

高效液相色谱法测定地骨皮中 18 种氨基酸

陈向明^{1,2}, 索有瑞¹

(1. 中国科学院 西北高原生物研究所, 西宁 810008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 采用高效液相色谱法测定地骨皮中 18 种氨基酸的含量。地骨皮样品用 10-乙基吡啶酮-2-磺酰氯为柱前衍生试剂进行衍生化。以 Akasil-C₁₈ 色谱柱为固定相, 用乙腈(5+95)溶液和乙腈(95+5)溶液以不同比例混合的溶液为流动相进行梯度洗脱, 用荧光检测器测定。18 种氨基酸的线性范围均为 32 fmol~100 pmol, 检出限(3S/N)在 2.06~8.65 fmol 之间。加标回收率在 96.4%~107% 之间, 测定值的相对标准偏差($n=6$)在均小于 4.0%。

关键词: 高效液相色谱法; 氨基酸; 地骨皮

中图分类号: O652.63

文献标志码: A

文章编号: 1001-4020(2015)10-1444-04

HPLC Determination of 18 Amino Acids in Cortex Lycii

CHEN Xiang-ming^{1,2}, SUO You-rui¹

(1. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;

2. University of the Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Abstract: HPLC was applied to the determination of 18 amino acids in cortex lycii. The sample of cortex lycii was derived with 10-ethyl-acridine-2-sulfonyl chloride as precolumn derivatization reagent. Akasil-C₁₈ chromatographic column was used as stationary phase with mixtures of acetonitrile (5+95) solution and acetonitrile (95+5) solution with different mixing ratios as mobile phase in the gradient elution, and determined with fluorescence detector. Linearity ranges of the 18 amino acids were found in the same range of 32 fmol-100 pmol with detection limits (3S/N) in the range of 2.06-8.65 fmol. Values of recovery found by standard addition method were in the range of 96.4%-107%, and values of RSD's ($n=6$) less than 4.0%.

Keywords: HPLC; Amino acids; Cortex lycii

地骨皮为茄科植物枸杞或宁夏枸杞的干燥根皮。具有凉血除蒸、清肺降火的功能, 用于阴虚潮热、骨蒸盗汗、肺热咳嗽、咳血、内热消渴的治疗^[1]。现代药理学研究发现地骨皮具有降血压、降血糖、调血脂、抗菌及抗病毒等活性^[2-4]。其活性成分包括氨基酸类物质等。氨基酸的测定方法主要是高效液相色谱法, 由于大多数氨基酸缺乏发色团也不能产生荧光, 直接的高效液相色谱法难以测定, 故需对氨基酸进行衍生, 为其连接上发色团或荧光基团, 以提高氨基酸检测的灵敏度。衍生试剂包括邻苯二甲

醛^[5], 9-芴甲基氯甲酸酯^[6]和二甲氨基萘磺酰氯^[7]等, 但这些试剂都存在许多缺点而限制了高效液相色谱法在实际测定中的应用。本工作采用新型柱前荧光标记试剂 10-乙基吡啶酮-2-磺酰氯(EASC)^[8], 建立了测定地骨皮中氨基酸含量的方法。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, 配 G1311A 型四元梯度泵, G1322A 型在线真空脱气机, G1321A 型荧光检测器, G1329A 型 100 位自动进样器。

18 种氨基酸混合标准溶液: 1.0×10^{-4} mol ·

收稿日期: 2014-08-19

作者简介: 陈向明(1978-), 男, 山东招远人, 博士研究生, 主要从事植物中活性成分分析。E-mail: xmch913@163.com

• 1444 •

L^{-1} ,用 pH 9.0 的硼酸钠缓冲溶液配制而成。

衍生试剂溶液: $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot L^{-1}$,称取自制的 10-乙基吡啶酮-2-磺酰氯适量,用乙腈配制而成。

