

相似度在 0.71 以下。可以看出炮制后 药材的成分及成分含有量及其比例关系都发生了相应的变化。本研究将为后期青礞石药材质量标准的建立提供基础研究数据 亦为其他矿物药建立红外光谱指纹图谱分析方法提供参考。

参考文献:

[1] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 184.
[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 294.
[3] 中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所. 中药志: 第六册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 340.
[4] 江苏新医学院. 中药大辞典: 下册[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 2700.
[5] 宋立人, 洪 恂, 丁绪亮, 等. 现代中药学大辞典: 下册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 2455.
[6] 何晋浙, 邵 平, 孙培龙. 灵芝红外光谱的特征峰研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(5): 1202-1205.

[7] 彭文世, 刘高魁. 矿物红外光谱集[M]. 北京: 北京科学出版社, 1982: 393.
[8] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 1443.
[9] 闻 轲. 矿物红外光谱学[M]. 重庆: 重庆大学出版社, 1988: 89-103.
[10] 梁碧燕, 李书渊, 孙素琴. 昆明山海棠与南蛇藤红外宏观指纹图谱研究[M]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(2): 313-317.
[11] 刘 江, 陈兴福, 杨文钰, 等. 川麦冬野生种质资源色谱特征图谱的建立及其系统聚类分析[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(20): 2726-2729.
[12] 刘圣金, 吴德康, 孔庆友, 等. 矿物药青礞石的炮制考证[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(12): 3262-3263.
[13] 麦 曦, 欧阳婷, 曹郁生, 等. 红外二阶导数指纹图谱用于紫花地丁药材的产地分类[J]. 理化检验-化学分册, 2011, 47(10): 12-14.
[14] 宿树兰, 欧阳臻, 金晓勇, 姜黄属几种药材的红外指纹图谱鉴别研究[J]. 中成药, 2006, 28(10): 1408-1410.

牦牛皮胶氨基酸类成分的高效液相色谱指纹图谱

朱洪梅^{1,2,3}, 魏立新^{1,2}, 杜玉枝^{1,2*}, 肖远灿^{1,2}, 杨红霞^{1,2,3}, 李 岑^{1,2,3}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所藏药现代化研究中心, 青海 西宁 810008; 2. 青海省藏药药理学与安全性评价重点实验室, 青海 西宁 810008; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 目的 采用高效液相色谱法研究并建立牦牛皮胶氨基酸类成分指纹图谱, 为牦牛皮胶的质量控制提供有效的方法。方法 采用柱前衍生-RP 高效液相色谱法 梯度洗脱进行分离, 固定相为 Agilent Analytical XDB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm 5 μm); 流动相为 pH6.4 的醋酸钠缓冲液(A) - 60% 乙腈(B) 检测波长为 360 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 分析时间为 48 min。结果 10 批样品具有较高的相似度。天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸和赖氨酸的平均质量分数分别为 5.58%、10.49%、3.35%、23.25%、1.74%、14.19%、8.98%、2.48%、0.29%、1.6%、3.07%、2.12% 和 3.57%。结论 该方法稳定可靠, 可为其氨基酸质量的全面控制提供参考。

关键词: 牦牛皮胶; 氨基酸; 高效液相; 指纹图谱

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2012)02-0195-04

Development of HPLC fingerprints of amino acids constituents in yak collagen

ZHU Hong-mei^{1,2,3}, WEI Li-xin^{1,2}, DU Yu-zhi^{1,2*}, XIAO Yuan-can^{1,2}, YANG Hong-xia^{1,2,3}, LI Cen^{1,2,3}

(1. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China; 2. Qinghai Provincial Key Laboratory of Tibetan Medicine Pharmacology and Safety Evaluation, Xining 810008, China; 3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

收稿日期: 2011-04-29

基金项目: 青海省科学技术厅项目(2009GJG20044)

作者简介: 朱洪梅(1985—)女, 硕士生, 研究方向: 药用植物化学。Tel: 18797150262, E-mail: y_may@126.com

* 通信作者: 杜玉枝(1967—)女, 副研究员, 研究方向: 中藏药开发。Tel: (0971) 6132480, Email: yzdu@nwipb.ac.cn

ABSTRACT: **AIM** To develop an HPLC method for controlling the quality of yak collagen according to the amino acids constituents. **METHODS** The amino acids constituents were analysed by Pre-column derivatization reversed phase high performance liquid chromatography. Chromatographic conditions were as follows: Agilent Analytical XDB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm 5 μm), mobile phase was natrium aceticum buffer solution (A) (pH = 6.5) - 60% acetonitrie (B), the detective wavelength was set at 360 nm, the flow rate was 1 mL/min and the analytical time was 48 minutes. **RESULTS** The result showed that the amino acids constituents had a high similarity. The contents of Asp, Glu, Ser, Gly, Thr, Arg, Ala, Val, Met, Ile, Leu, Phe and Lys were 5.58%, 10.49%, 3.35%, 23.25%, 1.74%, 14.19%, 8.98%, 2.48%, 0.29%, 1.6%, 3.07%, 2.12% and 3.57%, respectively. **CONCLUSION** The method has good reproducibility and stability, and can be served as the means to control the quality of yak collagen.

