

基于UHPLC特征图谱结合化学计量学及游离氨基酸含量测定的阿胶质量评价研究

张雄^{1,2}, 杨帅^{1,2}, 袁红飞^{1,2}, 迟明艳^{2,3}, 李月婷¹, 王雨茜², 魏茂陈⁴, 黄勇^{1*}, 郑林^{1*}

1. 贵州医科大学 中药功效成分发掘与利用全国重点实验室/贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004

2. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550004

3. 贵州医科大学 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵州 贵阳 550004

4. 贵阳新天药业股份有限公司, 贵州 贵阳 550018

摘要: **目的** 建立阿胶UHPLC特征图谱及游离氨基酸含量测定方法, 并结合指纹图谱相似度评价、化学计量学对不同批次的阿胶进行质量评价。**方法** 采用Waters BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 柱, 以0.1%甲酸水(A)-乙腈(B)为流动相, 梯度洗脱, 体积流量为0.3 mL/min, 检测波长254 nm, 柱温40 °C, 进样量2 μL。对14批阿胶进行特征图谱建立, 确定共有峰并进行相似度评价; 基于特征图谱共有峰面积测定结果, 结合化学计量学手段对14批阿胶进行质量评价; 并对甘氨酸(Gly)、L-脯氨酸(Pro)、L-丙氨酸(Ala)、L-甲硫氨酸(Met)、L-缬氨酸(Val)、L-亮氨酸(Leu)、L-苯丙氨酸(Phe)进行含量测定。**结果** 指纹图谱相似度评价结果表明, 14批阿胶样品的相似度均≥0.927, 说明各批次之间相似度良好, 质量较稳定, 共标定了9个共有峰, 并指认了Gly、Pro、Ala、Met、Val、Leu、Phe 7个共有峰; 化学计量学结果将14批阿胶划分为3类并筛选出导致不同批次间差异的差异性标志物为Met、Leu和Gly; Gly、Pro、Ala、Met、Val、Leu、Phe 7个成分的质量分数分别在319.8~1 227.27 μg/g、100.85~352.44 μg/g、113.92~531.06 μg/g、50.57~182.8 μg/g、47.5~116.53 μg/g、48.64~182.37 μg/g、45.65~124.69 μg/g。**结论** 建立的方法快捷, 准确可靠, 可为阿胶质量控制进一步提升提供实验参考。

关键词: 阿胶; UHPLC; 指纹图谱; 含量测定; 化学计量学; 质量评价

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2025)10-3668-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.10.024

Quality evaluation of *Colla Corii Asini* based on establishment of UHPLC characteristic spectrum combined with chemometrics and content determination of free amino acid

ZHANG Xiong^{1, 2}, YANG Shuai^{1, 2}, YUAN Hongfei^{1, 2}, CHI Mingyan^{2, 3}, LI Yueting¹, WANG Yuxi², WEI Maochen⁴, HUANG Yong¹, ZHENG Lin¹

1. State Key Laboratory of Discovery and Utilization of Functional Components in Traditional Chinese Medicine/Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

3. Engineering Research Center for Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

4. Guiyang Xintian Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550018, China

Abstract: Objective A method was developed to establish a UHPLC characteristic spectrum and determine the free amino acid content of Ejiao (*Colla Corii Asini*). The quality of different batches of *Colla Corii Asini* was assessed by combining fingerprint spectrum similarity evaluation and chemometrics. **Methods** UHPLC was launched on a Waters BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)

收稿日期: 2024-12-09

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合重大专项字[2024]015, 黔科合平台人才-GCC[2023]036, 黔科合平台人才-CXTD[2023]019, 黔科合平台人才-GCC[2022]031-1); 贵阳市科技计划项目(筑科合同[2024]2-35号)

作者简介: 张雄, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制及作用评价。E-mail: zhangxiong2024@126.com

*通信作者: 黄勇, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础及新药研究开发。

Tel: (0851)86908468 E-mail: HUANGY2020@126.com

郑林, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础及质量控制。Tel: (0851)86908468 E-mail: zhengl2020@126.com

column by gradient elution with a mobile phase of 0.1% formic acid water (A) and acetonitrile (B) at a flow rate of 0.3 mL/min, detection wavelength of 254 nm, column temperature of 40 °C, and an injection volume of 2 µL. The characteristic spectrum of 14 batches of *Colla Corii Asini* was established, common peak was identified and a similarity evaluation was carried out. Based on the determination results of the common peak area in the characteristic spectra, the quality of 14 batches of *Colla Corii Asini* was evaluated by combining chemometrics methods. The levels of glycine (Gly), *L*-proline (Pro), *L*-alanine (Ala), *L*-methionine (Met), *L*-valine (Val), *L*-leucine (Leu), and *L*-phenylalanine (Phe) were quantified. **Results** The results of the fingerprint similarity evaluation showed that the similarity of 14 batches of *Colla Corii Asini* samples was ≥ 0.927 , indicating a good similarity and stable quality. A total of nine common peaks were calibrated and seven common peaks were identified, namely Gly, Pro, Ala, Met, Val, Leu and Phe. The chemometrics analysis classified 14 batches of *Asini Corii Colla* into three categories, identifying the differential markers that caused differences between different batches as Met, Leu and Gly. The mass concentrations of the seven components, Gly, Pro, Ala, Met, Val, Leu and Phe, range from 319.8—1227.27 µg/g, 100.85—352.44 µg/g, 113.92—531.06 µg/g, 50.57—182.8 µg/g, 47.5—116.53 µg/g, 48.64—182.37 µg/g, 45.65—124.69 µg/g. **Conclusion** The method established in this study is fast, accurate and reliable, which can provide an experimental reference for further research on improving the quality standards of *Colla Corii Asini*.