乙腈为色谱纯,试验用水为纯净水,其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器工作条件

Akasil-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;流量为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量为 10 μL ,荧光激发波长(λ_{ex})和发射波长(λ_{em})分别为 262,425 nm。流动相:A 为乙腈(5+95)溶液,B 为乙腈(95+5)溶液,均含 pH 3.7 的 10 mmol $\cdot L^{-1}$ 甲酸-甲酸铵缓冲溶液。梯度洗脱:0~1 min 时,A 由 100%降至 85%;1~4 min 时,A 由 85%降至 75%;4~5 min 时,A 由 75%降至 70%;5~6.5 min 时,A 由 70%降至 67.5%;6.5~8.5 min 时,A 由 67.5%降至 62.5%;8.5~10 min 时,A 由 62.5%降至 53%;10~12 min 时,A 由 53%降至 49.5%;12~13 min 时,A 由 49.5%降至 45.5%;13~15 min 时,A 由 45.5%降至 20%;15~20 min 时,A 由 20%降至 0。

1.3 试验方法

1.3.1 标准溶液的衍生

在 2 mL 的安瓿瓶中依次加入氨基酸标准溶液 20 μL 、pH 9.5 的硼砂缓冲溶液 100 μL 、衍生试剂溶液 220 μL 和乙腈 200 μL 。密封,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min,冷却至室温后,加入乙酸(36+64)溶液 30 μL ,调节 pH 至弱酸性,加入乙腈 430 μL 后,按仪器工作条件进行测定。

1.3.2 样品的处理

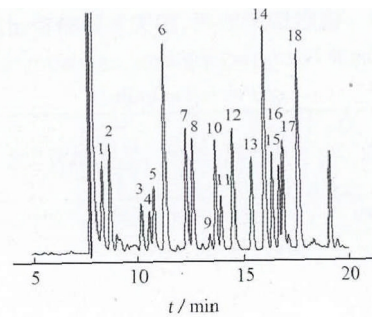
将采自青海省某市的地骨皮样品在真空干燥箱中于 60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 24 h,粉碎。称取地骨皮粉末 0.3 g 于 10 mL 离心管中,加入水 4 mL,超声提取 2 h,离心 10 min,分离上清液于 10 mL 容量瓶中,离心管中剩余物再加水 3 mL,超声 1 h,重复两次,离心后分离上清液。合并 3 次提取液于 10 mL 容量瓶中定容,溶液用 0.45 μm 滤膜过滤,取 100 μL 衍生后,按仪器工作条件进行测定。

2 结果与讨论

2.1 色谱行为

按试验方法对混合标准溶液进行衍生,并按仪器工作条件对其进行测定,其色谱图见图 1。

由图 1 可知:在 20 min 内实现了氨基酸衍生物



各峰号所对应的化合物同表 1

图 1 混合标准溶液衍生后的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of mixed standard solution after derivatization

的分离。

2.2 流动相的选择

EASC 与氨基酸衍生物中有游离的羧酸基团,在含水的流动相中能发生水解,导致部分羧酸基团电离成离子,使得色谱峰对称性变差,因此为抑制羧基的解离,需要调节流动相的 pH 为弱酸性。氨基酸中的氨基和固定相上游离的硅醇基都是强极性基团,相互之间能产生强烈的吸引,也会导致色谱峰的形状变差,为减弱氨基和固定相之间的相互作用,一般在流动相中加入含有氨基的调节剂,含有氨基的调节剂中的氮原子优先占据固定相上的吸附中心,从而减弱固定相对氨基酸衍生物的静电吸引。因此试验采用甲酸-甲酸铵缓冲体系。试验考察了不同 pH 的流动相对分离的影响,结果表明:随 pH 的降低,色谱峰的对称性越来越好,峰的宽度也减小,原因在于 pH 越小,对羧基的解离抑制就越强,但过低的 pH 对色谱柱有较大的损害。当 pH 大于 3.8 时,精氨酸、赖氨酸和丝氨酸的分离度非常差;当流动相的 pH 为 3.7 时,所有的氨基酸衍生物在 20 min 内完全分离。因此,试验选择流动相的 pH 为 3.7。

