

引用本文:郝晓蓓,汪旭,潘娅岚,等.柱前衍生-反相高效液相色谱法测定扶正补血食疗方胶原蛋白含量[J].安徽医药,2023,27(4):674-679.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.04.009.

◇ 药物分析 ◇



柱前衍生-反相高效液相色谱法测定扶正补血食疗方胶原蛋白含量

郝晓蓓¹,汪旭¹,潘娅岚¹,鲍黎²,王庆¹,杨敏¹,徐桂华¹

作者单位:¹南京中医药大学护理学院,江苏 南京210023;²南京市中医院肿瘤科,江苏南京210001

通信作者:徐桂华,女,教授,博士生导师,研究方向为中医护理、慢性病护理,Email:guihua.xu@njucm.edu.cn

基金项目:江苏省研究生实践创新计划项目(SJGX21-0665);2021年度江苏省卫生健康委医学科科研项目指导性项目(Z2021065);江苏省研究生科研创新计划项目(KYCX21-1803);江苏省中医药科技发展计划项目(YB2020004);南京中医药大学“江苏高校护理学优势学科建设工程资助项目”(2019YSHL097)。

摘要: 目的 基于RP-HPLC法对扶正补血食疗方中胶原蛋白含量进行测定,并通过正交试验优选出扶正补血食疗方中胶原蛋白的最佳提取方法。方法 于2021年12月至2022年1月将样品以6 mol/L盐酸于110℃水解24 h,利用AQC试剂进行衍生,采用Diamonsil-C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),以流动相A:无水乙酸钠11.48 g,三乙胺1.72 g,EDTA 1 mg,溶于1 L水中,用磷酸调pH为4.95;流动相B:乙腈水溶液(体积分数60%),梯度洗脱;柱温37℃;检测波长254 nm;流速1 mL/min;进样量10 μL。以羟脯氨酸含量为评价指标,考察煎煮时间、料水比、煎煮温度对胶原蛋白含量的影响,优化其制备工艺。结果 羟脯氨酸在10~500 mg/L浓度范围内线性关系良好($Y=0.0365X+0.5173$, $R^2=0.9991$),平均回收率95.11%,相对标准偏差(RSD)为1.12% ($n=6$)。猪蹄胶原蛋白的最佳提取工艺为:A₃B₁C₃,即加热温度为100℃,料水比为1:8,提取时间为3 h。结论 该方法快速准确,稳定可行,可作为扶正补血食疗方中胶原蛋白含量的测定方法,为该产品质量控制及临床应用提供科学依据。

关键词: 膳食疗法; 扶正补血; 色谱法,反相; 色谱法,高压液相; 羟脯氨酸; 柱前衍生; 胶原蛋白; 正交试验

Precolumn derivatization-reversed-phase high-performance liquid chromatography for the determination of collagen in *Fuzheng Buxue* dietary supplement

HAO Xiaobei¹, WANG Xu¹, PAN Yalan¹, BAO Li², WANG Qing¹, YANG Min¹, XU Guihua¹

Author Affiliations:¹School of Nursing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210023, China;

²Department of Oncology, Nanjing Hospital of TCM, Nanjing, Jiangsu 210001, China

Abstract: **Objective** To determine the collagen content in *Fuzheng Buxue* dietary supplement based on the RP-HPLC method and to optimize the best extraction method of collagen in *Fuzheng Buxue* dietary supplement by orthogonal testing. **Methods** Samples were hydrolyzed with 6 mol/L hydrochloric acid at 110℃ for 24 h from December 2021 to January 2022 and derived using AQC reagent on a Diamonsil-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase A: anhydrous sodium acetate 11.48 g, triethylamine 1.72 g, EDTA 1 mg, dissolved in 1 L of water. Mobile phase B: aqueous acetonitrile (60% v/v), gradient elution; column temperature 37℃; detection wavelength 254 nm; flow rate 1 mL/min; injection volume 10 μL. The effects of decoction time, ratio of material to water, and decoction temperature on the collagen content were investigated to optimize the preparation process using the hydroxyproline content as the evaluation index. **Results** Hydroxyproline showed good linearity in the concentration range of 10-500 mg/L ($Y=0.0365X+0.5173$, $R^2=0.9991$) with an average recovery of 95.11% and RSD value of 1.12% ($n=6$). The best extraction process for pig trotter collagen was A₃B₁C₃, i.e., the heating temperature was 100℃, the ratio of material to water was 1:8, and the extraction time was 3 h. **Conclusion** The method is rapid, accurate, stable and feasible and can be used as a method for the determination of collagen content in *Fuzheng Buxue* dietary supplement and provides a scientific basis for product quality control and clinical application.

