

凝胶排阻色谱法研究阿胶中蛋白质及多肽相对分子质量分布规律

汪冰², 肖新月^{1*}, 程显隆¹, 田守生³, 林瑞超¹

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 山东省药品检验所, 济南 250101;

3. 山东东阿阿胶股份有限公司研究所, 聊城 252201)

摘要 目的: 建立阿胶中水溶性成分凝胶排阻色谱分析方法, 研究阿胶中蛋白质及多肽的相对分子质量分布规律, 为阿胶质量评价提供依据。方法: 采用 TSK-GEL G4000PWXL (7.8 mm × 300 mm, 平均孔径 500 Å), 流动相为 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH = 7.2), 流速 0.4 mL·min⁻¹, 检测波长 280 nm, 以 β-淀粉酶、胰岛素为标记物, 室温下测定 16 个企业生产的 40 批阿胶样品, 并应用 TQ Analyst 软件进行样品图谱主成分分析。结果: 发现阿胶含有的蛋白质及多肽的相对分子质量主要集中在 6 × 10³ ~ 2 × 10⁵, 不同企业的产品中蛋白质及多肽的相对分子质量分布有一定规律。结论: 该方法准确、可靠, 具有良好的重复性和稳定性, 可用于阿胶中蛋白质及多肽的分析。测定结果反映出不同企业间, 甚至同一企业不同批次产品有差异。提示阿胶原料与生产工艺值得注意, 为保证阿胶质量稳定, 应该进行生产过程控制。

关键词: 阿胶; 水溶性成分; 蛋白质及多肽; 凝胶排阻色谱法; 相对分子质量分布; 主成分分析

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)11-1886-06

Study on relative molecular mass distribution of protein and peptide in donkey-hide glue by gel exclusion chromatography

WANG Bing², XIAO Xin-yue^{1*}, CHENG Xian-long¹, TIAN Shou-sheng³, LIN Rui-chao¹

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China

2. Shandong Province Institute for Drug Control, Jinan 250101, China

3. Institute for Drug Control of Shandong Dong E E Jiao CO., LTD., Liaocheng 252200, China)

Abstract Objective To develop a gel exclusion chromatography method for study of relative molecular mass distribution of protein and peptide in donkey-hide glue. **Methods** GPC was performed on a TSK-GEL G4000PWXL column (7.8 mm × 300 mm, average pore size 500 Å) with 0.05 mol·L⁻¹ phosphate buffered solution (pH 7.2) at the flow rate of 0.4 mL·min⁻¹, and detection at 280 nm. **Results** Relative molecular mass of protein and peptide in donkey-hide glue is in the ranges of 6 × 10³ - 2 × 10⁵, and there are regular pattern in the relative molecular mass distribution of protein and peptide in donkey-hide glue. **Conclusion** The developed method is accurate with high repeatability and stability, which can be used for the analysis of protein and peptide in donkey-hide glue. The result shows that there are difference in products among different manufacture, even among different batches, which caused by different production technique. The control of product production process is very important to ensure the quality of donkey-hide glue.

Key words donkey-hide glue; water-soluble constituent; protein and peptide; gel exclusion chromatography; distribution of relative molecular mass; analysis of main constituent

阿胶是马科动物驴 (*Equus asinus* L.) 的皮经煎熬、浓缩而成的干燥胶块。药用历史已有 2000 多年, 从古至今, 一直作为滋阴润燥、补血止血的良药。其主要成分为胶原蛋白部分水解产生的多肽、多种氨基酸、金属元素及硫酸皮肤素、生物酸等^[1]。2005 年版中国药典采用定氮法测定总氮量以控制

阿胶的质量, 该方法测定的总氮量包括有机氮和无机氮, 方法粗放, 专属性不强。为增强阿胶质量的可控性, 作者建立了柱前衍生化 HPLC 法测定阿胶中羟脯氨酸及胶原蛋白的主要水解氨基酸甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸含量的方法^[2]。该方法准确、可靠, 具有良好的重复性和稳定性。然而, 该方法测定的是

