

貂心质量标准的研究

崔馨元¹, 王艳双², 李盈诺¹, 张丽华³, 苑广信^{1*}
(1. 北华大学药学院, 吉林 吉林 132013; 2. 北华大学医学院, 吉林 吉林 132013; 3. 吉林市雷博科技有限公司, 吉林 吉林 132013)

摘要: **目的** 建立貂心质量标准。**方法** 对 4 个产地 11 批样品进行 TLC 定性鉴别、聚合酶链式反应, 药典法测定氮、水分、总灰分、重金属及有害物质 (Pb、As、Cr、Hg、Cu) 含量。**结果** TLC 斑点清晰, 可将正品与非动物类伪品区分开; 300~400 bp 处有单一 DNA 条带扩增, 可鉴别出基源性伪品。氮在 0.1~1.0 g 范围内线性关系良好 ($r=0.999\ 9$), 平均加样回收率为 96.4%, RSD 为 0.63%。氮、水分、总灰分平均含量分别为 11.56%、7.02%、3.76%, 重金属及有害物质含量符合国家标准。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于貂心的质量控制。
关键词: 水貂; 心脏; 氮; 水分; 总灰分; TLC; 聚合酶链式反应; 药典法
中图分类号: R282.74 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)12-2858-05
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.12.007

Quality standard for *Mustela vison* hearts

CUI Xin-yuan¹, WANG Yan-shuang², LI Ying-nuo¹, ZHANG Li-hua³, YUAN Guang-xin^{1*}
(1. College of Pharmacy, Beihua University, Jilin 132013, China; 2. College of Medicine, Beihua University, Jilin 132013, China; 3. Jilin Municipal Leibo Technology Co., Ltd., Jilin 132013, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the quality standard for *Mustela vison* Schreber hearts. **METHODS** For eleven batches of samples from four producing areas, TLC qualitative identification and polymerase chain reaction were performed, and pharmacopeia method was adopted in the content determination of nitrogen, water, total ash, heavy metals and hazardous substances (Pb, As, Cr, Hg, Cu). **RESULTS** The clear TLC spots could distinguish certified products from non-animal counterfeits, and the single DNA band amplification at 300–400 bp could identify original counterfeits. Nitrogen showed a good linear relationship within the range of 0.1–1.0 g ($r=0.999\ 9$), whose average recovery was 96.4% with the RSD of 0.63%. The average contents of nitrogen, water and total ash were 11.56%, 7.02% and 3.76%, respectively, and those of heavy metals and hazardous substances accorded with national standards. **CONCLUSION** This stable and reliable method can be used for the quality control of *M. vison* hearts.
KEY WORDS: *Mustela vison* Schreber; hearts; nitrogen; water; total ash; TLC; polymerase chain reaction; pharmacopeia method

貂心为吉林省习用药材, 收载于 1992 年版《卫生部药品标准》第 8 册中药成方制剂附录中, 基源为鼬科动物水貂 (美洲水貂) *Mustela vison* Schreber 的新鲜或干燥心脏, 具有补心安神的作
用, 富含多种氨基酸、脂肪酸、总磷酸、维生素、细胞色素丙、三磷酸腺苷, 以及 Fe、Mg、Zn、Ca、Cu、Mn 等微量元素^[1]。
作为名贵中药材, 貂心是利心丸主药^[2], 后

收稿日期: 2019-08-13
基金项目: 长白山药用动植物活性多肽国家地方联合工程实验室 (2015); 吉林省中药材地方标准项目 (JLBZ201708); 吉林省产业技术研究与开发专项 (2018C048-2)
作者简介: 崔馨元 (1994—), 女, 硕士生, 研究方向为药物分析。E-mail: qq1994498@163.com
* 通信作者: 苑广信 (1981—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为药物分析。Tel: 18604498620, E-mail: yuanguangxin2007@163.com

