

· 化学与分析 ·

鹿角胶中氨基酸类成分的 HPLC 指纹图谱

周芳妍, 李婷, 刘力*, 徐德生
(上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021)

[摘要] 目的:建立鹿角胶氨基酸类成分的高效液相色谱指纹图谱。方法:采用异硫氰酸苯酯(PITC)柱前衍生法建立高效液相指纹图谱,梯度洗脱进行分离,选用 Diamonsil C₁₈(2)(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱,流动相为乙腈-醋酸钠缓冲液(pH 6.5),检测波长 254 nm,柱温 43 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹。结果:共指认 13 个共有峰,10 批样品具有较高的相似度,其液相色谱指纹图谱可反映鹿角胶所含的 18 种氨基酸成分。结论:该方法稳定可靠,可为鹿角胶中氨基酸成分质量的全面控制提供依据。

[关键词] 鹿角胶; 氨基酸; 指纹图谱
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)09-0047-05
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014090047
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000069.html>
[网络出版时间] 2014-02-25 13:50

HPLC Fingerprints of Amino Acids Constituents
in Cervil Cornus Colla

ZHOU Fang-yan, LI Ting, LIU Li*, XU De-sheng
(Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China)

[Abstract] Objective: To establish a method of fingerprint analysis of the amino acids on Cervil Cornus Colla by HPLC. Method: Cervil Cornus Colla was derivated by Phenyl isothiocyanate (PITC). The Chromatographic fingerprints were obtained by the Diamonsil C₁₈(2) column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with the gradient elution solvent system composed of acetoniitrie-natrium aceticum buffer solution (pH 6.5). The detective wavelength was set at 254 nm, the flow rate was 1 mL·min⁻¹ and the column temperature was maintained at 43 ℃. Result: The result showed that the amino acids constituents had a high similarity. 18 kinds of amino acids in Cervil Cornus Colla were detected, of which 13 peaks were identified in common peaks. Conclusion: The method has good reproducibility and stability, and could be used for the research and the quality control of Cervil Cornus Colla.

[Key words] Cervil Cornus Colla; amino acids; fingerprints

鹿角胶是鹿科动物马鹿(*Cervus elaphus* linnaeus)或梅花鹿(*Cervus nippon* Temminck)已骨化的角或锯茸后脱落的角基经水煎煮、浓缩制成的固体胶,具有温补肝肾、益精养血的功效,用于肝肾不足所致的腰膝酸冷、阳痿遗精、虚劳羸瘦、崩漏下血、便血尿血、阴疽肿痛^[1]。《中国药典》(2010年版)对其质控方法包括甘氨酸薄层色谱鉴别及测定总氮含量。由于胶类药材富含蛋白质及多种氨基酸等成

[收稿日期] 20131022(026)
[基金项目] 国家“十一五”重大新药创制专项(2010ZX09102-208)
[第一作者] 周芳妍, 硕士, 从事中药新药和剂型研究, Tel: 021-53827661, E-mail: zhoufy44@163.com
[通讯作者] * 刘力, 主任药师, 博导, 从事中药新药和剂型研究, Tel: 021-53827660, E-mail: liuli2750@hotmail.com

分,且临床应用效果较佳^[2]。针对某一种氨基酸或测定总氮量不足以控制其质量,故本实验选取了 10 个不同生产批次的鹿角胶样品,利用柱前衍生化的方法,建立其氨基酸成分的高效液相指纹图谱,为鹿角胶中氨基酸成分质量的全面控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器 TG332A 型微量分析天平(上海精密科学仪器有限公司),FA2004 型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司),CQX25-06 型超声波清洗器(上海必能信超声有限公司),Agilent 1100 型高效液相色谱仪及色谱工作站,PHS-3c 型精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司),数显式电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械有限公司),DHG-9140A 型电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司),RE-52 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 试药 十八种氨基酸对照品(批号 140624-200805):谷氨酸(Glu)、天门冬氨酸(Asp)、精氨酸(Arg)、甘氨酸(Gly)、甲硫氨酸(Met)、酪氨酸(Tyr)、亮氨酸(Leu)、苏氨酸(Thr)、丝氨酸(Ser)、缬氨酸(Val)、盐酸赖氨酸(Lys)、苯丙氨酸(Phe)、色氨酸(Trp)、丙氨酸(Ala)、脯氨酸(Pro)、异亮氨酸(Ile)、组氨酸(His)、胱氨酸(Cys-Cys)购自中国药品生物制品检定所;*L*-羟脯氨酸(*L*-Hydroxyproline)(批号 20121205,购自上海金穗生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$,异硫氰酸苯酯(PITC,批号 101190606,购自 Sigma 公司,纯度 $\geq 99\%$),10 批鹿角胶样品(批号 20000324,20030212,20040102,080601,100805,100811,110903,110915,110512,20121101,均购自河南省四方药业集团有限公司)。

