

鳖甲抗肝纤维化活性多肽部位 HPLC 指纹图谱

林春敏, 李成容, 叶晓川*, 刘焱文

(湖北中医药大学药学院, 湖北省中药资源与中药化学省级重点实验室, 武汉 430065)

[摘要] 目的:建立鳖甲抗肝纤维化活性多肽部位 HPLC 指纹图谱,全面完整地反映其内在化学信息,为鳖甲活性多肽部位的质量控制提供依据。方法:采用高效液相色谱法,ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.03% 三氟乙酸梯度洗脱,检测波长 220 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 25 °C。结果:建立了鳖甲抗肝纤维化活性多肽部位的 HPLC 指纹图谱,获得了 13 个共有峰;利用中药指纹图谱相似度评价软件进行相似度评价,10 批样品的相似度均>0.9,提示鳖甲活性多肽质量较稳定。结论:该方法准确可靠,精密度、重复性和稳定性良好,能有效控制鳖甲活性多肽部位的质量,为进一步药效研究、制剂研发提供质量保证。

[关键词] 鳖甲;活性多肽;高效液相色谱法;指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)21-0074-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015210074

HPLC Fingerprint Anti-Liver Fibrosis Active Peptides in Trionycis Carapax LIN Chun-min, LI Cheng-rong, YE Xiao-chuan*, LIU Yan-wen (Hubei University of Chinese Medicine College of Pharmacy, Provincial Key Laboratory of Hubei Chemical Medicine and Traditional Chinese Medicine Resources, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of anti-liver fibrosis active peptides in Trionycis Carapax, reflect the chemical information comprehensively and provide evidence for quality control. **Method:** HPLC was used on ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.03% trifluoroacetic acid the mobile phase of gradient elution, detection wavelength was set at 220 nm, with the flow rate of 1 mL · min⁻¹, the column temperature was of 25 °C. **Result:** HPLC fingerprint of anti-liver fibrosis active peptides in Trionycis Carapax was established, which showed 13 comon peaks. The similarity was evaluated on the similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine. The similarities of 10 batches were over 0.9, which indicated that the quality of Trionycis Carapax active peptides was relatively stable. **Conclusion:** The method is simple and has good precision, reproducibility and stability, effective in quality control of Trionycis Carapax active peptides, and provide quality assurance for further pharmacological studies and preparation research.

[Key words] Trionycis Carapax; active peptides; HPLC; fingerprints

多肽类药物因其毒副作用低,用量少,生物活性强,疗效好等特点,近年来越来越受到医药界的关注。目前全球已上市的合成多肽类药物有 60 多种,而从中药中寻找多肽类药物也正逐渐成为研究热点。鳖甲具有滋阴潜阳、软坚散结、退热除蒸的功效,主要用于治疗阴虚发热、虚风内动、症

痕等病症^[1]。现代药理研究证实鳖甲提取物具有明显抗肝纤维化作用,临床用于治疗肝纤维化疾患疗效良好^[2-4]。本课题前期通过细胞实验确定鳖甲相对分子质量小于 6 000 Da,多肽为其发挥抗肝纤维化作用的有效部位,在此基础上优化了鳖甲活性多肽提取及膜分离纯化最佳生产工艺,并

[收稿日期] 20150105(027)

[基金项目] 武汉市科技攻关计划项目(201260523194)

[第一作者] 林春敏,从事中药学研究,Tel:15171453137,E-mail:1609349581@qq.com

[通讯作者] *叶晓川,博士,研究员,从事中药药效物质基础及质量控制研究,Tel:027-88920834,E-mail:yxxcc1965@163.com

采用四氯化碳诱导大鼠肝纤维化模型对鳖甲活性多肽部位抗肝纤维化作用及其机制进行了研究^[5-6]。本研究采用 HPLC 建立了鳖甲活性多肽指纹图谱测定方法,以期全面地反映了鳖甲活性多肽部位的化学信息,为进一步进行新药研制及作用机制研究提供科学依据。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),METTLER AL204 型 1/1 万分析电子天平(Mettler)。

内标物氨基酸排列顺序为 Asn-Pro-Asn-Pro-Thr (NPNPT),相对分子质量为 542.16,纯度 98.05%,由上海科肽生物技术有限公司合成。乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