Key words: Dietary supplement; *Fuzheng Buxue*; Chromatography, reverse-phase; Chromatography, high pressure liquid phase; Hydroxyproline; Precolumn derivatization; Collagen; Orthogonal test

扶正补血食疗方是徐桂华教授基于归芪猪蹄汤在临床肿瘤病人中的有效运用^[1],在精气血互生

理论指导下,加入润肺益肾补脾的黄精研制而成,其有效性已通过细胞实验得到验证^[2]。方中黄芪、

当归、黄精均为“药食同源”中药材^[3]与猪蹄相配伍,可达培土生金之效,共奏固本培元之功,契合化疗后骨髓抑制的治则。猪蹄是扶正补血食疗方中的君药,具有强筋壮骨、补血通乳、润滑肌肤、抗老防癌等功效^[1,3]。《中国食物成分表》显示,猪蹄中含有大量脂肪、碳水化合物、蛋白质^[4],含量最丰富的优质蛋白为胶原蛋白,也是其高营养价值的决定性因素^[5-6]。羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)为胶原蛋白水解物^[7],是其性质较为稳定的特异性氨基酸,所以现有研究常基于羟脯氨酸测定胶原蛋白含量^[8]。

本课题组前期以猪蹄辅以经典名方当归补血汤(黄芪、当归)构建归芪猪蹄汤,并通过拆方对食疗方中有效成分进行分析。研究表明,归芪猪蹄汤可通过提高外周白细胞计数,恢复骨髓造血细胞、巨核细胞数的减少有效预防和治疗化疗后骨髓抑制,且效果优于猪蹄汤组与当归补血汤组^[9]。但其升白机制和各份之间的作用关系尚未明确,缺乏标准化制作方法和稳定性评价体系,科学证据不足导致其在临床无法得到广泛推广。本研究于2021年12月3日至2022年1月9日在前期归芪猪蹄汤有效性的基础上,通过对扶正补血食疗方中的有效成分含量进行研究,以AQC柱前衍生法测定食疗方中胶原蛋白含量、正交试验优化其制备工艺,探索建立扶正补血食疗方的稳定性评价体系及标准化制备工艺,从而加强扶正补血食疗方的科学性及其临床应用质控,以期推进食疗方产业化进程,更好地服务于病人。

1 材料与方法

1.1 仪器 Ultimate U3000 高效液相色谱仪(美国thermo)、数显恒温水浴锅(常州朗越SYG-2)、高速冷冻离心机(德国Eppendorf 5810R)、鼓风干燥箱(上海精其 DHG-9243A)、电子天平(北京梅特勒ME155DU)、旋转蒸发器(山东欧莱博 RE-2000E)、九阳电磁炉(杭州九阳电器有限公司)、色谱柱(北京Diamonsil C₁₈柱 250 mm×4.6 mm, 5 μm)、酸度计(PHS-3C)、注射器(海旭医疗有限公司)、0.45 μm 针筒式过滤器(杭州富强化工仪器有限公司)、砂锅(康舒美厨)、温度计(宁波赵记电器有限公司)。

1.2 试药 猪蹄购自大型超市(含食品合格证);黄芪购于江苏省中医院,经中药药理学实验室鉴定为豆科植物蒙古黄芪(*Astragalus mongholicus* Bunge)的干燥根;当归购于江苏省中医院,经中药药理学实验室鉴定为伞形科植物当归(*Angelica sinensis*)的干燥根;黄精购于江苏省中医院,经中药药理学实验室鉴定为百合科植物黄精(*Polygonatum sibiricum* Red.)的根茎。甲醇(色谱纯,阿拉丁);乙腈(色

谱纯,阿拉丁);L-羟脯氨酸对照品(批号 Z26M7H1197 9,质量分数≥98%);6-氨基喹啉-N-羧基琥珀酰亚胺活化环氨基甲酸酯(AQC)试剂(源叶生物,批号 148757-94-2);磷酸及其余试剂均为分析纯;超纯水。