无水乙酸钠、盐酸、冰醋酸、三乙胺、正己烷、异丙醇均为分析纯(购自国药集团化学试剂有限公司),乙腈、甲醇均为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C_{18} (2) 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μ m),流动相采用乙腈(A)-0.1% 醋酸钠(冰醋酸调 pH 6.5)(B)梯度洗脱(0~5 min,3%~7% A;5~15 min,7%~12% A;15~18 min,12%~15% A;18~18.1 min,15%~17% A;18.1~33 min,17%~34% A;33~42 min,34%~66% A;42~47 min,66%~100% A;47~52 min,100% A),流速 1 mL $\cdot$ min⁻¹,检测波长 254 nm,柱温 43 $^{\circ}$ C,进样体积 5 μ L。

2.2 供试品溶液制备方法 取鹿角胶粉末 0.3 g,加入 25 mL 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ HCl,超声 30 min,吸取

2 mL,加入 2 mL 浓 HCl 共置安瓿中,150 $^{\circ}$ C 水解 1 h,放冷,用蒸馏水 30 mL 分次洗涤安瓿内液体于蒸发皿中,蒸干,以 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ HCl 洗涤蒸发皿,并定容于 25 mL。吸取 2 mL 上述溶液于 10 mL 量瓶中,加入 1 mL 异硫氰酸苯酯(PITC)溶液及 1 mL 三乙胺溶液,摇匀,室温衍生化 1 h,并以 10% 乙腈溶液定容至 10 mL,吸取 5 mL 溶液,加入正己烷 5 mL,萃取,分取下层溶液,重复萃取 1 次,分得下层溶液,过 0.45 μ m 微孔滤膜,即得。

2.3 空白供试品溶液的制备 吸取蒸馏水 2 mL 置 10 mL 量瓶中,加入 1 mL 异硫氰酸苯酯(PITC)溶液及 1 mL 三乙胺溶液,余下操作同 2.2 项,即得空白供试品溶液。

2.4 对照品溶液的制备 分别取各氨基酸对照品适量,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加蒸馏水至刻度,得氨基酸对照品溶液。对其进行衍生化,取各氨基酸对照品溶液 2 mL 置 10 mL 量瓶中,加入 1 mL 异硫氰酸苯酯(PITC)溶液及 1 mL 三乙胺溶液,余下操作同 2.2 项,即得氨基酸对照品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度 同一供试品溶液连续进样 5 次,共有峰相对保留时间 RSD $<0.37\%$,共有峰相对峰面积 RSD $<1.33\%$,表明进样和仪器精密度良好。

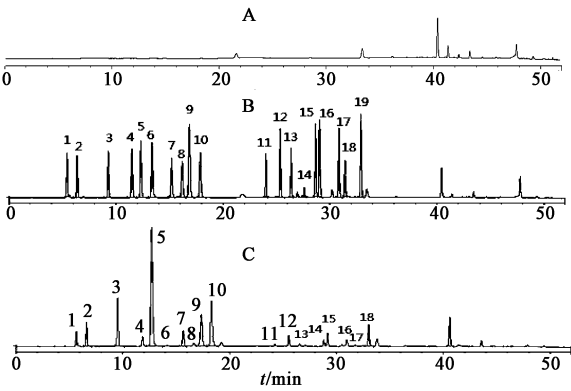
2.5.2 稳定性 同一供试品溶液分别在 0,4,8,12,24 h 进样,共有峰相对保留时间 RSD $<0.47\%$,共有峰相对峰面积 RSD $<2.38\%$,表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.5.3 重复性 制备同一批号的供试品溶液 5 份进样,共有峰相对保留时间 RSD $<1.37\%$,共有峰相对峰面积 RSD $<1.90\%$,表明方法重复性良好。

2.6 10 批鹿角胶药材指纹图谱的建立及其相似度评价

2.6.1 氨基酸成分的归属 取鹿角胶样品,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,另取空白供试品溶液、各氨基酸对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,结果显示空白供试品溶液在相应时间点未出峰,表明衍生化试剂对测定鹿角胶中氨基酸成分无干扰。19 种氨基酸在确定的色谱条件下,分离良好。鹿角胶供试品溶液色谱峰的氨基酸归属,可通过保留时间比对法,进行指认。共确定 18 个氨基酸。结果见图 1。

