

高效液相色谱法测定鸡软骨 II 型胶原蛋白含量

郑婷¹, 汪蕾², 刘菊¹, 施超欧^{1*}

(1. 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237; 2. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

摘要 目的: 建立一类新药 II 型胶原蛋白的液相色谱分析方法。方法: 选择鸡软骨为提取原料制成的 II 型胶原蛋白, 采用分子排阻柱高效液相色谱法测定。色谱条件: 使用 Sepax nanofilm SEC-150(4.6 mm × 300 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为 0.15 mol·L⁻¹ 磷酸钾盐缓冲液 (pH 6.7), 流速 0.35 mL·min⁻¹, UV 检测波长 210 nm, 柱温 25 °C。结果: II 型胶原蛋白浓度在 0.0894~0.8940 mg·mL⁻¹ 范围内, 线性关系良好 ($r=0.9998$); 重复性、稳定性良好。结论: 该方法简便、准确, 可用于测定鸡软骨 II 型胶原蛋白的含量。

关键词: II 型胶原蛋白; 分子排阻; 高效液相色谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2010)09-1767-03

HPLC determination of collagen II from chicken cartilage

ZHENG Ting¹, WANG Lei², LIU Ju¹, SHI Chao-ou^{1*}

(1. College of Chemistry and Molecular Engineering East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. College of Chinese Medicine, Shanghai University of Chinese Traditional Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for the determination of collagen II. **Methods** Collagen II from chicken cartilage was selected and it was determined by gel column with molecular exclusion chromatogram HPLC. The chromatographic conditions of collagen II are as follows: the chromatographic column was Sepax nanofilm SEC-150(4.6 mm × 300 mm, 5 μm); The mobile phase was 0.15 mol·L⁻¹ phosphate buffer (pH 6.7) at the flow rate of 0.35 mL·min⁻¹; The detection wavelength was set at UV 210 nm, and the column temperature maintained twenty-five degrees centigrade. **Results** There was a good linear relationships 0.0894-0.8940 mg·mL⁻¹, $r=0.9998$. The repeatability and the stability of samples were good. **Conclusion** This method is simple, accurate, and can be used for the determination of collagen II from chicken cartilage.

Key words collagen II; molecular exclusion chromatogram; HPLC

胶原蛋白主要存在于动物的皮、骨、软骨、牙齿、肌腱、韧带和血管中, 是结缔组织中极其重要的结构蛋白质, 起着支撑器官、保护肌体的作用。胶原蛋白是哺乳动物体内含量最多的蛋白质, 占体内蛋白质总量的 25%~30%^[1]。随着对胶原的进一步研究, 人们的生活中将会越来越多地接触到含有胶原蛋白的产品, 其产品将会在食品、化妆品、医药、工业、生物材料等方面有广泛的应用前景。

近年来的研究表明 II 型胶原蛋白还可以作为药物和保健品来防治类风湿性关节炎 (RA)。目前所使用的各种药物与方案是非特异性缓解对症治疗, 且带多种严重毒副作用, 例如最常见的非甾体抗炎

药, 如双氯芬酸、萘普生、布洛芬、美洛昔康等会造成胃肠消化不良、恶心呕吐、肝脏中毒、肾功能衰竭、血细胞减少、过敏反应等。基于鸡 II 型胶原耐受原能有效治疗类风湿关节炎的新型 DNA Tolerizing 治疗性疫苗的探索^[2-4], 将口服免疫耐受与基因治疗性疫苗两大策略充分进行有机融合, 其制成的口服溶液剂已经申报国家一类新药。

本文建立了 HPLC 法, 用于 II 型胶原蛋白的含量测定和质量控制等方面。

1 仪器与材料

1.1 实验仪器 高效液相色谱仪 Dionex Ultimate 3000(包括四元泵 LPG-3400A, 自动进样器 WPS-

* 通讯作者 Tel (021) 64252812 E-mail shicou@ecust.edu.cn

300Q 柱温箱 TCC - 320Q, DAD 检测器 DAD - 3000); 色谱工作站 Chromeleon 6.8 超纯水机 A 10 (美国 Millipore 公司); 电子天平 BS-110S 型 (德国赛多利斯公司); 数显鼓风干燥箱 GZX - 9070 MBE (上海博迅实业有限公司医疗设备厂); 超声波清洗仪 (美国 Branson 公司)。

1.2 药品与试剂 国内药厂提供的成品, 是以鸡关节软骨为原料制备的 II 型胶原蛋白, 3 个样品批号; Sigma 公司的 II 型鸡胶原蛋白标准品 (C9301, 10 mg); 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、醋酸、醋酸钠均为分析纯; 实验用水超纯水 (电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$)。

