

## 青藏高原九种动物角的氨基酸 成分及含量的分析\*

纪兰菊

(中国科学院西北高原生物研究所)

本文通过对青藏高原9种动物角和犀牛 (*Rhinoceros unicornis*) 角氨基酸成分和含量的分析, 根据牦牛 (*Bos grunniens*) 角与犀牛角中的蛋白质水解产物——氨基酸成分相近似, 提出用牦牛角代替犀牛角作为药用的可能性。分析结果还表明, 一些高原动物的角中, 苏氨酸 (threonine) 和丝氨酸 (serine) 的含量均比犀牛角高。

犀牛角系我国传统珍贵药材之一, 具有清热凉血, 解毒定惊等功能, 用于治疗热病痉挛、麻风及腹胸内脓肿等病症(青海省生物研究所等, 1975), 这在《本草纲目》中早有记载。但因其产地主要分布于印度、尼泊尔等热带地区, 现已濒于灭绝, 所以药源奇缺。为了开发药物资源, 本文对青藏高原上9种动物角: 牦牛 (*Bos grunniens*)、藏羚 (*Patholops hodgsoni*)、藏原羚 (*Procapra picticaudate*)、普氏原羚 (*Pracapra przewalskii*)、鹅喉羚 (*Gazella subgutturosa*)、斑羚 (*Naemohedus goral*)、苏门羚 (*Capricornis sumatraensis*)、岩羊 (*Pseudois nayaur*)、盘羊 (*Ovis ammon*) 进行了氨基酸成分及含量的分析, 根据与犀牛角中, 蛋白质水解产物——氨基酸成分和含量的对照, 试图找出犀牛角的代替品。

氨基酸是蛋白质组成的基本结构单位, 自从1820年 Braconnot 从 Gelatin 的水解产物中分离到世界上第一个氨基酸——甘氨酸 (glycine) (G. R. Tristram, 1981) 以来, 一直都是生物化学家所感兴趣的研究之一, 1958年, Stanford Moore 和 Darryl Spackman, 利用阳离子交换色谱柱和不断变化 pH 值的洗脱剂, 使氨基酸的混合样品得到分离, 然后与茚三酮 (ninhydrin) 反应, 成为有光吸收物质而被检出。近30年来, 许多色谱学家, 通过对色谱条件的研究, 实现了氨基酸成分自动分析的高速、高精度、高灵敏度。随着50年代分子生物学的兴起, 氨基酸分析广泛用于各种蛋白质的水解产物, 谷物种子、药用植物、食品与饲料、动物组织、血液等分析。并将某种氨基酸含量做为评价指标。如衡量谷物的营养价值, 以人类必需氨基酸的含量, 尤其是以赖氨酸 (lysine) 的含量来评价的 (吴兆苏等, 1976)。许多药材, 也用氨基酸的成分和含量, 来评价其药用价值 (郑毅男, 1985)。植物, 则将脯氨酸 (proline) 的含量作为抗逆性 (即抗寒、抗盐碱、抗旱、抗紫外辐射等) 最敏感的生理指标 (Ievitt, 1980)。并且, 对已纯化的蛋白质, 可提供

\* 分析所用样品, 由蔡桂全、高志强先生提供, 特此致谢。

氨基酸成分及含量的比例,为生物体中蛋白质的进一步研究,提供数据。

## 一、方 法

### (一) 仪器与试剂

仪器: 沃特斯液相色谱仪。

试剂: 氨基酸标准样品为日本进口混合试剂,硼酸、硝酸为国产优级纯试剂,其余均为国产分析纯试剂,水为重蒸水。

### (二) 样品的制备及分析条件

1. 水解: 取干燥(室温凉干)试料 50 毫克,研细,置 5 毫升安培瓶中,加 5 毫升 6 摩尔盐酸,充氮气 5 分钟,立即熔封,在  $110^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  条件下放置 24 小时,然后用 6 摩尔的氢氧化钠调 pH 值到 2.2—2.5,定容 25 毫升,放置 4 小时后,用 0.45 微米滤膜滤过,取滤液 1 毫升,待上样品处理小柱-sep-pak。