1.3 溶液的制备

1.3.1 标准溶液的配制 精密量取 10 mg L-羟脯氨酸标准品,加纯水定容于 20 mL 棕色容量瓶中,摇匀后,经 0.22 μm 滤膜过滤,取续滤液,即得 500 mg/L 羟脯氨酸标准储备液。以此为母液,分别稀释配制 250、125、100、50、25、10 mg/L 羟脯氨酸的标准系列溶液。

1.3.2 空白阴性溶液的制备 按照扶正补血食疗方称取原材料(猪蹄除外)制备食疗方并进行衍生,作为空白阴性溶液。

1.3.3 供试品溶液的制备 本实验基于扶正补血食疗方中猪蹄含有油脂及中药等特殊性质,在相关文献的研究^[10-11]基础上,通过对酸解时间及温度进行改良优化了猪蹄中胶原蛋白的提取方法。精密量取 1 mL 的扶正补血食疗方样品于 20 mL 具塞试管中,加入 6 mol/L 盐酸溶液 10 mL,充入高纯氮气 10 min,盖塞于 110 °C 烘箱中酸解 24 h。冷却后,将酸解液全部转移到烧杯中,用 3 mol/L NaOH 溶液将 pH 调节至中性,转入 100 mL 容量瓶中定容,稀释 4 倍,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

1.3.4 AQC 柱前衍生方法 精密量取上述制备的标准品溶液、供试品溶液和空白阴性溶液各 10 μL 于衍生管中,加入硼酸缓冲液 70 μL,涡旋混合,加入 AQC 试剂 20 μL,涡旋混合后静止 60 s,封口膜封口衍生管,于 55 °C 的烘箱中放置 10 min。转入进样瓶中,冷却,即得标准品、供试品和空白阴性的上机溶液。

1.3.5 胶原蛋白的含量计算 由于羟脯氨酸的特异性,现有研究大多通过测量检测品中羟脯氨酸的含量,再乘以相应的系数,计算得胶原蛋白含量^[12]。本实验主要参考黄萍学者的实验方法,故以猪蹄食疗方中胶原蛋白以 7.46 为折算系数^[13]。即:胶原蛋白(%)=Hyp(%)×7.46(1 g 羟脯氨酸相当于 7.46 g 胶原蛋白)。

1.4 色谱条件 色谱柱:Diamonsil-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。流动相 A:三乙胺 1.72 g,无水乙酸钠 11.48 g, EDTA 1 mg,溶于 1 L 水中,用磷酸将 pH 调节至 4.95;流动相 B:60% 乙腈的水溶液(体积分数)。梯度洗脱;流速 1 mL/min;检测波长 254 nm;柱温 37 °C;进样量 10 μL,见表 1。

1.5 正交实验设计 根据预实验结果,结合既往文献^[14-15],可知煎煮温度、料水比和煎煮时间 3 个影响

表1 梯度洗脱程序

时间	流动相A体积分数/%	流动相B体积分数/%
0~0.01 min	98	2
>0.01~45 min	79	21
>45~47 min	67	33
>47~58 min	64	36
>58~67 min	60	40
>67~69 min	0	100
>69~80 min	98	2

因素对胶原蛋白提取率影响较大,因此采用正交试验法,每个因素设3个水平,因素与水平表见表2。

表2 扶正补血食疗方胶原蛋白提取正交试验因素水平表

水平	A煎煮温度/℃	B料水比/倍	C煎煮时间/h
1	80	8	1
2	90	10	2
3	100	12	3

2 结果

2.1 专属性考察 分别精密吸取“1.3.4”项下制备的羟脯氨酸对照品溶液、扶正补血食疗方供试品溶液和空白阴性溶液各10 μL,按照“1.4”项下色谱条件进样并测定。供试品溶液与对照品溶液在羟脯氨酸处有相同的保留时间RT=23.100 min,阴性溶液对羟脯氨酸的测定无干扰,结果表明本研究专属性良好。

