

珍珠粉中氨基酸的高效液相色谱指纹图谱研究

晏桂敏^{1,2}, 李小龙³, 曾 苏², 孙静芸⁴, 徐淑媛¹

1. 杭州创新中药标准化研究所有限公司, 浙江 杭州 310053

2. 浙江大学 药学院, 浙江 杭州 310000

3. 浙江山下湖珍珠集团股份有限公司, 浙江 诸暨 311804

4. 浙江省中医药研究院, 浙江 杭州 310007

摘要: **目的** 参比商品珍珠粉及珍珠蚌壳粉液相指纹特征, 建立淡水养殖 1~5 年珍珠中氨基酸的液相指纹图谱以控制质量。**方法** 采用 HPLC 测定, 色谱条件: Venusil-AA 氨基酸分析柱, 乙腈 - 0.1 mol/L 的醋酸钠水溶液 (pH 6.50) 为流动相, 梯度洗脱, 检测波长 254 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 45 °C。**结果** 建立了 HPLC 指纹图谱共有模式, 得出不同品系的样本相似度分布谱带。**结论** 色谱指纹图谱分析法能准确地鉴别区分不同品系的珍珠类产品, 可为珍珠粉的质量控制和真伪鉴别提供依据和方法。

关键词: 珍珠粉; 氨基酸; 高效液相色谱; 指纹图谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2011)06-0490-05

Fingerprints of amino acids in pearl powder by HPLC

YAN Gui-min^{1,2}, LI Xiao-long³, ZENG Su², SUN Jing-yun⁴, XU Shu-yuan¹

1. Hangzhou Innovation TCM Standardization Research Institute Co., Ltd, Hangzhou 310053, China

2. School of Pharmacy, Zhejiang University, Hangzhou 310000, China

3. Zhejiang Shanxihu Pearl Group Co., Ltd., Zhuji 311804, China

4. Zhejiang Traditional Chinese Medicine Research Institute, Hangzhou 310007, China

Abstract: **Objective** To set up the HPLC fingerprints of amino acids in freshwater aquaculture pearl powder for 1—5 years and compare the fingerprints with that of commercial pearl powder and of pearl shell powder so as to establish a sensitive and specific method. **Methods** The HPLC separation was performed on a Venusil-AA analytical column (commercial spectrum column special for analyzing amino acids) and by gradient elution with acetonitrile-0.1 mol/L sodium acetate solution (pH 6.5) at the flow rate of 1.0 mL/min. The temperature of column was 45 °C. The detection wavelength was 254 nm. **Results** The common mode of HPLC fingerprints was set up and the similar degrees of commercial pearl powder and pearl shell powder to crude pearl powder were compared. **Conclusion** It is simple and rapid to identify and differentiate pearl powder collected from different sources with the method which can be used as a quality control item for pearl powder and its related products.

Key words: pearl powder; amino acids; HPLC; fingerprint

珍珠始载于《开宝本草》, 为传统的中药, 在我国已有几千年的应用历史, 具有镇惊安神、养阴熄风、明目消翳、解毒生肌等功效。当前市场珍珠品种较混乱、以次充好、以伪充真的事件常有发生, 特别是以珍珠蚌壳粉充当珍珠粉, 更是难于从表观、气味上加以鉴别。对珍珠类产品质量控制的研究有简单的理化性状鉴别、珍珠钙的测定等文献报道^[1-2]; 对含氮量、氨基酸的测定也有相关报道^[3-6], 但未见

珍珠氨基酸的指纹图谱研究。珍珠的主要有机成分是壳角蛋白, 水解后得氨基酸。不同类蛋白其水解后氨基酸的组成必然不一。本实验对珍珠粉先后经过脱钙、水解、衍生处理, 最后采用高效液相色谱法梯度洗脱, 测定分析了 1~5 年龄纯淡水养殖珍珠粉的氨基酸组成, 建立高效液相色谱指纹图谱。

1 仪器与试剂

美国 Agilent 1100 液相色谱仪及色谱工作站;

