

## 山羊角提取物中焦谷氨酸含量测定研究

李江海<sup>1</sup>, 王伯初<sup>1\*</sup>, 王建<sup>1</sup>, 刘绍勇<sup>2</sup>, 薛东升<sup>2</sup>

(1. 重庆大学生物工程学院 生物流变学与技术教育部重点实验室 重庆 400030;

2. 上海凯宝药业股份有限公司, 上海 201418)

**摘要** 目的:对山羊角提取物中的焦谷氨酸进行含量测定研究。方法:通过氨基酸自动分析仪及傅立叶变换离子回旋共振质谱确认山羊角提取物中含有焦谷氨酸,并建立专属高效液相色谱方法对焦谷氨酸进行含量检测。色谱条件为:色谱柱为 Sionchrom ODS-BP(200 mm×4.6 mm 5 μm),流动相为乙腈-3.5 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸氢二钠缓冲液(1:99),调 pH=3,流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 205 nm,柱温 27℃。结果:高分辨质谱有 *m/z* 128 离子峰,并且检测出该批山羊角提取物中含有焦谷氨酸 7.65%。结论:所建立的方法可快速、稳定地检测山羊角提取物中的焦谷氨酸,从而有效提高山羊角提取物的检测标准。

**关键词:** 中药; 山羊角; 提取物; 焦谷氨酸; 高分辨质谱; 高效液相色谱法; 羚羊角; 替代物

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)08-1567-04

## Study on the content determination of pyroglutamic acid in Cornu caprae hircus's extraction

LI Jiang-hai<sup>1</sup>, WANG Bo-chu<sup>1\*</sup>, WANG Jian<sup>1</sup>, LIU Shao-yong<sup>2</sup>, XUE Dong-sheng<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Biorheological Science and Technology (Chongqing University), Ministry of Education; College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China; 2. Shanghai Kaibao Pharmaceutical Company Limited, Shanghai 201418, China)

**Abstract Objective:** Study on the content determination of pyroglutamic acid in cornu caprae hircus. **Methods:** Through automatic amino acid analyzer and fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry to determine Cornu caprae hircus's extraction contain pyroglutamic acid. And develop an special method for detection of pyroglutamic acid by using high performance liquid chromatography(HPLC). HPLC method: Sionchrom ODS-BP column (200 mm×4.6 mm 5 μm), acetonitrile-3.5 mmol·L<sup>-1</sup> phosphate buffer(1:99) adjusted to pH 3 as mobile phase, the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, detection wavelength was set at 205 nm, the temperature of column was 27℃. **Results:** The detected ion peaks was *m/z* 128 by ESI/MS high-resolution spectrum. Moreover, the results showed that the content of pyroglutamic acid in the Cornu caprae hircus's Extraction was 7.65%. **Conclusion:** The detection method was rapid and stable. It can improve the examination standard of Cornu caprae hircus's extraction.

**Key words:** traditional Chinese medicine; Cornu caprae hircus; extraction; pyroglutamic acid; high-resolution mass spectrometry; HPLC; antelope horn; substitution

山羊角为牛科动物青羊 *Naemorhedus goral Hardwicke*、北山羊 *Capra ibex Linnaeus* 的角。其首载于《本草新编》,曰其“专活死血”。目前发现其具有明显的镇静、镇痛、解热、抗惊厥和抗病毒作用,与羚羊角药理作用相似,但效果稍差<sup>[1]</sup>。

山羊角的主要成分与羚羊角相似,主要为蛋白质、磷酸钙及微量的磷脂类成分。由于羚羊角数量稀少,药材主要靠进口,而山羊角与羚羊角药理作用相似,故山羊角是羚羊角的理想替代品<sup>[2]</sup>。对于山羊

角,仅限于其作为羚羊角替代物的研究,及简单的药理作用研究<sup>[3]</sup>:其水解液主要为 16 种游离氨基酸,一般认为复合氨基酸起主要药理作用,但对于山羊角中起药理作用的活性成分研究作者未见文献报道。