2 实验方法

2.1 溶液的配制

溶解胶原蛋白采用溶剂为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸, 静置缓慢溶解, 全溶时间为 24 h, 具体方法如下:

II 型胶原蛋白样品溶液配制: 将 II 型胶原蛋白样品剪成细长的一段段, 称取 50.0 mg 置于洁净干燥的 25 mL 量瓶中, 先加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸约 20 mL, 使其溶胀, 室温静置过夜, 完全溶解后, 再用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸定容。

标准溶液的配制: 用百万分之一天平精密称取标准品 4.47 mg 置于 10 mL 溶剂瓶中, 加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸 2.5 mL, 室温放置过夜, 使其溶解, 即得。

2.2 色谱条件 色谱柱: Sepax nanofilm SEC - 150 (4.6 mm \times 300 mm, 5 μm); 流动相: 磷酸钾盐缓冲液 ($0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 6.7); 流速: $0.35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 波长: UV 210 nm; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 分析时间: 15 min。在以上色谱条件下, 得到最佳实验色谱图, 见图 1。

3 实验结果

3.1 线性关系考察 取标准溶液 0.05, 0.125, 0.25, 0.375, 0.5 mL, 加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸钠 0.95, 0.875, 0.75, 0.625, 0.5 mL, 轻摇使其混匀。用自动进样器取稀释的标准溶液 10 μL 分别进样 3 次, 以浓度为横坐标, 以 II 型胶原蛋白峰面积为纵坐标, 制作标准曲线。回归方程为:

$$Y = 374.78X - 0.2735 \quad r = 0.9998$$

结果表明: II 型胶原蛋白浓度在 $0.0894 \sim 0.8940 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 线性关系良好。

3.2 重复性试验 取标准溶液以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸钠稀释 1 倍、1.5 倍、2 倍, 分别作为低、中、高 3 个浓度, 每个浓度平行配制 3 份, 进样 10 μL 。结果显示: 保留时间一致, 峰面积基本相同, RSD 低, 重复

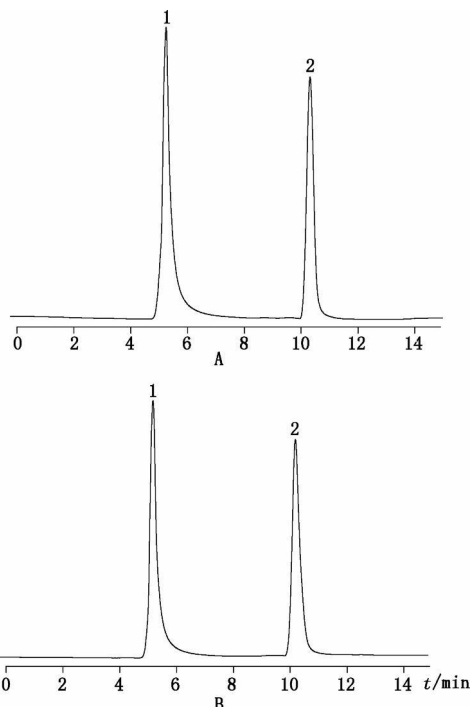


图 1 标准品 (A) 及样品 (B) 色谱图

Fig 1 Chromatograms of standard (A) and sample (B)

1. II 型胶原蛋白 (collagen II) 2. 醋酸钠 (sodium acetate)

性好。见表 1 (表 1 中重复性的 RSD 为同一天内连续 3 次进样所得)。

表 1 标准品的重复性和稳定性 (%)

Tab 1 The repeatability and stability of standard

浓度水平 (level of concentration)	重复性 (repeatability)			稳定性 (stability)
	保留时间 (retention time) RSD	峰面积 (peak area) RSD	峰高 (peak high) RSD	峰面积 (peak area) RSD
		低 (low)	0.042	0.590
中 (middle)	0.077	0.590	0.977	0.835
高 (high)	0.019	0.590	0.827	0.369

3.3 稳定性考察 取已配制的低、中、高 3 个浓度溶液, 在 0, 2, 4 h 进样 10 μL , 每次 3 针, 考察方法的稳定性。结果说明稳定性好, 见表 1 (表 1 中稳定性的 RSD 为第 0, 2, 4 h 检测标准溶液的峰面积 RSD)。

3.4 样品测定 精密称取 3 批样品, 其质量分别为 49.7, 49.9, 50.2 mg 按“2.1”项下方法配制样品溶液。分别取样品溶液 2.5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸钠定容, 制成约为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的蛋白溶液。自动进样器以 10 μL 进样, 分别进样 5 次, 测定样品中 II 型胶原蛋白的含量。结果见表 2。

