

高效液相色谱-电喷雾/质谱法 测定青稞幼苗提取物氨基酸^①

王萍^{a,b} 陈涛^{a,b} 杜玉枝^a 沈裕虎^a 李玉林^{②a}

^a 中国科学院西北高原生物研究所 西宁市新宁路 23 号 810008)

^b 中国科学院研究生院 北京市石景山区玉泉路 19 号甲 100049)

摘要 以 2-[2-(7H-二苯并[a, g]咪唑-乙氧基)-乙基] 氯甲酸酯 (DBCEC-Cl) 作为柱前衍生试剂, 采用高效液相色谱-电喷雾/质谱法 (HPLC-ESI/MS) 对青稞幼苗提取物中的氨基酸进行了测定。结果表明, 青稞幼苗提取物中含有 13 种氨基酸, 总含量为 81.6 mg/g, 其中有人体自身不能合成的 6 种重要氨基酸 [赖氨酸 (Lys)、蛋氨酸 (Met)、亮氨酸 (Leu)、异亮氨酸 (Ile)、苏氨酸 (Thr) 和缬氨酸 (Val)], 含量达 41.8 mg/g, 占总氨基酸的 51.2%。该方法灵敏、可靠、重现性好, 是一种理想的全谱氨基酸分析方法。

关键词 青稞; 氨基酸; 高效液相色谱-电喷雾/质谱法; 2-[2-(7H-二苯并[a, g]咪唑-乙氧基)-乙基] 氯甲酸酯

中图分类号: O657.63

文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2012)03-1351-05

1 引言

青稞 (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.) 属于禾本科大麦属作物, 是藏族人民最主要的粮食作物, 主要分布在我国西藏、青海等高海拔寒冷地区。近年来, 青稞丰富的营养和保健作用得到现代医学的证实^[1], 其叶的药用价值很早就被开发出来, 《本草纲目》中就有“麦苗, 解蛊毒, 煮汁滤服。除烦闷, 解时疾狂热, 退胸膈热, 利小肠, 作斋食, 甚益颜色…”的记载。研究表明青稞叶营养丰富, 含有丰富的黄酮、氨基酸等营养物质, 具有减肥、降脂、抗氧化、抵御酒精性胃炎出血、增强耐力等医疗保健作用^[2]。

氨基酸是构成生命有机体蛋白质的基本物质单元, 也是生命代谢过程中不可缺少的营养物质。目前, 氨基酸的测定多采用离子交换色谱法 (IEC)、高效液相色谱法 (HPLC) 和气相色谱法 (GC) 等方法。这些方法多采用紫外^[3]、荧光^[4,5]、氢火焰离子化^[6]和化学发光检测^[7]。多数氨基酸仅表现出弱的紫外吸收, 直接紫外检测难以获得满意的灵敏度, 因此进行化学衍生是提高该类化合物检测灵敏度的有效途径^[8,9]。2-[2-(7H-二苯并[a, g]咪唑-乙氧基)-乙基] 氯甲酸酯对氨基酸的标记不仅灵敏, 同时由于分子侧链上引入一个强电负性氧原子的二聚乙二醇醚链后, 表现出强的质谱灵敏度, 同时试剂与氨基酸的标记产率高、产物稳定, 已成功用于黄金蝉若虫体蛋白水解液的荧光标记及电喷雾/质谱鉴定^[10]。本研究以 2-[2-(7H-二苯并[a, g]咪唑-乙氧基)-乙基] 氯甲酸酯作为柱前衍生试剂, 采用高效液相色谱-电喷雾/质谱法 (HPLC-ESI/MS) 对青稞幼苗提取物中的氨基酸进行了分析, 结果表明本方法灵敏、可靠、重现性好, 可用于青稞幼苗提取物中的氨基酸测定。

① 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-EW-J-26)

② 联系人, 手机: (0) 13519719519; 电话: (0971) 6143857; E-mail: liyulin@nwipb.cas.cn

作者简介: 王萍 (1987-), 女, 山东省枣庄市人, 在读硕士, 主要从事天然产物化学分析检测工作。

收稿日期: 2011-07-27; 接受日期: 2011-09-04

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Agilent 1100 型离子阱液相色谱-质谱联用仪[配备四元梯度泵、在线真空脱气机、荧光检测器、自动进样器和电喷雾离子源(ESI), 美国 Agilent 公司]; Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(4.6mm×200mm, 5 μ m, 大连依利特公司); Labostar 7 TWF UV 低有机物型超纯水机(上海博钦环保科技有限公司)。