山羊角提取物为国家中药二类新药痰热清注射液中的主要成分。为了进一步对痰热清注射液中主要成份进行确认研究,提高其产品质量标准,我们对上海凯宝药业生产的山羊角提取物进行了物质基础研究。

\* 通讯作者 Tel: (023) 65112840; E-mail: wangbc2000@126.com

本文发现山羊角提取物中氨基酸含量与山羊角直接水解相比有一定差别,尤其是谷氨酸含量。由此通过研究和实验验证山羊角提取物中存在 *L*-焦谷氨酸,其为 *L*-谷氨酸在干燥脱水条件下生成。此物质首次在山羊角提取物中发现。焦谷氨酸在体内以游离形式存在于多种组织和体液(包括脑和脑脊液)中,参与组成许多神经肽如促甲状腺素释放激素、促性腺激素释放激素和神经紧张素的氨基末端<sup>[4]</sup>,并且许多重要生物活性的天然肽的氨基末端都是焦谷氨酰残基,其具有很强的药理作用,在蔬菜、水果、青草、糖蜜中较常见。故其在化妆品、食品、药品、织物、油墨和管道清洗等领域有重要应用<sup>[5,9]</sup>。

由于焦谷氨酸可以与谷氨酸相互转化,故其检测十分重要。检测方法有应用于味精检测的酸水解法,即酸水解后测其旋光度,间接测定焦谷氨酸含量。此方法只适合味精生产检测,且结果误差较大,实用性不强。苏芳等建立了一种检测 *L*-谷氨酰胺的方法,其中包含了对 *L*-焦谷氨酸的检测,方法灵敏度高,操作简单<sup>[6]</sup>,但由于山羊角中氨基酸较多,干扰多,氨基柱对其检测并不适用。此外范毅等利用 Chirobiotic T 柱实现了 *D/L*-焦谷氨酸对应体的分离检测<sup>[7]</sup>。由于此方法耗时长,操作复杂,其对山羊角提取物中焦谷氨酸的检测并不适用。因此我们通过研究建立了一种操作简单,检测精准的方法对山羊角提取物中的焦谷氨酸进行检测。

## 1 仪器与试剂

日立公司氨基酸自动分析仪 型号为 L-8800:

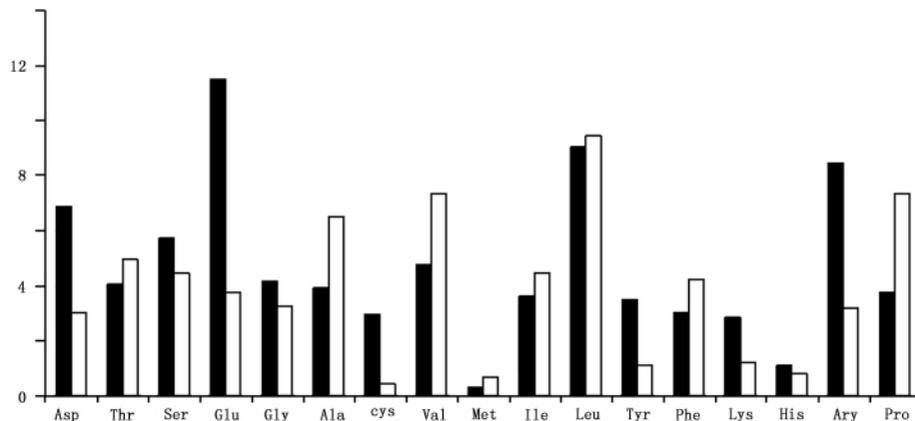


图1 山羊角提取物(□)与山羊角水解液(■)中氨基酸含量对比图

Fig 1 A comparison diagram of amino acids from the Cornu caprae hircus's extraction(□) and Cornu caprae hircus hydrolysates(■)

