

## 指纹图谱技术评价不同干燥方式对地龙氨基酸组分提取物的影响

黄文芳<sup>1,3</sup>, 石召华<sup>1,2\*</sup>, 陈立军<sup>2,3</sup>

1. 湖北李时珍药物研究院, 湖北 武汉 430073

2. 武汉爱民制药有限公司, 湖北 鄂州 436070

3. 湖北省天然组分药物工程技术研究中心, 湖北 鄂州 436070

**摘要:** **目的** 对不同干燥方式所得地龙氨基酸组分提取物进行指纹图谱测定方法的研究, 比较不同干燥方式对地龙氨基酸组分提取物品质的影响。 **方法** 采用异硫氰酸苯酯柱前衍生化反相高效液相色谱法, 测定并比较真空冷冻干燥、真空减压干燥和微波干燥 3 种方式所得地龙干燥样品以及未经干燥样品的指纹图谱, 以中药色谱指纹图谱相似度评价系统计算相似度, 并进行图谱比较和指认分析。 **结果** 建立了不同干燥技术处理的地龙氨基酸组分提取物高效液相指纹图谱, 确定了 17 个共有峰, 同一干燥方法不同批次干燥产品的镜像度较高, 具有良好的相似性 ( $>0.9$ ), 不同干燥方法所得提取物之间有一定的质量差异。 **结论** HPLC 指纹图谱分析法可较全面的反映不同干燥技术处理的地龙氨基酸组分提取物间的差异, 可用于同类提取物干燥工艺的质量控制和工艺评价。冷冻干燥法是地龙氨基酸组分提取物最适宜的干燥方法。

**关键词:** HPLC 指纹图谱; 地龙; 氨基酸; 柱前衍生; 异硫氰酸苯酯; 冷冻干燥

**中图分类号:** R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2015)03-0297-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.03.014

## Effects of drying methods on *Pheretima* amino acid components extract by HPLC fingerprint technology

HUANG Wen-fang<sup>1,3</sup>, SHI Zhao-hua<sup>1,2</sup>, CHEN Li-jun<sup>2,3</sup>

1. Lishizhen Institute of Natural Medicine, Wuhan 430073, China

2. Wuhan Aimin Pharmaceutical Co. Ltd., Ezhou 436070, China

3. Hubei Engineering Technology Centre of Natural Component Medicine, Ezhou 436070, China

**Abstract: Objective** To study HPLC fingerprint methods of *Pheretima* amino acid components extract obtained by different drying methods and compare the effect of different drying methods on the quality of *Pheretima* amino acid components extract. **Methods** After derivatization of amino acids in *Pheretima* extract with taking phenyl isothiocyanate as derivatization reagent, the amino acids were analyzed by HPLC fingerprint technology. *Pheretima* extract was dried by vacuum freeze-drying, vacuum drying, and microwave drying. The similarity of chromatograms was calculated using a professional software named Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Chinese Pharmacopoeia Committee Version 2004A). **Results** Seventeen common peaks were identified in the *Pheretima* amino acid components extract by HPLC fingerprint. The chromatograms of different batches of product dried by the same drying methods present a good similarity ( $>0.9$ ). There are certain quality differences in the extract by the different drying methods. **Conclusion** The quality control and process evaluation of herbal extracts by HPLC fingerprint technology are simple and reliable. The optimal drying method for *Pheretima* extract is vacuum freeze-drying.

**Key words:** HPLC fingerprint; *Pheretima*; amino acids; pre-column derivatization; phenyl isothiocyanate; freeze-drying

广地龙为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的干燥体, 其性味咸寒, 有清热熄风、降压平喘、通络利尿之功效<sup>[1]</sup>。现代研究表明, 地龙有溶栓<sup>[2]</sup>、抗肿瘤<sup>[3]</sup>、降压<sup>[4]</sup>等药理活

性, 其药用价值备受重视。研究发现地龙氨基酸含量及组成与其药理作用有很大关系<sup>[5-6]</sup>。广地龙中含有丙氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、赖氨酸等多种氨基酸, 成分复杂<sup>[7]</sup>。而在含地龙的中成药的