2.6.2 供试品溶液的测定 在确定的色谱条件及供试品溶液制备方法下,测定 10 批鹿角胶药材(20000324,20030212,20040102,080601,100805,



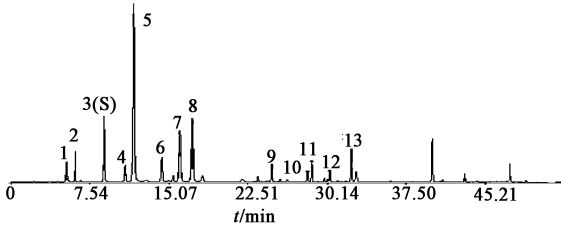
A. 空白样品;B. 对照品;C. 供试品

1. 门冬氨酸;2. 谷氨酸;3. 羟脯氨酸;4. 丝氨酸;5. 甘氨酸;
6. 组氨酸;7. 精氨酸;8. 苏氨酸;9. 丙氨酸;10. 脯氨酸;
11. 酪氨酸;12. 缬氨酸;13. 甲硫氨酸;14. 异亮氨酸;
15. 亮氨酸;16. 苯丙氨酸;17. 色氨酸;18. 赖氨酸

图 1 鹿角胶中氨基酸类成分的 HPLC

100811,110903,110915,110512,20121101),记录图谱。对 10 批供试品结果进行分析,建立对照指纹图谱(图 2),确定了 13 个共有峰。将 3 号峰(羟脯氨

酸)定为参照峰,其保留时间及峰面积计为 1,计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积,结果见表 1、2。10 批供试品叠加指纹图谱见图 3。



1. 门冬氨酸;2. 谷氨酸;3. 羟脯氨酸;4. 丝氨酸;5. 甘氨酸;
6. 精氨酸;7. 丙氨酸;8. 脯氨酸;9. 缬氨酸;10. 异亮氨酸;
11. 亮氨酸;12. 苯丙氨酸;13. 赖氨酸

图 2 鹿角胶中氨基酸对照指纹图谱

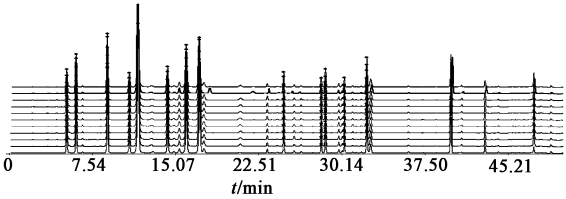


图 3 10 批供试品叠加指纹图谱

表 1 10 批样品共有峰的相对保留时间

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	平均数	RSD/%
1	0.584 8	0.583 9	0.585 9	0.584 4	0.585 4	0.586 6	0.587 0	0.585 1	0.584 5	0.599 0	0.586 7	0.76
2	0.681 5	0.679 6	0.680 9	0.680 4	0.680 0	0.682 2	0.681 2	0.681 2	0.679 4	0.694 1	0.682 0	0.64
3(S)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
4	1.224 2	1.223 2	1.224 3	1.224 6	1.222 5	1.222 1	1.223 4	1.223 7	1.216 3	1.216 3	1.222 1	0.26
5	1.312 7	1.311 9	1.312 7	1.313 4	1.310 8	1.310 7	1.313 0	1.312 7	1.312 8	1.300 7	1.311 1	0.29
6	1.617 6	1.619 4	1.618 6	1.619 6	1.616 6	1.615 4	1.621 0	1.620 4	1.617 2	1.560 4	1.612 6	1.14
7	1.806 8	1.807 8	1.808 1	1.809 1	1.806 0	1.804 5	1.809 7	1.810 9	1.807 0	1.753 0	1.802 3	0.97
8	1.941 4	1.944 0	1.943 8	1.944 5	1.941 9	1.941 0	1.945 8	1.947 0	1.941 7	1.864 3	1.935 5	1.30
9	2.801 5	2.805 1	2.811 2	2.809 5	2.809 6	2.806 8	2.810 2	2.813 1	2.805 7	2.655 6	2.792 8	1.73
10	3.182 3	3.187 0	3.192 0	3.190 7	3.192 6	3.189 0	3.194 8	3.194 5	3.184 4	3.029 3	3.173 7	1.60
11	3.226 0	3.230 1	3.235 5	3.234 0	3.236 1	3.232 5	3.237 5	3.237 9	3.227 8	3.075 3	3.217 3	1.56
12	3.417 9	3.422 2	3.427 9	3.426 3	3.429 0	3.425 3	3.429 4	3.430 6	3.419 9	3.273 9	3.410 2	1.41
13	3.646 2	3.650 0	3.656 7	3.653 8	3.656 8	3.654 3	3.657 1	3.659 0	3.647 2	3.503 7	3.638 5	1.31

