	20.2
	1202013	25.8	21.1
	110101	27.8	23.6
	1205002	14.6	19.0
高盐样品	平均值	22.4	22.9
	130815	15.8	47.3
	111830314	16.8	50.7
	100915	17.6	56.1
	1202013	15.8	50.2
	1001607	19.1	51.6
	120501	20.1	58.2
	1106124	13.4	47.7
	140108053	25.5	54.6
	20131108	21.8	52.4
	20110501	18.4	44.9
	平均值	18.4	51.4

表 3 梯度洗脱条件

t/min	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0 ~ 14	100→87	0→13
14 ~ 15	87→82	13→18
15 ~ 30	82→66	18→34
30 ~ 31	66→0	34→100
31 ~ 38	0	100
38 ~ 38.1	0→100	100→0
38.1 ~ 48	100	0

2.5.2 对照品与供试品的制备

2.5.2.1 对照品溶液的制备 取甘氨酸对照品、精氨酸对照品、L-脯氨酸对照品、亮氨酸对照品适量，精密称定，加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液制成每 1 mL 各含 100 μg 的混合溶液，取上述溶液 5 mL，置于 25 mL 量瓶中，加入 0.1 mol·L⁻¹ 异硫氰酸苯酯 (PITC) 的乙腈溶液 2.5 mL，1 mol·L⁻¹ 三乙胺的乙腈

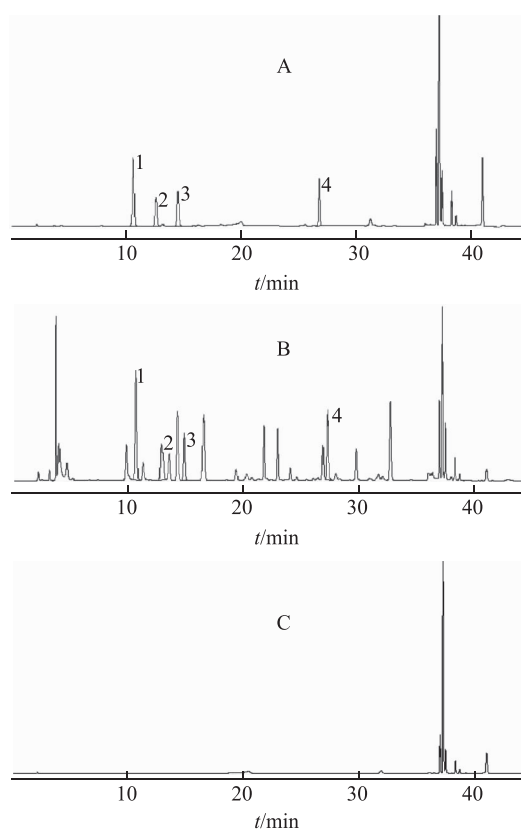
溶液 2.5 mL，摇匀，室温放置 1 h 后，加 50% 乙腈至刻度，摇匀。取 10 mL，加正己烷 10 mL，振摇，放置 10 min，取下层溶液，滤过，取续滤液，即得。

2.5.2.2 供试品溶液的制备 取全蝎样品细粉 0.1 g，精密称定，加 6 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 5 mL，密封，150 ℃ 水解 1 h，取出放冷至室温，精密吸取水解液 1 mL，蒸干，残渣加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液溶解，转移至 10 mL 量瓶中，加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液至刻度，摇匀，取上述溶液 5 mL，按 2.5.2.1 项下方法自“置于 25 mL 量瓶中，加入 0.1 mol·L⁻¹ 异硫氰酸苯酯 (PITC) 的乙腈溶液 2.5 mL”起操作，即得。

2.5.2.3 空白溶液的制备 取 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 5 mL，按 2.5.2.1 项下方法自“置于 25 mL 量瓶中，加入 0.1 mol·L⁻¹ 异硫氰酸苯酯 (PITC) 的乙腈溶液 2.5 mL”起操作，即得。

2.5.3 含量测定方法验证

2.5.3.1 专属性考察 取混合对照品溶液、供试品溶液、空白溶液按上述 2.5.1 色谱条件测定，空白无干扰，色谱峰分离度良好，理论塔板数均大于 20 000，见图 2。



