

## HPLC-ELSD 法测定醋龟甲中羟脯氨酸

王新雨, 谭晓梅\*, 陈飞龙, 汤庆发, 张文新

南方医科大学中药药学院 广东省中药制剂重点实验室, 广东 广州 510515

**摘要:** 目的 建立一种测定未衍生化氨基酸的方法, 测定醋龟甲中羟脯氨酸。方法 以高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)法, 采用 Prevail C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.7%三氟醋酸溶液(含 5.0 mmol/L 七氟丁酸)为流动相进行洗脱, 洗脱时间为 25 min。结果 羟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, 其方程为  $Y=1.2124X+7.8034$ ,  $r=0.9996$ , 羟脯氨酸的线性范围为 0.1~1.0 mg/mL, 平均加样回收率为 101.7%, RSD 为 2.7%。结论 该法快速、简便、准确, 可作为醋龟甲药材的质量控制方法。

**关键词:** HPLC-ELSD; 醋龟甲; 羟脯氨酸; 质量控制; 氨基酸

中图分类号: R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)07-1338-03

## Determination of hydroxyproline in vinegar *Testudinis Carapax et Plastrum* by HPLC-ELSD

WANG Xin-yu, TAN Xiao-mei, CHEN Fei-long, TANG Qing-fa, ZHANG Wen-xin

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

**Key words:** HPLC-ELSD; vinegar *Testudinis Carapax et Plastrum*; hydroxyproline; quality control; amino acid

龟甲为龟科动物乌龟 *Chinemys reevesii* (Gray) 的背甲及腹甲, 具有滋阴潜阳、益肾强骨、养血补心等作用。主要含有骨胶原、角蛋白等。其中胶原蛋白可用于皮肤创伤<sup>[1-2]</sup>、骨折愈合<sup>[3]</sup>的治疗。在胶原蛋白中, 含羟脯氨酸为 10%~14%, 其他组织几乎不含有羟脯氨酸<sup>[4-6]</sup>。本实验采用高效液相色谱-蒸发光散射器(HPLC-ELSD)测定羟脯氨酸, 以控制龟甲药材的质量。该方法可不用衍生化, 具有快速、简便、准确的特点。

### 1 仪器与材料

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪、Alltech 2000 型蒸发光散射检测器(美国 Agilent 公司)。乙腈为色谱纯; 三氟醋酸(TFA)、七氟丁酸、草酸、乙醇均为分析级; 水为二次蒸馏水。羟脯氨酸对照品(批号 111578-200201, 中国药品生物制品检定所); 醋龟甲药材: 批号 20090331(产地广东)、090825-2(产地广东), 亳州市亳广中药饮片有限公司; 批号 20090701(产地广东)、批号 090825-3(产

地广东), 广东省药材公司中药饮片厂; 批号 090701(产地湖北), 广州致信药材饮片有限公司。以上醋龟甲药材由南方医科大学中药鉴定教研室刘传明副教授鉴定均为龟科动物乌龟 *Chinemys reevesii* (Gray) 的腹甲。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Prevail C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 柱, 流动相为乙腈(A)-0.7%三氟醋酸溶液(含 5.0 mmol/L 七氟丁酸, B), 梯度洗脱程序: 0~7 min, 0~10% A; 7~10 min, 10%~15% A; 10~25 min, 15%~35% A; 漂移管温度 115 °C, 气体体积流量 2.5 L/min, 体积流量 0.5 mL/min, 柱温 35 °C, 进样量 5 μL。色谱图见图 1。

#### 2.2 醋龟甲水解条件的选择

**2.2.1 醋龟甲水解时间的选择** 据文献报道<sup>[7-8]</sup>, 氨基酸的水解时间多为 6、24 h, 本实验为确定水解时间, 分别进行了 6、24 h 的水解时间考察, 结果表

收稿日期: 2010-08-04

作者简介: 王新雨(1986—), 女, 安徽砀山人, 南方医科大学硕士研究生, 研究方向为中药药剂学。

Tel: 13202012110 E-mail: wangxy1225@126.com

\*通讯作者 谭晓梅 Tel/Fax: (020)61648265 E-mail: txm@fimmu.com.

