

长白山林蛙油鉴别 高效液相色谱蛋白质特征图谱法

Authentification of Changbai mountain Ranae Oviductus-high performance liquid chromatography (HPLC) based protein characteristic chromatogram

地方标准信息服务平台

2024 - 07 - 25 发布

2024 - 09 - 01 实施

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》和 GB/T 20001.4—2015《标准编写规则 第 4 部分：试验方法标准》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由吉林省农业农村厅提出并归口。

本文件由吉林省农业农村厅负责组织实施。

本文件起草单位：吉林农业大学、吉林大学、吉林省林蛙标准化技术委员会、吉林黄栀花药业有限公司。

本文件主要起草人：王诗涵、王志寒、王永生、王道君、伊常青。

地方标准信息服务平台

长白山林蛙油鉴别 高效液相色谱蛋白质特征图谱法

1 范围

本文件规定了林蛙油鉴别蛋白质组成的特征图谱法的分析原理、试剂及材料、试剂配制、仪器设备、样品、试验步骤及实验数据分析的要求。

本文件适用于长白山林蛙油真实性的鉴别。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

长白山林蛙油 *Changbai mountain Ranae Ovidutus*

蛙科动物中国林蛙 (*Rana temporaria chensinensis* David) 雌蛙的输卵管。主产于长白山地区，由《中华人民共和国药典》（2020 版）一部收载的哈蟆油，经采制干燥而得。

4 原理

中药特征图谱可采用特征峰保留时间评价，供试品特征图谱的相关色谱峰应与相应的参照物色谱峰保留时间相同。特征峰相对保留时间规定值范围一般应不超过±10%。实验以溶菌酶作参照物，通过分析林蛙油蛋白质特征峰与参照峰的相对保留时间确定目标峰，根据指纹图谱软件提取长白山林蛙油中蛋白质组成成分的特征峰，建立蛋白质对照特征图谱，进行真实性鉴别。

5 试剂和材料

警示——使用本文件的人员应有正规实验室工作的实践经验。本文件并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关法规规定的条件。

除特别说明外，所有试剂均为分析纯。

- 5.1 石油醚：沸点范围 60 °C~90 °C。
- 5.2 乙腈 (C₂H₃N) :色谱纯。
- 5.3 二硫苏糖醇 (C₄H₁₀O₂S₂, DTT)。
- 5.4 三氟乙酸 (C₂HF₃O₂, TFA)。
- 5.5 溶菌酶：纯度>98%。
- 5.6 二水合磷酸二氢钠 (NaH₂PO₄·2H₂O)。

- 5.7 无水磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)
- 5.8 硫酸铵 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)。
- 5.9 盐酸胍 ($\text{CH}_5\text{N}_3\cdot\text{HCl}$)。
- 5.10 水 (H_2O)：GB/T 6682 规定的一级水。

6 试剂配制

- 6.1 磷酸盐缓冲液 (PBS) (0.1 mol/L pH 7.4)：使用天平称取 6.04 g 二水合磷酸二氢钠和 8.71 g 的无水磷酸氢二钠，混合后用水定容至 1 L。
- 6.2 60% 饱和度的硫酸铵溶液：在 25 °C 下，使用天平称取 390 g 硫酸铵，加水至 1 L 后搅拌溶解即获得 60% 饱和度的硫酸铵溶液。
- 6.3 盐酸胍 (1 mL 6 mol/L) 含 DTT (10 mmol/L)：使用天平称取 57.3 g 盐酸胍和 0.1542 g DTT 混合，加入水溶解定容至 100 mL。

7 仪器设备

- 7.1 高效液相色谱仪-紫外检测器。
- 7.2 冷冻离心机：0 rpm~12000 rpm，0 °C~4 °C。
- 7.3 电热鼓风干燥箱。
- 7.4 旋转蒸发仪。
- 7.5 粉碎机：频率：50 Hz~60 Hz。
- 7.6 磁力搅拌器。
- 7.7 天平：感量：0.001 g 和 0.00001 g。
- 7.8 300 Å C8 色谱柱：250 mm×4.6 mm，5 μm。
- 7.9 二号筛。
- 7.10 具塞锥形瓶：100 mL。
- 7.11 离心管：100 mL。
- 7.12 布氏漏斗：100 mL。
- 7.13 抽滤瓶：250 mL。
- 7.14 透析袋：截留分子量：8000 Da。
- 7.15 容量瓶：1 mL 和 5 mL。
- 7.16 微孔滤膜：0.45 μm。
- 7.17 样品瓶：1.5 mL。