## 2.2 傅立叶变换离子回旋共振质谱

**2.2.1 质谱条件** 扫描方式为电喷雾负离子模式,扫描范围:0~300 *m/z*,干燥气温度:200 °C,干燥气流量:12 L·min<sup>-1</sup>,雾化气流量:6 L·min<sup>-1</sup>,电喷雾电压为2.3 kV。注射泵进样速度2 μL·min<sup>-1</sup>。

17种 *L*-氨基酸混合标样(0.1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 储备液)由 sigma 提供,不同 pH 值和离子强度洗脱用缓冲溶液,茚三酮等(按仪器说明书配制)。

Bruker 傅立叶变换离子回旋共振质谱,型号为 IV FT-MS。

Elite 高效液相色谱仪: Elite UV230 II 检测器, Elite ZW II 柱温箱, Elite ES2600 工作站。

焦谷氨酸含量为98%,由 Alfa aesar 提供。

山羊角及山羊角提取物(批号:091001)均由上海凯宝药业股份有限公司提供

乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 山羊角提取物中焦谷氨酸的确认

### 2.1 氨基酸成分检测

**2.1.1 样品的配置** 山羊角水解液的制备:取山羊角,制成粉末,精密称取约0.5 g,置于安瓿瓶中,加入浓硫酸10 mL,氮气保护后,封口于100 °C恒温酸水解12 h,取出水解液,用氢氧化钠溶液调 pH=7,制成山羊角水解液。山羊角提取物溶液的制备:另准确称取山羊角提取物约0.5 g,溶于10 mL水中,制成山羊角提取物溶液。取山羊角水解液及山羊角提取物溶液各1 mL,用0.45 μm 滤膜过滤。并与氨基酸自动分析仪所用盐酸溶液等比例混合,供检测。

**2.1.2 氨基酸自动分析** 调整仪器参数及洗脱液 pH,使各氨基酸分辨率≥85%,分别自动进样制备好的山羊角水解液和山羊角提取物溶液各20 μL 进行分析,其中缓冲溶液流速为0.400 mL·min<sup>-1</sup>。茚三酮溶液为0.350 mL·min<sup>-1</sup>。结果见图1。

