

## HPLC 测定不同海拔小叶金露梅 17 种氨基酸含量

陈晨<sup>1,2</sup>, 赵晓辉<sup>1</sup>, 文怀秀<sup>1</sup>, 陶燕铎<sup>1</sup>, 邵赞<sup>1\*</sup>, 梅丽娟<sup>1</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008; 2. 中国科学院研究生院 北京 100049)

**摘要:**目的: 建立高效液相色谱法测定小叶金露梅中 17 种氨基酸含量的方法。方法: 采用 N,N-二硝基氟苯柱前衍生氨基酸后测定; 色谱柱为 Phenomenex Gemini 5 $\mu$  C<sub>18</sub>, 流动相为醋酸钠 (pH=6.40) 和 50% 乙腈, 采用梯度洗脱, 检测波长为 360 nm, 外标法计算含量。结果: 17 种氨基酸线性关系、精密度、稳定性、重复性良好, 加样回收率为 97.4%~102.8% (RSD 为 1.21%~2.5%)。各海拔的氨基酸总量范围是 10%~14.79%, 在不同海拔小叶金露梅中氨基酸平均质量分数顺序为亮氨酸>天冬氨酸>异亮氨酸>组氨酸>丝氨酸>精氨酸>丙氨酸>苯丙氨酸>缬氨酸>谷氨酸>脯氨酸>甘氨酸>赖氨酸。小叶金露梅含有 7 种必需氨基酸, 它们的含量均大于 48%。本方法简便、准确, 为小叶金露梅药理提供理论依据。

**关键词:** 小叶金露梅; 氨基酸; HPLC; 衍生化

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1006-8376(2011)01-0071-04

小叶金露梅 (*Potentilla parvifolia* Fisch.), 为蔷薇科萎陵菜属落叶灌木。小叶金露梅灌丛是我国高寒地区的一种典型性落叶灌丛<sup>[1]</sup>。此外, 小叶金露梅是一种常见的藏药——班玛, 《晶珠本草》记载班玛主治消化不良和肺病, 现代医药研究表明小叶金露梅的叶和花可入药, 微苦、寒性, 具有清暑热、益脑清心、调经、健胃、固齿、治疗妇女病等功能<sup>[2]</sup>。

近年来氨基酸高效液相分析得到了较大的发展, 柱前衍生化具有设备简单、方法通用、稳定性好等特点, 在氨基酸分析中占有重要地位<sup>[35]</sup>。本文采用 N,N-二硝基氟苯作为衍生化试剂, 分析不同海拔小叶金露梅的氨基酸, 探讨了小叶金露梅氨基酸与海拔的关系。

### 1 实验材料与仪器

#### 1.1 实验仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪 (四元梯度泵, DAD 检测器, Agilent 1200 色谱工作站); UPT-II-10 优普超纯水机 (成都超纯科技有限公司); N-1001 旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司); AG204 电子分析天平 (梅特勒公司)。

#### 1.2 实验材料

小叶金露梅药材: 共 11 批, 分别于 2010 年 8 月采自青海省境内, 经中国科学院西北高原生物研究所梅丽娟高级工程师鉴定为小叶金露梅 (*Potentilla*

*parvifolia* Fisch.), 全株清洗后用去离子水冲洗, 然后自然阴干, 粉碎后过 40 目筛备用。

#### 1.3 实验试剂

17 种氨基酸对照品 (Sigma 公司, 纯度 $\geq$ 98%), 甲醇 (色谱纯, 山东禹王试剂公司); 蒸馏水; 超纯水; 磷酸 (优级纯, 天津兴华化学试剂厂); 盐酸 (分析纯, 白银良友化学试剂有限公司), 其余试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件

色谱柱: Phenomenex Gemini 5 $\mu$  C<sub>18</sub> column (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m), 流动相 A: 0.05 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 醋酸钠 (pH=6.40); 流动相 B: 50% 乙腈, 紫外检测波长: 360 nm, 流速: 1 mL/min, 进样量 10  $\mu$ L, 柱温: 37  $^{\circ}$ C, 梯度洗脱: 0 min (74% A), 5 min (65% A), 15 min (60% A), 20 min (45% A), 25 min (35% A), 30 min (25% A), 35 min (2% A), 40 min (2% A), 对照品及样品色谱图分别见图 1。

#### 2.2 样品溶液制备

准确称取 20 mg 小叶金露梅样品放置于安瓿瓶中, 再移入 6 mL 6 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的盐酸, 充氮气, 迅速将安瓿瓶在酒精灯下封口, 然后置于 105 $^{\circ}$ C 恒温干燥箱中水解 24 h 取出后过滤, 然后旋转蒸发至干, 再用 0.02 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的盐酸复溶。加入 N,N-二硝基氟苯于 60 $^{\circ}$ C 进行衍生处理 1 h。处理完后 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤以备液相色谱分析<sup>[6-8]</sup>。