8 样品

应符合《中华人民共和国药典》(2020 年版)一部中哈蟆油项下性状、鉴别和检查的相关要求。

9 试验步骤

9.1 试样制备

取 10 g±1 g 的林蛙油样品混匀后，经粉碎机粉碎后过二号筛，取上述粉碎后样品 2 g，称定，置于具塞锥形瓶中经 20 mL 石油醚室温搅拌脱脂 1 h，用布氏漏斗和抽滤瓶滤过后，粉末置于电热鼓风干燥箱中 55 °C 烘干 1 h，保存备用。

9.2 供试品溶液制备

- 9.2.1 取试样 0.5 g，称定，置于具塞锥形瓶中，加磷酸盐缓冲液 50 mL。
- 9.2.2 磁力搅拌器连续 25 °C 搅拌 8 h 后，以 5000 r/min 离心 15 min，收集上清液，再次提取沉淀物，合并全部上清液。
- 9.2.3 向上清液中（9.2.2）加入 1.5 倍含 0.085% 三氟乙酸（v/v）的乙腈放置 1 h 后，以 5000 r/min 离心 15 min，收集全部上清液。
- 9.2.4 上清液（9.2.3）在 50 °C 下使用旋转蒸发仪回收乙腈，得到浓缩液 0.5 mL~1.5 mL。
- 9.2.5 取浓缩液（9.2.4）缓慢加入 30 mL 60% 饱和度的硫酸铵。
- 9.2.6 混合物（9.2.5）在 0 °C~4 °C 静置 1 h 后，以 8000 r/min 离心 20 min。
- 9.2.7 离心管中的沉淀（9.2.6），使用 1 mL 6 mol/L 盐酸胍（含 10 mmol/L DTT）涡旋充分溶解后完全转入透析袋中，将透析袋悬浮于装有一级水的烧杯中，磁力搅拌烧杯中的水，持续透析 12 h，将透析袋中溶液转移至 5 mL 容量瓶中，用一级水冲洗透析袋并转移至容量瓶中，定容至刻度，充分摇匀，备用。
- 9.2.8 取溶液（9.2.7），使用滤膜过滤至样品瓶。
- 9.2.9 将样品溶液（9.2.8）与参照物溶液（9.3.2）按 4:1 比例混合作为供试品溶液待用。

9.3 参照物溶液的制备

9.3.1 对照品储备液配制

取溶菌酶标准品 6.5 mg，精密称定，用一级水充分溶解，转移至 5 mL 容量瓶中，定容至刻度，充分摇匀，配置成浓度为 1.3 mg/mL 的对照品储备液，0 °C~4 °C 冰箱保存，保存期 30 天。

9.3.2 对照品工作溶液配制

精密量取对照品储备液 125 μL，用一级水定容至 1 mL，将 1.3 mg/mL 溶液稀释成 0.1625 mg/mL 的参照物溶液，吸取参照物溶液，使用滤膜过滤至样品瓶，于 0 °C~4 °C 冰箱保存，作为参照物溶液待用。

9.4 试验条件

高效液相色谱仪，色谱柱，流动相：含 0.085% 三氟乙酸（v/v）的乙腈（A）-含 0.1% 三氟乙酸（v/v）的一级水（B），线性梯度洗脱，按照表 1 设置洗脱条件；检测波长：215 nm；柱温：45 °C；进样量：20 μL。

表1 流动相线性梯度洗脱条件

| 时间 min | 流动相 A% (含 0.085% TFA 的乙腈溶液) | 流动相 B% (含 0.1% TFA 的水溶液) | 流速 mL/min |
|-----------|--------------------------------|-----------------------------|--------------|
| 0 | 12 | 88 | 1.0 |
| 52 | 30 | 70 | |
| 80 | 44 | 56 | |