**2.2.2 样品处理** 取微量山羊角提取物,溶于甲醇中,加入适量乙酸,促进其离子化。用0.25 mL 注射器吸取一定体积样品液固定在注射泵上,直接进样。

**2.2.3 质谱结果** 见图2。

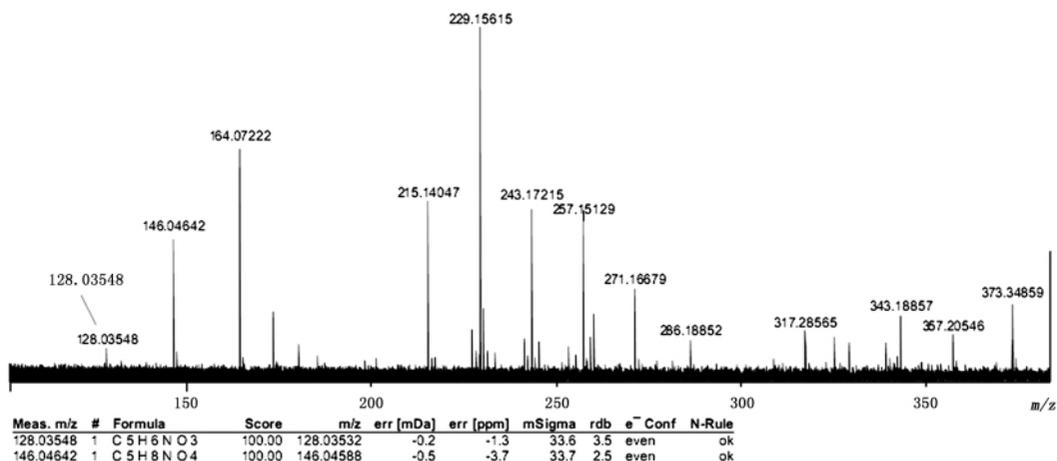


图2 山羊角提取物高分辨质谱图

Fig 2 High resolution mass - spectrogram of Cornu caprae hircus's extraction

**2.3 焦谷氨酸的确定** 从氨基酸自动分析仪上我们可以很清楚地看出,山羊角提取物与山羊角水解液的氨基酸有一定的差别,而谷氨酸含量最多且差别较大(见图1)。根据分析认为1种可能性是山羊角提取物中谷氨酰胺水解不彻底所导致,而谷氨酰胺在酸性环境下可转化为谷氨酸;而另1种可能性是谷氨酸在山羊角处理过程中转化为其他物质。但考虑到山羊角提取物为山羊角在过量硫酸中于106℃处理16h,水解较完全,可以排除第1种可能性;而在山羊角提取物制取过程中有烘干步骤,且谷氨酸加热后易脱水转化为焦谷氨酸(图3)。为了验证上述的判断,对山羊角提取物进行高分辨质谱分析。结果发现了  $m/z$  128.03548 离子峰,其匹配最佳分子式为  $C_5H_6NO_3$ , 因其是  $ESI^-$  模式下,主要的离子化反应是质子转换和电荷交换,因此可能形成  $M^-$ 。所以分子式应为  $C_5H_7NO_3$  符合焦谷氨酸的分子式,而  $m/z$  146.04642 离子峰,其分子式应为  $C_5H_9NO_4$  确定其为谷氨酸,并且没有谷氨酰胺的分子峰出现。此后的高效液相分析也佐证了的判断,在相同时间,焦谷氨酸标准品与山羊角提取物供试品有同一时间峰。故可以肯定山羊角提取物中含有焦谷氨酸。

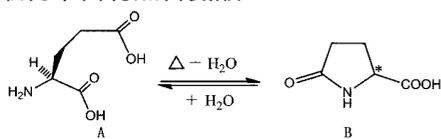


图3 谷氨酸(A)与焦谷氨酸(B)相互转化式

Fig 3 The transformed relations between pyroglutamic acid(A) and glutamic acid(B)

### 3 含量测定

**3.1 色谱条件** 采用 Sionchrom ODS - BP 色谱柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup> 检测波长 205 nm 柱温 27℃。流动相: 乙腈 - 3.5 mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸氢二钠缓冲液 (1:99), 用磷

酸调 pH = 3, 上样 20 μL。

#### 3.2 溶液的制备

**3.2.1 对照品溶液** 精确称取焦谷氨酸对照品适量, 用流动相配成 136 μg · mL<sup>-1</sup> 的溶液。

**3.2.2 供试品溶液** 取山羊角提取物约 1 g, 精密称定, 置于 1 L 量瓶中, 用流动相定容即可。

**3.3 线性关系考察** 将对照品溶液等倍稀释为 136, 68, 34, 17, 8.5 μg · mL<sup>-1</sup>, 按上述液相条件分别进样测定。以对照品量为 (X) 为横坐标, 峰面积积分值 (Y) 为纵坐标, 得回归方程为:

$$Y = 15.08X + 28.88 \quad r = 0.999$$

线性范围 8.5 ~ 136 μg。

**3.4 精密度试验** 取对照品溶液, 在上述色谱条件下连续进样 5 次, 每次进样 20 μL, 测得焦谷氨酸色谱峰面积的分别为 1098.49, 1101.26, 1089.04, 1106.52, 1092.27 mV。其 RSD 为 0.64% (n = 5), 结果表明精密度良好。