2. 处理: 取 sep-pak 小柱,先用 10 毫升甲醇活化,再用 20 毫升水分 2 次清洗,然后,取 10 毫升 0.1% 的三氟醋酸溶液冲洗,再用 10 毫升 0.1% 三氟醋酸甲醇 (8:2) 溶液冲洗。取 1 毫升样品滤液和 2 毫升 0.1% 三氟醋酸甲醇 (7:3) 溶液混合,通过 sep-pak 小柱,弃去最先流出的 1 毫升,接收后面的 2 毫升待上机分析。该过程用于处理样品中残留蛋白质、脂肪、色素、重金属等成分,对氨基酸成分,无吸附作用 (Pfeifer 等, 1983)。

#### 3. 色谱条件:

色谱柱: 阳离子交换树脂柱 4 毫米  $\times$  300 毫米。

洗脱剂: A、B 缓冲液(配方在后)。

线性梯度洗脱: 0—48 分钟;由 100% A  $\rightarrow$  100% B, 48—75 分钟; 100% B, 75—76 分钟;由 100% B  $\rightarrow$  100% A。

流速: 0.4 毫升/分。反应温度:  $62^{\circ}\text{C}$ 。

反应液 A、B 流速: 0.4 毫升/分。柱压: 600—700 磅

运行时间: 90 分钟。检测器: 荧光 Ex $\lambda$  338 毫微米, Em $\lambda$  425 毫微米,检测线性范围: 1—2 微摩尔。

纸速: 0.25 厘米/分。

(色谱图见图 2)

#### 4. 试剂的配制:

洗脱剂 A: 称取 19.6 克柠檬酸三钠和 1 克苯酚,用硝酸配制成 pH 值为 3.08 的 1 升溶液。

洗脱剂 B: 称取 1.5 克硼酸和 21.0 克硝酸钠,用 6N 氢氧化钠配制成 pH 值为 9.78 的 1 升溶液。

反应液 A: 取 2 毫升 5% 次氯酸钠,溶于 1 升硼酸钾保存液中。

反应液 B: 称取 700 毫克邻苯二甲醛及 2 毫升 2-巯基乙醇,加 10 毫升甲醇混合,溶于 1 升硼酸钾保存液中。

硼酸钾保存液: 取 123.6 克硼酸和 105 克氢氧化钾,配制成 pH 值为 10.4 的 4 升溶液。

## 二、结果和讨论

1. 本文采用保留时间定性、外标峰面积法定量来分析氨基酸成分及含量, 因此, 对 17 种氨基酸测试的重复性和精确度进行了分析 (表 1)。

表 1 氨基酸测试的重复性和精确度

Table 1 Reproducibility and accuracy in analysis of amino acids

氨基酸名称 Name of amino acids	保留时间 Retention time			峰面积 Peak area		
	$\bar{X}$ N = 15	标准偏差 S. D	相对偏差 R. S. D%	$\bar{X}$ N = 15	标准偏差 S. D	相对偏差 R. S. D%
天冬氨酸 Asp	21.84	0.368	1.69	1.536	0.070	4.56
苏氨酸 Thr	26.30	0.579	2.20	2.259	0.078	3.44
丝氨酸 Ser	27.57	0.439	1.59	1.448	0.061	4.20
谷氨酸 Glu	33.41	0.415	1.24	1.571	0.069	4.40
脯氨酸 Pro	36.73	0.389	1.06	7.203	0.184	2.55
甘氨酸 Gly	41.93	0.289	0.69	1.859	0.051	2.73
丙氨酸 Ala	44.01	0.220	0.50	1.134	0.034	2.98
胱氨酸 Cys	46.51	0.055	0.12	4.630	0.112	2.42
缬氨酸 Val	48.63	0.034	0.07	1.509	0.045	2.97
蛋氨酸 Met	50.64	0.100	0.20	1.130	0.050	4.45
异亮氨酸 Ile	52.20	0.128	0.24	1.461	0.034	2.31
亮氨酸 Leu	52.79	0.130	0.25	9.430	0.250	2.65
酪氨酸 Tyr	55.58	0.120	0.22	9.516	0.266	2.79
苯丙氨酸 Phe	56.83	0.112	0.20	1.146	0.032	2.83
组氨酸 His	58.27	0.151	0.26	0.940	0.075	8.03
赖氨酸 Lys	69.52	0.085	0.12	1.155	0.072	6.28
精氨酸 Arg	85.01	0.290	0.34	4.979	0.177	3.56