* 通讯作者 Tel: (010) 67095432 E-mail: xiaox@nicpp.org.cn

阿胶水解后的氨基酸,不足以反映组成阿胶的蛋白质类成分的原生状态。为此,本文研究建立了阿胶中水溶性成分凝胶排阻色谱分析方法 (gel exclusion chromatography 简称 GPC 法),不经水解直接分析阿胶中的可溶性蛋白质及多肽的相对分子质量分布规律,并比较 16 个企业 40 批产品的差异,以期更客观、科学地评价阿胶的质量情况。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪;实验样品阿胶为 2007 年对不同生产厂家进行药品评价性抽验留样的样品 (见表 1)。相对分子质量标记物 β -淀粉酶 (批号: 054k6104) 购自 Sigma 公司,胰岛素 (批号: 0633-200703) 由中国药品生物制品检定所提供,均为供含量测定用。试剂磷酸氢二钠、氢氧化钠均为分析纯;纯净水为 Milli-Q 纯水。

表 1 实验用 40 批阿胶样品

Tab 1 Forty samples of donkey-hide glue

生产企业 (manufacturer)	批号 (Lot No.)	编号 (sample No.)	生产企业 (manufacturer)	批号 (Lot No.)	编号 (sample No.)
	070746	A1	20070414	H1	
A	070771	A2	H	2007511	H2
	070812	A3		2007515	H3
	070523	B1		0702028	I1
B	070522	B2	I	0702030	I2
	070521	B3		0702031	I3
	20070414	C1		20070305	J1
C	20070415	C2	J	20070323	J2
				20070414	J3
	20070503	D1		070420	K1
D	20070505	D2	K	070422	K2
	20070507	D3		070423	K3
	070702-3	E1		20070210	L1
E	070703-4	E2	L	20070302	L2
	070706-4	E3		20070308	L3
	20070402	F1		200700101	M1
F	20070403	F2	M		
	20070404	F3		20070103	M2
	070113	G1	N	070601	N
G	070202	G2	O	070307	O
	070203	G3	P	070202	P

2 色谱条件

色谱柱为 TSK-GEL G4000PWXL (7.8 mm × 300 mm, 平均孔径 500 Å), 柱温为室温 (25 °C), 流动相为 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH = 7.2) (取磷酸二氢钠 27 g 加水使溶解成 1000 mL, 取 50 mL, 加 0.2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液约 40 mL, 再加水稀释至 200 mL, 即

得), 流速为 0.4 mL·min⁻¹, 检测波长为 280 nm。

3 溶液配制

3.1 标记物溶液 取 β -淀粉酶、胰岛素适量, 精密称定, 加水制成每 1 mL 分别含 β -淀粉酶 0.8 mg 胰岛素 1.0 mg 的混合溶液。

3.2 供试品溶液 取阿胶样品 250 mg 置于 25 mL 量瓶中, 加水约 20 mL, 超声处理 (功率 300 W, 频率 50 kHz) 30 min, 放冷, 加水定容至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μ m) 滤过, 即得。

4 分析方法验证

4.1 系统适应性及专属性试验 取标记物溶液、供试品溶液及空白溶液 (水) 各 5 μ L, 按“2.2”项下色谱条件进行测定, 理论板数按胰岛素计算为 4034, 分离度大于 1.5, 空白无干扰。信噪比 (S/N) 以 b 峰与噪音的比值计算为 17。标记物溶液、供试品溶液凝胶排阻色谱图见图 1。