Key words: *Colla Corii Asini*; UHPLC; fingerprint; content determination; chemometrics; quality evaluation

阿胶为马科动物驴 *Equus asinus* L.的干燥皮或鲜皮经煎煮、浓缩制成的固体胶,最早记载于《神农本草经》,被誉为“补血圣药”,其最主要的化学成分为氨基酸、多肽和蛋白质^[1-2]。阿胶具有补血、滋阴、润燥、止血的功效,已有2 000多年的使用历史^[3]。现代药理学研究表明,阿胶具有强化免疫力、抗休克、抗衰老、调节缺铁性贫血等药理作用,已被广泛应用于临床;同时有研究表明阿胶的补血作用主要是由其所含的蛋白质、氨基酸和人体必需的微量元素共同协调完成^[4-6]。氨基酸作为阿胶的主要成分,其含量已成为影响阿胶药材质量的关键物质^[7-9]。目前关于阿胶中氨基酸含量测定的研究,大多为测定其水解后的氨基酸^[10],而阿胶中游离氨基酸却很少被关注。游离氨基酸具有调节人体氮平衡,增强免疫力和健体补虚的功效^[11-12],它不需经胃肠道水解,可直接被人体吸收,是身体补充营养的良好来源^[13]。因此,对阿胶中游离氨基酸含量进行测定可为其质量控制提供新的思路。中药特征图谱是基于中药整体性控制的思路,采用色谱技术对中药含有的化学成分进行系统、全面、专属的表征,可作为控制同一产品不同批次之间质量均一性的有效工具,已被广泛应用于中药材鉴别和质量评价^[14-16]。现如今针对多成分的含量测定已成为中药质量控制的关键,利用特征图谱,同时结合化学计量学等手段进行系统分析,可达到有效、客观、全面评价药材质量的目的^[17-18]。本研究以不同批次的阿胶为研究对象,利用特征图谱结合化学计量学筛选导致不同批次阿胶质量产生差异的成分,并

进行定量分析,旨在为阿胶建立更系统、全面、易于推广应用的质量标准提供借鉴与参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1290 型超高效液相色谱系统(美国安捷伦科技有限公司, DAD 检测器); WP-UP-IV-20 型超纯水机(四川沃特尔科技发展有限公司); EL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Allegra 30R Centrifuge 低温高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司)。

1.2 药材与试剂

14批阿胶均购自不同的企业,经贵州医科大学药学院生药学教研室刘春花副教授鉴定为动物驴 *E. asinus* L.的干燥皮或鲜皮经煎煮、浓缩制成的固体胶(批号分别为20220208、20100602、2109013、220204、220302、21120429、220303、21120302、21082001、21092803、202111110、22010501、21052001、20220114,依次编号为S1~S14,其中S1~S7产地为山东,S8~S10产地为河南,S11产地为河北,S12~S13产地为湖南,S14产地为安徽);对照品甘氨酸(Gly)、*L*-脯氨酸(Pro)、*L*-丙氨酸(Ala)、*L*-甲硫氨酸(Met)、*L*-缬氨酸(Val)、*L*-亮氨酸(Leu)和*L*-苯丙氨酸(Phe)(批号依次为AF20102451、AF20080255、AF20071851、AF21032151、AF20050253、AF20080253、AF20080254)均购自成都埃法生物科技有限公司,上述对照品质量分数均 $\geq 98\%$;其他试剂均为分析纯,实验用水为纯化水。

2 方法

2.1 对照品溶液制备

分别精密称取 Gly、Pro、Ala、Met、Val、Leu 和 Phe 对照品适量，加水溶液溶解制成质量浓度分别为 1.033、1.033、1.043、1.077、1.013、1.080、1.177 mg/mL 的对照品储备液，于 4 °C 冰箱保存备用。精密吸取 Gly、Pro、Ala、Met、Val、Leu 和 Phe 7 种对照品适量，加 50% 乙腈溶液稀释成混合对照品溶液；再精密吸取该混合溶液 500 μ L 于 2 mL 离心管中，加入三乙胺乙腈溶液和异硫氰酸苯酯乙腈溶液各 250 μ L，摇匀，静置衍生 30 min；加入正己烷 1 mL，充分振摇萃取，吸出上层溶液，弃去；重复萃取 2 次。下层溶液经 0.22 μ m 滤膜过滤，即得。

2.2 供试品溶液制备

取阿胶粗粉约 0.20 g，精密称定，置于 5 mL 离心管中，精密加入 3 mL 水，称定质量，冷处静置过夜，室温超声处理（功率 250 W、频率 40 kHz）提取 3 次，每次 40 min，称定质量，加水补足减失质量，取该溶液 1.2 mL，加乙腈 2.4 mL，摇匀，冷藏过夜，14 000 r/min 离心 10 min，取上清液 3 mL，60 °C 挥干，残渣加 500 μ L 50% 乙腈溶解，自“2.1”项下“加入三乙胺乙腈溶液和异硫氰酸苯酯乙腈溶液各 250 μ L”起操作制成供试品溶液。

2.3 空白溶液制备

除不加阿胶外，其余按照“2.2”项下供试品溶液的制备方法，制成空白溶液。

2.4 色谱条件

色谱柱为 Waters BEH C₁₈ (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m) 柱；流动相为 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈 (B)，梯度洗脱 (0~2 min, 5%~10% B; 2~15 min, 10%~24% B; 15~16 min, 24%~29% B; 16~17 min, 29%~34% B; 17~23 min, 34%~40% B; 23~25 min, 40%~50% B)；体积流量 0.3 mL/min，柱温 40 °C，检测波长 254 nm，进样量 2 μ L。

2.5 特征图谱研究

2.5.1 精密度试验 取编号为 S3 的阿胶，采用“2.2”项下方法制得供试品溶液，按“2.4”项下色谱条件连续进样 6 次，记录色谱峰峰面积。以 4 号色谱峰 Ala (分离度良好，峰面积较大且为所有批次共有) 为参照峰，各共有峰的相对峰面积 RSD 均小于 1.00%，相对保留时间 RSD 均小于 0.40%，表明仪器精密度良好。

