

阿胶酶解物 HPLC 指纹图谱建立

付英杰¹, 李新健², 贾玉民³, 陈 智⁴, 任 强¹, 于定荣^{2*}, 陈 娅¹
(1. 济宁医学院药学院, 山东 日照 276826; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 3. 东阿阿胶股份有限公司, 国家胶类中药工程技术研究中心, 山东 东阿 252201; 4. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355)

摘要: **目的** 建立阿胶酶解物 HPLC 指纹图谱。**方法** 阿胶酶解物的分析采用 Gemini NX C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 0.2 mol/L 无水硫酸钠-乙腈-水, 梯度洗脱; 体积流量 1 mL/min; 柱温 25 ℃; 检测波长 280 nm, 并进行相似度、聚类分析及主成分分析。**结果** 胰蛋白酶酶解物指纹图谱显示 3 厂家样品存在 5 个共有峰; 糜蛋白酶酶解物指纹图谱显示了 3 厂家样品的高一致性, 出现 13 个共有峰; 各样品相似度均大于 0.9。同仁堂及多数东阿阿胶的类别距离<5, 可与相对分散的福牌阿胶进行区分; 同仁堂阿胶类别距离<5, 但 3 厂家类别不易区分。同仁堂与东阿阿胶相对集中, 而福牌阿胶较分散; 在散点图 A1~A2、A2~A4 可区分出东阿阿胶、A1~A3、A3~A4 中可区分出福牌阿胶, A2~A3 可以区分 3 厂家阿胶、A1~A4 可以区分 3 厂家与其他品牌阿胶。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于阿胶的质量控制。

关键词: 阿胶; 酶解物; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: R282.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2021)08-2120-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.08.026

Establishment of HPLC fingerprints for enzymatic hydrolysates of *Colla Corii Asini*

FU Ying-jie¹, LI Xin-jian², JIA Yu-min³, CHEN Zhi⁴, REN Qiang¹, YU Ding-rong^{2*}, CHEN Ya¹
(1. College of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276826, China; 2. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Dong'e Ejiao Co., Ltd., Dong'e 252201, China; 4. Shandong University of TCM, Jinan 250355, China)

KEY WORDS: *Colla Corii Asini* (E' jiao); enzymatic hydrolysate; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis

阿胶 *Colla Corii Asini* 始载于《神农本草经》, 列为上品^[1]。2015 年版《中国药典》规定阿胶是由马科动物驴 *Equus asinus* L. 的干燥皮或鲜皮经煎煮、浓缩制成的固体胶, 具有补血滋阴、润燥、止血的功效, 多用于治疗眩晕心悸、肌痿无力、心烦不眠、虚风内动、肺燥咳嗽、癆咳咯血、吐血尿血、便血崩漏等^[2-4]。阿胶含有大量的胶原蛋白、多肽、氨基酸和丰富的微量元素, 阿胶的蛋白类含

量约 60%~80%^[5-8], 但其有效成分尚不完全明确。阿胶有补血^[9]、抗氧化^[10]、抗疲劳^[11]、耐氧化、耐寒冷、抗休克、增强记忆力、改善皮肤、促骨愈合、抑瘤增效, 在一定程度上还能拮抗血液的肝素化, 起到止血等作用^[12-14]。

目前, 阿胶的质量评价仍然主要依靠传统的生药学鉴别等方法, 其经验依赖性强、准确性较低^[15]。2015 年版《中国药典》将阿胶用胰酶酶

收稿日期: 2020-08-11

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81703703); 国家自然科学基金应急管理项目 (81541089); 中医药公共卫生服务补助专项全国中药资源普查项目 (财社〔2018〕43)

作者简介: 付英杰 (1983—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药新药与炮制原理。Tel: 15965001526, E-mail: pilipili@163.com

* 通信作者: 于定荣 (1975—), 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药炮制、中药化学、中药制剂以及质量标准。Tel: 13717521473, E-mail: yudingrong0826@sina.com

