

柱后衍生阳离子交换色谱法同时测定新疆产贝母中17种氨基酸的含量^Δ

艾则孜·莫合买提^{1,2,3*},沙丽娜³,阿布力米提·伊力¹(1.中国科学院新疆理化技术研究所,乌鲁木齐 830011;2.中国科学院研究生院,北京 100039;3.新疆食品药品检验所,乌鲁木齐 830000)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)12-1680-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.12.27

摘要 目的:建立同时测定新疆产贝母中17种氨基酸含量的方法。方法:采用阳离子交换色谱柱分离17种氨基酸;采用柱后衍生阳离子交换色谱法测定药材中17种氨基酸的含量;色谱柱为LCAK 06/Na柱,流动相A为柠檬酸三钠11.9 g、柠檬酸6 g、苯酚1 g,加水溶解,再加65 mL甲醇和6 mL浓盐酸,加水定容(调pH至3.4),流动相B为柠檬酸三钠11.9 g、氢氧化钠2.8 g、苯酚1 g、硼酸5.0 g,加水溶解并定容(调pH至10.8)(梯度洗脱),流速为0.45 mL/min(A泵)、0.25 mL/min(M泵),检测波长为440 nm(脯氨酸)、570 nm(其余氨基酸),进样量为50 μL。结果:天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸和脯氨酸检测浓度线性范围均为20~400 nmol/mL(除胱氨酸10~200 nmol/mL)(*r*均大于0.989 0);精密度、重复性、稳定性试验的RSD<2.0%;检测限除胱氨酸外(0.08 nmol/mL)其余氨基酸均为0.16 nmol/mL;加样回收率为98.5%~99.5%(RSD为0.06%~0.21%,*n*=6)。结论:该方法操作简便,精密度、稳定性、重复性好,可用于新疆产贝母中氨基酸含量的同时测定。

关键词 贝母;氨基酸;柱后衍生化;阳离子交换色谱法

Simultaneous Determination of Contents of 17 Amino Acids in Fritillariae Pallidiflorae Bulbus Produced in Xinjiang by Post-column Derivatization Cation-exchange Chromatography

Aziz·MOHAMMAT^{1,2,3}, SHA Lina³, Ablumiti·YILI¹(1.Xinjiang Technical Institute of Physics & Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China; 2.Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3.Xinjiang Institute for Food and Drug Control, Urumqi 830000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method of contents determination of 17 amino acids in Fritillariae Pallidiflorae Bulbus produced in Xinjiang. METHODS: Cation-exchange column was used to separate 17 kinds of amino acids; post-column derivatization liquid chromatography was used to determine the contents of amino acids; the column was strong sulfonic acid cation exchange resin LCAK06/Na with mobile phase A (weighing trisodium citrate 11.9 g, citric acid 6 g, phenol 1 g, dissolving by water, then adding 65 mL of methanol and 6 mL of concentrated hydrochloric acid, bringing the volume with tap water, adjusting pH to 3.4), mobile phase B (weighing trisodium citrate 11.9 g, NaOH 2.8 g, phenol 1 g, boric acid 5.0 g, adding water to dissolve, adjusting

数据,经过统计分析,得到各种影响因素与中药材质量变化的相关性,为中药材保质期的确定提出科学依据;且因为中药材的有效成分复杂,不能单一用某种成分来衡量其有效期,应寻找更全面适合中药有效期的确定方法,结合药效评价和临床应用实际,制订出科学合理的中药材保质期。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:221.
- [2] 李红霞,王雪芹,李振国,等.不同产地金银花与山银花主要成分的含量比较[J].中国药房,2011,22(31):2395-2397.
- [3] 朱丹,李琼,张春花,等.不同产地金银花中绿原酸、木犀草苷和总黄酮含量的比较研究[J].广西医科大学学报,

2016,33(1):15-19.

- [4] 牛晓雪,崔旭盛,苏贺,等.高效液相色谱法同时测定忍冬中7种成分[J].色谱,2012,30(2):211-214.
- [5] 欧水平,张文志,陈灵.金银花与山银花抗病毒酚酸类和黄酮类成分的差异性研究[J].中国药房,2015,26(33):4750-4752.
- [6] 彭素琴,刘郁林.不同品种金银花不同花期绿原酸含量比较[J].安徽农业科学,2010,38(14):7296-7298.
- [7] 宋健,张会敏,石俊英.金银花最佳产地加工方法:杀青烘干干燥法[J].中药材,2008,31(4):489-491.
- [8] 胡璇,李卫东,李欧,等.滚筒杀青烘干加工方法对四倍体金银花药材质量的影响[J].中国中药杂志,2012,37(17):2554-2557.
- [9] 薛志平,王金梅,刘杰,等.初均速法预测金银花的有效期[J].中国中药杂志,2012,37(21):3179-3181.

