

异硫氰酸苯酯衍生化-HPLC 法测定龟甲中胶原蛋白

骆 达¹, 李惠芬^{1*}, 李秀兰², 周 静¹, 杜 凡¹, 王 丽¹

(1. 天津医科大学药学院, 天津 300070; 2. 天津医院骨科研究所, 天津 300211)

摘要:目的 采用异硫氰酸苯酯衍生化法分析龟甲中胶原蛋白。方法 龟甲中胶原蛋白经酸水解后分解为含有羟脯氨酸的氨基酸混合物, 经异硫氰酸苯酯衍生化后, 以 0.1 mol/L 醋酸钠溶液-乙腈(94:6, pH6.5)与乙腈-水(80:20)为二元流动相, 经 C₁₈ 色谱柱分离, 254 nm 处测定羟脯氨酸。通过测定样品中羟脯氨酸的量来计算样品中胶原蛋白的量。结果 羟脯氨酸在 0.02~0.20 mg/mL 时与峰面积呈良好的线性关系, 回收率为 102.0%。结论 建立的龟甲中胶原蛋白的 HPLC 分析方法分离效果好、准确、快速、干扰少。

关键词: 龟甲; 羟脯氨酸; 异硫氰酸苯酯; 胶原蛋白; 高效液相色谱

中图分类号: R286.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2008)06-0851-02

龟甲是乌龟的干燥腹甲, 具有滋阴潜阳、益肾强骨、养血、补心等功能。胶原蛋白是人与动物机体的主要结构蛋白, 也是一种促纤维细胞生长因子, 其特有的低抗原性、可生物降解性、生物吸收性、止血性能及促进细胞生长等功能^[1], 使其越来越多地应用于皮肤创伤^[2,3]与骨折愈合^[4]等临床治疗。羟脯氨酸是胶原蛋白的特异性氨基酸, 其他蛋白中几乎没有, 且比较稳定。本实验采用柱前衍生化法定性、定量分析了龟甲中的羟脯氨酸, 并计算胶原蛋白的量^[5], 获得了满意的结果。

1 仪器与材料

美国 Waters515 型双泵高效液相色谱仪, Millennium³² 色谱管理系统; WH-2 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器有限公司)。

L-羟脯氨酸由 Sigma 公司提供, 其他氨基酸由天津天安药业股份有限公司提供, 质量分数均大于 99%; 异硫氰酸苯酯(Fluka); 龟甲购于天津市中药饮片厂, 经天津中医药大学第一附属医院尚英和药师鉴定为乌龟 *Chinemys reevesii* (Gray) 背甲; 乙腈、正己烷为色谱纯, 重蒸水自制, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 衍生化试剂的配制: 取 0.3 mL 异硫氰酸苯酯置于 25 mL 棕色量瓶中, 乙腈定容, 质量浓度为 0.1 mol/L。摇匀, 作为衍生化试剂, 每日更换。三乙胺-乙腈(139:861)作为干燥试剂。

2.2 衍生化步骤: 精密移取 200 μ L 对照品或供试品溶液, 分置于 1.5 mL 离心管中, 依次精密吸取 100 μ L 干燥试剂和 150 μ L 衍生化试剂, 涡旋振荡 5 min, 静置 1 h 使其充分反应, 再于离心管中精密移

入 200 μ L 正己烷, 涡旋振荡 5 min, 放置 10 min, 吸取下层溶液进样。

2.3 色谱条件: 色谱柱为 Phenomenex C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为 0.1 mol/L 醋酸钠溶液-乙腈(94:6, pH 6.5)(A)-乙腈-水(80:20)(B), 梯度洗脱: 0~3 min, 6%B, 3~6 min, 16%B, 6~7 min, 70%B, 7~8 min, 100%B, 8 min 以后, 0%B; 检测波长为 254 nm; 柱温为 40 $^{\circ}$ C; 体积流量为 1 mL/min。

