

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)22-0087-08
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.22.019



UPLC-MS/MS 法同时测定阿胶中 20 种氨基酸含量 及其化学模式识别分析*

蒲健^{1,2}, 杨帅^{3,4}, 祝扬帆^{3,4}, 谭丹^{1,2}, 郑林^{2,3}, 迟明艳^{3,4}, 黄勇^{2,3,Δ}

(1. 贵州益佰制药股份有限公司, 贵州 贵阳 550008; 2. 国家苗药工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550004;
3. 贵州医科大学省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室·贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳
550004; 4. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550004)

摘要:目的 建立阿胶中 20 种氨基酸的含量测定方法及不同产地阿胶的化学模式识别分析法。方法 采用超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定阿胶中氨基酸含量, 分析柱为 Waters BEH C₁₈ 柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1% 甲酸乙腈-0.1% 甲酸水溶液(5:95, V/V), 流速为 0.35 mL/min, 柱温为 45 °C, 进样体积为 5 μL; 采用电喷雾离子源(ESI), 正离子模式下多反应监测(MRM)。采用层次聚类分析(HCA)法、主成分分析(PCA)法和正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)法分析测定结果。结果 20 种成分在相应质量浓度范围内与峰面积线性关系良好, 检测限为 0.002~0.075 μg/mL, 定量限为 0.004~0.134 μg/mL; 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均不超过 4.70%, 平均加样回收率为 93.20%~107.80%, RSD 为 0.80%~3.90%。HCA 法及 PCA 法均可将 18 个产地的药材样品分为 2 类; OPLS-DA 法筛选出指标性成分异亮氨酸、丙氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、脯氨酸、精氨酸。结论 所建方法可用于阿胶中氨基酸类成分的含量测定, 筛选的 7 种成分可作为区分不同厂家阿胶的潜在指标。

关键词:超高效液相色谱串联质谱法; 阿胶; 氨基酸; 质量控制; 指标性成分; 化学模式识别

*基金项目: 贵州省科技计划项目[黔科合支撑[2021]一般 419, 黔科合平台人才-GCC[2022]031-1, 黔科合平台人才-CXTD[2023]019, 黔科合中引地[2023]006]。

第一作者: 蒲健, 女, 苗族, 大学本科, 中级工程师, 研究方向为中药质量控制及新药研发, (电子信箱)1037930332@qq.com。

Δ通信作者: 黄勇, 男, 汉族, 博士, 教授, 研究方向为中药药效物质基础及质量控制, (电子信箱)HUANGY2020@126.com。

同时测定小儿热速清口服液中多种防腐剂含量。

参考文献

- [1] 苗明三, 李中心, 朱志军, 等. 小儿热速清口服液解热抗炎作用的研究[J]. 河南中医, 1991, 11(6): 11-12.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 26.
- [3] 魏一婷, 吴媛, 丁琳, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定调味品中 7 种对羟基苯甲酸酯类防腐剂及其水平调查[J]. 分析科学学报, 2023, 39(5): 612-617.
- [4] 许有诚, 赵庄, 李丹凤. MEKC 法同时测定中药口服液体制剂中 10 种防腐剂和甜味剂含量[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(6): 798-802.
- [5] 孟蕾蕾. 罗汉果止咳糖浆抑菌剂含量测定和抑菌效力的研究[J]. 中国药品标准, 2023, 24(3): 319-323.
- [6] 唐川, 沈学彬, 桂凌. 高效液相色谱法同时测定肺力咳合剂中苯甲酸钠等 6 种防腐剂含量[J]. 儿科药学杂志, 2022, 28(9): 26-29.
- [7] 张筱, 隋海山, 李现菊, 等. HPLC-DAD 法同时测定复方甘草片中 3 种有效成分和 5 种防腐剂[J]. 中成药, 2022, 44(2): 376-380.
- [8] 黄慧, 孙煜, 何虹, 等. HPLC 法同时测定复方黄藤洗液中 3 个有效成分及 2 种防腐剂的含量[J]. 药学研究, 2021, 40(12): 790-793.
- [9] 肖引, 王皎, 陈江. 五味子糖浆中 6 种抑菌剂筛查与分析[J]. 中国药业, 2020, 29(15): 84-86.
- [10] 魏文芝, 王天学, 张敏娟. HPLC 法同时测定复方磷酸可待因口服液中 3 种有效成分及 2 种防腐剂的含量[J]. 中国药房, 2018, 29(18): 2501-2504.
- [11] 任菲菲, 魏静, 李晶平. 高效液相色谱法测定化妆品中 5 种防腐剂[J]. 化学分析计量, 2023, 32(5): 51-55.
- [12] 陈婧, 王文强, 孙姗姗, 等. 高效液相色谱法测定湿巾中 7 种防腐剂[J]. 轻工标准与质量, 2023(4): 64-67.
- [13] 马永青, 杜高锋, 李小盼. 高效液相色谱法双波长测定川贝枇杷糖浆中 8 种防腐剂含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2022, 39(12): 1439-1446.
- [14] 时佩, 冯有龙, 鲁寅生, 等. HPLC 法测定不同厂家小儿止咳糖浆中防腐剂的含量[J]. 药学与临床研究, 2022, 30(4): 323-326.
- [15] 钱保勇, 朱琼, 吴璐. HPLC 法测定滴眼液中 5 种常用抑菌剂的含量[J]. 中国药品标准, 2023, 24(1): 90-95.
- [16] 许有诚, 赵庄, 李丹凤. MEKC 法同时测定中药口服液体制剂中 10 种防腐剂和甜味剂含量[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(6): 798-802.

