

鹿茸柱前衍生化高效液相指纹图谱研究

武文, 李卓明, 苏冀彦, 陈志维, 曾惠芳, 苏子仁*
(广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] 目的: 建立鹿茸的柱前衍生化高效液相指纹图谱, 为科学评价及有效控制其质量提供有效可靠的方法。方法: 采用 2, 4-二硝基氟苯(DNFB) 为衍生化试剂对鹿茸药材进行处理。高效液相色谱条件为 Phenomenex Luna 5u C₁₈(2) 100R (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇-醋酸钠缓冲液梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 20 , 检测波长 360 nm。结果: 在本实验条件下测定 10 批鹿茸药材, 其色谱指纹图谱可反映鹿茸所含的 17 种氨基酸成分, 当中所含的 10 种必需氨基酸的含量与市售价格有较好的一致性。结论: 该方法精密度、稳定性、重复性好, 为鹿茸的质量控制提供了思路和导向。

[关键词] 鹿茸; 柱前衍生化法; 高效液相色谱法; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0058-04

Study on Pre-column Derivatization HPLC Fingerprint of Cornu Cervi Pantotrichum

WU Wen, LI Zhuo-ming, SU Ji-yan, CHEN Zhi-wei, ZENG Hui-fang, SU Zi-ren*
(Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] Objective: To establish a pre-column derivatization method for HPLC fingerprint analysis of Cornu Cervi Pantotrichum. **Method:** Cornu Cervi Pantotrichum was derivated by 2, 4-dinitrofluorobenzene. HPLC analysis was performed on Column Phenomenex Luna 5u C₁₈(2) 100R (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with a mixture of methanol and acetate buffer as mobile phase in gradient mode. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, wavelength was set at 360 nm, and column temperature was at 20 . **Result:** Seventeen kinds of amino acids in Cornu Cervi Pantotrichum were detected, of which 10 kinds of essential amino acids showed a concordance with the content and market price. **Conclusion:** Good precision, stability and repetition were showed. The method provides ideas and guide in the quality control of the valuable Cornu Cervi Pantotrichum.

[Key words] Cornu Cervi Pantotrichum; pre-column derivatization; HPLC; fingerprint

鹿茸(Cornu Cervi Pantotrichum)具有壮肾阳、益精血、强筋骨、调冲任、托疮毒等作用, 历来被誉为强身壮阳的佳品。由于鹿茸有多种不同的商品规格, 价钱有数 10 倍的差异, 建立高效、准确的质量控制方法尤为重要。鹿茸主要含有氨基酸类成分, 由于氨基酸类没有紫外吸收和荧光发射特性, 常规示差折光检测器对氨基酸的检出也无足够的灵敏度, 给鉴别、含量控制带来了巨大的困难。传统的氨基酸分析手段是

采用氨基酸自动分析仪测定, 该仪器对氨基酸测定的专属性较强, 但价格昂贵, 样品处理严格, 限制了其普及。本文尝试以 2, 4-二硝基氟苯(DNFB) 作为衍生化试剂, 对鹿茸中的氨基酸成分进行柱前衍生化, 使之产生紫外吸收, 可在一般的 UV-HPLC 仪器上检测, 建立了一种可检测鹿茸氨基酸的方法, 并建立了鹿茸药材的柱前衍生化高效液相指纹图谱。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Dionex Summit 高效液相色谱仪(P680 HPLC Pump, ASI-100 Automated Sampled Injector, UVD170U, PDA-100 Phtodiode Array Detector, STH585 Column Oven), Chromeleon 数据处理系统;

[收稿日期] 2009-11-30

[通讯作者] * 苏子仁, Tel: 020-39358517, E-mail: vip.suziren@gzhtcm.edu.cn

试验室专用超纯水机(重庆利迪现代水技术设备有限公司);万分之一电子分析天平(AB-204N,上海METTLER TOLEDO GROUP);电热鼓风干燥箱(CS101-1E,重庆万达仪器有限公司)。

1.2 试剂 甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.3 对照品及药材 对照品来源及批号见表 1,10 批鹿茸药材的来源(购买地点)、品种及炮制方法见表 2。

