

芫菁科昆虫体内斑蝥素的气相色谱法测定^{*}

李晓飞^{1**} 陈祥盛^{1***} 国兴明²

(1. 贵州大学昆虫研究所 贵阳 550025; 2 贵州大学生化营养研究所 贵阳 550025)

Gas-chromatographical study of cantharidin in Meloidae. LI Xiao-Fei^{**}, CHEN Xiang-Sheng^{1***}, GUO Xing-Ming² (1. *Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, China*; 2. *Institute of Biochemistry and Nutrition, Guizhou University, Guiyang 550025, China*)

Abstract The samples from different species of Meloidae, the eggs of *Epicauta aptera* Kaszab and the different parts of *Mylabris phalerata* Pallas were treated with acidolysis or direct extraction, and cantharidin contents were determined by gas chromatography. The result showed that cantharidin contents in the samples of Meloidae treated with acidolysis method were 1 to 9 times higher than those dealt with extraction method, usually more than 7 times higher in *Epicauta*, and no much differences in *Mylabris*. The differences of cantharidin contents in eggs between samples with two methods were not notable. The cantharidin was mainly found in the abdomen of *M. phalerata*.

Key words cantharidin, Meloidae, gas chromatography, acidolysis, direct extraction

摘 要 分别采用酸水解法和直接浸提法处理不同种芫菁样品、短翅豆芫菁 *Epicauta aptera* Kaszab 的卵和大斑芫菁 *Mylabris phalerata* Pallas 的不同虫体部位, 后用气相色谱仪测定斑蝥素含量。结果表明: 用酸水解法处理后的芫菁体内斑蝥素含量较之用直接浸提法处理后有显著提高, 增高幅度在 1~9 倍之间, 其中以豆芫菁属 *Epicauta* 昆虫的增高幅度最大, 一般在 7 倍以上, 而斑芫菁属 *Mylabris* 的斑蝥素含量增幅不高, 芫菁卵中斑蝥素含量变化不显著; 斑蝥素主要富集于大斑芫菁的腹部。

关键词 斑蝥素, 芫菁科, 气相色谱法, 酸水解法, 直接浸提法

斑蝥素(cantharidin)是芫菁科 Meloidae 昆虫分泌的萜类防御物质。因其具有明显的抗癌活性以及后来发现的杀虫活性而为人们所关注, 并对其进行了大量的研究^[1]。对于芫菁体内斑蝥素含量的测定方法有多种^[2,3],《中华人民共和国药典》(以下简称《药典》)^[4]规定用直接浸提法处理芫菁样品, 用气相色谱法测定斑蝥素含量。Carnel 等曾提到先用酸水解法处理芫菁, 会使测定的斑蝥素含量增高^[5]; 杨兆芬等亦证实, 用浓 HCl 水解芫菁样品后再提取的方法处理所得到的斑蝥素含量, 比直接用有机溶剂提取的方法得到的斑蝥素含量高 4 倍左右^[6]。但至今人们对于酸水解法关注度不高。本文对酸水解法和直接浸提法测定斑蝥素含量进行了比较分析研究, 以期为进一步探索高效、简便、快捷、低成本的斑蝥素测定新方法提供参考。

1 材料和方法

1.1 样品

斑芫菁属 *Mylabris* 昆虫: 眼斑芫菁 *M. cichorii* L. (采自贵州惠水、贵阳), 大斑芫菁 *M. phalerata* Pallas (购自贵阳市三桥中药材市场, 采集地不详)。

豆芫菁属 *Epicauta* 昆虫: 短翅豆芫菁 *E. aptera* Kaszab 和凹角豆芫菁 *E. impressicomis* Pic (均采自贵州贵阳), 毛胫豆芫菁 *E. tibialis* Waterhouse (采自贵州紫云县和绥阳县), 锯角豆

^{*} 贵州省优秀科技教育人才省长资金(15001B-10); 贵州省高层次人才科研条件补助经费; 贵阳市大学生创业科技项目资助(2006筑科技合同字第 21-2 号)。