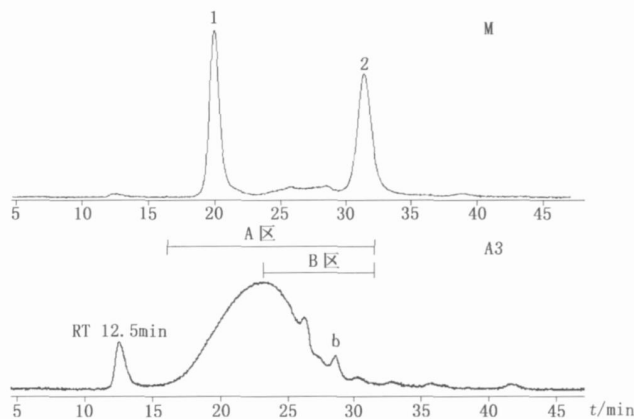


图 1 混合标记物 (M) 和 A3 样品凝胶排阻色谱图

Fig 1 GPC chromatograms of marker (M) and sample A3

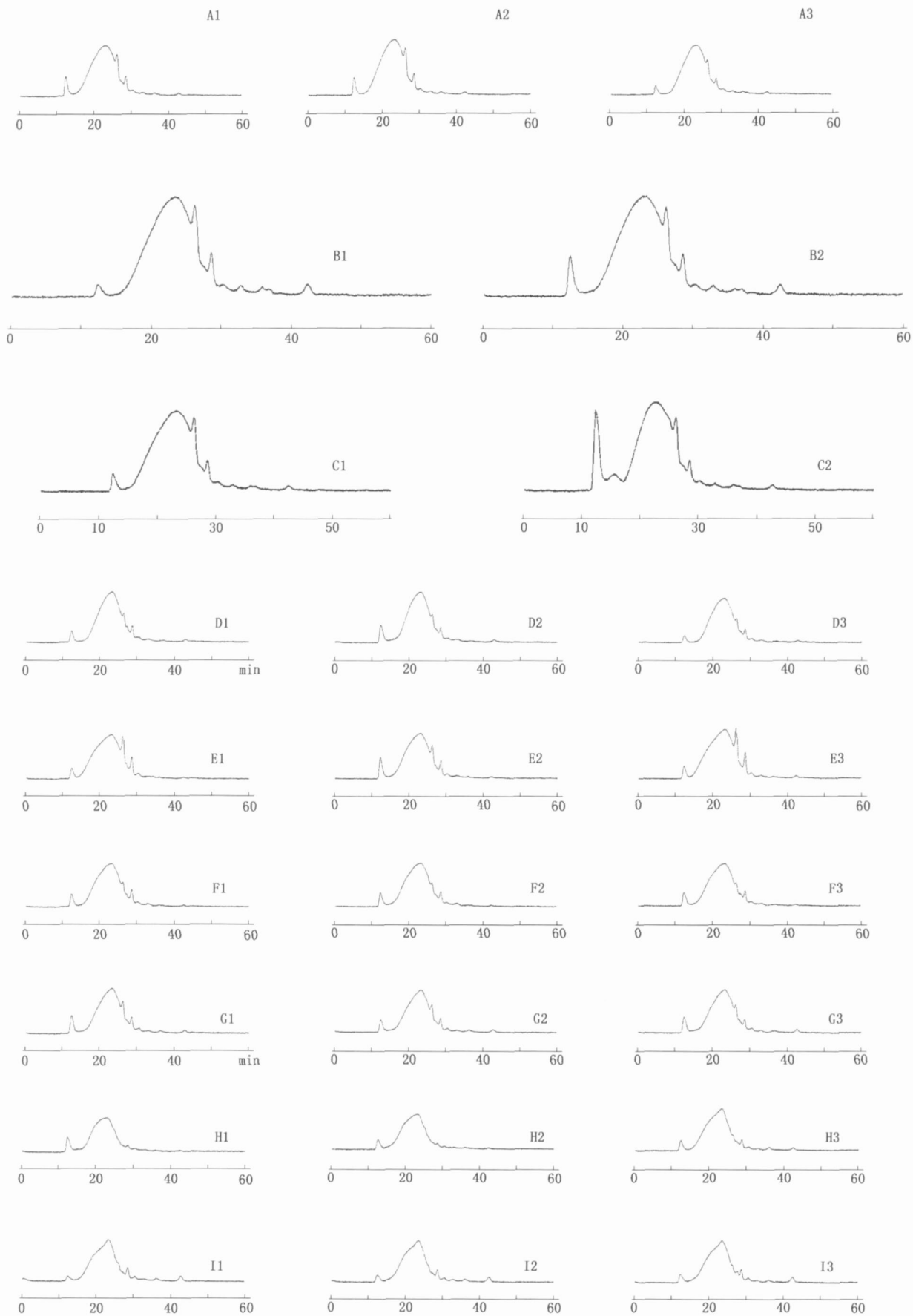
1. 淀粉酶 (amylase, 19.92 min) 2. 胰岛素 (insulin, 31.38 min)

