

一测多评法测定阿胶中4种主要氨基酸的含量

李敏¹, 郭威^{2,3}, 于珊珊¹, 周倩^{2,3}, 王亮^{3*}

(1. 济南市食品药品检验检测中心, 济南 250102;

2. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 3. 山东省中医药研究院, 济南 250014)

[摘要] **目的:**采用一测多评法测定阿胶中L-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸4种氨基酸类成分的含量。**方法:**采用HPLC法,以L-羟脯氨酸为内参物,测定与甘氨酸、丙氨酸和脯氨酸的相对校正因子,计算对应的含量,同时采用外标法测定阿胶中4个指标成分的含量,比较计算值与实测值的差异,以验证一测多评法的准确性和可行性。**结果:**L-羟脯氨酸在0.017~0.26 μg($r=0.9998$),甘氨酸在0.033~0.50 μg($r=0.9997$),丙氨酸在0.015~0.23 μg($r=0.9995$),脯氨酸在0.025~0.37 μg($r=0.9998$)与峰面积均呈现良好的线性关系,4种成分加样回收率在96.8%~98.4%,RSD均<3.0%,测得甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸对L-羟脯氨酸的相对保留时间分别为1.386,1.940和2.129,相对校正因子分别为0.642,0.975和0.951。对一测多评法的计算值和外标法的测定值进行了比较,两者无显著差异。**结论:**一测多评法在阿胶4种氨基酸类成分的含量测定中具有适用性。

[关键词] 一测多评; 相对校正因子; 阿胶; 氨基酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)04-0079-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016040079

Determination of 4 Main Amino Acids in Asini Corii Colla by Quantitative Analysis of Multi-components by Single Marker

LI Min¹, GUO Wei^{2,3}, YU Shan-shan¹, ZHOU Qian^{2,3}, WANG Liang^{3*}

(1. *Ji'nan Experimental Center for Drug and Food, Ji'nan 250102, China;*

2. *Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;*

3. *Shandong Academy of Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China*)

[Abstract] **Objective:** To establish a method of quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) for the determination of L-hydroxyproline, glycine, alanine and proline in Asini Corii Colla. **Method:** With L-hydroxyproline as the internal reference substance, the relative correction factors (RCF) of glycine, proline and alanine were determined by HPLC and were used to calculate corresponding contents. At the same time, the contents of the four amino acids were determined by external standard method, and the calculated values and estimated values were compared to ensure the accuracy and feasibility of QAMS. **Result:** The experiments showed good linear relationship at the determination ranges: L-hydroxyproline 0.017-0.26 μg ($r=0.9998$), glycine 0.033-0.50 μg ($r=0.9997$), alanine 0.015-0.23 μg ($r=0.9995$) and proline 0.025-0.37 μg ($r=0.9998$). The average recoveries of four components were from 96.8% to 98.4% and the relative standard deviations were all less than 3.0%. The RRT of glycine, alanine and proline were 1.386, 1.940 and 2.129, and the RCF were 0.642, 0.975 and 0.951, respectively. Calculated values of QAMS and estimated values of external standard method did not make significant difference. It showed that the RCF was authentic. **Conclusion:** QAMS

[收稿日期] 20150522(009)

[基金项目] 山东省科技发展计划项目(2014GSF118026);济南市青年科技明星计划专项(20120142)

[第一作者] 李敏, 硕士, 工程师, 从事中药分析与质量控制工作, Tel:0531-67883715, E-mail:568027183@qq.com

[通讯作者] *王亮, 硕士, 助理研究员, 从事中药分析与质量控制工作, Tel:0531-82949856, E-mail:wliang81@gmail.com

has the applicability and feasibility for the determination of the four amino acids ingredients in Asini Corii Colla.