收稿日期: 2011-10-08

作者简介: 晏桂敏 (1977—), 男, 江西高安人, 硕士, 工程师, 研究方向为制药质量和制剂。Tel: (0571)86674880 E-mail: vipyg@163.com

氨基酸分析柱 Venusil-AA(250 mm×4.6 mm, 5 μm) (由杰尔科技); 正亮氨酸内标 (批号 AA0702; 质量分数 99.5%), 衍生试剂: 三乙胺 (批号 AA0702)、异硫氰酸苯酯 (批号 AA0701), 17 种氨基酸的 0.1 mol/L 盐酸混合对照品溶液 (其中天门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸为 2.5 μmol/mL, 胱氨酸 1.25 μmol/mL), 均为氨基酸分析方法包专供 (艾杰尔科技提供); 水为双蒸水, 乙腈为色谱纯 (美国默克公司), 无水醋酸钠、醋酸、盐酸、正己烷均为分析纯。一年生淡水珍珠粉 (批号 0101、0102)、二年生淡水珍珠粉 (批号 0201、0202)、三年生淡水珍珠粉 (批号 0301、0302)、四年生淡水珍珠粉 (批号 0401、0402)、五年生淡水珍珠粉 (批号 0501、0502)、某品牌淡水珍珠粉 (批号 C01)、珍珠蚌壳粉 (批号 W01; 制备方法: 珍珠蚌壳以 40% 氢氧化钠适量浸泡, 蛻去外表层后, 粉碎得类白色粉末) 均由浙江山下湖珍珠集团股份有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 内标液的制备

准确称取正亮氨酸适量, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液使溶解, 制成 1 mg/mL 内标液。

2.2 供试品溶液的制备

称取珍珠粉约 10 g 于 500 mL 烧杯中, 加水 10 mL, 搅拌调和成糊状。搅拌下, 缓慢分次加入过量的 6 mol/L 盐酸酸化 4 次, 每次 10 mL, 放置, 待泡基本消退后, 取合适大小的滤纸抽滤, 以水洗滤至洗液呈中性, 得橙黄色或桔黄色粗蛋白, 备用。

称取粗蛋白约 10 mg 于 15 mL 耐温耐压瓶中, 准确加入 6 mol/L 盐酸 5 mL, 加盖密封, 置于 110 ℃下, 水解 24 h。取出, 放冷, 将水解液移至蒸发皿中, 水浴蒸干, 残渣以水溶解, 移入 10 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 微孔滤膜精滤, 取续滤液 100 μL 置 2 mL 小瓶中, 依次准确加入 14%三乙胺乙腈溶液、异硫氰酸苯酯乙腈溶液 (25 μL/2 mL) 各 50 μL, 再加正亮氨酸内标溶液 10 μL, 加盖, 混匀, 置于 (28±0.5) ℃下衍生 90 min, 取出, 加正己烷 400 μL, 振摇, 静置 10 min, 取下层溶液, 即得。

2.3 氨基酸混合对照品溶液的制备

取“氨基酸分析方法包”提供的 17 种氨基酸混合对照品溶液 100 μL 置 2 mL 小瓶中, 按“2.2”项, 自“依次准确加入 14%的三乙胺乙腈溶液”起, 至

“取下层溶液”止, 同法操作, 即得。

2.4 空白衍生溶液的制备

取蒸馏水 100 μL 置 2 mL 小瓶中, 按“2.2”项, 自“依次准确加入 14%三乙胺乙腈溶液”起, 至“取下层溶液”止, 同法操作, 即得。

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 色谱条件与系统适用性试验 Venusil-AA 分析柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以 0.1 mol/L 醋酸钠水溶液 (pH 6.50) 为流动相 A, 以乙腈为流动相 B, 进行梯度洗脱 (表 1); 检测波长 254 nm、柱温 45 ℃、体积流量 1 mL/min、进样量 2 μL。理论板数按正亮氨酸峰计算应不低于 1.1×10^5 , 与其他峰的分离度均大于 1.0, 所有组分均在 60 min 内检测完, 色谱图见图 1。