表 1 17 种氨基酸对照品来源及批号

中文名称	英文名称及缩写	来源	批号
缬氨酸	Valine (Val.)	中国药品生物制品检定所	0874-9701
亮氨酸	Leucine (Leu.)	Sigma	L-8733
丙氨酸	Alanine (Ala.)	Sigma	A-1334
精氨酸	Arginine (Arg.)	Sigma	A-4438
蛋氨酸	Methionine (Met.)	Sigma	M-0941
异亮氨酸	L-Isoleucine (Ile.)	Sigma	I-7383
脯氨酸	L-Proline (Pro.)	Sigma	P-0380
赖氨酸	DL-Lysine (Lys.)	Sigma	L-0380
天冬氨酸	L-Asparagine (Asp.)	Sigma	A-0884
酪氨酸	L-Tyrosine (Tyr.)	Nacalai tesque	357-09
丝氨酸	L-Serine (Ser.)	Sigma	S-4500
色氨酸	L-Tryptophan (Try.)	Sigma	T-0254
苯丙氨酸	L-Phenylalanine (Phe.)	Sigma	P-2126
苏氨酸	L-Threonine (Thr.)	Sigma	T-8625
组氨酸	L-Histidine (His.)	Sigma	H-8125
甘氨酸	L-Glycine (Gly.)	Sigma	G-9875
谷氨酸	L-Glutamic acid (Glu.)	Sigma	G-4633

表 2 10 批鹿茸药材的来源(购买地点)、品种、炮制方法

No.	品种	来源	炮制方法
1#	梅花鹿茸	吉林庆丰	生切片
2#	梅花鹿茸	吉林庆丰	生切片
3#	梅花鹿茸	吉林	生切片
4#	梅花鹿茸	吉林	生切片
5#	梅花鹿茸	吉林	生切片
6#	梅花鹿茸	吉林	生切片
7#	梅花鹿茸	广州杏园春药店	蜡片
8#	梅花鹿茸	广州杏园春药店	血茸蜡片
9#	梅花鹿茸	广州杏园春药店	生切片
10#	梅花鹿茸	广州杏园春药店	生切片

1.4 数据处理软件 中药色谱指纹图谱相似性评价系统软件(2004A 版,国家药典委员会)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Phenomenex Luna 5u C₁₈ (2) 100R (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相甲醇-0.1 mol·L⁻¹ 醋酸钠缓冲液,梯度洗脱,见表 3;流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长 360 nm;柱温 20 °C;进样量 10 μL。

2.2 供试品溶液的制备 取鹿茸药材粗粉约 1 g,精密称定,精密加入 25 mL 水,称重,水浴回流提取

表 3 鹿茸柱前衍生化高效液相指纹图谱流动相洗脱程序 %

流动相	0	30/min	40/min	50/min	70/min	75/min	78/min
甲醇	10	35	35	55	70	10	10
醋酸钠缓冲液	90	65	65	45	30	90	90

1h,用水补足减失的质量,滤过,精密量取续滤液 2 mL 置 5 mL 量瓶中,加入 1 mL 的 0.5 mol·L⁻¹ NaHCO₃ (pH 9.0)、1 mL 的 1.5% 的 2,4-二硝基氟苯(DNFB)乙腈溶液,摇匀,置 60 °C 烘箱中避光反应 1h,取出,冷却,加 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸钠缓冲液至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤,作为供试品溶液。

2.3 阴性对照品的制备 精密量取纯化水 2 mL 置 5 mL 量瓶中,余下操作同 2.2 项下加入 1 mL 的 0.5 mol·L⁻¹ NaHCO₃ 后,作为衍生剂阴性对照品溶液。

2.4 对照品溶液的制备 分别取各氨基酸对照品约 10 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加纯化水至刻度,得浓度为 1 g·L⁻¹ 的氨基酸对照品溶液。分别对各氨基酸对照品溶液进行衍生化,取各氨基酸对照品溶液 2 mL 置 5 mL 量瓶中,余下操作同 2.2 项下加入 1 mL 的 0.5 mol·L⁻¹ NaHCO₃ 后,作为氨基酸对照品溶液。

2.5 专属性实验及氨基酸归属 取 1#鹿茸药材,按 2.2 项下方法制备成供试品溶液,另取阴性对照品溶液、各氨基酸对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,结果显示衍生化试剂在对测定鹿茸中氨基酸成分无干扰,方法专属性良好。结果见图 1。

由图 1 可以确定主要色谱峰的归属 2, 5, 10, 11 为衍生化试剂 DNFB 产生的峰,1 为天冬氨酸(Asp.),3 为谷氨酸(Glu.),6 为丝氨酸(Ser.),7 为甘氨酸(Gly.),8 为精氨酸(Arg.),9 为苏氨酸(Thr.),12 为丙氨酸(Ala.)和脯氨酸(Pro.)的混合峰,13 为酪氨酸(Tyr.),14 为组氨酸(His),15 为缬氨酸(Val.),16 为色氨酸(Try.),17 为蛋氨酸(Met.),18 为苯丙氨酸(Phe.),19 为异亮氨酸(Ile.),20 为亮氨酸(Leu.),21 为赖氨酸(Lys.)。图谱上共可识别出鹿茸 17 种氨基酸成分。