[Key words] quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS); relative correction factors (RCF); Asini Corii Colla; amino acid

“一测多评”分析方法通过一个对照品实现中药多成分定量,是适合中药特点的多指标质量控制和评价模式^[1],目前已在多种药材及饮片中成功应用,如大黄及其制剂中大黄蒽醌类成分的含量测定^[2],穿心莲中内酯类成分的含量测定^[3],甘草中有效成分的含量测定^[4]等,但是在阿胶中氨基酸类化合物的应用还未见报道。

阿胶具有补血滋阴、润燥、止血的功效^[5]。《中国药典》2010 年版阿胶项下以 *L*-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸 4 种氨基酸作为指标成分,以控制阿胶的质量,目前阿胶含量测定的研究也多采用多对照品外标法定量^[6-7]。外标法需要对照品较多,检测成本较高,操作繁琐,为解决这一问题,笔者引入一测多评法对阿胶进行多指标检测。阿胶中的主要成分是胶原蛋白,*L*-羟脯氨酸是胶原蛋白中特有的氨基酸,其含量在胶原蛋白中比例基本固定^[8],且对照品较为价廉,因此选用 *L*-羟脯氨酸作为内参物,根据 *L*-羟脯氨酸与其他成分的相对校正因子(RCF),通过测定 *L*-羟脯氨酸来计算其他成分的含量,实现一测多评的目的,同时与外标法测定结果进行比较,评价该技术的可行性,为阿胶含量测定的相关研究提供数据支持。

1 材料

1.1 仪器 e2695 型高效液相色谱系统(美国 Waters 公司),1200 系列高效液相色谱系统(美国 Agilent 公司),AE 240 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),Rotavapor R-3 型旋转蒸发器(瑞士 Buchi 公司)。

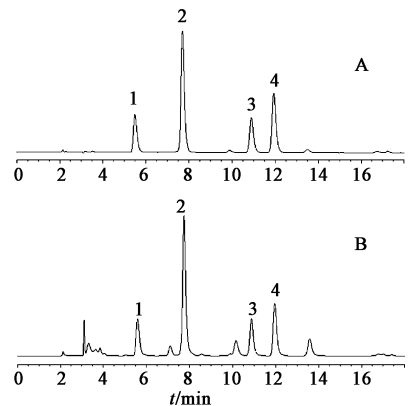
1.2 试剂 *L*-羟脯氨酸(批号 111578-200201),脯氨酸(批号 140677-201206),甘氨酸(批号 110735-200102)及丙氨酸(批号 140680-201002)对照品均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。试验用阿胶样品为不同药店购买的 10 批的阿胶产品。

2 方法与结果

2.1 含量测定和方法学考察

2.1.1 色谱条件 Sciencome Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Venusil MP-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 乙腈-0.1 mol·L⁻¹乙

酸钠溶液(用乙酸调节 pH 至 6.5)(7:93)为流动相 A,以乙腈-水(4:1)为流动相 B,梯度洗脱(0~11 min,100%~93% A;11~13.9 min,93%~88% A;13.9~14 min,88%~85% A;14~29 min,85%~66% A;29~30 min,66%~0% A),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 254 nm,进样量 5 μL,柱温 43 °C。理论塔板数按 *L*-羟脯氨酸峰计算不低于 4 000。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. *L*-羟脯氨酸; 2. 甘氨酸; 3. 丙氨酸; 4. 脯氨酸

图 1 阿胶中 4 种氨基酸 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of 4 amino acids in Asini Corii Colla