2.5.2 重复性试验 取的阿胶 (S3) 6 份，采用“2.2”

项下方法制得供试品溶液，按“2.4”项下色谱条件分别进样，记录峰面积。以 Ala 为参照峰，各共有峰的相对峰面积 RSD 均小于 2.54%，相对保留时间 RSD 均小于 0.09%，表明方法重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 取编号为 S3 的阿胶样品，采用“2.2”项下方法制得供试品溶液，按“2.4”项下色谱条件，分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样，记录峰面积。以 Ala 为参照峰，各共有峰的相对峰面积 RSD 均小于 3.87%，相对保留时间 RSD 均小于 1.06%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.4 特征图谱的生成与相似度评价 取 14 批阿胶 (S1~S14) 样品，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.4”项下色谱条件分别进 UHPLC 分析。相关色谱数据以 AIA 格式导入《中药指纹图谱相似度评价系统》(2012 版) 分析，以 S1 号样品的色谱图为参照图谱，采用平均数法，设定时间窗宽度为 0.1 min，对 14 批制剂进行多点校正后自动峰匹配，生成 14 批阿胶样品指纹图谱及对照指纹图谱 (R)，结果见图 1，共标定了 9 个共有峰，其中 4 号色谱峰 Ala 保留时间适中、分离度良好，峰面积较大，作为参照峰 (S)。计算各批次间 9 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积 (表 1、2)。结果显示，各批次间各共有峰的相对保留时间的 RSD 为 0.05%~0.92%，相对峰面积的 RSD 为 10.77%~42.22%，表明各批次间各共有峰保留时间较稳定，但化学成分含量存在差异。

2.5.5 共有峰的指认 按“2.4”项下色谱条件分别测定供试品溶液和混合对照品溶液，结果见图 2。通过各峰的保留时间及化学成分的紫外光谱图对比，共指认了 7 个成分，分别为 2 (Gly)、3 (Pro)、4 (Ala)、5 (Met)、6 (Val)、7 (Leu)、9 (Phe) 号峰。

2.5.6 指纹图谱相似度评价 采用《中药指纹图谱相似度评价系统》(2012 版) 对 14 批阿胶的特征图谱进行相似度计算，见表 1。14 批样品的相似度均在 0.927 以上，说明该产品各批次之间相似度良好，质量较稳定。

2.6 化学计量学分析

2.6.1 层次聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA) 为了考察不同厂家阿胶中游离氨基酸类成分的含量差异，采用 SPSS 26.0 软件，以 14 批阿胶的 9 个共有峰的峰面积为变量，采用 Ward 法，以平方欧氏距离作为度量标准进行聚类分析，探讨不同批次阿胶数据的一致性，结果见图 3。当距离刻

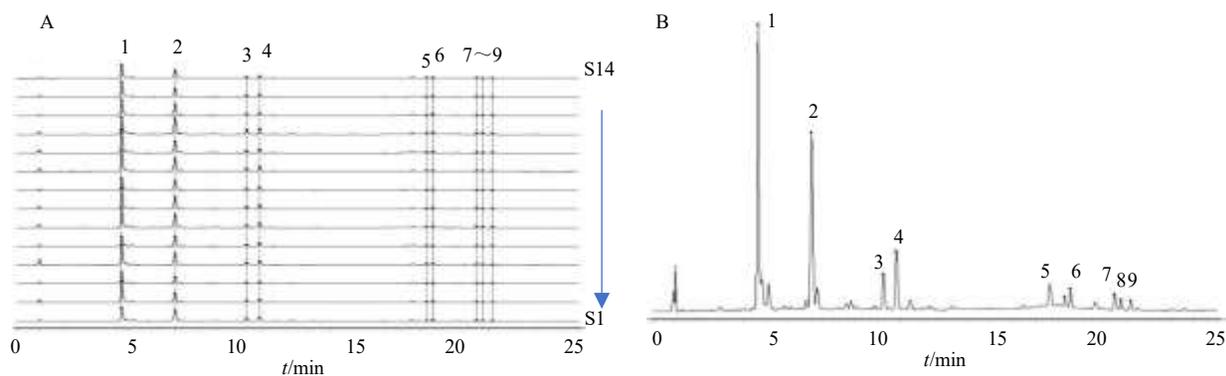


图 1 14批阿胶的UHPLC指纹图谱(A)及其对照指纹图谱(B)

Fig. 1 UHPLC fingerprint (A) and referential fingerprint (B) of 14 batches of *Colla Corii Asini*

表 1 14批次阿胶指纹图谱共有峰相对保留时间

Table 1 Relative retention time of common peaks in fingerprints of 14 batches of *Colla Corii Asini*

编号	相对保留时间								
	1	2	3	4 (S)	5	6	7	8	9
S1	0.433	0.643	0.954	1.000	1.757	1.786	1.971	1.991	2.031
S2	0.432	0.642	0.953	1.000	1.756	1.785	1.970	1.991	2.031
S3	0.432	0.642	0.953	1.000	1.758	1.787	1.972	1.993	2.032
S4	0.439	0.644	0.952	1.000	1.784	1.815	2.003	2.024	2.066
S5	0.433	0.643	0.953	1.000	1.758	1.787	1.972	1.992	2.032
S6	0.432	0.641	0.953	1.000	1.712	1.755	1.969	1.989	2.029
S7	0.433	0.643	0.953	1.000	1.756	1.785	1.970	1.991	2.031
S8	0.433	0.643	0.953	1.000	1.758	1.788	1.973	1.994	2.033
S9	0.432	0.641	0.953	1.000	1.756	1.785	1.969	1.990	2.030
S10	0.438	0.650	0.953	1.000	1.780	1.811	1.999	2.023	2.063
S11	0.434	0.645	0.954	1.000	1.765	1.795	1.980	2.001	2.041
S12	0.433	0.642	0.953	1.000	1.761	1.791	1.976	1.997	2.037
S13	0.433	0.643	0.953	1.000	1.754	1.783	1.968	1.988	2.028
S14	0.433	0.643	0.954	1.000	1.760	1.789	1.975	1.995	2.035
平均值	0.434	0.643	0.953	1.000	1.758	1.789	1.976	1.997	2.037
RSD/%	0.53	0.35	0.05	0.00	0.92	0.77	0.56	0.59	0.59

