

HPLC-ELSD法同时测定东北岩高兰果肉中17种氨基酸的含量

金司阳*,刘寒,郭慧,王振月*(黑龙江中医药大学药学院,哈尔滨 150040)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)09-1272-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.09.33

摘要 目的:建立同时测定东北岩高兰果中17种氨基酸含量的方法。方法:采用高效液相色谱-蒸发光散射检测法。色谱柱为Waters Symmetry C₁₈,流动相为5.0 mmol/L七氟丁酸溶液(含0.7%三氟乙酸)-乙腈(梯度洗脱),流速为2.0 L/min,柱温为37℃,漂移管温度为60℃。结果:甘氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、丙氨酸、苏氨酸、谷氨酸、胱氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、脯氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸检测质量浓度线性范围分别为0.005 9~0.187 7、0.008 2~0.262 8、0.010 4~0.332 8、0.007 0~0.222 7、0.009 3~0.297 8、0.011 5~0.367 8、0.009 4~0.300 4、0.011 4~0.365 5、0.012 1~0.388 0、0.013 6~0.435 5、0.009 0~0.287 8、0.009 2~0.293 0、0.011 7~0.373 0、0.014 2~0.453 0、0.010 3~0.328 0、0.010 3~0.328 0、0.012 9~0.413 0 mg/mL(r 均 >0.999);精密度、稳定性、重复性试验的RSD $\leq 2.0\%$;加样回收率为98.0%~101.2%(RSD均 $<2.0\%$, $n=6$)。结论:该方法操作简便,精密度、稳定性、重复性好,可用于东北岩高兰果中17种氨基酸含量的同时测定。

关键词 东北岩高兰;高效液相色谱法;蒸发光散射检测;氨基酸

Simultaneous Determination of 17 Amino Acids in Sarcocarp of Northeast *Empetrum nigrum* by HPLC-ELSD

JIN Siyang, LIU Han, GUO Hui, WANG Zhenyue (College of Pharmacy, Heilongjiang University of TCM, Harbin 150040, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine the content of 17 amino acid in sarcocarp of northeast *Empetrum nigrum* simultaneously. METHODS: HPLC-ELSD method was adopted. The determination was performed on Waters Symmetry C₁₈ column with mobile phase consisted of 5.0 mmol/L heptafluorobutyric acid solution (containing 0.7% trifluoroacetic acid)-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 2.0 L/min, the column temperature was 37 °C, the drift tube temperature was set at 60 °C. RESULTS: The linear ranges of glycine, serine, aminosuccinic acid, aminopropionic acid, threonine, glutamic acid, cystinol, diaminocaproic acid, histidine, arginine, proline, valine, methionine, oxyphenylaminopropionic acid, isoleucine, aminocaproic acid, phenylalanine were 0.005 9-0.187 7, 0.008 2-0.262 8, 0.010 4-0.332 8, 0.007 0-0.222 7, 0.009 3-0.297 8, 0.011 5-0.367 8, 0.009 4-0.300 4, 0.011 4-0.365 5, 0.012 1-0.388 0, 0.013 6-0.435 5, 0.009 0-0.287 8, 0.009 2-0.293 0, 0.011 7-0.373 0, 0.014 2-0.453 0, 0.010 3-0.328 0, 0.010 3-0.328 0 and 0.012 9-0.413 0 mg/mL (all $r > 0.999$ 0). RSDs of precision, stability and repeatability tests were not all less than 2.0%. Recoveries were 98.0%-101.2% (RSD $<2.0\%$, $n=6$). CONCLUSIONS: This method is simple, precision, stable and repeatable, and can be used for simultaneous determination of 17 amino acid in sarcocarp of northeast *E. nigrum*.