^{**}E-mail: lixiaofei35@tom.com

^{***}通讯作者, E-mail: chenxs3218@163.com

收稿日期: 2006-02-22, 修回日期: 2006-08-31

芫菁 *E. gorhami* Marseul(采自贵州正安)。

卵:来自短翅豆芫菁所产的卵。

芫菁不同部位:大斑芫菁的头部、胸部(去翅和足)、腹部、鞘翅、足5个部分。

将以上样品在50~60℃烘干,用粉碎机打成粉末,放入干燥器内,备用。

1.2 试剂与仪器

试剂:丙酮、氯仿、盐酸、硝酸、无水硫酸钠、无水碳酸钠等试剂为分析纯;正十六烷为色谱标准品,制成有效成分2.012 mg/mL的内标液;斑蝥素(sigma)为纯品,制成有效成分为1.024 mg/mL的斑蝥素标准液。

仪器:气相色谱仪(PERKIN-EMECK8500),电子天平,旋转蒸发仪等。

1.3 色谱条件

固定液:甲基硅橡胶(SE-30),涂布质量分数为3.5%;担体:101白色担体,80~100目;色谱柱:内径2 mm×2 m。

柱温为175℃;进样温度250℃;载气:N₂,流速41.2 mL/min;检测器:FID,250℃。斑蝥素的保留时间是5 min 56 s;内标正十六烷的保留时间是7 min 58 s。

1.4 内标法

本实验拟选用正十六烷为内标剂。

(1)内标剂与斑蝥素纯品的线性关系:精密吸取斑蝥素标准液0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL,分别置7个10 mL烧瓶中,各加内标液1 mL混匀,进样3次,每次1 μL,求平均值,以斑蝥素平均峰面积与内标正十六烷平均峰面积之比为纵坐标,以斑蝥素绝对量为横坐标作图。线性回归方程为 $y = 3.605896x - 0.131585399$,相关系数 $r = 0.9991$ 。实验数据说明:斑蝥素与正十六烷的浓度比在1/4~3倍范围内,斑蝥素的量与它们的峰面积比值呈线性关系。

(2)2 mL 1.024 mg/mL标准溶液加入1 mL 2.012 mg/mL的内标液,混匀,进样1 μL,连续重复6次,求出斑蝥素峰面积与内标正十六烷峰面积之比值,分别是0.634, 0.614, 0.607, 0.601, 0.597, 0.578, RSD为3.07%,正十六烷有较好的稳定性。

(3)内标分析法计算公式,求芫菁中斑蝥素的含量 X_1 :

$$X_1(\%) = \frac{R_2 \times M_1 \times 100}{R_1 \times M_2}$$

R_1 :标准溶液中斑蝥素与内标物峰面积比值;
 R_2 :样品中斑蝥素与内标物峰面积比值; M_1 :斑蝥素标准品质量(g); M_2 :样品质量(g)。

1.5 样品处理方法

本次试验拟采用2种样品处理方法处理芫菁样品,比较两者之间的差异。

(1)酸水解法(方法1):本方法在综合参考Carrel等^[5]、杨兆芬等^[9]和方宇凌等^[3]的方法的基础上,有所改动。

精确称取0.5 g样品,用20 mL丙酮、30 mL三氯甲烷混合溶液及5滴浓盐酸溶于带有冷凝管的50 mL烧瓶中,沸腾回流12 h,将溶液浓缩至约2 mL。把浓缩的提取液在无水硫酸钠及无水碳酸钠柱上用10 mL三氯甲烷淋洗,溶液浓缩至1 mL,用氯仿稀释至5 mL,加入1 mL正十六烷,备用。

(2)氯仿直接提取法(方法2):本方法综合参考药典^[4]和谭娟杰等^[2]的方法,略有改动。

精确称取0.5 g样品,置于50 mL具塞三角瓶中,加入5 mL氯仿,振荡0.5 h后放置24 h,加热到40℃,趁热过滤,加入1 mL正十六烷液,备用。

2 结果与分析

2.1 芫菁体内结合态斑蝥素的含量测定结果

精确称取1.1样品中各种芫菁样品和短翅豆芫菁卵各6份,3份采用方法1处理,测定斑蝥素的平均含量;3份采用方法2处理,测定斑蝥素的平均含量。试验结果见表1。

从表1中可以看出:用直接浸提法处理后测定的斑蝥素含量均在2%以下;以斑芫菁属种类为高,其中眼斑芫菁最高,达到1.56%;而以豆芫菁属种类为低,均在0.4%以下,其中凹角豆芫菁最低,为0.28%,低于《药典》中所规定的最低标准^[4]《药典》中规定斑蝥素含量大于0.35%的芫菁方可入药。

