

高效毛细管电泳法同时分离检测六种地龙多肽*

周鑫悦, 张诗琪, 林露, 陈莉, 李琦, 赖昕**, 余丽双**

(福建中医药大学药学院 福州 350122)

摘要:地龙药用历史悠久,但目前未见对其活性多肽进行分离检测的报道。本文建立了一种同时分离检测六种地龙多肽的毛细管区带电泳新方法。实验发现,在以 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵- $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠 ($\text{pH} = 8.0$) 为运行缓冲液,以 20 kV 为分离电压的分析条件下,六种地龙多肽可在 10 min 内到达基线分离。经方法学验证,六种多肽精密度良好,检测限 ($S/N = 3$) 可低至为 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

关键词:地龙 多肽 毛细管电泳

doi: 10.11842/wst.20181218002 文献标识码: A

地龙又名蚯蚓,为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier), 通俗环毛蚓 *Pheretima vulgaris* Chen, 威廉环毛蚓 *Pheretima guillelmil* (Michaelsen) 或栉盲环毛蚓 *Pheretima pectinifera* Michaelsen 的干燥体,相传因用其治疗宋太祖赵匡胤的带状疱疹和哮喘而得名“地龙”,是一种传统的中药材。地龙性寒味咸,具有降压、平喘、通络、利尿、解热镇痛抗炎等多种功效^[1-2]且应用广泛,近年来常用于中药制剂、注射剂及保健品中。地龙富含蛋白质和多肽,干体中含量高达 $56\% \sim 66\%$ ^[3],地龙多肽种类繁多,功能各异。据报道,目前已从地龙中分离得到抗菌肽^[4-6]、催产素相关肽^[7]、镇痛抗炎肽^[8]等多种多肽,例如地龙多肽 Annectocin 是从赤子爱胜蚓 (*Eisenia foetida*) 中分离得到的一种催产素-加压素相关肽 (oxytocin-vasopressin-related peptide),具有增强肠道的自发收缩、肾脏的脉动收缩及膀胱摇动,诱导产生陈规定型产卵行为的作用^[7-9]; PTP 是一种从蚯蚓全身中分离出的对前肠的自发性收缩显示出强烈兴奋作用的多肽^[10]; F-1 和 OEP3121 是从蚯蚓中纯化出的有抗菌作用的抗菌短肽^[5,6]。AQ-5、VQ-5 是从赤子爱胜蚓 (*Eisenia foetida*) 的体腔液中分离得到的两种新的镇痛抗炎肽^[8]。现代药理研究表

明,地龙多肽具有抗菌抗炎^[5-6,8]、调节免疫^[11]、降血脂血压^[12-13]等多种生物活性,因此有必要对地龙多肽进行研究测定。

目前分离检测多肽最常用的方法有高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 和毛细管电泳法 (capillary electrophoresis, CE)。高效液相色谱分辨率较高,常用于多肽的纯度鉴定及纯化。多肽分离分析常用的高效液相色谱法有:反相高效液相色谱法、离子交换色谱、体积排挤色谱、疏水作用色谱、亲和色谱、多维高效液相色谱、液相色谱与质谱联用法等^[14]。舒一梅等^[15]采用制备型反相高效液相色谱 (RP-HPLC),使用 A 液: 5% 乙腈 (含 0.05% TFA), B 液: 95% 乙腈 (含 0.05% TFA) 为流动相,对离子交换层析分离后的猪股骨中的高活性组分进一步分离。刘佳佳等^[16]采用 A 液: 0.1% 甲酸和 B 液: 0.1% 甲酸乙腈作为流动相,进行梯度洗脱,建立了牛奶中杆菌肽、粘杆菌素 A、粘杆菌素 B、维吉尼霉素和万古霉素 5 种多肽类抗生素的反相液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 检测方法,并对实际牛奶样品进行了检测,重复性良好。胡朝暉等^[17]采用高效液相色谱-质谱考察家福捕鸟蛛粗毒中的多肽和蛋白质的多样性,分离得到 40

收稿日期: 2018-12-18

修回日期: 2019-10-10

* 福建省科技厅面上项目 (2018J01871): 基于多模式毛细管电泳及其联用技术的动物类中药质量控制新方法研究, 负责人: 余丽双; 福建省科技厅重点项目 (2017Y0051): 基于抗肝癌活性导向的闽产中成药消癥益肝片制剂工艺改进研究, 负责人: 赖昕; 福建省科技厅面上项目 (2017J01839): 基于脂质体毛细管电泳技术的太子参活性成分快速筛选新方法研究, 负责人: 李琦。

