

塞隆骨和虎骨的羟脯氨酸含量分析比较

魏立新, 张宝琛, 杜玉枝

(中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001)

摘要:用改良的 Woessner 第 1 法测定和比较了塞隆骨和虎骨的 L-4 羟脯氨酸的含量。结果表明:原药材中羟脯氨酸含量塞隆骨略低于虎骨,但在水煎液干膏部分 L-4 羟脯氨酸含量塞隆骨高于虎骨,这为塞隆骨与虎骨的药用价值比较提供了成份实验依据。

关键词:塞隆骨;虎骨;羟脯氨酸

中图分类号:TQ460.7

文献标识码:A

文章编号:1006-8376(2001)03-0009-04

1 前言

塞隆骨为鼯鼠科动物高原鼯鼠 (*Myospalax baileyi*) 的干燥全骨架,是卫生部于 1990 年批准的(批准文号: <90>卫药试字 Z-33 号)中药第一类新药材,研究发现其药理作用与虎骨有类似之处。在研究初期是以总氮含量作为与虎骨的成份比较分析对象和质量控制标准的,随后的研究表明胶原是塞隆骨的主要有效药用成分,因此用胶原的特征性氨基酸——羟脯氨酸作为含量指标(以代表胶原蛋白)来与虎骨进行对比分析,有着重要的理论意义和应用价值。

L-羟脯氨酸(trans-4-Hydroxyproline, Hyp)在胶原蛋白分子中主要以 Gly-Pro-Hyp 的形式存在。以游离形式存在的 Hyp 较少,且这种形式大多是代谢后的产物,因为羟脯氨酸的羟基是在肽链形成后经羟化酶加到脯氨酸上的^[1]。L-羟脯氨酸的测定方法有化学比色法、电泳法、氨基酸分析仪测定法和 HPLC 法等。电泳法和氨基酸仪分析法主要应用于不同氨基酸存在或含量的比较,即相对测定意义较大。HPLC 法以其检测用样量少,灵敏和快速得到了迅速的发展^[2],但仪器要求较高。光电比色法是从羟脯氨酸检测初期^[3]发展到现在^[4]一直使用的主要

方法,特别是 Woessner 第 1 法^[5]以其准确和简便的特点,成为胶原蛋白中 L-羟脯氨酸测定的首选方法。

羟脯氨酸在临床上一直是作为骨代谢的标志物来检测,以其为代表的胶原蛋白也是以结构性成份的形式来研究的。但近年的研究表明,胶原蛋白(包括分子大小不等的明胶和小分子分解产物等)作为细胞外基质的主要成份的生理功能,如诱导血小板聚集作用等也是十分显著的。祖国医药中一直使用的虎骨、阿胶和鹿茸等药材都表明胶原的系列分解产物也是有药物功效的。因此,利用现代科学方法对胶原蛋白的传统用法给出合理解释,并对象虎骨这样的名贵药材的替代品进行深入研究,以期达到充分利用生物资源的目的,是很有现实意义的。

2 实验部分

2.1 试剂与器材

试剂:trans-4-Hydroxyproline (Sigma 公司), 氯胺 T, 盐酸, 氢氧化钠, 柠檬酸, 柠檬酸钠, 高氯酸, 无水乙醇, 乙二醇单甲醚, 对二甲氨基苯甲醛等均为国产 A. R 级试剂。

器材:724 微机型可见光分光光度计(上海光学仪器厂), 多功能恒温水浴锅, 分析天平, 鼓风干燥箱, 安培瓶(5 ml), 微量移液器等。

* 国家八·五科技攻关项目资助课题
收稿日期:2001-03-25
作者简介:魏立新(1967—),男,博士。

2.2 实验方法

2.2.1 药材来源

塞隆骨:高原鼯鼠 (*Myospalax baileyi* Thomas) 的干燥全骨架,采自青海省门源县。

虎骨:东北虎 (*Panthera tigris altaica* Temminck) 风干骨架,西宁市人民公园饲养,1994 年因胃病死亡,16 岁,雌性。

2.2.2 药材的处理

自然风干的塞隆骨和虎骨药材(虎骨去骨髓),砸碎,捣成细粉,经水份测定后,用于羟脯氨酸的含量测定。

2.2.3 试剂的配制

6 mol/L 的盐酸,1 mol/L 的盐酸,10 mol/L 的 NaOH,1 mol/L 的 NaOH,柠檬酸缓冲液 (pH 6.0),氯胺 T 氧化试剂 (0.05 mol/L,称取氯胺 T 7.05 g,溶于 100 mL 蒸馏水中,加乙二醇单甲醚 150 mL,再加柠檬酸缓冲液 250 mL,混匀),3.15 mol/L 的高氯酸,对二甲氨基苯甲醛试剂(取浓 H_2SO_4 2.74 mL,慢慢加入无水乙醇 20 mL,为溶液 A;另取对二甲氨基苯甲醛 12.0 g,慢慢加入无水乙醇 40 mL,37 °C 水浴加热使其完全溶解,冷却,为溶液 B;在冰浴中将溶液 A 慢慢加入溶液 B 中使其混匀),L-羟脯氨酸标准母液(精密称取 L-羟脯氨酸标准品 10.0 mg,加浓盐酸 0.1 mL,溶解后加蒸馏水定容至 100 mL,浓度为 100 μ g/mL)。

