

异硫氰酸苯酯衍生化-HPLC法测定龟甲中胶原蛋白

骆 达¹, 李惠芬^{1*}, 李秀兰², 周 静¹, 杜 凡¹, 王 丽¹

(1. 天津医科大学药学院, 天津 300070; 2. 天津医院骨科研究所, 天津 300211)

摘要:目的 采用异硫氰酸苯酯衍生化法分析龟甲中胶原蛋白。方法 龟甲中胶原蛋白经酸水解后分解为含有羟脯氨酸的氨基酸混合物, 经异硫氰酸苯酯衍生化后, 以0.1 mol/L 醋酸钠溶液-乙腈(94:6, pH 6.5)与乙腈-水(80:20)为二元流动相, 经C₁₈色谱柱分离, 254 nm处测定羟脯氨酸。通过测定样品中羟脯氨酸的量来计算样品中胶原蛋白的量。结果 羟脯氨酸在0.02~0.20 mg/mL时与峰面积呈良好的线性关系, 回收率为102.0%。结论 建立的龟甲中胶原蛋白的HPLC分析方法分离效果好、准确、快速、干扰少。

关键词: 龟甲; 羟脯氨酸; 异硫氰酸苯酯; 胶原蛋白; 高效液相色谱

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)06-0851-02

龟甲是乌龟的干燥腹甲, 具有滋阴潜阳、益肾强骨、养血、补心等功能。胶原蛋白是人与动物机体的主要结构蛋白, 也是一种促纤维细胞生长因子, 其特有的低抗原性、可生物降解性、生物吸收性、止血性能及促进细胞生长等功能^[1], 使其越来越多地应用于皮肤创伤^[2,3]与骨折愈合^[4]等临床治疗。羟脯氨酸是胶原蛋白的特异性氨基酸, 其他蛋白中几乎没有, 且比较稳定。本实验采用柱前衍生化法定性、定量分析了龟甲中的羟脯氨酸, 并计算胶原蛋白的量^[5], 获得了满意的结果。

1 仪器与材料

美国Waters515型双泵高效液相色谱仪, Millennium³²色谱管理系统; WH-2微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器有限公司)。

L-羟脯氨酸由Sigma公司提供, 其他氨基酸由天津天安药业股份有限公司提供, 质量分数均大于99%; 异硫氰酸苯酯(Fluka); 龟甲购于天津市中药饮片厂, 经天津中医药大学第一附属医院尚英和药师鉴定为乌龟*Chinamys reevesii* (Gray)背甲; 乙腈、正己烷为色谱纯, 重蒸水自制, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 衍生化试剂的配制: 取0.3 mL异硫氰酸苯酯置于25 mL棕色量瓶中, 乙腈定容, 质量浓度为0.1 mol/L。摇匀, 作为衍生化试剂, 每日更换。三乙胺-乙腈(139:861)作为干燥试剂。

2.2 衍生化步骤: 精密移取200 μL对照品或供试品溶液, 分置于1.5 mL离心管中, 依次精密吸取100 μL干燥试剂和150 μL衍生化试剂, 涡旋振荡5 min, 静置1 h使其充分反应, 再于离心管中精密移入200

μL正己烷, 涡旋振荡5 min, 放置10 min, 吸取下层溶液进样。

2.3 色谱条件: 色谱柱为Phenomenex C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为0.1 mol/L醋酸钠溶液-乙腈(94:6, pH 6.5) (A)-乙腈-水(80:20) (B), 梯度洗脱: 0~3 min, 6% B, 3~6 min, 16% B, 6~7 min, 70% B, 7~8 min, 100% B, 8 min以后, 0% B; 检测波长为254 nm; 柱温为40℃; 体积流量为1 mL/min。

2.4 供试品溶液的制备: 准确称取0.5 g 100目龟甲粉末, 置150 mL平底烧瓶中, 加入6 mol/L HCl 20 mL, 于100℃水解6 h, 趁热滤过置100 mL量瓶中, 残渣用重蒸水反复冲洗, 冷却后加重蒸水至刻度, 准确吸取以上溶液10 mL, 60℃旋转蒸干, 后加入1 mL重蒸水, 再次旋干, 如此反复3次后, 用0.1 mol/L HCl转移至10 mL量瓶中, 定容, 摇匀。0.45 μm滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.5 标准曲线的绘制: 精密称定一定量L-羟脯氨酸对照品置于10 mL量瓶中, 0.02 mol/L HCl稀释定容, 配制成1 mg/mL对照品储备液备用。精密吸取羟脯氨酸对照品储备液一定量配制成0.02、0.05、0.08、0.10、0.12、0.15、0.20 mg/mL对照品系列, 各自衍生化后进样5 μL。以羟脯氨酸质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归分析, 得回归方程为 $Y = 2 \times 10^7 X + 17\,725$, $r = 0.999\,9$, 线性范围0.02~0.20 mg/mL。

2.6 精密度试验: 精密吸取供试品溶液200 μL, 衍生化后连续6次, 每次进样5 μL, 结果羟脯氨酸峰面积的RSD为1.07%。

* 收稿日期: 2007-10-16

资金项目: 天津市科委技术发展计划重点项目(023617011)

作者简介: 骆 达(1982-), 男, 天津市人, 天津医科大学药学院硕士研究生, 研究方向为药物分析。

* 通讯作者 李惠芬 Tel:(022) 23529243 E-mail: lihufen@tjmu.edu.cn

2.7 重现性试验: 取批号20061001样品, 平行制备6份供试品溶液, 衍生化后进样5 μL , 测定, 计算羟脯氨酸质量分数, 结果其RSD为1.12%。