** 通讯作者: 余丽双, 副研究员, 主要研究方向: 毛细管电泳分析方法; 赖昕, 讲师, 主要研究方向: 中药活性成分分析。

多个色谱峰,经质谱鉴定得到238个多肽。

毛细管电泳是以弹性石英毛细管为分离通道,以高压直流电场为驱动力,依据样品中各组分之间淌度和分配行为上的差异而实现分离的电泳分离分析方法。毛细管电泳兼有电泳和色谱技术的双重优点,克服经典色谱分辨率低、柱效低等缺陷^[18-19]。随着毛细管电泳的不断发展,毛细管电泳越来越多地应用到小分子多肽的分离分析中。分离多肽常用的毛细管电泳模式有:毛细管区带电泳(CZE)和毛细管胶束电动色谱(MEKC)等。与高效液相色谱相比,毛细管电泳具有分析时间短,分离效果好,样品用量少,有机试剂用量少,绿色环保,水相分离模式多,非常适合分离极性较大的成分等优点。例如陈均志等^[20]用高效毛细管电泳(HPCE)无胶筛分方式(MEKC)成功地分离和检测了微波复合酶法大豆蛋白水解物中的多肽。王辰等^[21]利用高效毛细管电泳法分析了脑蛋白水解物中的多肽组分且可有效地分析比较注射液中脑蛋白水解物的多肽组分。薛洪宝等^[22]用毛细管电泳法直接同时定量了15种氨基酸及2种多肽,经方法学验证,其线性范围宽、相对标准偏差低、精密度高、重现性好,且应用于玉米幼苗样品中氨基酸和多肽的定量,获得满意结果。

查阅相关文献,未见任何分离检测地龙多肽的报道。本论文根据地龙化学成分鉴定及药理研究等相关文献,选取六种具有生物活性且有较强紫外吸收的地龙多肽(即Annectocin、PTP、VQ-5、OEP3121、F-1和AQ-5)进行分离测定。因上述地龙多肽多数均为小分子多肽,极性较大,前期实验采用HPLC无法同时分离多种地龙多肽。本实验发现采用毛细管区带电泳法可在10 min内快速同时分离检测六种地龙多肽。但由于地龙多肽稳定性较差,文献报道提取上述地龙多肽需要采用地龙鲜品在低温环境下提取或采用活地龙电针刺激其产生体液^[8,23],由于实验条件限制,未能将该方法用于实际药材中对地龙多肽的测定。但将其用于人加标尿样的测定,回收率良好,表明该方法有望用于复杂样品体系中地龙多肽的测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Beckman P/ACE MDQ型毛细管电泳仪(Beckman Coulter公司,美国),配以二极管阵列检测器及32Karat

软件;戴安UltiMate3000高效液相色谱仪(美国戴安公司);弹性未涂层石英毛细管(75 μm × 60 cm,有效长度49.5 cm,永年县锐沅色谱器件有限公司),KQ-2200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),雷磁PHS-3C型酸度计(上海仪电科学仪器有限公司),XS105电子分析天平(梅特勒-托利多国际股份有限公司)。

六种多肽Annectocin(CFVRNCPYG-NH₂)、PTP(GFRDGSADRISHGF-amide)、VQ-5(VSSVQ)、OEP3121(ACSAG)、F-1(Ac-AMVSS)和AQ-5(AMADQ)对照品均购自上海吉尔生化有限公司(纯度98%);乙酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),乙酸铵(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),二水合磷酸二氢钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),十二水合磷酸氢二钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),氢氧化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),乙腈(色谱纯,德国Merck公司),甲酸(分析纯,西陇科学股份有限公司),硼酸(分析纯,西陇科学股份有限公司)、十水合四硼酸钠(分析纯,西陇科学股份有限公司),盐酸(分析纯,西陇科学股份有限公司),所有实验用水为Milli-Q超纯水。

尿液来源于实验室成年健康志愿者在未服用任何药物的前提下所取得的空白尿液。

1.2 实验方法

1.2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取6种地龙多肽标准品1 mg至1 mL容量瓶中,用超纯水溶解并定容至刻度,即得,六种地龙多肽浓度均为1 mg·mL⁻¹。