2.3 标准曲线及检出限

按试验方法对混合标准溶液进行衍生,并用乙腈稀释得混合标准溶液系列,按仪器工作条件进行测定,结果表明:各氨基酸的物质的量在 32 fmol~100 pmol 范围内与其衍生物的峰面积呈线性关系,线性回归方程、相关系数见表 1。按 3 倍信噪比计算各氨基酸的检出限(3S/N),结果见表 1。

由表 1 可知:相关系数大于 0.999,检出限在 2.06~8.65 fmol 之间。

表 1 线性回归方程、相关系数和检出限

Tab. 1 Linear regression equations, correlation coefficients and detection limits

峰号	化合物	线性回归方程	相关系数	检出限 n/fmol
1	半胱氨酸	$y=79.21x+10.13$	0.999 2	3.16
2	组氨酸	$y=83.19x+13.66$	0.999 4	3.49
3	精氨酸	$y=60.54x-20.22$	0.999 3	5.35
4	赖氨酸	$y=54.36x-16.39$	0.999 4	5.60
5	丝氨酸	$y=67.98x-10.68$	0.999 3	4.88
6	天冬氨酸	$y=101.2x-24.31$	0.999 1	2.06
7	谷氨酸	$y=91.76x-9.82$	0.999 0	3.94
8	苏氨酸	$y=88.31x+13.98$	0.999 1	3.62
9	甘氨酸	$y=67.87x-7.33$	0.999 4	8.65
10	色氨酸	$y=87.61x+8.13$	0.999 2	3.81
11	丙氨酸	$y=55.89x+11.41$	0.999 2	4.44
12	酪氨酸	$y=89.05x-7.86$	0.999 1	4.97
13	脯氨酸	$y=76.78x+16.67$	0.999 4	4.24
14	蛋氨酸	$y=108.4x+6.52$	0.999 4	2.10
15	缬氨酸	$y=65.20x-3.99$	0.999 8	3.22
16	苯丙氨酸	$y=34.77x+19.69$	0.999 2	3.81
17	异亮氨酸	$y=83.06x-8.83$	0.999 5	3.29
18	亮氨酸	$y=98.56x+6.52$	0.999 4	2.42

2.4 精密度试验

称取 0.01 mmol · L⁻¹ 标准衍生溶液,按试验方法平行测定 6 次,结果表明:胱氨酸、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苏氨酸、甘氨酸、色氨酸、丙氨酸、酪氨酸、脯氨酸、蛋氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸衍生物峰面积的相对标准偏差(RSD)依次为 2.1%,1.6%,2.3%,2.6%,1.4%,2.4%,1.9%,1.6%,1.7%,2.4%,1.8%,1.7%,1.9%,2.5%,1.9%,1.5%,1.3%,1.8%。表明仪器的性能良好,适用于分析氨基酸衍生物。

2.5 稳定性试验

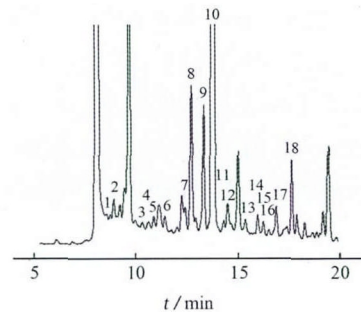
取氨基酸标准衍生溶液,保存于室温下,分别于 0,2,4,8,12,24 h 按试验方法平行测定 6 次,结果表明:胱氨酸、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苏氨酸、甘氨酸、色氨酸、丙氨酸、酪氨酸、脯氨酸、蛋氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸衍生物峰面积的 RSD 依次为 4.5%,3.6%,3.6%,3.7%,3.9%,3.4%,3.5%,4.1%,3.6%,4.4%,3.2%,3.4%,3.6%,3.9%,3.4%,4.0%,4.2%,3.6%。表明氨基酸衍生物室温下在 24 h 内稳定。