(收稿日期:2016-05-09 修回日期:2016-07-02)

(编辑:张静)

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.U1403201)

* 主任药师。研究方向:药物分析。E-mail:Qabdas@163.com

pH to 10.8), gradient elution, flow rate was 0.45 mL/min for A pump and 0.25 mL/min for M pump, the detection wavelength was 440 nm for proline and 570 nm for the remaining amino acids, the injection volume was 50 μ L. RESULTS: The linear range were 20~400 nmol/mL of aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, glycine, alanine, valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, histidine, lysine, arginine, proline, 10-200 nmol/mL of cystine (r were higher than 0.989 0); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; limits of detection were 0.16 nmol/mL except for cystine (0.08 nmol/mL); recovery was 98.5% -99.5% (RSD was 0.06% -0.21%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple with good precision, stability and reproducibility, and can be used for the simultaneous determination of amino acids in *Fritillariae Pallidiflorae Bulbus* produced in Xinjiang.

KEYWORDS *Fritillariae Pallidiflorae Bulbus*; Amino acids; Post-column derivatization; Cation exchange chromatography

贝母是一种常用的药材,百合科 Liliaceae 贝母属 *Fritillaria* 多年生草本植物,其鳞茎可供药用,具有清热化痰、润肺止咳等功效,可用于肺热咳嗽、胸闷痰黏等症的治疗。在新疆分布量比较丰富的有新疆贝母 *F. walujewii* Rgl^[1-2]、伊犁贝母 *F. kpallidiflora* Schrenk^[3-4]、轮叶贝母 *F. tortifolia*、黄花贝母 *F. verticillata*、大白花贝母 *F. verticillata var. albidiflora*、裕民贝母 *F. yuminensis*、滩贝母 *F. karelinii* 和小花贝母 *F. meleagroides* 等,以上统称为新疆产贝母^[1-4]。贝母主要成分为异甾生物碱、多糖和蛋白质等,其所含的氨基酸具有特殊的生物活性^[5]。目前,对其生物碱成分报道较多,氨基酸的测定则较少见报道。为此,本试验对新疆产贝母中氨基酸进行了研究。

目前,国内外氨基酸分析方法主要分为直接分析法和衍生化间接分析法等两类。其中,衍生化方式又分为柱前、柱上和柱后衍生化等 3 种模式^[6-9]。Sykam 氨基酸分析仪广泛用于检测植物、动物中的氨基酸,主要采用柱后衍生模式,其基本原理与高效液相色谱法(HPLC)相似。同时,该方法对氨基酸分析进行了一系列细节的优化,如氮气保护、惰性管路、在线脱气、洗脱梯度及柱温梯度控制等。氨基酸分析仪使用时,通常利用 Na⁺型或 Li⁺型磺酸基强酸性阳离子交换树脂。由于氨基酸为两性电解质,在酸性条件下,能被树脂表面的活性基团(-SO³⁻)吸附,通过不同 pH 系列的洗脱液使氨基酸逐步洗脱下来,以氨基酸与活性基团亲和力最弱洗脱,即依次为酸性氨基酸、羟基氨基酸和中性氨基酸、芳香族氨基酸和碱性氨基酸等。Na⁺型树脂一般用于蛋白质水解液中的氨基酸分析;Li⁺型树脂一般用于生理体液中的氨基酸分析。本试验采用阳离子交换色谱法分离 17 种氨基酸,并采用柱后衍生化色谱法测定贝母中氨基酸的含量。

1 材料

1.1 仪器

S433D/S433 型氨基酸分析仪,包括 S5200 全自动进样器、S4300 氨基酸反应模块、S2100 梯度泵(德国 Sykam 公司);Delta 320 台式酸度计、AG135 型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);WG2003SBC 型台式电热干燥箱(重庆四大实验仪器有限公司);232 HK 型高速离心机(德国 Hermle 公司)。

1.2 试剂

天冬氨酸(Asp)、苏氨酸(Thr)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、胱氨酸(Cys)、蛋氨酸(Met)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)、组氨酸(His)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、脯氨酸(Pro)混合对照品(批号:07070114-6006001,各氨基酸纯度均>99.2%)、缓冲液 A、缓冲液 B、再生液、样品稀释液均购自德国 Sykam 公司;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