(收稿日期: 2023-11-30; 修回日期: 2024-06-09)

Simultaneous Determination of 20 Amino Acids in Asini Corii Colla by UPLC – MS / MS and Its Chemical Pattern Recognition

PU Jian^{1,2}, YANG Shuai^{3,4}, ZHU Yangfan^{3,4}, TAN Dan^{1,2}, ZHENG Lin^{2,3}, CHI Mingyan^{3,4}, HUANG Yong^{2,3}

(1. Guizhou Yibai Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang, Guizhou, China 550008; 2. National Engineering Research Center of Miao's Medicines, Guiyang, Guizhou, China 550004; 3. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants · Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceuticals, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China 550004; 4. School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China 550004)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of 20 amino acids in Asini Corii Colla and a chemical pattern recognition method for Asini Corii Colla from different producing areas. **Methods** The content of amino acids in Asini Corii Colla was determined by the ultra – high – performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC – MS / MS) method. The analytical column was the Waters BEH C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid acetonitrile – 0.1% formic acid aqueous solution (5:95, V / V), the flow rate was 0.35 mL / min, the column temperature was 45 °C, and the injection volume was 5 μL. The electrospray ionization (ESI) with positive ion mode and multi – reaction monitoring (MRM) was adopted. The content determination was analyzed by the hierarchical clustering analysis (HCA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares – discriminant analysis (OPLS – DA). **Results** Twenty components had a good linear relationship with the peak area within the corresponding mass concentration range. The limits of detection (LOD) were in the range of 0.002 – 0.075 μg / mL, the limits of quantification (LOQ) were in the range of 0.004 – 0.134 μg / mL. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were not over 4.70%. The average recovery rates of 20 components were in the range of 93.20% – 107.80% with RSDs in the range of 0.80% – 3.90%. The medicinal materials from 18 producing areas were classified into two categories by HCA or PCA methods; seven indicator components including isoleucine, alanine, glutamine, aspartic acid, glutamic acid, proline, and arginine were screened out by the OPLS – DA method. **Conclusion** The established method can be used to determine the content of amino acids in Asini Corii Colla, and the screened seven components can be used as the potential indicators to distinguish Asini Corii Colla from different manufacturers.

Key words: UPLC – MS / MS; Asini Corii Colla; amino acid; quality control; indicator component; chemical pattern recognition

阿胶是以马科动物驴 *Equus asinus* L. 的皮为原料加入黄酒和冰糖等辅料制成的胶状中药^[1], 广泛用于养血、优化免疫应答, 以及妇科疾病的治疗^[2]。阿胶的化学成分主要包含蛋白质及其降解产物氨基酸。氨基酸是组成多肽和蛋白质的基本单位, 是生物代谢过程中的重要物质, 具有抗氧化^[3]、调血压^[4]、增强免疫力^[5]、抗疲劳、补充皮肤水分^[6]、增强营养和能量代谢^[7-8]、增强记忆能力^[9]、抗衰老^[10]等重要作用。阿胶中含有多种氨基酸[包括人体不能合成的必需氨基酸, 如赖氨酸(Lys)、亮氨酸(Leu)、缬氨酸(Val)、苯丙氨酸(Phe)等], 2020年版《中国药典(一部)》阿胶的含量测定项下仅对4种氨基酸[羟脯氨酸(Hyp)、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、脯氨酸(Pro)]进行含量测定, 在药材内在品质综合评价和全面控制方面均有欠缺。目前, 用于阿胶氨基酸含量测定的方法多为色谱法, 由于多数氨基酸无紫外吸收, 故测定前多需对氨基酸进行化学衍生, 但其产生的副产物会干扰测定, 同时, 测得的氨基酸含量常取决于阿胶与衍生化试剂的反应程度, 因此测定结果准确性较差, 且操作烦琐, 使用的衍生试剂也有一定毒性。超高效液相色谱串联质谱(UPLC – MS / MS)法具有灵敏、准确、高效的特点, 适用于中药复杂体系中多种成分的同时定量分析, 使用其测定阿胶中氨基酸时无

须进行化学衍生, 操作简便。为此, 本研究中采用该法同时测定不同产地阿胶中20种氨基酸的含量, 并结合化学模式识别分析方法寻找可用于区分不同产地阿胶的潜在指标成分。现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

UPLC – TQ – D型液相色谱 – 质谱联用仪(美国Waters公司); EL204 1 / 1型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司, 精度为0.1 mg); Allegra 30R Centrifuge型低温高速离心机(美国Beckman Coulter公司); KQ – 500DE数控型超声清洗机(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

对照品 L – Leu、L – 谷氨酸(Glu)、L – 天冬氨酸(Asp)、L – 精氨酸(Arg)、L – 组氨酸(His)、L – Lys、瓜氨酸(Cit)、L – Phe、L – 异亮氨酸(Ile)、L – 酪氨酸(Tyr)、L – 甲硫氨酸(Met)、L – 丝氨酸(Ser)、L – 谷氨酰胺(Gln)、L – Val、L – Pro、Gly、L – Ala、L – Hyp、L – 苏氨酸(Thr)、L – 鸟氨酸盐酸盐(Orni), 均购自成都埃法生物科技有限公司, 批号分别为 AF20080253、AF20071254、AF20080263、AF20080251、AF20080257、AF20080261、AF21021555、AF20080254、AF20080256、AF20080252、AF21032151、AF20080260、AF22040751、AF20050253、

