

象皮 HPLC 指纹图谱研究

周永梅^{1,3}, 刘素香², 许 浚², 房德敏³, 薛 坤⁴, 张铁军^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 天津市天津医院 药学部, 天津 300211

4. 天津中医药大学第一附属医院 制剂室, 天津 300193

摘要: **目的** 建立象皮 HPLC 指纹图谱分析方法, 为其质量控制以及开发应用提供实验依据。**方法** 用 6 mol/L 盐酸溶液水解象皮中的氨基酸, 以异硫氰酸苯酯 (PITC) 为柱前衍生剂, 用 Hypersil ODS-2 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 40 ℃。利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”对其进行相似度评价。**结果** 建立了象皮 HPLC 指纹图谱共用模式, 确定 18 个共有峰, 并根据对照品指认 17 个共有峰, 10 批象皮药材具有较高的相似度, 可反映象皮所含的 17 种氨基酸成分。**结论** 首次建立了象皮的指纹图谱分析方法。该方法简便、快速, 可为象皮质量的全面控制提供科学依据。

关键词: 象皮; 氨基酸; HPLC; 指纹图谱; 相似度分析

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)13-1980-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.13.021

HPLC fingerprint of Chinese materia medica elephant skin

ZHOU Yong-mei^{1,3}, LIU Su-xiang², XU Jun², FANG De-min³, XUE Kun⁴, ZHANG Tie-jun²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Department of Pharmacy, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China

4. Department of Preparation, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the fingerprint analysis on Chinese materia medica (CMM) elephant skin so as to provide the evidence for the quality control and application of elephant skin. **Methods** To extract amino acids by the method of hydrolysis in 6 mol/L HCL and use phenyl isothiocyanate (PITC) as the derivating agent. The Hypersil ODS-2 C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. Under the condition of gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the UV detection wavelength was 254 nm, and the column temperature was 40 ℃. The similarity was analyzed with “Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM 2004A”. **Results** The HPLC characteristic fingerprint of elephant skin has been established. A total of 18 common peaks were characterized, and 17 of them were identified by comparing their retention time with reference substances. The result showed that the amino acid constituents had a high similarity. Seventeen kinds of amino acids in elephant skin were detected. **Conclusion** It is the first time to establish the HPLC fingerprint of elephant skin. The method is simple and quick, which provides the scientific basis for the comprehensive quality control of elephant skin.

Key words: elephant skin; amino acids; HPLC; fingerprint; similarity analysis

象皮为象科动物亚洲象 *Elephas maximus* L. 或非洲象 *Elephas africanus* Blumenbach 的皮, 具有止血、敛疮的功效, 治外伤出血及创伤、溃疡久不收

口。《本草纲目》对象皮记载: “治下疳, 烧灰和油敷之。又治金疮不合”^[1]。现代药理研究表明, 象皮有显著的促进肉芽组织生长的作用, 有利于创伤的

收稿日期: 2015-03-17

基金项目: 天津市中医药管理局资助项目 (13122)

作者简介: 周永梅 (1975—), 女, 天津中医药大学 2012 级在职硕士研究生, 天津医院药学部副主任中药师。E-mail: yymzym@163.com

*通信作者 张铁军 E-mail: zhangtj@tjipr.com

修复愈合^[2],其主要药效成分为胶原蛋白,且富含多种氨基酸类成分。动物实验和临床研究资料显示,适量补充氨基酸有利于创伤后机体的伤口愈合与功能恢复^[3]。目前,《中国药典》、《部颁药材标准》均未收载象皮,地方中药材标准中象皮仅有性状鉴别、显微鉴别及氨基酸、蛋白质的理化鉴别方法,《中药大辞典》中有性状鉴别^[4],象皮药材标准几乎为空白。本实验采用柱前衍生化的方法,建立象皮中氨基酸成分的 HPLC 指纹图谱,为象皮的质量控制以及开发利用提供实验依据。

1 材料

高效液相色谱仪(UV6000LP 二极管阵列检测器,AS3000 型进样器,OV-2001 型柱温箱,均为赛默飞世尔科技公司);AB204-N 型万分之一天平(Mettler Toledo 公司);AS3120 型超声仪(奥特宝恩斯仪器有限公司);XMTB 型水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司)。

乙腈(色谱纯,天津康科德科技有限公司),甲醇(色谱纯,天津康科德科技有限公司),三水合乙酸钠(分析纯),冰醋酸(分析纯),超纯水。17 种氨基酸对照品(批号 140624-200805):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、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸;L-羟脯氨酸(批号 111578-200201)均购自中国食品药品检定研究院。异硫氰酸苯酯(PITC,批号 1041634)购自上海晶纯生化科技股份有限公司,质量分数为 98%。