2.2.4 样品的处理

分别称取塞隆骨和虎骨原药材 20 g 左右,研钵中研成细粉:其中的 10 g 用来测定水份含量,5 g 用来做羟脯氨酸的含量测定,剩余的 5 g 留样。分析天平准确称取两种药材粉各 10 mg 左右,于 5 mL 的安培瓶中,加入 6 mol/L 的盐酸 2 mL,煤气喷灯封熔,于 118 °C 的烘箱中酸解 16 h。酸解后的溶液用 NaOH 调 pH 至 6,定量滤纸过滤到容量瓶中,用蒸馏水定容至 100 mL,作

为供试品溶液。不取药材样品,按上述相同的方法步骤操作,所得定容液作为空白对照溶液。

另取同一批的塞隆骨和虎骨药材,按骨胶原蛋白的提取分离方法^[6],制备两种药材的水煎液干膏。分别取样 10 mg 左右,按上述相同方法步骤制备供试品溶液。

2.2.5 羟脯氨酸的标准曲线的制定

精密吸取 L-羟脯氨酸的标准母液 (100 μ g/mL) 0.6, 1.0, 1.6, 2.0, 2.6, 3.0, 3.6, 4.0, 4.6 mL, 分别用蒸馏水定容至 100 mL。以蒸馏水 1.0 mL 为空白对照,分别吸取上述定容液 1.0 mL 于试管中,各加柠檬酸缓冲液 (pH 6.0) 1.0 mL,再加入 0.05 mol/L 的氯胺 T 1.0 mL 后,于室温 (20 °C 左右) 放置氧化 10 min 后,加 3.5 mol/L 的高氯酸溶液 1.0 mL 静置 10 min 终止氧化。最后,加入对二甲氨基苯甲醛试液 1.0 mL 于 65 °C 水浴中显色 8 min,冷却后在 561 nm 处测定吸光度 A 值。以 L-Hyp 浓度 C (μ g/mL) 为横坐标,吸光度 A 值为纵坐标绘制出标准曲线,并回归出标准曲线方程。

2.3 药材和提取物干膏的羟脯氨酸含量测定

按羟脯氨酸标准曲线的制定方法,以空白酸解定容液为对照,测定待测样品溶液的吸光度。由标准曲线换算出样品溶液的羟脯氨酸浓度 C (μ g/mL),按计算式 $(100 \times C) / W / 10^3 \times 100\%$ 算出样品中羟脯氨酸的百分含量。其中 W (mg) 为药材或提取物干膏的称样量, C (μ g/mL) 为样品溶液的羟脯氨酸浓度。

3 结果与讨论

3.1 羟脯氨酸标准曲线的测定

按照 2.2.5 的方法测定羟脯氨酸的标准曲线,结果见图 1。羟脯氨酸标准品的浓度 (μ g/mL) 与吸光度 A 的测定结果见表 1,并由此计算回归方程为: $Y = 12.2947x - 0.05228$, 相关系数 = 1.0000。此标准曲线的线性关系良好。

表1 羟脯氨酸的标准品密度、浓度和吸光度测定结果 (n = 3)

浓度 C/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.6	1.0	1.6	2.0	2.6	3.0	3.6	4.0	4.6
吸光度/A	0.052	0.084	0.136	0.168	0.215	0.251	0.298	0.327	0.378

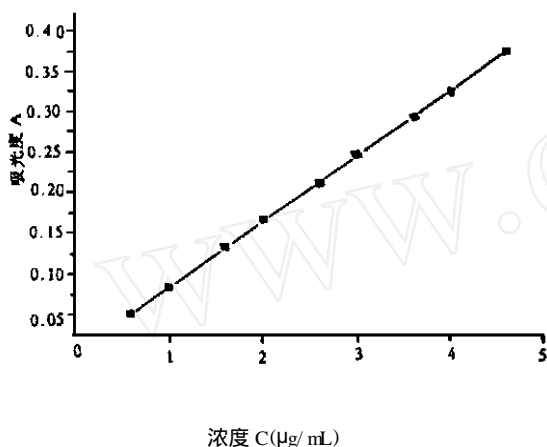


图1 羟脯氨酸标准曲线

3.2 塞隆骨与虎骨药材羟脯氨酸的含量测定

两种药材的细粉按 2.2.4 项样品的处理方法处理,按标准曲线测定方法测定其吸光度 A 值,按回归方程换算出样品在该处的羟脯氨酸浓度 C,再按计算式 $(100 \times C) / W / 10^3 \times 100\%$ 计算出原药材的羟脯氨酸含量,结果见表 2。