#### 2.3 对照品溶液制备

分别精密称取经五氧化二磷干燥过夜的 17 种

收稿日期: 2010-11-26

作者简介: 陈晨, 男 (1984-) 硕士研究生, E-mail: chenchen19841014@163.com

\* 通讯作者, E-mail: shaoyun11@126.com

基金项目: 国家科技支撑计划项目 2007BAI45B00

氨基酸对照品 0.25 g 于烧杯中,加入每毫升 0.05 mol 盐酸溶解,定容于 25 mL 的容量瓶后备用。

2.4 线性关系考察

分别精密量取对照品溶液 0.05 mL、0.10 mL、0.15 mL、0.20 mL、0.25 mL 于 25 mL 的容量瓶中,

加入甲醇定容,既得不同浓度的对照品混合液。各进样 10 μL 进行分析,以标准品峰面积对浓度进行线性回归,得到 17 种氨基酸对照品的回归方程和相关关系,见表 1。

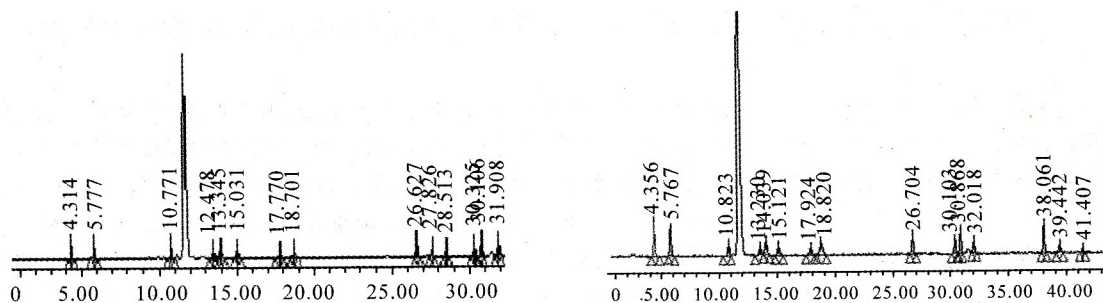


图 1 对照品与供试品 HPLC 图

表 1 17 种氨基酸的线性范围

氨基酸种类	线性方程	相关系数
天冬氨酸	$Y = 2.8735X + 5.0987$	0.9999
丝氨酸	$Y = 1.2748X + 2.1315$	0.9999
谷氨酸	$Y = 1.5873X + 4.5736$	0.9999
甘氨酸	$Y = 1.7822X - 5.9453$	0.9999
组氨酸	$Y = 3.8673X + 5.0007$	0.9999
精氨酸	$Y = 1.8795X + 6.7543$	0.9999
苏氨酸	$Y = 2.4326X + 5.6428$	0.9999
丙氨酸	$Y = 1.5478X + 9.8748$	0.9999
脯氨酸	$Y = 2.5789X + 3.5823$	0.9999
半胱氨酸	$Y = 1.2215X + 2.3784$	0.9999
酪氨酸	$Y = 2.4286X + 3.3009$	0.9999
缬氨酸	$Y = 2.4413X + 2.7790$	0.9999
甲硫氨酸	$Y = 2.2219X + 2.4789$	0.9999
赖氨酸	$Y = 1.6235X + 5.2379$	0.9999
异亮氨酸	$Y = 1.5875X + 4.1439$	0.9999
亮氨酸	$Y = 1.3574X + 2.2457$	0.9999
苯丙氨酸	$Y = 3.4773X + 3.1227$	0.9999

2.5 稳定性实验

取样品待测液分别在 0、3、6、9、12 h 后在本文

2.1 项色谱条件下测定,结果表明 17 种氨基酸峰面积的 RSD 为 1.1% ~ 1.9%,表明样品在 12 h 内稳定。

2.6 精密度实验

精密取样品待测液溶液,在本文 2.1 项色谱条件下连续进样 5 次,结果表明 17 种氨基酸峰面积的 RSD 为 0.8% ~ 1.7%,实验表明该方法精密度良好。

2.7 重复性实验

精密取样品待测液溶液 5 份,在本文 2.1 项色谱条件下测定,结果表明 17 种氨基酸峰面积的 RSD 为 1.2% ~ 1.9%,实验表明该方法重复性良好。

2.8 回收率测定

精密取已知含量的样品 5 份,加入适量的混合对照品溶液,混合均匀后,按照 2.1 项下色谱条件测定样品溶液中 17 种氨基酸的含量,并计算出加样回收率,由表 2 可知样品的加样回收率为 97.4% ~ 102.8%,RSD 为 1.21% ~ 2.5%。