表 1 梯度洗脱

Table 1 Elution program

<i>t</i> / min	流动相 B/%	流动相 A/%
0~0.1	3→0	97→100
0.1~7.0	0→10	100→90
7.0~16.8	10→12	90→88
16.8~17.2	12→22	88→78
17.2~30.0	22→23	78→77
30.0~38.0	23→35	77→65
38.0~45.0	35→80	65→20
45.0~52.0	80	20

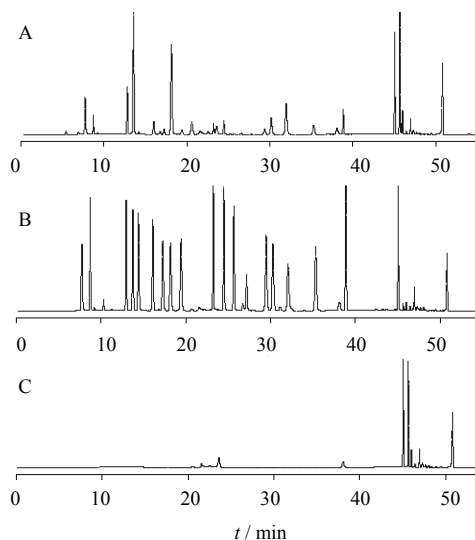


图 1 珍珠粉氨基酸 (A)、氨基酸对照品 (B) 及空白衍生溶液 (C) 色谱图

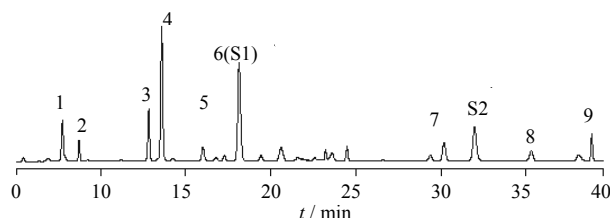
Fig. 1 Chromatograms of amino acids in pearl powder (A), amino acids reference substances (B), and blank (C)

2.5.2 精密度试验 取一年生珍珠粉(批号 0101)制备供试品溶液,重复进样 6 次,记录指纹图谱。利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版软件计算相似度,结果均大于 0.9;各特征峰相对保留时间 RSD 均小于 0.90%,相对峰面积 RSD 均小于 0.34%。

2.5.3 稳定性试验 取一年生珍珠粉(批号 0101)制备供试品溶液,分别于 0、1、2、4、8 h 进样分析,记录指纹图谱,相似度计算结果均大于 0.9;各特征峰相对保留时间 RSD 均小于 0.92%,相对峰面积 RSD 均小于 0.36%,表明样品在 8 h 内稳定,可满足分析要求。

2.5.4 重现性试验 取一年生珍珠粉(批号 0101)6 份制备供试品溶液,记录指纹图谱,相似度计算结果均大于 0.9;各特征峰相对保留时间 RSD 均小于 0.70%,相对峰面积 RSD 均小于 2.99%。

2.5.5 山下湖淡水珍珠氨基酸指纹图谱的建立 称取 1~5 年生珍珠粉 10 批次(每龄两批次)适量依次制备得供试品溶液 1~10,分别进样,进行 HPLC 分析,得淡水珍珠氨基酸指纹图谱及 9 个特征峰(图 2),并生成对照图谱(R),见图 3。计算得 10 批次样品 9 个特征峰的相对峰面积技术参数(表 2)。其中样品自源性 6(S1)峰为相对峰面积参照峰,内标出峰 S2(正亮氨酸)为相对保留时间参照峰。



1-天冬氨酸 2-谷氨酸 3-丝氨酸 4-甘氨酸 5-精氨酸
6(S1)-丙氨酸 7-亮氨酸 S2-正亮氨酸 8-苯丙氨酸 9-赖氨酸
1-Asp 2-Glu 3-Ser 4-Gly 5-Arg 6(S1)-Ala 7-Leu S2-Leu
8-Phe 9-Lys