2.2 线性关系考察 对“1.3.1”项下所配制的羟脯氨酸系列标准溶液,以“1.3.4”项下柱前衍生方法进行衍生,制成Hyp质量浓度分别为500、250、125、100、50、25、10 mg/L的系列对照品溶液。按“1.4”项下色谱条件进样测定。以Hyp浓度(C,mg/L)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标进行线性回归,得回归方程:Y=0.036 5X+0.517 3, R²=0.999 1。结果表明,对照品溶液中在10~500 mg/L浓度范围内线性关系良好。

2.3 精密度试验 取“1.3.4”项下供试品溶液,按“1.4”项色谱条件,重复进样6次,测定日内精密度,按羟脯氨酸峰面积-浓度标准曲线计算含量及相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)值为0.52%。这一结果说明本方法精密度良好。

2.4 稳定性试验 取“1.3.4”项下供试品溶液,按“1.4”项下色谱条件,分别于0、2、4、6、12和24 h时进样测定。以羟脯氨酸的峰面积计算稳定性(RSD)值为0.64%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.5 重复性试验 取同一份扶正补血食疗方样品,按照“1.3.4”项衍生方法平行制备6份供试品溶液,按照“1.4”项下色谱条件,同一时间点连续重复6

次,进行HPLC检测,记录峰面积值,按羟脯氨酸标准曲线计算RSD值为0.58%。这一结果表明本试验方法的重现性好。

2.6 相对回收率实验 精密称取已知羟脯氨酸含量的样品6份,分别精密加入一定量的羟脯氨酸对照品,按照“1.3.4”项下样品衍生方法对加标样品预处理后,依据“1.4”项下色谱条件,采用超高效液相色谱仪进行测定,得峰面积,根据回收率=(测得量-样本含量)/加入量×100%,计算相对加标回收率。结果表明,L-羟脯氨酸的平均回收率为95.11%,RSD值为1.12%(n=6),见表3。结果表明该方法准确可靠,可用于猪蹄食疗方中胶原蛋白的含量测定。

表3 L-羟脯氨酸回收率实验结果

样品中含量/μg	加入量/μg	测得量/μg	回收率/%
150.58	125	266.06	92.38
150.59	125	272.10	97.21
150.61	125	267.19	93.26
150.73	125	268.24	94.01
150.93	125	270.53	95.68
151.26	125	273.92	98.13

注:RSD为1.12%,平均回收率为95.11%。

2.7 正交实验设计方案与结果 用正交L₉(3³)表进行正交试验优选,试验结果见表4,并对羟脯氨酸的含量进行方差分析,结果见表5。

以羟脯氨酸的含量作为考察指标,极差R分析显示影响提取率的因素依次为C>A>B;方差分析结

表4 正交试验结果及分析

试验号	A煎煮温度/℃	B料水比/倍	C煎煮时间/h	羟脯氨酸含量
1	80	8	1	0.94
2	80	10	2	1.96
3	80	12	3	4.85
4	90	8	2	3.75
5	90	10	3	5.15
6	90	12	1	1.84
7	100	8	3	6.03
8	100	10	1	3.11
9	100	12	2	3.53
K ₁	7.75	10.72	5.89	
K ₂	10.74	10.22	9.24	
K ₃	12.67	10.22	16.03	
K ₁ '	2.58	3.57	1.96	
K ₂ '	3.58	3.41	3.08	
K ₃ '	4.22	3.41	5.34	
优水平	A3	B1	C3	
R _j	1.64	0.16	3.38	
主次顺序	C>A>B			

表5 正交试验方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F值	P值
A	4.097	2	2.048	4.64	0.177
B	0.056	2	0.028	0.06	0.941
C	17.794	2	8.897	20.15	0.047
误差	0.883	2	0.441		

果表明:C因素对羟脯氨酸的提取有显著意义($P<0.05$),A因素和B因素差异无统计学意义($P>0.05$)。根据分析结果,确定最佳提取工艺为: $A_3B_1C_3$,即加热温度为100℃,料水比为1:8,提取时间为3 h。

2.8 验证试验 按照“2.7”项下正交实验结果所得煎煮方法制备扶正补血食疗方样品3批,按照“1.3.3”项下方法制备供试品溶液,再依据“1.3.4”项方法进行衍生,分别制备3份供试品溶液,按“1.4”项下色谱条件进样测定,各精密吸取10 μ L,记录峰面积并计算Hyp含量,三次结果分别为150.59、150.62、150.68,均值为150.63 mg/L。结果胶原蛋白平均提取量为1.12 g/L,RSD小于2%,与正交实验结果基本一致,表明优选工艺合理。