KEY WORDS: yak collagen; amino acids; HPLC; fingerprints

牦牛皮胶是以牦牛皮为原料,经现代生物技术方法加工制成。它富含胶原蛋白,具有补血、活血、补肾、抗衰老等功效,现已作为生物制品应用于临床^[1-4]。牦牛是青藏高原的特有动物,其生长环境具有高寒、高海拔、远离工业污染等特点,而且皆为人工放养,不食用人工合成饲料,因此牦牛皮胶与其他动物胶类相比,更为安全。近年来对于牦牛皮胶的研究较少,仅见关于其化学成分和药理方面的几篇文献报道。本实验采用高效液相法对牦牛皮胶氨基酸成分的指纹图谱进行研究,可为其质量控制提供依据。

中药指纹图谱是控制天然药物质量的有效方式之一,已日益成为国内外广泛接受的中药质量评价模式。现阶段,指纹图谱的研究和应用已逐渐拓展到生物、食品、化工等领域的各个行业,成为控制产品质量的有效工具^[5-7]。本实验选取了10个不同生产批次的牦牛皮胶样品,利用柱前衍生-RP高效液相色谱法研究了其氨基酸成分的指纹图谱,从图谱相似度、共有峰等情况确定指纹图谱的技术参数,为牦牛皮胶的质量标准的建立提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 Series 液相色谱仪(G1379A 在线脱气机、G1312A 二元泵、G1316A 柱温箱、G1315B 二极管阵列检测器、手动进样器); Agilent Chemstation 色谱工作站(美国 Agilent 公司); Millipore simplicity 超纯水仪(美国 Millipore 公司); ML104 电子天平[梅特勒托利多仪器(上海)有限公司]。

1.2 试剂 DNCB(2,4-二硝基氯苯)衍生剂;氨基酸对照品(由 sigma 公司提供);乙腈(色谱纯);超纯水;硼酸(分析纯);无水乙酸钠(分析纯);三乙胺

(分析纯);盐酸(分析纯);10批牦牛皮胶干粉样品,由青海信成药业有限公司提供,批号分别为:20081205、20090508、20090630、20090715、20090725、20090731、20090806、20090812、20090824、20091021。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Analytical XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm);流动相为 pH 6.4 的乙酸钠缓冲液(A) - 60% 乙腈(B),梯度洗脱,洗脱剂 B 在 0~5 min 为 25%,在 5~9 min 为 28%,9~12 min 为 30%,12~17 min 为 34%,17~21 min 为 36%,21~46 min 为 85%,46~48 min 为 25%。体积流量 1.0 mL/min;检测波长 360 nm;分析时间 48 min。

2.2 供试品溶液的制备 称取牦牛皮胶粉 0.5 g,蒸馏水溶解并定容至 25 mL,精密吸取 1 mL 置于安瓿瓶中,另加 6 mol/L 盐酸 1 mL,密封,置烘箱 105 °C 加热 24 h,取出后挥干,用 0.02 mol/L 盐酸定容至 10 mL,取定容好的上述溶液 100 μL,加入等体积硼酸缓冲液和 5 倍体积的 50 mmol/L 2,4-二硝基氯苯衍生物,混匀,置烘箱 90 °C 加热衍生 1 h,取出后定容至 1 mL,即得样品供试液。

2.3 对照品溶液的制备 取氨基酸对照品溶液 100 μL,与等体积硼酸缓冲液和 5 倍体积的 50 mmol/L 2,4-二硝基氯苯衍生物混匀,置烘箱 90 °C 加热 1 h,取出后定容至 1 mL,作为参照品溶液。

2.4 样品的测定 按照 2.1 项色谱条件,对 10 批供试样品进行氨基酸的测定,天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸和赖氨酸的平均质量分数分别为 5.58%、10.49%、3.35%、

23.25%、1.74%、14.19%、8.98%、2.48%、0.29%、1.6%、3.07%、2.12%和3.57%。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取同一供试液,连续进样5次,各共有峰相对保留时间RSD < 1.08% 相对峰面积RSD < 2.61% ,表明仪器精密度良好。