图 2 珍珠氨基酸指纹图及特征峰标识

Fig. 2 Fingerprints of amino acids in pearl powder and marking of characteristic peak

2.5.6 商品珍珠粉、蚌壳粉氨基酸指纹图谱的相关技术参数 分别称取商品珍珠粉、蚌壳粉样品适量,按“2.5.5”项下方法,进行 HPLC 分析,得到商品珍珠粉和蚌壳粉氨基酸中 9 个特征峰的相对峰面积技术参数(表 2)。

2.6 数据处理

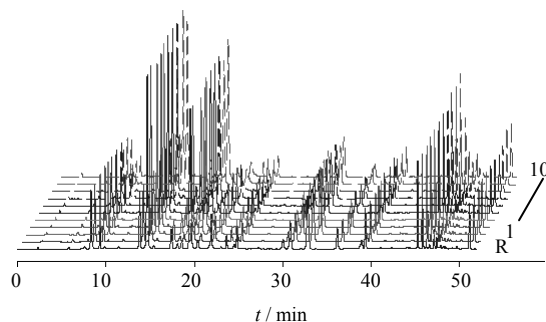


图 3 1~5 年生珍珠粉及生成的共有模式

Fig. 3 Pearl powder (aged from 1—5 year) and common pattern generated

2.6.1 系统聚类分析^[7] 用软件 Minitab 对 1~5 年生纯珍珠粉、商品珍珠粉及珍珠蚌壳粉的氨基酸 HPLC 的 9 个特征峰与内参比峰 S1(丙氨酸)的相对峰面积所得到的 14×8 阶原始数据矩阵作聚类分析。采用离差平方和法,利用欧氏距离作为样品的测度。聚类谱系图见图 4。

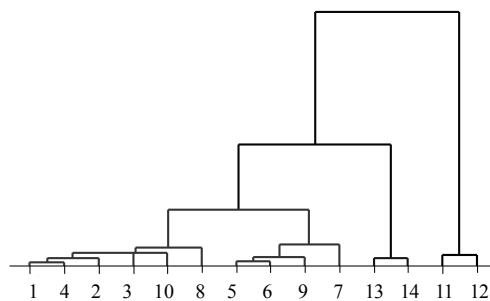


图 4 聚类谱系树状图(Minitab 软件结果截图)

Fig. 4 Dendrogram of clustering analysis (Minitab software)

结果显示,以上述方法采集数据,结合软件 Minitab 聚类分析,能很好地将 1~5 年生纯珍珠粉、商品珍珠粉及珍珠蚌壳粉聚类区分。1~5 年不同珠龄纯珍珠粉之间的指纹数据无法进行聚类区分,即不具有珠龄区分特征。

2.6.2 相似度分析 利用 Excel 软件,函数公式 CORREL 计算样品组与标准对照组的相关系数,汇总分析见表 3。

结果显示,相关系数可为不同品系的判定指标,相关系数不小于 0.999 为珍珠粉纯品,0.996~0.999 为本品商品珍珠粉,小于 0.996 为非本品。

2.7 指纹特征分析与判定

以各特征峰相对峰面积为真伪鉴定的依据,参

表 2 1~5 年生珍珠、商品珍珠粉及蚌壳粉氨基酸液相指纹图谱结果

Table 2 Fingerprint of amino acids in pearl powder (aged from 1—5 year), commercial pearl powder, and pearl shell powder