10 批鳖甲(购于湖北九州通医药集团股份有限公司,经湖北中医药大学药学院吴和珍教授鉴定为鳖科动物鳖 *Trionyx sinensis* Wiegmann 的背甲)。10 批鳖甲活性多肽样品参照文献^[5]自制。

2 方法与结果

2.1 内标物溶液的制备 取内标物 NPNPT 适量,精密称定,加水制成每 1 mL 含 0.6 mg 的内标物溶液,即得。

2.2 缺内标物供试品溶液的制备 取鳖甲活性多肽粉末 60 mg,精密称定,加水定容于 2 mL 量瓶中,摇匀,溶液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得缺内标物供试品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 分别精密吸取 2.1、2.2 项下的内标物溶液、缺内标物供试品溶液各 100 μL,混合均匀,即得供试品溶液。

2.4 鳖甲活性多肽色谱指纹图谱分析

2.4.1 色谱条件 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.03% 三氟乙酸(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 2% ~ 6% A; 5 ~ 15 min, 6% ~ 10% A),检测波长 220 nm^[7],柱温 25 °C,流速 1 mL·min⁻¹。分别精密吸取内标溶液、缺内标供试品溶液 5 μL,供试品溶液 10 μL,注入液相色谱仪,见图 1。

2.4.2 方法学考察 供试品溶液色谱图中可见 14 个峰,其中 S 号峰为内标物峰,即参照物峰。根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》^[8]中参照物的选择原则,根据参照物的保留时间计算各指纹峰的相对保留时间;以内标物作为参照物,将共有指纹峰中峰面积相对较大、且稳定的 6 号峰峰面积设为 1,计算各指纹峰的相对峰面积。

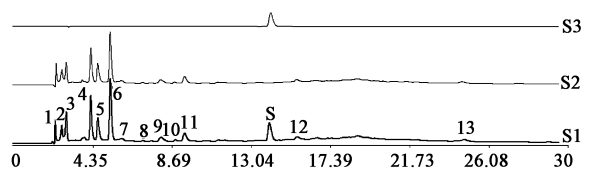


图 1 内标物溶液(S3)、缺内标供试品溶液(S2)及供试品溶液(S1)色谱

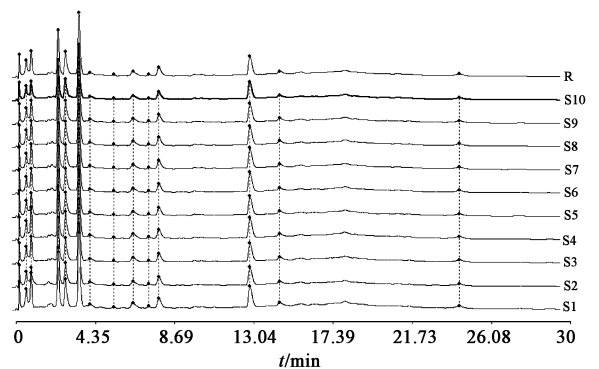
Fig. 1 HPLC chromatograms of internal standard solution content (S3), the test solution without internal standard substance (S2) and the test solution (S1)

精密度考察:取同一供试品溶液,连续进样 6 次,在 2.4.1 项色谱条件下检测,结果各色谱峰相对保留时间的 RSD < 1%,相对峰面积的 RSD < 3%,表明仪器精密良好。

稳定性考察:取同一供试品溶液,分别在 0, 1, 3, 7, 15, 24 h 注入液相色谱仪,在 2.4.1 项色谱条件下检测,考察共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各色谱峰相对保留时间的 RSD < 2%,相对峰面积的 RSD < 3%,说明溶液在 24 h 内基本稳定。

重复性考察:取鳖甲活性多肽粉末 6 份,制成供试品溶液进样。在 2.4.1 项色谱条件下检测。结果显示,各色谱峰相对保留时间的 RSD < 1%,相对峰面积的 RSD < 3%,表明方法的重复性良好。

2.4.3 鳖甲活性多肽样品 HPLC 指纹图谱 按 2.4.1 项下色谱条件测定 10 批样品。将 10 批供试品溶液色谱数据导入国家药典委员会“中药指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)对其进行评价,采用多点校正和自动匹配生成对照指纹图谱(平均数),见图 2。选择了 10 批样品中共有的 13 个峰作为指纹图谱的共有峰。经计算,13 个共有峰与内标参照物峰总面积大于总峰面积的 92%。以参照物



