

乌贼墨中主要活性成分的定性定量分析

姜云云¹, 叶光明², 范国荣^{1*}

(1. 上海市药物代谢产物研究重点实验室, 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433; 2. 解放军第 102 医院药械科, 常州 213003)

[摘要] 目的: 建立乌贼墨主要活性成分的定性鉴别与定量分析方法。方法: 通过黑色素溶于碱性溶液、在酸性环境中有黑色物质析出的性质对黑色素进行定性鉴别, 采用 HPLC-AccQ-Tag 法测定乌贼墨中甘氨酸、天门冬氨酸、谷氨酸和丙氨酸的含量, 采用原子吸收分光光度法测定乌贼墨中微量铁元素的含量。结果: 在鉴别反应中, 乌贼墨黑色素可溶于 2 mol/L 氢氧化钠溶液, 并在 2 mol/L 盐酸溶液中有黑色飘浮状物析出。4 种氨基酸和铁元素的加样回收率均在 95%~105% 之间, RSD 均小于 5% (n=6), 3 批乌贼墨样品中甘氨酸、天门冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸和铁元素的平均含量分别为 7.37、11.23、12.05、7.32 和 0.206 mg·g⁻¹。结论: 乌贼墨活性成分的定性定量方法准确可靠, 重复性好, 可用于乌贼墨的质量控制。

[关键词] 乌贼墨; 氨基酸类; 铁; 色谱法, 高压液相; 分光光度法, 原子

[中图分类号] R 284.1 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)01-0105-03

Primary active components in sepia: a qualitative and quantitative analysis

JIANG Yun-yun¹, YE Guang-ming², FAN Guo-rong^{1*} (1. Shanghai Key Laboratory for Pharmaceutical Metabolites Research/Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmaceutics, No. 102 Hospital of PLA, Changzhou 213003)

[ABSTRACT] Objective: To establish a method for qualitative and quantitative analysis of the major active components in sepia. Methods: Melanin was identified by dissolving it in a basic solution to see whether there was segregation of a black substance. Glycine, asparagines, glutamic acid and alanine in sepia were determined by HPLC-AccQ-Tag method and iron was determined by atomic absorption spectrophotometer. Results: Melanin in sepia was dissolved in 2 mol/L NaOH solution and black substance was obtained in 2 mol/L HCl solution. The recoveries of the above 4 amino acids and iron were within the range of 95%-105% with RSD<5% (n=6). The mean contents of glycine, asparagines, glutamic acid, alanine and iron in 3 batches of sepia samples were 7.37, 11.23, 12.05, 7.32 and 0.206 mg·g⁻¹, respectively. Conclusion: The method in this article is feasible for quantitative and qualitative analysis of bioactive contents in sepia; it has good repeatability and may be used for the quality control of sepia.

[KEY WORDS] sepia; amino acids; iron; chromatography, high pressure liquid; spectrophotometry, atomic

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(1): 105-107]

乌贼墨来自乌贼科动物曼氏无针乌贼 *Sepiella maindroni* de Rochebrune 和金乌贼 *Sepia esculenta* Hoyle 的墨囊, 化学成分主要为黑色素和蛋白多糖复合物^[1]。乌贼墨作为传统药物, 在我国有着悠久的历史。据《本草拾遗》所述, 可“主血刺心痛”, 目前乌贼墨制剂临床上主要作为止血剂。20 世纪 90 年代以来, 发现其具有抗菌、抗肿瘤及升高白细胞等活性, 受到日益广泛的关注^[2~4]。但乌贼墨的质量控制尚未引起足够的重视。本实验采用理化反应对乌贼墨黑色素进行定性鉴别, AccQ-Tag 柱前衍生化 HPLC 法测定乌贼墨中甘氨酸、天门冬氨酸、谷氨酸和丙氨酸的含量, 原子吸收分光光度法测定乌贼墨中微量铁元素的含量, 方法简便可靠, 适用于乌贼墨的质量控制。

1 仪器和试剂

LC-10AT 系列高效液相色谱仪 (岛津), SOLAAR M5 型原子吸收光谱仪 (美国热电公司); Foss Tecator DIGESTOR DS12 型消化器; Millipore Simplicity 185 超纯水系统。