20 种 1.0mmol/L 氨基酸混合标样[批号: GBW(E) 100062, 美国 Sigma 公司]; 乙腈(色谱纯, 中国禹王试剂公司); 盐酸、甲酸、氨水等试剂(分析纯, 山东省禹王实业有限公司禹城化工厂); 2-[2-(7H-二苯并[a, g] 咪唑)-乙氧基]-乙基氯甲酸酯(DBCEC-Cl) 的合成见文献^[10]。实验用水为超纯水。

2.2 材料与方法

2.2.1 实验材料

本实验所用青稞幼苗样品采自青海省湟源县日月乡, 品种为肚里黄, 青稞幼苗提取物为实验室自制^[11]。

2.2.2 标准溶液的配制及衍生

称取定量氨基酸标准品, 用少量 6mol/L 的盐酸溶解并用 6mol/L 的氢氧化钠溶液调至中性, 用 pH 9.0 的硼酸钠缓冲液稀释配成 1.0×10^{-2} mol/L 的标准溶液, 并进行标准品溶液衍生^[10]。低浓度氨基酸标准液(1.0×10^{-4} mol/L) 用 pH 9.0 的硼酸缓冲液稀释而成。

2.2.3 样品溶液的制备

准确称取青稞幼苗提取物粉末 50mg, 置于 2mL 安培瓶中, 加入 6mol/L 的盐酸 1mL, 密封后 110℃ 水解 24h, 冷却后经氮气吹干, 用 3mL pH9.0 的硼酸钠缓冲液溶解, 相应浓度为 16700 ng/ μ L, 衍生过程同 2.2.2 节。低浓度的水解液用 pH 9.0 的硼酸钠缓冲液稀释而成, 然后放入 -20℃ 冰箱内储存待用。

2.2.4 色谱与质谱条件

流动相 A: 30% 的乙腈(含有 30mmol/L 的甲酸, 用 17% 的氨水调至 pH= 3.6), 流动相 B: 50% 的乙腈(含有 30mmol/L 的甲酸/氨水缓冲液, pH= 3.6), 流动相 C: 95% 的乙腈。流动相流速 1.0mL/min, 进样量 10 μ L, 柱温 35℃。荧光激发和发射波长分别为: λ_{ex} = 300nm 和 λ_{em} = 395nm。梯度洗脱程序见表 1。

电喷雾离子源(ESI), 正离子模式, 喷雾压力 413kPa, 干燥气流量为 5L/min, 干燥气温度 350℃, 毛细管电压 3.5kV, 电晕电流 4000nA。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	A(%)	B(%)	C(%)
0	30	70	0
15	0	100	0
20	0	95	5
30	0	95	5
40	0	65	35
45	0	35	65
55	0	30	70
60	0	0	100

