

· 论著 ·

柱前衍生 RP-HPLC 法同时测定珙菲亚中 14 种水解氨基酸

陈哲¹, 路娟¹, 彭纪铭^{1,2}, 柴瑞平¹, 陈曦¹ (1. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193; 2. 山东中医药大学, 山东 济南 250355)

[摘要] 目的 建立柱前衍生反相高效液相色谱法同时测定珙菲亚中 14 种水解氨基酸含量的方法。方法 采用 Waters XBridge Shield RP₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 异硫氰酸苯酯为柱前衍生试剂, 梯度洗脱, 流速 0.8 ml/min, 检测波长 254 nm, 柱温 25 ℃。结果 14 种氨基酸在一定浓度范围内呈良好的线性关系, 相关系数 r 值均 > 0.999 0, 加样回收率 ($n=6$) 为 90.2%~105.1%, 氨基酸衍生溶液在 24 h 内稳定。结论 本实验建立的方法可靠, 可用于珙菲亚中氨基酸的含量测定。

[关键词] 珙菲亚; 柱前衍生; 反相高效液相色谱法; 氨基酸; 异硫氰酸苯酯

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)02-0130-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.02.008

Simultaneous determination of 14 amino acids in *Pfaffia* by RP-HPLC with pre-column derivatization

CHEN Zhe¹, LU Juan¹, PENG Jiming^{1,2}, CHAI Ruiping¹, CHEN Xi¹ (1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China; 2. Shandong University of Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective** To develop a HPLC method for determining 14 hydrolyzed amino acids in *Pfaffia*. **Methods** The sample was derivatized with phenyl isothiocyanate (PITC). Amino acids were separated on Waters XBridge Shield RP₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column at the flow rate of 0.8 ml/min, detected at 254 nm. The column temperature was 25 ℃. **Results** The response was linear for 14 amino acids with a correlation coefficient $r > 0.999 0$. The average recoveries ($n=6$) were 90.2%-105.1%. Amino acids derivative solution remained stable in 24 hours. **Conclusion** This well-established method is very reliable. It can be used as a quantitative determination method for 14 amino acids in *Pfaffia*.

[Key words] *Pfaffia*; pre-column derivatization; RP-HPLC; amino acids; phenyl isothiocyanate

巴西人参 (*Pfaffia paniculata*) 为苋科 (Amaranthaceae) 牛膝属多年生草本植物^[1], 又称珙菲亚, 以根入药。生长在圭亚那、玻利维亚、阿根廷和巴西。在巴西, 主要分布于圣保罗、巴拉那河、马托格罗索州、戈亚斯。珙菲亚通常被用来作为亚洲人参的替代品, 在民间医学中, 作为一种滋补药使用, 药效学研究表明珙菲亚有壮阳、抗糖尿病、抗胃溃疡的作用^[1,2]。目前, 国内外对珙菲亚的研究甚少, 有外文文献报道, 珙菲亚中富含多种氨基酸和维生素^[3-10]。本实验采用柱前衍生 HPLC 法测定了珙菲亚中水解氨基酸的含量, 为珙菲亚的进一步开发

提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters UPLC H-Class 系统(含四元溶剂泵、自动进样装置、在线真空脱气装置、PDA 检测器、Empower2 色谱工作站); AB265-S 十万分之一天平(瑞士 METTLER 公司); KQ-250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 高速万能粉碎机(上海顶帅电器有限公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(河南省予华仪器有限公司)。

1.2 样品试剂 L-天冬氨酸(Asp, 批号: 121027), L-谷氨酸(Glu, 批号: 121107), L-丝氨酸(Ser, 批号: 121109), L-甘氨酸(Gly, 批号: 121024), L-精氨酸(Arg, 批号: 121102), L-苏氨酸(Thr, 批号: 121126), L-脯氨酸(Pro, 批号: 121031), L-丙氨酸(Ala, 批号: 121105), L-胱氨酸(Cys-Cys, 批号: 121107), L-缬氨酸(Val, 批号: 121125), L-蛋氨酸

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673667); 国家重大科技专项(2014ZX09201022-006)

