

柱前衍生化-HPLC法测定市售3种胶类药材中L-羟脯氨酸和胶原蛋白的含量^Δ

王旭波^{1,2*},徐利丽²,郑洁²,李楠³,沈玉萍²,王智²,韦波²,杨欢^{2#}(1.常州工程职业技术学院制药与生物工程技术系,江苏常州 213164;2.江苏大学药学院,江苏镇江 212013;3.镇江市药品检验所,江苏镇江 212050)

中图分类号 R282 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)27-3824-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.27.22

摘要 目的:建立测定胶类药材中L-羟脯氨酸(L-Hyp)和胶原蛋白含量的方法,并比较对照药材与市售药材中两种成分的含量。方法:采用柱前衍生化法进行前处理,并采用高效液相色谱法测定样品中L-Hyp的含量:色谱柱为Kromasil C₁₈,流动相为[乙腈-0.1 mol/L醋酸钠缓冲液(pH 6.5, 7:93, V/V)]-[乙腈-水(4:1, V/V)](梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为254 nm,柱温为43 ℃,进样量为20 μL;再通过折算系数计算样品中胶原蛋白的含量。结果:L-Hyp检测质量浓度线性范围为2.5~40 μg/mL($r=0.999\ 9$);定量限为0.20 μg/mL,检测限为0.05 μg/mL;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<4.0%;加样回收率为96.03%~102.07%(RSD=2.20%, $n=9$)。28批市售药材中L-Hyp和胶原蛋白的含量有一定差异,其中13批市售阿胶药材与阿胶对照药材中两种成分的含量较为接近,而5批龟甲胶和7批鹿角胶药材中两种成分的含量高于其对照药材。结论:该方法准确、可靠,适用于测定胶类药材中L-Hyp和胶原蛋白的含量。

关键词 胶类药材;L-羟脯氨酸;胶原蛋白;含量测定;柱前衍生化;高效液相色谱法

Content Determination of L-Hyp and Collagen in 3 kinds of Gelatinous Chinese Medicines by Pre-column Derivatization-HPLC

WANG Xubo^{1,2}, XU Lili², ZHENG Jie², LI Nan³, SHEN Yuping², WANG Zhi², WEI Bo², YANG Huan²(1.Dept. of Pharmaceutical Technology and Biological Engineering, Changzhou Vocational Institute of Engineering Technology, Jiangsu Changzhou 213164, China; 2.School of Pharmacy, Jiangsu University, Jiangsu Zhenjiang 212013, China; 3. Zhenjiang Institute for Drug Control, Jiangsu Zhenjiang 212050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of L-Hyp and collagen in gelatinous medicinal material, and to compare the contents of two components in reference medicinal material and commercially available medicinal material. METHODS: Pre-column derivatization was adopted for pretreatment. The content of L-Hyp was determined by HPLC. The determination was performed on Kromasil C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1 mol/L sodium acetate buffer (pH 6.5, 7:93, V/V)-acetonitrile-water (4:1, V/V) (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 254 nm, and column temperature was set at 43 ℃. The sample size was 20 μL. The content of collagen was calculated by using convert coefficient. RESULTS: The linear range of L-Hyp were 2.5-40 μg/mL ($r=0.999\ 9$). LOQ was 0.20 μg/mL, and LOD was 0.05 μg/mL. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 4.0%. The recoveries were 96.03%-102.07% (RSD=2.20%, $n=9$). There was difference in the contents of L-Hyp and collagen among 28 batches of commercially available medicinal material. The contents of two components in 13 batches of commercially available Colla Corii Asini were relative close to reference medicinal material; 5 batches of Colla Carapacis et Plastris Testudinis and 7 batches of Cervi Cornus Colla were much higher than those of reference medicinal material. CONCLUSIONS: The method is accurate, reliable and suitable for the content determination of L-Hyp and collagen in gelatinous medicinal material.