2.4 供试品溶液的制备: 准确称取 0.5 g 100 目龟甲粉末, 置 150 mL 平底烧瓶中, 加入 6 mol/L HCl 20 mL, 于 100 $^{\circ}$ C 水解 6 h, 趁热滤过置 100 mL 量瓶中, 残渣用重蒸水反复冲洗, 冷却后加重蒸水至刻度, 准确吸取以上溶液 10 mL, 60 $^{\circ}$ C 旋转蒸干, 后加入 1 mL 重蒸水, 再次旋干, 如此反复 3 次后, 用 0.1 mol/L HCl 转移至 10 mL 量瓶中, 定容, 摇匀。0.45 μ m 滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.5 标准曲线的绘制: 精密称定一定量 L-羟脯氨酸对照品置于 10 mL 量瓶中, 0.02 mol/L HCl 稀释定容, 配制成 1 mg/mL 对照品储备液备用。精密吸取羟脯氨酸对照品储备液一定量配制成 0.02、0.05、0.08、0.10、0.12、0.15、0.20 mg/mL 对照品系列, 各自衍生化后进样 5 μ L。以羟脯氨酸质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归分析, 得回归方程为 $Y=2 \times 10^7 X+17\ 725$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 0.02~0.20 mg/mL。

2.6 精密度试验: 精密吸取供试品溶液 200 μ L, 衍生化后连续 6 次, 每次进样 5 μ L, 结果羟脯氨酸峰面积的 RSD 为 1.07%。

收稿日期: 2007-10-16

基金项目: 天津市科委技术发展计划重点项目(023617011)

作者简介: 骆 达(1982-), 男, 天津市人, 天津医科大学药学院硕士研究生, 研究方向为药物分析。

* 通讯作者 李惠芬 Tel(022) 23529243 E-mail: lihuifen@tjmu.edu.cn

2.7 重现性试验:取批号 20061001 样品,平行制备 6 份供试品溶液,衍生化后进样 5 μL ,测定,计算羟脯氨酸质量分数,结果其 RSD 为 1.12%。

2.8 稳定性试验:取供试品溶液 200 μL ,衍生化后在室温放置 0、2、4、6、8、12 h 后分别测定,计算得羟脯氨酸峰面积 RSD 为 1.08%,表明龟甲羟脯氨酸供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.9 回收率试验:吸取 9 份各 100 μL 供试品溶液,再各自加入 0.08、0.10、0.12 mg/mL 羟脯氨酸对照品溶液 100 μL ,制备供试品溶液,进行测定,计算,结果平均回收率为 102.0%,RSD 为 2.47%。

2.10 其他氨基酸干扰试验:考察了 13 种常见氨基酸(门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、精氨酸、苏氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸)对羟脯氨酸测定的影响。结果表明其他氨基酸与羟脯氨酸均成很好的分离,不影响羟脯氨酸的定性、定量分析,色谱图见图 1。

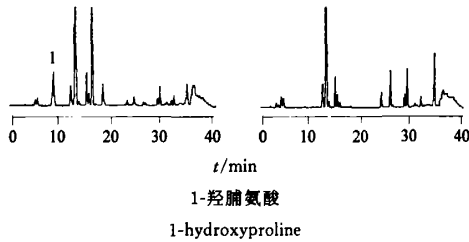


图 1 龟甲样品(A)和无羟脯氨酸混合氨基酸(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of *C. reevesii* (A) and mixed amino acids reference substances without hydroxyproline (B)

2.11 龟甲中羟脯氨酸的测定:取 4 批龟甲样品,每批分别处理 3 份,经衍生化后进样测定,并计算龟甲中羟脯氨酸的质量分数。由于羟脯氨酸在胶原蛋白中的质量分数为 10%^[4],因此可以通过计算得龟甲中胶原蛋白的量。测定结果见表 1,色谱图见图 2。

表 1 龟甲中羟脯氨酸的测定结果(n=4)

Table 1 Determination of hydroxyproline content in *C. reevesii* (n=4)

批号	羟脯氨酸/(mg·g ⁻¹)	胶原蛋白/%
20060801	14.13	14.1
20060815	14.20	14.2
20061001	14.33	14.3
20061015	14.39	14.4

