

HPLC-ELSD 测定醋鳖甲中未衍生化甘氨酸和脯氨酸的含量

王新雨, 谭晓梅*, 高明泽, 彭金龙

(南方医科大学 中医药学院 广东省中药制剂重点实验室, 广东 广州 510515)

[摘要] 目的: 建立一种测定醋鳖甲中未衍生化甘氨酸(Gly)及脯氨酸(Pro)含量的方法。方法: 以反相高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)法, 采用 Prevail C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.7% 三氟醋酸溶液(含 5.0 mmol · L⁻¹ 七氟丁酸)为流动相进行洗脱, 洗脱时间为 15 min。结果: 甘氨酸及脯氨酸峰面积的自然对数与相应浓度的自然对数呈良好的线性关系, 线性范围均为 0.1 ~ 0.6 g · L⁻¹。平均回收率及 RSD 分别为 Gly 102.5%, RSD 1.9%; Pro 101.2%, RSD 2.5%。结论: 该方法不需要专门的氨基酸分析仪和衍生化氨基酸, 简便、快速、准确, 可作为醋鳖甲药材的质量控制方法。

[关键词] HPLC-ELSD; 醋鳖甲; 甘氨酸; 脯氨酸

醋鳖甲为鳖科动物鳖 *Trionyx sinensis* Wiegmann 背甲的醋制品。具有滋阴潜阳、软坚散结、退热除蒸的作用, 用于阴虚发热, 劳热骨蒸, 虚风内动, 经闭, 癥瘕, 久疟疟母等。醋鳖甲主要含骨胶原、氨基酸、多糖及无机元素等^[1-3], 富含 15 种氨基酸, 其中甘氨酸(Gly)占氨基酸总量的 17%, 脯氨酸(Pro)占 27%, 高含量的 Gly 和 Pro 是鳖甲中氨基酸的特征^[4]。

近年来, 柱前衍生高效液相色谱法测定氨基酸的报道较多, 但衍生步骤比较繁琐^[5], 影响其准确性。高效液相色谱-质谱联用技术也有报道^[6], 但此类设备造价昂贵。高效液相色谱-蒸发光散射器技术可不用衍生化, 具有快速、简便、准确的特点。HPLC-ELSD 法已被应用于测定未衍生氨基酸的含量^[7], 但利用此技术测定鳖甲中氨基酸的含量, 未见报道。2010 年版《中国药典》(一部) 鳖甲的质量标准中, 目前尚未建立含量测定项。高含量的甘氨酸和脯氨酸是鳖甲药材中氨基酸含量的主要特征, 本研究建立了同时测定醋鳖甲中甘氨酸和脯氨酸含

量的 HPLC-ELSD 法, 该法可作为控制醋鳖甲药材质量的依据。

1 材料

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪; Alltech 2000 型蒸发光散射检测器; 三氟醋酸(TFA)(天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号 20090904); 七氟丁酸(Aladdin Chemistry Co., Ltd., 批号 1103120); 草酸; 乙醇均为分析级; 乙腈为色谱级; 水为二次蒸馏水。脯氨酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 111578-200201); 甘氨酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 140689-200401)。醋鳖甲药材: ①广州致信药材饮片有限公司, 批号 090701, 产地 湖北; ②广东省药材公司中药饮片厂, 批号 20090701, 产地 浙江; ③亳州市亳广中药饮片有限公司, 批号 20090707, 产地 广东; ④康美药业股份有限公司, 批号 090609101, 产地 湖北; ⑤广东紫云轩药业有限公司, 批号 20090710, 产地 广东。样品由南方医科大学中药鉴定教研室刘传明老师鉴定。

2 方法与结果

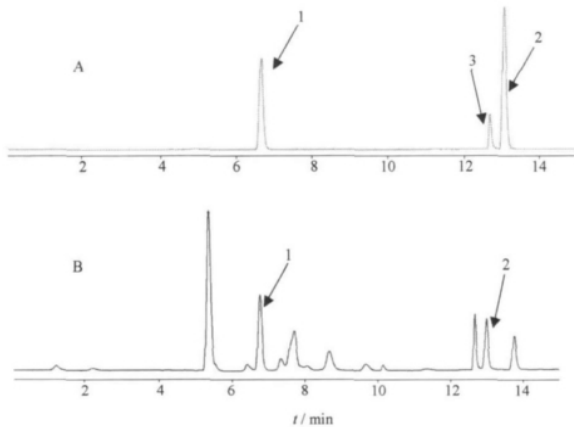
2.1 色谱条件

Prevail C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相, 乙腈(A)-0.7% 三氟醋酸溶液(含 5.0 mmol · L⁻¹ 七氟丁酸)(B) 梯度洗脱程序 0 min 0% A; 8 min 10% A; 15 min 20% A; 漂移管温度 115 °C; 气体流量 2.5 L · min⁻¹; 流速 0.5 mL · min⁻¹; 柱温 35 °C; 进样量 10 μL。色谱图见图 1。