AF20080255、AF20102451、AF20071851、AF21032351、AF2008258、AFBH1905, 含量均不小于 98%); 试验所用试剂均为分析纯, 水为纯化水。阿胶(批号分别为 20220208、2010062、2109013、220204、220302、202038、21120101、21120302、01190207、21120603、202111110、21052001、21100101、21100501、21110301、21110401、21110201、21100401, 依次编号为 S1 – S18, 其中 S1 – S6、S7 – S8、S9 – S11、S12 – S18 样品产地分别为山东、河南、湖北、湖南), 经贵州省药物制剂重点实验室刘春花副教授鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 试验条件

色谱条件, 分析柱为 Waters BEH C₁₈ 柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 保护柱为 Waters Van Guard BEH C₁₈ 柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1% 甲酸乙腈 – 0.1% 甲酸水溶液(5:95, V/V); 流速为 0.35 mL/min, 进样体积为 5 μL; 柱温为 45 °C。质谱条件, 采用电喷雾离子源(ESI), 正离子模式下多反应监测(MRM), 毛细管电压为 0.5 kV, 离子源温度为 150 °C, 喷雾气与反吹气为氮气(N₂), 去溶剂气流速为 1 000 L/h, 去溶剂气温度为 500 °C, 质谱数据采集及处理软件为 MassLynx V4.1 工作站。20 种氨基酸的质谱条件见表 1。

表 1 20 种氨基酸的质谱条件

Tab.1 Mass spectrometric conditions of 20 amino acids

待测成分	分子式	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	锥孔电压(V)	碰撞能量(eV)
Leu	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132.1	30.1	20	15
Glu	C ₅ H ₉ NO ₄	148.1	84.1	20	15
Asp	C ₄ H ₇ NO ₄	134.1	74.1	20	15
Arg	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	175.1	116.1	25	15
His	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	156.2	110.1	20	15
Lys	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	147.1	84.1	15	15
Cit	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	176.1	159.2	20	10
Phe	C ₉ H ₁₁ NO ₂	166.2	120.2	15	15
Ile	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132.1	69.2	20	10
Tyr	C ₉ H ₁₁ NO ₃	182.1	136.2	20	15
Met	C ₅ H ₁₁ O ₂ NS	150.1	133.1	17	10
Ser	C ₃ H ₇ NO ₃	106.1	60.1	20	10
Gln	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146.9	83.9	8	16
Val	C ₅ H ₁₁ NO ₂	118.1	72.1	20	10
Pro	C ₅ H ₉ NO ₂	116.1	70.1	20	13
Gly	C ₂ H ₅ NO ₂	76.1	30.1	20	7
Ala	C ₃ H ₇ NO ₂	90.1	44.1	20	10
Hyp	C ₅ H ₉ NO ₃	132.1	68.1	25	15
Thr	C ₄ H ₉ NO ₃	120.1	74.1	19	10
Orni	C ₅ H ₁₃ N ₂ O ₂	133.1	116.1	20	10

2.2 溶液制备

混合对照品溶液: 取 Leu、Glu、Asp、Arg、His、Lys、Cit、Phe、Ile、Tyr、Met、Ser、Gln、Val、Pro、Gly、Ala、Hyp、Thr、Orni 对照品各约 10 mg, 精密称定, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液使溶解, 制成质量浓度分别为 1.032, 1.083, 1.094, 1.119, 1.106, 1.004, 1.022, 0.985, 1.128, 1.085, 1.028, 1.138, 1.036, 1.064, 1.161, 1.212, 1.099, 1.121, 1.057, 1.033 mg/mL 的混合对照品溶液。

供试品溶液: 取样品粗粉约 0.10 g, 置 100 mL 容量瓶中, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液 80 mL, 超声(功率 500 W, 频率 40 kHz)处理 30 min, 放冷, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液定容, 摇匀。取 2 mL, 置 10 mL 顶空瓶中, 加 12 mol/L 盐酸 2 mL, 150 °C 水解 1 h, 放冷, 移至蒸发皿中, 用水 10 mL 分次洗涤, 洗液并入蒸发皿中, 蒸干, 残渣加 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解, 移至 25 mL 容量瓶中, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液定容, 摇匀; 取 1 mL, 14 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 即得。

空白对照溶液: 以 0.1 mol/L 盐酸溶液为空白对照溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验: 取空白对照溶液、混合对照品溶液、供试品溶液各适量, 按 2.1 项下试验条件进样测定, 记录色谱。结果表明, 供试品溶液与对照品溶液色谱图中 Leu、Glu、Asp、Arg、His、Lys、Cit、Phe、Ile、Tyr、Met、Ser、Gln、Val、Pro、Gly、Ala、Hyp、Thr、Orni 的出峰时间一致, 而空白对照溶液色谱图相应位置无色谱峰。详见图 1。

线性关系考察: 分别精密量取 2.2 项下混合对照品溶液适量, 用 0.1 mol/L 盐酸溶液制成系列混合对照品溶液。精密量取 5 μL, 按 2.1 项下试验条件进样测定, 记录峰面积。以待测成分质量浓度(*X*, μg/mL)为横坐标、峰面积(*Y*)为纵坐标进行线性回归。结果见表 2。

检测限与定量限: 分别精密量取 2.2 项下混合对照品溶液适量, 倍比稀释, 并按 2.1 项下试验条件进样测定, 以信噪比为 10:1、3:1 时的质量浓度分别记作定量限和检测限。结果见表 2。

精密度试验: 取混合对照品溶液适量, 按 2.1 项下试验条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果上述 20 种成分峰面积的 *RSD* 分别为 2.57%, 0.25%, 2.75%, 2.91%, 2.39%, 2.66%, 0.96%, 2.04%, 1.26%, 2.17%, 2.78%, 1.53%, 2.17%, 2.23%, 2.47%, 1.33%, 0.83%, 1.75%, 1.02%, 2.38% (*n* = 6), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取供试品溶液(S3)适量, 于室温放置 0, 4, 8, 12, 18, 24 h 时按 2.1 项下试验条件进样测定, 记录峰面积。结果上述 20 种成分峰面积的 *RSD* 分别为 4.80%, 3.20%, 3.73%, 3.90%, 3.36%, 4.70%, 0.91%,