表 2 14批次阿胶指纹图谱共有峰相对峰面积

Table 2 Relative peak areas of common peaks in fingerprints of 14 batches of *Colla Corii Asini*

编号	相对峰面积								
	1	2	3	4 (S)	5	6	7	8	9
S1	3.158	2.791	0.617	1.000	0.142	0.183	0.198	0.084	0.096
S2	5.831	3.217	0.539	1.000	0.135	0.222	0.200	0.117	0.120
S3	5.682	3.908	0.684	1.000	0.263	0.352	0.321	0.179	0.223
S4	1.994	3.629	0.594	1.000	0.156	0.220	0.207	0.105	0.084
S5	4.465	3.423	0.521	1.000	0.150	0.209	0.201	0.117	0.110
S6	3.436	3.268	0.514	1.000	0.095	0.193	0.194	0.079	0.097
S7	4.029	2.970	0.452	1.000	0.105	0.163	0.181	0.088	0.100
S8	5.119	3.391	0.577	1.000	0.157	0.178	0.267	0.116	0.135
S9	4.275	3.298	0.568	1.000	0.221	0.185	0.257	0.117	0.125
S10	10.708	3.674	0.648	1.000	0.315	0.328	0.478	0.191	0.249
S11	4.213	3.176	0.523	1.000	0.226	0.179	0.291	0.130	0.139
S12	3.539	3.694	0.533	1.000	0.072	0.174	0.158	0.091	0.118
S13	5.920	4.257	0.598	1.000	0.177	0.253	0.180	0.109	0.125
S14	4.865	3.220	0.529	1.000	0.156	0.169	0.260	0.129	0.130
平均值	4.802	3.423	0.564	1.000	0.169	0.215	0.242	0.118	0.132
RSD/%	42.22	11.17	10.77	0.000	39.40	27.25	34.10	27.71	35.62

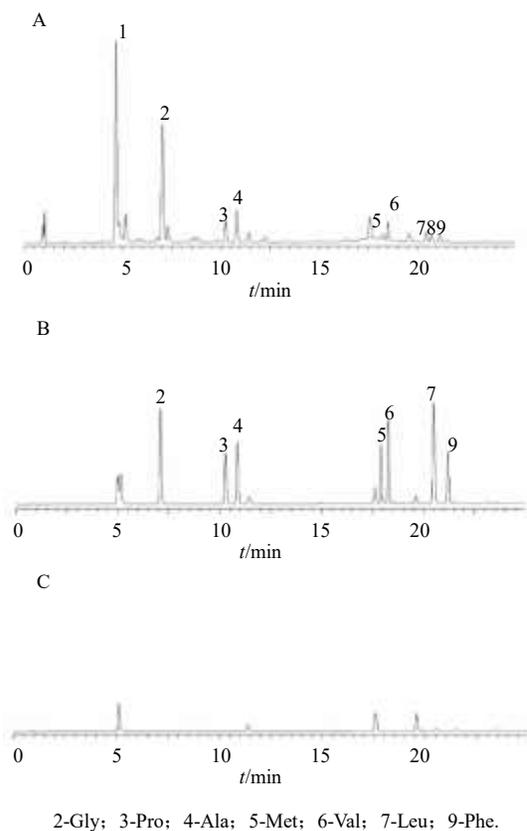


图2 阿胶溶液 (A)、混合对照品溶液 (B) 和空白溶液 (C) 的 UHPLC 图

Fig. 2 UHPLC of *Colla Corii Asini* solution (A), mixed reference solution (B) and blank solution (C)

度为 10 时, 整体上所有批次的阿胶被分为 2 类, S12、S13 聚为一类, 其他所有批次阿胶聚为 2 类, 所有湖南阿胶样品被聚为一类, 表明湖南产的阿胶差异较小, 质量较为稳定; 当距离刻度为 5 时, 14 批阿胶被分为 3 类: S3~S7、S9、S10、S11 为第 1 类, 产地为 5 批山东、2 批河南、1 批河北; S1、S2、S8、S14 为第 2 类, 产地为 2 批山东、1 批河南、1 批安徽; S12、S13 为第 3 类, 产地为 2 批湖南。由 HCA 结果可知, 山东、湖南产地的阿胶大致按产地聚为一类, 说明阿胶中游离氨基酸的含量可能与产地有一定的关系, 其中 5 批山东, 2 批河南的样品聚为一大类, 表明这 2 个产地阿胶差异较小; 此外, 阿胶产地整体地理位置上呈现出从中国南部到北部的聚类趋势, 说明阿胶中游离氨基酸的含量还可能存在一定的南北差异。

2.6.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) PCA 是以降维为核心的思想, 在尽可能保持原有数据信息前提下的一种数据分析方法^[19], 可将存在一定相关性的多个指标转变为少数具有代表性的综合指标, 提取出主要成分特征。将 14 批阿胶的 9 个共有峰的峰面积作为变量, 导入 SIMCA14.1 软件进行 PCA 建模分析, 采用自标度化法 (UV) 缩放, 提取 2 个主成分, 结果如图 4 所示, 得到模型解释率参数 $R^2_X=0.892$, 预测能力参数 $Q^2=0.715$,