2.6 精密度试验 取 1#鹿茸药材,制备供试品溶液,连续进样 6 次,将所得图谱以中药色谱指纹图谱相似度评价系统进行分析(多点校正,中位数法),结果表明仪器稳定,精密度良好。

2.7 稳定性试验 取 1#鹿茸药材,制备供试品溶液,分别在 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 h 各进样 1 次,将所得图谱以中药色谱指纹图谱相似度评价系统进行分析

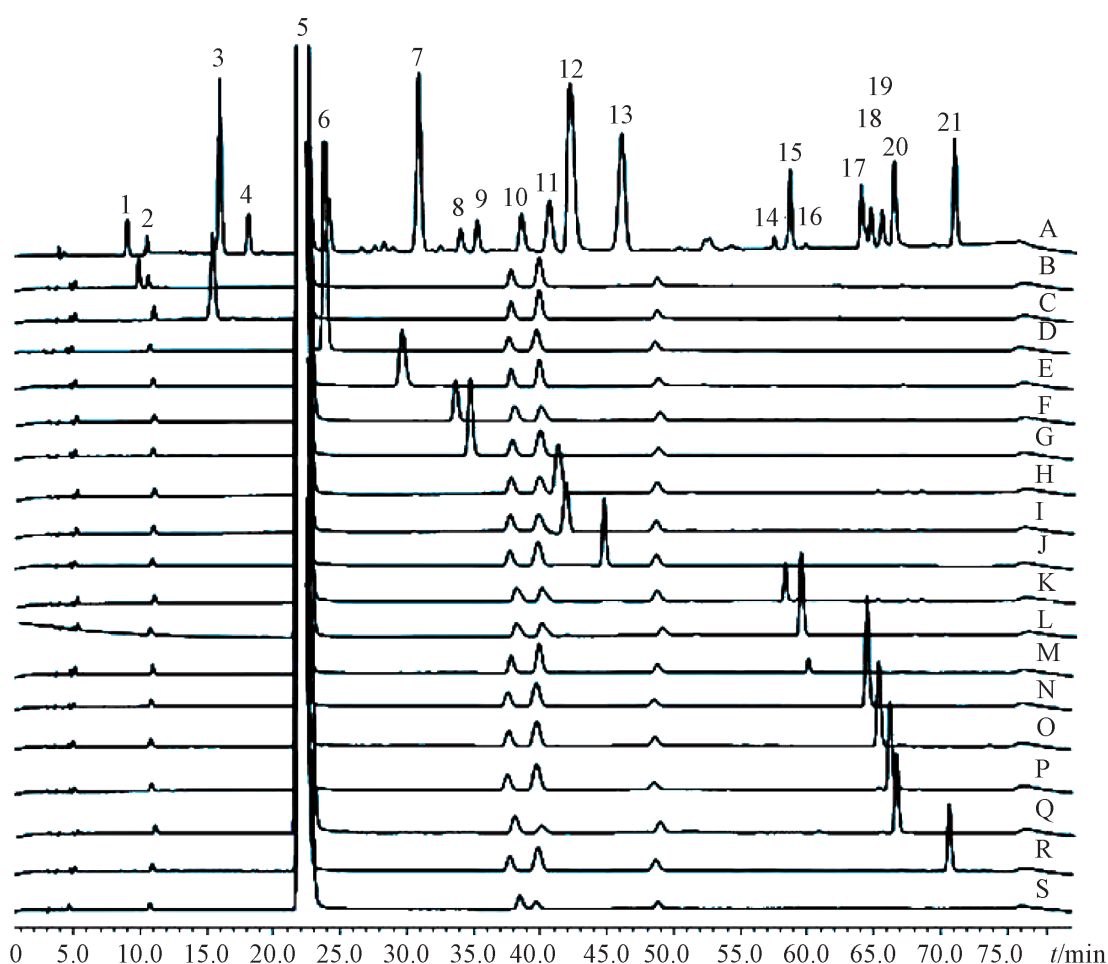


图 1 鹿茸供试品溶液、各氨基酸对照溶液及阴性对照溶液的柱前衍生化高效液相色谱图

A. 鹿茸药材; B. 天冬氨酸; C. 谷氨酸; D. 丝氨酸; E. 甘氨酸; F. 精氨酸; G. 苏氨酸; H. 丙氨酸; I. 脯氨酸; J. 酪氨酸;
K. 组氨酸; L. 缬氨酸; M. 色氨酸; N. 蛋氨酸; O. 苯丙氨酸; P. 异亮氨酸; Q. 亮氨酸; R. 赖氨酸; S. 阴性对照