1.2.2 样品处理

将人尿样品过0.22 μm的微孔滤膜,取续滤液。向人尿样品续滤液中加入对照品Annectocin、PTP、VQ-5、OEP3121、F-1、AQ-5,使这六种多肽的浓度均达到80 μg·mL⁻¹。

1.2.3 电泳条件

新毛细管使用前分别用水,0.1 mol·L⁻¹ HCl溶液,水,0.1 mol·L⁻¹ NaOH溶液,水各冲洗20 min;旧毛细管使用前分别用水,0.1 mol·L⁻¹ NaOH溶液,水,运行缓冲液各冲洗8 min。

未涂层毛细管:75 μm × 60 cm(有效长度为49.5 cm);运行电压是20 kV,检测波长是215 nm,压力进样3.45 kPa × 10 s,操作温度为25℃;每次进样前,需运行

超纯水冲洗 3 min, 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液冲洗 3 min, 缓冲溶液冲洗 3 min。

1.2.4 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 甲酸 (1:99); 检测波长: 215 nm; 流速: 1 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μL; 柱温: 25℃。

2 结果与讨论

2.1 分离方法的选择

分离检测多肽最常用的方法有高效液相色谱法和毛细管电泳法, 首先对分离方法进行选择; 在预实验中, 先尝试使用高效液相色谱法, 依次采用等度洗脱、一步梯度、多步梯度的洗脱方式, 均不能使六种多肽同时全部出峰, 且可出峰的多肽保留时间长, 色谱峰拖尾严重, 无法达到同时快速分离检测的要求, 原因可能是六种小分子地龙多肽极性过大, 保留过少, 不适宜采用高效液相色谱进行分离。之后, 尝试使用毛细管电泳对六种地龙多肽进行分离, 在预实验中, 采用毛细管区带电泳模式, 六种多肽均可出峰, 且分析时间短因此, 选择毛细管电泳区带电泳模式对地龙多肽进行分离。

由于多肽均含有羰基基团, 具有紫外吸收, 因此选择二极管阵列检测器 (PDA) 对多肽进行检测分析, 选择检测波长为 215 nm。

2.2 缓冲液种类的优化

电泳缓冲液种类是样品组分能否得到完全分离的关键因素之一, 缓冲体系不同, 物质的迁移行为有很大差异。实验分别考察了硼砂-硼酸, 磷酸二氢钠-硼砂, 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠, 乙酸-乙酸铵及乙酸铵-氢氧化钠这几种缓冲液体系对六种地龙多肽迁移行为的影响, 结果见图 1。以乙酸铵-氢氧化钠溶液为缓冲液时, 六种多肽能得到完全分离, 且分析时间较短, 同时峰面积和峰高较大, 因此选择乙酸铵-氢氧化钠溶液为最佳缓冲液。

2.3 分离缓冲液 pH 值的优化

缓冲液的 pH 决定了各组分的解离程度, 即影响其有效淌度, 各组分因有效淌度不同而得到分离, 因此, 缓冲液的 pH 是影响各组分分离效果的一大关键。实验考察了乙酸铵体系 (pH 值分别为 2.0、4.0、6.0 的乙酸-乙酸铵缓冲液和 pH 值分别为 8.0、10.0 乙酸铵-氢氧化钠缓冲液) 在不同 pH 值条件下六种地龙多肽的

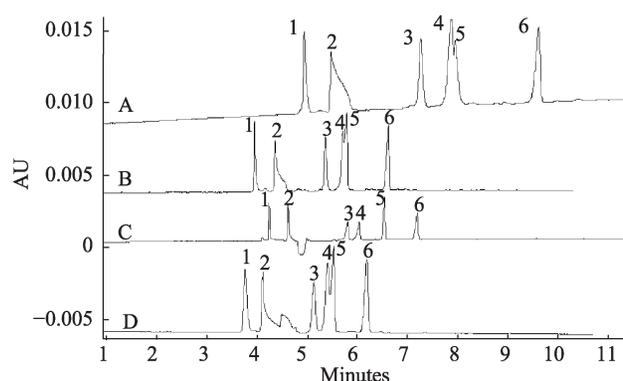


图 1 缓冲液种类对分析物迁移时间的影响

注 A: 50 mmol·L⁻¹ Disodium phosphate-50 mmol·L⁻¹ Sodium dihydrogen phosphate (pH=8.0); B: 50 mmol·L⁻¹ Sodium dihydrogen phosphate-20 mmol·L⁻¹ Borax (pH=8.0); C: 50 mmol·L⁻¹ Sodium hydroxide-60mmol·L⁻¹ Ammonium acetate (pH=8.0); D: 20 mmol·L⁻¹ Borax-300 mmol·L⁻¹ Boric acid (pH=8.0); 1: Annectocin; 2: PTP; 3: VQ-5; 4: OEP3121; 5: F-1; 6: AQ-5