乌贼墨 (浙江茂源药业有限公司, 批号 040315、040421、040506); 氨基酸对照品 (BDH Chemical Ltd, Poole England); 铁标准溶液: 1.0 g/L (上海市计量测试技术研究院)。AccQ·FluorTM 衍生化试剂 6-氨基喹啉-N-羧基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯 (AQC) 及缓冲液 (Waters 公司); 乙腈、磷酸以及三乙胺均为德国 Merck 公司生产的色谱纯试剂; 水为超纯去离子水; 其他试剂均为国产分析纯。

2 方法和结果

2.1 黑色素的鉴别 取乌贼墨适量, 研细, 称取 0.2 g, 加 2 mol/L 的氢氧化钠溶液 10 ml, 55℃ 烘箱中放置 30 min, 取出放置至室温。10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2 ml, 加入 2 mol/L 盐酸溶液 3 ml, 于 4℃ 冰箱放置 2 h, 取出, 可见明显的飘浮状黑色物, 与乌贼墨黑色素溶于碱性溶液、在酸性

[作者简介] 姜云云, 硕士生。
* Corresponding author. E-mail: guofan@yahoo. com. cn

环境中又被析出的特性相吻合^[1]。

2.2 四种氨基酸的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil C₁₈ (150 mm×4.6 mm,5 μm);采用梯度洗脱,流动相 A:磷酸-三乙胺-水(0.3∶0.5∶100),流动相 B:乙腈-水(60∶40),梯度洗脱程序:0~0.5 min,0%~2%B;0.5~15 min,2%~7%B;15~19 min,7%~10%B;19~26 min,10%~21%B;26~31 min,21%~100%B;31~36 min,100%B;36~37 min,100%~0%B;检测波长:248 nm;柱温:37℃;进样量:10 μl;流速:1.0 ml/min。

2.2.2 溶液的配制 分别精密称取经五氧化二磷干燥 24 h 的对照品甘氨酸、天门冬氨酸、谷氨酸和丙氨酸适量,加 0.1 mol/L 的盐酸制成含 4 种氨基酸质量浓度均为 0.25 mg/ml 的储备液,精密吸取该储备液 6.0 ml 于 100.0 ml 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。

取乌贼墨适量,研成细粉,精密称取约 0.5 g 至 5 ml 安瓿瓶中,精密加入 3.0 ml 6 mol/L 的盐酸,密封,置 110℃ 烘箱中放置 24 h 水解。取出冷却至室温后打开安瓿瓶,吸取上层溶液 10 000 r/min 离心 10 min,精密吸取上清液 1.0 ml 于 10.0 ml 容量瓶中,加入 5.0 ml 1 mol/L 的 NaOH 溶液,加水至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)过滤,精密量取续滤液 1 ml 至 10.0 ml 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

2.2.3 氨基酸衍生化反应 精密吸取对照品溶液或供试品溶液 50 μl 于 0.5 ml 离心管中,加入 350 μl 缓冲液,涡旋混合 10 s,再加入 100 μl AccQ·FluorTM 衍生化试剂,涡旋混合 10 s,于 55℃ 烘箱中放置 10 min,取出放置至室温,于 4℃ 冰箱保存待测^[5]。

2.2.4 样品含量测定 分别取供试品溶液和对照品溶液,按 2.2.3 项操作后进样。结果见表 1、图 1。

表 1 乌贼墨中 4 种氨基酸含量
Tab 1 Determination of 4 amino acids in samples

(n=3, $\bar{x} \pm s, z_B/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

Batch number	Glycine	Asparagine	Glutamic acid	Alanine
040315	7.51±0.20	11.24±0.23	11.98±0.05	7.33±0.08
040421	7.23±0.17	11.42±0.12	12.32±0.05	7.15±0.02
040506	7.36±0.09	11.02±0.13	11.85±0.10	7.49±0.05