10 批贝母药材(见表 1)经新疆维吾尔自治区食品药品检验所苏来曼·哈力克主任药师鉴定为真品。采集时间为 2014—2015 年。

表 1 贝母药材来源

Tab 1 Sources of *Fritillariae Pallidiflorae Bulbus*

编号	种源	拉丁名	产地
F01	轮叶贝母(野生)	<i>F. verticillata</i> var. <i>jimunaica</i>	阿勒泰吉木乃县
F02	新疆贝母(野生)	<i>F. walujewii</i> Regel	阿尔泰山
F03	阿勒泰贝母(栽培)	<i>F. walujewii</i> Regel	阿尔泰山
F04	伊犁牛贝母(野生)	<i>F. xinyuanensis</i>	新源县那拉提
F05	伊犁牛贝母(栽培)	<i>F. pallidiflora</i>	伊犁特克斯县
F06	伊犁牛贝母(野生)	<i>F. pallidiflora</i>	伊犁特克斯县
F07	裕民贝母(野生)	<i>F. yuminensis</i>	塔城裕民县
F08	裕民贝母(栽培)	<i>F. yuminensis</i>	塔城裕民县
F09	托里贝母(野生)	<i>F. tortifolia</i>	塔城托里县
F10	托里贝母(栽培)	<i>F. tortifolia</i>	塔城托里县

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: LCAK 06/Na 柱;流动相:流动相 A(称取柠檬酸三钠 11.9 g、柠檬酸 6 g、苯酚 1 g,置于 1 L 量瓶中,加适量水溶解,再加 65 mL 甲醇和 6 mL 浓盐酸,加水定容,调 pH 至 3.4)、流动相 B(称取柠檬酸三钠 11.9 g、氢氧化钠 2.8 g、苯酚 1 g、硼酸 5.0 g,置于 1 L 量瓶中,加水溶解并定容,调 pH 至 10.8),梯度洗脱(0~8 min, 100% A; 8~15 min, 100% →85% A; 15~22 min, 85% →80% A; 22~27 min, 80% →75% A; 27~34 min, 75% →0 A; 34~51.1 min, 0 A; 51.1~51.2 min, 0 →100% A; 51.2~65 min, 100% A);流速:0.45 mL/min(A 泵)、0.25 mL/min(M 泵);检测波长:440 nm(Pro)、570 nm(其余氨基酸);进样量:50 μ L。

2.2 溶液的制备

表2 回归方程、线性范围与检测限

Tab 2 Regression equations, linear range and limits of detection

待测氨基酸	回归方程	<i>r</i>	线性范围, nmol/mL	检测限, nmol/mL
Asp	$y=33.339x+521.74$	0.990 4	20~400	0.16
Thr	$y=32.700x+559.97$	0.990 6	20~400	0.16
Ser	$y=35.108x+599.68$	0.990 7	20~400	0.16
Glu	$y=33.856x+568.75$	0.989 9	20~400	0.16
Gly	$y=33.185x+535.62$	0.991 3	20~400	0.16
Ala	$y=34.074x+502.59$	0.991 4	20~400	0.16
Val	$y=33.766x+839.99$	0.991 0	20~400	0.16
Cys	$y=18.661x+652.89$	0.990 6	10~200	0.08
Met	$y=32.975x+557.85$	0.990 8	20~400	0.16
Ile	$y=32.887x+531.88$	0.990 3	20~400	0.16
Leu	$y=33.962x+548.75$	0.990 9	20~400	0.16
Tyr	$y=32.553x+528.70$	0.990 1	20~400	0.16
Phe	$y=32.605x+514.21$	0.991 1	20~400	0.16
His	$y=32.828x+951.75$	0.989 3	20~400	0.16
Lys	$y=35.146x+752.93$	0.991 7	20~400	0.16
Arg	$y=31.519x+1\ 313.1$	0.992 7	20~400	0.16
Pro	$y=8.125\ 4x+75.824$	0.993 0	20~400	0.16

2.5 检测限考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量, 倍比稀释, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 当信噪比为3:1时, 得检测限, 详见表2。

2.6 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, 17个待测氨基酸峰面积的RSD为0.03%~0.53% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:F10)适量, 分别于室温下放置0、2、4、6、8、10、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 17个待测氨基酸峰面积的RSD为0.62%~1.22% ($n=7$), 表明供试品溶液在室温放置12 h内基本稳定。