表 1 用 2 种方法处理不同种芫菁后
所测定的斑蝥素含量

种类	斑蝥素含量(%)	
	方法 2	方法 1
大斑芫菁 <i>M. phalerata</i>	0.99	2.14
眼斑芫菁 <i>M. cichorii</i>	1.56	3.09
凹角豆芫菁 <i>E. impressicornis</i>	0.28	2.63
短翅豆芫菁 <i>E. aptera</i>	0.39	3.48
毛胫豆芫菁 <i>E. tibialis</i>	0.37	4.27
锯角豆芫菁 <i>E. gorhami</i>	0.32	2.61
芫菁的卵 Eggs of <i>Epicauta</i>	0.92	0.96

注:表中结果为 3 次测量的平均值,表 2 同。

用酸水解法处理芫菁样品所测定的斑蝥素含量比用直接浸提法的提高 1~9 倍,其中以豆芫菁属种类增加幅度最大,一般在 7 倍以上;斑芫菁属种类增加在 1 倍左右,增幅不大;所有豆芫菁属种类斑蝥素含量都超过 2.6%,远远高于《药典》中规定的入药标准。

经直接浸提法处理后,测定结果显示:短翅豆芫菁卵中的斑蝥素含量高于虫体的斑蝥素含量,而酸水解后的结果却相反。2 种方法测定的短翅豆芫菁卵的斑蝥素含量值的 RSD=0.03,差异不显著。

2.2 大斑芫菁不同部位的斑蝥素含量测定

精确称取 1.1 中大斑芫菁头部、胸部(去翅和足)、腹部、鞘翅、足样品各 6 份,3 份采用方法 1 处理,测定斑蝥素的平均含量;3 份采用方法 2 处理,测定斑蝥素的平均含量。实验结果见表 2。

表 2 经不同方法处理的大斑芫菁
各部位的斑蝥素含量

身体部位	斑蝥素含量(%)	
	方法 2	方法 1
全体	0.99	2.14
头部	0.07	0.10
胸部	0.13	0.16
腹部	1.96	4.27
鞘翅	0.12	0.13
足	0.12	0.13

从表 2 可知:2 种方法处理后的结果均表明腹部是斑蝥素富集的部位,其斑蝥素含量远远高于其它部位,且腹部在经过不同方法处理

后斑蝥素含量变化非常大;在大斑芫菁的头部和胸部(包括鞘翅和足)只有微量的斑蝥素存在,斑蝥素含量在 2 种方法处理下变化甚微。

3 讨论

在以往的测定斑蝥素含量的文章中,人们大多选用直接浸提法来处理样品,所测定的含量偏低,不能真正反映芫菁体内所含斑蝥素的情况,这样可能导致的后果有 2 个:一是芫菁作为中药,不能准确入药,人们只有根据医生的经验来谨慎服用,经常出现因服药过量而致死的现象。在人们长期的用药过程中,有许多人早已发现斑蝥素含量很“低”的豆芫菁属昆虫的毒性要大于斑蝥素含量“高得多”的斑芫菁属昆虫。二是人们很久以来过于依赖斑芫菁属昆虫,特别是大斑芫菁和眼斑芫菁,即中药中的斑蝥,导致大斑芫菁和眼斑芫菁被过量采集,生态平衡受到严重的破坏,自然界中的斑蝥数量急剧减少,中药材市场上经常出现断货的情况,不利于芫菁资源的长远开发,而斑蝥素含量更为丰富的豆芫菁属昆虫却被人们所忽视。豆芫菁属昆虫分布很广,数量庞大,是斑蝥素资源开发的重要种类。本研究发现,提取斑蝥素时,可用豆芫菁属昆虫代替斑芫菁属昆虫。同时酸水解法还可以准确测量芫菁中药半成品中的斑蝥素含量,例如可以对斑蝥胶囊进行准确测定。

芫菁体内有不溶于氯仿的斑蝥素衍生物存在,这种物质在强酸条件下又可以反应成斑蝥素(其具有一个酸酐键),这说明斑蝥素在芫菁体内可能以盐类物质形式存在,究竟是什么物质还有待于今后的继续研究。此前有人认为在芫菁体内可能有斑蝥素酸镁的斑蝥素盐类结合物质存在^[7]。