4.2 精密度试验 取 A3 号样品的供试品溶液 5 μ L, 按“2”项下色谱条件连续进样 6 次, 测定在 40 批样品均出现的保留时间为 12.5 min 色谱峰的峰面积, 计算其 RSD 为 1.6%。另外, 供试品溶液为水溶液, 不宜放置过久。

4.3 重复性试验 精密称取 A3 号样品 6 份, 每份 250 mg 按“3.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2”项下色谱条件测定保留时间为 12.5 min 峰的峰面积, 计算其 RSD 为 2.0%。

5 结果与分析

按上述条件, 以 β -淀粉酶 (相对分子质量约 2.15×10^5) 和胰岛素 (相对分子质量约 5.7×10^3) 作为相对分子质量标记物, 对 16 个不同企业生产的 40 批阿胶样品测定, 结果见图 2。



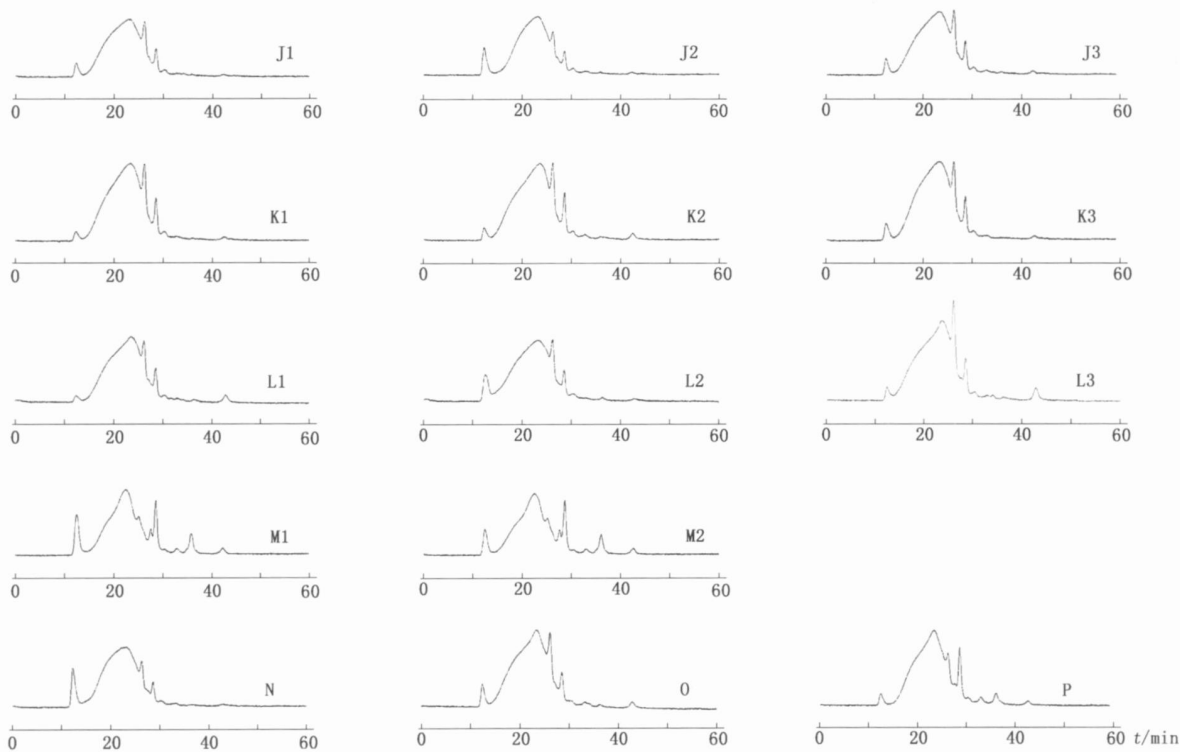


图 2 16 个企业生产的 40 批阿胶样品凝胶排阻色谱图

Fig 2 GPC chromatograms of 40 batches of samples in 16 companies

结果发现,阿胶含有的蛋白质及多肽的相对分子质量主要集中在 $6 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$ 。为便于分析,将色谱图中的保留时间为 16~32 min 之间的区域称为 A 区;将主峰顶端及其右半部分划为 B 区。如图 1 所示。