3 结果与讨论

3.1 标准品的色谱分离及质谱鉴定

20 种氨基酸的色谱分离见图 1。各氨基酸衍生物的质谱数据见表 2。

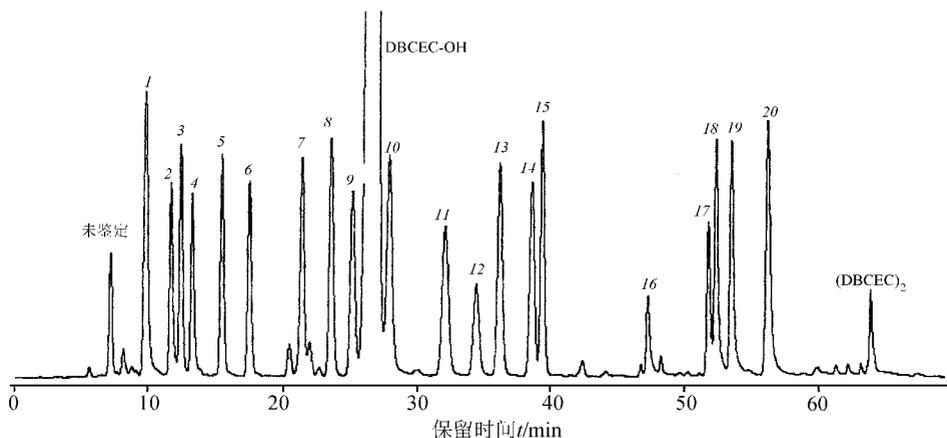


图 1 标准氨基酸的色谱图

1—精氨酸(Arg); 2—天冬氨酸(Asp); 3—丝氨酸(Ser); 4—谷氨酸(Glu); 5—苏氨酸(Thr); 6—甘氨酸(Gly); 7—丙氨酸(Ala); 8—四氨基丁酸(GABA); 9—脯氨酸(Pro); 10—蛋氨酸(Met); 11—缬氨酸(Val); 12—色氨酸(Try); 13—苯丙氨酸(Phe); 14—异亮氨酸(Ile); 15—亮氨酸(Leu); 16—胱氨酸((Cys)₂); 17—组氨酸(His); 18—鸟氨酸(Orn); 19—赖氨酸(Lys); 20—酪氨酸(Tyr); DBCEC-OH—2-(7H-二苯并[a,g]咪唑-乙氧基)-乙醇; (DBCEC)₂—2-[2-(7H-二苯并[a,g]咪唑-乙氧基)-乙基]碳酸酯。

3.2 线性回归方程、检出限、保留时间和峰面积的重现性

在 24.4 fmol—50 pmol 范围内, 对氨基酸衍生物重复测定 3 次取平均值, 依据峰面积和进样量进行线性回归, 所得各氨基酸衍生物的回归方程、线性相关系数和检出限见表 2。由表 2 知, 线性相关系数均大于 0.9992, 检出限在 2.60—24.30 fmol 范围内(信噪比 RSN=3)。对 25 pmol 氨基酸衍生物平行分析 6 次, 保留时间和峰面积的重现性见表 2, 保留时间的相对标准偏差小于 0.045%, 峰面积的相对标准偏差小于 1.46%。

表 2 氨基酸衍生物的回归方程、线性相关系数、检出限和质谱数据
以及保留时间和峰面积的重现性

氨基酸	线性回归方程 $y = Ax + B$	线性回归系数 (r)	检出限 (fmol)	质荷比 (m/z)	保留时间 (min)	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)
Arg	$y = 78.96x - 67.88$	0.9995	9.79	556.8	9.853	0.006	1.21
Asp	$y = 38.58x - 43.19$	0.9994	7.72	515.6	11.762	0.012	1.23
Ser	$y = 57.71x - 11.64$	0.9999	11.90	487.6	12.576	0.011	1.31
Gh	$y = 39.62x - 42.88$	0.9994	2.60	529.6	13.758	0.013	1.28
Thr	$y = 59.90x + 1.55$	0.9997	6.91	501.7	15.486	0.005	1.16
Gly	$y = 57.09x + 7.58$	0.9998	24.30	457.6	17.823	0.007	1.23
Ala	$y = 66.82x + 7.32$	0.9999	5.25	471.6	21.894	0.005	1.12
GABA	$y = 78.66x + 23.57$	0.9994	3.12	485.5	23.792	0.007	1.18
Pro	$y = 62.05x + 9.29$	0.9998	3.37	497.5	25.025	0.005	1.03
Met	$y = 9.766x - 11.03$	0.9995	3.05	531.3	28.031	0.004	1.25
Val	$y = 77.58x + 15.38$	0.9998	4.86	499.6	32.026	0.006	1.03
Try	$y = 50.30x + 0.26$	0.9999	4.53	585.9	34.049	0.006	0.79
Phe	$y = 83.02x + 6.98$	0.9999	8.68	547.5	36.235	0.006	0.97
Ile	$y = 69.06x + 13.46$	0.9998	7.29	513.5	38.684	0.006	1.23
Leu	$y = 73.62x + 14.08$	0.9997	11.10	513.5	39.589	0.005	1.05
(Cys) ₂	$y = 21.56x - 13.88$	0.9993	16.25	1004.0	47.216	0.044	1.37
His	$y = 40.72x - 22.83$	0.9996	16.60	918.7	52.012	0.016	1.42
Orn	$y = 64.40x - 18.19$	0.9996	4.23	894.8	52.515	0.013	1.32
Lys	$y = 85.28x - 8.20$	0.9997	3.75	908.2	53.893	0.005	1.35
Tyr	$y = 101.52x + 23.40$	0.9996	2.98	944.6	56.145	0.007	1.45