2.6.3 相似度分析 取 10 批次鹿角胶药材进行样品制备,按优化后确定的色谱条件分析。分析评价软件:中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)。具体相似度计算结果见表 3。

由相似度结果可以看出,10 批鹿角胶药材与对照指纹图谱的相似度均为 1.000%,相似度符合相关规定,表明各批鹿角胶药材含量相似,质量稳定。

3 结论

建立了鹿角胶中氨基酸成分指纹图谱,其精密度、稳定性、重复性符合中药指纹图谱相关技术参数要求。同时指认了 13 个共有峰,并对指纹图谱中各特征峰进行氨基酸定性鉴别,共鉴定 18 个氨基酸成分。对 10 批相同厂家不同批号的鹿角胶样品进行相似度评价,结果均为 1.000%,表明制剂中氨基酸成分稳定,此方法对于鹿角胶产品的质量控制在提供依据。

表 2 10 批样品共有峰的相对峰面积

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	平均数	RSD/%
1	0.298 3	0.352 3	0.352 9	0.364 9	0.344 1	0.352 6	0.356 4	0.351 6	0.355 0	0.351 5	0.348 0	5.23
2	0.535 4	0.604 7	0.619 9	0.660 5	0.599 4	0.636 2	0.638 1	0.630 0	0.636 8	0.627 3	0.618 8	5.51
3(S)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
4	0.289 0	0.294 5	0.297 3	0.312 6	0.293 2	0.322 5	0.323 0	0.319 9	0.322 9	0.317 4	0.309 2	4.54
5	3.425 2	3.381 0	3.402 5	3.474 4	3.401 0	3.415 3	3.440 7	3.410 1	3.440 1	3.427 3	3.421 7	0.76
6	0.456 6	0.486 8	0.478 2	0.494 9	0.477 0	0.474 2	0.490 3	0.484 7	0.490 9	0.484 0	0.481 8	2.28
7	1.122 9	1.129 8	1.163 3	1.197 3	1.141 5	1.151 2	1.165 4	1.155 7	1.165 8	1.146 4	1.153 9	1.83
8	1.325 1	1.252 7	1.283 8	1.314 3	1.268 1	1.281 9	1.294 2	1.288 9	1.306 1	1.368 9	1.298 4	2.52
9	0.257 3	0.242 3	0.253 7	0.269 6	0.236 6	0.262 6	0.267 9	0.265 0	0.267 7	0.247 3	0.257 0	4.54
10	0.163 4	0.153 5	0.159 4	0.172 6	0.147 1	0.159 0	0.160 7	0.159 7	0.161 5	0.151 1	0.158 8	4.44
11	0.317 3	0.290 9	0.305 6	0.332 1	0.281 3	0.316 0	0.321 5	0.318 7	0.322 7	0.297 0	0.310 3	5.18
12	0.143 6	0.135 1	0.140 6	0.149 5	0.132 1	0.144 5	0.146 5	0.145 5	0.147 1	0.138 3	0.142 3	3.96
13	0.513 2	0.514 9	0.513 9	0.532 5	0.512 6	0.502 5	0.526 7	0.521 8	0.531 5	0.497 3	0.516 7	2.25

表 3 10 批样品的相似度

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
S2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
S3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
S4	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
S5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
S6	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
S7	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000v	1.000	1.000	1.000
S8	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
S9	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
S10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
R	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

注：R 为对照指纹图谱。

4 讨论

本实验测定鹿角胶中氨基酸成分应用了柱前衍生化法^[3],目前衍生化方法主要有异硫氰酸苯酯(PITC)衍生法,邻苯二甲醛和 9-芴甲基氯甲酸酯(OPA-FMOC)衍生法^[4]、2, 4-二硝基氟苯(FDNB)衍生法^[5]和 6-氨基喹啉-*N*-羧基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯(AQC)衍生法^[6]。因异硫氰酸苯酯(PITC)在氨基酸衍生化测定中的优势,故选用其为衍生化试剂,PITC 与氨基酸在弱碱性条件(pH≈9.0)下反应生成噻唑啉酮苯胺衍生物,衍生物在反相柱上具有较强保留并在 254 nm 下具有明显吸收。该方法操作简便,产物较稳定。本实验发现衍生化试剂对色谱柱造成一定伤害,使其柱效下降^[7],装预柱可