解,再利用 HPLC-MS 联用技术对阿胶进行鉴定^[2]。方法可靠,但操作过程繁琐,而且进行重复时,偶会出现不同厂家、不同产地原料制作的正品阿胶也会不达标的问题,且作为一般的质量控制方法过于昂贵。本实验以阿胶为基础,采用不同的蛋白酶对不同厂家不同批的阿胶进行酶解,取酶解物为样品,建立 HPLC 指纹图谱,并进行相似度、聚类及主成分分析,试图解决目前胶类药材无法突破指纹图谱的问题,以期为阿胶的质量评价提供参考。

1 材料

1.1 仪器 安捷伦 1260 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); Gemini NX C₁₈ 色谱柱 (广州菲罗门科学仪器有限公司); KQ-500DB 型数控超声清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); PH-3E 酸度计 (南京桑力电子设备厂); CP224C 电子天平 (奥豪斯仪器常州有限公司); SYC-15c 超级恒温水浴 (南京桑力电子设备厂)。

1.2 试剂 α-糜蛋白酶(B604BA0026,1 000 U/mg,上海晶纯实业有限公司);胰蛋白酶 [C119BA0026,≥300 U/mg,生物工程(上海)股份有限公司]。其他试剂均为色谱纯。

1.3 样品 东阿阿胶 (S1~S12 批号分别为 1305077、1306026、1407017、1408005、1409001、1503022、1503027、1504044、1505001、1508034、1509013、1505039);福牌阿胶 (S13~S22 批号分别为 130303、130308、130925 (纸盒)、140386 (纸盒)、1400741、14040708、14100401、14120682、15070462、15070572);同仁堂阿胶 [S23~S32 批号分别为 13191482、14191695 (大纸

盒)、14191794、14191921、14191959、15190704、15191072、15191156、20150139 (食用)、201407012 (大铁盒)];其他品牌华信 S33 批号 20141102、胶城 S34 批号 20160401、九芝堂 S35 批号 20150502。以上未标注产品批均为 250 g 普通铁盒装。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备 阿胶加纯水加热配成 5% 浓度,选用以下 2 种蛋白酶于 40 ℃ 水浴中酶解 4 h,胰蛋白酶 (将 pH 调至 8.0,胰蛋白酶加入量为 5 000 U/g 阿胶)、糜蛋白酶 (将 pH 调至 8.0,糜蛋白酶加入量为 5 000 U/g 阿胶),酶解后在 95 ℃ 水浴中灭活 15 min,冷却,依次使用脱脂棉、定量滤纸和 0.45 μm 微孔滤膜进行过滤,即得。

2.2 色谱条件 Gemini NX C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相 0.2 mol/L 无水硫酸钠 (磷酸调节 pH 至 2.3,A)-乙腈-水 (B),梯度洗脱 (0~5 min,90%~84% B;5~25 min,84%~72% B;25~35 min,72%~60% B;35~40 min,60%~48% B);体积流量 1 mL/min;柱温 25 ℃;波长 280 nm;进样量 20 μL。

2.3 HPLC 指纹图谱建立 取 35 批阿胶的胰蛋白酶及糜蛋白酶酶解物,分别在“2.2”项色谱条件下进样,获得 HPLC 色谱图,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004 A 版) 叠加色谱图,截取 5~35 min 色谱数据,以 S1 为参照,时间窗 0.2 min,获得对照色谱图 ej-R^[16]。将各色谱图与之对照求得相似度,并以匹配数=批数的色谱峰作为共有峰。见图 1~3。相似度见表 1。

表 1 32 批样品相似度

Tab. 1 Similarities of thirty-two batches of samples

编号	胰蛋白酶酶解物	糜蛋白酶酶解物	编号	胰蛋白酶酶解物	糜蛋白酶酶解物	编号	胰蛋白酶酶解物	糜蛋白酶酶解物
S1	0.975	0.905	S13	0.981	0.984	S23	0.991	0.940
S2	0.969	0.901	S14	0.96	0.984	S24	0.969	0.937
S3	0.925	0.933	S15	0.965	0.986	S25	0.972	0.939
S4	0.942	0.986	S16	0.857	0.987	S26	0.983	0.972
S5	0.866	0.987	S17	0.947	0.981	S27	0.94	0.934
S6	0.965	0.989	S18	0.944	0.97	S28	0.962	0.938
S7	0.962	0.99	S19	0.989	0.944	S29	0.967	0.957
S8	0.886	0.99	S20	0.908	0.95	S30	0.961	0.951
S9	0.976	0.986	S21	0.988	0.96	S31	0.987	0.939
S10	0.954	0.988	S22	0.992	0.967	S32	0.987	0.938
S11	0.715	0.955						
S12	0.933	0.939						