表 2 17 种氨基酸的加样回收率

氨基酸	加入量	测得量	平均回收率	RSD/%	氨基酸	加入量	测得量	平均回收率	RSD/%
天冬氨酸	1.54	2.48	98.4	1.21	脯氨酸	0.60	1.52	97.8	2.29
丝氨酸	0.99	1.87	99.1	1.42	缬氨酸	0.69	1.78	98.5	2.19
谷氨酸	0.68	1.57	97.8	1.87	甲硫氨酸	1.10	2.01	101.2	2.50
甘氨酸	0.38	1.46	97.4	1.65	赖氨酸	0.18	1.01	101.6	1.26
组氨酸	0.74	1.82	102.1	2.50	异亮氨酸	1.02	2.09	102.8	1.01
精氨酸	0.85	1.96	101.4	1.66	亮氨酸	2.69	3.57	99.0	1.78
苏氨酸	1.06	2.20	98.5	2.31	苯丙氨酸	0.86	1.79	98.6	2.21
丙氨酸	0.95	2.07	102.3	1.54					

## 2.9 样品含量测定

分别精密吸取 11 批样品待测液各 10  $\mu\text{L}$ , 注入 HPLC 中, 按本文 2.1 项色谱条件下测定, 外标法计

算样品溶液中 17 种氨基酸的质量分数, 每个样品重复 3 次取平均值。结果见表 3。

表 3 样品测定结果

地点	海拔 (m)	质量分数/%														
		天冬氨酸	丝氨酸	谷氨酸	甘氨酸	组氨酸	精氨酸	苏氨酸	丙氨酸	脯氨酸	缬氨酸	甲硫氨酸	赖氨酸	异亮氨酸	亮氨酸	苯丙氨酸
都兰	3500	1.49	1.15	0.87	0.46	1.37	0.96	0.92	0.80	0.58	0.79	1.14	0.32	1.38	1.88	0.63
莫勒	3350	1.19	1.00	0.69	0.31	1.25	0.81	0.77	0.71	0.49	0.70	1.11	0.33	1.20	1.47	0.68
祁连县城	2600	1.54	0.99	0.68	0.38	0.74	0.85	1.06	0.95	0.60	0.69	1.10	0.18	1.02	2.69	0.86
橡皮山	3300	1.04	0.75	0.68	0.34	0.65	0.76	1.06	0.71	0.60	0.66	0.90	0.30	0.89	2.80	0.50
冰沟	3300	1.04	0.84	0.60	0.35	1.06	0.67	0.63	0.76	0.49	0.59	0.99	0.21	1.10	2.58	0.53
祁连鹿厂	2900	1.20	0.93	0.66	0.37	1.53	0.97	1.03	0.90	0.58	0.69	1.12	0.25	1.20	2.50	0.63
互助	3700	1.17	1.01	0.85	0.40	1.41	0.87	0.74	0.72	0.53	0.53	1.16	0.28	1.34	3.07	0.71
旺尕秀	3700	1.35	1.04	0.73	0.44	1.47	0.88	0.95	0.86	0.62	0.78	1.20	0.30	1.31	1.94	0.82
昆仑山	3800	0.90	0.88	0.45	0.44	0.37	0.57	1.19	0.53	0.49	0.58	0.68	0.09	0.72	3.09	0.62
冰大阪	4000	1.37	0.89	0.55	0.35	1.14	0.86	1.05	0.76	0.56	0.79	1.04	0.22	0.92	1.74	0.70
舟群乡	3400	0.83	0.69	0.35	0.28	0.71	0.63	0.54	0.49	0.38	0.43	0.72	0.15	0.90	2.43	0.59

## 3 结果与分析

本文测定不同海拔小叶金露梅 17 种氨基酸的质量分数, 其中半胱氨酸和酪氨酸均未检测出。各海拔的氨基酸总量范围是 10% ~ 14.79%, 祁连鹿厂的氨基酸总量最高 14.79%, 冰大阪的总质量分数最低为 10.14%, 其各海拔的氨基酸及总量与海拔相关系数见表 4, 由表 4 可知, 缬氨酸、苯丙氨酸与海拔呈现正相关, 其他氨基酸与海拔呈现负相关。

表 4 氨基酸质量分数与海拔的线性相关系数

氨基酸种类	相关系数
天冬氨酸	-0.0016
丝氨酸	-0.0233
谷氨酸	-0.5620
甘氨酸	-0.0086
组氨酸	-0.0935
精氨酸	-0.2086
苏氨酸	-0.0911
丙氨酸	-0.2517
脯氨酸	-0.3941
缬氨酸	0.0066
甲硫氨酸	-0.2678
赖氨酸	-0.5038
异亮氨酸	-0.1993
亮氨酸	-0.3861
苯丙氨酸	0.2886
总量	-0.3586