2.1.2 对照品溶液的制备 取 *L*-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸对照品适量,精密称定,加 0.1 mol·L⁻¹盐酸溶液制成每 1 mL 分别含 *L*-羟脯氨酸 85.1 μg,甘氨酸 0.167 3 mg,丙氨酸 77.0 μg,脯氨酸 0.124 7 mg 的混合溶液,作为对照品储备液。精密量取上述混合溶液 5 mL,置 25 mL 量瓶中,加入 0.1 mol·L⁻¹异硫氰酸苯酯的乙腈溶液 2.5 mL,1 mol·L⁻¹三乙胺的乙腈溶液 2.5 mL,摇匀,室温放置 1 h 后,加 50% 乙腈至刻度,摇匀。取 10 mL,加正己烷 10 mL,振摇,放置 10 min,取下层溶液,滤过,取续滤液,过 0.45 μm 滤膜,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取本品粗粉约 0.25 g,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加 0.1 mol·L⁻¹盐酸溶液 20 mL,超声处理(功率 500 W,频率 40 kHz) 30 min,放冷,加 0.1 mol·L⁻¹盐酸溶液至刻度,摇匀。精密量取 2 mL,置 5 mL 安瓿中,加盐酸 2 mL,100 °C 水解 1 h,放冷,移至蒸发皿中,用水 10 mL 分次洗涤,洗液并入蒸发皿中,蒸干,残渣加 0.1 mol·L⁻¹盐酸溶液溶解,转移至 25 mL 量瓶中,加 0.1 mol·L⁻¹盐

酸溶液至刻度, 摇匀。精密量取上述混合溶液 5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 异硫氰酸苯酯 (PITC) 的乙腈溶液 2.5 mL, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三乙胺的乙腈溶液 2.5 mL, 摇匀, 室温放置 1 h 后, 加 50% 乙腈至刻度, 摇匀。取 10 mL, 加正己烷 10 mL, 振摇, 放置 10 min, 取下层溶液, 滤过, 取续滤液, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜, 即得。

2.1.4 线性关系考察 精密量取 2.1.2 项中对照品储备液 1, 2, 3, 5, 10, 15 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 各加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 异硫氰酸苯酯的乙腈溶液 2.5 mL, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三乙胺的乙腈溶液 2.5 mL, 摇匀, 室温放置 1 h 后, 加 50% 乙腈至刻度, 摇匀。取 10 mL, 加正己烷 10 mL, 振摇, 放置 10 min, 取下层溶液, 滤过, 取续滤液, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜, 即得系列浓度的对照品溶液。各进样 5 μL , 测定 *L*-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸 4 个氨基酸成分的峰面积, 以峰面积积分值对各对照品的进样量 (μg) 进行线性回归处理, 结果见表 1。表明各对照品的样品量与峰面积积分值均呈良好线性关系。

表 1 氨基酸线性关系考察

Table 1 Results of linear relationship

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
<i>L</i> -羟脯氨酸	$Y = 645.04X + 3.495$	0.999 8	0.017 ~ 0.26
甘氨酸	$Y = 328.11X + 3.495$	0.999 7	0.033 ~ 0.50
丙氨酸	$Y = 712.89X + 3.495$	0.999 5	0.015 ~ 0.23
脯氨酸	$Y = 440.2X + 3.495$	0.999 8	0.025 ~ 0.37

2.1.5 精密度试验 取供试品溶液, 连续进样 6 次, 测定 *L*-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸 4 个氨基酸成分, 结果各成分峰面积的 RSD 分别为 0.4%, 0.08%, 1.8%, 0.4%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取阿胶 (批号 140105) 制备的供试品溶液, 分别于室温避光放置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 测定 *L*-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸 4 个氨基酸成分, 结果各成分峰面积的 RSD 分别为 1.9%, 1.5%, 0.8%, 1.5%, 表明 24 h 内, 供试品溶液稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 取阿胶 (批号 14105) 6 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 分别制备供试品溶液, 依法测定, 计算 *L*-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸含量, 结果 4 种成分含量的 RSD 分别为 0.9%, 1.1%, 1.4%, 1.2%, 表明方法的重复性良好。

2.1.8 加样回收试验 取阿胶 6 份, 每份约 0.125 g, 精密称定, 分别按样品含量-对照品 (1:1) 的大致比例加入一定量的对照品溶液, 依法提取测定, 计算各