注:S1~S12 为东阿阿胶,S13~S22 为福牌陈胶,S23~S32 为同仁堂阿胶。

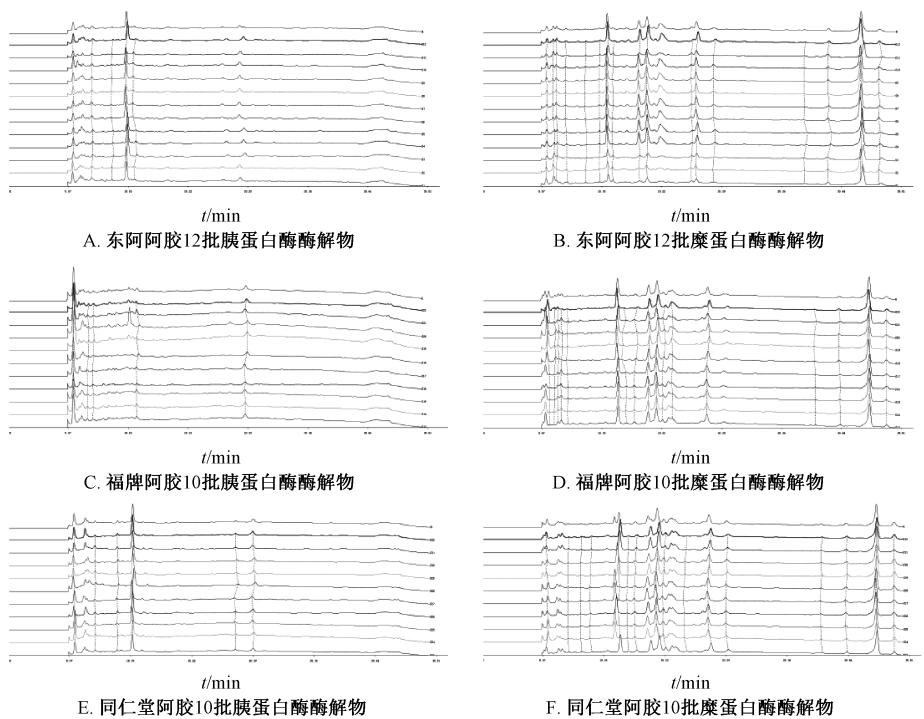
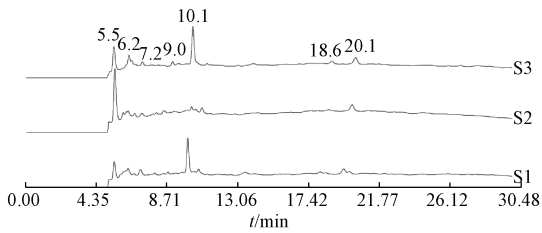


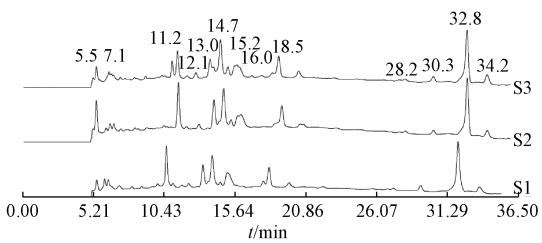
图 1 不同样品酶解物 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints for enzymatic hydrolysates of different samples



注：S1~S3 分别为东阿阿胶、福牌阿胶、同仁堂阿胶。
图 2 3 厂家胰蛋白酶酶解物生成对照指纹图谱 (R) 的比较图

Fig. 2 Comparison of control fingerprints (R) for trypsin hydrolysates of products from three manufacturers