表 2 样品中 II 型胶原蛋白含量测定

Tab 2 Analysis of collagen II from chicken cartilage

样品序号 (sample No)	5 次峰面积平均值 (average of five peak areas)	测定浓度 (detected concentration) / /mg·mL ⁻¹	配制浓度 (con fected concentration) / mg·mL ⁻¹	含量 (content) / %	RSD / %
1	109.1669	0.494	0.497	99.4	0.59
2	109.3317	0.495	0.499	99.2	0.42
3	110.4741	0.500	0.502	99.6	0.12

4 讨论

4.1 色谱条件的优化

4.1.1 检测波长 蛋白质特征波长在 260 nm 左右,但其响应值较低,因此选择灵敏度较高范围内的 210 nm 作为检测波长,提高了检测的灵敏度,也保证了基线的稳定性。

4.1.2 色谱柱 筛选了多种色谱柱,在采用 Agilent GF-250 的标准方法和条件,发现蛋白峰拖尾严重,峰形差;采用 Waters 色谱柱 Protein-parkTM 300SW (7.5 mm × 300 mm),流动相为 0.15 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0),样品出峰正常,但随着时间的延长,样品峰峰面积减少直至消失,因此其条件不适合,这是因为胶原蛋白的结构以及色谱条件造成的。选择 Sepax nanofilm 色谱柱,因为这种柱子较耐酸,寿命长,重复性好,在优化各种参数后选择了此柱。

4.1.3 盐浓度 盐浓度对蛋白出峰的时间和浓度有很大的影响,盐浓度过低,蛋白被柱吸附,重复性差,蛋白峰拖尾,因此在比较不同的盐浓度后,选择 0.15 mol·L⁻¹。

4.1.4 pH pH 对蛋白的保留以及柱子的寿命有很大的影响,不同柱子各不相同,曾采用不同 pH (pH 6.0~7.0) 的缓冲液,结果表明 pH 6.7 较为理想,峰形好,峰面积大。

4.1.5 温度 从 20 25 30 35 40 °C 的结果看,不同温度下,II 型胶原蛋白的保留时间、峰高、峰面积都基本相同,分离效果没有明显差异。相对而言,从峰形上比较 25 °C 与 30 °C 更好,选择 25 °C 作为柱温。

4.2 样品溶解 胶原蛋白在水中的溶解度很低,且缓慢,在 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸溶液中,溶解度较高。通过实验证明,采用加热或超声处理,待样品全部溶解后,进行含量测定,其峰高与峰面积降低显著,含量降低。可见,加热与超声处理将引起蛋白变性,因此溶解过程必须在比较低的温度下,缓慢进行。此外,将样品剪成细长的一段段,有助于提高溶解速度。

4.3 实验优化选择方法 实验中,流动相与色谱柱的条件考察同时进行,因此,在其他条件相同的情况下,通过相同浓度及 pH 的流动相在不同色谱柱中的分离状况,即可筛选出合适的色谱柱,同时也便于以最优的色谱柱考察流动相对该成分分离出峰的影响。

5 结论

确立 II 型胶原蛋白色谱分析方法,方法简便、准确,重复性、精密度高,方法可行。在建立方法学基础上,对 3 批 II 型胶原蛋白进行检测分析,实验测定结果证明该样品纯度高,无杂质,其结果同电泳法的纯度鉴定以及免疫学活性检测的结果相一致,重复性和稳定性好,适用于相应的质量控制。

参考文献

- JIANG Ting-da(蒋挺大), ZHANG Chun-ping(张春萍). Collagen(胶原蛋白). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2001
- XU Jian-hua(徐建华), XU Sheng-qian(徐胜前), WANG Fen(王芬), et al. A double-blind, randomized controlled clinical study on oral chicken type II collagen for treatment of rheumatoid arthritis(鸡 II 型胶原双盲随机对照治疗类风湿关节炎的研究). *Chin Rem Clin*(中国药物与临床), 2006, 6(6): 433
- LIU Yan-xu(卢延旭), CHEN Min-zhu(陈敏珠). Immune therapeutic effect of oral soluble chicken collagen type II on adjuvant arthritis in rats(可溶性鸡 II 型胶原对关节炎大鼠的免疫治疗作用). *Chin J Clin Pharmacol Ther*(中国临床药理学与治疗学), 2004 9(2): 180
- LIU Ling(刘玲), ZHU Ping(朱平), WANG Yan-hong(王彦宏), et al. Detection and significance of serum antibodies against type II collagen in patients with rheumatoid arthritis(类风湿性关节炎患者血清抗 II 型胶原抗体的检测及意义). *J Cell Mol Immunol*(细胞与分子免疫学杂志), 2002, 18(3): 281

(本文于 2009 年 8 月 25 日收到)