3.3 样品的氨基酸分析及结果

青稞幼苗提取物样品中氨基酸的分离见图 2, 质谱数据显示在对应保留时间上与标准品给出相同的质荷比, 各氨基酸含量见表 3。结果表明, 样品中明显含有至少 13 种氨基酸, 含量达 81.6 mg/g; 人体不能合成的 8 种氨基酸 (Lys, Met, Leu, Ile, Thr, Val, Try 和 Phe) 中, 青稞幼苗提取物样品可提供其中的 6 种 (Lys, Met, Leu, Ile, Thr 和 Val), 含量达 41.8 mg/g, 占总氨基酸的 51.2%。其中 GABA 别名: γ -氨基丁酸。

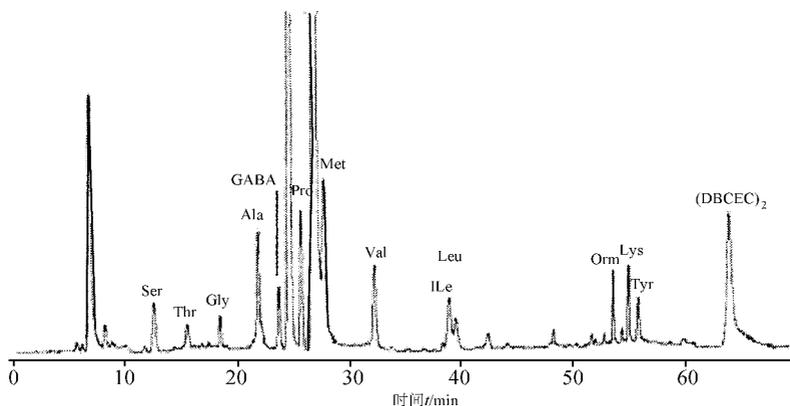


图 2 青稞幼苗提取物中氨基酸的色谱图

GABA—— γ -氨基丁酸; (DBCEC)₂——2-[2-(7H-二苯并[a, g] 咪唑-乙氧基)-乙基] 碳酸酯。

表 3 青稞幼苗提取物中氨基酸的含量

(mg/g)

氨基酸	含量	氨基酸	含量
Arg	0	Val	7.6
Asp	0	Try	0
Ser	5.7	Phe	No
Glu	0	Ile	5.5
Thr	1.5	Leu	2.9
Gly	1.8	(Cys) ₂	0
Ala	11.0	His	0
GABA	3.2	Orn	5.3
Pro	8.6	Lys	5.9
Met	18.4	Tyr	4.2

3.4 讨论

3.4.1 流动相 pH 值对分析的影响

在大多数的氨基酸反相分离研究中, 常采用硼酸或者磷酸缓冲液来调节流动相的 pH 值^[12, 13]。本实验为减少金属盐对质谱离子室的污染, 采用甲酸/氨水缓冲液控制流动相 A 和 B 的 pH 值, 并在 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱上考察了流动相 A 的 pH 值对分离度的影响。结果表明, 当流动相 A 的 pH 值为 3.7 时, 较难分离的 Asp 和 Ser 物质对基本实现基线分离。当流动相 A 的 pH 值小于 3.5 或大于 3.8 时, Asp 和 Ser, DBCEC-OH 和 Met, Ile 和 Leu 3 个物质对产生部分共洗脱现象。实验结果也表明, 流动相 pH 的改变, 对高疏水性的 His、Orn、Lys 和 Tyr 4 种氨基酸衍生物的分离度无明显改变, 故实验中选择流动相的 pH 值为 3.7。

3.4.2 对样品中氨基酸的分析

青稞幼苗提取物中含有 13 种氨基酸, 含量达 81.6 mg/g, 其中人体不能合成的 8 种氨基酸

(Lys, Met, Leu, Ile, Thr, Val, Try 和 Phe) 中, 青稞幼苗提取物样品可提供其中的 6 种 (Lys, Met, Leu, Ile, Thr 和 Val), 含量达 41.8 mg/g, 占总氨基酸的 51.2%, 是高营养的食品补剂之一, 具有广阔的市场前景。