表 3 14 批阿胶相似度评价结果

Table 3 Similarity evaluation results of 14 batches of *Colla Corii Asini*

编号	相似度														R
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	
S1	1.000	0.975	0.992	0.992	0.984	0.998	0.992	0.997	0.998	0.984	0.989	0.994	0.990	0.994	0.997
S2	0.975	1.000	0.992	0.993	0.927	0.982	0.994	0.966	0.986	0.999	0.932	0.980	0.996	0.993	0.987
S3	0.992	0.992	1.000	0.999	0.964	0.997	0.999	0.989	0.997	0.997	0.967	0.997	0.999	0.999	0.998
S4	0.992	0.993	0.999	1.000	0.960	0.996	0.999	0.987	0.998	0.997	0.966	0.993	0.999	0.999	0.998
S5	0.984	0.927	0.964	0.960	1.000	0.980	0.961	0.992	0.974	0.945	0.995	0.981	0.956	0.964	0.975
S6	0.998	0.982	0.997	0.996	0.980	1.000	0.997	0.996	0.999	0.990	0.982	0.997	0.995	0.997	1.000
S7	0.992	0.994	0.999	0.999	0.961	0.997	1.000	0.987	0.998	0.998	0.964	0.994	1.000	1.000	0.998
S8	0.997	0.966	0.989	0.987	0.992	0.996	0.987	1.000	0.993	0.978	0.990	0.997	0.984	0.989	0.995
S9	0.998	0.986	0.997	0.998	0.974	0.999	0.998	0.993	1.000	0.992	0.979	0.995	0.996	0.998	0.999
S10	0.984	0.999	0.997	0.997	0.945	0.990	0.998	0.978	0.992	1.000	0.947	0.989	0.999	0.997	0.993
S11	0.989	0.932	0.967	0.966	0.995	0.982	0.964	0.990	0.979	0.947	1.000	0.978	0.959	0.967	0.978
S12	0.994	0.980	0.997	0.993	0.981	0.997	0.994	0.997	0.995	0.989	0.978	1.000	0.993	0.995	0.998
S13	0.990	0.996	0.999	0.999	0.956	0.995	1.000	0.984	0.996	0.999	0.959	0.993	1.000	0.999	0.997
S14	0.994	0.993	0.999	0.999	0.964	0.997	1.000	0.989	0.998	0.997	0.967	0.995	0.999	1.000	0.999
R	0.997	0.987	0.998	0.998	0.975	1.000	0.998	0.995	0.999	0.993	0.978	0.998	0.997	0.999	1.000

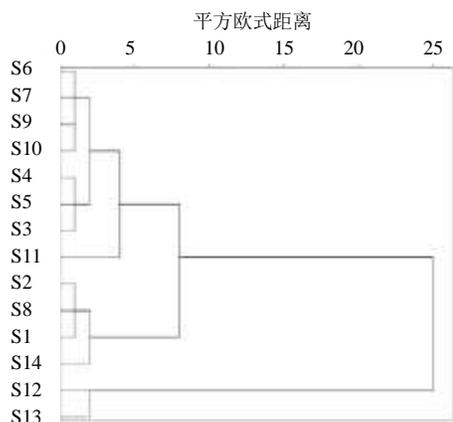


图3 不同产地阿胶聚类分析树状图

Fig. 3 Dendrogram of hierarchical clustering analysis of 14 batches of *Colla Corii Asini* from different origins

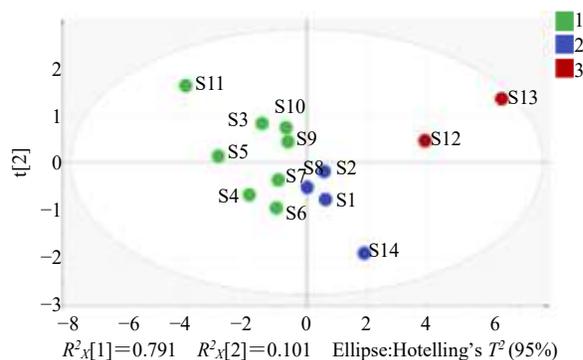


图4 14批阿胶主成分分析得分图

Fig. 4 PCA plot of 14 batches of *Colla Corii Asini*

表明提取的主成分可解释 89.2% 的原始变量，模型的预测能力为 71.5%，2 个主成分的累积贡献率为 89.2%，14 批阿胶样品基本分为 3 类，S3~S7、S9、S10、S11 为第 I 类，S1、S2、S8、S14 为第 II 类，S12、S13 为第 III 类，与 HCA 结果相互佐证，进一步说明阿胶的质量与产地有一定的关系。

2.6.3 正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 为更好地寻找到不同批次间阿胶的质量差异标志物，采用有监督的 OPLS-DA 进行建模分析。将 14 批样品的 9 个共有峰的峰面积导入 SIMCA14.1，进行 OPLS-DA，在该模型下矩阵结实率 $R^2_X=0.937$ 、模型区分参数 $R^2_Y=0.775$ 、模型主成分回归系数 $Q^2=0.596$ ，超过 0.5，表明该模型具有比较好的预测能力^[20]。结果如图 5 所示，14 批阿胶样品共被分为 3 类，与 HCA 和 PCA 结果一致。

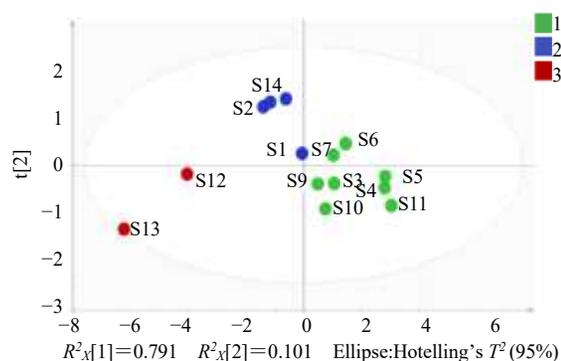


图5 14份阿胶 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 OPLS-DA score plot for 14 batches of *Colla Corii Asini*