KEYWORDS Northeast *Empetrum nigrum*; HPLC; ELSD; Amino acids

东北岩高兰 *Empetrum nigrum* L. var. japonicum K. Koch为岩高兰科岩高兰属植物,在我国仅有一变种,数量极少,仅分布在中国的大兴安岭亚高山地带,是国家重点保护植物,为珍稀植物。黑龙江省东北岩高兰资源分布面积达13 000 hm²,3 250 t,年生长量32 t^[1-2]。据记载,该植物有利尿,抗坏血病,预防和治疗酒精性脂肪肝、冠心病、心肌炎等功效^[3]。为了合理开发及保护该药用资源,本研究前期对东北岩高兰果肉进行了生药学、药理学相关研究,结果显示东北岩高兰果肉中所含主要化学成分为黄酮类、酚醛树脂、酚类成分,并对模型大鼠酒精性脂肪肝有良好的抑制作用^[4]。本试验在此基础上对东北岩高兰果肉中17种氨基酸进行了比较系统的研

究,以为东北岩高兰果肉资源品质研究和开发利用提供依据。

1 材料

1.1 仪器

e2695型高效液相色谱仪,包括UM5000蒸发光散射检测器(美国Waters公司);AE240型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);KQ-300E型超声波清洗仪(昆山市舒美超声仪器有限公司,功率:250 W,频率:40 kHz)。

1.2 试剂

混合氨基酸对照品(美国Sigma公司,批号:1002078739,浓度均为1.0 mol/L);七氟丁酸、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为重蒸水。

1.3 药材

东北岩高兰果于2013年10月采自大兴安岭阿龙山,经黑龙江中医药大学王振月教授鉴定为真品。

* 硕士研究生。研究方向:中药资源研发。E-mail:jsy_0451@126.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:中药资源研发。电话:0451-87266873。E-mail:wangzhen_yue@163.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters Symmetry C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 5.0 mmol/L 七氟丁酸溶液(含0.7%三氟乙酸, A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~5 min, 0 B; 5~17 min, 0→15% B; 17~30 min, 15%→25% B); 流速: 2.0 L/min; 柱温: 37 °C; 漂移管温度: 60 °C^[5-7]。

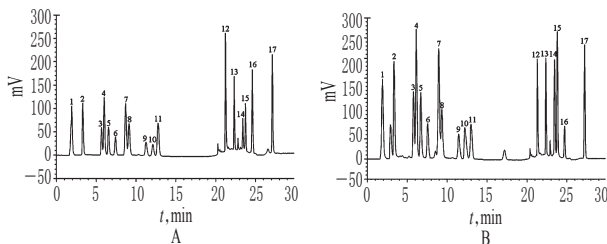
2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取混合氨基酸对照品适量, 置于10 mL量瓶中, 加0.01 mol/L盐酸溶解制成甘氨酸(Gly)、丝氨酸(Ser)、天冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)、苏氨酸(Thr)、谷氨酸(Glu)、胱氨酸(Cys)、赖氨酸(Lys)、组氨酸(His)、精氨酸(Arg)、脯氨酸(Pro)、缬氨酸(Val)、甲硫氨酸(Met)、酪氨酸(Tyr)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe)质量浓度分别为0.187 7、0.262 8、0.332 8、0.222 7、0.297 8、0.367 8、0.300 4、0.365 5、0.388 0、0.435 5、0.287 8、0.293 0、0.373 0、0.453 0、0.328 0、0.328 0、0.413 0 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取药材样品适量, 去除种子后剩余部分干燥粉碎后过40目筛。精密称取粗粉2.0 g, 置于50 mL锥形瓶中, 加40 mL水, 超声提取30 min, 抽滤, 滤液冷却至室温, 加水定容至50 mL, 摇匀后取溶液适量, 经0.45 μm微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 系统适用性试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液、供试品溶液各适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图1。结果, 各待测氨基酸的理论板数最小值为4 488(Tyr); 分离度最小值为1.683(Asp), 各成分基线分离良好。



A. 混合对照品; B. 供试品; 1.Gly; 2.Ser; 3.Asp; 4.Ala; 5.Thr; 6.Glu; 7.Cys; 8.Lys; 9.His; 10.Arg; 11.Pro; 12.Val; 13.Met; 14.Tyr; 15.Ile; 16.Leu; 17.Phe

A.mixed control; B. test sample; 1.Gly; 2.Ser; 3.Asp; 4.Ala; 5.Thr; 6.Glu; 7.Cys; 8.Lys; 9.His; 10.Arg; 11.Pro; 12.Val; 13.Met; 14.Tyr; 15.Ile; 16.Leu; 17.Phe