注：S1~S3 分别为东阿阿胶、福牌阿胶、同仁堂阿胶。
图 3 3 厂家糜蛋白酶酶解物生成对照指纹图谱 (R) 的比较图

Fig. 3 Comparison of control fingerprints (R) for chymotrypsin hydrolysates of products from three manufacturers

2.4 聚类分析 采用 SPSS 软件中的聚类分析，首先将峰形一致的峰进行归类，捏合峰的原则为± 0.5 min 内的且峰形一致的峰面积并入一个 fn，以减少色谱图中的 t_R 误差。然后运用 SPSS 19.0 软件对 35 批样品进行系统聚类，采用组间联结法，以平方组间距离作为样品相似度的距离公式，绘制树状图，观察样品间是否存在相似性，以寻求其规律性。见图 4。

12 批东阿阿胶除 S8、S11<10 外，其他批东阿阿胶类别距离均<5，10 批同仁堂阿胶类别距离均<5，表明不同批东阿阿胶和同仁堂阿胶质量相当稳定，福牌阿胶和其他品牌的阿胶类别距离相对分散，推

测其原辅料来源可能较广。同时，东阿阿胶及同仁堂阿胶类别距离非常近，与福牌阿胶形成明显的两大类，因此该法可区分福牌阿胶与另外 2 厂。

糜蛋白酶酶解物聚类分析表明，同仁堂阿胶 10 个批较集中，类别距离均<5，东阿阿胶可以分为两类，东阿阿胶的 S1、S2、S3、S11 类别距离<5，而其他 8 批是另一类，类别距离均<5，但两类间有较大区别。福牌阿胶中除 S19、S22<10 外，其他批类别距离<5。其他品牌 3 批类别距离<5。总体来看，各厂家不同批阿胶的糜蛋白酶酶解物类别距离均较近不易区分，与指纹图谱相似度法结论相同，3 个厂家的阿胶在糜蛋白酶酶解物色谱图上展