3.88%, 3.60%, 4.09%, 2.45%, 2.35%, 3.46%, 2.15%, 4.17%, 2.46%, 2.50%, 3.79%, 3.12%, 0.89% ($n=6$), 表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(S3)适量,6份,精密称定,按2.2项下方法制成供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果上述20种成分的平均含量分别为31.17, 21.54, 7.92, 106.47, 10.21, 29.29, 0.93, 16.24, 44.32, 6.28, 4.94, 11.33, 33.54, 18.84, 118.87, 130.44, 48.53, 51.47, 10.82, 0.38 mg/g, RSD 分别为3.34%, 1.17%, 2.82%, 3.85%, 4.64%, 2.68%, 3.04%, 1.06%, 3.62%, 3.56%, 4.59%, 4.06%, 4.63%, 2.34%, 2.89%, 4.19%, 3.95%, 2.65%, 2.85%, 3.37% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

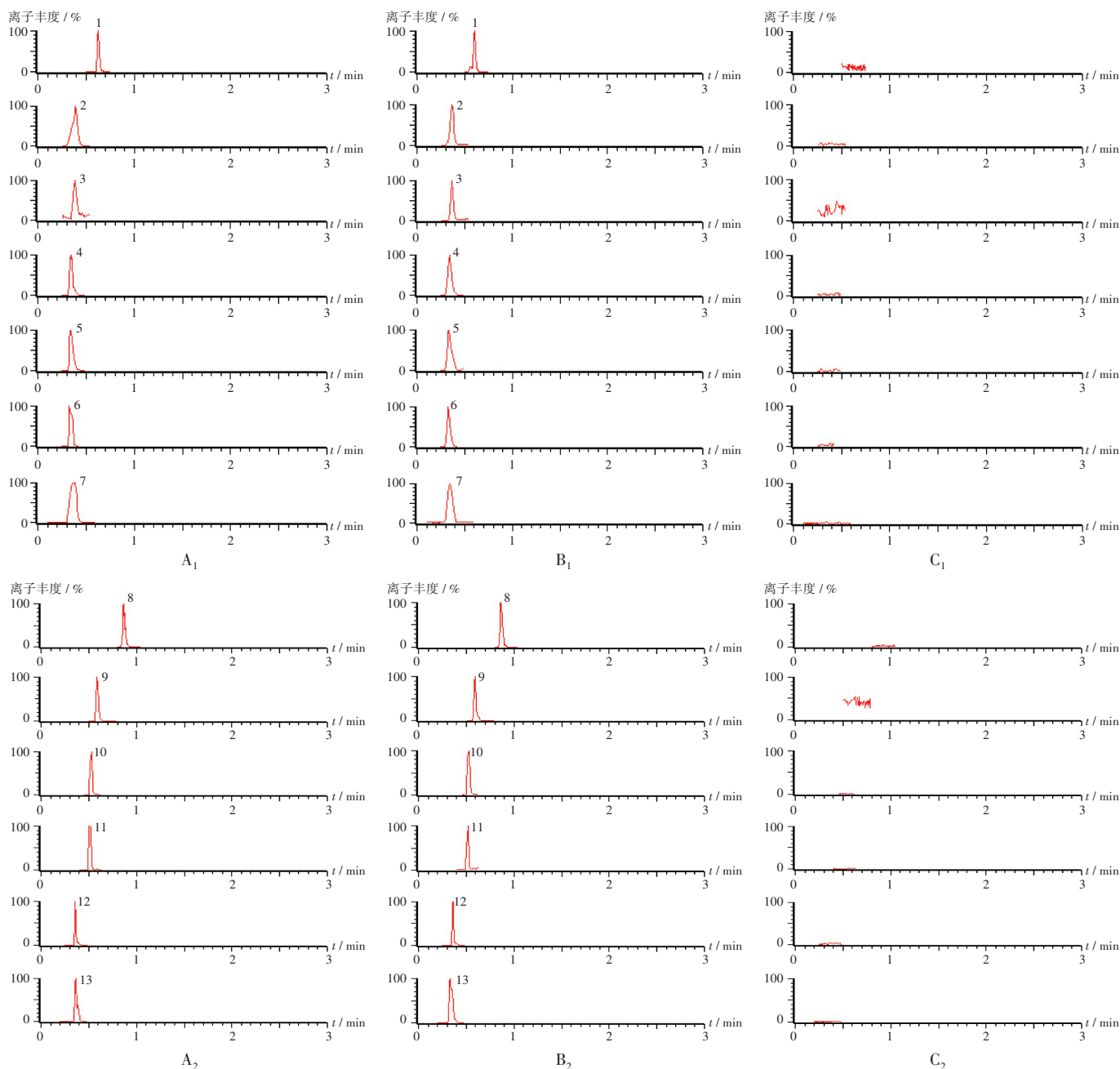
加样回收试验:取已知含量样品(S3)适量,共6份,每份加入一定质量浓度的混合对照品溶液,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进行测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果见表3。