2.5.2 重复性实验 取同一样品5份,按2.2项方法平行制备供试液,进样检测,各共有峰相对保留时间RSD < 2.32%; 相对峰面积RSD < 2.86% ,表明重复性良好。

2.5.3 稳定性实验 取同一样品,分别于制备后0、2、4、8、12、24 h 进样测定,各共有峰相对保留时间RSD < 1.56%; 相对峰面积RSD < 1.93% ,表明供试液在24 h 内稳定性良好。

2.6 指纹图谱的建立

2.6.1 共有峰标定 按照2.2项方法,制备10批牦牛皮胶粉供试液,在上述色谱条件下进行测定、记录色谱图。将上述10个不同批次牦牛皮胶粉HPLC 色谱图的检测结果,导入中药指纹图谱相似度软件2004A,对保留时间0~42 min 的色谱峰进行自动匹配,确定13个共有峰,其中S1 为对照图谱,HPLC 色谱图如图1。样品S1 到S10 色谱峰出峰总数依次为24、24、30、29、27、26、28、28、31、15,共有峰所占比例依次为0.54、0.54、0.43、0.45、0.48、0.50、0.46、0.46、0.42、0.87。

在13个共有峰中,甘氨酸的峰面积约占总峰面积的52%,比较稳定,选为参照峰。将各色谱峰保留时间与同一图谱中甘氨酸的保留时间比较,其比值为各色谱峰的相对保留时间,10批样品中各共有峰相对保留时间的RSD% 分别为0.67%、0.48%、0.13%、0.00%、0.31%、0.62%、0.49%、0.54%、0.54%、0.54%、0.54%、0.54%、0.57%。

2.6.2 指纹图谱相似度计算 根据文献[8],对10批样品指纹图谱进行匹配,并分别以生成的对照图谱(中位数法)作为对照模板,计算相似度。10批样品的相似度均在0.982~1之间,表明10批样品具有较好的相似度,结果样品匹配后的色谱图见图2和表1。

3 讨论

3.1 氨基酸测定方法的选择 氨基酸的液相色谱分析法主要有柱前衍生法和柱后衍生法^[9-10]。柱后衍生是以茚三酮作为衍生试剂的离子交换色谱法,需专门的仪器,分析时间也较长。柱前衍生反相高效液相色谱法具有快速灵敏,不需专用仪器等优

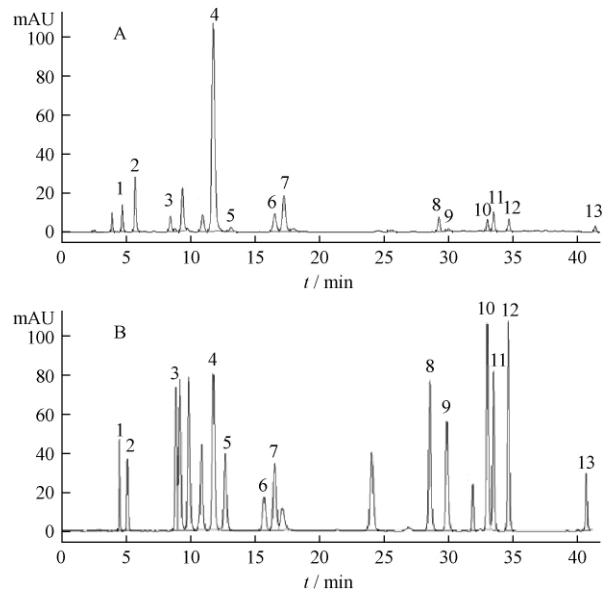


图1 牦牛皮胶的HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of yak collagen

A. 供试品 B. 标准品 1. 天冬氨酸 2. 谷氨酸 3. 丝氨酸 4. 甘氨酸 5. 苏氨酸 6. 脯氨酸 7. 丙氨酸 8. 缬氨酸 9. 甲硫氨酸 10. 异亮氨酸 11. 亮氨酸 12. 苯丙氨酸 13. 赖氨酸

A. samples B. standards 1. Asp 2. Glu 3. Ser 4. Gly 5. Thr 6. Arg 7. Ala 8. Val 9. Met 10. Ile 11. Leu 12. Phe 13. Lys

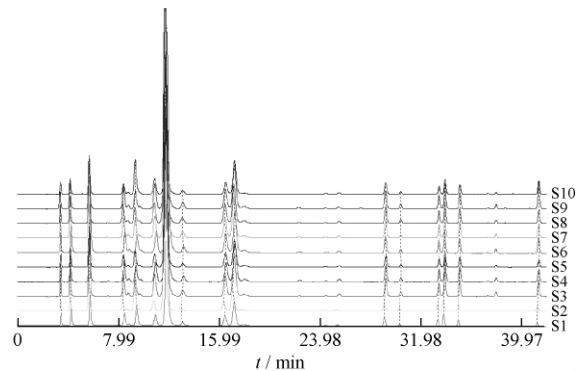


图2 10批牦牛皮胶样品指纹图谱

Fig.2 HPLC fingerprint chromatogram for ten batches of samples

点^[11]。2,4-二硝基氯苯是常用的柱后衍生试剂,具有价廉易得、理化性质稳定、制备试样方便、过量的2,4-二硝基氯苯对测定无干扰等特点。因此本实验采用此种方法进行氨基酸测定^[12]。