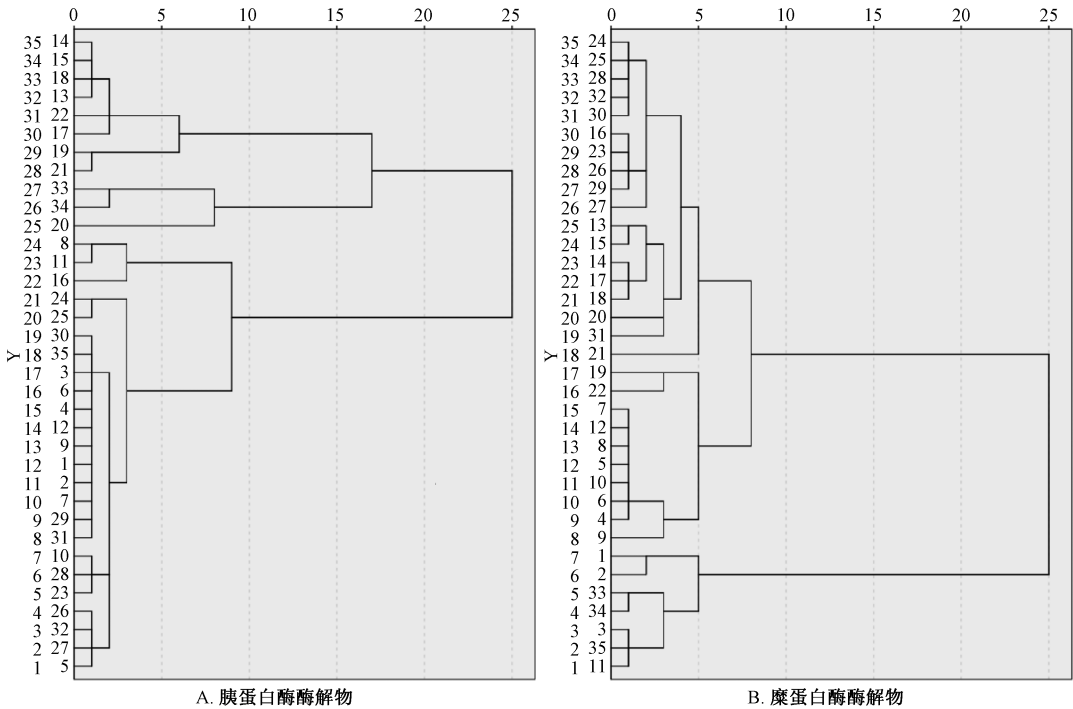


图 4 35 批样品聚类树状图

Fig. 4 Dendrogram for thirty-five batches of samples

现出较高的一致性，因此该法无法区分各厂家产品，而更适于用来做正品阿胶指纹图谱。

2.5 主成分分析 运用 SPSS 19.0 统计分析软件对 35 批阿胶不同蛋白酶酶解液进行 PCA 分析，将其投影至低维空间观察其细微差别，将共有峰进行因子分析，再进行标准化处理和运算^[17]。表 2 显示，按主成分特征值 > 1，对方差的累积贡献率 > 80%，均需要提取 4 个主成分，按 4 个主成分进行分析，根据成分得分系数矩阵得到阿胶胰蛋白酶酶解物各主成分解析表达式分别为 $A_1 = 0.121f_1 - 0.164f_2 - 0.048f_3 + 0.058f_4 + 0.492f_5 - 0.183f_6 + 0.518f_7 + 0.186f_8$ ；

$$A_2 = 0.295f_1 + 0.053f_2 + 0.199f_3 + 0.008f_4 + 0f_5 + 0.464f_6 + 0.101f_7 + 0.515f_8；$$

$$A_3 = -0.182f_1 + 0.675f_2 - 0.042f_3 + 0.544f_4 - 0.073f_5 + 0.147f_6 - 0.069f_7 - 0.029f_8；$$

$$A_4 = -0.588f_1 + 0.062f_2 + 0.655f_3 + 0.105f_4 - 0.092f_5 + 0.26f_6 - 0.091f_7 - 0.088f_8；$$

阿胶糜蛋白酶酶解物各主成分解析表达式分别为 $A_1 = 0.017f_1 - 0.092f_2 + 0.046f_3 - 0.080f_4 + 0.070f_5 + 0.121f_6 + 0.127f_7 + 0.125f_8 + 0.093f_9 + 0.074f_{10} + 0.049f_{11} - 0.001f_{12} + 0.126f_{13} + 0.119f_{14} - 0.045f_{15} + 0.099f_{16} + 0.054f_{17}$ ；

$$A_2 = -0.070f_1 - 0.092f_2 + 0.121f_3 + 0.220f_4 +$$

$$0.183f_5 + 0.091f_6 - 0.003f_7 + 0.017f_8 - 0.213f_9 + 0.259f_{10} - 0.293f_{11} - 0.032f_{12} - 0.008f_{13} - 0.037f_{14} + 0.010f_{15} + 0.056f_{16} - 0.109f_{17}；$$

$$A_3 = -0.412f_1 + 0.060f_2 - 0.160f_3 + 0.108f_4 + 0.014f_5 + 0.033f_6 - 0.031f_7 + 0.013f_8 + 0.082f_9 + 0.040f_{10} - 0.034f_{11} - 0.048f_{12} - 0.007f_{13} + 0.161f_{14} + 0.430f_{15} - 0.001f_{16} + 0.336f_{17}；$$

$$A_4 = -0.016f_1 - 0.237f_2 + 0.260f_3 - 0.074f_4 - 0.090f_5 + 0.023f_6 - 0.010f_7 - 0.001f_8 + 0.019f_9 + 0.001f_{10} - 0.003f_{11} + 0.679f_{12} + 0.061f_{13} - 0.034f_{14} + 0.286f_{15} - 0.217f_{16} - 0.086f_{17}。根据以上表达式绘制二维散点图，见图 5~6。$$