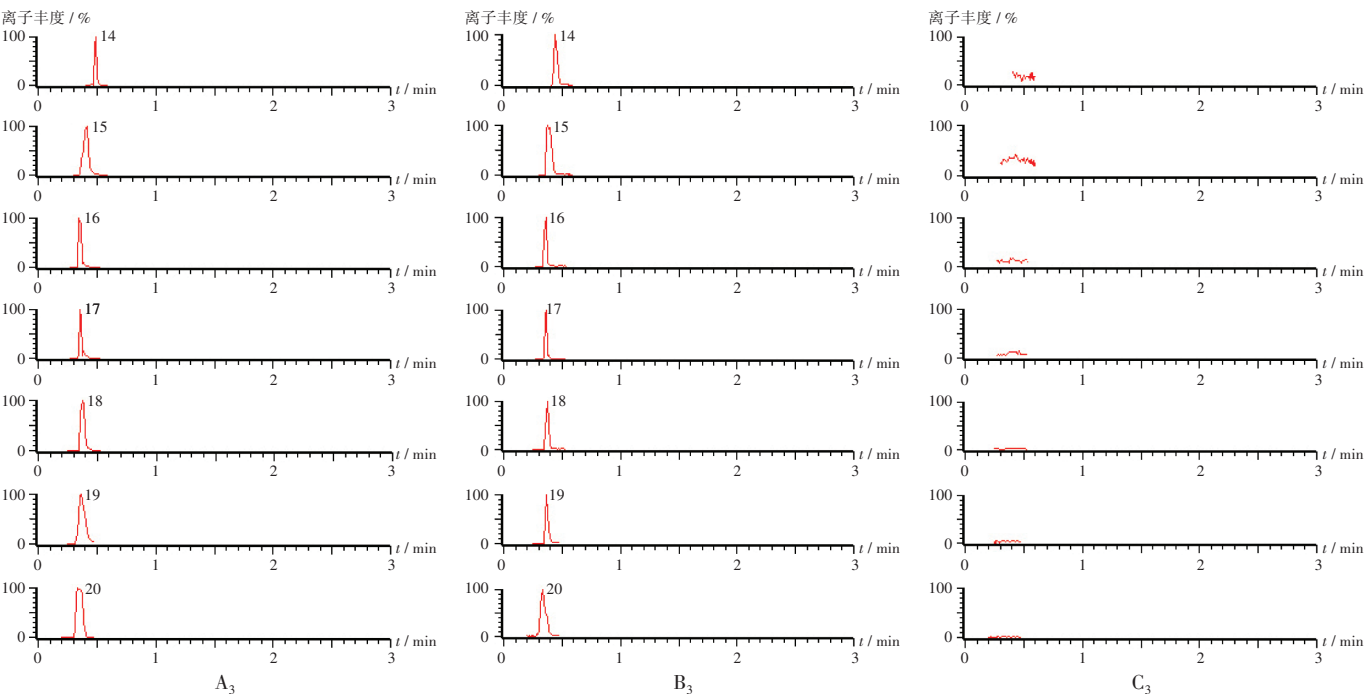
2.4 含量测定

取各批样品约0.10 g,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果见表4。

2.5 化学模式识别

层次聚类分析(HCA)^[11-13]:将18批次阿胶的20种氨基酸的含量为变量,导入SIMCA 13.0软件,采用Ward法,以平方欧氏距离作为度量标准进行HCA,以考察不同产地阿胶中氨基酸的含量差异。结果见





1. Leu 2. Glu 3. Asp 4. Arg 5. His 6. Lys 7. Cit 8. Phe 9. Ile 10. Tyr 11. Met 12. Ser 13. Gln 14. Val 15. Pro 16. Gly 17. Ala 18. Hyp 19. Thr 20. Orni
 $A_1 - A_3$. 混合对照品溶液 $B_1 - B_3$. 供试品溶液 $C_1 - C_3$. 空白对照溶液

图1 MRM 色谱图

1. Leu 2. Glu 3. Asp 4. Arg 5. His 6. Lys 7. Cit 8. Phe 9. Ile 10. Tyr 11. Met 12. Ser 13. Gln 14. Val 15. Pro 16. Gly 17. Ala 18. Hyp 19. Thr 20. Orni
 $A_1 - A_3$. Mixed reference solution $B_1 - B_3$. Test solution $C_1 - C_3$. Blank reference solution

Fig.1 MRM chromatograms

表2 线性关系与检测限、定量限考察结果

Tab.2 Results of the linear relation test, LOD and LOQ

investigation					
待测成分	回归方程	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	r	检测限($\mu\text{g/mL}$)	定量限($\mu\text{g/mL}$)
Leu	$Y_1 = 8\,524.5X_1 + 2\,012.7$	0.31~7.73	0.999 2	0.019	0.038
Glu	$Y_2 = 1141.1X_2 + 253.14$	0.21~5.33	0.999 3	0.006	0.012
Asp	$Y_3 = 291.91X_3 + 2.230\,9$	0.16~4.16	0.999 9	0.016	0.032
Arg	$Y_4 = 3\,268X_4 + 464.88$	0.92~23.03	0.999 5	0.043	0.086
His	$Y_5 = 4\,026.9X_5 + 533.2$	0.09~2.15	0.999 2	0.013	0.026
Lys	$Y_6 = 7\,220.7X_6 + 1\,671.2$	0.29~7.23	0.999 7	0.014	0.028
Cit	$Y_7 = 3\,549X_7 + 35.13$	0.02~0.59	0.999 3	0.002	0.004
Phe	$Y_8 = 16\,754X_8 - 746.07$	0.16~4.08	0.999 2	0.025	0.050
Ile	$Y_9 = 4\,820X_9 + 1\,747.7$	0.41~10.25	0.999 0	0.058	0.115
Tyr	$Y_{10} = 2\,229.9X_{10} - 75.415$	0.07~1.73	0.999 5	0.075	0.134
Met	$Y_{11} = 1\,698.7X_{11} - 110.95$	0.05~1.33	0.999 0	0.021	0.042
Ser	$Y_{12} = 2\,490.7X_{12} + 190.39$	0.11~2.65	0.999 7	0.025	0.050
Gln	$Y_{13} = 1\,661.6X_{13} + 300.05$	0.30~7.48	0.999 5	0.012	0.024
Val	$Y_{14} = 20\,686X_{14} + 484.91$	0.19~4.65	0.999 5	0.007	0.014
Pro	$Y_{15} = 8\,884.2X_{15} + 21\,099$	1.13~28.15	0.999 7	0.058	0.118
Gly	$Y_{16} = 455.13X_{16} + 759.41$	1.34~33.43	0.999 4	0.040	0.080
Ala	$Y_{17} = 1\,992.8X_{17} + 2\,496.2$	0.46~11.43	0.999 1	0.027	0.054
Hyp	$Y_{18} = 876.67X_{18} + 1\,559.7$	0.66~16.40	0.999 9	0.043	0.086
Thr	$Y_{19} = 567.86X_{19} + 251.62$	0.15~3.75	0.999 6	0.018	0.036
Orni	$Y_{20} = 8\,629.4X_{20} + 12.963$	0.01~0.33	0.999 5	0.003	0.005