表 1 数据表明, 仪器测试的重复性和精确度的标准误差在 0.032—0.579 之间, 可以用于生物样品的测定。组氨酸 (Histidine) 与赖氨酸峰面积的相对标准偏差较大, 可能是与这两个氨基酸和荧光物质结合的强度及仪器的积分程序有关。

2. 10 种动物角的氨基酸分析结果见表 2。

表 2 中的 % 是指每一个氨基酸在整个样品的重量百分数。总和为总氨基酸的参考量不包括色氨酸的含量与其他物质如磷酸钙、碳酸钙等。

为了便于比较, 将 8 种有药用价值的动物角 (盘羊、岩羊除外) (中国药用动物志协作组主编, 1979) 中, 人类必需氨基酸 (除色氨酸 Tryptophan) 的含量分布以柱状图表示 (图 1)。

从图 1 可明显看出, 犀牛角和牦牛角中所含 7 种人类必需氨基酸含量, 除色氨酸以外, 其余都非常接近。

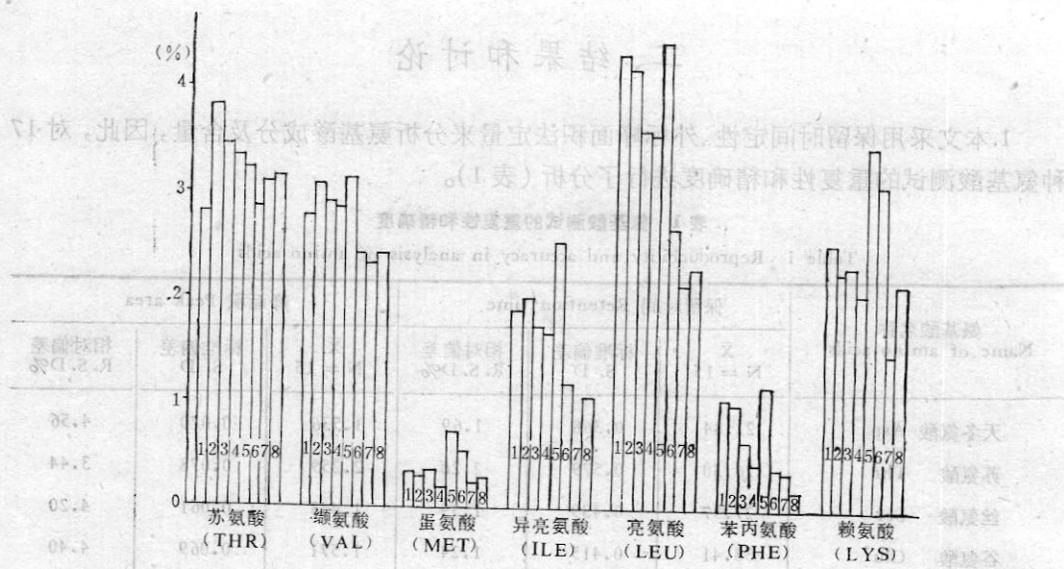


图1 7种氨基酸的含量分布

Fig. 1 Distribution of the contents of seven amino acids.

1. 犀牛 *Rhinoceros unicornis*;
2. 牦牛 *Bos grunniens*;
3. 鹅喉羚 *Gazella subgutturosa*;
4. 藏羚 *Patholops hodgsoni*;
5. 普氏原羚 *Pracapra przewalskii*;
6. 斑羚 *Naemiohedus goral*;
7. 苏门羚 *Capricornis sumatraensis*;
8. 藏原羚 *Procacra picticaudate*