减少衍生化试剂对色谱柱的损伤,延长使用寿命。

共有峰的确定以峰面积占总峰面积比例较大、且分离较好的峰为指标,虽然鹿角胶中氨基酸类成分指纹图谱共对 18 个氨基酸进行了归属,但是其中 5 个氨基酸所占比例极小,故将其剔除,最终共确定了 13 个共有峰。本实验建立的方法稳定可靠,可为鹿角胶中氨基酸成分质量的全面控制提供依据。

供试品衍生化方法筛选中,考察了苯酚、氮气对提取效果的影响,结果发现两者均未对氨基酸的提取有明显影响,故未将其加入水解过程,从而简化实验操作步骤,也同时分别考察了样品超声时间、水解时间及温度、浓缩方式、衍生化试剂加入量,以达到最佳提取条件。

藏药十味诃子丸的质量控制

张幸福*, 才毛, 骆桂法
(青海省食品药品检验所, 西宁 810016)

[摘要] 目的:建立藏药十味诃子丸的质量控制方法。方法:采用显微鉴别和薄层色谱法进行定性鉴别,采用 HPLC 法测定羟基红花黄色素 A 和没食子酸的含量。结果:通过显微可鉴别出红花和诃子;TLC 法可鉴别出诃子、红花、山矾叶、紫草茸、獐牙菜和藏茜草及其活性成分的特征斑点;羟基红花黄色素 A 回归方程为 $Y = 2.5263 \times 10^6 X - 1.1957 \times 10^4$ ($r = 0.9997$) 线性范围 0.013 6~0.271 7 μg ;没食子酸方程 $Y = 3.0529 \times 10^6 X - 9.392 \times 10^3$ ($r = 0.9997$),线性范围 0.157 9~0.947 5 μg ;平均回收率分别为 99.9%,99.1%;RSD 分别为 2.2%,1.6% ($n = 6$)。结论:建立的方法可全面控制十味诃子丸的质量,鉴别方法专属性强,定量方法准确,可有效控制该制剂的质量。

[关键词] 十味诃子丸;红花;诃子;紫草茸;藏茜草;獐牙菜;山矾叶;羟基红花黄色素 A;没食子酸

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)09-0051-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014090051

Quality Control of Tibetan Medicine Shiwei Hezi Pills

ZHANG Xing-fu*, CAI Mao, LUO Gui-fa
(Qinghai Institute for Food and Drug Control, Xi'ning 810016, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for quality control of Tibetan Medicine Shiwei Hezi Pills. **Method:** Traditional Tibetan medicine in prescription were identified by a series of Microstructure and TLC methods. Hydroxysafflor yellow A; gallic acid was determined by HPLC. The separation was performed on Phenomenex C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). **Result:** The linear range of Hdroxysafflor yellow A and gallic acid was within the range of 0.013 6-0.271 7 μg and 0.157 9-0.947 5 μg . The average recovery was 99.9% and 99.1%, the RSD was 2.2%. and 1.6%. **Conclusion:** The method can be applied to the quality control of Shiwei Hezi Pills.

[Key words] Shiwei Hezi pills; Carthami Flos; Chebulae Fructus; Lacc; Radix et Rhizome Rubiae; Zhangyacai; Folium sympiocos; hydroxysafflor yellow A; gallic acid

[收稿日期] 20130930(006)
[基金项目] 国家药品标准提高项目(民族药 414)
[通讯作者] * 张幸福,本科,副主任药师,从事中藏药材及成药的研究工作,Tel:0971-8215400,E-mail:happydrug@163.com

[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.

[2] 国家药典委员会.中国药典[S].北京:中国医药科技出版社,2010:302.

[3] 罗晓健,吴志鹏,黄璐琦,等.氨基酸的柱前衍生高效液相色谱分析在中草药研究中的应用[J].中草药,2005,36(4):630.

[4] 陆明,孙黛妮,汪杨,等.OPA-FMOC 联用柱前衍生化

法测定复方氨基酸注射液中氨基酸的含量[J].药物分析杂志,2010,30(12):2424.

[5] 武文,李卓明,苏冀彦,等.鹿茸柱前衍生化高效液相指纹图谱研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(9):58.

[6] 柯雪红,孙维广,姚江雄,等.夏桑菊颗粒氨基酸类成分指纹图谱的研究[J].中成药,2007,29(6):781.

[7] 唐涛.氨基酸柱前衍生化 HPLC 方法发展及应用[D].南京:南京理工大学,2006.

[责任编辑 顾雪竹]