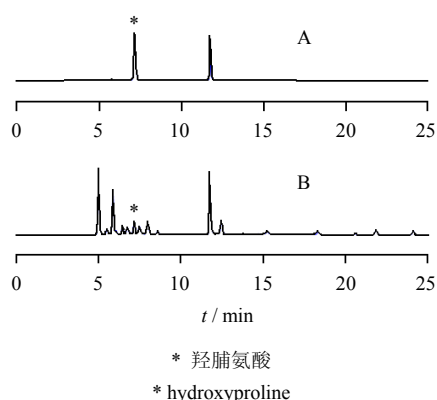


图 1 对照品 (A) 和醋龟甲样品 (B) 的 HPLC-ELSD 色谱图

Fig. 1 HPLC-ELSD chromatograms of reference substance (A) and vinegar *Testudinis Carapax et Plastrum* sample (B)

明这 2 种条件下羟脯氨酸的峰面积无明显差异, 故选用 6 h, 既达到了醋龟甲中氨基酸全部水解的目的, 又节省了能源与时间。

**2.2.2 去钙、磷条件的选择** 由于醋龟甲含有大量的钙、磷等物质, 对羟脯氨酸的测定有影响, 需对其进行处理。

**去钙条件的选择:** 采用草酸去钙, 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。处理 0.1 g 醋龟甲 (批号 20090701), 分别加入 0.1 mol/L 草酸溶液 6、7、8、9 mL, 结果 0.1 g 醋龟甲加入 8 mL 0.1 mol/L 草酸溶液即可将钙完全去除。

**去磷条件的选择:** 取 0.1 g 醋龟甲 (批号 20090701), 分别选用 50%、70%、85%、95%乙醇 20 mL 进行处理, 结果表明 70%乙醇去磷效果最好, 且羟脯氨酸的损失最小, 因此选用 20 mL 70%乙醇去磷。

### 2.3 对照品储备液的制备

精密称取羟脯氨酸对照品 25.07 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 0.01 mol/L 盐酸溶解配制成 1.00 mg/mL 对照品储备液。

### 2.4 供试品溶液的制备

精密称取过 100 目醋龟甲粉末 0.5 g, 置锥形瓶中, 加入 6 mol/L 盐酸 5 mL, 密封, 110 °C 恒温水解 6 h, 放冷, 滤过, 挥干滤液, 加入 100 mL 70%乙醇溶液, 超声溶解 15 min, 滤过, 滤液挥干, 再加入 0.1 mol/L 草酸 40 mL 溶解, 滤过, 滤液定容至 50 mL 量瓶中, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,

取续滤液, 备用。

### 2.5 线性关系考察

精密吸取对照品储备液 1、2、4、6、8、10 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 用 0.01 mol/L HCl 稀释至刻度, 摇匀, 各进样 5 μL, 记录色谱图。以峰面积的自然对数为纵坐标, 质量浓度的自然对数为横坐标进行线性回归, 得回归方程  $Y=1.2124X+7.8034$ ,  $r=0.9996$ , 表明羟脯氨酸在 0.1~1.0 mg/mL 质量浓度自然对数与峰面积自然对数呈良好线性关系。

### 2.6 精密度试验

精密吸取对照品储备液 6 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用 0.01 mol/L HCl 稀释至刻度, 进样 5 μL, 连续进样 6 次, 计算得羟脯氨酸峰面积自然对数的 RSD 为 0.44%。

### 2.7 稳定性试验

取批号 20090701 的醋龟甲制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样 5 μL, 测定, 记录色谱图, 计算得羟脯氨酸峰面积自然对数的 RSD 为 0.80%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

### 2.8 重现性试验

取批号 20090701 的醋龟甲, 平行制备供试品溶液 6 份, 进样 5 μL, 测定, 记录色谱图, 计算得羟脯氨酸质量分数的 RSD 为 0.46%。

### 2.9 加样回收率试验

取过 100 目批号 20090701 的醋龟甲粉末 6 份, 每份 0.25 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入 5 mL 羟脯氨酸对照品储备液, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算得羟脯氨酸平均加样回收率为 101.7%, RSD 为 2.7%。