为避免所建立的 OPLS-DA 模型出现过拟合而影响结果的准确性，进一步进行 200 次置换检验模型进行内部验证 (图 6)，右上角 R^2 和 Q^2 的纵坐标的值高于最左边的 R^2 和 Q^2 ，斜率为正值，且 Q^2 点的蓝色回归线与 Y 轴交点小于 0，说明模型是有效的，不存在过度拟合，认为该结果可用于不同批次间阿胶质量差异标志物的筛选。OPLS-DA 模型中的 VIP 值可用于筛选出对上述样本分类贡献较大的成分，以 $VIP>1$ 为有意义变量进行筛选^[21]，如图 7 所示，筛选出 5 (Met)、7 (Leu) 和 2 (Gly) 号峰可能是导致样品之间产生差异的主要原因，提示这些成分可作为区分不同厂家阿胶的潜在指标成分。

2.7 种游离氨基酸含量测定

2.7.1 线性关系考察 精密吸取适量“2.1”项下的 Gly 等成分的对照溶液，用水稀释成不同质量浓度梯度的混合对照溶液，按照“2.4”项下色谱条件，进样分析，以不同化合物的峰面积为纵坐标 (Y)，质量浓度为横坐标 (X) 制备标准曲线，见表 4。结

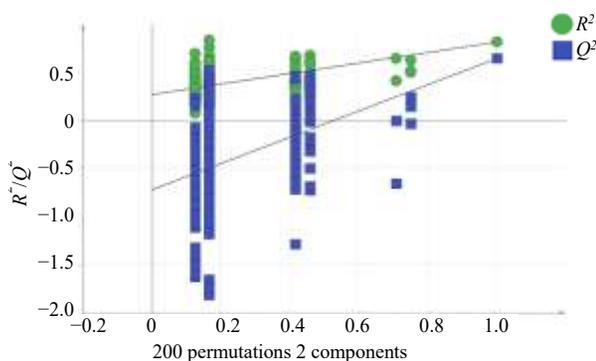


图6 OPLS-DA 模型的 200 次置换检验

Fig. 6 200 permutation tests for OPLS-DA model

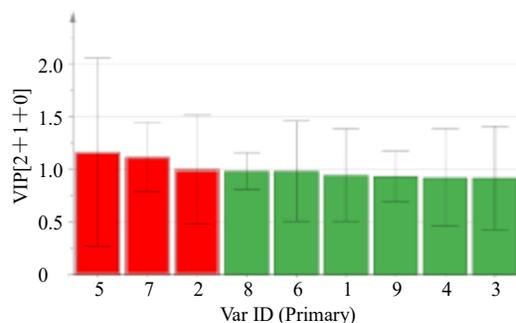


图7 阿胶的 OPLS-DA 的 VIP 值图

Fig. 7 VIP plot of OPLS-DA for *Colla Corii Asini*

表4 线性方程

Table 4 Linear equations

成分	线性方程	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	R^2
Gly	$Y=34.7X-78.555$	12.003 5~300.086 5	1.000 0
Pro	$Y=19.967X-21.538$	7.995 4~199.885 5	1.000 0
Ala	$Y=24.677X+7.0428$	7.989 4~199.734 5	0.999 6
Met	$Y=16.252X-0.5121$	4.006 4~100.161 0	0.999 9
Val	$Y=20.575X-5.3678$	3.201 1~80.027 0	0.999 9
Leu	$Y=19.907X+27.701$	2.008 8~50.220 0	1.000 0
Phe	$Y=15.531X-14.261$	3.201 4~80.036 0	1.000 0

果表明, Gly 等 7 种成分的线性关系良好。

2.7.2 精密度试验 取一定浓度的对照品混合溶液, 按照“2.4”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 分别计算各成分峰面积的 RSD 值, Gly、Pro、Ala、Met、Val、Leu 和 Phe 的 RSD 值分别为 0.16%、0.17%、0.17%、0.24%、0.13%、0.18%、0.13%, 表明该仪器的精密度良好。

2.7.3 重复性试验 将样品 S3 精密称取 6 份, 采

用“2.2”项下方法制成供试品溶液后, 按照“2.4”项下色谱条件, 进样分析。计算 Gly、Pro、Ala、Met、Val、Leu 和 Phe 7 种成分的平均质量分数分别为 580.62、177.21、199.62、78.58、89.39、69.19 和 80.69 $\mu\text{g}/\text{g}$, 并计算 7 种成分质量分数的 RSD 值分别为 1.55%、0.99%、1.37%、0.76%、2.98%、1.04%、2.72%。

2.7.4 稳定性试验 将样品 S3 按“2.2”项下方法制成供试品溶液后, 按照“2.4”项下色谱条件, 于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 计算各指标性成分峰面积的 RSD 值, Gly、Pro、Ala、Met、Val、Leu 和 Phe 的 RSD 值分别为 1.23%、1.77%、0.76%、0.97%、0.77%、2.36%、2.85%, 表明供试品溶液于 24 h 内稳定性良好, 能用于含量测定。

2.7.5 加样回收率试验 将样品 S3 精密称取 6 份, 每份约 0.2 g, 加入特定浓度的对照品混合溶液, 采用“2.2”项下方法制成供试品溶液, 按“2.4”项下色谱条件进行测定, 计算得到各成分的加样回收率并计算其 RSD, Gly、Pro、Ala、Met、Val、Leu 和 Phe 的加样回收率分别为 103.51%、96.65%、95.99%、105.78%、101.57%、99.56%、102.92%; RSD 值分别为 0.78%、0.24%、1.98%、1.63%、1.63%、0.87%、2.1%, 表明该方法可用于测定阿胶中 Gly 等 7 种成分的含量。

2.7.6 样品含量测定 精密称取 14 批不同厂家 (S1~S14) 的阿胶粉末约 0.20 g, 按“2.2”项方法制成供试品溶液, 用“2.4”项下色谱条件分析, 分别将峰面积代入标准曲线来计算 Gly、Pro、Ala、Met、Val、Leu 和 Phe 的含量, 见表 5。