收稿日期: 2015-01-12

作者简介: 黄文芳 (1987—), 女, 硕士, 从事中药及天然药物研究。E-mail: huangwenfangjiayou@126.com

\*通信作者 石召华 (1978—), 男, 博士, 高级工程师, 主要从事中药资源和质量研究。Tel: (0711)3818216 E-mail: whymyf@163.com

工艺研究中,大多数仅仅采用测定单一或某几个氨基酸作为评价工艺优劣的指标。采用单一指标进行工艺评价是不能表征中药通过多成分、多途径、多环节、多靶点实现疗效的药效学特点的。

指纹图谱是近年来用于表征中药中多成分特征的分析方法<sup>[8-9]</sup>,以指纹图谱作为中药天然药物提取物及其制剂的质量控制方法已成为目前国际共识<sup>[10]</sup>。本研究借鉴指纹图谱方法,采用异硫氰酸苯酯柱前衍生化反相高效液相色谱法<sup>[11-12]</sup>,建立了地龙氨基酸组分的 HPLC 指纹图谱,并用于考察地龙提取物不同干燥工艺下氨基酸组分的图谱变化,优选地龙氨基酸提取物的干燥工艺。

## 1 仪器与材料

RE-5298 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);LYO-0.5 (CIP) 真空冷冻干燥机(上海东富龙科技股份有限公司);DZG-6020 型真空减压干燥箱(上海森信实验仪器有限公司);HWZ-5B 箱式微波真空干燥机(广州兴兴微波能设备有限公司);MA45 红外水分测定仪(德国赛多利斯公司);安捷伦 1260 液相色谱仪系统(美国安捷伦公司);电子分析天平(梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司);相似度软件为“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(中国药典委员会)。

17 种混合氨基酸对照品溶液(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、胱氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸)、衍生试剂 A(异硫氰酸苯酯-乙腈溶液)和衍生试剂 B(三乙胺-乙腈溶液)均来自月旭公司氨基酸分析包。三水合醋酸钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);冰醋酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);乙腈(HPLC 级,美国 TEDIA 试剂);正己烷(HPLC 级,美国 TEDIA 试剂);实验用水为娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团)。地龙药材经湖北省药学会中药鉴定分会陈科力教授鉴定为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的干燥体,产地、批号及来源见表 1。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Ultimate Amino Acid AAA 氨基酸分析柱(250 mm×4.6mm, 5 μm);体积流量 1.0 mL/min;柱温 40 ℃;进样量 5 μL;检测波长 254 nm。流动相 A 为 0.1 mol/L 醋酸钠溶液(pH 6.5) -

乙腈(93:7);流动相 B 为水-乙腈(20:80),二元梯度洗脱,洗脱条件见表 2。

表 1 地龙样品来源

Table 1 Sources of *Pheretima*

| 样品编号 | 产地 | 批号       | 来源            |
|------|----|----------|---------------|
| S1   | 佛山 | 20131106 | 广州市清平中药材市场    |
| S2   | 平远 | 20131107 | 广州市清平中药材市场    |
| S3   | 龙门 | 20131101 | 亳州市华美药业销售有限公司 |
| S4   | 茂名 | 20131102 | 亳州市华美药业销售有限公司 |
| S5   | 韶关 | 20131201 | 安徽泰源中药饮片公司    |
| S6   | 灵山 | 20131202 | 安徽泰源中药饮片公司    |
| S7   | 钦县 | 20131108 | 广州市清平中药材市场    |
| S8   | 北流 | 20140101 | 安国市顺全隆中药材有限公司 |
| S9   | 容县 | 20140102 | 安国市顺全隆中药材有限公司 |
| S10  | 梧州 | 20140103 | 安国市顺全隆中药材有限公司 |