3 讨论

3.1 样品前处理方法的优化 目前尚无猪蹄相关食疗方中胶原蛋白含量测定及完整样品前处理方法的文献。本实验结合课题组前期食疗方制作方法,并参考大量文献^[13,16]中猪肉样品的前处理方法,通过实验整理出一套猪蹄相关食疗方的样品专业前处理方法。具体步骤为:①将所制备的猪蹄食疗方,过80目筛滤去药渣,再用纱布进行二次过滤细小药渣及部分油脂。随后将所得食疗方放入冰箱冷藏4 h,刮去表层油脂,以减少油脂对试验的影响。隔水加热使冷藏后的果冻状食疗方融化,得到无油脂食疗方溶液。②利用“1.3.3”项下的方法对无油脂食疗方溶液进行AQC衍生制样前处理。研究证明,该方法适用于猪蹄相关食疗方的样品前处理。样品前处理是为了将胶原蛋白中的肽键水解,得到游离氨基酸。氨基酸水解可通过碱、酸和酶的处理来实现,其水解程度对测量结果有一定的影响。最常用的水解方法是酸水解,样品的水解时间对样品的检测效果也具有一定的影响^[17]。本实验在参考文献的基础上,选择将其用6 mol/L盐酸在110℃下处理24 h。

3.2 衍生试剂的选择 高效液相色谱法检测胶原蛋白含量精密度高、操作便捷、需样量少,但检测前要对样品进行水解和衍生^[18]。AQC衍生法是以AQC试剂对待测物进行柱前衍生从而测定氨基酸含量的方法,具有发生快速、试剂水解物干扰性小、灵敏度高特点^[18-20],于1997年已被用于猪血浆中

氨基酸的测定^[21]。AQC衍生法结合HPLC法测定羟脯氨酸含量首次应用对象是奶粉,经证明稳定可行^[22]。2011年,顾伟钢等^[23]首次将AQC法运用至熟猪肉及其汤汁中游离氨基酸的检测中,证明该法前处理过程简单,样品峰型好,可应用于肉制品的质量评定。因此选择AQC试剂作为本实验胶原蛋白含量测定的衍生试剂。本实验研究结果表明,AQC衍生法测定胶原蛋白含量简便、灵敏、重复性好。

3.3 色谱条件的选择 AQC法检测胶原蛋白含量的基本原理是AQC试剂与羟脯氨酸发生反应,生成在248 nm有紫外吸收的高稳定性的脲、6-氨基喹啉和N-羟基琥珀酸亚酰胺,故本研究选用紫外检测器进行羟脯氨酸峰的检测^[24]。羟脯氨酸是一种极性较大的氨基酸,与AQC试剂混合后的衍生物和剩余的衍生试剂混在一起分不开。因此本研究选择梯度洗脱,通过减少流动相中乙腈含量,实现对羟脯氨酸峰的分离。温度对可通过影响缓冲溶液和样品的酸度系数从而影响样品峰的分离,本研究在前期研究基础上将37℃柱温与40℃柱温下峰形分离效果进行对比,结果表明在本方法下37℃更有利于羟脯氨酸峰的分离。此外,本研究还发现流动相的PH值对羟脯氨酸的出峰时间及色谱峰分离程度有一定的影响,pH>4.95,容易出现出峰时间提前,样品峰分离度小的状况,故在配置流动相的过程中务必严格注意流动相的pH。

3.4 正交试验结果讨论 本研究以羟脯氨酸含量为指标,以煎煮时间、料水比、煎煮温度作为三因素,通过正交试验表对扶正补血食疗方中的胶原蛋白含量进行测定,优化扶正补血食疗方中胶原蛋白的提取方法。试验结果表明:试验因素影响主次顺序为煎煮时间>煎煮温度>料水比,这与诸永志等^[25]的相似研究结果一致。当加热温度为100℃,料水比为1:8,提取时间为3 h时,所得的扶正补血食疗方中胶原蛋白含量最高。本研究是首次针对猪蹄及其食疗方中胶原蛋白含量提取的研究,由于扶正补血食疗方中中药有效成分的特殊性,实验中的因素水平设置主要是通过对现有肉汤成分及中药成分提取文献进行参考而综合设立。