注：A. 混合对照品；B. 全蝎样品；C. 空白对照品；

1. 甘氨酸；2. 精氨酸；3. L-脯氨酸；4. 亮氨酸。

图 2 全蝎样品和对照品 HPLC 图

2.5.3.2 线性关系考察 精密吸取混和对照品溶液1、2、4、8、10 μL ，在2.5.1项的色谱条件下测定含量，记录色谱峰面积，以峰面积(Y)对进样量(X)进行线性回归，回归方程分别为 $Y_{\text{甘氨酸}} = 457\ 225X - 6\ 152.76$ ， $r = 1.000\ 0$ ； $Y_{\text{精氨酸}} = 189\ 815X - 2\ 824.61$ ， $r = 1.000\ 0$ ； $Y_{\text{L-脯氨酸}} = 324\ 434X - 2\ 692.74$ ， $r = 1.000\ 0$ ； $Y_{\text{亮氨酸}} = 278\ 969X - 3\ 374.43$ ， $r = 1.000\ 0$ 。结果显示，甘氨酸在0.509 1~5.091 0 μg 、精氨酸在0.502 5~5.025 0 μg 、L-脯氨酸在0.348 2~3.482 0 μg 、亮氨酸在0.508 8~5.088 0 μg 线性关系良好。

2.5.3.3 精密度考察 取同一混合对照品溶液，按2.5.1色谱条件连续进样6次，测得甘氨酸、精氨酸、L-脯氨酸、亮氨酸色谱峰的峰面积RSD分别为0.84%、0.76%、0.65%、0.73%，表明仪器精密度良好。

2.5.3.4 重复性考察 同一份样品共取6份，按2.5.2.2项下方法平行制备供试品溶液，分别进样，记录色谱数据。结果甘氨酸、精氨酸、L-脯氨酸、亮氨酸的含量RSD分别为0.78%、0.64%、0.69%、0.57%，表明该方法重现性良好。

2.5.3.5 稳定性考察 取同一供试品溶液，按2.5.1项下色谱条件分别于0、4、8、12、24 h进样，记录峰面积，甘氨酸、精氨酸、L-脯氨酸、亮氨酸色谱峰的峰面积RSD分别为0.84%、0.96%、1.06%、0.75%，表明供试品溶液在室温24 h内稳定。

2.5.3.6 加样回收率考察 称取约50 mg已知含量的供试品细粉9份，平行分为3组，分别加入高、中、低3个浓度对照品的盐酸溶液，再加盐酸使成5 mL，按2.5.2.2项下操作，按2.5.1色谱条件进行测定，计算加样回收率。结果甘氨酸、精氨酸、L-脯氨酸、亮氨酸的加样回收率分别为102.5%、104.1%、102.5%、102.3%，RSD分别为2.7%、2.8%、2.2%、2.9%。

2.5.3.7 样品测定 取不同批次的样品0.1 g，精密称定，按2.5.2.2项下方法制备供试品溶液，并按2.5.1项下色谱条件测定含量，按干燥品计算，结果甘氨酸、精氨酸、L-脯氨酸、亮氨酸的含量范围分别为2.47%~9.43%、2.06%~12.66%、1.37%~8.73%、2.42%~9.24%，4种氨基酸总和范围为8.52%~35.95%，平均值为19.28%。建议规定含

氨基酸以甘氨酸、精氨酸、L-脯氨酸、亮氨酸的总量计不得少于15.0%。

3 讨论

全蝎样品为我中心省级评价品种，当时执行标准为《中国药典》2010年版一部，包括性状、显微鉴别、浸出物3项，按法定标准检验，不合格率为9%，全部为浸出物不合格。2015年版《中国药典》针对成全蝎易吸潮霉变的特点增加了黄曲霉毒素检查项，但仍然控制不了全蝎的纯净度。综观全蝎质量参差不齐，性状差异较大，干湿程度不一，含盐量相差悬殊，色泽也不一致，水分测定值高达50%，有的腹内泥土较多，有的混有明显的盐粒，这些人为增重的方法均能影响药物疗效^[4]，现行标准对上述内容均无控制指标，尤其是缺少有效成分的专属性检测方法，需要不断完善。故增加水分、总灰分、酸不溶性灰分检查项是极其必要的。

上文提出浸出物所用溶剂不能消除盐分的影响，不够科学，为了进一步证实这一点，我们运用SPSS软件进行总灰分与浸出物数据的相关性分析，结果显示显著相关($P = 0.000$ ， $r = 0.858$)。可见浸出物测定以一定的总灰分限度为前提，或者改变浸出物的溶剂，可以消除盐分影响。

全蝎的活性成分蝎毒主要由非蛋白质部分和蛋白质部分组成，非蛋白质部分主要包括一些以饱和脂肪酸为主的脂类成分，如油酸；毒性蛋白(蝎毒素)是由20~80个氨基酸残基构成的小分子蛋白质^[5]。故本文建立了以油酸为对照品、全蝎为对照药材的TLC定性鉴别方法及特征氨基酸的HPLC含量测定方法。