[稿件编号] 20101205004

[通信作者] * 谭晓梅, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药新制剂的研究, Tel: (020) 61648265, Fax: (020) 61648265, E-mail: txm@fimmu.com

[作者简介] 王新雨, 硕士, 中药药剂学, E-mail: wangxy1225@126.com



A. 对照品; B. 样品; 1. 甘氨酸; 2. 脯氨酸; 3. 溶剂峰。

图1 对照品及醋鳖甲药材供试品溶液的 HPLC-ELSD 图

2.3 对照品溶液和供试品溶液的制备

2.3.1 混合对照品储备液的制备 精密称取甘氨酸及脯氨酸对照品适量置于量瓶中,加 0.01 mol · L⁻¹ 盐酸溶解,配制成浓度均为 1 g · L⁻¹ 的混合对照品储备液。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取 100 目醋鳖甲(批号 20090701) 粉末 0.25 g 置于锥形瓶中,加入 6 mol · L⁻¹ 盐酸 5 mL,密封,110 °C 恒温水解 6 h,放冷,滤过,挥干滤液,加入 50 mL 70% 乙醇溶液,超声溶解 15 min,过滤,滤液挥干,再加入 0.1 mol · L⁻¹ 草酸 15 mL 溶解,过滤,定容至 50 mL 量瓶中。摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,备用。

2.3.3 标准曲线的制作 精密吸取混合对照品储备液 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,用 0.01 mol · L⁻¹ HCl 稀释至刻度,进样 10 μL,记录色谱图。分别以甘氨酸及脯氨酸质量浓度的自然对数为横坐标,峰面积的自然对数为纵坐标,进行线性回归分析。其方程为 Gly $Y = 1.364X + 8.548$ ($r = 0.9998$),线性范围 0.1 ~ 0.6 g · L⁻¹; Pro $Y = 1.232X + 8.870$ ($r = 0.9993$),线性范围 0.1 ~ 0.6 g · L⁻¹。在线性范围内甘氨酸及脯氨酸峰面积自然对数与其质量浓度自然对数呈良好线性关系。

2.3.4 精密度试验 精密吸取混合对照品储备液 3 mL,置于 10 mL 量瓶中,用 0.01 mol · L⁻¹ HCl 稀释至刻度,进样 10 μL,连续进样 6 次。结果甘氨酸及脯氨酸峰面积的 RSD 分别为 1.7%, 1.8%。

2.3.5 重复性试验 精密称取 100 目醋鳖甲(批号

20090701) 粉末,平行制备 6 份供试品液,进样 10 μL,测定计算,甘氨酸及脯氨酸含量的 RSD 分别为 2.3%, 2.8%。

2.3.6 稳定性试验 取供试品液(批号 20090701) 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h,进样 10 μL,甘氨酸及脯氨酸含量的 RSD 分别为 1.9%, 2.3%,表明醋鳖甲供试品中甘氨酸及脯氨酸在 24 h 内稳定。

2.3.7 回收率试验 精密称取 100 目醋鳖甲(批号 20090701) 粉末置于锥形瓶中,精密加入与饮片中等量的甘氨酸及脯氨酸对照品,制备同一浓度的溶液 6 份,测定,结果平均回收率及 RSD 分别为 Gly 102.5%, RSD 1.9%; Pro 101.2%, RSD 2.5%。

2.3.8 五批醋鳖甲中药材中甘氨酸及脯氨酸的测定 取五批醋鳖甲样品,按照 2.3.2 项下制备样品,每批分别处理 2 份,进样测定,外标法计算醋鳖甲中甘氨酸及脯氨酸的含量。测定结果见表 1。

表 1 醋鳖甲中甘氨酸及脯氨酸的质量分数($\bar{x} \pm s$, $n = 2$)

No	甘氨酸	脯氨酸
090701	5.36 ± 0.05	1.62 ± 0.03
20090701	5.49 ± 0.06	1.87 ± 0.04
20090707	5.21 ± 0.03	1.95 ± 0.06
090609101	5.34 ± 0.01	1.97 ± 0.02
20090710	5.66 ± 0.18	1.74 ± 0.17