表2 塞隆骨和虎骨的羟脯氨酸含量比较 (n = 6)

	样品重量/ mg	吸光度/ A	Hyp 浓度/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Hyp 含量/ %
塞隆骨药材	10.8	0.178	2.14	1.98
虎骨药材	10.0	0.236	2.85	2.85

结果表明,原药材中的羟脯氨酸含量虎骨要高于塞隆骨。原因可能是虎骨的密度大于塞隆骨,而且虎骨是去骨髓的,塞隆骨由于比虎骨小得多而无法除掉骨髓。以前的实验结果表明骨髓中的羟脯氨酸含量是很低的。

3.3 塞隆骨与虎骨提取物干膏的羟脯氨酸含量比较

两种药材按照 2.2.4 样品处理提取部分方法提取后得到的干膏再依照标准曲线下的方法测定其吸光度值,然后用回归方程计算出样品溶液在该处的羟脯氨酸浓度 C。由于干膏中的 Hyp 含量远高于原药材,所以酸解后的样品溶液作 500 mL 定容(药材测定时是以 100 mL 定

容的)。因此,该项羟脯氨酸百分含量的换算式调整为 $(500 \times C) / W / 10^3 \times 100\%$ 。测定结果见表 3。

表3 塞隆骨和虎骨提取物干膏的羟脯氨酸含量比较

水煎液干膏	样品重量/ mg	吸光度/ A	Hyp 浓度/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Hyp 含量/ %
塞隆骨提取物	10.0	0.137	1.63	8.15
虎骨提取物	10.2	0.125	1.48	7.25

该项测定结果表明,水煎液干膏中的羟脯氨酸含量塞隆骨要高于虎骨,而从骨类药材的使用来说基本全部是水煎液。这种测定结果虽然并不能肯定塞隆骨水煎液的某种药效与虎骨水煎液相比有何联系,但至少提供了一种思考路线。我们现在正在就以 Hyp 为核心的胶原相关肽作这方面的尝试研究,希望能从中找到某种内在的联系。

参考文献:

- [1] Prockop DJ. Pleasant Surprises En Route from the Biochemistry of Collagen to Attempts at Gene Therapy [J]. Biochemical Society Transactions, 1999, 27:15 ~ 31.
- [2] Biondi PA, Chiesa LM, Storelli, MR. A New Procedure for the Specific HPLC Determination of Hydroxyproline [J]. J Chromat Sci, 1997, 35:509 ~ 512.
- [3] Prockop DJ, Udenfried S, Lindsted S. A Simple Technique for Measuring the Specific Activity of labeled Hydroxyproline in Biological Materials [J]. J Biol Chem, 1961, 236(5):1395 ~ 1403.
- [4] Koike K, Li Y, Miyuki S, et al. Free 4-hydroxyproline Content in serum of bedridden aged people is elevated due to fracture [J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23(1):101 ~ 103.
- [5] Woessner JF. The Determination of Hydroxyproline in Tissue and Protein Samples Containing Small Proportions of this Imino acid [J]. Arch Biochem Biophys, 1961, 93:440 ~ 445.
- [6] 张晓峰,胡伯林,张宝琛. 塞隆骨与虎骨的骨胶蛋

白对比分析[J]. 高原生物学集刊,1999,14:228~

232.

The Analysis of Hydroxyproline in Sailonggu and Hugu Bone

WEI Li - xin , ZHANG Bao - chen , DU Yu - zhi
(*Northwest Plateau Institute of Biology , The Chinese
Academy of Science , Xining 810008*)

Abstract : The quantitative analysis of hydroxyproline in crude drugs of Sailonggu and Hugu bone was carried out by the improved Woessner method . It showed that the content of hydroxyproline in Sailonggu was lower than that in Hugu , but in the extract of both bones the content of the former was higher than the later.

Key words : Sailonggu and Hugu bone ; hydroxyproline ; analysis

(上接第 6 页)

Determination of Amino Acids and Other Nutritious Components in *Lactarius deliciosus*

WU San - qiao , ZHOU Xuan - wei , LI Xin - sheng
(*Bio - resources key Laboratory of Shanxi Province , Hanzhong
Teachers College , Hanzhong 723000 , Shanxi , China*)

Abstract : The amino acids and other nutritious components in the fruitbody of *Lactarius deliciosus* were determined. The results showed that there are 17 kinds of amino acids in the mushroom cover and 16 kinds in mushroom stem. The two parts of the mushroom contain 24 - 17 % and 19.03 % of crude protein in which 36.75 % and 35.95 % of amino acid are essential amino acids , 6.84 % and 5.02 % of crude fat , 11.52 % and 15.26 % of crude fiber , 37.41 % and 23.89 % of total sugar , and 7.42 % and 5.28 % of ash respectively. The mushroom contain La , Fe , Zn , Cu , and Mn five trace elements also in which the content of Fe is the highest which amount to 0.168 % in the two parts of the mushroom , respectively.

Key words : *Lactarius deliciosus* ; amino acid ; nutritious component ; determination