同仁堂阿胶的散点相当集中，东阿阿胶除 S8、S11 外也比较集中，福牌阿胶及其他品牌阿胶较分散，与指纹图谱及聚类分析结果保持一致；同仁堂阿胶在 6 个散点图中都很集中，东阿阿胶除 S1、S2、S3、S11，福牌阿胶除 S19、S22 样品偏离较大外均相对集中，其他 3 个品牌阿胶样品较为分散。在散点图 A1~A2、A2~A4 可区分出东阿阿胶，A1~A3、A3~A4 中可区分出福牌阿胶，A2~A3 可以区分 3 厂家阿胶、A1~A4 可以区分 3 厂家与其他品牌阿胶。可以看出，东阿阿胶及同仁堂阿胶的胰蛋白酶酶解物 PCA 分析相当稳定，而糜蛋白酶酶解物 PCA 分析则可根据具体鉴定需求，灵活选择不同的二维投影方法以区分不同厂家产品。

表 2 主成分初始特征值和贡献率

Tab. 2 Initial eigenvalues and contribution rates of principal components

成分	胰蛋白酶酶解物色谱初始特征值			糜蛋白酶酶解物色谱初始特征值		
	合计	方差/%	累积贡献率/%	合计	方差/%	累积贡献率/%
1	2. 425	30. 31	30. 31	7. 697	45. 276	45. 276
2	1. 622	20. 275	50. 584	2. 990	17. 588	62. 864
3	1. 515	18. 941	69. 525	1. 826	10. 740	73. 603
4	0. 795	9. 932	79. 456	1. 350	7. 943	81. 546

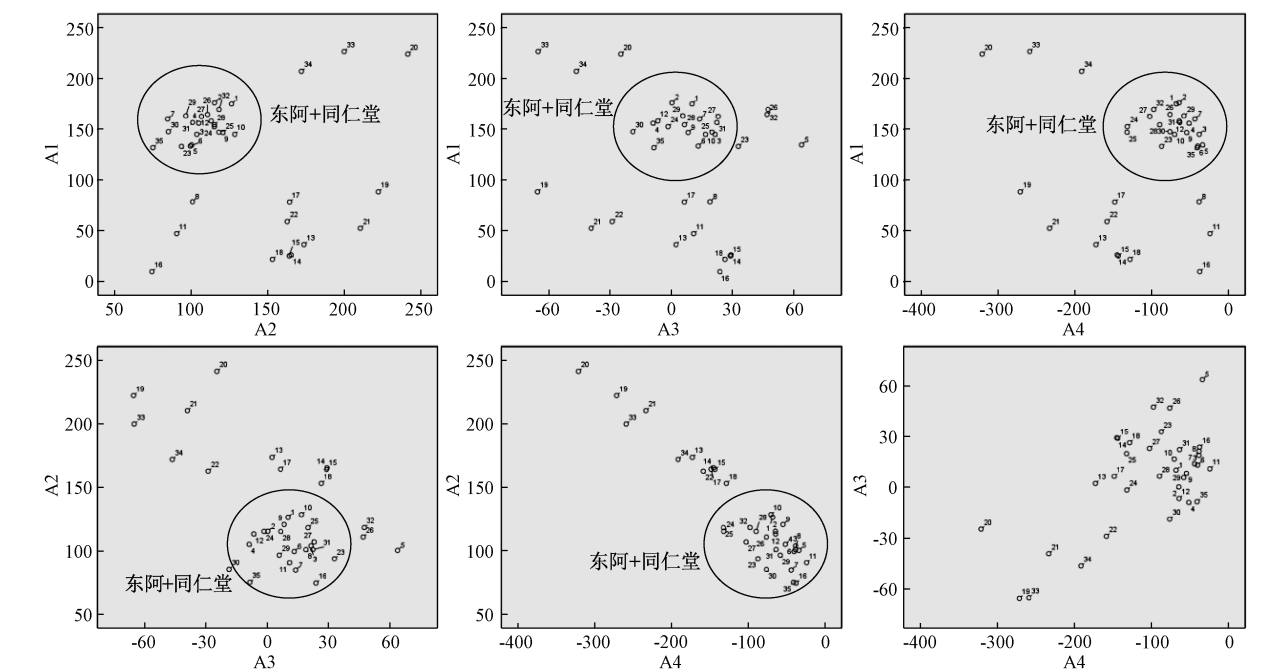


图 5 35 批阿胶胰蛋白酶酶解物 PCA 散点图

Fig. 5 PCA score scatter plot for thirty-five batches of E' jiao trypsin enzymatic hydrolysate