者适用于风湿性心脏病、心动过速、心率不齐、心力衰竭等常见心血不足症者^[3]，但目前仅对其中的生地黄、牡丹皮、防己等药材进行研究，鲜有涉及貂心。因貂心价格昂贵、货源不足等原因，不法商贩常趁机以假乱真，扰乱市场秩序，尤以鸡心作为代替品的居多^[4]，但目前尚无相关质量标准，故无法对其药效成分进行定性定量检测，难以控制药材及其成药质量，以及临床用药有效性和安全性。

随着现代分析技术的发展，指纹图谱已成为中药材质量鉴别的重要途径^[5]，故可利用分子生物学技术来研究貂心及其伪品的 DNA 指纹图谱，从而完善该药材质量标准；由于重金属含量是中药安全、有效、可控的首要问题之一^[6]，故本实验对其进行了测定。另外，还进行了性状、TLC 定性鉴别、聚合酶链式反应，以及氮、水分、总灰分含有量测定，可为貂心质量标准的提升提供依据。

1 材料

1.1 仪器 BT223S 电子天平（德国赛多利斯公司）；SB-2 薄层喷雾泵（天津市天分分析仪器厂）；202-OAB 干燥箱（武汉药品科技有限公司）；硅胶 G 板（10 cm×10 cm，青岛海洋化工厂分厂）；电热套（沈阳瑞博前锋有限公司）；高速冷冻离心机（美国 Beckman 公司）；Tgradient-96 PCR 扩增仪（德国 Biometra 公司）；PS500A 电泳仪（美国 Savant 公司）；凯氏烧瓶（500 mL，天津天波仪器有限公司）；NKD6280 电位法凯氏定氮仪（上海祎鸿分析仪器有限公司）；Sx-4-10 高温炉（沈阳电炉厂）。

1.2 试药 乙醇、丙酮、乙酸乙酯（北京化工厂）；冰醋酸（天津市化工厂）；茚三酮（天津市光复精细化工研究所）；硫酸钾（河南威佳利化工产品有限公司），以上试剂均为分析纯；水为去离子水。Ex TaqDNA 聚合酶、dNTP（2.5 mmol/L）、10×buffer、6×Loading buffer、100 bp DNA Ladder Marker（天根生化科技北京有限公司）。谷氨酸、缬氨酸、色氨酸对照品均购自中国食品药品检定研究院。貂心产地左家、永吉泰岳、苍山歇沟、玉田，经长春中医药大学姜大成教授鉴定为鼬科动物水貂 *Mustela vison* Schreber 的干燥心脏。

2 方法与结果

2.1 性状鉴别 本品呈略扁的卵圆形，长 2.5~3.5 cm，宽 1.8~2.5 cm；表面棕褐色至黑褐色，稍光滑，具不规则褶皱，顶端残留部分脉管组织；

质坚硬，断面角质样，中间角质纵隔膜隔成左右两室；气腥。

2.2 TLC 定性鉴别^[7]

2.2.1 对照品溶液制备 取谷氨酸、缬氨酸、色氨酸对照品适量，加 70% 乙醇制成每 1 mL 各含三者 2 mg 的溶液，即得。

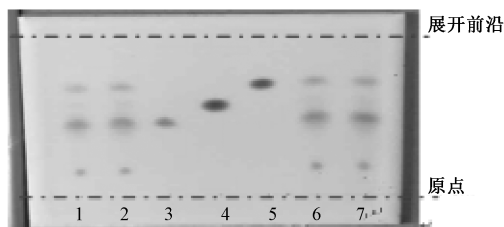
2.2.2 供试品溶液制备 取本品 1 g 研细，称取 0.5 g，加 5 mL 70% 乙醇超声 15 min，滤过，取滤液，即得。

2.2.3 提取溶剂筛选 选择无水乙醇、70% 乙醇、40% 乙醇、甲醇，以正丁醇-冰醋酸-水（3：1：1）为展开剂，用量 15~20 mL；双槽展开缸；展距 8 cm。结果显示，70% 乙醇提取后色谱图显示粉紫斑点最清晰，对照品、供试品颜色统一，提取效果好，故选择其作为提取溶剂。