3 讨论

3.1 醋鳖甲水解时间的选择

以往报道的氨基酸的水解多为 6 h^[8] 或 24 h^[9],本实验为确定水解时间,分别进行 5, 6, 8, 12, 16, 20, 24 h 的水解时间考察。结果表明在 6, 8, 12, 16, 20, 24 h 时,甘氨酸及脯氨酸的含量无明显的差异,与 6, 8, 12, 16, 20, 24 h 相比较,在 5 h 时,甘氨酸及脯氨酸的含量有所下降,故选用 6 h,既达到了龟板中氨基酸全部水解的目的,又节省了能源与时间。

3.2 去钙、磷条件的选择

醋鳖甲为鳖科动物鳖 *T. sinensis* 背甲的粗制品,含有大量的钙、磷等物质,对甘氨酸及脯氨酸含量的测定有影响,因此需对其进行处理。

3.2.1 去钙条件的选择 本实验采用草酸去钙^[10],由于草酸难以挥发,容易在雾化室沉积,因此须对其用量进行考察,本实验处理 0.1 g 药材,分别

加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的草酸溶液 5, 6, 7, 8 mL 结果 0.1 g 药材加入 6 mL 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的草酸溶液即可将钙完全去除。

3.2.2 去磷条件的选择 分别取 0.1 g 药材, 选用 50%, 70%, 85%, 95% 乙醇 20 mL 进行处理 结果表明乙醇浓度为 70% 时, 去磷效果最好, 且对甘氨酸及脯氨酸含量无影响。因此, 最终确定为 70% 乙醇 20 mL 去磷。

本研究采用 HPLC-ELSD 法测定醋鳖甲中甘氨酸及脯氨酸, 样品不需要衍生可直接分析, 操作简便、结果准确可靠, 因此, 本方法可作为醋鳖甲药材的质量控制方法。也可为其他药材中氨基酸的分析提供参考。

[参考文献]

[1] 王阳奎. 煮熟后的鳖甲不易食用[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(2): 125.

- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典·下册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977: 2723.
- [3] 李军德. 我国抗癌动物药概述[J]. 中成药, 1992; 14(2): 42.
- [4] 缪华蓉, 沈耀明. 鳖甲内氨基酸成分的研究[J]. 中成药, 1995; 17(12): 38.
- [5] 田静, 吕坚. 高效液相色谱法测定大鼠纤维化肝组织中羟脯氨酸含量[J]. 中国药房, 2003, 14(3): 145.
- [6] 夏金根, 陈波, 姚守拙. 高效液相色谱-质谱联用测定胶原蛋白中的羟脯氨酸[J]. 色谱, 2008, 26(5): 595.
- [7] 鄢丹, 张毅等, 韩玉梅, 等. HPLC-ELSD 法测定疏血通注射液中 17 中未衍生氨基酸含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(4): 558.
- [8] 李惠芬, 骆达, 张庆伟, 等. 柱前衍生化 RP-HPLC 法分析龟板中氨基酸[J]. 中草药, 2005, 36(11): 1638.
- [9] 张亚婕, 凌秀梅, 张桂英, 等. 鳖甲及鳖甲提取物中氨基酸的测定[J]. 吉林中医药, 1995(6): 39.
- [10] 许善锦主编. 无机化学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 426.

Determination of underivatized glycine and proline in vinegar turtle shell by HPLC-ELSD

WANG Xinyu, TAN Xiaomei*, GAO Mingze, PENG Jinlong

(Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Preparation of Guangdong Province, School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method to determine the underivatized glycine (Gly) and proline (Pro) in vinegar turtle shell. **Method:** An HPLC-ELSD method was conducted on a Prevail C_{18} column (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) with the mobile phase of acetonitrile and 0.7% trifluoroacetic acid solution (containing 5.0 mmol \cdot L⁻¹ heptafluorobutyric acid), and elution time was 15 min. **Result:** The calibration curves were showed good linearity within the concentration range of 0.1-0.6 g \cdot L⁻¹. The average recoveries were 101.2% and 102.5%, and RSD were 1.9% and 2.5%, respectively. **Conclusion:** Since this method needs neither the special amino acid analyzer nor derivation of amino acid, it is efficient, simple and accurate, which could be used for quality control of vinegar turtle shell.

[Key words] HPLC-ELSD; vinegar tortoise shell; glycine; proline

doi: 10.4268/cjcm20111521

[责任编辑 丁广治]