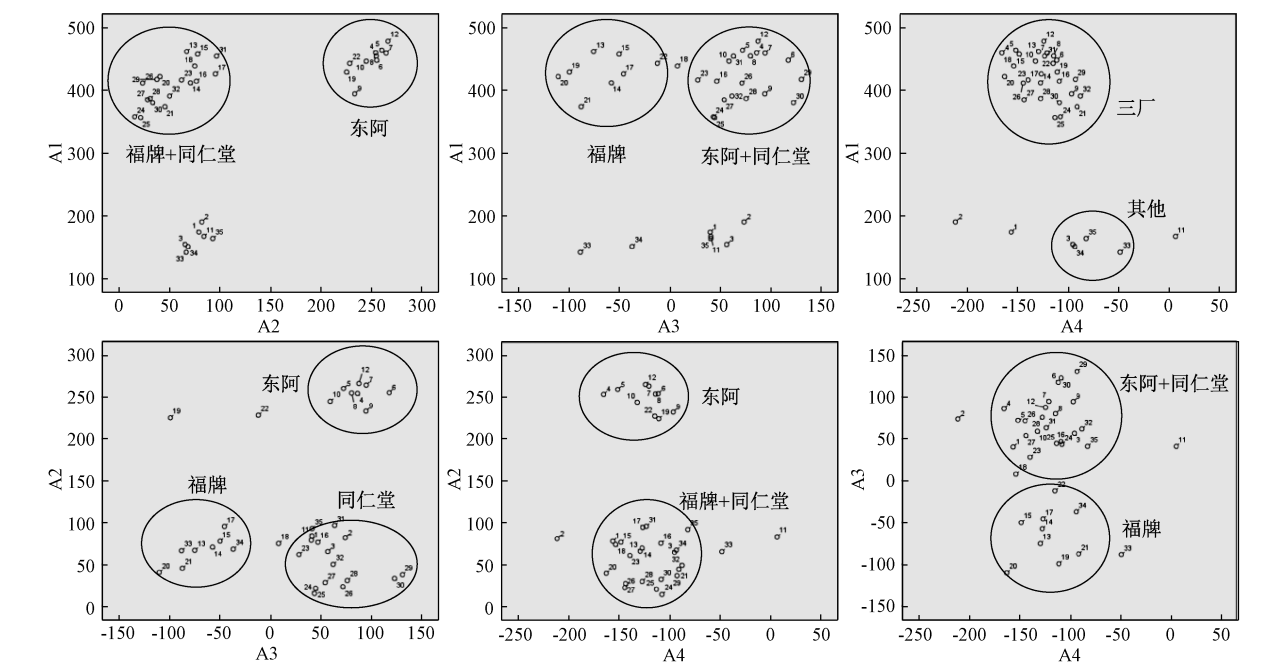


图 6 35 批阿胶糜蛋白酶酶解物 PCA 散点图

Fig. 6 PCA score scatter plot for thirty-five batches of E' jiao chymotrypsin enzymatic hydrolysate

3 小结与讨论

3 个厂家的阿胶在糜蛋白酶酶解物色谱图上表现出较高的一致性,有 17~20 个位置匹配数目达到最大,以最大匹配为基准,在 5.5、7.1、11.3、12.1、13.0、14.7、15.2、16.0、18.5、28.2、30.3、32.8、34.2 min 共 13 个位置处出现 3 厂家阿胶糜蛋白酶酶解物共有峰;与对照指纹图谱 R 比较的相似度上,所有样品均>0.9。表明采用糜蛋白酶酶解物的 HPLC 指纹图谱可以较好地作为阿胶质量控制的标准。3 个厂家的阿胶在胰蛋白酶酶解物色谱图上则有一定差异,福牌阿胶的色谱峰与另外 2 厂有较大区别。3 厂阿胶胰蛋白酶酶解物在 5.5、6.2、7.2、9.0、20.1 min 共 5 个位置处存在共有峰,但福牌阿胶在 10.1 min 处的大峰、18.6 min 处的峰则有多数样品不能与另外 2 厂准确匹配,且 5.5 min 处峰信号明显更强,在相似度上,S11 与 S16 的相似度小于 0.9,观察色谱图是由于 S11 在 10.1 min 处、S16 在 5.5 min 的大峰峰面积明显变小所致,但色谱图其他位置的峰形与其他样品保持一致。