2.2.4 色谱条件 吸取供试品、对照药材、对照品溶液各 5 μL，点于同一硅胶 G 板上。以正丁醇-冰醋酸-水（3：1：1）为展开剂，用量 15~20 mL；双槽展开缸；展距 8 cm。晾干后，以 2% 茚三酮丙酮溶液为显色剂，105℃ 下加热显色后在日光下观察。

2.2.5 耐用性试验 与实验室正常温度、相对湿度比较，TLC 鉴定结果并无明显差异。因此，初步证明低温、低湿、高湿环境对实验均无明显影响。

图 1 显示，貂心与其他动物心脏均含有氨基酸，但该方法只是为了与非动物类伪品区分开，并且可明确 3 种常见氨基酸，故将其纳入本实验。



1. 貂心 2. 鸡心 3. 谷氨酸 4. 缬氨酸 5. 色氨酸 6. 鸭心
7. 鹅心
1. *M. vison* hearts 2. chicken hearts 3. glutamate 4. proline
5. tryptophan 6. duck hearts 7. goose hearts

图 1 动物心脏、氨基酸 TLC 色谱图

Fig. 1 TLC chromatogram of animal hearts and amino acids

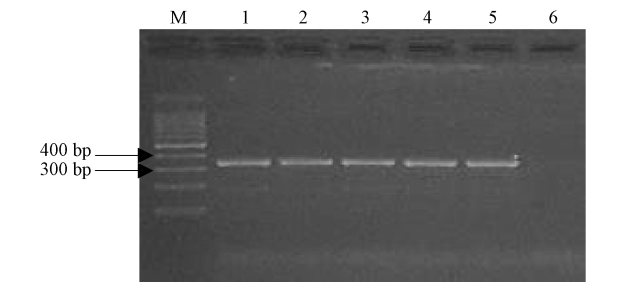
2.3 聚合酶链式反应

2.3.1 模板 DNA 提取 参照 2015 年版《中国药典》方法进行 DNA 提取^[8]。

2.3.2 引物设计 正向 5'-TATCAACAACATCAT-TCATTGATC-3'，反向 5'-TGCTATTACTGTGAAT-AGTAAGA-3'，PCR 扩增片段 337 bp。

2.3.3 反应体系和条件^[8-12] PCR 反应体系：DNA 模板 2 μL，鉴别引物（12.5 μmol/L）各 1 μL，2×PCR Mix 12.5 μL，无菌双蒸水 8.5 μL，总反应体系 25 μL。反应条件：94 ℃ 预变性 5 min，循环反应 30 次（94 ℃ 30 s，56 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s），延伸 72 ℃ 5 min。

2.3.4 电泳检测 采用琼脂糖凝胶电泳法（2015 年版《中国药典》四部通则 0541 第三法），胶浓度 2%，胶中加入核酸凝胶染色剂 GelRed；供试品、对照药材 PCR 反应溶液上样量均为 5 μL，DNA 分子量标记上样量为 6 μL。电泳结束后，取凝胶片在凝胶成像仪或紫外分析仪上检视，发现供试品凝胶电泳图谱在对照药材相应的位置上，于 300~400 bp 处有单一 DNA 条带，见图 2。



注：M 为 DL100 bp DNA Marker，1~6 分别为阳性对照药材、左家貂心、永吉泰岳貂心、苍山歇沟貂心、玉山貂心、空白对照

图 2 样品凝胶电泳图

Fig. 2 Gel electrophoretogram of samples

2.3.5 方法学验证

2.3.5.1 特异性试验 以鉴定的貂心为阳性对照，鸡心、鸭心、鹅心、狐狸心为阴性对照，进行特异性实验。结果，仅貂心检测呈阳性，其他均无扩增条带被检出，表明该方法特异性良好。