3.4.1 煎煮温度的确定 本研究中的温度为保温温度,即将猪蹄大火煮沸后,文火慢熬所用的保温温度。瞿明勇等^[26]通过研究发现在80℃的保温条件下,猪排骨汤中的蛋白质含量最高。诸永志等^[25]研究发现鲫鱼汤在90℃蛋白溶出率最高,故其适宜的加热温度应控制在80~90℃之间。亦有研究表明,在制作肉汤时,100℃左右是肉中蛋白质溶出的飞跃节点^[27]。基于以上,本研究将加热温度设为

80、90、100℃三个水平。

3.4.2 料水比的确定 本研究中的料水比指的是以固定1 800 mL的水将猪蹄炖煮1 h后,再次加入的浸泡中药的水含量。料水比常与原料中的营养成分和风味物质溶出呈正相关,是影响汤的营养品质与风味的重要影响因素之一^[28]。但由于猪蹄食疗方具有药用功效,其浓度是固定的,为了便于实验操作,故实验在选择料水比的过程中主要是参考中药有效成分分析出的料水比值。扶正补血食疗方是以猪蹄结合我国经典补血方剂当归补血汤所制备的食疗方,而在当归补血汤的质量控制研究中,大量研究将其料水比三水平设置为1:8、1:10、1:12^[29-30]。以此确定本研究的料水比水平。

3.4.3 煎煮时间的确定 在煎煮时间三水平选择的时候,虽文献称加热时间越长,胶原蛋白的溶解度越高,但考虑到食疗方制作的时间经济成本及中药有效成分提取相关的研究结果^[31]。笔者参考陆路等^[32]煲汤2 h后,汤中蛋白质含量开始增长,4 h后增长速度减缓的实验结论,将猪蹄食疗方的煎煮时间三水平设置为先将猪蹄用清水炖煮1 h后,加入中药煎煮1、2、3 h进行胶原蛋白含量测定。

3.5 后续研究 中医食疗方常采用传统肉食汤煲的制作方法,以砂锅进行煎煮,故本研究未考虑到压力条件对胶原蛋白溶出的影响。在之后的研究中可考虑嵌入高压蒸煮工艺,如利用高压锅的高温高压提高胶原蛋白提取量,并将其结果与砂锅进行对比,择优使用,以最大限度地发挥猪蹄的营养价值。基于扶正补血食疗方自身属性,在其正交试验因素水平选择时综合考虑猪蹄胶原蛋白与中药有效成分含量提取,所以研究结果基本为所设定三水平的临界值。故后续研究可在本研究的基础上进行细化,通过缩小试验因素水平,增加试验因素,比如猪蹄的破碎程度(骨肉分离程度)、加盐量等,优化扶正补血食疗方的参数选择及制备工艺。此外,还应以扶正补血食疗方的感官评价及食疗方中的其他中药的有效成分等为评价指标,利用赋权法,进行综合评价,从而探索扶正补血食疗方的最优制备工艺,为扶正补血食疗方临床运用的用法、用量提供科学依据。

4 结论

本研究采用反相高效液相色谱法建立了快速检测扶正补血食疗方中胶原蛋白含量的方法,并通过 $L_9(3^3)$ 正交实验方法,优化了猪蹄胶原蛋白的前处理和提取方法。研究结果表明,本研究所建立的方法专属性强、科学合理,能比较客观地反映方中羟脯氨酸的含量,从而较客观地反映胶原蛋白含

量,可用于扶正补血食疗方中胶原蛋白含量的测定。正交试验结果表明,在100℃下,料水比为1:8,煎煮3 h时,所得到的扶正补血食疗方中胶原蛋白含量最高,该研究结果可为形成扶正补血食疗方的标准化制备工艺及稳定性评价体系奠定基础,提高扶正补血食疗方的质量控制,促进食疗方产业化进程,推动中医食疗发展。