3.1 观察色谱图 B 区的肩峰特征,以该区域中肩峰的高低及比例变化可将样品大致分成 2 类。第 1 类为肩峰较低,且肩峰在该区域中所占比例较小,有 A1~A3, B1~B3, C1, C2, D1~D3, E2, F1~F3, G1~G3, H1~H3, II~B, J2, N, 来自 11 个企业的 26 批样品;第 2 类为肩峰高,其在该区域中所占比例较大,有 E1, E3, J1, J3, K1~K3, L1~L3, M1, M2, O, P, 来自 7 个企业的 14 批样品。观察色谱图 A 区的峰形特征,以该区域峰形曲线是否较对称,又可将“3.1”所述第 1 类样品大致分成 2 组。第 1 组为峰形较对称,有 A1~A3, B1~B3, C1, C2, D1~D3, 来自 4 个企业的 11 批样品;第 2 组为峰形对称性差,有 E1~E3, F1~F3, G1~G3, H1~H3, II~B, J2, N, 来自 7 个企业的 17 批样品。

3.2 综合色谱图 A 区和 B 区的特征,将 40 批样品大致分为三大类:第 I 类为 A 区峰形较对称,主峰右侧肩峰较小,有 A1~A3, B1~B3, C1, C2, D1~D3, 来自 4 个企业的 11 批样品;第 II 类为 A 区中的

峰形对称性稍差峰顶部略向右偏移,但肩峰很小,有 E1~E3, F1~F3, G1~G3, H1~H3, II~B, J2, N, 来自 7 个企业的 17 批样品;第 III 类为 A 区峰形对称性差,肩峰很大分别为 J1, J3, K1~K3, L1~L3, M1, M2, O, P, 来自 6 个企业的 12 批样品。相对而言,不同企业间样品差异较大,而同一企业的样品相对变化较小。以上分析结果如图 3 所示。

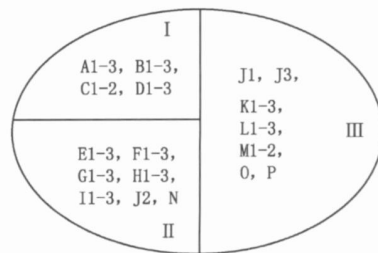


图 3 16 个企业生产的 40 批阿胶样品分类结果

Fig 3 Classification of 40 batches of samples in 16 companies

4 讨论

4.1 凝胶排阻色谱法是近年来应用越来越广泛的一种液相色谱技术。分离原理为凝胶色谱柱的分子筛机制。在填充剂亲水凝胶表面分布着不同尺寸的孔径,药物分子进入色谱柱后,它们中的不同组分按其粒径大小进入相应的孔径内,粒径大于凝胶孔径的分子不能进入填充剂颗粒内部,在色谱过程中不

被保留,最早被流动相洗脱出,表现为保留时间较短;小于所有孔径的分子能自由进入填充剂表面的所有孔径,在柱子中滞留时间较长,表现为保留时间较长;其余分子则按分子大小依次被洗脱。凝胶排阻色谱法常用于高分子化合物,如蛋白质^[3]、多肽^[4]、核酸^[5]等的分离分析。

4.2 通常认为,阿胶是由驴皮中的胶原蛋白(平均相对分子质量为12万多)及其部分水解产物组成。阿胶熬胶的过程就是胶原蛋白肽键(-CO-NH-CO-)部分断裂,形成一系列降解产物。温度和时间适当,这些成分进一步水解,产生多肽,甚至是氨基酸。所以阿胶实际上是一种蛋白质、多肽、氨基酸的混合物。有人^[6]认为,正是阿胶制备过程中疏水性的胶原蛋白在温度、水分、时间的作用下变成“亲水性胶体”,从而形成独特的“聚负离子基”结构,与阿胶的药效有关。连续系统聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)电泳测定^[7]表明,阿胶的胶原蛋白分子是多分散体系,相对分子质量分布范围相当宽,但多集中在相对分子质量 $6 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^5$ 之间。也就是说阿胶蛋白质水解条件的强弱、水解程度的高低以及批间原料与工艺的一致性,直接影响阿胶成品蛋白质、多肽相对分子质量分布。

应用本文建立的凝胶排阻色谱法,经反复实验,选用相对分子质量已知的2个蛋白类物质 β -淀粉酶(相对分子质量约 2.15×10^5)和胰岛素(相对分子质量约 5.7×10^3)作为相对分子质量标记物,测得阿胶蛋白质及多肽的相对分子质量主要分布于二