9.5 试样测定

按 9.4 中色谱条件进行测定，记录色谱图。

9.6 数据处理

使用相应液相色谱仪工作站对数据进行记录和处理，积分参数：斜率灵敏度为 1，峰宽为 0.02，最小峰面积为 50，最小峰高为 3.5。

10 试验数据分析

10.1 在相同条件下，将样品特征图谱（图 A.1）与溶菌酶参照物图谱（图 A.2）进行比较。

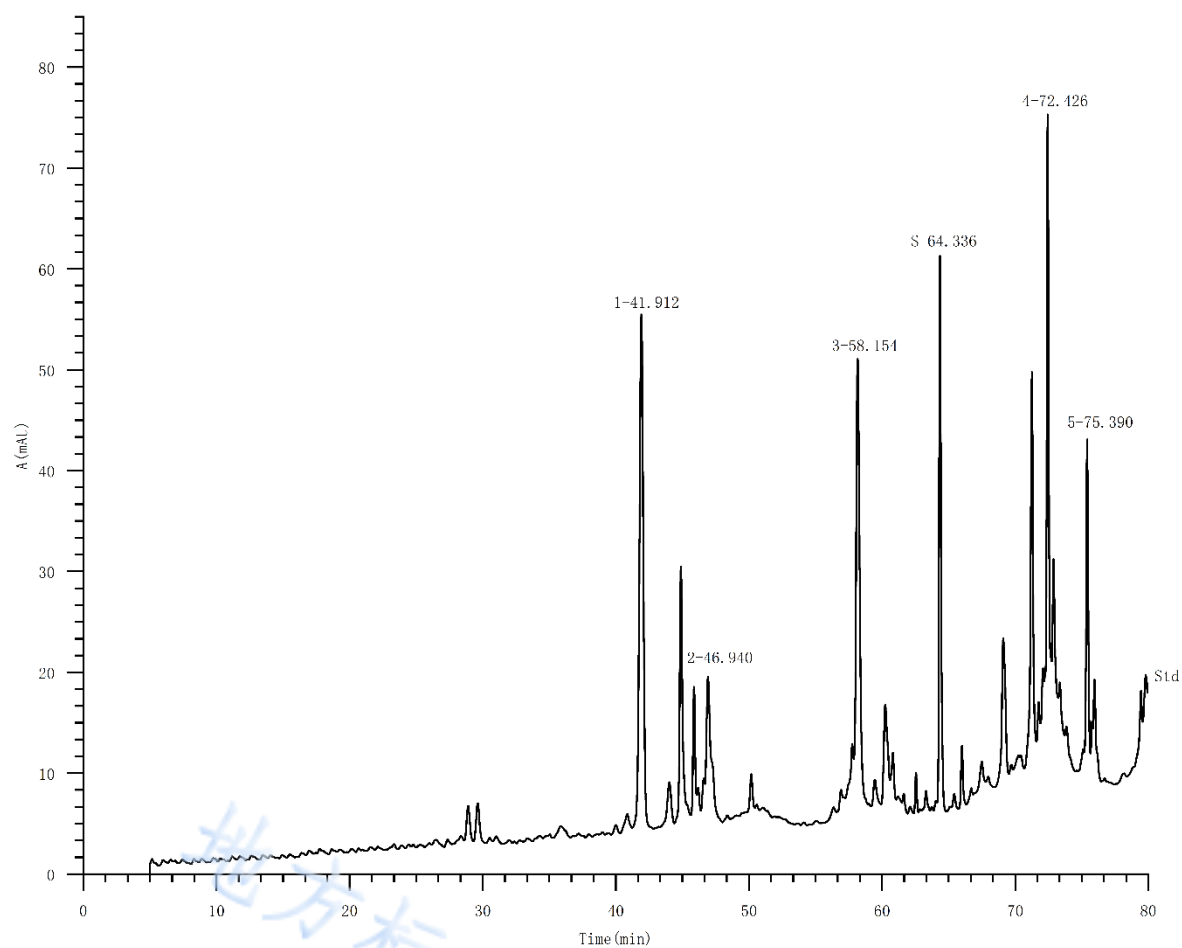
10.2 以样品相对保留时间均值（ $n \geq 6$ ）标定共有特征峰，以参照物溶菌酶保留时间相对应的峰为 S 峰，计算特征色谱峰与 S 峰的相对保留时间。规定值为：0.651（峰 1）、0.730（峰 2）、0.904（峰 3）、1.000（峰 S）、1.126（峰 4）、1.172（峰 5）。