KEYWORDS Gelatinous medicinal material; L-hydroxy proline; Collagen; Content determination; Pre-column derivation; HPLC

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81303174);江苏省大学生创新训练项目(No.201713102021H);常州工程职业技术学院级科研项目(No. 11130100116002)

* 讲师,硕士研究生。研究方向:药物分析。电话:0519-886332101。E-mail:8000000617@email.czie.edu.cn

通信作者:副教授,博士。研究方向:中药鉴定。电话:0511-88791564。E-mail:yanghuan1980@ujs.edu.cn

胶类药材应用历史悠久,据《周礼·考工记》记载,先秦时期已有“鹿胶青白、马胶赤白、牛胶火赤、鼠胶黑、鱼胶饴、犀胶黄”等描述,表明我国古代在胶类药材的应用上已具有多样化^[1]。该类药材富含多种氨基酸和胶原蛋白^[2-4],具有补血止血、滋阴润燥等功效,并以滋补强壮作

用突出而闻名于世^[5]。2015年版《中国药典》(一部)^[6]记载了阿胶、龟甲胶和鹿角胶3味胶类药材,并对其外观性状、鉴别方法、检测项目和含量限度等作了明确的规定。*L*-羟脯氨酸(*L*-Hyp)和胶原蛋白是胶类药材的指标性有效化学成分,近年来测定*L*-Hyp的方法主要包括分光光度法、氨基酸分析仪法、气相色谱/质谱法、柱前衍生化-高效液相色谱法(HPLC)和电泳法等^[7-8],而胶原蛋白的含量主要根据*L*-Hyp的含量乘以相应的折算系数而得到。然而目前尚未有同时测定阿胶、龟甲胶和鹿角胶3味胶类药材中上述两种成分含量的报道。鉴于此,本课题组综合考虑胶类药材的特性以及试验的简便性,采用柱前衍生化-HPLC法测定市售胶类药材中*L*-Hyp和胶原蛋白的含量,以期完善胶类中药的质量控制标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-10AVP型HPLC仪,包括SPD-10A紫外/可见光检测器(日本Shimadzu公司);N2000 SP1工作站(浙江大学智达信息工程有限公司);Milli-Q Advantage A10型超纯水仪(美国Millipore公司);AE240型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);KQ-500E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

L-Hyp对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111578-201602,纯度:>95%);乙腈为色谱纯,醋酸钠、盐酸、三乙胺、异硫氰酸苯酯均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

收集28批市售胶类药材及4批对照药材,置于干燥阴暗处保存,样品信息见表1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:[乙腈-0.1 mol/L醋酸钠缓冲液(pH 6.5, 7:93, V/V), (A)]-[乙腈-水(4:1, V/V), (B)],梯度洗脱(洗脱程序见表2);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:43 ℃;进样量:20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取*L*-Hyp对照品8.00 mg,置于100 mL量瓶中,加0.1 mol/L盐酸溶液溶解并定容,制成质量浓度为80.0 μg/mL的*L*-Hyp对照品贮备液。取上述对照品贮备液适量,置于10 mL量瓶中,加0.1 mol/L盐酸溶液定容,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 取药材样品粉末0.25 g,精密称定,置于25 mL量瓶中,加0.1 mol/L盐酸溶液20 mL,超声(功率:500 W,频率:40 kHz,下同)处理30 min,放冷至室温,加0.1 mol/L盐酸溶液定容,摇匀,即得供试品贮备液。精密量取上述供试品贮备液2.0 mL,置于5 mL安瓿中,加浓盐酸2 mL,于150 ℃下水解1 h,放冷至室温;

表1 样品信息

Tab 1 Information of samples

样品	批号	来源
阿胶药材1	20120506	厂家A
阿胶药材2	20120919	厂家B
阿胶药材3	20120902	厂家C
阿胶药材4	20120901	厂家D
阿胶药材5	20120922	厂家E
阿胶药材6	20120702	厂家F
阿胶药材7	20120902	厂家G
阿胶药材8	1104053	厂家H
阿胶药材9	20120712	厂家I
阿胶药材10	20120102	厂家J
阿胶药材11	110367	厂家K
阿胶药材12	110223	厂家K
阿胶药材13	0906118	厂家L
阿胶药材14	110402	厂家L
阿胶药材15	100905	厂家L
龟甲胶药材1	20100529	厂家M
龟甲胶药材2	20131018	厂家N
龟甲胶药材3	20150116	厂家N
龟甲胶药材4	20100702	厂家O
龟甲胶药材5	20120201	厂家P
龟甲胶药材6	130929	厂家Q
鹿角胶药材1	20121201	厂家R
鹿角胶药材2	20131112	厂家S
鹿角胶药材3	140331	厂家T
鹿角胶药材4	20100703	厂家U
鹿角胶药材5	20130508	厂家V
鹿角胶药材6	20121105	厂家V
鹿角胶药材7	20130710	厂家W
阿胶对照药材1	121274-200301	中国食品药品检定研究院
阿胶对照药材2	121274-201202	中国食品药品检定研究院
龟甲胶对照药材	121693-201301	中国食品药品检定研究院
鹿角胶对照药材	121694-201301	中国食品药品检定研究院