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液1、2、4、

6、8、10 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以待测氨基酸质量浓度(x, μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程与线性范围, 详见表1。

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equation and linear range

待测氨基酸	回归方程	r	线性范围, mg/mL
Gly	$y=1.622 9x+0.466 1$	0.999 4	0.005 9~0.187 7
Ser	$y=1.577 9x+0.401 0$	0.999 0	0.008 2~0.262 8
Asp	$y=1.978 5x-0.809 6$	0.999 4	0.010 4~0.332 8
Ala	$y=1.172 3x+1.790 0$	0.999 8	0.007 0~0.222 7
Thr	$y=1.599 8x-0.224 9$	0.999 7	0.009 3~0.297 8
Glu	$y=1.711 3x-0.718 3$	0.999 3	0.011 5~0.367 8
Cys	$y=1.669 0x-0.776 5$	0.999 8	0.009 4~0.300 4
Lys	$y=1.775 5x-1.355 8$	0.999 2	0.011 4~0.365 5
His	$y=1.749 3x-1.259 7$	0.999 7	0.012 1~0.388 0
Arg	$y=1.730 7x-1.055 7$	0.999 4	0.013 6~0.435 5
Pro	$y=1.731 6x-0.700 6$	0.999 9	0.009 0~0.287 8
Val	$y=1.391 8x+0.012 0$	0.999 8	0.009 2~0.293 0
Met	$y=1.603 2x-0.834 7$	0.999 6	0.011 7~0.373 0
Tyr	$y=1.557 6x-0.765 0$	0.999 3	0.014 2~0.453 0
Ile	$y=1.749 3x-1.132 0$	0.998 9	0.010 3~0.328 0
Leu	$y=1.742 7x-0.903 7$	0.999 8	0.010 3~0.328 0
Phe	$y=1.752 6x-1.022 7$	0.999 6	0.012 9~0.413 0

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次, 记录峰面积。结果, 各待测氨基酸峰面积的RSD为0.14%~2.0% (n=6), 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液适量, 分别于室温下放置0、4、6、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 各待测氨基酸峰面积的RSD为0.1%~1.9% (n=6), 表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

2.7 重复性试验

精密称取同一批样品适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 共6份, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 各待测氨基酸峰面积的RSD为0.05%~1.8% (n=6), 表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量样品0.2 g, 共6份, 分别加入一定质量的待测氨基酸混合对照品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算加样回收率, 结果见表2。

2.9 样品含量测定

取样品适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,

再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表3。

表2 加样回收率试验结果($n=6$)
Tab 2 Results of recovery test($n=6$)

待测氨基酸	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
Gly	98.1~101.0	99.4	1.11
Ser	98.4~100.5	99.4	0.75
Asp	98.4~101.1	99.8	0.99
Ala	98.1~100.6	99.0	0.94
Thr	98.6~100.7	99.2	0.71
Glu	98.1~100.7	99.6	0.95
Cys	98.0~101.1	99.0	1.15
Lys	98.8~100.8	99.9	0.69
His	98.2~100.8	99.4	0.95
Arg	98.1~101.2	99.1	1.02
Pro	98.6~100.7	99.3	0.69
Val	99.0~100.3	99.6	0.61
Met	98.7~101.1	99.7	0.76
Tyr	98.1~100.9	99.2	0.95
Ile	98.8~100.4	99.5	0.50
Leu	98.2~100.8	100.1	0.87
Phe	98.8~100.6	99.5	0.67

表3 样品含量测定结果($n=3$, mg/g)

Tab 3 Results of contents determination of samples ($n=3$, mg/g)