2.8 重复性试验

精密称取同一批样品(编号:F10)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, 17个待测氨基酸峰面积的RSD为0.07%~1.74% ($n=6$), 表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量样品(编号:F10)适量, 共6份, 分别加入高、低浓度的待测氨基酸对照品溶液, 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3。

2.10 样品含量测定

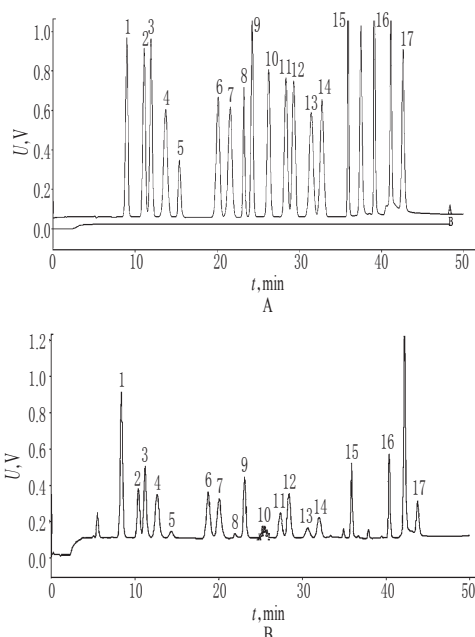
取10批样品各适量, 分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算样品含量, 结果见表4。

2.2.1 混合对照品溶液 精密量取混合氨基酸对照品适量, 加样品稀释液制成Cys、其余16种氨基酸浓度分别为100、200 nmol/L的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 称取样品粉末约1.0 g, 置于水解管中, 加6 mol/L盐酸10 mL, 通氮气封口, 置于110 °C烘箱内水解24 h, 取出放冷至室温, 打开水解管, 以半径为12 cm、3 000 r/min离心10 min, 取上清液1.0 mL, 置于蒸发皿中, 挥尽盐酸, 残渣加少量样品稀释液多次溶解并定容至20 mL, 经微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 即得。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”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。结果表明, 在440、570 nm波长处, 混合对照品溶液和供试品溶液中的氨基酸得到了很好地分离。



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

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

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适量, 加样品稀释液制成浓度为20、40、80、120、200、400 nmol/mL (Cys浓度为10、20、40、60、100、200 nmol/mL)的系列混合对照品溶液。精密量取上述系列混合对照品溶液各10 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以待测氨基酸浓度(x , nmol/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2。

表3 加样回收率试验结果(n=6)
Tab 3 Results of recovery test(n=6)

待测氨基酸	取样量,mg	样品含量,nmol/mL	加入量,nmol/mL		测得量,nmol/mL		加样回收率,%		平均加样回收率,%	RSD,%
			低浓度	高浓度	低浓度	高浓度	低浓度	高浓度		
Asp	25	0.35	0.5	0.75	0.844	1.088	99.3	98.9	99.1	0.20
Thr	25	0.13	0.5	0.75	0.625	0.869	99.3	98.8	99.1	0.12
Ser	25	0.21	0.5	0.75	0.705	0.950	99.3	99.0	99.2	0.15
Glu	25	0.58	0.5	0.75	1.071	1.318	99.2	99.1	99.2	0.12
Gly	25	0.33	0.5	0.75	0.823	1.072	99.2	99.3	99.3	0.10
Ala	25	0.42	0.5	0.75	0.914	1.154	99.3	98.6	99.0	0.15
Val	25	0.24	0.5	0.75	0.736	0.982	99.4	99.2	99.3	0.21
Cys	25	0.07	0.25	0.375	0.318	0.439	99.3	98.6	99.0	0.06
Met	25	0.08	0.5	0.75	0.575	0.821	99.2	98.9	99.1	0.06
Ile	25	0.17	0.5	0.75	0.664	0.909	99.2	98.8	99.0	0.12
Leu	25	0.28	0.5	0.75	0.775	1.021	99.3	99.1	99.2	0.17
Tyr	25	0.09	0.5	0.75	0.587	0.831	99.5	98.9	99.2	0.15
Phe	25	0.17	0.5	0.75	0.665	0.911	99.3	99.0	99.2	0.17
His	25	0.18	0.5	0.75	0.675	0.923	99.3	99.2	99.3	0.15
Lys	25	0.18	0.5	0.75	0.676	0.921	99.4	99.0	99.2	0.15
Arg	25	0.81	0.5	0.75	1.298	1.540	99.1	98.7	98.9	0.06
Pro	25	0.24	0.5	0.75	1.299	0.975	99.2	98.5	98.9	0.10