象皮药材由天津市天津医院制剂室提供,经天津药物研究院张铁军研究员鉴定,均为象科动物亚洲象 *Elephas maximus* L. 或非洲象 *Elephas africanus* Blumenbach 的皮。象皮采用滑石粉烫至发泡,呈深黄色,粉碎成细粉,药材信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Hypersil ODS-2 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相 A 为乙腈-0.1 mol/L 醋酸钠溶液(用冰醋酸调节 pH 值至 6.5)(3:97),流动相 B 为乙腈-水(4:1),按表 2 进行梯度洗脱。体积流量 1 mL/min,检测波长 254 nm,柱温 40 ℃,进样量 5 μL。

2.2 供试品溶液制备

取象皮粉约 0.2 g,精密称定,置 10 mL 安瓿中,加 6 mol/L 盐酸溶液 6 mL,110 ℃水解 12 h,放置至室温,过滤至 50 mL 量瓶中,残渣用纯化水反复

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

编号	产地	批号	拉丁名
S1	非洲	303031	<i>E. africanus</i>
S2	非洲	901131	<i>E. africanus</i>
S3	云南	131215	<i>E. maximus</i>
S4	云南	140526	<i>E. maximus</i>
S5	非洲	403031	<i>E. africanus</i>
S6	云南	120424	<i>E. maximus</i>
S7	云南	110618	<i>E. maximus</i>
S8	非洲	504131	<i>E. africanus</i>
S9	非洲	402031	<i>E. africanus</i>
S10	云南	130112	<i>E. maximus</i>

表 2 梯度洗脱程序

Table 2 Gradient elution conditions

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	100	0
11	93	7
13.9	88	12
14	85	15
29	66	34
35	20	80
36	0	100
41	0	100
46	100	0

冲洗,加纯化水至刻度,摇匀。精密量取以上溶液 5 mL,蒸干,用 0.1 mol/L 盐酸溶液转溶至 10 mL 量瓶中,定容,即得。

2.3 对照品溶液制备

精密称取天冬氨酸等 17 种氨基酸对照品于量瓶中,加 0.1 mol/L 盐酸溶液制成分别含天冬氨酸 43 μg/mL、谷氨酸 122 μg/mL、L-羟脯氨酸 84 μg/mL、丝氨酸 44 μg/mL、甘氨酸 210 μg/mL、组氨酸 29 μg/mL、苏氨酸 101 μg/mL、丙氨酸 56 μg/mL、精氨酸 75 μg/mL、脯氨酸 103 μg/mL、酪氨酸 66 μg/mL、缬氨酸 78 μg/mL、甲硫氨酸 60 μg/mL、异亮氨酸 43 μg/mL、亮氨酸 77 μg/mL、苯丙氨酸 91 μg/mL、赖氨酸 105 μg/mL 的混合对照品溶液,即得。

2.4 柱前衍生方法

精密量取供试品溶液及对照品溶液各 2 mL,分别置 10 mL 离心管中,依次加 1 mol/L 三乙胺的乙

腈溶液 1.0 mL 和 0.1 mol/L PITC 的乙腈溶液 1.0 mL, 漩涡混合 5 min, 室温放置 1 h 后, 加正己烷 4 mL, 漩涡混合 5 min 后, 放置 10 min, 取下层溶液, 再加正己烷 4 mL, 振摇, 放置 10 min, 取下层溶液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液按“2.1”项下色谱条件进行测定。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度考察 同一供试品溶液, 按“2.4”项方法衍生及“2.1”项方法测定, 连续进样 5 次, 测得各共有峰相对保留时间 $\text{RSD} < 2.26\%$, 各共有峰相对峰面积 $\text{RSD} < 2.75\%$, 表明进样和仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性考察 同一供试品溶液, 按“2.4”项方法衍生及“2.1”项方法测定, 分别在 0、2、4、6、8、12 h 进样, 各测得各共有峰相对保留时间 $\text{RSD} < 1.82\%$, 各共有峰相对峰面积 $\text{RSD} < 2.53\%$, 表明样品在 12 h 内稳定性良好。

2.5.3 重复性考察 取同一批号的供试品 5 份, 按“2.2”项方法制备供试品溶液, “2.4”项方法衍生及“2.1”项方法测定, 共有峰相对保留时间 $\text{RSD} < 2.32\%$, 共有峰相对峰面积 $\text{RSD} < 2.94\%$, 表明方法重复性良好, 符合指纹图谱的技术要求。