分离效果。结果表明, 当 pH 值为 2.0 时, 各多肽峰拖尾严重, 且多肽 5 及多肽 6 在 21 min 内未出峰。当 pH 值为 4.0 时, 各多肽峰无法完全分离, 多肽 1 和多肽 2, 多肽 3 和多肽 4 几乎完全重合, 且拖尾严重。当 pH 值为 6.0 时, 多肽 2 和多肽 3, 多肽 4 和多肽 5 无法分离, 且出峰时间较长。当 pH 值为 10.0 时, 虽然各多肽出峰时间短, 但多肽 2 和多肽 3 的峰叠加在一块, 无法分离。综合考虑, 选择缓冲液的最佳 pH 值为 8.0, 结果见图 2。

2.4 分离缓冲液浓度的优化

缓冲液的浓度直接影响了电泳介质的离子强度, 改变 Zeta 电势, 从而影响到电渗流。缓冲液浓度越高, 离子强度越强, Zeta 电势越低, 电渗流越小, 样品的保留时间越长。同时, 缓冲盐的浓度会影响电泳介质的电导, 若电导大于样品溶液的电导会产生堆积效果, 提高分析灵敏度。但缓冲液的浓度越高, 电流越大, 热效应越大, 样品组分峰型展宽严重。缓冲液的浓度还会影响溶液的粘度、介电常数等来影响电渗, 离子强度过高或过低都对提高分离效率不利。实验考察了不同浓度的乙酸铵浓度 (固定 NaOH 浓度为 50 mmol·L⁻¹) 对六种地龙多肽分离效果的影响, 见图 3。当乙酸铵浓度为 50 mmol·L⁻¹ 时, 多肽 3 和多肽 4, 多肽 5 和多肽 6 无法完全分离, 且多肽 5 和多肽 6 出峰时间较长。乙酸铵浓度为 60-90 mmol·L⁻¹, 多肽均可在 10 min 内得到完全分离, 且峰面积、峰高和出峰时间差异不大, 但随着乙酸铵的浓度增大, 电流明显增加, 焦耳