表5 不同厂家阿胶中 7 种游离氨基酸的含量

Table 5 Contents of seven free amino acids in *Asini Corii Colla* from various manufacturers

编号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)						
	Gly	Pro	Ala	Met	Val	Leu	Phe
S1	822.25	317.61	403.67	87.84	90.99	89.34	68.76
S2	810.58	238.97	344.92	71.62	94.52	75.93	72.72
S3	560.88	173.47	193.66	78.52	84.51	67.70	76.22
S4	765.92	221.15	288.07	68.88	78.47	64.08	45.65
S5	593.17	160.37	234.60	54.14	61.18	48.64	48.25
S6	831.98	230.81	348.55	50.78	82.94	74.10	61.05
S7	776.96	208.89	357.80	57.83	72.18	70.54	63.96
S8	929.46	230.59	299.45	81.09	93.30	56.90	66.67
S9	740.63	221.84	298.10	71.70	66.04	88.95	71.33
S10	718.10	217.83	296.92	100.76	68.10	85.14	66.09
S11	319.80	100.85	113.92	55.70	47.50	58.44	52.71
S12	1 078.83	311.39	461.82	109.96	96.00	139.21	102.39
S13	1 220.88	352.44	531.06	182.80	116.53	182.37	124.69
S14	1 227.27	311.56	458.71	50.57	98.10	80.24	92.97

3 讨论

3.1 色谱条件的考察

《中国药典》2020年版关于阿胶中氨基酸含量测定的方法为测定其水解后的氨基酸,与本研究所测定的氨基酸种类、含量以及数量都有所不同,故本研究分别对流动相(乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%甲酸溶液)、波长(190~400 nm)、进样量(1、2、5 μL)和色谱柱[Waters BEH C₁₈ (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm)柱、ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm)柱]进行了考察,根据色谱图中的色谱峰信息、色谱峰响应值、干扰和基线确定最佳色谱条件,结果显示流动相为乙腈-0.1%甲酸溶液,波长为254 nm,进样量为2 μL ,色谱柱为Waters BEH C₁₈ (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm)柱时所得的色谱图中色谱峰信息较多,色谱峰响应值较高,干扰较少且基线平稳,再根据分离度以及峰形对流动相梯度进行优化,从而确定色谱条件。最终方法没有用到缓冲盐,流动相的组成更加简单,虽有别于《中国药典》,但是经过系统的方法学的验证,证明方法可行,可用于特征图谱研究以及游离氨基酸含量测定。

3.2 供试品处理方法考察

本研究未加酸、碱等溶液对样品进行水解,而是直接测定游离氨基酸的含量,更加简便快捷;同时,由于氨基酸无紫外吸收,故样品须进行衍生化处理,而且衍生化反应要充分,才能将氨基酸检测完全,本研究采用异硫氰酸苯酯为衍生化试剂,对各组分峰的测定无干扰,生成的衍生物也十分稳定。此外,前期使用超声提取后直接进样分析,发现在色谱图中,保留时间靠后的部分均有紫外吸收,最后呈现一段较长的“基线漂移”谱图,可能由阿胶中所含蛋白质多糖等成分所致,因此考虑用“醇沉法”去除这些干扰性成分,考虑到流动相为乙腈和水,因此用乙腈代替乙醇进行醇沉。

3.3 特征图谱建立及多指标含量测定

特征图谱展示了中药复方的整体性与动态性,可准确地揭示中药成分的特征性、溯源性及可测性^[22],建立中药专属的特征图谱可有效促进药材的质量控制。由于中药成分的复杂性,现针对多成分的含量测定已成为中药质量控制的有效手段。目前已报道关于阿胶含量测定和指纹图谱的研究大多为水解氨基酸,如付英杰等^[23]应用HPLC建立阿胶多种酶解物的指纹图谱,为后续进行的酶解物-HPLC法对

阿胶特征峰及规律研究提供参考。李婉斯等^[24]应用HPLC测定分析阿胶加酸水解后的17种氨基酸类成分的含量,并进行相似度分析和HCA,为阿胶的质量评价提供了实验参考。另外,陈萍红等^[25]采用反相高效液相色谱法同时测定阿胶加酸水解后13种氨基酸的含量,可用于阿胶的质量控制。Xie等^[26]采用9-戊基氯甲酸甲酯衍生化法,采用高亚胶束液相色谱梯度洗脱法,测定了阿胶中的氨基酸。目前对阿胶中游离氨基酸测定的报道较少,大多测定的为水解后的氨基酸,关于该方面的质量控制还亟待进一步提升。本研究采用UHPLC建立了14批阿胶的特征图谱,标定了9个共有峰,通过与对照品进行比对,指认了7个色谱峰,分别为Gly、Pro、Ala、Met、Val、Leu和Phe,7个成分均稳定出现在各个批次中,达到定量要求,于是对该7个成分进一步展开含量测定研究,为今后阿胶质量标准的补充完善提供了有益的参考。综上,本研究使用UHPLC测定14批阿胶中的7种游离氨基酸类成分的含量,建立的方法快捷,准确可靠,可为进一步提升阿胶的质量标准研究提供实验依据。

3.4 多元统计分析

根据阿胶特征图谱9个共有峰面积测定结果,结合HCA、PCA和OPLS-DA3种化学模式识别手段进一步统计分析,寻找阿胶的质量差异标志物,为阿胶质量评价提供更为全面的信息。HCA、PCA和OPLS-DA的结果表明所有样品被分为3类,其中山东、湖南产地的阿胶大致按产地聚为一类,说明阿胶中氨基酸的含量可能与产地有一定的关系;此外,阿胶产地整体地理位置上呈现出从中国南部到北部的聚类趋势,说明阿胶中氨基酸的含量还可能存在一定的南北差异。通过OPLS-DA筛选到5(Met)、2(Gly)和7(Leu)号峰可能是导致样品之间产生差异的主要原因,提示这3种成分可作为区分不同批次阿胶质量的潜在指标,在阿胶质量评估中需重点关注它们的质量变化。可能导致上述结果的原因与不同厂家原料的来源和制备工艺有密切关系。阿胶的原料来源和各个厂家的生产工艺可能会影响其游离氨基酸的含量。因此,从游离氨基酸的角度去区分不同产地的阿胶质量差异,能够为保证阿胶的质量均一性和稳定性提供有益参考。在今后的深入研究中,可收集更多批次的样本加以验证,以便更好地控制阿胶的质量。综上,本研究通过UHPLC检测阿胶中的游离氨基酸,结合化学计