编号(批号)	各峰相对峰面积									<i>r</i>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1(0101)	0.295 4	0.106 0	0.335 7	0.989 8	0.131 6	1.000 0	0.226 9	0.144 0	0.189 4	0.999 91
2(0102)	0.296 9	0.107 3	0.338 3	1.000 1	0.132 8	1.000 0	0.231 0	0.142 7	0.192 3	0.999 92
3(0201)	0.289 7	0.102 7	0.333 3	0.975 9	0.128 8	1.000 0	0.224 1	0.139 2	0.184 1	0.999 86
4(0202)	0.293 4	0.106 3	0.336 5	0.989 3	0.128 1	1.000 0	0.228 0	0.140 3	0.186 7	0.999 87
5(0301)	0.286 9	0.102 3	0.307 9	0.982 8	0.127 0	1.000 0	0.223 8	0.138 0	0.183 3	0.999 88
6(0302)	0.281 9	0.098 5	0.306 1	0.985 8	0.129 0	1.000 0	0.221 5	0.140 8	0.180 1	0.999 83
7(0401)	0.286 4	0.100 4	0.317 3	0.955 8	0.128 8	1.000 0	0.219 5	0.137 6	0.174 4	0.999 95
8(0402)	0.303 1	0.109 7	0.339 6	1.014 7	0.134 7	1.000 0	0.229 6	0.143 5	0.190 1	0.999 94
9(0501)	0.282 4	0.100 7	0.294 6	0.977 9	0.130 1	1.000 0	0.223 6	0.140 6	0.179 7	0.999 53
10(0502)	0.291 5	0.105 9	0.318 7	0.997 5	0.132 6	1.000 0	0.227 5	0.141 4	0.184 2	0.999 96
对照	0.290 0	0.100 0	0.320 0	0.990 0	0.130 0	1.000 0	0.230 0	0.140 0	0.180 0	1.000 00
11(W01-1)	0.214 2	0.076 2	0.215 2	0.884 3	0.106 4	1.000 0	0.201 9	0.128 5	0.130 6	0.994 77
12(W01-2)	0.215 8	0.075 6	0.220 4	0.904 3	0.109 7	1.000 0	0.200 6	0.129 8	0.130 6	0.994 95
13(C01-1)	0.276 9	0.098 5	0.279 0	1.061 1	0.126 9	1.000 0	0.216 3	0.148 7	0.153 0	0.997 45
14(C01-2)	0.285 3	0.103 9	0.285 4	1.055 9	0.130 8	1.000 0	0.220 8	0.149 0	0.155 6	0.997 81

对照组数据为 1~5 年生纯珍珠粉 10 批数据的均值

Data in control group are mean for data of ten batches of pure pear powder during 1—5 years

表 3 相关系数分布汇总表

Table 3 Total results of correlation coefficient

名 称	<i>r</i>	系数谱带
1~5 年生纯珍珠粉	0.999 91、0.999 92、 0.999 86、0.999 87、 0.999 88、0.999 83、 0.999 95、0.999 94、 0.999 53、0.999 96	0.999 96~0.999 53
商品珍珠粉	0.998 45、0.997 81	0.997 81~0.997 45
珍珠蚌壳粉	0.994 95、0.994 77	0.994 95~0.994 77

照珍珠氨基酸指纹图及特征峰标识(图 2),各特征峰相对峰面积均值和区间分别为 1 号峰 0.29(0.26~0.32);2 号峰 0.10(0.09~0.12);3 号峰 0.32(0.28~0.35);4 号峰 0.99(0.90~1.1);5 号峰 0.13(0.14~0.12);6 号峰基准峰(常数 1,不列入运算);7 号峰 0.22(0.21~0.24);8 号峰 0.14(0.13~0.15);9 号峰 0.18(0.17~0.20)。

判定规则:当样品各特征峰相对峰面积超出上下限 10%(包括 10%)为非本品;以均值为标准对照组,通过 Excel 软件函数 CORREL 计算样品组与标准对照组的相关系数,相关系数大于 0.999 为珍

珠粉纯品,0.996~0.999 为本品商品珍珠粉,小于 0.996 为非本品。

3 讨论

3.1 特征峰的确立原则

满足系统适用性好、重现性好,非空白干扰峰等方法学要求;建模样品所共有,本实验为 1~5 年共 10 批样品共有;特征峰为氨基酸峰,本实验研究的重点即为“珍珠氨基酸的指纹研究”。