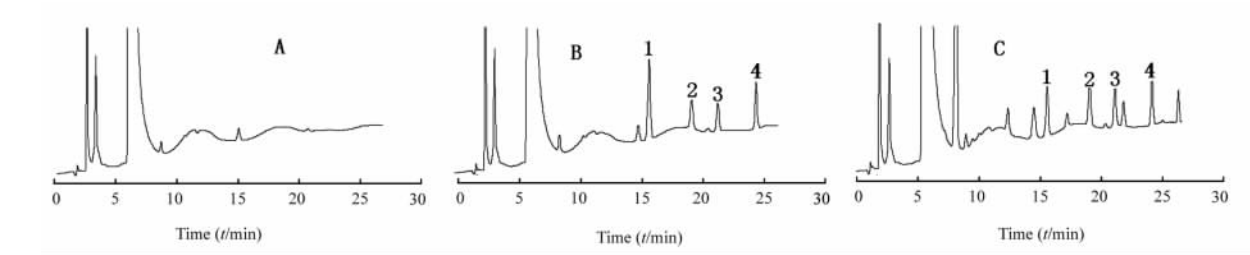


图 1 空白对照(A)、氨基酸对照品(B)和样品(C)的 HPLC 图谱
Fig 1 HPLC chromatograms of blank control (A), standard amino acid (B) and sample (C)
1:Glycine; 2:Asparagines; 3:Glutamic; 4:Alanine

2.3 方法学考察

2.3.1 空白实验 分别以 0.001 mol/L 盐酸、对照品溶液、供试品溶液按 2.2.3 项下操作,在 2.2.1 色谱条件下进样。结果见图 1A,各氨基酸色谱峰分离良好,空白溶液在相应的保留时间处无干扰。

2.3.2 线性关系的考察 分别精密吸取 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 ml 对照品溶液于 10.0 ml 容量瓶中,分别用水定容,摇匀,按 2.2.3 项下操作,各进样 10 μl,以甘氨酸、天门冬氨酸、谷氨酸和丙氨酸衍生化产物的峰面积对相应浓度线性回归,所得方程分别为:甘氨酸 $A=7\,999.4\,c-402.41, r=0.999\,6$;天门冬氨酸 $A=2\,734.6\,c-392.73, r=0.999\,7$;谷氨酸 $A=2\,433.8\,c-114.12, r=0.999\,5$;丙氨酸 $A=3\,917.1\,c-113.28, r=0.999\,5$ 。结果表明,4 种氨基酸在 2.5~25 μg/ml 范围内线性关系良好。

2.3.3 精密度实验 取对照品溶液,按 2.2.3 项操作后,重复进样 6 次,以 4 种氨基酸衍生化产物的峰面积计,RSD 均小于 2.0%。

2.3.4 重现性实验 取本品细粉约 0.5 g,共 6 份,精密称定,同法测定。以甘氨酸、天门冬氨酸、谷氨酸和丙氨酸的含量计,RSD 分别为 0.89%、1.65%、1.21%、0.96%。

2.3.5 加样回收率实验 精密称取已知含量的样品,精密加入 4 种氨基酸对照品,按供试品溶液制备方法水解后测定,记录 4 种氨基酸衍生化产物的峰面积并按外标法定量,甘氨酸、天门冬氨酸、谷氨酸和丙氨酸的平均回收率分别为 98.31%、96.73%、102.50%、99.87%,RSD 分别为 2.96%、1.21%、1.58%、0.99%(n=6)。

2.3.6 稳定性实验 取供试品溶液,按 2.2.3 项下操作后,间隔 1 h 进样一次,观察氨基酸衍生化产物峰面积的变化。

结果在 24 h 内以样品溶液中甘氨酸、天门冬氨酸、谷氨酸和丙氨酸的衍生化产物的峰面积计,RSD<2.0%(n=3)。

2.4 铁元素的含量测定

2.4.1 溶液的配制 用超纯去离子水将铁标准溶液稀释成 60 μg/L,即得对照品溶液。取乌贼墨适量,研成细粉,精密称取约 0.10 g 至消化管中,加入 2.0 ml 硝酸和 1.0 ml 30% 过氧化氢,静置过夜,然后置于 DS12 型消化器中,120℃ 消化 1 h,180℃ 消化 2 h,220℃ 挥发多余硝酸至近干;冷却后用超纯去离子水转移至 100.0 ml 量瓶中,并定容至刻度,即得^[6]。