氨酸 > 精氨酸 > 丙氨酸 > 苯丙氨酸 > 缬氨酸 > 谷氨酸 > 脯氨酸 > 甘氨酸 > 赖氨酸, 各个氨基酸的质量分数范围见表 5。

表 5 100 克不同海拔小叶金露梅氨基酸的质量分数范围

氨基酸种类	质量分数范围/g	氨基酸种类	质量分数范围/g
天冬氨酸	0.83 ~ 1.54	丝氨酸	0.68 ~ 1.14
谷氨酸	0.35 ~ 0.87	甘氨酸	0.28 ~ 0.45
组氨酸	0.37 ~ 1.53	精氨酸	0.58 ~ 0.95
苏氨酸	0.54 ~ 1.18	丙氨酸	0.48 ~ 0.95
脯氨酸	0.38 ~ 0.62	缬氨酸	0.42 ~ 0.78
甲硫氨酸	0.67 ~ 1.16	赖氨酸	0.09 ~ 0.33
异亮氨酸	0.72 ~ 1.38	亮氨酸	1.47 ~ 3.09
苯丙氨酸	0.49 ~ 0.86		

从小叶金露梅中氨基酸含量的最大值可以看出, 小叶金露梅中氨基酸的最大值分别是不同海拔地区的。这些差异可能与小叶金露梅的地理位置、土壤气候环境有关, 使小叶金露梅在不同海拔表现出不同的氨基酸的最大含量。

小叶金露梅含有 7 种必需氨基酸, 它们的质量分数均大于 48%, 其中在海拔为 2900 m 的祁连鹿厂必需氨基酸的质量分数高达 60%, 最新研究表明必需氨基酸与人体衰老有关<sup>[9]</sup>, 这为小叶金露梅的药理提供了理论基础。

## 4 结论

采用衍生化测定氨基酸含量的方法稳定性好,

在不同海拔小叶金露梅中氨基酸平均质量分数顺序为亮氨酸 > 天冬氨酸 > 异亮氨酸 > 组氨酸 > 丝

操作简便,精密度好。本实验对小叶金露梅氨基酸的测定为进一步研究藏药的作用机理、开发新药资源、研发新药,提供了进一步的信息和基础。

参考文献

[1] 中国科学院西北高原生物研究所,青海植物志,青海人民出版社. 1987. 160

[2] 杨永昌,藏药志[M], 青海人民出版社,1991

[3] 陈娅兰,等,十八种氨基酸注射液的 HPLC,2,4-二硝基氟苯柱前衍生化法含量测定[J],物分析杂志, 1990. 10(3):149

[4] 王玲,陈刚,周秀清,等. 猪脑蛋白水解物注射液的多 种氨基酸含量分析[J],长春中医学院学报,2002,18

(3):48

[5] 李东,孙家义,2,4-二硝基氟苯柱前衍生高效液相色谱法测定 18 种氨基酸[J],化学分析计量,2004,13 (1):18~20。

[6] 何轶,陈亚飞. HPLC 法测定板蓝根中主要氨基酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25 (3) : 274 ~277.

[7] 李惠芬,骆达,张庆伟,等. 柱前衍生化 RP - HPLC 法分析龟板中氨基酸[J]. 中草药, 2005, 36(3) : 1637 ~1639.

[8] 杨昭鹏,曾文珊,杨晓晖,等. 脑蛋白水解物注射液的质量标准(11)[J],药物分析杂志,2003,23(2):106.

[9] 张梅红,王基伟. 氨基酸药用现状[J]. 中国生化药物 杂志,2002,23(4):214

### Determining Content of Amino Acids of *Potentilla parvifolia* Fisch. of Different Altitudes

CHEN Chen<sup>1,2</sup>, ZHAO Xiao - hui<sup>1</sup>, WEN Huai - xiu<sup>1,2</sup>, SHAO Yun<sup>1,\*</sup>,  
TAO Yan - duo<sup>1</sup>, MEI Li - juan<sup>1</sup>

(1 Northwest Institute of Plateau Biology Chinese Academy of Sciences, Xining 810008;  
2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** To determine content of amino acids in *Potentilla parvifolia* Fisch., NN - 2,4dinitro - fluorobenzene was undergone precolumn derivatization and the amino acids was determined by HPLC with Phenomenex Gemini 5μ C18 column, the mobile phase was composed of external reference method. The linear ranges, precision, stability and repeatability were good. Recovery and RSD of the method were 97.4% ~ 102.8% and 1.21% ~ 2.5% respectively. The total content of amino acids was 10% ~ 14.79%. The order of the amino acid contents was Leu > Asp > Ile > His > Ser > Arg > Ala > Phe > Val > Glu > Pro > Gly > Lys.

**Key words:** *Potentilla parvifolia* Fisch.; amino acid; HPLC; derivatization