表3 加样回收试验结果(%)

Tab.3 Results of the recovery test (%)

待测成分	$\bar{X}$	RSD	待测成分	$\bar{X}$	RSD
Leu	99.22	0.80	Met	107.80	1.57
Glu	98.50	1.70	Ser	99.44	2.77
Asp	98.58	1.49	Gln	102.08	2.36
Arg	100.09	2.39	Val	96.57	2.03
His	100.68	1.14	Pro	100.33	2.23
Lys	95.96	2.35	Gly	95.84	3.00
Cit	102.79	3.90	Ala	93.20	2.15
Phe	100.86	1.56	Hyp	103.62	1.88
Ile	101.20	2.69	Thr	97.98	1.89
Tyr	98.54	1.97	Orni	95.95	2.64

图2。当分类距离为300时,18批次阿胶可聚为2类,其中编号为S1-S6及S9-S11的号样品聚为第一类(即山东、河北样品可聚为一类);编号为S7-S8及S12-S18的样品聚为第二类(即河南、湖南样品聚为一类)。阿胶能按产地聚类,表明阿胶中氨基酸的含量高低可能与产地有一定关系,且各产地阿胶质量较稳定,其中山东与湖北、湖南与河南产地的阿胶含量差异较小。

主成分分析(PCA)^[13-14]:以20种氨基酸的含量测

表 4 18 批次阿胶中 20 种氨基酸含量测定结果 (mg / g, n = 3)

编号	Cit	Lys	His	Arg	Asp	Glu	Leu	Gln	Ser	Met	Tyr	Ile	Phe	Orni	Thr	Hyp	Ala	Gly	Pro	Val
S1	0.90	26.06	7.03	98.02	8.89	22.35	26.13	27.64	8.39	2.96	5.21	35.40	14.65	0.67	10.91	59.58	49.66	114.86	118.33	16.52
S2	0.88	24.32	10.04	89.60	8.80	22.69	30.46	28.96	11.09	2.52	6.93	47.48	17.56	0.62	11.57	69.24	52.26	155.71	120.40	15.78
S3	0.89	33.85	10.43	116.72	9.00	23.96	30.45	38.30	12.32	5.20	5.99	44.65	16.27	0.38	10.88	61.56	50.61	136.25	116.23	18.26
S4	1.06	28.65	7.98	86.70	6.16	23.30	30.97	28.20	9.00	3.86	6.70	44.93	16.98	0.49	9.70	61.01	46.95	132.89	117.50	15.32
S5	0.84	30.27	9.03	97.90	8.92	23.51	30.52	33.08	11.31	4.67	6.07	40.56	17.11	0.52	7.99	80.63	50.82	142.28	118.80	18.04
S6	1.00	29.36	10.05	102.84	7.64	9.36	27.39	30.34	10.38	2.69	7.08	40.39	15.60	0.47	9.12	66.97	46.81	158.08	117.74	17.48
S7	1.00	31.11	10.26	82.25	21.15	31.54	37.52	58.43	12.36	5.09	6.46	15.62	18.70	0.81	13.34	53.60	83.19	148.68	122.53	27.06
S8	1.12	30.32	9.92	86.27	19.69	31.66	29.59	55.03	12.78	4.00	4.84	13.60	17.44	0.56	15.64	76.76	85.24	162.71	123.28	21.51
S9	1.07	31.59	8.00	107.78	6.38	21.94	30.40	33.87	9.55	4.04	6.29	42.90	17.39	0.81	8.82	60.36	54.67	163.35	137.60	19.06
S10	0.95	24.91	5.38	57.85	7.49	20.94	28.48	29.54	9.86	5.26	5.77	42.36	15.23	0.42	10.36	62.20	47.90	117.70	111.07	17.44
S11	1.05	28.94	7.77	83.97	11.18	24.85	29.49	39.48	10.73	4.44	5.63	32.95	16.69	0.59	11.60	66.44	62.60	147.92	123.99	19.33
S12	1.12	29.46	10.91	81.68	25.71	37.64	33.62	56.36	16.76	2.77	6.76	17.79	18.99	1.09	14.24	49.50	81.66	107.81	104.50	17.85
S13	1.14	30.70	11.33	79.85	22.39	31.51	31.71	51.22	12.14	2.88	5.17	14.15	17.78	0.55	13.43	55.68	82.78	151.15	109.93	23.18
S14	1.05	29.86	8.74	72.16	21.03	29.26	28.75	45.17	12.22	2.53	4.17	13.05	15.85	0.48	14.17	62.40	63.52	96.04	108.65	20.15
S15	0.92	28.87	8.51	71.21	19.20	28.75	28.73	50.51	10.37	2.38	4.56	12.46	14.44	0.49	9.43	51.28	74.92	133.55	96.08	19.94
S16	0.95	28.54	9.17	77.96	24.26	31.15	28.31	55.05	13.29	2.18	4.61	12.08	15.39	0.58	11.66	59.57	79.88	138.66	101.90	20.79
S17	1.12	28.35	6.72	79.38	21.42	33.43	27.93	44.46	9.04	2.15	4.35	13.18	14.98	0.48	10.75	55.50	76.23	107.94	93.93	18.48
S18	1.01	29.87	8.97	80.05	19.59	31.39	30.16	46.47	12.56	3.70	5.40	16.05	16.96	0.54	10.04	53.45	75.98	130.12	93.67	15.29