3 讨论

由于胶原蛋白不溶于冷水,但溶于热水,故有研究用龟甲水煎液灌胃后的大鼠含药血清,观察其对骨髓间质干细胞体外增值的影响,结果表明龟甲水

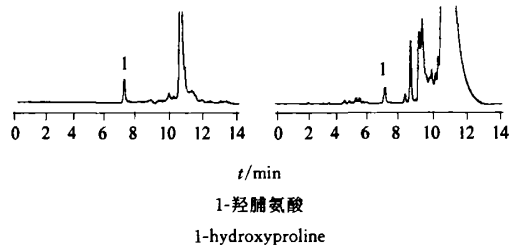


图 2 羟脯氨酸对照品(A)和龟甲样品(B)的 HPLC 色谱图
Fig. 2 HPLC Chromatogram of hydroxyproline reference substance (A) and *C. reevesii* (B)

煎液的含药血清可促进骨髓间质干细胞的增殖而有利于细胞 DNA 的合成^[6],局部种植骨髓间质干细胞不仅利于皮肤的再生与愈合,对于难治的慢性皮肤创伤也有很好的疗效,另外骨髓间质干细胞也能加快骨形成的速度^[7]。由此可推断,龟甲中胶原蛋白是促进皮肤与骨修复愈合的主要药效成分,这与胶原蛋白可以修复愈合皮肤和骨的临床疗效是一致的。

胶原蛋白特异氨基酸羟脯氨酸的衍生化方法很多,一般分为柱前衍生和柱后衍生两类,柱后衍生化设备一次性投入大,不便于普通实验室应用;柱前衍生化相对简单,主要包括异硫氰酸苯酯、6-氨基喹啉-N-(羟基琥珀酰亚胺基)氨基甲酸酯(AQC)、邻苯二甲醛和丹酰氯 4 种方法。AQC 法要求 pH 值和洗脱温度控制必须准确;邻苯二甲醛法只能与伯氨反应,二级氨不能被同时检测,另外邻苯二甲醛法衍生化后的邻苯二甲醛-氨基酸稳定性很差;丹酰氯法所生成的衍生物在紫外光下不稳定,易分解;故本实验采用异硫氰酸苯酯法衍生化。该法适于普通实验室分析胶原蛋白,且简单、快速、适用于龟甲胶原蛋白的分析。

参考文献:

- [1] 刘慧玲,王 栋,章金刚. 胶原蛋白在临床医学中的应用[J]. 北京生物医学工程,2005, 24(3): 239-241.
- [2] 陈静涛,徐 政,顾其胜. 胶原蛋白研究的最新进展[J]. 上海生物医学工程,2004, 25(2): 52-55.
- [3] Maeda M, Tani S, Sano A. Microstructure and release characteristics of the minipellet, a collagen based drug delivery system for controlled release of protein drugs [J]. *J Controlled Release*, 1999, 62: 313-324.
- [4] 杨志明,余希杰,黄富国,等. 外源性 I 型胶原对人胚骨膜成骨细胞生物学特性的影响[J]. 华西医科大学学报, 2001, 32(1): 1-4.
- [5] 邹晓莉,黎源倩,曾红燕,等. 反相高效液相色谱法测定人肌腱中的胶原蛋白[J]. 色谱, 2006, 24(3): 263-266.
- [6] 周健洪,陈东风,黎 晖,等. 龟板含药血清对大鼠骨髓间质干细胞体外增值的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2005, 22(1): 35-38.
- [7] 王 珍,徐根波. 骨髓间质干细胞及其临床应用的研究进展[J]. 国外医学:内科学分册,2006, 33(2): 85-88.