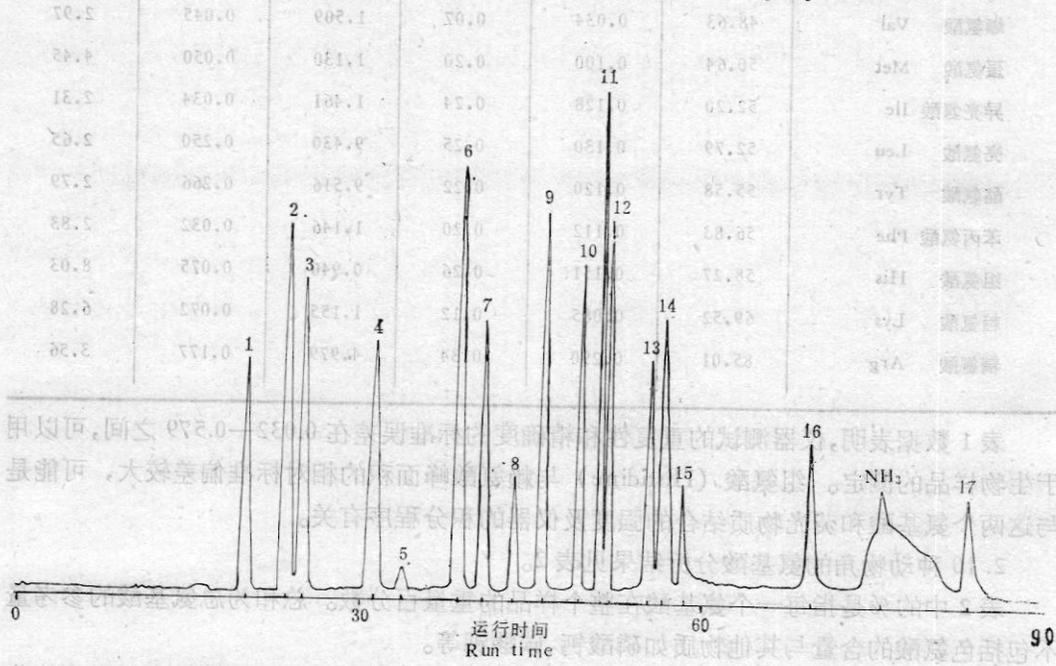


图2 氨基酸分析色谱图

Fig. 2 Analytical chromatogram of amino acids

1. 天冬氨酸 Asp;
2. 苏氨酸 Thr;
3. 丝氨酸 Ser;
4. 谷氨酸 Glu;
5. 脯氨酸 Pro;
6. 甘氨酸 Gly;
7. 丙氨酸 Ala;
8. 胱氨酸 Cys;
9. 缬氨酸 Val;
10. 蛋氨酸 Met;
11. 异亮氨酸 Ile;
12. 亮氨酸 Leu;
13. 酪氨酸 Tyr;
14. 苯丙氨酸 Phe;
15. 组氨酸 His;
16. 赖氨酸 Lys;
17. 精氨酸 Arg

表2 十种动物角的氨基酸成分及含量(%)  
Table 2 Amino acids contents of ten species of animal horns

动物 Animal	犀牛 <i>Rhinoceros unicornis</i>	牦牛 <i>Bos grunniens</i>	鹅喉羚 <i>Gazella subgutturosa</i>	藏羚 <i>Patholops hodgsoni</i>	普氏原羚 <i>Pracapra przewalskii</i>	斑羚 <i>Naemorhedus goral</i>	苏门羚 <i>Capricornis sumatranaensis</i>	藏原羚 <i>Procapra peticicaudate</i>	盘羊 <i>Ovis ammon</i>	岩羊 <i>Pseudois nayaur</i>
天冬氨酸 Asp	5.52	5.70	5.24	3.47	6.40	5.90	4.25	4.63	5.47	4.93
苏氨酸 Thr	2.80	3.80	3.44	3.28	3.22	2.85	3.12	3.16	3.49	3.22
丝氨酸 Ser	4.12	5.14	4.86	4.26	5.67	6.15	4.45	4.29	5.07	4.79
谷氨酸 Glu	9.49	9.70	9.41	9.70	11.06	9.71	7.80	8.80	9.81	8.82
脯氨酸 Pro	2.46	3.44	2.96	2.68	1.80	1.29	2.87	2.67	2.80	2.49
甘氨酸 Gly	2.91	3.25	2.77	2.24	4.26	5.70	2.90	2.05	2.63	2.65
丙氨酸 Ala	2.88	2.46	2.54	2.67	3.06	2.47	2.06	2.34	2.62	2.45
胱氨酸 Cys	1.31	2.73	2.35	1.79	1.28	0.75	2.43	1.94	2.22	1.95
缬氨酸 Val	2.75	3.08	2.90	2.87	3.11	2.41	2.31	2.41	3.05	2.77
蛋氨酸 Met	0.33	0.30	0.33	0.17	0.71	0.54	0.25	0.26	0.29	0.20
异亮氨酸 Ile	1.89	2.00	1.71	1.69	2.53	1.17	1.02	1.06	1.65	1.43
亮氨酸 Leu	4.33	4.19	3.59	3.58	4.47	2.69	2.11	2.30	3.85	3.22
酪氨酸 Tyr	2.17	3.12	1.82	1.00	2.09	1.22	1.13	0.61	1.66	1.49
苯丙氨酸 Phe	1.04	1.01	0.62	0.43	1.19	0.37	0.30	0.19	0.81	0.57
组氨酸 His	0.50	0.32	0.32	0.65	0.82	0.63	1.00	1.16	0.07	0.52
赖氨酸 Lys	2.55	2.29	2.34	2.06	3.48	3.13	1.50	2.15	2.37	1.99
精氨酸 Arg	6.15	6.25	6.27	4.62	6.21	4.64	5.27	3.41	6.24	4.91