3.2 相关系数

相关系数是评价相似度的重要指标,分析样品与标准数模建立时的基准物相似度越强,相关系数越接近 1.0,反之,越小。相关系数进行相似度判定的另一个特点是不同品系的样品,相似度往往有相对固定的分布范围,从而形成分布谱带,可以据此判断样品的归属,如本实验中珍珠蚌壳粉和商品珍珠粉。值得强调说明的是,数模建立时,品系样品数量越丰富,相似度谱带分布越清晰,越有利于未知样品的分析判定。

3.3 实验存在的问题

样本数量有限,淡水珍珠采集仅局限于浙江山下湖珍珠集团股份有限公司养殖基地,故标准数模和判定规则的运用有一定的适用范围。但仍希望样

品的处理、数据的采集以及数模的建立等方法流程对相关的后续研究能有一定参考意义。

参考文献

- [1] 易建文, 杨 宇. 珍珠的鉴别及体会 [J]. 中药材, 1999, 22(7): 339-340.
- [2] 梁健明. 珍珠片剂中钙含量的测定 [J]. 广东微量元素科学, 1999, 6(7): 49-50.
- [3] 叶碧莎, 宋悦华. 可溶性珍珠粉的氨基酸总量测定 [J]. 广西预防医学, 2002, 8(6): 366-367.
- [4] 郑华保, 吴晓华. 珍珠层粉中氨基酸的含量测定 [J]. 中药材, 1998, 21(6): 316.
- [5] 金凤明, 冯学伟, 李桂贞. 珍珠角壳蛋白中氨基酸的高效液相色谱分析 [J]. 华东理工大学学报, 2001, 27(1): 103-105.
- [6] 黄耀海, 席 萍, 王安西. 珍珠层粉不同水解方法中的含氮量比较及氨基酸分析 [J]. 中药材, 1994, 17(5): 32-33.
- [7] 段和祥, 刘永锁, 罗国安, 等. 程度相似度结合聚类分析在金银花药材质量评价中的应用 [J]. 中成药, 2007, 29(3): 318-321.

“十二五”国家重点图书出版规划项目《植物药活性成分大辞典》已经出版



植物中的活性成分是植物药发挥疗效的物质基础,植物活性成分研究是阐释植物药的生物活性、临床疗效和毒性的必要手段,也是新药发现和创制的可行途径,更是中药药效物质基础研究、质量控制以及配伍合理性及作用规律研究的前提和基础。近些年来,随着国际上植物化学以及天然药物化学学科的迅速发展,大量的植物活性成分被研究和报道,形成大量、丰富的植物活性成分研究的信息源。但是,这些资料作为原始文献散在于成千上万的中外学术期刊上,不能满足读者对植物活性成分的系统了解、方便查阅和迅速掌握的需要。

天津药物研究院在国家科技部和原国家医药管理局新药管理办公室支持下,在建立“植物活性成分数据库”的基础上,组织科研人员经过几年的艰苦努力编纂了大型工具书《植物药活性成分大辞典》。

本套书分上、中、下共 3 册,共收载植物活性成分 8 719 个,约 700 万字。正文中每个活性成分包含英文正名、中文正名、异名、化学名、结构式、分子式和相对分子量、理化性状(晶型、熔点、溶解性、旋光、紫外、红外、质谱、氢谱和碳谱)、植物来源、生物活性等内容。并于下册正文后附有 3 种索引——植物药活性成分中文名、植物药活性成分英文名和植物拉丁学名索引。

全书涵盖大量国内外专业期刊的翔实数据,内容丰富、信息量大,具有反映和体现信息趋时、简便实用的特色;编者在注重数据科学性、系统性的同时,着眼于全球药物研发前沿需求和我国市场实际应用的结合,为新药研究人员选题、立项、准确评价成果提供快速、简便、有效的检索途径,为植物药的开发、利用提供疗效优异、结构独特的活性分子或先导化合物。

该书已批准列入“十二五”国家重点图书出版规划项目,于 2011 年 11 月由人民卫生出版社出版发行,大 16 开精装本,每套定价 588 元。