表 2 梯度洗脱条件

Table 2 Gradient elution program

| t/min | A%    | B%    |
|-------|-------|-------|
| 0.01  | 100.0 | 0.0   |
| 11    | 93.0  | 7.0   |
| 13.9  | 88.0  | 12.0  |
| 14    | 85.0  | 15.0  |
| 29    | 66.0  | 34.0  |
| 32    | 30.0  | 70.0  |
| 35    | 0.0   | 100.0 |
| 42    | 0.0   | 100.0 |
| 45    | 100.0 | 0.0   |
| 60    | 100.0 | 0.0   |

### 2.2 样品的制备

**2.2.1 参照物溶液的制备** 取 Welch 公司 17 种氨基酸混合对照品溶液用水稀释至原来浓度的 1/10 倍作为对照品溶液。

**2.2.2 地龙药材提取物的制备** 称取地龙粗粉 10 g,加水 100 mL,浸泡 60 min,超声处理(250 W, 50 Hz) 60 min, 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,备用。

**2.2.3 地龙氨基酸提取物的不同干燥样品的制备** 以含水量低于 5%为干燥标准,精密量取地龙药材提取物,分别采用真空减压干燥、真空冷冻干燥和微波干燥 3 种方式干燥地龙氨基酸组分提取物。

真空冷冻干燥工艺:预冻温度为-40 ℃,时间 3 h;升华干燥温度 20 ℃,升温时间 2 h,时间为 8 h;解析温度为 40 ℃,时间为 8 h;工作压力 10~

30 Pa。

真空减压干燥工艺：温度控制在 40 ℃左右，真空度控制在-0.09 MPa，提取液的相对密度控制在 1.25 左右，时间为 4 h。

微波干燥工艺：将金属温度探头置于样品表面测量温度，调节一定的微波功率进行辐射（通过间隙辐射控制温度在 40 ℃以下）。

**2.2.4 衍生步骤** 分别将 A、B 两种衍生试剂用稀释剂稀释至原来浓度的 1/5 倍，精密量取“2.2.1”项所制备对照品溶液 1 mL，置于试管中，加入稀释后的 A 溶液 0.5 mL 和稀释后的 B 溶液 0.5 mL，涡旋混合 1 min，在 50 ℃水浴中加热 45 min，取出，加入正己烷溶液 1 mL，振摇，涡旋混合 1 min，静置 30 min，吸取下层澄清液体，用孔径为 0.45 μm 有机滤膜滤过，即得。供试品溶液稀释到适宜浓度后的衍生步骤与对照品相同。

## 2.3 方法学考察

**2.3.1 精密度试验** 取“2.2.4”项下的衍生化后供试品溶液，按照上述色谱条件连续进样 6 次。将 6 次测定图谱转化为 AIA 格式后依次导入相似度软件，输出 17 个共有峰峰面积的 RSD 为 0.12%~3.43%，保留时间的 RSD 为 0.04%~0.31%，表明仪器精密度良好。

**2.3.2 稳定性试验** 取“2.2.4”项下制备的同一份衍生化后供试品溶液，在上述色谱条件下，分别在 0、2、4、6、8、12、24、48、72 h 进样，进行测定。测定图谱转化为 AIA 格式后依次导入相似度软件，输出 17 个共有峰峰面积的 RSD 为 0.17%~2.81%，保留时间的 RSD 为 0.03%~0.13%，实验结果表明样品在 72 h 内稳定。

**2.3.3 重复性试验** 取“2.2.4”项下的平行制备的 6 份衍生化后供试品溶液，按照上述色谱条件进行测定。测定图谱转化为 AIA 格式后依次导入相似度软件，输出 17 个共有峰峰面积的 RSD 为 0.41%~3.58%，保留时间的 RSD 为 0.03%~0.15%，实验结果表明方法的重复性良好，证明分析方法和提取工艺的稳定性及可靠性。

## 2.4 不同干燥工艺比较

**2.4.1 样品测定及指纹图谱的建立** 按“2.2.2”项制备 10 批地龙药材提取物，按“2.2.4”项衍生化方法进行衍生化，按“2.1”项色谱条件进行测定，除衍生试剂外的其他色谱峰均积分。将 10 批地龙氨基酸组分提取物图谱导入相似度软件，计算相似度，