2.3.5.2 人员对比试验 3 名实验室人员进行貂心 PCR 实验，发现操作结果无明显差异。

2.3.6 结果 供试品凝胶电泳图谱在阳性对照相应位置上，于 300~400 bp 处有单一 DNA 条带，而阴性对照无条带。

2.4 含有量测定 1992 年版《卫生部药品标准》第 8 册中药成方制剂附录中无此项目。本实验根据貂心所含化学成分及其肌肉，采用 2015 年版《中国药典》四部通则 0704 氮测定法中第一法或第三法（常量法）测定蛋白质含量。

2.4.1 消解条件考察

2.4.1.1 取样量（第一法） 精密称取本品粉末 0.10、0.25、0.5、1.00 g，根据硫酸滴定液（0.05 mol/L）消耗量确定取样量。由于本实验控制滴定体积在 25 mL 以下，故确定取样量为 0.25 g。

2.4.1.2 取样量（第三法） 精密称取本品粉末 0.1、0.2、0.3、0.5 g（含氮量 9.98%），根据硫酸滴定液（0.05 mol/L）消耗量确定取样量。由于控制滴定体积在 25 mL 以下，故确定取样量为 0.25 g。

2.4.2 含有量测定 精密称取 11 批本品，按照 2015 年版《中国药典》方法测定含氮量，结果见表 1，可知第一法、第三法所得结果无明显差异。

表 1 含氮量测定结果

Tab. 1 Results of content determination of nitrogen

编号	产地	含氮量(第一法)/%	含氮量(第三法)/%
1	左家貂心 1 号	9.46	9.46
2	左家貂心 2 号	9.98	9.85
3	左家貂心 3 号	11.82	10.62
4	永吉县泰岳种貂厂貂心 1 号	9.26	9.31
5	永吉县泰岳种貂厂貂心 2 号	13.35	13.31
6	苍山斜沟特种动物养殖场貂心 1 号	9.90	8.91
7	苍山斜沟特种动物养殖场貂心 2 号	14.63	12.63
8	苍山斜沟特种动物养殖场貂心 3 号	12.08	12.09
9	玉田特种动物养殖场貂心 1 号	11.57	11.48
10	玉田特种动物养殖场貂心 2 号	12.35	13.35
11	玉田特种动物养殖场貂心 3 号	13.10	13.18

2.4.3 方法学考察

2.4.3.1 线性关系考察 精密称取本品粉末 0.1、

0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 g，按照第一法测定。以进样量为横坐标

(X), 消耗滴定液体积为纵坐标 (Y) 进行回归, 得方程 $Y=65.141X+0.2541$ ($r=0.9999$), 在 $0.1\sim1.0\text{ g}$ 范围内呈良好的线性关系。

2.4.3.2 加样回收率实验 取含有量已知的本品

粉末 0.25 g (以干品计算含氮量 9.98% , 含水量 5.4%), 共 6 份, 精密加入硫酸铵 (含氮量 21.21%) 适量, 平行 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 氮加样回收率试验结果 ($n=6$)
Tab. 2 Results of recovery tests for nitrogen ($n=6$)

取样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.250 1	24.96	21.22	45.47	96.65	96.4	0.63
0.251 2	25.07	21.25	45.58	96.52		
0.252 3	25.18	21.15	45.39	95.56		
0.251 5	25.10	21.27	45.73	96.99		
0.251 1	25.06	21.19	45.37	95.85		
0.251 3	25.08	21.29	45.74	97.04		

2.4.3.3 重复性试验 取 2 号本品 6 份 (含氮量 9.98%), 精密称定质量后按照第一法测定, 测得 RSD 为 0.12% , 表明该方法重复性良好。

2.4.3.4 中间精密度 3 人各做一样品 (2 号, 含氮量 9.98%), 用同一天平、试剂、消解条件测定, 测得含氮量分别为 9.97% 、 9.96% 、 9.96% , RSD 为 0.1% , 表明该方法中间精密度良好。