参考文献

- [1] 方芳,卞彦君.归芪猪蹄汤在缓解化疗后患者白细胞减少中的应用[J].当代护士,2019,26(1):96-97.
- [2] 汪旭,郝晓蓓,杨敏,等.扶正补血食疗方含药血清干预Notch通路调控骨髓造血干细胞化疗后损伤的机制研究[J].中医药信息,2022,39(2):18-24.
- [3] 田雨,丁艳平,邵宝平,等.黄芪等药食同源类中药作为功能性食品与肠道菌群的相互作用[J].中国中药杂志,2020,45(11):2486-2492.
- [4] 杨月欣,王光亚,潘兴昌.中国食物成分表[M].北京:北京大学医学出版社,2002:101.
- [5] 蒋挺大,张春平.胶原蛋白[M].北京:化学工业出版社,2001.
- [6] 秦晓佩,束俊霞.猪蹄胶原蛋白的营养价值及应用研究[J].现代食品,2018(7):46-49.
- [7] 胡颀,步婷婷,于松峰,等.牛骨源胶原蛋白肽的制备及其生理活性研究进展[J].食品工业科技,2020,41(15):357-364.
- [8] 陆雨顺,张磊,姜辉,等.梅花鹿副产品中氨基酸及胶原蛋白含量的测定与分析[J].特产研究,2020,42(6):43-47,54.
- [9] 张迪,徐桂华,蒋高霞,等.扶正食疗方对化疗致骨髓抑制大鼠外周血细胞的影响[J].护理学杂志,2012,27(7):1-4.
- [10] 叶加兰,吕道飞,周坪骏,等.海参胶原蛋白的提取及其活性研究[J].生物化工,2021,7(6):161-163.
- [11] 纪倩,宿丹丹,应慧妍,等.猪皮中胶原蛋白的提取与结构鉴定[J].食品研究与开发,2017,38(13):44-49.
- [12] 张曦,万莹,席汝娟,等.种青养殖模式提升草鱼肌肉中胶原蛋白的相关研究[J].淡水渔业,2021,51(5):70-75.
- [13] 黄萍.反相高效液相色谱测定猪肌肉中胶原蛋白含量[J].饲料研究,2007(11):23-24.
- [14] 孙培利,谈花,王晓燕,等.牦牛蹄筋胶原蛋白提取工艺优化[J].食品研究与开发,2021,42(13):119-125.
- [15] 王锡念,徐志善,孙钦军,等.不同方法提取鮫鳔鱼皮胶原蛋白的比较和分析[J].食品研究与开发,2019,40(10):80-87.
- [16] 林单,金振涛,宋国勇,等.胶原蛋白肽产品中羟脯氨酸检测方法研究[J].食品科技,2019,44(11):334-338.
- [17] 卢彬,付铭,范蕊,等.柱前衍生反相高效液相色谱法测定新疆特色食品馕中氨基酸含量[J].食品安全质量检测学报,2021,12(2):713-720.
- [18] 邓浩,党政,尹青春,等.胶原蛋白的研究进展[J].广州化工,2019,47(18):27-30.
- [19] 曲栗,古淑青,张嘉麒,等.柱前衍生-超高效液相色谱法测定3种奶粉中18种氨基酸[J].色谱,2021,39(5):472-477.
- [20] ONOZATO M, TANAKA Y, ARITA M, et al. Amino acid analyses of the exosome-eluted fractions from human serum by HPLC with fluorescence detection [J/OL]. Pract Lab Med, 2018, 12: e00099. DOI:10.1016/j.plabm. 2018.e00099.