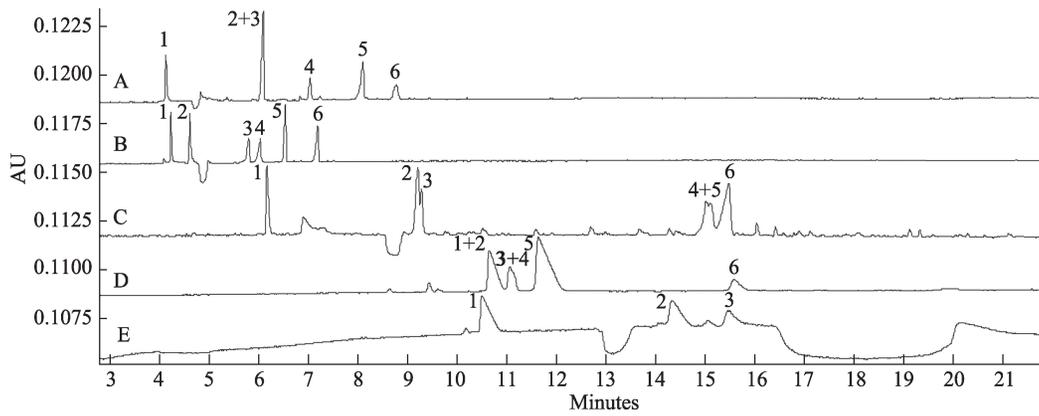


图2 pH值对5种多肽的分离条件的影响

A: pH=10.0; B: pH=8.0; C: pH=6.0; D: pH=4.0; E: pH=2.0

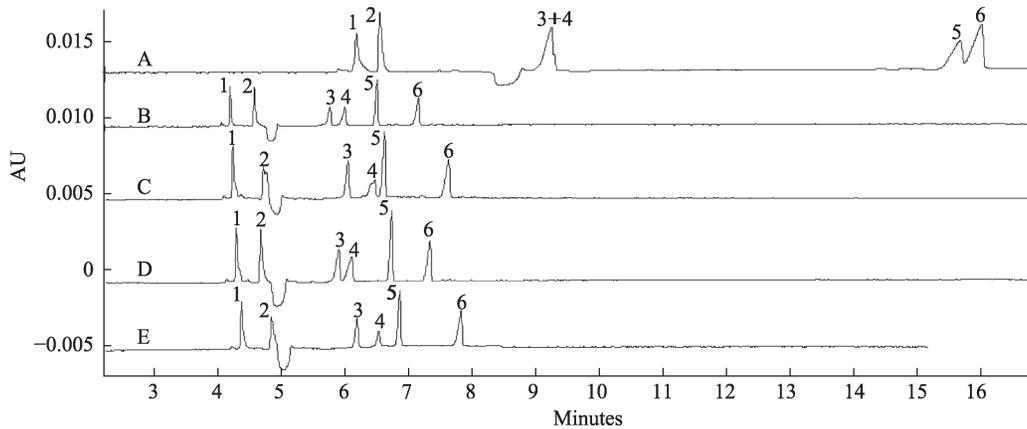


图3 不同缓冲液浓度的影响

A: 50 mmol·L⁻¹; B: 60 mmol·L⁻¹; C: 70 mmol·L⁻¹; D: 80 mmol·L⁻¹; E: 90 mmol·L⁻¹

热明显增多。因此,选择最佳的乙酸铵浓度为 60 mmol·L⁻¹。

2.4 分离电压的优化

实验考察了分离电压对分离效果的影响。当分离电压在20–25 kV之间变化时,迁移时间虽有缩短但不显著,且随着电压增加,电流增大,焦耳热增多,基线稳定性下降,故综合考虑,选择分离电压为20 kV。

综上所述,优化最佳的实验条件:60 mmol·L⁻¹乙酸铵–50 mmol·L⁻¹氢氧化钠(pH = 8.0),运行电压是20 kV,检测波长是215 nm,压力进样3.45 kPa ×10 s,操作温度为25℃,最优条件下的电泳图见图4。

2.5 线性关系、精密度、检出限及定量限

在最佳实验条件下,分析测定了一系列不同浓度对照品溶液,以电泳谱图的峰面积(Y)与相应的化合物浓度X(μg·mL⁻¹)进行线性回归,结果显示六种地龙多肽的峰面积和浓度呈现良好的线性关系,检测限(S/

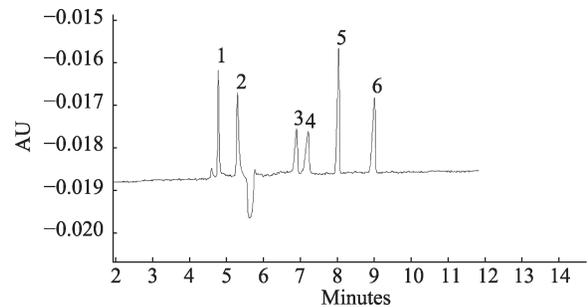


图4 六种多肽的电泳谱图

$N = 3$)可低至为1.0 μg·mL⁻¹。将浓度为80 μg·mL⁻¹的六种地龙多肽混合溶液连续进样5次,结果显示各分析物迁移时间的相对标准偏差(RSD)小于1.6%,峰面积的RSD小于9.5%,表明该方法精密度良好。线性关系、精密度、检测限及定量限的结果见表1。

2.6 稳定性实验

配制浓度为80 μg·mL⁻¹的六种地龙多肽混合溶

表1 6种多肽的线性方程、定量限、检出限及精密度

Analyte	Linear equation	r	Linear range/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%	
						Peak area	Migration time
Annectocin	$Y = 404.30X - 8482.9$	0.993 8	20-160	20	2.5	8.8	0.27
PTP	$Y = 402.39X - 5407.9$	0.992 6	5-160	5	5	5.1	0.57
VQ-5	$Y = 257.42X - 2176.1$	0.991 9	5-120	5	2.5	8.7	0.97
OEP3121	$Y = 276.52X - 2476.6$	0.994 4	5-160	5	5	9.5	1.6
F-1	$Y = 600.38X - 3770.3$	0.995 4	5-160	5	1.0	6.8	0.49
AQ-5	$Y = 546.39X - 3390.4$	0.997 3	5-160	5	2.5	8.4	1.3