2.4.2 样品含量测定 分别取对照品溶液和样品溶液检测,记录光密度,计算含量,3 批样品中铁元素平均含量分别为 0.209、0.206 和 0.204 mg·g⁻¹,RSD 分别为 0.002%、0.003% 和 0.002%(n=3)。

2.4.3 方法学考察 精密吸取铁标准溶液一定量,用超纯去离子水分别稀释成 10.0、20.0、40.0、60.0、80.0、100.0 μg/L 的铁元素系列标准样品,通过原子吸收光谱仪检测,以光密度对浓度回归,得线性方程:A=0.003 4 c-0.000 6,r=0.999 6,表明铁元素在 10.0~100.0 μg/L 范围内与光密度呈良好的线性关系。

取对照品溶液,重复进样 6 次,结果 RSD 为 0.94%,表明精密密度良好。

取本品细粉约 0.10 g,共 6 份,精密称定,同法测定。以铁元素含量计,RSD 为 2.88%,表明重现性良好。

精密称取已知含量的样品,精密加入铁元素对照品,按供试品溶液制备法操作,测定光密度并按外标一点法计算含量,平均回收率为 98.65%,RSD=1.24%(n=6)。

取供试品溶液,间隔 1 h 进样一次,观察其光密度的变化。结果在 24 h 内样品溶液中铁元素的光密度相对稳定,RSD<1.0%(n=3)。

3 讨 论

乌贼墨黑色素的化学性质非常稳定,在许多液体介质中不溶,但可溶于碱性溶液,酸性环境下又产生黑色沉淀^[1]。

本研究即用此特性对黑色素进行定性鉴别。

乌贼墨中含较高含量的微量元素,而乌贼墨具有缩短凝血时间和降低纤溶酶活性的作用,很可能与乌贼墨中铁含量较高有关^[7]。另外,乌贼墨中结构特殊的蛋白对增强肌体免疫力有较好功效^[8],乌贼墨中具抗肿瘤活性的肽聚糖肽链部分的主要氨基酸为天门冬氨酸、谷氨酸和丙氨酸,且乌贼墨中甘氨酸含量也较高^[8]。因此,通过测定铁元素和代表性氨基酸的含量来控制海墨止血片的质量是比较合理的。

氨基酸的含量测定方法较多,其中,氨基酸分析仪虽然操作简便,但使用范围较为局限,仅可分析氨基酸类成分,不适合普及。柱前衍生化法目前应用较为广泛,衍生化试剂品种繁多,本实验采用的 HPLC-AccQ-Tag 法衍生化反应迅速、产物单一,过量的衍生化试剂对实验没有影响,且无需使用专门的氨基酸柱,一般的 C₁₈ 柱即可有满意的分离效果。

[参 考 文 献]

[1] 杜铁平,周培根. 乌贼墨研究概况[J]. 食品研究与开发,2002,23:16-18.
[2] 杜铁平,周培根,卫小怡,等. 乌贼墨抗菌活性的分离与研究[J]. 现代食品科技,2005,21:69-71.
[3] 苏伟明,马润娣,于立坚,等. 中国枪乌贼墨汁提取物的抗肿瘤作用[J]. 中国海洋药物杂志,2005,24:47-50.
[4] 徐秀云,张永军,王保全,等. 复方乌贼墨胶囊升高白细胞作用的实验研究[J]. 中华临床医药,2003,4:44-45.
[5] 陈永波,程 群,饶 斌,等. 对一种分离测定氨基酸方法的改进[J]. 色谱,2001,19:560-563.
[6] 王锦荣,董启太. 铝合金中锌、铁的快速测定——原子吸收分光光度法[J]. 山西化工,2004,24:30-31.
[7] 吕昌龙,李宁和,钟建国. 乌贼墨中微量元素含量的测定[J]. 中国中药杂志,1995,20:555.
[8] 宋 坤,丁安伟. 乌贼墨化学成分和药理作用研究概况[J]. 时珍国医国药,2001,12:377-378.

[收稿日期] 2005-05-12 [修回日期] 2005-11-16
[本文编辑] 尹 荼