**3.5 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 在上述色谱条件下, 分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 各取 20 μL 进样测定, 峰面积分别为 1127.71, 1121.52, 1117.47, 1119.42, 1112.5, 1104.71, 1109.55 mV, 测得焦谷氨酸色谱峰峰面积的 RSD 为 0.70% (n = 7), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**3.6 加样回收率试验** 取批号为 091001 的样品 (含量为 7.65%) 0.01 g 各 9 份, 精密称量后, 按 3 个水平加入 “3.2.1” 项下 136 μg · mL<sup>-1</sup> 溶液 1, 2, 5 mL 各 3 份, 定容于 10 mL 量瓶中, 流动相定容, 按上述色谱条件分别进样 20 μL, 计算回收率。低、中、高浓度回收率 (n = 3) 分别为 99.8%, 100.1%, 100.0%; RSD 分别为 0.25%, 0.18%, 0.03%。

**3.7 方法专属性试验** 取焦谷氨酸标准品、谷氨酸、谷氨酰胺对照品各 10.0 mg, 混合后用流动相定容于 100 mL 量瓶中。按上述色谱条件取样 20 μL

进样测定。结果显示谷氨酸、谷氨酰胺色谱峰的出峰时间均不同于焦谷氨酸出峰时间,对焦谷氨酸检测无干扰。结果见图4。

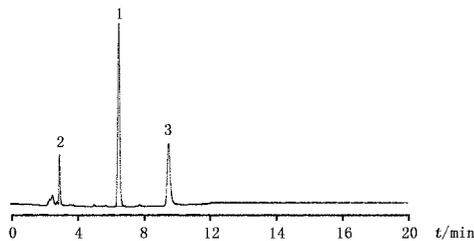


图4 专属性试验图

Fig 4 HPLC chromatogram of the method selectivity

1. 焦谷氨酸(pyroglutamic acid) 2. 谷氨酰胺(glutamine) 3. 谷氨酸(glutamic acid)

**3.8 检测限及定量限** 将“3.2.1”项下对照品溶液依次稀释至不同浓度,按上述色谱条件分别取样20  $\mu\text{L}$  进样测定。按信噪比分别为3和10时进行检测限及定量限测定。焦谷氨酸的检测限及定量限分别约为0.136  $\mu\text{g}$  和0.425  $\mu\text{g}$ 。

**3.9 含量测定** 吸取20  $\mu\text{L}$  供试品溶液,按照上述色谱条件进行测定,按照峰面积外标法,进样3次,峰面积分别为1127.71,1115.25,1112.14 mV。计算出第091001批山羊角中焦谷氨酸的含量为7.65%,RSD=0.74% ( $n=3$ )。结果见图5。

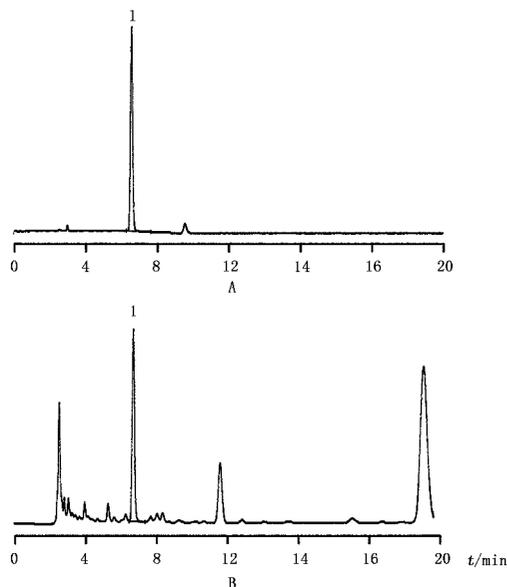


图5 对照品(A)与供试品(B)的HPLC图谱

Fig 5 HPLC chromatograms of reference substance(A) and *Cornu caprae hircus*'s extraction(B)

1. 焦谷氨酸(pyroglutamic acid)