待测氨基酸	测得值			平均值	RSD, %
	1	2	3		
Gly	3.680	3.783	3.731	3.731	1.37
Ser	6.020	6.090	6.055	6.055	0.58
Asp	4.689	4.789	4.739	4.739	1.06
Ala	5.987	6.057	6.022	6.022	0.58
Thr	3.652	3.752	3.702	3.702	1.35
Glu	5.662	5.732	5.697	5.697	0.61
Cys	1.524	1.514	1.484	1.507	1.38
Lys	4.785	4.825	4.805	4.805	0.42
His	1.705	1.764	1.734	1.734	1.70
Arg	6.820	6.880	6.850	6.850	0.44
Pro	1.578	1.638	1.608	1.608	1.87
Val	4.263	4.363	4.313	4.313	1.16
Met	2.257	2.317	2.287	2.287	1.31
Tyr	2.782	2.842	2.812	2.812	1.07
Ile	4.789	4.892	4.840	4.840	1.06
Leu	6.853	6.923	6.888	6.888	0.51
Phe	3.636	3.696	3.666	3.666	0.82

3 讨论

3.1 流动相的选择

笔者以乙腈为有机相,对水相七氟丁酸中的三氟乙酸的加入量(0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%)进行考察,结果0.7%效果最佳。因此,本试验最终确立流动相为5.0 mmol/L七氟丁酸溶液(含0.7%三氟乙酸)-乙腈。

3.2 检测器参数的选择

蒸发光散射检测器的漂移管温度和气体流速是影响检测结果的重要参数。本研究中笔者考察了漂移管温度40、50、60、70℃,气体流速1.5、2.0、2.5、3.0 L/min

时的信号响应。结果表明,在漂移管温度为60℃时,气体流量速2.0 L/min时,基线平稳,噪音较小,有适宜的响应值。因此,确定本试验的漂移管温度为60℃,气体流速为2.0 L/min。

3.3 氨基酸营养分析

现代研究认为,人体氨基酸摄入不足影响蛋白质营养价值,氨基酸过剩同样也限制蛋白质营养的完全发挥^[8]。世界卫生组织(WHO)和联合国粮农组织(FAO)提出了评价蛋白质营养价值的氨基酸模式^[9]。其指标采用氨基酸比值系数(SRC)表示。本研究结果表明,东北岩高兰果肉中氨基酸总量为71.256 mg/g,其中人体必需氨基酸有Thr、Lys、Val、Met、Ile、Leu、Phe 7种,其总量为30.501 mg/g;非必须氨基酸有Gly、Ser、Asp、Ala、Glu、Cys、His、Arg、Pro、Tyr 10种,其总量为40.755 mg/g。东北岩高兰果肉中人体必需氨基酸占氨基酸总量的相对含量为42.80%,人体必需氨基酸含量与非必须氨基酸含量百分比为74.84%。根据2007年WHO/FAO提出的理想模式,东北岩高兰果肉适宜人体生理作用需要,营养价值高。

综上所述,本方法操作简便,精密度、稳定性、重复性好,可用于东北岩高兰果中17种氨基酸含量的同时测定。

参考文献

- [1] 陈辉.东北岩高兰的分布及保护利用价值[J].内蒙古林业调查设计,2011,34(6):119-121.
- [2] 张洪亮,赵玉杰,高德志.内蒙古大兴安岭林区岩高兰种质资源保护的必要性[J].内蒙古林业调查设计,2010,33(6):92-93.
- [3] 康庭棣.大兴安岭药用资源[M].哈尔滨:哈尔滨出版社,2001:294.
- [4] 李春燕.东北岩高兰对大鼠酒精性脂肪肝的预防作用研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2009.
- [5] 白玉静,高晓燕,张宏桂,等. HPLC-ELSD法测定清开灵注射液中19种氨基酸含量[J].中国中药杂志,2009,34(24):3301-3303.
- [6] 王玉红,申克宇,李鹏,等.高效液相色谱-蒸发光散射检测法直接检测20种未衍生基本氨基酸[J].色谱,2011,29(9):908-911.
- [7] 龙毅,杨武德,袁吉虎.RP-HPLC法同时测定石韦中4种氨基酸的含量[J].中国药房,2015,26(27):3838-3840.
- [8] 朱圣陶,吴坤.蛋白质营养价值评价:氨基酸比值系数法[J].营养学报,1988,10(2):187-190.
- [9] 叶发荣,韩秀梅,肖钧,等.“红阳”猕猴桃果肉氨基酸含量及组成分析[J].中国园艺文摘,2015,31(8):1-3,25.

(收稿日期:2016-04-19 修回日期:2016-06-01)

(编辑:张静)