10 批地龙氨基酸组分提取物的相似度在 0.99 以上，说明提取工艺的稳定性及重复性良好。将地龙氨基酸组分提取物按“2.2.3”项的 3 种干燥工艺各制备干燥样品的供试品溶液各 10 批，按“2.2.4”项衍生化方法进行衍生化，按“2.1”项色谱条件进行测定，得到各供试样品。

**2.4.2 指纹图谱分析** 氨基酸组分提取物及 3 种干燥工艺干燥样品经与 17 种氨基酸对照峰比较，发现地龙药材中含有 17 种游离氨基酸成分，峰 1~17 为地龙氨基酸组分提取物中含有的 17 种氨基酸成分，分别为门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、胱氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸。其中谷氨酸、丝氨酸、精氨酸、丙氨酸、胱氨酸、蛋氨酸、酪氨酸、赖氨酸等含量较高，门冬氨酸、甘氨酸、组氨酸、苏氨酸、脯氨酸、缬氨酸、异亮氨酸含量较低，峰 10 胱氨酸在 HPLC 图谱中分离良好，含量较高且稳定，所以选择胱氨酸为参照峰。以胱氨酸为参照峰，共标示了 17 个共有峰。见图 1。

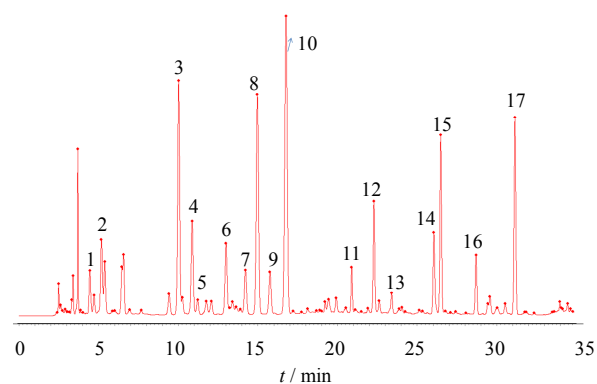
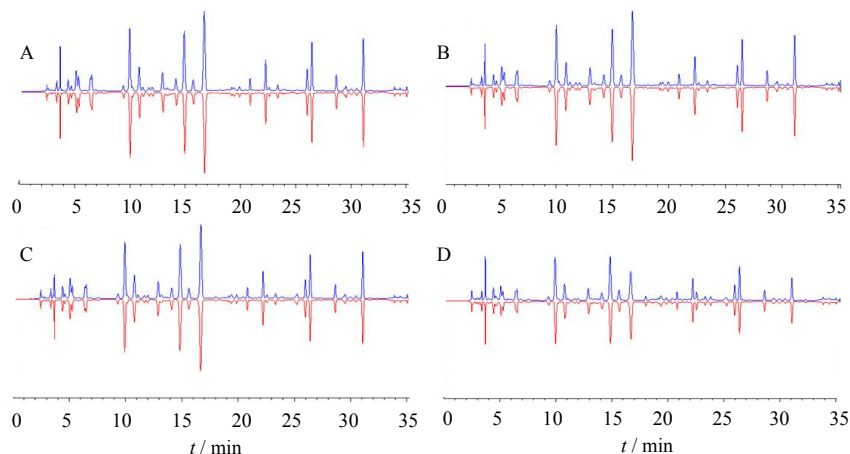


图 1 地龙氨基酸组分提取物参照图谱

Fig. 1 Reference fingerprint of *Pheretima* amino acid components extract

**2.4.3 共有模式图谱镜像** 分别量取未经干燥样品以及 3 种干燥工艺制备的样品适量，按“2.2.4”项下衍生化方法制备供试品溶液，测定。运用指纹图谱软件处理，分别建立该 4 种样品的 HPLC 共有指纹图谱模式，以各工艺 10 批样品的 HPLC 指纹图谱共有模式与编号 1 样品的指纹图谱进行对比，结果见图 2，表明镜像度比较高。