表2 人尿样中加标回收率的测定结果

Analyte	Found/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Added/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Recovery/%	Average recovery/%	RSD/%
Annectocin	75.45	80	94.32	97.04	3.9
	76.35	80	95.44		
	81.09	80	101.36		
PTP	73.15	80	91.43	93.83	7.8
	81.63	80	102.03		
	70.42	80	88.02		
VQ-5	89.48	80	111.84	110.20	1.3
	87.54	80	109.42		
	87.46	80	109.33		
OEP3121	73.21	80	91.51	99.28	7.8
	79.42	80	99.27		
	85.64	80	107.05		
F-1	125.81	80	157.26	141.10	10
	107.57	80	134.46		
	105.26	80	131.57		
AQ-5	90.28	80	112.85	121.89	8.2
	106.15	80	132.68		
	96.11	80	120.13		

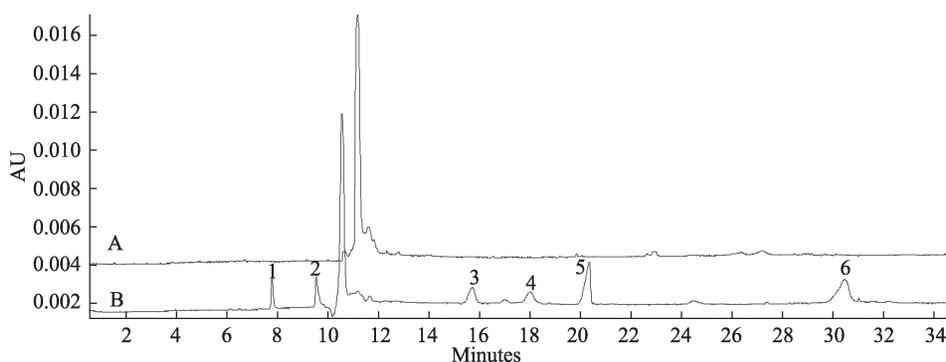


图5 人空白尿样(A)及加标尿样(B)的电泳谱图

液,分别于0.5、1、1.5、2、2.5、3 h进样,记录 Annectocin、PTP、VQ-5、OEP3121、F-1、AQ-5 六种多肽的峰面积,并计算其 RSD。结果表明,Annectocin、PTP、VQ-5、OEP3121、F-1、AQ-5 六个组分的峰面积的 RSD 分别为 10%、5.3%、9.0%、9.6%、7.1%、8.8%,说明样品溶液

在 3 h 内能相对稳定。

2.7 加标样品处理

按“1.2.2”项下样品处理方法对样品进行处理,然后直接进样所得图谱如图 5,所测得的回收率结果见表 2。由表 2 可知,除了 F-1 可能由于内源性物质的干

扰,其他地龙多肽 Annectocin、PTP、VQ-5、OEP3121、AQ-5的回收率良好。

3 结论

本文采用毛细管区带电泳法同时分离测定了地龙的六种多肽,分别为 Annectocin、PTP、VQ-5、OEP3121、F-1、AQ-5。实验对缓冲液的种类、pH值、

缓冲液浓度、分离电压进行了优化。在最优的条件下,六种地龙多肽可以在 10 min 内实现基线分离。但地龙多肽稳定性较差,需要采用地龙鲜品在低温环境下方可提取,由于实验条件限制,未能将该方法用于实际药材中地龙多肽的测定。但将该方法用于人加标尿样的测定,回收率良好。本文所建立的方法简单快速,有望为地龙多肽的分离检测提供一个新手段。