## 4 讨论

**4.1 高效液相方法的建立** 目前报道的关于焦谷氨酸高效液相检测的方法有很多,我们考察了Li-Chrospher 100  $\text{NH}_2$  (250 mm  $\times$  4.6 mm 5  $\mu\text{m}$ ); CAP-

CELL PAK  $\text{C}_{18}$  SG300(250 mm  $\times$  4.6 mm 5  $\mu\text{m}$ ); Sion-chrom ODS-BP(200 mm  $\times$  4.6 mm 5  $\mu\text{m}$ )等多种色谱柱。由于山羊角提取物大多为氨基酸,对氨基柱损害太大;而CAPCELL PAK  $\text{C}_{18}$  SG300柱由于山羊角中其他物质影响,对焦谷氨酸检测造成干扰;ODS柱极性相对较弱,对氨基酸能有很好的分离,预实验中焦谷氨酸的峰型也相对较好,故我们采用后者作为分离柱。鉴于焦谷氨酸在水溶液中不是很稳定,配置了5%甲醇,磷酸调pH=3;5%甲醇,三氟乙酸调pH=3;1%乙腈,3.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>磷酸氢二钠缓冲液,调pH=3等多种流动相进行试验。焦谷氨酸在此3种流动相中均比较稳定,但由于乙腈吸收较小无干扰,且极性稍强,洗脱效果更好。所以选择了后者。对一些文献上<sup>[6,8]</sup>的方法我们也进行了尝试,发现其对山羊角提取物检测时存在着出峰时间长,干扰多等问题。

**4.2 小结** 在山羊角提取物中发现的焦谷氨酸此前没有相应的检测标准,而本文所建立的高效液相色谱检测方法具有专属性强,检测方便,出峰时间快等特点,是一种适宜检测山羊角提取物中焦谷氨酸含量的方法。

## 参考文献

- SUN Bao-sen(孙宝森). Research progress on the medicine animal horns(动物角类的药用研究概况). *Inf Tradit Chin Med*(中医药信息) 2004 21(3):25
- XU Bi-da(徐必达), ZHANG Hua-lin(张华林). The advancement of antelope's horn and its substitutes research(羚羊角及其代用品的研究进展). *J Chin Med Mater*(中药材) 2003 26(12):910
- JIANG Qing-hua(姜清华), ZHAI Yan-jun(翟延君). Pharmacological action comparison between *Cornu antelopis* and *Cornu caprae hircus*(羚羊角与山羊角药理作用比较). *Shanxi Med J*(山西医药杂志) 2006 35(7):582
- DING Qi-long(丁启龙), LIU Guo-qing(刘国卿), ZHOU Jun(周俊). Research progress in pharmacological actions of pyroglutamic acid(焦谷氨酸药理学研究进展). *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报) 1998 14(6):481
- YANG Xiao-ling(杨晓玲), YIN Shu-mei(殷树梅). Research progress in synthesis of glutamic acid ramifications(谷氨酸衍生物合成研究进展). *Technol Dev Chem Ind*(化工技术与开发) 2008 37(9):18
- SU Fang(苏芳), ZHOU Li-chun(周立春), FENG Pu-chun(冯朴纯). Determination of L-glutamine in its preparation by HPLC(高效液相色谱法测定L-谷氨酰胺及其制剂的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2002 22(2):132
- FAN Yi(范毅), FENG Yu-qi(冯钰琦), PENG Jian-min(彭剑民). HPLC enantioseparation of pyroglutamic acid using teicoplanin bonded silica stationary phase(焦谷氨酸对映体的手性高效液相色谱分离). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2005 25(4):402
- Gandini C, De Lorenzi D, Kitsos M. HPLC determination of pyroglutamic acid as a degradation product in parenteral amino acid formulations. *Chromatographia* 1993 36(1):75
- Silva AR, Silva CG. L-pyroglutamic acid inhibits energy production and lipid synthesis in cerebral cortex of young rats in vitro. *Neurochem Res* 2001 26(12):1277

(本文于2010年10月16日收到)