(多点校正, 中位数法), 结果相似度均大于 0.99, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验 取 1#鹿茸药材, 制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 将所得图谱以中药色谱指纹图谱相似度评价系统进行分析(多点校正, 中位数法), 结果相似度均大于 0.99, 表明方法具有较好的可重复性。

2.9 10 批鹿茸药材的指纹图谱及其相似度评价 对 10 批鹿茸药材按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样分析, 图谱结果见图 2。采用国家药典委员会提供的中药色谱指纹图谱相似度评价系统对指纹图谱进行处理(多点校正, 中位数法), 结果见表 4。

表 4 10 批鹿茸药材相似度评价

No.	相似度	No.	相似度
1#	0.998	6#	0.999
2#	0.994	7#	0.880
3#	0.998	8#	0.203
4#	0.994	9#	0.989
5#	0.999	10#	0.990

评价结果显示 1# ~6#, 9#, 10# 有较好的相似性, 7#, 8# 拟合的结果提示有明显差异。7# 为精制腊片, 8# 为血茸腊片, 氨基酸含量明显高于其他 8 批, 因此与 10 批药材拟合的结果存在差异。

2.10 市售不同规格鹿茸的必需氨基酸含量比较 为考察本实验建立的鹿茸氨基酸成分柱前衍生化高效液相指纹图谱评价鹿茸药材质量的合理性, 对广州杏园春药店中销售的 4 种不同规格的鹿茸药材进行了指纹图谱检测, 以必需氨基酸含量为评价指标, 统计了所含的 10 种必需氨基酸(赖氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、组氨酸、精氨酸) 的峰面积总和占总氨基酸峰面积的比例, 计算必需氨基酸的含量, 见表 5。结果提示, 质量较佳(价格较高)的鹿茸药材中必需氨基酸含量相对较高, 不同规格的鹿茸的质量可通过必需氨基酸的含量来评价。

表 5 市售不同规格鹿茸的必需氨基酸质量分数比较

鹿茸规格	价格 (元/10g)	总氨基酸 峰面积	必需氨基酸 峰面积总和	必需氨基 酸含量/%
精制腊片	360	10 613	3 578	33.7
血茸腊片	280	24 292	7 937	32.7
生切片	60	11 980	3 058	25.5
生切片(统装)	30	15 652	3 852	24.6