**2.4.4 相似度分析** 将 10 批地龙氨基酸组分提取物图谱导入相似度软件，以未经干燥样品为参照，计算相似度。10 批地龙原药材指纹图谱见图 3。



A-原药材 (未经干燥) B-冻干样品 C-减压干燥样品 D-微波干燥样品

A-raw materials (undried) B-freeze-drying samples C- vacuum drying samples D-microwave drying samples

图2 不同干燥工艺制备提取物与共有模式图谱镜像对比

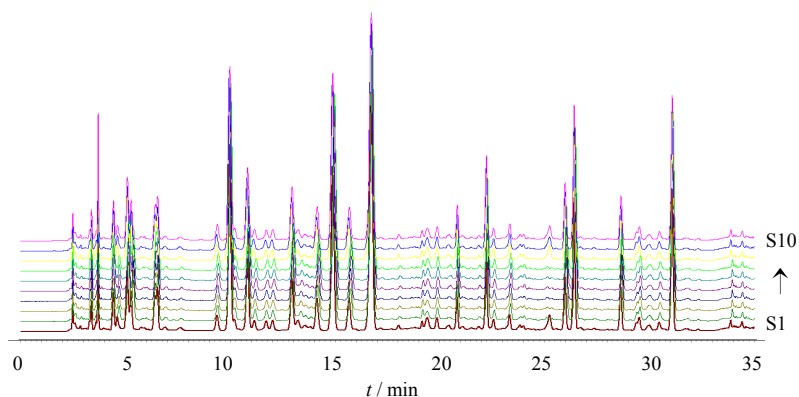
Fig. 2 Common pattern fingerprint mirror of *Pheretima* amino acid components extract prepared by different drying processes

图3 10批地龙提取物指纹图谱

Fig.3 HPLC fingerprint of 10 batches *Pheretima* amino acid components extract

运用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件,对不同干燥工艺制备的10批样品检测结果进行相似度分析,以未经干燥的地龙药材氨基酸组分提取物图谱作为参照图谱,相似度分析包括相关系数法和夹角余弦法,结果见表3,说明各干燥工艺制备的不同批次提取物均具有良好的相似性(>0.9)。其中冻干工艺样品的相似度均在0.99以上,减压干燥样品的相似度均在0.98以上,微波干燥样品的相似度均在0.93以上。从相似度分析结果可以看出,减压干燥和真空冷冻干燥方式均能较好的保持地龙氨基酸组分提取物的原有品质,结合外观性状等其他指标,真空冷冻干燥样品为淡黄色疏松块状物,且样品具有良好的复溶性,因此,真空冷冻干燥方

法是更适合地龙氨基酸组分提取的干燥方式。

### 3 讨论

现阶段氨基酸分析中应用较广的是柱前衍生-高效液相色谱法。异硫氰酸苯酯<sup>[13-14]</sup>作为衍生化试剂具有衍生物单一、稳定,衍生副产物对HPLC测定无干扰,衍生化反应速度快,一、二级氨基酸均可被测定的优点,是目前应用较广泛的方法。本实验采用异硫氰酸苯酯作为柱前衍生化试剂来测定地龙氨基酸组分提取液中的氨基酸。

相似度分析结果充分显示了不同干燥工艺下地龙氨基酸组分提取物的质量差异,表明HPLC指纹图谱技术在中药提取物干燥工艺质量控制方面具有优势,能够较好的体现中药的整体疗效与物质总量