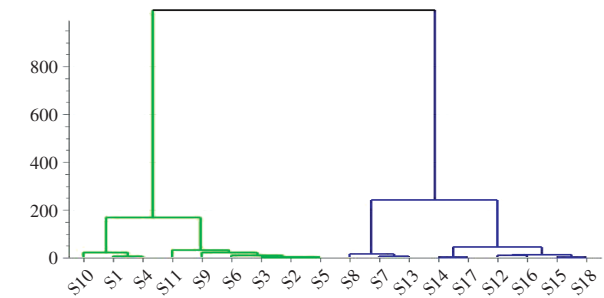


图 2 18 批次阿胶聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram of HCA of 18 batches of Asini Corii Colla 定结果作为变量,采用SIMCA 13.0 软件对 18 批次阿胶进行 PCA,以研究不同产地阿胶间的相似性或差异性的关系或趋势,并观察样品的聚散程度^[15],结果表明,前 2 个主成分的累计贡献率达 75.22%,且特征根均大于 1,表明两者能反映阿胶的大部分信息和基本特征。PCA 得分见图 3,18 批次样品可分为 2 类,结果与 HCA 基本一致,进一步验证了聚类分析的分类结果。20 种氨基酸载荷的散点图见图 4(变量离原点越远,则表明该变量对主成分的影响权重越大^[16]),可知,Ile、Ala、Gln、Asp、Glu、Arg 对主成分 1 的贡献率较大,Pro 和 Gly 对主成分 2 的贡献率较大。

正交偏最小二乘 - 判别分析(OPLS - DA)^[17]:将 18 批次样品的 20 种氨基酸的含量导入 SIMCA 13.0 软件。OPLS - DA 得分图见图 5,可知,在该模型下 R^2_X 、 R^2_Y 、 Q^2 分别为 0.743、0.953、0.934,均大于 0.5,表明该模型具有较好预测能力^[18]。进行 200 次置换检验(见图 6),

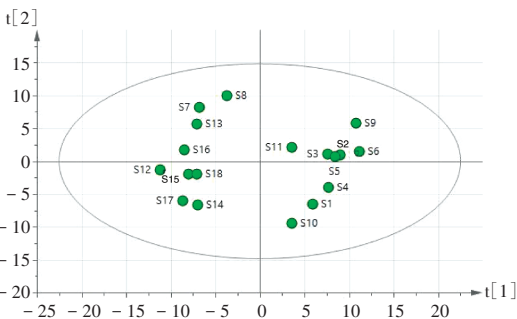


图 3 18 批次阿胶主成分分析得分图

Fig. 3 Scoring plot of PCA of 18 batches of Asini Corii Colla

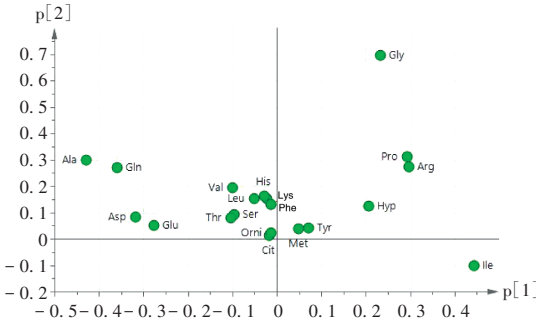


图 4 18 批次阿胶主成分分析模型载荷散点图

Fig. 4 Loading scatter plot of PCA of 18 batches of Asini Corii Colla

结果表明模型有效,未过度拟合^[19]。进一步以 20 个变量的筛选差异变量(VIP)值大于 1 为标准^[20],筛选出 Ile、Ala、Gln、Asp、Glu、Pro、Arg(见图 7)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产地阿胶的潜在指标成分,该结果与 PCA 载荷散点