2.8 稳定性试验: 取供试品溶液200 μL , 衍生化后在室温放置0、2、4、6、8、12 h后分别测定, 计算得羟脯氨酸峰面积RSD为1.08%, 表明龟甲羟脯氨酸供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.9 回收率试验: 吸取9份各100 μL 供试品溶液, 再各自加入0.08、0.10、0.12 mg/mL 羟脯氨酸对照品溶液100 μL , 制备供试品溶液, 进行测定, 计算, 结果平均回收率为102.0%, RSD为2.47%。

2.10 其他氨基酸干扰试验: 考察了13种常见氨基酸(门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、精氨酸、苏氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸)对羟脯氨酸测定的影响。结果表明其他氨基酸与羟脯氨酸均成很好的分离, 不影响羟脯氨酸的定性、定量分析, 色谱图见图1。

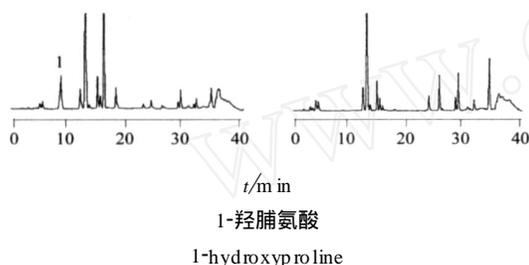


图1 龟甲样品(A)和无羟脯氨酸混合氨基酸(B)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of *C. reevesii* (A) and mixed amino acids reference substances without hydroxyproline (B)

2.11 龟甲中羟脯氨酸的测定: 取4批龟甲样品, 每批分别处理3份, 经衍生化后进样测定, 并计算龟甲中羟脯氨酸的质量分数。由于羟脯氨酸在胶原蛋白中的质量分数为10%^[4], 因此可以通过计算得龟甲中胶原蛋白的量。测定结果见表1, 色谱图见图2。

表1 龟甲中羟脯氨酸的测定结果(n=4)

Table 1 Determination of hydroxyproline content in *C. reevesii* (n=4)

批号	羟脯氨酸/(mg · g ⁻¹)	胶原蛋白/%
20060801	14.13	14.1
20060815	14.20	14.2
20061001	14.33	14.3
20061015	14.39	14.4

3 讨论

由于胶原蛋白不溶于冷水, 但溶于热水, 故有研究用龟甲水煎液灌胃后的大鼠含药血清, 观察其对骨髓间质干细胞体外增值的影响, 结果表明龟甲水

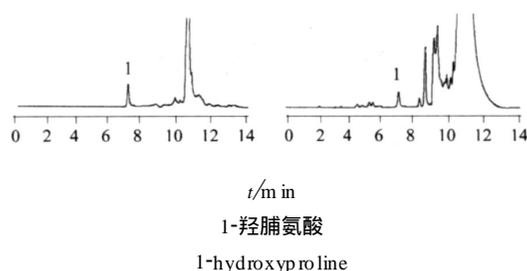


图2 羟脯氨酸对照品(A)和龟甲样品(B)的HPLC色谱图
Fig. 2 HPLC Chromatogram of hydroxyproline reference substance (A) and *C. reevesii* (B)

煎液的含药血清可促进骨髓间质干细胞的增殖而有利于细胞DNA的合成^[6], 局部种植骨髓间质干细胞不仅利于皮肤的再生与愈合, 对于难治的慢性皮肤创伤也有很好的疗效, 另外骨髓间质干细胞也能加快骨形成的速度^[7]。由此可推断, 龟甲中胶原蛋白是促进皮肤与骨修复愈合的主要药效成分, 这与胶原蛋白可以修复愈合皮肤和骨的临床疗效是一致的。

胶原蛋白特异氨基酸羟脯氨酸的衍生化方法很多, 一般分为柱前衍生和柱后衍生两类, 柱后衍生化设备一次性投入大, 不便于普通实验室应用; 柱前衍生化相对简单, 主要包括异硫氰酸苯酯、6-氨基喹啉-N-(羟基琥珀酰亚胺基)氨基甲酸酯(AQC)、邻苯二甲醛和丹酰氯4种方法。AQC法要求pH值和洗脱温度控制必须准确; 邻苯二甲醛法只能与伯氨反应, 二级氨不能被同时检测, 另外邻苯二甲醛法衍生化后的邻苯二甲醛-氨基酸稳定性很差; 丹酰氯法所生成的衍生物在紫外光下不稳定, 易分解; 故本实验采用异硫氰酸苯酯法衍生化。该法适于普通实验室分析胶原蛋白, 且简单、快速、适用于龟甲胶原蛋白的分析。

参考文献

- 刘慧玲, 王栋, 章金刚. 胶原蛋白在临床医学中的应用[J]. 北京生物医学工程, 2005, 24(3): 239-241.
- 陈静涛, 徐政, 顾其胜. 胶原蛋白研发的最新进展[J]. 上海生物医学工程, 2004, 25(2): 52-55.
- Maeda M, Tani S, Sano A. Microstructure and release characteristics of the minipellet, a collagen based drug delivery system for controlled release of protein drugs [J]. *J Controlled Release*, 1999, 62: 313-324.
- 杨志明, 余希杰, 黄富国, 等. 外源性I型胶原对人胚骨膜成骨细胞生物学特性的影响[J]. 华西医科大学学报, 2001, 32(1): 1-4.
- 邹晓莉, 黎源倩, 曾红燕, 等. 反相高效液相色谱法测定人肌腱中的胶原蛋白[J]. 色谱, 2006, 24(3): 263-266.
- 周健洪, 陈东风, 黎晖, 等. 龟板含药血清对大鼠骨髓间质干细胞体外增值的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2005, 22(1): 35-38.
- 王珍, 徐根波. 骨髓间质干细胞及其临床应用的研究进展[J]. 国外医学: 内科学分册, 2006, 33(2): 85-88.