表3 不同干燥工艺制备的提取物的相似度分析

Table 3 Similarity analysis of extract prepared by different drying processes

| 冻干  | 相关系数    | 夹角余弦    | 减压干燥 | 相关系数    | 夹角余弦    | 微波干燥 | 相关系数    | 夹角余弦    |
|-----|---------|---------|------|---------|---------|------|---------|---------|
| S1  | 0.997 1 | 0.997 4 | S11  | 0.989 7 | 0.990 4 | S21  | 0.932 7 | 0.937 6 |
| S2  | 0.997 6 | 0.997 8 | S12  | 0.990 4 | 0.991 0 | S22  | 0.942 1 | 0.945 9 |
| S3  | 0.997 6 | 0.997 7 | S13  | 0.989 8 | 0.990 5 | S23  | 0.925 7 | 0.931 0 |
| S4  | 0.996 8 | 0.997 0 | S14  | 0.990 0 | 0.990 8 | S24  | 0.938 3 | 0.942 3 |
| S5  | 0.995 8 | 0.996 1 | S15  | 0.989 3 | 0.990 1 | S25  | 0.926 8 | 0.931 8 |
| S6  | 0.995 4 | 0.995 7 | S16  | 0.986 5 | 0.987 5 | S26  | 0.937 6 | 0.941 9 |
| S7  | 0.995 8 | 0.996 1 | S17  | 0.987 4 | 0.988 3 | S27  | 0.941 6 | 0.945 7 |
| S8  | 0.994 7 | 0.995 0 | S18  | 0.987 1 | 0.988 0 | S28  | 0.940 4 | 0.944 6 |
| S9  | 0.994 5 | 0.994 9 | S19  | 0.987 1 | 0.988 1 | S29  | 0.941 1 | 0.945 4 |
| S10 | 0.993 8 | 0.994 1 | S20  | 0.986 3 | 0.987 2 | S30  | 0.932 1 | 0.936 5 |

的关系,可为中成药的工艺研究、中药材炮制研究提供参考。对比相似度分析结果可以看出冷冻干燥方法能够最大限度的保持地龙氨基酸组分提取液的品质,冷冻干燥法是地龙氨基酸组分提取液最适宜的干燥方法。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 2010.
- [2] 毕燕芳, 马书林. 中药地龙中溶栓成分研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(8): 60-62.
- [3] 余艳秋, 陈 洪. 蚯蚓提取物抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2007, 12(3): 232-234.
- [4] 李承德, 康 白, 毛淑梅, 等. 地龙降压蛋白对自发性高血压大鼠血管紧张素及内皮素含量的影响 [J]. 中国医药导报, 2008, 5(21): 11-13.
- [5] 刘亚明, 郭继龙, 刘必旺, 等. 中药地龙的活性成分及药理作用研究进展 [J]. 山西中医, 2011, (3): 48-49.
- [6] 周 琼, 陆大祥, 付咏梅, 等. 甘氨酸对小鼠心肌缺血性损伤的防治作用研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2002, (4): 25-27.
- [7] 裴福成, 李长新, 任桂萍. 柱前衍生 HPLC 法测定地龙中氨基酸的含量 [J]. 中医药学报, 2007, (3): 30-31.
- [8] 陈林伟, 秦昆明, 徐雪松, 等. 中药指纹图谱数据库的研究现状及展望 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3041-3047.
- [9] 李 强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [10] 徐为公, 徐 鹏. 中药提取物的国际化策略 [J]. 中药研究与信息, 2005, 7(10): 34-34.
- [11] Checa-Moreno R, Manzano E, Mirón G, *et al.* Revisitation of the phenylisothiocyanate-derivatives procedure for amino acid determination by HPLC-UV [J]. *J Sep Sci*, 2008, 31(22): 3817-3828.
- [12] 杨 智, 阳利龙, 祝文兵, 等. 异硫氰酸苯酯柱前衍生化 RP-HPLC 法测定人血浆中 10 种氨基酸的浓度 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2011, (5): 75-78.
- [13] 宋志峰, 王 丽, 纪 锋, 等. 氨基酸分析中的柱前衍生技术 [J]. 吉林农业科学, 2004, 29(6): 54-58.
- [14] 杨 菁, 孙黎光, 白秀珍, 等. 异硫氰酸苯酯柱前衍生化反相高效液相色谱法同时测定 18 种氨基酸 [J]. 色谱, 2002, 20(4): 369-371.