R. 对照指纹谱

图 2 10 批鳖甲活性多肽 HPLC 指纹谱

Fig. 2 HPLC Fingerprints of 10 batches of *Trionyx Carapax* active peptides

的保留时间,计算各指纹峰的相对保留时间,以 6 号峰峰面积为 1,计算其他各指纹峰面积的比值。13

个共有峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均 < 3%,符合要求。见表 1,2。

表 1 鳖甲活性多肽部位 13 个共有峰的相对保留时间

Table 1 Relative retention time of 13 common peaks of Trionycis Carapax active peptides

共有峰	供试品									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.163	0.162	0.163	0.163	0.162	0.162	0.163	0.162	0.162	0.162
2	0.189	0.188	0.188	0.189	0.188	0.188	0.188	0.188	0.188	0.187
3	0.206	0.205	0.206	0.206	0.206	0.206	0.206	0.206	0.206	0.206
4	0.302	0.320	0.300	0.300	0.301	0.303	0.303	0.302	0.301	0.301
5	0.329	0.345	0.328	0.326	0.328	0.330	0.329	0.329	0.328	0.328
6	0.379	0.393	0.377	0.375	0.377	0.379	0.379	0.378	0.377	0.377
7	0.420	0.432	0.418	0.417	0.418	0.420	0.420	0.418	0.418	0.418
8	0.505	0.510	0.504	0.503	0.504	0.505	0.505	0.504	0.504	0.504
9	0.576	0.581	0.574	0.574	0.574	0.575	0.575	0.574	0.574	0.574
10	0.632	0.639	0.629	0.632	0.631	0.633	0.633	0.631	0.631	0.631
11	0.668	0.673	0.668	0.669	0.670	0.670	0.670	0.669	0.669	0.670
12	1.107	1.106	1.107	1.108	1.109	1.108	1.108	1.108	1.107	1.107
13	1.761	1.758	1.759	1.764	1.764	1.761	1.761	1.760	1.759	1.759

表 2 鳖甲活性多肽部位 13 个共有峰的相对峰面积

Table 2 Relative peak area of 13 common peaks of Trionycis Carapax active peptides

共有峰	供试品									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.166	0.172	0.166	0.166	0.168	0.175	0.175	0.176	0.170	0.169
2	0.139	0.133	0.137	0.138	0.129	0.130	0.134	0.134	0.140	0.130
3	0.267	0.255	0.265	0.267	0.262	0.251	0.263	0.256	0.249	0.249
4	0.657	0.625	0.648	0.639	0.663	0.651	0.650	0.653	0.654	0.633
5	0.401	0.404	0.419	0.405	0.413	0.415	0.416	0.427	0.429	0.438
6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
7	0.087	0.085	0.085	0.088	0.085	0.087	0.085	0.088	0.082	0.084
8	0.043	0.045	0.046	0.046	0.046	0.047	0.045	0.047	0.044	0.045
9	0.200	0.189	0.203	0.203	0.206	0.196	0.208	0.196	0.202	0.200
10	0.059	0.059	0.062	0.057	0.060	0.060	0.061	0.058	0.059	0.062
11	0.264	0.271	0.283	0.262	0.282	0.267	0.284	0.269	0.274	0.273
12	0.152	0.151	0.145	0.153	0.150	0.158	0.151	0.162	0.153	0.153
13	0.173	0.165	0.169	0.169	0.173	0.176	0.176	0.166	0.177	0.176

2.5 指纹图谱相似度评价 将 10 批供试品溶液色谱数据导入国家药典委员会“中药指纹图谱相似度评价系统”2004A 版,以对照指纹图谱为标准,进行整体相似度评价,结果 10 批样品的相似度均 > 0.9,见表 3,表明生产工艺稳定可行。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择 考察 3 种流动相体系(①三氟乙酸水-乙腈系统,②水-甲醇系统,③三氟乙酸水-甲醇系统,线性、梯度洗脱)和 2 种不同型号色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),

Agilent TC-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),结果以本实验所选流动相和色谱柱对供试品分离度好,且色谱峰数目多。