### 2.10 样品测定

分别取 5 批醋龟甲样品制备供试品溶液, 每批平行制备 3 份, 各进样 5 μL, 测定, 按外标法计算醋龟甲中羟脯氨酸。结果见表 1。

## 3 讨论

羟脯氨酸的测定方法很多, 氨基酸自动分析仪

表 1 样品测定 ( $n=3$ )

| Table 1 Determination of samples ( $n=3$ ) |        |
|--------------------------------------------|--------|
| 批 号                                        | 羟脯氨酸/% |
| 20090701                                   | 2.14   |
| 090701                                     | 1.67   |
| 20090331                                   | 2.43   |
| 090825-2                                   | 1.88   |
| 090825-3                                   | 1.98   |

测定氨基酸,是一种成熟的、经典的氨基酸分析方法,但局限于氨基酸一类分析。近年来,柱前衍生化和柱后衍生化 HPLC 法测定羟脯氨酸的报道较多<sup>[7,9]</sup>,如柱前衍生的 RP-HPLC 法、柱后衍生的离子交换色谱(IEC)法。柱后衍生通常用茚三酮作为衍生试剂<sup>[10]</sup>,柱前衍生试剂常见的有异硫氰酸苯酯<sup>[11-12]</sup>、邻苯二甲醛<sup>[13]</sup>、氯甲酸-9-芴基甲酯<sup>[14-15]</sup>等,但这几种衍生试剂均在不同程度上存在缺陷:有的衍生过程复杂,有的衍生产物不稳定,有的衍生试剂过量会对氨基酸的分离产生干扰,且衍生步骤比较繁琐,影响测定结果。高效液相色谱-质谱联用技术也有报道<sup>[16]</sup>,但此类设备造价昂贵。

本实验采用 HPLC-ELSD 法测定醋龟甲中羟脯氨酸,样品不需要衍生即可直接分析,避免了衍生产物的多样性,也不涉及样品中氨基酸衍生不彻底等问题,操作简便、结果准确可靠。本方法可作为醋龟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] 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.
- [2] Maeda M, Tani S, Sano A, *et al.* 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(3): 313-324.
- [3] 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.
- [4] Miller E J, Martin G R, Piez K A. The utilization of lysine in the biosynthesis of elastin crosslinks[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1964, 17(3): 248-253.
- [5] 杨凤蕊,娄建石,方步武. 蒿鳖养阴软坚方抗 CCl<sub>4</sub> 复合因素所致大鼠肝纤维化的作用[J]. 中草药, 2011, 42(3): 530-534.
- [6] 潘赞红,宓余强,毕丽萍,等. 软肝化纤丸对 CCl<sub>4</sub> 致大鼠慢性肝纤维化的影响[J]. 中草药, 2011, 42(5): 951-954.
- [7] 骆达,李惠芬,李秀兰,等. 异硫氰酸苯酯衍生化-HPLC 法测定龟甲中胶原蛋白[J]. 中草药, 2008, 39(6): 851-852.
- [8] 鄢丹,李果. 反相高效液相色谱法直接测定水蛭中 14 种未衍生氨基酸的含量[J]. 分析化学研究简报, 2006, 34(5): 705-708.
- [9] 潘葳,郭根和,苏德森,等. 反相高效液相色谱法与离子交换色谱法测定氨基酸比对[J]. 现代科学仪器, 2004(3): 25-28.
- [10] Spackman D H, Stein W H, Moore S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids[J]. *Anal Chem*, 1958, 30(7): 1190-1206.
- [11] Bidlingmeyer B A, Cohen S A, Tarvin T L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization[J]. *J Chromatogr B*, 1984, 336(1): 93-104.
- [12] Bidlingmeyer B A, Cohen S A, Tarvin T L, *et al.* A new, rapid, high-sensitivity analysis of amino acids in food type samples[J]. *J Assoc Off Anal Chem*, 1987, 70(2): 241-247.
- [13] Qureshi G A, Fohlin L, Bergström J. Application of high-performance liquid chromatography to the determination of free amino acid in physiological fluids[J]. *J Chromatogr A*, 1984, 297: 91-100.
- [14] Einarsson S, Folestad S, Josefsson B, *et al.* High-resolution reversed-phase liquid chromatography system for the analysis of complex solution of primary and secondary amino acids[J]. *Anal Chem*, 1986, 58(8): 1638-1643.
- [15] 黄浩,肖雪,傅俊曾,等. 邻苯二甲醛-9-氯甲酸芴甲酯柱前衍生 HPLC 法测定血必净注射液中氨基酸[J]. 现代药物与临床, 2011, 26(1): 58-62.
- [16] 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): 595-598.