成分的回收率。结果 *L*-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸的平均回收率分别为 97.7%, 98.4%, 98.2%, 96.8%, RSD 分别为 1.2%, 1.3%, 1.0%, 1.5%, 表明方法的准确度良好。

2.2 RCF 的测定

2.2.1 相对校正因子公式 取 2.1.2 项中混合对照品溶液, 分别进样 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL , 以公式 $f_{si} = f_s/f_i = (A_s C_i)/(A_i C_s)$ (式中 A_s 为内参物对照品峰面积, C_s 为内参物对照品浓度, A_i 为某待测成分对照品峰面积, C_i 为某待测成分对照品浓度)^[9], 分别计算 *L*-羟脯氨酸与甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸的 RCF, 结果表明在不同进样量下, *L*-羟脯氨酸对其他成分的 RCF 重复性良好, 见表 2。

表 2 *L*-羟脯氨酸与其他成分的 RCF 的测定

Table 2 Effects of different injection volume on RCF

进样量/ μL	甘氨酸	丙氨酸	脯氨酸
1	0.648	1.018	0.966
2	0.640	0.968	0.946
4	0.631	0.953	0.930
6	0.638	0.962	0.932
8	0.637	0.961	0.932
10	0.641	0.967	0.943

2.2.2 不同仪器和色谱柱对 RCF 的影响 考察了不同高效液相色谱系统和不同色谱柱对 RCF 的影响, 结果表明, 不同仪器和色谱柱对各个组分的 RCF 无显著影响。见表 3。

表 3 不同仪器和色谱柱对 *L*-羟脯氨酸与其他成分的 RCF 的影响

Table 3 Effects of different instruments and columns on RCF

仪器	色谱柱	甘氨酸	丙氨酸	脯氨酸
Agilent 1200	Agilent	0.651	0.958	0.961
	Sciencelhome	0.635	0.988	0.935
	Venusil	0.649	0.967	0.937
Waters e2695	Agilent	0.644	0.982	0.974
	Sciencelhome	0.647	0.994	0.955
	Venusil	0.638	0.975	0.962

2.2.3 RCF 的确定 综合以上对 RCF 影响因素的考察, 对所得数据取平均值, 最终确定 *L*-羟脯氨酸与甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸间的 RCF 分别为 0.642, 0.975, 0.951, RSD 分别为 1.0%, 1.9%, 1.6%。

2.3 色谱峰的定位参数考察 在仅使用 *L*-羟脯氨酸做为对照品时, 为了能够确认甘氨酸、丙氨酸和脯氨酸色谱峰的位置, 从而利用 RCF 计算其他 3 种成分的量, 达到一测多评的目的, 本实验考察了采用不同仪器和色谱柱时甘氨酸、丙氨酸和脯氨酸色谱峰与 *L*-羟脯氨酸色谱峰间的相对保留时间, 公式为

$R_{as} = t_{Ra}/t_{Rs}$ (式中 R_{as} 为相对保留时间, t_{Ra} 为待测成分对照品保留时间, t_{Rs} 为内参物保留时间)^[9], 其 RSD 均 < 5%, 可见, 与 *L*-羟脯氨酸色谱峰的相对保留时间可作为其他 3 个待测成分色谱峰的定位参数。见表 4。

表 4 不同仪器、不同色谱柱对 *L*-羟脯氨酸与其他成分的相对保留时间考察

仪器	色谱柱	甘氨酸	丙氨酸	脯氨酸
Agilent 1200	Agilent	1.389	1.956	2.143
	Sciencome	1.386	1.948	2.121
Waters e2695	Venusil	1.386	1.947	2.135
	Agilent	1.388	1.921	2.095
	Sciencome	1.377	1.960	2.130
	Venusil	1.391	1.906	2.152