- [21] REVERTER M, LUNDH T, LINDBERG JE. Determination of free amino acids in pig plasma by precolumn derivatization with 6-N-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr B: Biomed Sci Appl, 1997, 696(1):1-8.
- [22] 金苏英,林笑容,赵志红,等.高效液相色谱法测定奶粉及其他乳制品中的L-羟脯氨酸[J].饮料工业,2009,12(7):28-30.
- [23] 顾伟钢,张进杰,辛梅,等.柱前衍生-反相高效液相色谱法测定不同方法煮制的猪肉及其汤汁中的游离氨基酸[J].色谱,2011,29(10):1041-1045.
- [24] 汪明志,张华锋,周坚,等.柱前衍生-反相高效液相色谱法测定阿胶补血口服液主要氨基酸的含量[J].西北药学杂志,2020,35(1):42-45.
- [25] 诸永志,卞欢,吴海虹,等.提高鲫鱼汤原料蛋白溶出率的工艺优化[J].江苏农业科学,2018,46(8):189-192.
- [26] 瞿明勇,张瑞霞,赵思明,等.工艺参数对排骨汤营养特性的影响[J].食品科技,2007(12):123-126.
- [27] 李柳冰,林婷婷,曾晓房,等.前处理方式对鸽汤品质及风味的影响[J].食品工业科技,2021,42(11):15-22.
- [28] 王虎虎,黄明远,李潇,等.黄羽肉鸡汤煲炖煮工艺优化[J].中国食品学报,2021,21(5):272-277.
- [29] 马家骅,李霞,谭承佳,等.基于药效理化表征的当归补血汤质量控制模式初探[J].中草药,2012,43(5):901-905.
- [30] 靳如娜,齐晓甜,孙蓉,等.经典名方当归补血汤的药效物质基础和g量控制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(16):220-228.
- [31] 王静帆,黄峰,沈青山,等.低温长时蒸煮对猪肉品质的影响[J].中国农业科学,2021,54(3):643-652.
- [32] 陆路,金振涛,马勇,等.中华传统肉食煲汤的基本营养成分[J].食品与发酵工业,2010,36(1):187-190.

(收稿日期:2022-01-25,修回日期:2022-03-20)

引用本文:张新勇,葛雪松,孙桐,等.超高效液相色谱串联三重四极杆质谱法测定三种葡萄糖制剂中5-羟甲基糠醛的含量[J].安徽医药,2023,27(4):679-682.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.04.010.

◇ 药物分析 ◇



超高效液相色谱串联三重四极杆质谱法测定三种葡萄糖制剂中5-羟甲基糠醛的含量

张新勇,葛雪松,孙桐,卓静

作者单位:宿迁市食品药品检验所,江苏 宿迁 223800

摘要: 目的 建立葡萄糖注射液、葡萄糖酸钙口服溶液与盐酸氨基葡萄糖胶囊中5-羟甲基糠醛的超高效液相色谱串联三重四极杆质谱测定方法。方法 2021年1—9月,采用ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)色谱柱,流动相为0.05%甲酸溶液-甲醇(85:15),流速为0.3 mL/min,柱温30℃,进样盘温度5℃,进样体积2 μL。质谱条件:ESI源,正离子扫描,脱溶剂温度:400℃;干燥气流速:15 L/min;毛细管电压:3.0 kV。结果 5-羟甲基糠醛在2.07~155.25 μg/L浓度范围内,线性关系良好($r=0.999\ 7$),定量限为0.36 μg/L,平均回收率为99.54%,RSD为1.63%($n=9$)。结论 该方法专属性较强,灵敏度高,稳定性好,适用于三类制剂中5-羟甲基糠醛的质量控制。

关键词: 葡萄糖; 药物污染; 超高效液相色谱串联三重四极杆质谱(UPLC-MS/MS); 5-羟甲基糠醛; 质量控制

Determination of 5-Hydroxymethyl furfural in three glucose preparations by UPLC-MS/MS

ZHANG Xinyong, GE Xuesong, SUN Tong, ZHUO Jing

Author Affiliation: Suqian Institutes for Drug and Food Control, Suqian, Jiangsu 223800, China

Abstract: **Objective** To establish an UPLC-MS/MS method for determination of 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) in Glucose Injection, Calcium Gluconate Oral Solution and Glucosamine Hydrochloride Capsules. **Method** From January 2021 to September 2021, an ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) was used, the mobile phase was 0.05% formic acid solution-methanol (85:15), the flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 30℃ and the sample plate temperature was 5℃, the sample volume was 2 μL. MS conditions: ESI ion source was used and positive ion scanning; the desolvation temperature was 400℃, the dry gas flow rate was 15 L/min and the capillary voltage was 3.0 kV. **Result** There was a good linear relationship within the range of 2.07-155.25 μg/L for 5-HMF ($r=0.999\ 7$), and the limit of quantitation of 0.36 μg/L, the average recovery of 99.54% with RSD of 1.63% ($n=9$). **Conclusion** The method shows promising specificity, high sensitivity and good stability, can be used in the quality control of 5-HMF in three preparations.

Key words: Glucose; Drug contamination; UPLC-MS/MS; 5-HMF; Quality control