3.2 内标物的选择 考察了 3 种多肽物质,氨基酸序列分别为 Asn-Asp-Asp-Tvr (NDDY, m/z 526.2), Try-Ser-Gly-Ala-Trp (YSGAW, m/z 583.299), Asn-Pro-Asn-Pro-Thr (NPNPT, m/z 542.16)(3 种多肽均为本实验室委托上海科肽生物技术有限公司合成,纯度均 ≥ 98%)。结果表明 NPNPT 出峰位置与被分析物质的出峰位置相近,且又不共溢出,与其他

表 3 10 批鳖甲活性多肽部位相似度评价

Table 3 Smilarity evaluation of Trionycis Carapax active peptides

批次	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.982	0.962	0.967	0.984	0.958	0.957	0.955	0.960	0.970	0.983
S2	0.982	1.000	0.950	0.953	0.988	0.959	0.958	0.956	0.946	0.975	0.980
S3	0.962	0.950	1.000	0.996	0.955	0.978	0.974	0.970	0.983	0.941	0.987
S4	0.967	0.953	0.996	1.000	0.958	0.979	0.975	0.972	0.982	0.942	0.988
S5	0.984	0.988	0.955	0.958	1.000	0.964	0.965	0.961	0.956	0.988	0.985
S6	0.958	0.959	0.978	0.979	0.964	1.000	0.997	0.992	0.970	0.960	0.991
S7	0.957	0.958	0.974	0.975	0.965	0.997	1.000	0.989	0.968	0.961	0.990
S8	0.955	0.956	0.970	0.972	0.961	0.992	0.989	1.000	0.967	0.964	0.988
S9	0.960	0.946	0.983	0.982	0.956	0.970	0.968	0.967	1.000	0.948	0.983
S10	0.970	0.975	0.941	0.942	0.988	0.960	0.961	0.964	0.948	1.000	0.978
R	0.983	0.980	0.987	0.988	0.985	0.991	0.990	0.988	0.983	0.978	1.000

峰有较好的分离度。故选 NPNPT 活性多肽为内标物。

3.3 指纹图谱分析结果 通过对 10 批样品的指纹图谱分析,构建了鳖甲活性多肽部位的指纹图谱^[7-12];10 批样品指纹图谱相似度均 > 0.90,说明 10 批样品有较好的一致性。所建立的 HPLC 指纹图谱具有较好的稳定性和可控性,可用于鳖甲活性多肽部位的质量控制。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010: 361.

[2] 王英凯,王丹,唐彤宇. 鳖甲为主的中药治疗肝纤维化的实验室和临床研究[J]. 临床肝胆病杂志,2002, 18(4): 253-254.

[3] 高建蓉,陶君,张赤志,等. 鳖甲防治肝纤维化实验研究[J]. 中华中医药学刊,2008,26(11):2462-2471.

[4] 姚立,姚真敏,余涛. 鳖甲煎口服液对大鼠肝纤维化的影响[J]. 中药药理与临床,2002,18(6): 5-7.

[5] 李水清,孔菲菲,叶晓川,等. 鳖甲活性多肽的提取及膜分离纯化工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014,20(2):11-13.

[6] Ye X C, Kong F F, Li J, et al. Effect and mechanism of polypeptides of carapax trionycis on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats[C]. The 17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2014;365.

[7] 唐尹萍,陈进文,刘焱文,等. 鳖甲与醋鳖甲抗肝纤维化活性部位的化学成分比较[J]. 医药导报,2010,29 (9):1127-1129.

[8] 国家药品监督管理局. 关于印发《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》的通知[J]. 中国药品标准,2000,1(4):64-68.

[9] 梁从莲,刘红燕,崔媛,等. 金银花指纹图谱及其清除 DPPH 自由基的谱-效关系[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(17):44-46.

[10] 肖洪贺,闫艳,乐心逸,等. 葛根汤 HPLC 指纹图谱及多指标成分定量分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015,21(15):47-52.

[11] 刘妍如,宋忠兴,张严磊,等. 固肠止泻丸及中间体的多波长 HPLC-DAD 指纹图谱质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(15):65-70.

[12] 马晓青,张鹏,魏宝红,等. 柴胡龙骨牡蛎汤高效液相色谱指纹图谱的建立[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015,21(13):66-69.

[责任编辑 顾雪竹]