表2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution process

时间, mins	A, %	B, %
0~11	100→93	0→7
11~13.9	93→88	7→12
13.9~14	88→85	12→15
14~29	85→66	15→34
29~30	66→0	34→100

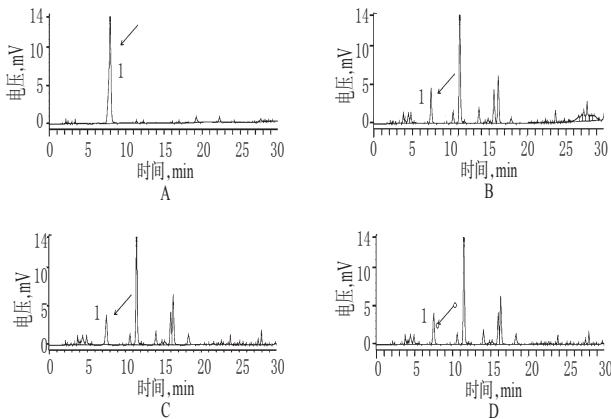
水解液转移至蒸发皿中,用10 mL双蒸水分次洗涤安瓿,洗液并入蒸发皿中,蒸干;残渣加0.1 mol/L盐酸溶液溶解,转移至25 mL量瓶中,再加0.1 mol/L盐酸溶液定容,摇匀,即得。

2.2.3 柱前衍生化 精密量取上述对照品溶液和供试品溶液各5 mL,分别置于25 mL量瓶中,各加含0.1 mol/L异硫氰酸苯酯的乙腈溶液2.5 mL、含1 mol/L三乙胺的乙腈溶液2.5 mL,摇匀,于室温下放置1 h;加50%乙腈溶液定容,摇匀;各取10 mL,加正己烷10 mL,摇匀,于室温下放置10 min,取下层溶液,滤过,取续滤液,即得。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图

1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以L-Hyp峰计为8 500,保留时间为7.5 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。



A. 对照品; B. 阿胶供试品; C. 龟甲胶供试品; D. 鹿角胶供试品; 1. L-Hyp
A. substance control; B. test sample of *Equus asinus*; C. test sample of *Colla Carapacis et Plastris Testudinis*; D. test sample of *Cervi Cornus Coua*; 1. L-Hyp

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

取“2.2.1”项下对照品贮备液适量,按“2.2.3”项下方法柱前衍生化后逐级稀释,制成L-Hyp质量浓度分别为40、20、10、5、2.5 μg/mL的系列对照品溶液。取上述系列对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以L-Hyp质量浓度(x , μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得L-Hyp回归方程为 $y=3\ 502.5x-2\ 168.3$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,L-Hyp检测质量浓度线性范围为2.5~40 μg/mL。

2.5 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.2.3”项下方法柱前衍生化后倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得LOQ为0.20 μg/mL;当信噪比为3:1时,得LOD为0.05 μg/mL。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.2.3”项下方法柱前衍生化后,按“2.1”项下色谱条件进样测定6次,记录峰面积。结果,L-Hyp峰面积的RSD=1.13%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20120506)适量,按“2.2.3”项下方法柱前衍生化后,分别于室温下放置0、2、4、8、16、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,L-Hyp峰面积的RSD=1.30%($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取阿胶(批号:20120506)、龟甲胶(批号:20100529)和鹿角胶(批号:20121201)药材样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液1~3,按“2.2.3”项下方法柱前

衍生化后,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,3个供试品溶液中L-Hyp峰面积的RSD分别为3.06%、1.98%、2.95%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的药材样品(批号:20120506)粉末适量,每份约125 mg,精密称定,分别加入低、中、高质量的L-Hyp对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.3”项下方法柱前衍生化后,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 3 Results of recovery tests($n=9$)