量学手段筛选到区分不同厂家的潜在质量差异标志物,可为进一步提升阿胶的质量控制提供借鉴与参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 197.
- [2] 曲媛鑫, 付英杰. 阿胶化学成分、质量控制及药理作用研究进展 [J]. 特产研究, 2023, 45(3): 136-143.
- [3] Xia Z Y, Che X Q, Ye L, *et al.* A synergetic strategy for brand characterization of *Colla Corii Aasini* (Ejiao) by LIBS and NIR combined with partial least squares discriminant analysis [J]. *Molecules*, 2023, 28(4): 1778.
- [4] 吴崇乐, 颜冬兰, 黄胜, 等. 阿胶及其制剂质量控制方法研究进展 [J]. 海峡药学, 2022, 34(4): 1-4.
- [5] Wu W J, Li L F, Fung H Y, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of Ejiao-related animal gelatins through peptide markers using LC-QTOF-MS/MS and scheduled multiple reaction monitoring (MRM) by LC-QQQ-MS/MS [J]. *Molecules*, 2022, 27(14): 4643.
- [6] 孔浩, 田汝芳, 曹桂云, 等. 阿胶质量安全分析研究进展 [J]. 畜牧与饲料科学, 2023, 44(4): 109-115.
- [7] 马双成, 王莹, 魏锋. 我国中药质量控制模式十年来的实践与探索 [J]. 中国药理学杂志, 2023, 58(1): 2-9.
- [8] 葛重宇, 庞慧, 李楠, 等. 18家企业阿胶中氨基酸的含量分析与比较研究 [J]. 中国药房, 2017, 28(1): 122-126.
- [9] 樊雨梅, 汝文文, 史传超, 等. 阿胶低聚肽的成分分析及其抗氧化活性 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(18): 314-318.
- [10] 杨帅, 鲁婷婷, 周祖英, 等. 阿胶化学成分和药理作用及质量控制研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2023, 32(8): 806-816.
- [11] Neinst M D, Jang C, Hui S, *et al.* Quantitative analysis of the whole-body metabolic fate of branched-chain amino acids [J]. *Cell Metab*, 2019, 29(2): 417-429.e4.
- [12] Solon-Biet S M, Cogger V C, Pulpitel T, *et al.* Branched chain amino acids impact health and lifespan indirectly via amino acid balance and appetite control [J]. *Nat Metab*, 2019, 1(5): 532-545.
- [13] Pu P L. Enantioselective fluorescent recognition of free amino acids: Challenges and opportunities [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59(49): 21814-21828.
- [14] 田芳, 张英, 吴孟华, 等. HPLC 特征图谱结合多模式识别及熵权 TOPSIS 法不同基原蒲黄药材质量评价 [J]. 中草药, 2025, 56(4): 1377-1384.
- [15] Jiang M Y, Cao J L, Zhang C B, *et al.* A comprehensive strategy for quality evaluation of Wushe Zhiyang Pills by integrating UPLC-DAD fingerprint and multi-ingredients rapid quantitation with UPLC-MS/MS technology [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2022, 210: 114556.
- [16] Xiao Y Y, Shan X X, Wang H X, *et al.* Spectrum-effect relationship between HPLC fingerprint and antioxidant of "San-Bai Decoction" extracts [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2022, 1208: 123380.
- [17] 籍学伟, 陈备尧, 白妍, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和多成分含量测定结合化学计量学的暖宫七味丸质量评价研究 [J]. 中草药, 2024, 55(2): 470-478.
- [18] 宋娟, 张晶玉, 吕重宁, 等. 基于 HPLC 指纹图谱及多成分定量对刺五加的质量评价 [J]. 中草药, 2024, 55(4): 1326-1333.
- [19] 徐容, 施天慧. 基于 HPLC 指纹图谱、多指标成分含量测定及化学计量学的延胡索不同炮制品质量评价 [J]. 药物分析杂志, 2022, 42(5): 856-865.
- [20] 周杨, 晏婷, 郑林, 等. GC-MS 同时测定大果木姜子油中 11 种挥发性成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(6): 1568-1577.
- [21] 刘慧, 肖金超, 张庆捷, 等. 金骨莲胶囊 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4185-4192.
- [22] 陆小梦, 古玉正, 刘瑞媚, 等. 基于特征图谱及指标成分优化新清毒饮颗粒的制备工艺 [J]. 中药新药与临床药理, 2024, 35(2): 263-273.
- [23] 付英杰, 王肖, 贾玉民, 等. 阿胶不同酶解物 HPLC 指纹图谱建立 [J]. 中成药, 2022, 44(8): 2731-2735.
- [24] 李婉斯, 李婷, 陆春怡, 等. 基于 HPLC 指纹图谱及聚类分析评价市售阿胶的质量 [J]. 上海中医药大学学报, 2017, 31(6): 91-96.
- [25] 陈萍红, 王书芳, 田守生, 等. 柱前衍生 RP-HPLC 法测定阿胶中 13 种氨基酸 [J]. 中草药, 2013, 44(14): 1995-1999.
- [26] Xie Y F, Luo T, Yang J, *et al.* Rapid determination of amino acids in beer, red wine, and donkey-hide gelatin by gradient elution of HPLC: From micellar liquid chromatography to high submicellar liquid chromatography [J]. *J AOAC Int*, 2018, 101(1): 249-255.

[责任编辑 时圣明]