者之间。可认为阿胶蛋白质及多肽的相对分子质量集中在 $6 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$,而非文献报道^[7,8]的 $6 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^5$ 与 1.5×10^4 以下。

色谱图B区域主要为阿胶生产过程中产生的相对分子量较低的多肽类物质。相对而言,峰形对称性差、相对分子质量相对较小的成分比例大的样品,生产工艺中水解条件较剧烈,水解程度较高。B区域中的肩峰大,提示其生产过程水解条件较剧烈,生产工艺参数也不稳定。另外,由图2可见40批样品保留时间约12.5min的色谱峰的大小存在差异,这是相对分子质量较大的蛋白质,可反映不同企业,甚至同一企业批间原料或生产工艺有别。

4.3 主成分分析(principal components analysis 简称PCA)为广泛地用于分析化学信号处理的数据分析方法^[9]。为了能够更客观地分析阿胶样品的差异,尝试采用Thermo公司开发的TQ Analyst分析软件,应用主成分分析法对16个企业的40批阿胶样品进行图谱分析,并以第一主成分PC1为X轴,第二主成分PC2为Y轴作相关图(图4)。从图中各样品的点分布情况看,40批样品可明显分为两大区域:①和②。按照“3.2”项下方法划分的第3类样品全部落在区域①;有趣的是按照中国药典2005年版标准检验不合格的样品(L3M1-2P)都落在了这一区域。区域②又可进一步划分为2个小区域:②-1和②-2。按照“3.2”项下方法划分的第I类样品除样品D3外都落在区域②-1中;第II类样品除样品N外都落在区域②-2中。

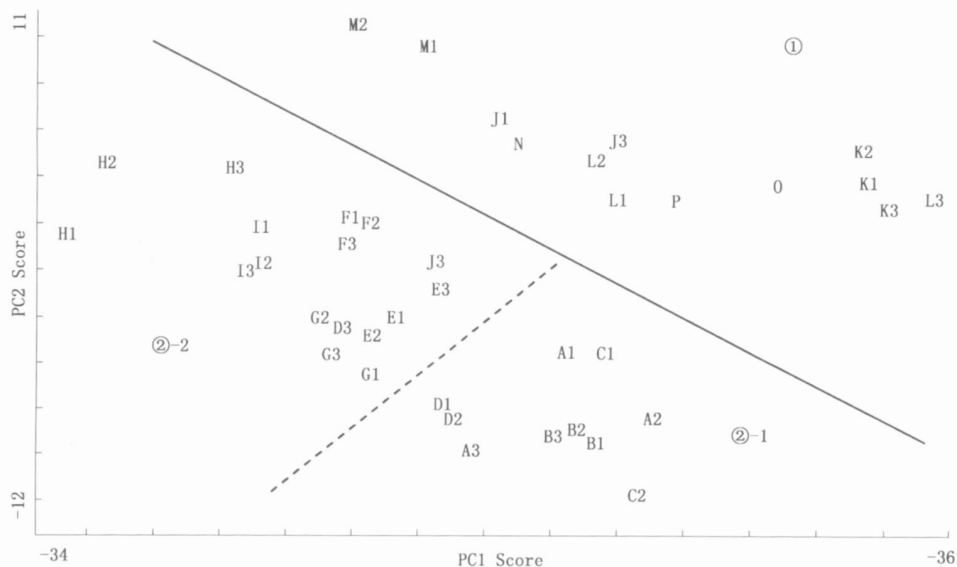


图4 16个不同企业生产的40批阿胶样品主成分分析结果

Fig 4 Result of 40 batches of samples in 16 companies by PCA

另外,从凝胶排阻色谱图中可以看到多数厂家的3批样品差别较小,说明其生产原料与工艺比较稳定,而企业J和L的3批样品差异较大;这一结果在图3中也客观的反映出来。即主成分分析法和图谱比对2种分析结果基本一致。