聚类分析与 PCA 分析结果与其保持一致,胰蛋白酶酶解物聚类分析可作为同仁堂阿胶及东阿阿胶与福牌阿胶之间的鉴别法;而糜蛋白酶酶解物聚类分析则可将所有正品阿胶进行聚类,以期作为区分正伪品的方法。

东阿阿胶及同仁堂阿胶胰蛋白酶酶解物 PCA 分析相当稳定,可考虑作为厂内批稳定性鉴别方法;糜蛋白酶酶解物 PCA 分析的不同二维投影可以作为区分不同厂家阿胶的方法。

本实验方法主要解决的是阿胶质控上样品信息不全面、易钻漏洞,以及阿胶指纹图谱困难等问题。由于使用了双酶解物样品进样及指纹图谱的方法(如糜蛋白酶酶解物有多达 17 个以上的特征峰),与单一指标性成分检测方法比较,掺假难度极大,对打击混伪品有较大的应用价值。

参考文献:

[1] 张金聚,张英,孟江,等. 阿胶历史沿革考[J]. 中国中

药杂志, 2020, 45(10): 2464-2472.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 189-190.

[3] 陈慧慧,冯明建,朱海芳,等. 阿胶药理研究进展[J]. 中国药物评价, 2014, 31(1): 23-26.

[4] 刘谷全. 中药阿胶的临床应用及药理作用[J]. 临床合理用药杂志, 2014, 7(35): 74-75.

[5] 杜怡波,樊慧蓉,阎昭. 阿胶的化学成分及药理作用研究进展[J]. 天津医科大学学报, 2018, 24(3): 267-270.

[6] Wang D L, Ru W W, Xu Y P, et al. Chemical constituents and bioactivities of *Colla corii asini*[J]. *Drug Discov Ther*, 2014, 8(5): 201-207.

[7] Li Y F, He H, Yang L L, et al. Therapeutic effect of *Colla corii asini* on improving anemia and hemoglobin compositions in pregnant women with thalassemia[J]. *Int J Hematol*, 2016, 104(5): 559-565.

[8] 张斌,胡晶红,张永清. 阿胶化学成分与真伪鉴别研究进展[J]. 山东中医药大学学报, 2014, 38(3): 285-287.

[9] 张好,田俊生. 复方阿胶浆改善溶血性贫血的代谢调控机制[J]. 中成药, 2019, 41(9): 2090-2095.

[10] 姜一朴,邸志权,王延涛,等. 小分子阿胶抗疲劳、抗氧化及止血作用研究[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(2): 203-208.

[11] 张路,朱海芳,陈慧慧,等. 复方阿胶浆对小鼠抗疲劳能力的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(19): 254-257.

[12] 李瑞奇,刘培建,刘耀华,等. 中药阿胶临床应用分析及药理作用研究[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(9): 159.

[13] 郭中坤,王可洲,籍国霞,等. 阿胶的成分、鉴别方法及药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(4): 71-74.

[14] Zhang Y, Ye T T, Gong S Q, et al. RNA-sequencing based bone marrow cell transcriptome analysis reveals the potential mechanisms of E'jiao against blood-deficiency in mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109291.

[15] 李文龙,张淹,刘海滨,等. 胶类中药的质量控制方法研究进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(13): 2748-2752.

[16] 李艳荣,杜义龙,潘海峰. 金莲花药材高效液相色谱指纹图谱及两种黄酮类成分含量测定[J]. 医药导报, 2012, 31(11): 1500-1505.

[17] 屈晓晨,杨义芳,杨悦文,等. 基于聚类与 PCA 分析对江西 49 批栀子的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国医药工业杂志, 2013, 44(8): 764-769.