异硫氰酸苯酯衍生化-HPLC法测定龟甲中胶原蛋白

作者: 骆达, 李惠芬, 李秀兰, 周静, 杜凡, 王丽

作者单位: 骆达, 李惠芬, 周静, 杜凡, 王丽(天津医科大学药学院, 天津, 300070), 李秀兰(天津医院骨科研究所, 天津, 300211)

刊名: 中草药 ISTIC PKU

英文刊名: CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS

年, 卷(期): 2008, 39(6)

被引用次数: 4次

参考文献(7条)

1. 刘慧玲, 王栋, 章金刚. 胶原蛋白在临床医学中的应用[期刊论文]-北京生物医学工程 2005(03)
2. 陈静涛, 徐政, 顾其胜. 胶原蛋白研发的最新进展[期刊论文]-上海生物医学工程 2004(02)
3. Maeda M, Tani S, Sano A. Microstructure and release characteristics of the minipellet, a collagen based drug delivery system for controlled release of protein drugs[外文期刊] 1999(3)
4. 杨志明, 余希杰, 黄富国. 外源性I型胶原对人胚骨膜成骨细胞生物学特性的影响[期刊论文]-华西医科大学学报 2001(01)
5. 邹晓莉, 黎源倩, 曾红燕. 反相高效液相色谱法测定人肌腱中的胶原蛋白[期刊论文]-色谱 2006(03)
6. 周健洪, 陈东风, 黎晖. 龟板含药血清对大鼠骨髓间质干细胞体外增殖的影响[期刊论文]-广州中医药大学学报 2005(01)
7. 王珍, 徐根波. 骨髓间质干细胞及其临床应用的研究进展[期刊论文]-国外医学(内科学分册) 2006(02)

本文读者也读过(9条)

1. 沈婷. 浅谈复方炉甘石外用散在感染伤口中的应用[期刊论文]-中国中医药现代远程教育2009, 7(8)
2. 王棘, 毕开顺. 柱前衍生-异硫氰酸苯酯法测定宁心宝胶囊中水解氨基酸[期刊论文]-中草药2008, 39(7)
3. 薄层扫描法测定龟甲中胆甾4, 6-二烯-3醇的含量[期刊论文]-医药导报2005, 24(11)
4. 姜大成, 王永生, 雷钧涛, 许艳梅. 龟甲滋阴化学成分的初步研究[会议论文]-2001
5. 郑家概, 王飞, 农云军, 闫世平, 李光宪, ZHENG Jia-gai, WANG Fei, NONG Yun-jun, YAN Shi-ping, LI Guang-xian. 柱前衍生高效液相色谱法对动物组织中胶原蛋白的测定[期刊论文]-分析测试学报2008, 27(12)
6. 雷钧涛. 龟甲及其混淆品的性状和成分研究[期刊论文]-第四军医大学吉林军医学院学报2005, 26(1)
7. 李毓群, 陆维承. 龟甲炮制工艺沿革及合理性探讨[期刊论文]-中国中医药信息杂志2006, 13(9)
8. 楼步青, 张诚光, LOU Bu-qing, ZHANG Cheng-guang. 龟甲的提取工艺筛选[期刊论文]-中医药导报2005, 11(12)
9. 黄哲甄, 隋玉荣, 李海生, 孙长海, Huang Zhesu, Sui Yurong, Lee Haisheng, SUN Changhai. 异硫氰酸苯酯柱前衍生法测定安尿通中3种氨基酸含量[期刊论文]-现代仪器2005, 11(2)

引证文献(4条)

1. 石森, 李惠芬, 李新元. 工业提取重楼薯蓣皂苷元的工艺研究[期刊论文]-天津药学 2010(5)
2. 陈静, 刘昌勇, 杜红岩, 杜兰英, 付建敏, 李钦. 杜仲叶饲料添加剂对鸡肉及鸡皮中胶原蛋白含量的影响[期刊论文]-河南大学学报(医学版) 2011(1)
3. 王新雨, 谭晓梅, 陈飞龙, 汤庆发, 张文新. HPLC-ELSD法测定醋龟甲中羟脯氨酸[期刊论文]-中草药 2011(7)
4. 周芳妍, 刘力. 胶类中药质量控制方法研究进展[期刊论文]-中国药业 2013(1)