2.6 重复性试验

取氨基酸标准衍生溶液,按试验方法连续进样 6 次测定,结果表明:各氨基酸衍生物的 RSD 小于 4.1%,表明方法的重复性良好。

2.7 回收试验

按试验方法对地骨皮样品平行测定 6 次,色谱图见图 2,测定结果见表 2。同时加入一定量氨基酸混合标准溶液,按试验方法进行回收试验,结果见表 2。



各峰号所对应的化合物同表 1

图 2 样品衍生物的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of the sample derivatize

表 2 回收试验结果

Tab. 2 Results of test for recovery

化合物	测定值 $w/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	加标量	测定总量 $w/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	回收率 /%	RSD /%
半胱氨酸	57.7	50	109.5	104	2.9
组氨酸	108.0	100	214.7	107	3.1
精氨酸	121.8	100	225.9	104	2.6
赖氨酸	124.3	100	230.5	106	2.4
丝氨酸	62.0	50	113.2	102	3.5
天冬氨酸	67.5	50	120.0	105	3.2
谷氨酸	68.0	50	117.9	99.8	2.1
苏氨酸	228.8	200	432.0	102	1.9
甘氨酸	176.8	150	324.4	98.4	2.8
色氨酸	6 948.6	7 000	14 179.6	103	1.5
丙氨酸	30.7	50	83.6	106	3.4
酪氨酸	113.3	100	215.9	103	3.2
脯氨酸	53.4	50	105.7	105	3.9
蛋氨酸	51.2	50	100.3	98.2	3.4
缬氨酸	60.5	50	109.3	97.6	2.9
苯丙氨酸	47.6	50	98.4	102	3.2
异亮氨酸	41.3	50	89.5	96.4	3.6
亮氨酸	111.1	100	209.8	98.7	2.8

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中

- 国医药科技出版社, 2005.
- [2] 魏智清,于洪川,樊瑞军.地骨皮降血糖有效成分的初步研究[J].时珍国医国药,2009,20(4):848-850.
- [3] 宁娜,韩建军.地骨皮的化学成分与药理作用[J].现代药物与临床,2010,25(3):172-176.
- [4] 魏秀丽,梁敬钰.地骨皮化学成分的研究[J].中国药科大学学报,2002,33(4):271-273.
- [5] 陈飒飒,王钧,段世明.邻苯二甲醛柱前衍生反相高效液相色谱法测定氨基酸类神经递质[J].理化检验-化学分册,2003,39(5):283-285.
- [6] LOZANOV V, BENKOVA B, MATEVA L, et al. Liquid chromatography method for simultaneous analysis of amino acids and biogenic amines in biological fluids with simultaneous gradient of pH and acetonitrile[J]. Journal of Chromatography B, 2007,860(1):92-97.
- [7] FÜRST P, POLLACK L, GRASER T A, et al. Appraisal of four pre-column derivatization methods for the high-performance liquid chromatographic determination of free amino acids in biological materials[J]. J Chromatogr A, 1990,499:557-569.
- [8] CHEN Guang, LI Jun, SUN Zhi-wei, et al. Rapid and sensitive ultrasonic-assisted derivatisation microextraction (UDME) technique for bitter taste-free amino acids (FAA) study by HPLC-FLD [J]. Food Chemistry, 2014,143:97-105.

欢迎订阅《理化检验-化学分册》电子期刊

为了倡导环保理念,保护森林,节约纸张,希望广大读者踊跃订阅电子期刊,支持环保事业,共同携手创造绿色发展的明天!本刊采用 PDF 格式用 E-mail 形式发送,读者保存方便不占空间,可方便打印某篇文章或某一页,订阅费用低,全年订阅比邮购费用低一半,且比邮局发行快 10 天左右。如需订

阅,请您登陆 www.mat-test.com 网站填写信息,并把订阅款项汇入指定银行或邮局,收到款项后我们及时将电子期刊发送给您。

《理化检验-化学分册》电子期刊定价全年 90 元,半年 50 元。

联系人:王敏;电话:021-65527634。