注: %系每一个氨基酸占分析样品的重量百分数

Note: % showing each amino acid is of the weigh of percent of the analytical sample.

### 三、小 结

1. 建议用水牛角代替犀牛角作为药用早已有报道(中国医学科学院药物研究所主编, 1961), 藏族人民也有用牦牛角和羚羊角治病的历史。从中医的观点来看, 这些角的用途有相近之处, 大都具有清热解毒, 平肝息风之功能; 从组成来看, 动物角是由角蛋白和磷酸钙、碳酸钙等矿物质组成, 它们的水解产物——氨基酸的成分和含量, 对其角蛋白的组成有着一定的参考价值。青藏高原9种动物角的氨基酸成分和含量, 从表2中可知, 犀牛角与牦牛角, 鹅喉羚角、藏羚角、斑羚角等, 主要化学成分——角蛋白中氨基酸成分和含量比较接近, 为人药提供了依据。尤其是除色氨酸之外的7种人体必需氨基酸(图1), 牦牛角

与犀牛角更为接近,因此,用牦牛角代替犀牛角做为药用,似有可能,但牦牛角在药理与临床方面的作用,还需进一步的工作。

2. 酸性氨基酸中,苏氨酸与丝氨酸的化学结构近似,仅相差1个次甲基,其物理性质与化学性质也近似,都是脂肪族氨基酸,从表2中可以看出,犀牛角中,这两种氨基酸含量,均比生活在高寒地区动物角中的低,这固然是物种的不同,也可能与生态环境因子有关。

### 参 考 文 献

- 中国医学科学院药物研究所主编,1961,中药志(四),132—137,人民卫生出版社。  
中国药用动物志协作组主编,1979,中国药用动物志(一),303—307,天津科技出版社。  
青海省生物研究所,同仁县隆务卫生所编,1975,青藏高原药物图鉴(三),131—132,青海人民出版社。  
吴兆苏、周之杭,1976,国外小麦蛋白质遗传育种研究的进展。国外农业科技资料,3: 1—7。  
郑毅男,1985,白花桔梗与紫花桔梗中氨基酸成分的比较。中药材,2: 24。  
Tristram, G. R. and J. M. Rattenbury, 1981, The Development of amino acids analysis. Amino Acids Analysis 17—35. Ellishorwood Publishers.  
Levitt, J., 1980, Responses of Plants to Environmental Stresses. Academic Press, N., Y., No. 1, 183—184。  
Pfeifer, R., R. Karol, J. Korpi, R. Burgoyne and D. McCourt, 1983, HPLC to amino acids analysis. American Laboratory 3: 77。

## ANALYSIS OF THE COMPOSITION AND CONTENT OF AMINO ACIDS IN THE HORNS OF NINE ANIMAL SPECIES ON QINGHAI-XIZANG PLATEAU

Ji Lanju

(Northwest Plateau Institute of Biology, Academia Sinica)

This paper discusses the analysis of amino acids on HPLC with cation exchange and post-column fluorescence detection for protein's hydrolytic products of the horns of nine species of animals living on Qinghai-Xizang plateau and the horn of *Rhinoceros unicornis* living in the tropical zone.

The experimental results are as follows:

1. The composition and content of the major amino acids in *Bos grunniens* horn is approximate to that of *Rhinoceros unicornis*. We suggest that it may be used as a replacement in medication.

2. The quantity of the Threonine and Serine in all proteins of animal horns on Qinghai-Xizang plateau is higher than those of *Rhinoceros unicornis* living in the tropical zone. The reason for this is, of course of species characteristics, but enviromental difference may take roles partly also.