3.2 参照峰的选择 经HPLC 色谱图比较,在13个共有峰中,甘氨酸的峰面积最大,约占总峰面积的52%,比较稳定,而且与相邻峰分离度较好,出峰位置适中,故选为参照峰。

表 1
Tab. 1
10 批牦牛皮胶样品的相似度结果
Similarity evaluation results for ten batches of samples

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1.000	0.991	0.997	0.997	0.998	0.997	0.997	0.997	0.996	0.996	0.997
S2	0.991	1.000	0.983	0.984	0.987	0.983	0.984	0.983	0.982	0.990	0.984
S3	0.997	0.983	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000	0.999	0.989	1.000
S4	0.997	0.984	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	0.989	1.000
S5	0.998	0.987	0.999	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	0.998	0.991	1.000
S6	0.997	0.983	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000	0.999	0.990	1.000
S7	0.997	0.984	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	0.990	1.000
S8	0.997	0.983	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	0.989	1.000
S9	0.996	0.982	0.999	0.999	0.998	0.999	0.999	0.999	1.000	0.991	0.999
S10	0.996	0.990	0.989	0.989	0.991	0.990	0.990	0.989	0.991	1.000	0.990
对照指纹图谱	0.997	0.984	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	0.990	1.000

3.3 本实验共测定出 17 种氨基酸,由于其他 4 种氨基酸的含有量很少,指纹图谱软件未分析出其共有峰。

3.4 指纹图谱的评价 对供试的 10 个不同生产批次的牦牛皮胶样品的氨基酸进行了指纹图谱分析,发现 10 批样品的指纹图谱中主要峰群的整体图貌基本一致;相似度计算结果表明,10 批样品指纹图谱相似度均在 98% 以上。不同批次的样品指纹图谱相对保留时间也有很好的相似性,但是共有峰的相对峰面积有所差别,可能与牦牛的生长环境、牦牛个体生长发育情况有关,也可能与工业生产中牦牛皮的取样部位差异有关。

3.5 本实验采用衍生化反相高效液相法,建立了牦牛皮胶氨基酸的指纹图谱分析方法,结果表明本方法稳定,可靠,重复性好,可为其质量的全面控制提供参考。

参考文献:

[1] 赵文静,刚宏林. 胶类动物药的临床与现代研究[J]. 中医药信息 2004 21(3): 27-28.
[2] 忻家础. 动物胶药分类及临床应用[J]. 时珍国药研究,

1996 7(3): 181-182.

[3] 党合群,杨黎彬,孙青惠. 牦牛皮胶对人体营养性贫血的改善作用[J]. 医药世界 2005(10): 76-77.
[4] 宁春兰,陈来同. 牦犀皮胶改善缺铁性贫血的研究[J]. 中国生化药物杂志 2006 27(2): 107-109.
[5] 朱潘炜,刘东红,黄伟. 指纹图谱技术在食品品质检测中的应用[J]. 粮油加工 2008 39(6): 125-128.
[6] 闫克玉,王光耀,许志杰. 指纹图谱技术在烟草行业中的应用研究进展[J]. 郑州轻工业学院学报:自然科学版,2008,23(1): 6-10.
[7] 郑岩,汤庆莉,吴天祥,等. GC-MS 法建立贵州茅台酒指纹图谱的研究[J]. 中国酿造 2008 28(5): 74-76.
[8] 苗爱东,孙殿甲. Excel 2002 在中药指纹图谱相似度计算中的应用[J]. 药学进展 2003 27(1): 52-54.
[9] 朱曙东,赵昇皓. 氨基酸的高效液相色谱分析[J]. 色谱,1994,12(1): 20-24.
[10] Rfeifer R, Karol R, Burgoyne R, et al. Application of HPLC to amino acid analysis[J]. Ame Lab, 1983, 15(3): 77-78.
[11] 于泓,牟世芬. 氨基酸分析方法的研究进展[J]. 分析化学 2005 33(3): 398-404.
[12] 李芳,史霄燕. 2,4-二硝基氯苯衍生化法在反相高效液相色谱测定氨基酸中的应用研究[J]. 色谱,1995,13(3): 200-202.