表4 样品含量测定结果(n=3,%)

Tab 4 Results of contents determination of samples(n=3,%)

编号	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Cys	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Pro	总量
F01	0.497	0.164	0.228	1.058	0.244	0.368	0.261	0.073	0.065	0.197	0.339	0.077	0.176	0.274	0.276	1.372	0.250	5.919
F02	0.621	0.237	0.295	1.348	0.324	0.84	0.344	0.082	0.141	0.263	0.486	0.128	0.310	0.415	0.347	2.160	0.285	8.626
F03	0.824	0.326	0.418	1.410	0.457	0.507	0.373	0.085	0.085	0.294	0.552	0.193	0.353	0.595	0.496	1.745	0.337	9.050
F04	0.623	0.164	0.236	0.671	0.281	0.292	0.272	0.069	0.097	0.221	0.385	0.138	0.255	0.222	0.268	0.626	0.216	5.036
F05	0.564	0.167	0.237	0.835	0.297	0.483	0.276	0.073	0.112	0.228	0.394	0.152	0.376	0.269	0.281	1.586	0.330	6.660
F06	0.422	0.131	0.184	0.617	0.211	0.382	0.222	0.062	0.074	0.165	0.295	0.086	0.222	0.179	0.219	1.206	0.258	4.935
F07	0.313	0.101	0.147	0.509	0.156	0.246	0.195	0.060	0.085	0.142	0.244	0.096	0.229	0.186	0.175	0.704	0.194	3.782
F08	0.535	0.167	0.254	0.958	0.301	0.430	0.259	0.071	0.070	0.209	0.377	0.102	0.253	0.241	0.262	1.230	0.347	6.066
F09	0.521	0.164	0.246	0.913	0.277	0.415	0.261	0.068	0.066	0.205	0.370	0.103	0.236	0.223	0.260	1.222	0.287	5.837
F10	0.375	0.126	0.180	0.677	0.196	0.301	0.225	0.068	0.098	0.174	0.298	0.126	0.230	0.225	0.210	1.131	0.222	4.862

3 讨论

氨基酸分析在医药、食品和动植物代谢产品检测等方面应用非常广泛,国外早已开展了氨基酸HPLC检测方法的研究,国内也进行了这方面的探索。本试验采用柱后衍生阳离子交换色谱法测定氨基酸含量,定量结果比较可靠。

笔者对不同水解温度和时间(110℃水解24h,110℃水解12h,105℃水解24h)进行考察,结果110℃水解24h较完全,样品水解时一定要水解充分,衍生时间足够;并且温度不可过低,否则将造成衍生不完全。

试验中所用的贝母来自不同年份同一采收季节,笔者分别测定了17种氨基酸的含量,其中有3种必须氨基酸的平均含量均大于0.5%,即Arg、Glu和Asp,尤其以Arg含量最高,这也说明贝母具有较高的药用价值。

综上所述,本方法操作简便,精密度高、稳定性、重复性好,可用于新疆产贝母中氨基酸含量的同时测定。

参考文献

[1] 徐新,巴哈尔古丽·黄汗汗.哈萨克药志:一卷[M].北京:民族出版社,2009:172-174.
[2] 刘勇民.维吾尔药志[M].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版

社,1999:56-66.

[3] 何先元.贝母属药材资源分布及性状特点研究[J].中国药房,2009,20(6):479-480.
[4] 郝丽红,汤正姣,于晓南.贝母属6个新疆野生种质调查及其园林应用初探[J].浙江农业学报,2014,26(3):661-666.
[5] 王志军,高文远,于琳,等.百合科贝母属药用植物分类研究进展[J].中国中药杂志,2007,32(16):1609-1614.
[6] 王秀中,王清清,宋海峰.衍生化技术在氨基酸分析中的应用进展[J].药物分析杂志,2010,30(6):1162-1165.
[7] 艾则孜·莫合买提,沙丽娜,巴哈尔古丽·黄汗汗,等.柱后衍生阳离子交换色谱法测定桦菌芝中氨基酸的含量[J].药物分析杂志,2012,32(11):1972-1974.
[8] 崔淑芬,许柏球,王小如.柱前衍生RP-HPLC法测定泽泻中氨基酸的含量[J].中草药,2004,35(8):867-867.
[9] 鄢丹,李果.反相高效液相色谱法直接测定水蛭中14种未衍生氨基酸的含量[J].分析化学研究简报,2006,34(5):705-708.

(收稿日期:2016-07-18 修回日期:2016-09-02)
(编辑:张 静)