有人认为当芫菁成虫排出斑蝥素后,其体内可以再合成新的斑蝥素^[8]。作者根据以上的试验猜测:斑蝥素作为保幼激素的代谢产物^[8],其含量在芫菁成虫体内是固定的,只是有很大一部分以其衍生物的形式储存起来,当遇到危险分泌出斑蝥素后,这部分储藏的斑蝥素又被释放出来。对这部分斑蝥素衍生物的研究,可

能会对寻找斑蝥素合成位点有所帮助。

从2种处理方法得到不同的斑蝥素含量的结果来看,《药典》规定的测定方法似有欠缺。首先,《药典》没有考虑酸水解的情况,这也与芫菁作为口服中药的情况不符。人类胃液中的pH值在1~2之间,属于强酸,芫菁在胃液内可以发生酸水解反应。其次,《药典》规定斑蝥素含量超过0.35%方可入药^[4],而在酸水解方法处理的情况下,芫菁体内的斑蝥素含量大都超过2%,这一规定已经没有实际意义。

芫菁卵中的斑蝥素未随处理方法的改变而改变,其原因可能是芫菁用斑蝥素而非其衍生物来保护卵。

从表2中可以推测:芫菁体内的大多数斑蝥素和几乎全部的斑蝥素衍生物富集于腹部。

参 考 文 献

- 1 李晓飞,陈祥盛,国兴明. 山地农业生物学报, 2004 77 (2): 169~175.
- 2 谭娟杰,章有为,王书永,邓正己,朱传先. 昆虫学报, 1995, 38(3): 324~331.
- 3 方宇凌 谭娟杰,马文珍,刘举鹏,刘珣. 昆虫学报, 2001, 44(2): 192~19.
- 4 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京:北京化学工业出版社. 2000. 272.
- 5 Carrel J. E., Doorn J. P., McCormick J. P. J. *Chromatogr.*, 1985, 342: 411~415.
- 6 杨兆芬,丁在富. 动物学研究, 1995, 16(2): 161~165.
- 7 王正益,张振凌,张广强,李军,梁生旺,等. 中国中药杂志, 1990, 15(10): 24~25.
- 8 McCormick J. P., Carrel J. E. In: Blomquist G. D., Blomquist G. J. (eds.), *Pheromone Biochemistry*. Academic Press. Orlando. 1987. 307~350.

昆 虫 知 识
KUNCHONG ZHISHI
(双月刊 1955年创刊)

2007年5月 第44卷 第3期

CHINESE BULLETIN OF ENTOMOLOGY

(formerly ENTOMOLOGICAL KNOWLEDGE)

(Bimonthly, Founded in 1955)

May, 2007 Vol. 44 No. 3

编辑出版 《昆虫知识》编辑部
(北京朝阳区大屯路
中科院动物所 100101)
电话 010-64807137
传真 010-64807179
电子信箱 entom@ioz.ac.cn
http://www.ent-bull.com.cn

主 编 王琛柱
主 管 中国科学院
主 办 中国科学院动物研究所
中国昆虫学会
协 办 广东省昆虫研究所
中山大学昆虫学研究所
印刷装订 北京科信印刷厂
发行方式 国内外公开发行人
总发行处 北京报刊发行局
国内订购 全国各地邮电局
国外发行 中国国际图书贸易总公司
(北京399信箱100044)

责任编辑 庞苏娟
编辑助理 祁佳琪
广告许可证 京海工商广字第8086号

Edited and published by: Editorial Board of *Chinese Bulletin of Entomology*

(Institute of Zoology, CAS, Datunlu, Chaoyang,
Beijing 100101, China)

Tel: 8610-64807137; Fax: 8610-64807179

E-mail: entom@ioz.ac.cn

http://www.ent-bull.com.cn

Chief editor: WANG Chen-Zhu

Supervised by: Chinese Academy of Sciences

Sponsored by: Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences & the Entomological Society of China

Edited jointly: Guangdong Entomological Institute,
Guangdong Academy of Science

Institute of Entomology, Zhongshan University

Printed by: Beijing Kexin Printing House

Distributed by: Beijing Bureau for Distribution of
Newspapers and Journals

Domestic subscription: All Local Post Offices in China

Foreign subscription: China International Book Trading
Corporation

(P. O. Box 399, Beijing 100044, China)

祝贺 本刊2006年印刷质量被国家新闻出版总署评为一等品!