2.6 象皮药材指纹图谱的建立及相似度分析

2.6.1 指纹图谱的建立 在确定的色谱条件下测定 10 批象皮药材, 记录其指纹图谱。10 批样品叠加指纹图谱见图 1。将 10 号峰 (脯氨酸) 定为参照峰, 其保留时间及峰面积计为 1, 计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积, 结果见表 3、4。

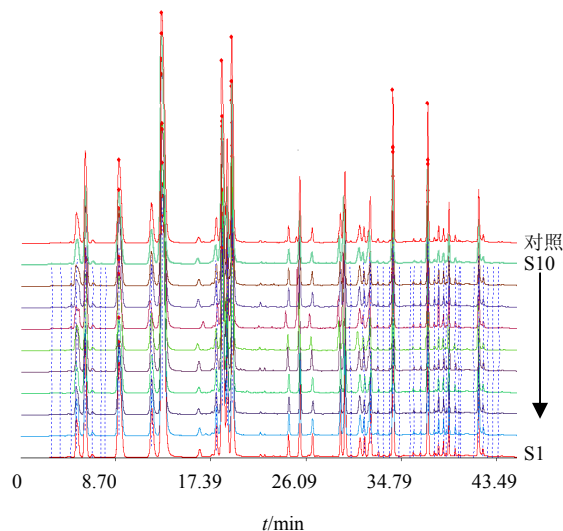


图 1 10 批象皮的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 Overlap plot fingerprint of 10 batches of samples

表 3 10 批象皮指纹图谱共有峰的相对保留时间

Table 3 Relative retention time of common peaks for 10 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	平均值	RSD/%
1	0.260 8	0.268 3	0.269 0	0.264 3	0.264 0	0.265 8	0.264 6	0.263 1	0.262 5	0.262 0	0.264 4	0.99
2	0.298 7	0.304 1	0.305 6	0.305 3	0.305 3	0.307 2	0.306 2	0.308 1	0.305 7	0.306 3	0.305 2	0.84
3	0.461 8	0.468 8	0.472 0	0.471 5	0.471 5	0.474 1	0.470 8	0.471 3	0.471 3	0.470 9	0.470 4	0.70
4	0.621 7	0.622 5	0.625 1	0.629 2	0.622 2	0.628 0	0.617 2	0.621 1	0.627 6	0.618 4	0.623 3	0.65
5	0.676 5	0.671 8	0.674 8	0.680 2	0.672 4	0.677 4	0.666 8	0.670 7	0.677 9	0.668 0	0.673 7	0.66
6	0.858 4	0.841 6	0.848 7	0.851 6	0.846 2	0.847 1	0.840 4	0.844 1	0.848 8	0.839 9	0.846 7	0.67
7	0.932 6	0.923 8	0.927 6	0.928 0	0.926 7	0.925 7	0.923 1	0.925 5	0.926 8	0.923 2	0.926 3	0.31
8	0.959 6	0.952 8	0.955 5	0.955 9	0.955 6	0.954 3	0.952 8	0.954 4	0.955 0	0.953 0	0.954 9	0.21
9	0.981 0	0.974 1	0.976 9	0.976 7	0.977 4	0.976 1	0.975 5	0.976 6	0.976 7	0.976 1	0.976 7	0.18
10	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
11	1.275 6	1.267 7	1.261 0	1.261 1	1.264 1	1.264 4	1.265 8	1.261 7	1.260 0	1.265 9	1.264 8	0.36
12	1.324 0	1.320 7	1.312 2	1.312 2	1.315 3	1.316 2	1.319 2	1.314 4	1.311 9	1.318 2	1.316 4	0.31
13	1.384 0	1.379 8	1.370 3	1.369 5	1.374 6	1.374 4	1.379 2	1.372 8	1.370 7	1.376 4	1.375 2	0.34
14	1.512 3	1.514 8	1.500 7	1.497 2	1.506 8	1.505 7	1.513 5	1.505 9	1.501 4	1.508 9	1.506 7	0.39
15	1.533 1	1.536 7	1.522 3	1.518 4	1.528 2	1.527 5	1.535 2	1.527 9	1.522 6	1.530 5	1.528 2	0.39
16	1.622 8	1.628 8	1.612 7	1.607 5	1.618 6	1.620 2	1.626 8	1.620 7	1.612 4	1.621 4	1.619 2	0.41
17	1.650 6	1.658 4	1.641 7	1.636 8	1.647 4	1.650 4	1.656 2	1.650 3	1.641 5	1.651 3	1.648 4	0.41
18	1.745 7	1.764 8	1.748 9	1.743 8	1.752 3	1.759 6	1.763 7	1.757 4	1.747 9	1.760 6	1.754 4	0.44