2.4.3.5 专属性试验 取空白试剂, 按照第一法测定, 消耗滴定液体积为 0.20 mL 。

2.4.3.6 耐用性试验 取 2 号本品 6 份 (含氮量 9.98%), 精密称定质量, 按照第一法测定, 采用不同厂家样品进行实验, 测得 RSD 为 1.1% , 表明该方法耐用性良好。

2.4.3.7 稳定性试验 取 2 号本品 7 份 (含氮量 9.98%), 精密称定质量, 按照第一法测定, 蒸馏后放置 0 、 4 、 8 、 12 、 16 、 20 、 24 h 测定, 测得 RSD 为 0.31% , 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 检查

2.5.1 水分 按照 2015 年版《中国药典》四部

通则 0832 第二法 (烘干法) 测定, 结果见表 3, 可知 11 批本品平均含水量为 7.02% 。2015 年版《中国药典》四部 0212 药材和饮片检定通则规定, 含水量通常不得超过 13.0% , 故拟定其限度不超过 13.0% 。

2.5.2 总灰分 按照 2015 年版《中国药典》四部通则 2302 测定, 结果见表 3, 可知 11 批本品平均总灰分含有量为 3.76% 。2015 年版《中国药典》一部规定, 九香虫、牛黄、水蛭总灰分含有量分别不得超过 6.0% 、 10.0% 、 8.0% , 故拟定其限度不超过 5.0% 。

2.5.3 重金属及有害物质^[13-14] 参照《中国药典》2015 年版四部通则 2321 铅、镉、砷、汞、铜测定法中原子吸收分光光度法测定, 结果见表 3。2015 版《中国药典》一部规定, 黄芪、甘草等药材中含铅不得超过 5 mg/kg , 镉不得超过 0.3 mg/kg , 砷不得超过 2 mg/kg , 汞不得超过 0.2 mg/kg , 铜不得超过 20 mg/kg , 而 11 批本品中上述 5 种元素含有量均远低于上述限度。

表 3 水分、总灰分、重金属及有害物质含有量测定结果

Tab. 3 Results of content determination of water, total ash, heavy metals and hazardous substances

批次	水分/%	灰分/%	铅/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	砷/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	铬/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	汞/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	铜/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
1	6.8	3.2	0.8	0.6	0.1	0.01	2.8
2	7.0	3.4	0.6	0.5	0.1	0.01	3.5
3	7.1	3.6	0.7	0.7	0.1	0.01	5.8
4	5.9	3.9	0.3	0.5	0.08	0.008	5.5
5	6.3	4.1	0.4	0.6	0.07	0.009	6.0
6	7.6	3.5	0.8	0.7	0.1	0.007	4.0
7	7.7	3.8	0.5	0.7	0.1	0.009	4.9
8	7.4	4.0	0.6	0.4	0.1	0.007	5.3
9	7.2	4.0	0.8	0.3	0.07	0.01	6.2
10	7.4	3.9	0.4	0.2	0.07	0.01	3.3
11	6.7	4.0	0.5	0.2	0.09	0.01	5.1

3 讨论

3.1 TLC 定性鉴别 本实验首先确定提取溶剂，其次研究不同实验环境对结果的影响。通过分析色谱图可知，低温、低湿、高湿环境对 TLC 结果均无明显影响；通过鉴别貂心与其他动物心脏可知，TLC 法无法鉴别出伪品，但可区分开非动物类伪品，故也将该方法纳入到质量标准中。

3.2 聚合酶链式反应 本实验设计貂源性引物序列，以期探索出合适的反应体系。结果，供试品凝胶电泳图谱在貂心阳性对照药材凝胶电泳图谱 300~400 bp 处有单一 DNA 条带，而空白对照无条带，表明该方法能有效快速地将貂心与其他基源性伪品区分开，而且重复性良好，特异性较高。但目前还不能准确鉴定貂心与貂肉，因此还应作进一步研究。