4 结论

本法衍生反应在 5min 内完成, 20 种氨基酸在 60min 内出峰完全且分离良好, 溶剂峰不影响检测。本分析方法灵敏、可靠、重现性好, 是一种理想的全谱氨基酸分析方法。

参考文献

- [1] 迟晓峰, 董琦, 胡凤祖. 微波消解 ICP-AES 测定青稞中 17 种微量元素[J]. 光谱实验室, 2010, 27(6): 2177—2180.
- [2] 许钢, 张虹. 大麦麦叶中黄酮类化合物清除自由基动态研究[J]. 营养学报, 2003, 25(4): 401—404.
- [3] 商振华, 于亿年, 郭为等. 高效液相色谱法(硝基氟苯柱前衍生化和紫外吸收)测定猪血蛋白氨基酸组成[J]. 色谱, 1993, 11(4): 236—238.
- [4] 邹欣平, 周兴旺, 袁汇娟等. 两亲荧光探针与氨基酸的荧光光谱[J]. 光谱实验室, 2007, 24(3): 380—383.
- [5] Roth M. Fluorescence Reaction for Amino Acids[J]. *Analytical Chemistry*, 1971, 43(7): 880—882.
- [6] Kirkman M A. Comparative Determination of Protein Amino-Acids in Plant Materials by Automated Cation-Exchange and Gas-Liquid-Chromatography of Amino-Acid N-Heptafluoro-Butyryl, Normal-Propyl Esters[J]. *Journal of Chromatography*, 1974, 97(2): 175—191.
- [7] 颜流水, 梁宁, 罗国安等. 整体式 PDMS 电泳芯片快速成型及高灵敏化学发光检测氨基酸[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(7): 1193—1197.
- [8] 许柏球, 杨剑. 反相高效液相色谱法测定荔枝果实游离氨基酸[J]. 食品科学, 2004, 25(12): 156—159.
- [9] 石运伟, 明永飞, 王彩萍等. 牛血清白蛋白中氨基酸的高效液相色谱荧光测定及质谱鉴定[J]. 分析化学, 2006, 34(4): 503—507.
- [10] 李肖燕, 尤进茂, 孙志伟等. 黄金蝉若虫体蛋白水解液的荧光标记及电喷雾质谱鉴定[J]. 分析化学, 2010, 38(7): 917—923.
- [11] 李玉林, 杜玉枝, 沈裕虎. 正交试验法优化青稞叶黄酮的提取工艺[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(增刊): 509—511.
- [12] Gatti R, Gioia M G, Andreatta P *et al.* HPLC-Fluorescence Determination of Amino Acids in Pharmaceuticals After Pre-Column Derivatization with Phanquinone[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, 35(2): 339—348.
- [13] Schwarz E L, Roberts W L, Pasquali M. Analysis of Plasma Amino Acids by HPLC with Photodiode Array and Fluorescence Detection[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2005, 354(1—2): 83—90.

Determination of Amino Acids from Highland Barley Seedlings Extract by HPLC-ESI/MS

WANG Ping^{a,b} CHEN Tao^{a,b} DU Yu-Zhi^a SHEN Yu-Hu^a LI Yu-Lin^a
a(Northern Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, P. R. China)
b(Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, P. R. China)

Abstract The amino acids in highland barley seedlings extract was determined by HPLC-ESI/MS with 2-[2-(dibenzocarbazole)-ethoxy] ethyl chloroformate (DBCEC-Cl) as the sensitive pre-column derivatization reagent. The results showed that there were 13 kind of amino acids in highland barley seedlings extract, and the total content was 81.6 mg/g, and there were 6 kinds of amino acids that couldn't be synthesized by the body itself, including lysine(Lys), methionine(Met), leucine(Leu), isoleucine(Ile), threonine(Thr) and valine(Val), and their contents amounted to 41.8 mg/g with accounting for 51.2% of the total amino acids. The method is sensitive and reliable with good repeatability, that is as the ideal analysis of full-spectrum amino acids in highland barely seedlings.

Key words Highland Barley; Amino Acids; HPLC-ESI/MS; DBCEC-Cl