全蝎中脂类成分的薄层色谱鉴别曾比较不同的薄层板和不同的温湿度条件，均取得较好的分离效果，该方法参照鸦胆子中油酸的TLC鉴别制定^{[1]254-255}。全蝎中特征氨基酸的含量测定选取蝎毒蛋白的水解产物——氨基酸为含量测定对象。甘氨酸、精氨酸、L-脯氨酸、亮氨酸在全蝎中的含量较高，且不易被酸氧化破坏，故本实验以这4种氨基酸为指标成分进行含量测定。提取方法、流动相的选择、柱温、检测波长、流速等均参照文献制订^[6-10]。

全蝎中脂类成分的TLC鉴别及特征氨基酸的含量测定方法能够消除水、盐的影响，二者结果趋近一致，且为有效成分的专属性检测，故更能真实地

反映全蝎的质量水平,可为现行标准的提高提供参考。同时建议明确规定炮制方法中沸盐水的浓度、煮制时间及干燥程度,各检测项目有机结合,从整体上评价全蝎的质量水平。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 肖培根. 新编中药志:第四卷[M]. 北京:化学工业出版社,2002:75.
- [3] 王国强. 中国中草药汇编:卷四[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2014:42.
- [4] 郑虎占,金护哲. 中药饮片应用与标准化研究[M]. 北京:学苑出版社,2004:612.
- [5] 冯幼,肖森光,罗志强,等. 蝎毒的成分及其应用[J]. 饲料博览,2012(4):47-50.
- [6] 郑灏,程显隆,魏锋,等. 雷丸中16种氨基酸的柱前衍生化 RP-HPLC 法含量测定[J]. 药物分析杂志,2011,39(9):1631-1635.
- [7] 程显隆,肖新月,邹泰文,等. 柱前衍生化 HPLC 法同时测定阿胶中4种主要氨基酸的含量[J]. 药物分析杂志,2008,28(12):1997-2000.
- [8] 梁琨,安歆,尤丽莎,等. 柱前衍生化 RP-HPLC 法测定中药全蝎中16种氨基酸含量[J]. 中国新药杂志,2014,23(6):716-720.
- [9] 梁琨,张丹,史辑,等. 柱前衍生化 RP-HPLC 测定鸡内金中16种氨基酸的含量[J]. 中国中药杂志,2014,39(8):1463-1467.
- [10] 石云峰,林丽琴,王金兰. 虫草头孢菌粉中16种氨基酸的含量测定[J]. 医药导报,2012,31(12):1624-1627.

(收稿日期 2016-05-24)

(上接第199页)

综上所述,玉女煎对大鼠佐剂性关节炎有一定的治疗作用,该作用可能是通过抑制相关炎症因子分泌发挥作用,本结果将为玉女煎治疗类风湿性关节炎作用机制的研究提供实验基础。

参考文献

- [1] 杜军,陈长勋,王樱,等. 加味玉女煎抗心室重构的实验研究[J]. 中成药,2008,30(1):24-27.
- [2] 郭娟,陈长勋,李欣. 加味玉女煎抗甲状腺机能亢进作用的研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(18):2369-2372.
- [3] 王邦旺. 加味玉女煎治疗退行性膝关节炎的研究[D]. 北京:北京中医药大学,2005:23-53.
- [4] Shammas R M, Ranganath V K, Paulus H E. Remission in rheumatoid arthritis[J]. Curr Rheumatol Rep, 2010, 12(5):355-362.
- [5] Ahmed Y M, Messiha B A, Abo-Saif A A. Protective effects of simvastatin and hesperidin against complete Freund's Adjuvant-induced rheumatoid arthritis in Rats[J]. Pharmacology, 2015, 96(5-6):217-225.
- [6] 雷莉妍,唐志书,刘妍如,等. 玉女煎 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中药材,2016,39(1):113-116.
- [7] Choi Y J, Lee W S, Lee E G, et al. Sulforaphane inhibits IL-1 β -induced proliferation of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and the production of MMPs, COX-2, and PGE2[J]. Inflammation, 2014, 37(5):1496-503.
- [8] Tsubaki M, Takeda T, Kino T, et al. Mangiferin suppresses CIA by suppressing the expression of TNF- α , IL-6, IL-1 β , and RANKL through inhibiting the activation of NF- κ B and ERK1/2[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(8):1371-1381.
- [9] Gottenberg J E, Dayer J M, Lukas C, et al. Serum IL-6 and IL-21 are associated with markers of B cell activation and structural progression in early rheumatoid arthritis: results from the ESPOIR cohort[J]. Ann Rheum Dis, 2012, 71(7):1243-1248.

(收稿日期 2016-06-12)