表 4 10 批象皮指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 4 Relative peak areas of common peaks for 10 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	平均值	RSD/%
1	0.270 5	0.263 6	0.256 2	0.291 7	0.262 3	0.261 6	0.254 5	0.266 8	0.260 1	0.270 6	0.265 6	3.97
2	0.486 3	0.493 2	0.467 5	0.512 3	0.482 9	0.473 4	0.458 9	0.486 3	0.472 4	0.494 4	0.482 3	3.20
3	0.691 3	0.656 3	0.700 9	0.676 9	0.665 4	0.691 9	0.680 1	0.685 3	0.665 8	0.667 4	0.678 4	2.11
4	0.243 0	0.278 4	0.271 8	0.310 4	0.262 0	0.287 3	0.257 7	0.282 5	0.270 4	0.299 6	0.277 1	7.20
5	2.433 1	2.352 4	2.327 3	2.401 6	2.361 2	2.325 3	2.324 5	2.361 7	2.318 2	2.343 4	2.352 4	1.58
6	0.068 2	0.058 4	0.060 9	0.062 2	0.065 3	0.058 7	0.058 1	0.060 3	0.056 0	0.058 2	0.054 9	6.79
7	0.123 8	0.111 9	0.115 2	0.129 7	0.115 6	0.116 9	0.110 5	0.121 4	0.111 1	0.120 2	0.117 5	5.25
8	1.060 2	1.068 0	1.038 7	1.077 1	1.046 8	1.032 4	1.030 0	1.055 5	1.042 1	1.057 1	1.050 2	1.47
9	0.387 2	0.388 6	0.392 8	0.409 6	0.385 0	0.398 8	0.384 5	0.396 0	0.389 6	0.396 1	0.393 1	1.95
10	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
11	0.075 4	0.083 3	0.068 7	0.085 5	0.091 0	0.074 3	0.071 5	0.082 9	0.072 9	0.082 8	0.078 6	9.20
12	0.235 7	0.243 3	0.228 8	0.250 7	0.239 7	0.232 8	0.225 0	0.241 5	0.232 1	0.242 3	0.237 0	3.26
13	0.083 0	0.068 9	0.081 0	0.086 0	0.089 6	0.080 9	0.077 6	0.082 3	0.069 8	0.075 2	0.079 3	8.41
14	0.159 8	0.138 2	0.119 2	0.146 8	0.143 0	0.127 7	0.130 0	0.145 2	0.125 5	0.139 2	0.136 6	8.83
15	0.291 5	0.312 3	0.280 6	0.323 6	0.300 4	0.294 2	0.281 9	0.309 1	0.293 9	0.317 7	0.300 3	4.90
16	0.070 2	0.053 0	0.059 0	0.059 4	0.061 4	0.058 5	0.060 7	0.063 5	0.052 3	0.058 2	0.059 3	8.57
17	0.189 9	0.185 1	0.172 8	0.193 4	0.186 9	0.177 4	0.175 8	0.186 5	0.176 7	0.188 0	0.182 8	3.81
18	0.476 8	0.465 7	0.444 9	0.490 9	0.456 1	0.455 9	0.446 8	0.465 5	0.446 6	0.462 6	0.460 5	3.16

运用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”对 10 批样品的指纹图谱进行分析,建立对照指纹图谱(图 2),确定了 18 个共有峰。通过对照品指认 1 号峰为门冬氨酸、2 号峰为谷氨酸、3 号峰为羟脯氨酸、4 号峰为丝氨酸、5 号峰为甘氨酸、6 号峰为组氨酸、7 号峰为苏氨酸、8 号峰为丙氨酸、9 号峰为精氨酸、10 号峰为脯氨酸、11 号峰为酪氨酸、12 号峰为缬氨酸、13 号峰为甲硫氨酸、14 号峰为异亮氨酸、15 号峰为亮氨酸、16 号峰为 L-羟脯氨酸、17 号峰为苯丙氨酸、18 号峰为赖氨酸。

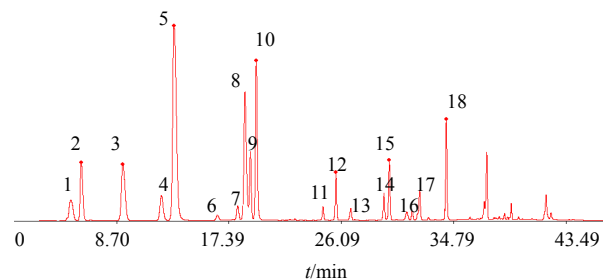


图 2 象皮中氨基酸对照指纹图谱

Fig. 2 Fingerprint of amino acids in elephant skin

2.6.2 相似度分析 采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”系统评价软件,以特征指纹图谱共有模式为对照,计算各批次样品的相似度,计算结果见表 5。由相似度结果可以看出,10 批象皮药材与对照指纹图谱的相似度均大于 0.9,相似度符合相关规定,表明各批象皮药材质量相似,质量稳定。