取样量, mg	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
125.2	12.08	6.04	17.95	97.19		
125.6	12.12	6.04	18.04	98.01		
124.9	12.05	6.04	18.19	101.66		
125.7	12.13	12.08	24.46	102.07		
125.3	12.09	12.08	24.02	98.76	99.20	2.20
125.1	12.07	12.08	24.37	101.82		
124.9	12.05	18.12	29.45	96.03		
125.0	12.06	18.12	30.04	99.23		
125.3	12.09	18.12	29.86	98.07		

2.10 样品含量测定

取32批药材样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.3”项下方法柱前衍生化后,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算L-Hyp含量。根据相关文献报道^[9-10],L-Hyp一般占胶原蛋白干重的14%左右,但随着组织来源、部位的不同而有所差异,如软骨中约占10%左右。目前,陆生动物常用7.1作为折算系数,水生和两栖动物则多采用11.1为折算系数^[10]。据此,本研究中阿胶、鹿角胶药材以7.1为折算系数,而龟甲胶药材以11.1为折算系数,结果见表4。

3 讨论

3.1 对结果的分析

根据2015年版《中国药典》(一部)规定^[6],按干燥品计算,阿胶中L-Hyp含量不得少于8.0%;龟甲胶中L-Hyp含量不得少于5.4%;鹿角胶中L-Hyp含量不得少于6.6%。在被检测的4批胶类对照药材以及28批市售胶类药材中,除阿胶药材3、4两个批次样品中L-Hyp含量未达到标准外,其余均符合药典中的含量测定要求。

本研究中,阿胶、龟甲胶和鹿角胶对照药材中L-Hyp的平均含量依次为9.11%、6.93%、8.06%,阿胶药材的L-Hyp含量最高;胶原蛋白的平均含量分别为64.65%、76.92%、57.23%,龟甲胶药材中胶原蛋白含量最高。28批市售药材中L-Hyp和胶原蛋白的含量有一定差异,其中有13批市售阿胶药材与对照品药材中两种成分的含量较为接近,而5批龟甲胶和7批鹿角胶药材中两种成分的含量高于其对照药材。

3.2 柱前衍生化-HPLC法适于测定胶类药材中氨基酸

表4 样品含量测定结果($n=3, \%$)Tab 4 Content determination of samples($n=3, \%$)

样品	批号	L-Hyp		胶原蛋白	
		含量	RSD	含量	RSD
阿胶药材1	20120506	9.04	3.15	64.18	3.15
阿胶药材2	20120919	8.73	1.14	61.98	1.14
阿胶药材3	20120902	5.21	0.80	36.99	0.80
阿胶药材4	20120901	5.16	1.78	36.64	1.78
阿胶药材5	20120922	9.14	2.27	64.89	2.27
阿胶药材6	20120702	9.29	2.33	65.96	2.33
阿胶药材7	20120902	9.82	2.37	69.72	2.37
阿胶药材8	1104053	9.40	0.76	66.74	0.76
阿胶药材9	20120712	9.91	2.58	70.36	2.58
阿胶药材10	20120102	10.05	3.52	71.36	3.52
阿胶药材11	110367	9.65	1.92	68.52	1.92
阿胶药材12	110223	10.41	0.74	73.91	0.74
阿胶药材13	0906118	10.27	0.01	72.92	0.01
阿胶药材14	110402	9.91	3.02	70.36	3.02
阿胶药材15	100905	9.68	0.24	68.73	0.24
阿胶对照药材1	121274-200301	9.52	1.72	67.59	1.72
阿胶对照药材2	121274-201202	8.69	1.24	61.70	1.24
龟甲胶药材1	20100529	9.30	2.74	103.23	2.74
龟甲胶药材2	20131018	9.29	3.07	103.12	3.07
龟甲胶药材3	20150116	6.28	1.98	69.71	1.98
龟甲胶药材4	20100702	7.95	2.79	88.25	2.79
龟甲胶药材5	20120201	9.68	1.14	107.45	1.14
龟甲胶药材6	130929	8.45	2.93	93.80	2.93
龟甲胶对照药材	121693-201301	6.93	1.11	76.92	1.11
鹿角胶药材1	20121201	10.53	1.83	74.76	1.83
鹿角胶药材2	20131112	9.71	3.51	68.94	3.51
鹿角胶药材3	140331	9.65	1.51	68.52	1.51
鹿角胶药材4	20100703	10.82	2.71	76.82	2.71
鹿角胶药材5	20130508	9.36	1.75	66.46	1.75
鹿角胶药材6	20121105	9.63	1.86	68.37	1.86
鹿角胶药材7	20130710	9.95	1.41	70.65	1.41
鹿角胶对照药材	121694-201301	8.06	1.27	57.23	1.27