参考文献

- 1 李嘉欣,王鹏思,王玉洁,等. 中药材地龙中七种指示性多氯联苯残留量测定研究. 中国现代中药, 2017, 19(12): 1708-1712.
- 2 周晓,季倩,张汉明,等. 地龙的研究进展. 药学实践杂志, 2015,33(5): 396-400, 410.
- 3 吴庆,曹云娥,方海田,等. 鲜地龙可溶性蛋白不同提取方法的比较. 中成药, 2018, 40(8): 1878-1882.
- 4 Kim D H, Lee I H, Nam S T, *et al.* Neurotropic and neuroprotective activities of the earthworm peptide Lumbricisin. *Biochem Bioph Res Co*, 2014, 448(3): 292-297.
- 5 张希春,孙振钧,嵇如朋,等. 蚯蚓两种抗菌肽的分离纯化及部分性质. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(6): 955-960.
- 6 Liu Y Q, Sun Z J, Wang C, *et al.* Purification of a Novel Antibacterial Short Peptide in Earthworm *Eisenia foetida*. *Acta Bioch Bioph Sin*, 2004, 36(4): 297-302.
- 7 Oumi T, Ukena K, Matsushima O, *et al.* Annetocin: an oxytocin-related peptide isolated from the earthworm, *Eisenia foetida*. *Biochem Bioph Res Co*, 1994, 198(1): 393.
- 8 Li C, Chen M, Li X, *et al.* Purification and function of two analgesic and anti-inflammatory peptides from coelomic fluid of the earthworm, *Eisenia foetida*. *Peptides*, 2017, 89: 71-81.
- 9 Kawada T. Subchapter 40C - Annetocin. *Handbook of Hormones*, 2016: 349.
- 10 Ukena K, Oumi T, Matsushima O, *et al.* A novel gut tetradecapeptide isolated from the earthworm, *Eisenia foetida*. *Peptides*, 1995, 16(6): 0-999.
- 11 傅炜昕,董占双,李铁英,等. 免疫活性地龙肽的制备及其对小鼠NK细胞活性的影响. 中国医科大学学报, 2007, 36(6): 650-652.
- 12 陈萍. 地龙多肽降血脂作用的实验研究. 药物生物技术, 2015, 22(6): 509-511.
- 13 张兰娥,李清华,康白,等. 地龙蛋白肽的成分分析及对血管紧张素转化酶活力的影响. 天然产物研究与开发, 2013, 25(12): 1740-1742.
- 14 李文龙,张慧,汤琦,等. 高效液相色谱在多肽分离分析中的应用. 分析仪器, 2018, 1: 63-67.
- 15 舒一梅,李诚,李凌希,等. 制备型反相高效液相色谱分离猪股骨降血压肽的研究. 食品工业科技, 2015, 36(4): 265-268.
- 16 刘佳佳,金芬,余永新,等. 液相色谱-串联质谱法测定牛奶中5种多肽类抗生素. 分析化学, 2011, 39(5): 652-657.
- 17 胡朝曦,肖慧,周熙,等. 采用高效液相色谱-质谱考察家福捕鸟蛛粗毒中多肽和蛋白质的多样性. 色谱, 2015, 33(6): 628-633.
- 18 朱晓伟,陈建平,郭妍妍,等. 高效毛细管电泳在中药分析中的应用. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(1): 214-218.
- 19 颜梅,韩颜颜,徐媛媛,等. 毛细管电泳技术在药物分离分析中的研究与应用. 分析测试技术与仪器, 2008, 14(2): 79-86.
- 20 陈均志,张海平,顾玲,等. 高效毛细管电泳-紫外检测法分离测定微波复合酶法大豆蛋白水解物中的多肽. 食品工业科技, 2005, 26(8): 163-165.
- 21 王辰,黄慧玲,莫丽冬,等. 脑蛋白水解物中多肽组分的高效毛细管电泳分析. 中国医药, 2012, 7(5): 603-605.
- 22 薛洪宝,刘海峰,焦艳娜,等. 15种氨基酸及2种多肽的毛细管电泳法定量分析. 工程科学与技术, 2010, 42(2): 204-208.
- 23 Zhang X, Sun Z, Zhuo R, *et al.* Purification and characterization of two antibacterial peptides from *Eisenia fetida*. *Prog Biochem Biophys*, 2002, 29(6): 955-960.

Simultaneous Separation and Detection of Six Earthworm Peptides by Efficient Capillary Zone Electrophoresis

Zhou Xinyue, Zhang Shiqi, Lin Lu, Chen Li, Li Qi, Lai Xin, Yu Lishuang

(College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122;China)

Abstract: Earthworms have been used as a traditional medicine in China for thousands of years. However, there have not been publications related to the analysis of their active peptide. The experiment found that by using $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

ammonium acetate-50 mmol·L⁻¹ sodium hydroxide (pH = 8.0) as running buffer and 20 kV as separation voltage, the six kinds of earthworm peptides reached baseline separation within 10 min. After the methodological verification, good precision was obtained, and the detection limit ($S/N = 3$) could be as low as 1.0 μg·mL⁻¹.

Keywords: Earthworm, peptide, capillary electrophoresis

(责任编辑: 闫 群, 责任译审: 钱灵姝)