3 讨论

3.1 象皮的炮制方法

象皮质地坚韧,不易粉碎,在制剂中多以象皮粉入药,故本实验对象皮进行了炮制,即用滑石粉烫制后,粉碎成细粉,使供试品即能与临床使用形式保持一致,又能满足实验的需要。

3.2 酸水解条件的考察

考察了象皮粉水解的温度、时间及盐酸溶液的用量。结果表明 110 °C 水解 12 h, 0.2、0.5、1.0 g 象皮粉加 6 mL 6 mol/L 的盐酸溶液均能水解完全。

3.3 衍生化条件的考察

衍生化试剂异硫氰酸苯酯对色谱柱伤害较大,使其柱效明显下降^[5],本实验考察了衍生剂的用量,供试品溶液 2 mL,加入 0.1 mol/L PITC 的乙腈溶液

表 5 10 批样品的相似度

Table 5 Similarity of fingerprints in 10 batches of samples

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照
S1	1.000	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998
S2	0.998	1.000	0.999	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
S3	0.998	0.999	1.000	0.999	0.999	1.000	1.000	0.999	1.000	0.999	1.000
S4	0.998	1.000	0.999	1.000	0.999	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000
S5	0.998	1.000	0.999	0.999	1.000	0.999	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000
S6	0.998	0.999	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
S7	0.998	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
S8	0.998	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
S9	0.998	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
S10	0.998	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
对照	0.998	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

1.0、1.5 mL，结果表明加入 1.0 mL 衍生剂即可使供试品中氨基酸成分衍生完全，又可减少衍生剂对色谱柱的损害。衍生后供试品溶液用正己烷处理 2 次，可最大程度去除衍生剂，减少对色谱柱的伤害。

3.4 色谱条件的考察

考察了流动相 A 中乙腈与 0.1 mol/L 醋酸钠溶液的比例（3：97^[6]、7：93^[7]、6：94^[8]）等情况，结果表明两者比例为（3：97）时分离效果较好，可满足指纹图谱的技术要求。由于流动相的 pH 值会影响氨基酸成分的分离度，因此确定流动相 A 为乙腈-0.1 mol/L 醋酸钠溶液（用冰醋酸调节 pH 值至 6.5、3：97），且 0.1 mol/L 醋酸钠溶液的 pH 值要严格控制为 6.5。

4 结论

本研究首次采用 HPLC 指纹图谱对 10 批象皮药材进行研究，建立了象皮药材中氨基酸成分 HPLC 指纹图谱共用模式，其精密度、稳定性、重复性符合中药指纹图谱相关技术参数要求。同时指认了 18 个共有峰，并对指纹图谱中各特征峰进行氨基酸定性鉴别，共鉴定 17 个氨基酸成分。对 10 批不同批号的象皮样品进行相似度评价，结果均大于 0.9，表明象皮中氨基酸成分稳定，此方法对于象皮的质量控制提供依据。象皮与其他皮类如驴皮、牛

皮、猪皮氨基酸指纹图谱及总氨基酸量的区别有待进一步研究，为象皮鉴别、质量控制以及进一步替代品研究提供参考。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [2] 周玉祥. 象皮粉促进肉芽生长的实验研究 [J]. 中医药学报, 1999(5): 45-46.
- [3] 蒋与刚, 徐琪寿. 条件性必需氨基酸在创伤愈合中的作用及其机制研究进展 [J]. 氨基酸和生物资源, 2002, 24(3): 59-62.
- [4] 江苏新医学院. 《中药大辞典》 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977.
- [5] 唐涛. 氨基酸柱前衍生化 HPLC 方法发展及应用 [D]. 南京: 南京理工大学, 2006.
- [6] 欧金秀, 谷陟欣, 张妮瑜. 柱前衍生 HPLC 同时测定驴胶补血颗粒中 6 种水解氨基酸 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 93-96.
- [7] 戎其月, 葛文波, 魏茂陈, 等. 不同动物皮制胶中氨基酸成分及相似度分析 [J]. 上海中医药大学学报, 2013, 27(5): 89-93.
- [8] 骆达, 李惠芬, 李秀兰. 异硫氰酸苯酯衍生化-HPLC 法测定龟甲中胶原蛋白 [J]. 中草药, 2008, 39(6): 851-852.