4.4 由A、B、C、D、E、F、G、H、I、K、L 11个企业各3批阿胶样品凝胶排阻色谱图可见,除C企业外其余10个企业的3批样品差别均较小,说明其生产原料与工艺比较稳定。文献[10]应用HPLC法研究东阿阿胶集团公司生产的10批阿胶中水溶性小分子成分,结果特征图谱中的28个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3%,提示同一企业生产的阿胶水溶性成分的相对含量较为稳定。与本文结论一致。

4.5 阿胶质量评价标准一直是药学工作者关注的焦点,也是研究的难点。本文对阿胶水溶性成分的初步研究,获得阿胶蛋白及多肽成分相对分子质量及其分布规律等关键信息,对进一步分离纯化其单体成分及活性验证实验,以及建立更科学有效的阿胶质量标准提供重要支持。16个企业40批样品的测定结果也提示为保证阿胶质量稳定,应该进行生产过程控制。

4.6 阿胶作为胶原蛋白分子多分散体系的动物胶类药材的典型代表,其分散程度、规律以及与功效的相关性和检测指标,值得深入研究。

参考文献

1 HU Jun-ying(胡军影), CHENG Xian-long(程显隆), XIAO Xin-yue(肖新月), et al. Review on chemical compositions and quality evaluation of donkey-hide glue(阿胶的化学成分及质量评价方法研究进展). *Chin Pharm Aff*(中国药事), 2007, 21(3): 193

2 CHENG Xian-long(程显隆), XIAO Xin-yue(肖新月), ZOU Qin-wen(邹秦文), et al. Pre-column derivatization HPLC simultaneous determination of 4 main amino acids in donkey-hide glue(柱前衍生化HPLC法同时测定阿胶中4种主要氨基酸的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2008, 28(12): 1997

3 CHE Jing(车婧), HAN Jin-xiang(韩金祥). The development of size exclusion chromatography-based protein renaturation(蛋白质复性的分子排阻色谱法的研究进展). *Pharm Biotechnol*(药物生物技术), 2004, 11(2): 111

4 LÜ Ying-ying(吕英英), YANG Zhao-peng(杨昭鹏), LIAO Hai-ming(廖海明), et al. Study and comparison on the molecular distribution and reversed phase chromatogram of bovine spleen extract with HPLC method(牛脾提取物相对分子质量分布及反相色谱图的研究与比较). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2003, 23(6): 423

5 GENG Li(耿莉), AN Li-juan(安丽娟). Test the high molecular weight proteins in insulin with exclusion chromatography method(分子排阻色谱法检测胰岛素中的大分子蛋白质). *J Xuzhou Coll Technol*(徐州工程学院学报), 2007, 22(4): 50

6 GUO Cheng-hao(郭成浩), JIN Yi(金毅), ZHANG Hui(张辉), et al. The theory of structures about pharmacological actions of donkey-hide glue(阿胶药理作用的结构学说). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 1999, 24(1): 54

7 XU Kang-sen(徐康森), ZHANG Lin-ke(张林可), SUN Lei(孙磊). Study and quality evaluation of donkey-hide glue IV. (阿胶的真伪鉴别和内在质量的研究IV. 阿胶和其它胶的蛋白含量及分子量的对比研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 1989, 9(5): 332

8 WANG Ruo-guang(王若光), YOU Zhao-ling(尤昭玲), LIU Xiao-li(刘小丽), et al. Analysis of the traditional Chinese medicine donkey-hide gelatin proteome based on surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry(基于激光解析/离子化-飞行时间质谱技术的中药阿胶蛋白质组分析). *J Clin Rehabil Tissue Eng Res*(中国组织工程研究与临床康复), 2007, 11(13): 2518

9 HOU Zhen-yu(侯振雨), CAI Wen-sheng(蔡文生), SHAO Xue-guang(邵学广). Principal component analysis-support vector regression and its application in near infrared spectral analysis(主成分分析-支持向量回归建模方法及应用研究). *Chin J Anal Chem*(分析化学), 2006, 34(5): 617

10 WANG Xiao-kun(王晓坤), CHENG Xi-min(程秀民), YU Hai-ying(于海英), et al. HPLC fingerprint of the water-soluble constituents in donkey-hide glue(阿胶水溶性成分HPLC指纹图谱研究). *J Shanghai Tradit Chin Med*(上海中医药杂志), 2008, 42(2): 66

(本文于2009年3月19日收到)