10.3 样品图谱应与标准图谱峰形（图 A.1）保留时间一致，其相对保留时间应在规定值的 $\pm 5\%$ 之内。

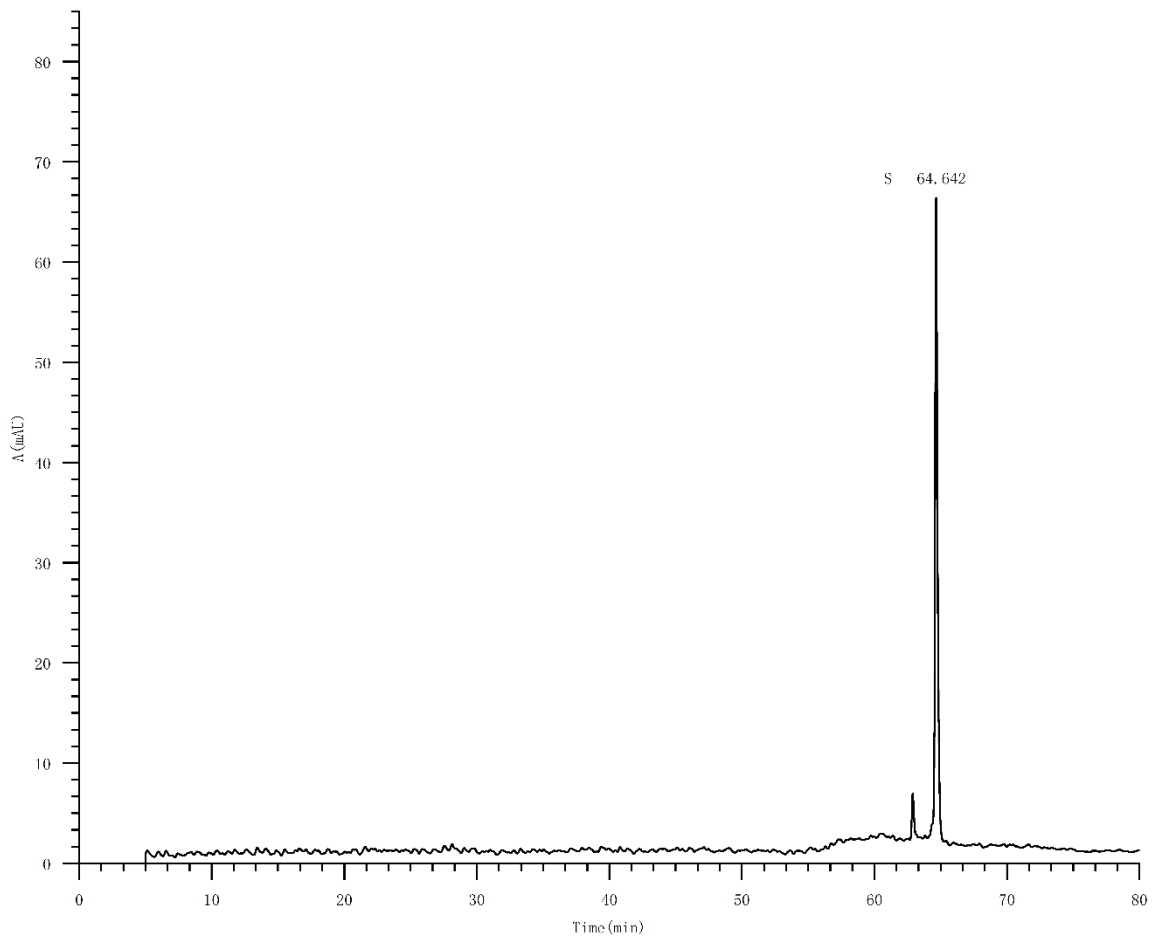
地方标准信息服务平台

附录 A
(规范性)
对照特征图谱和参照物图谱

图 A.1 给出了长白山林蛙油蛋白质组成特征色谱图；图 A.2 给出了溶菌酶（对照品）色谱图。



图A.1 长白山林蛙油蛋白质组成特征色谱图



图A.2 溶菌酶（对照品）色谱图

地方标准信息服务平台

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国药典（2020年版）一部. 国家药典委员会，中国医药科技出版社
-

地方标准信息服务平台