表 5 阿胶中 4 种成分的含量测定结果比较

No.	<i>L</i> -羟脯氨酸		甘氨酸		丙氨酸		脯氨酸	
	外标法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	
1	9.251	19.348	19.359	7.512	7.506	11.153	11.144	
2	10.472	21.376	21.364	8.232	8.246	12.028	12.022	
3	9.746	20.883	20.871	8.014	8.021	11.839	11.831	
4	11.355	22.210	22.197	9.156	9.149	13.534	13.542	
5	10.709	21.686	21.670	8.358	8.352	12.550	12.559	
6	9.348	19.879	19.866	7.878	7.891	11.871	11.864	
7	9.767	20.093	20.108	8.074	8.089	11.951	11.956	
8	10.315	21.540	21.551	8.290	8.293	12.372	12.367	
9	9.942	20.023	20.017	8.301	8.307	12.139	12.146	
10	9.199	19.706	19.698	7.488	7.482	11.074	11.067	

果表明不同仪器和色谱柱对相对保留时间和相对校正因子影响不大。

为验证一测多评法结果的准确性, 采用外标法测定了阿胶中的 *L*-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸的量, 结果表明各成分采用相对校正因子计算的质量分数与外标法测定值之间无显著差异。一测多评法的适用性和可行性在阿胶的 4 种氨基酸类成分的定量测定中得到了验证。

本实验首次将一测多评法用于阿胶中多指标的质量评价, 研究结果表明, 在缺乏对照品的情况下, 仅使用 *L*-羟脯氨酸 1 个对照品即可对阿胶中 4 种氨基酸类成分同时进行测定, 方法准确、快捷、价廉。本方法可以实现对阿胶质量的有效控制, 并能显著降低检测成本, 具有一定的推广价值, 同时可以为一测多评法在中药质量评价中的应用推广提供数据支持。

[参考文献]

[1] 陆兔林, 石上梅, 蔡宝昌, 等. 基于一测多评的中药多成分定量研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43 (12):

2525-2529.

[2] 李树翠, 冯俭, 张秋燕, 等. 采用“一测多评”法测定大黄及其制剂中大黄蒽醌类成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20 (10): 66-71.

2.4 一测多评法和外标法的对比

取 10 批阿胶供试品溶液, 进样测定, 分别采用外标法和一测多评法测定阿胶中 *L*-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸的含量, 两种方法所得结果无显著差异。见表 5。

3 讨论

采用二极管阵列检测器, 在 190 ~ 400 nm 波长下对供试品和对照品溶液进行了全波长扫描, 结果在波长 254 nm 附近 4 个待测成分均有较强吸收, 且此波长条件下待测成分分离度良好, 故选择 254 nm 作为检测波长。

色谱峰的准确定位是保证一测多评法应用的前提, 为保证多个待测成分定位的准确性, 本实验考察了不同仪器和色谱柱对相对保留时间重复性的影响, 同时对相对校正因子的重复性也进行了考察, 结

[3] 林青, 匡艳辉, 黄琳, 等. 一测多评法测定穿心莲及其制剂中内酯类成分 [J]. 中草药, 2012, 43 (12): 2406-2411.

[4] 刘香南, 李明珠, 尚晓娜, 等. “一测多评”法测定甘草中 6 种有效成分含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (24): 56-59.

[5] 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: 189-190.

[6] 程显隆, 肖新月, 邹秦文, 等. 柱前衍生化 HPLC 法同时测定阿胶中 4 种主要氨基酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28 (12): 1997-2000.

[7] 陈萍红, 王书芳, 田守生, 等. 柱前衍生 RP-HPLC 法测定阿胶中 13 种氨基酸 [J]. 中草药, 2013, 43 (14): 1995-1998.

[8] 刘芳, 李德富, 林炜. 羟脯氨酸含量的测定方法与应用 [J]. 中国皮革, 2007, 36 (15): 51-54.

[9] 王智民, 钱忠直, 张启伟, 等. 一测多评法建立的技术指南 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36 (6): 657-658.

[责任编辑 顾雪竹]