的含量

从本文的色谱图以及精密度、稳定性、重复性、加样回收率等试验结果可见,本研究所建立方法是准确、可靠的。此外,值得注意的是,在分析时间内,除了L-Hyp的色谱峰之外,尚有余17个氨基酸衍生物的色谱峰,其中6个色谱峰的分度度欠佳,出现部分重叠。因而,在后续研究中,可以对流动相体系、梯度洗脱程序、柱温等条件进行适当优化,利用HPLC法实现胶类药材中更多氨基酸含量的准确测定。

3.3 部分龟甲胶药材中胶原蛋白含量偏高

龟甲胶是由两栖类动物乌龟 *Chinemys reevesii* (Gray) 的龟甲 (*Testudinis Carapax ET Plastrum*) 经水煎煮、浓缩制成的固体胶。研究中发现,龟甲胶对照药材的胶原蛋白平均含量为76.92%,而有3批龟甲胶药材中的胶原蛋白含量均>103%,远高于对照药材,有可能是由于这些产品为了达到药典对L-Hyp含量的要求,而人为添加了L-Hyp或者其他来源的胶原蛋白所致,但仍需进一步证实。

3.4 部分阿胶药材中胶原蛋白含量远低于对照药材

本研究测定了15批市售阿胶药材中的L-Hyp和胶原蛋白含量,结果表明这些产品有13批阿胶药材中L-Hyp和胶原蛋白的含量与2个批次的阿胶对照药材比较接近。然而,研究发现有2个批次阿胶药材中L-Hyp和胶原蛋白的含量远远低于对照药材和其他阿胶药材,这可能是由于生产过程中投料不足、生产工艺不规范等原因所致。

3.5 胶类药材的专属性鉴定研究亟待深入

到目前为止,中国食品药品检定研究院仅出品了2批阿胶、1批鹿角胶和1批龟甲胶对照药材,因而本研究中只分析了这4个批次的胶类对照药材中L-Hyp和胶原蛋白的含量。市售胶类药材的需求量大,市面上伪品和掺伪品较多,如猪皮胶和杂皮胶等,因而成为近年来鉴定研究的热点。2015年版《中国药典》(一部)中胶类药材的质量控制体系虽然愈发完善,但其专属性鉴定的研究基础仍然相对薄弱;因此,在后续研究中拟选择特异性高的目标分子和灵敏度高的分析技术,开展相应的基础研究并最终实现对胶类中药的准确鉴别。

综上所述,本方法准确、可靠,适用于测定胶类药材中L-Hyp和胶原蛋白的含量。

参考文献

- [1] 张振平.阿胶制备原料的历史演变及原因探析[J].中成药,1995,17(7):41-42.
- [2] Wang D, Ru W, Xu Y, et al. Chemical constituents and bioactivities of *Colla corii asini*[J]. *Drug Discov Ther*, 2014, 8(5):201-207.
- [3] Yang H, Shen Y, Xu Y, et al. A novel strategy for the discrimination of gelatinous Chinese medicines based on enzymatic digestion followed by nano-flow liquid chromatography in tandem with orbitrap mass spectrum detector[J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10:4947-4955.
- [4] 葛重宇,庞慧,李楠,等.18家企业阿胶中氨基酸的含量分析与比较研究[J].中国药房,2017,28(1):122-126.
- [5] 艾伟霞,郑虹.阿胶与易混淆品的鉴别[J].世界最新医学信息文摘,2015,15(27):171.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:181、189、322.
- [7] 刘芳,李德富,林炜,等.羟脯氨酸含量的测定方法与应用[J].中国皮革,2007,36(15):51-54.
- [8] 龙毅,杨武德,袁吉虎.RP-HPLC法同时测定石韦中4种氨基酸的含量[J].中国药房,2015,26(27):3833-3840.
- [9] 李小勇,李洪军.猪肺胶原蛋白含量的测定[J].肉类研究,2006(7):35-37.
- [10] 穆畅道.胶原蛋白的提取及其生物膜材料研究[D].成都:四川大学,2003.

(收稿日期:2017-01-27 修回日期:2017-04-20)

(编辑:刘柳)