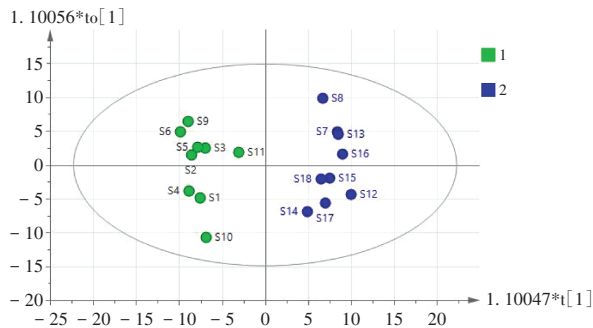


图 5 18 批次阿胶 OPLS - DA 得分图

Fig. 5 Scoring plot of OPLS - DA of 18 batches of Asini Corii Colla

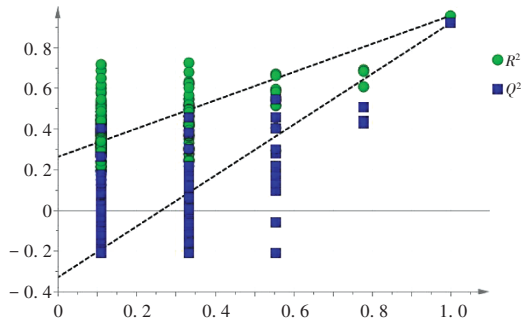


图 6 OPLS - DA 模型的 200 次置换检验

Fig. 6 Two - hundred permutation tests for OPLS - DA model

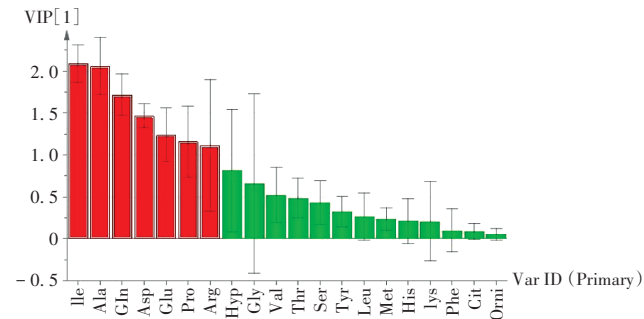


图 7 阿胶 OPLS - DA 的 VIP 值图

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

图中寻找的重要性权重变量基本一致。

3 讨论

预试验中分别考察盐酸与样品的体积比(1:4, 1:2, 1:1, 5:4, 7:4), 水解时间(0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 h), 水解温度(50, 100, 150, 175, 200 °C), 根据峰面积和峰形确定了盐酸与样品的体积比为 1:1, 水解时间为 1.0 h, 水解温度为 150 °C。同时, 分别对进样量 1, 5, 10 μ L 进行了考察, 结果进样量为 1 μ L 时, 各成分峰形较差, 且 Met、Cit、Orni 等含量较低的氨基酸不能检测到; 进样量为 10 μ L 时, 甘氨酸等含量较高的氨基酸, 线性关系较差; 进样量为 5 μ L 时, 各成分均能检测到, 峰形较好, 且线性关系良好, 故选择。

本研究中使用 UPLC - MS / MS 谱法测定 18 批、4 个产地阿胶中的 20 种氨基酸, 且包括目前未见报道的 Gln、Cit、Orni, 从 HCA 结果来看, 不同产地的阿胶中的

氨基酸含量存在一定差异, 可能与其所用的原材料来源、原材料批间质量及制备方式差异有关。随后 PCA 分类结果与聚类分析结果一致, 进一步验证了聚类分析的结果。对 18 批次阿胶进行了差异性评价, 通过 VIP 值筛选出了 Ile、Ala、Gln、Asp、Glu、Pro、Arg 可能是导致样品之间产生差异的主要原因, 但 2020 年版《中国药典(一部)》阿胶的含量测定项下仅测定了 Ala 和 Pro, 在今后阿胶的生产过程中可同时关注其余 5 种成分的含量变化, 从而更好地对其质量进行把控。由于该研究中分析的样品产地及批次的数量较少, 因此氨基酸是否能成为评判阿胶质量的指标性成分或其他成分是否也是指标性成分, 尚需增加样本量加以验证, 并进一步深入研究。

综上所述, 本研究中所建方法可用于阿胶中氨基酸类成分的含量测定, 筛选出的 7 种成分可作为区分不同厂家阿胶的潜在指标。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 197.
- [2] 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.
- [3] 蒋 楠, 杜立达, 孔德文, 等. 胱氨酸 / 谷氨酸反向转运体作为药物靶点的研究进展[J]. 药学学报, 2022, 57(6): 1621 - 1629.
- [4] POGGIOGALLE E, FONTANA M, GIUSTI AM, et al. Amino acids and hypertension in adults[J]. Nutrients, 2019, 11(7): 1459.
- [5] VAN DEN BERG A, VAN ELBURG RM, WESTERBEEK EA, et al. Glutamine - enriched enteral nutrition in very - low - birth - weight infants and effects on feeding tolerance and infectious morbidity: a randomized controlled trial [J]. Am J Clin Nutr, 2005, 81(6): 1397 - 1404.
- [6] 兰 韬, 吴 琦, 赵 琳, 等. 保健食品功效成分、功能声称及其检测标准现状研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(1): 387 - 396.
- [7] 刘 桦, 郑 涓, 张皎月, 等. 异亮氨酸对机体能量代谢的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2022, 38(7): 618 - 621.
- [8] 陆雨顺, 张燕婷, 夏蕴实, 等. 不同形态鹿茸游离氨基酸的含量测定及质量评价应用研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(6): 1587 - 1594.
- [9] GENCHI G. An overview on D - amino acids[J]. Amino Acids, 2017, 49(9): 1521 - 1533.
- [10] DATO S, HOXHA E, CROCCO P, et al. Amino acids and amino acid sensing: implication for aging and diseases [J]. Biogerontology, 2019, 20(1): 17 - 31.
- [11] 罗 虹, 刘博文, 杨 慧, 等. 基于网络药理学及活性成分测定的六味地黄系列制剂质量研究[J]. 中草药, 2020, 51(21): 5462 - 5477.
- [12] GU F, HALL P, MILES NJ. Performance evaluation for composites based on recycled polypropylene using principal component analysis and cluster analysis [J]. J Clean Prod, 2016, 115: 343 - 353.
- [13] 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.