3.3 氮含有量测定 貂心主要成分为蛋白质，故氮含有量是重要检测指标。本实验比较了 2015 年版《中国药典》四部通则 0704 氮测定法中第一法、第三法，发现两者结果并无差异，故将其都纳入质量标准中，而且方法学考察发现其线性关系(0.1~1.0 g)、重复性、稳定性(24 h)良好。然后，收集了不同产地 11 批貂心，测得氮平均含有量为 11.56%，按照其 80% 水平，确定其限度为不得少于 8.0%。

3.4 常规检查 11 批貂心平均含水量为 7.02%，参考 2015 年版《中国药典》四部 0212 药材和饮片检定通则规定，拟定其不得超过 13.0%；平均总灰分含有量为 3.76%，参考 2015 年版《中国药典》一部其他动物药规定，拟定其不得超过 5.0%。

3.5 重金属及有害物质检测 貂心作为制备利心丸等中成药的重要药材，若重金属及有害物质超标，长期服用势必会产生蓄积，从而危害身体健康，故相关控制很有必要。参考 2015 年版《中国药典》一部规定，本实验发现貂心中铅、镉、砷、汞、铜含有量均远小于限度，故不将其列入质量标准。

3.6 创新点与不足 本实验参考药典法确定了貂

心 TLC 定性鉴别条件，并研究了环境因素对测定结果的影响；通过聚合酶链式反应来快速、有效地鉴定貂心与其伪品，并初步建立了该药材质量标准，以便今后进一步完善。但聚合酶链式反应操作复杂，成本较高，无法简易快速地区分貂心与其他动物心脏，同时也未涉及具体有效成分（如氨基酸等）含有量的测定，故今后需继续深入考察。

参考文献：

[1] 张丽华, 孙晶波, 苑广信. ICP-AES 法测定貂心的金属元素[J]. 中药材, 2008, 31(12): 1786-1787.

[2] 于士婷, 赵大庆, 尹翌秋, 等. 利心丸中粉防己碱 HPLC 检测方法的建立及其评价[J]. 长春中医药大学学报, 2017, 33(4): 538-540.

[3] 于士婷, 赵大庆, 李修刚, 等. HPLC 法测定利心丸中毛蕊花糖苷的含量[J]. 中国药房, 2016, 27(33): 4728-4730.

[4] 孙晶波, 张丽华, 姜 爽, 等. 貂心及其易混品种中微量元素测定[J]. 吉林大学学报(医学版), 2010, 36(2): 320-322.

[5] 谢志军, 龚成文, 米永伟, 等. 当归标准化研究进展[J]. 中医药学报, 2018, 46(5): 125-129.

[6] 宋利捷, 张 楠, 李兴月, 等. 吉林省不同产地龙胆中重金属含量分析[J]. 吉林中医药, 2018, 38(9): 1091-1094.

[7] 李 桃, 谭晓梅, 龙 群, 等. 蜈蚣药材薄层鉴别及抗凝活性定量的研究[J]. 中药材, 2012, 35(5): 686-689.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 383.

[9] 杨明妍, 刘 洋, 张丽华, 等. 貂心与其伪品的脱氧核糖核酸指纹特征研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(4): 937-938.

[10] 孙景昱, 张丽华, 傅桂莲, 等. 聚合酶链式反应偶联单链构象多态性分析(PCR-SSCP)技术用于鹿鞭线粒体 DNA 指纹的研究[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(9): 721-725.

[11] 于文静, 周亭亭, 张丽华, 等. 蕲蛇 DNA 检测试剂盒的评价及应用[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(11): 999-1003.

[12] 刘桐辉, 王 锦, 李明成, 等. 中药材龟甲细胞色素 b 基因特异性鉴定研究[J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(3): 182-185.

[13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 205.

[14] 杨 江, 董小萍. 中药中重金属元素检测方法的研究进展[J]. 中药与临床, 2014, 5(4): 46-49; 55.