3 讨论

本实验所确定的柱前衍生化高效液相分析方法, 可在同一条件下分离鹿茸所含的 17 种氨基酸成分, 方法简便易行, 重复性好, 可在普通实验室条件

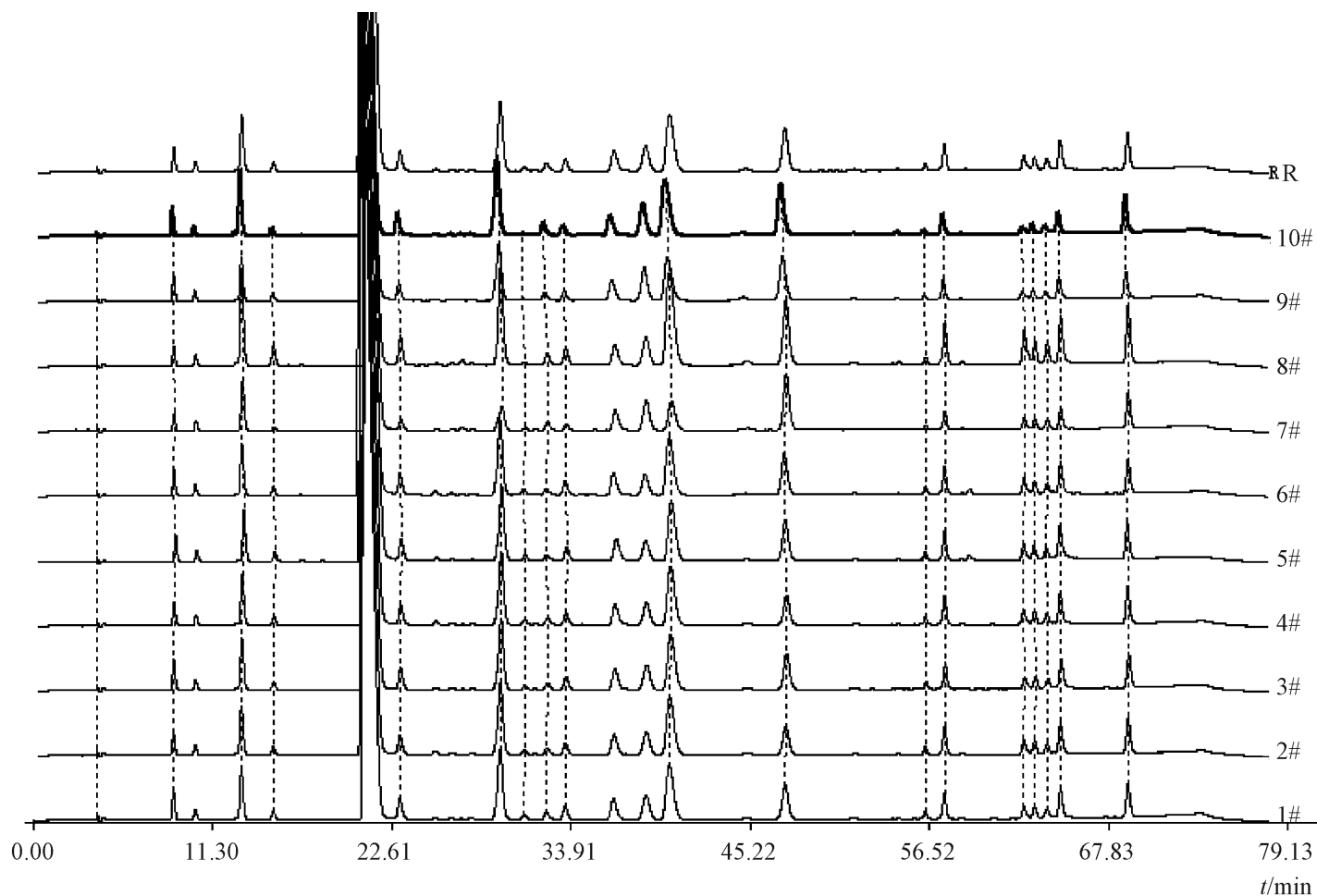


图 2 10 批鹿茸药材相似度分析图谱

下操作,其中所含的 10 种必需氨基酸的含量与市售价格有较好的一致性,提示在该条件下测得的必需氨基酸的含量与鹿茸药材的质量有一定的相关性。必需氨基酸的含量对鹿茸的药效是否有贡献,能否直接用于评价鹿茸质量的优劣,还需搜集更多的样品进行进一步研究。该方法的建立为鹿茸这一名贵药材的质量控制提供了思路和导向。

本实验测定鹿茸中的氨基酸成分应用了柱前衍生化法,该法原理为一分子氨基酸在碱性溶液中能定量地与一分子 DNFB 迅速缩合而成为二硝基苯氨基酸(DNP-氨基酸),该衍生化产物具有紫外吸收,可采用紫外检测器检测。该方法简便易行,衍生化反应易于控制,制得的 DNP-氨基酸性质稳定,与各种氨基酸的定量关系明确,为中药中氨基酸成分的分析寻找了一条有效的途径。

根据文献^[1-2],衍生化反应的最佳 pH 为 9,在 60 反应 1h,衍生化产物 DNP-氨基酸的得率较高,重复该条件可取得满意的结果,故未进一步考察衍

生化条件。

根据文献^[2],衍生化试剂的加入量最佳为 5 倍理论量,由于 DNFB 常温下为液体,较难折算成理论量准确加入,因此本实验中 DNFB 统一配制成一定的浓度,分别称取 0.1, 0.3, 0.5, 1, 1.5 g 鹿茸粗粉按供试品制备项下操作,最后统计主要氨基酸峰的峰面积与取样量的关系,具线性相关,可推知本实验所定的衍生化试剂 DNFB 加入量可保证衍生化反应完全。

[参考文献]

- [1] 钱广生,苏旭,刘三康,等. 柱前衍生化-HPLC 测定田参氨基酸胶囊中 10 种氨基酸的含量[J]. 华西药学杂志,2005,20(2):145.
- [2] 李芳,史霄燕. 2,4-二硝基氯苯衍生化法在反相高效液相色谱测定氨基酸中的应用研究[J]. 色谱,1995,13(3):200.

[责任编辑 顾雪竹]