[作者简介] 陈哲, 硕士研究生。研究方向: 中药药理学。Tel: (010)57833257; E-mail: chenzheyim2009@126.com

[通讯作者] 陈曦, 副研究员。研究方向: 中药药理学与毒理学。Tel: (010)57833257; E-mail: chenxi@implad.ac.cn

(Met, 批号: 121112), L-异亮氨酸 (Ile, 批号: 121013), L-亮氨酸 (Leu, 批号: 120929), L-苯丙氨酸 (Phe, 批号: 120922), L-色氨酸 (Trp, 批号: 121027), L-赖氨酸 (Lys, 批号: 121126), 均购于上海融禾医药科技发展有限公司, 纯度 $\geq 98\%$ 。乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司); 异硫氰酸苯酯(批号: 201207111, 成都格雷西亚化学技术有限公司), 醋酸钠(批号: 140601, 西陇化工股份有限公司), 三乙胺(批号: 80134318, 国药集团化学试剂有限公司), 盐酸(批号: 161026, 北京化工厂), 冰醋酸(批号: 20150629, 北京化工厂), 屈臣氏蒸馏水。珐菲亚样品由浙江珐菲亚生物科技有限公司(外商独资)提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Waters XBridge Shield RP₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 流动相 A: 0.1 mol/L 乙酸钠溶液(称取 8.2 g 无水乙酸钠用 900 ml 蒸馏水溶解, 滴加冰醋酸调 pH 至 6.5, 加水定容至 1 000 ml, 混匀)-乙腈(93:7), 流动相 B: 乙腈-水(80:20), 梯度洗脱(0~10 min, 10%B \rightarrow 20%B; 10~34 min, 20%B \rightarrow 48%B; 34~50 min, 48%B \rightarrow 80%B); 流速 0.8 ml/min, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 检测波长 254 nm, 进样量 10 μ l。

2.2 溶液的配制

2.2.1 混合氨基酸对照品溶液 精密称取 16 种氨基酸标准品适量, 加 0.1 mol/L 盐酸溶解, 定容于 10 ml 容量瓶, 制成 16 种氨基酸标准品混合溶液。

2.2.2 供试品溶液 将珐菲亚原药材粉碎后过 60 目筛, 精密称取 1.0 g, 置于 25 ml SCOTT 蓝盖瓶中, 加入 0.1 mol/L 盐酸溶液 10 ml, 超声 10 min, 再加入 10 ml 盐酸, 于 120 $^{\circ}$ C 油浴水解 3 h, 转移至蒸发皿中, 蒸干, 向残渣中加入 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解, 移至 25 ml 容量瓶中定容, 混匀, 过滤, 取续滤液, 即得。

2.2.3 空白溶液 以 0.1 mol/L 盐酸溶液作为空白溶液。

2.2.4 氨基酸柱前衍生化试剂 A 液(0.1 mol/L PITC 乙腈溶液): 精密吸取异硫氰酸苯酯(PITC) 120 μ l, 加乙腈定容至 10 ml 容量瓶, 混匀, 即得。B 液(1 mol/L 三乙胺乙腈溶液): 精密量取三乙胺 1.39 ml, 加乙腈定容至 10 ml 容量瓶, 混匀, 即得。

2.3 氨基酸柱前衍生化

2.3.1 混合氨基酸对照品溶液的衍生化 分别精密吸取“2.2.1”项下混合氨基酸对照品溶液和

“2.2.3”项下空白溶液各 200 μ l, 置于 1.5 ml 离心管中, 加入 A 液 100 μ l, B 液 100 μ l, 混匀, 50 $^{\circ}$ C 水浴 1 h 后, 滴加正己烷 400 μ l, 涡旋 30 s, 静置 10 min, 取下层溶液, 再加入 400 μ l 正己烷萃取, 静置 10 min, 取下层溶液 200 μ l, 加 10 μ l 冰醋酸, 混匀, 1.3×10^4 r/min 离心 10 min, 取上清液, 即得。

2.3.2 供试品溶液的衍生化 精密吸取“2.2.2”项下供试品溶液 0.2 ml, 按“2.2.1”项下方法自“置 1.5 ml 离心管中”起操作, 即得。

2.4 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下混合氨基酸对照品溶液 1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 ml, 分别置于 25 ml 容量瓶中, 用 0.1 mol/L 盐酸定容, 混匀, 配制成系列浓度的对照品溶液, 按“2.3.1”项下方法进行衍生化, 即得系列浓度对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 测得峰面积。分别以氨基酸对照品峰面积值(Y)为纵坐标, 14 种氨基酸对照品质量浓度(X)为横坐标, 制作标准曲线, 计算回归方程, 见表 1。

表 1 14 种氨基酸的线性关系

成分	回归方程	r	线性范围(μ l/ml)
Asp	$Y=7\ 518X+81\ 625$	0.999 0	39.20~78.40
Glu	$Y=15\ 065X-5\ 879.9$	0.999 5	25.32~50.64
Ser	$Y=31\ 107X-55\ 795$	0.999 9	15.08~30.16
Gly	$Y=79\ 970X-193\ 336$	0.999 9	13.40~26.80
Arg	$Y=12\ 455X-35\ 329$	0.999 5	26.28~52.56
Thr	$Y=33\ 373X-86\ 819$	0.999 9	16.08~32.16
Pro	$Y=50\ 076X-167\ 728$	0.999 9	14.92~29.84
Ala	$Y=25\ 367X-3\ 083.4$	0.999 7	14.92~29.84
Cys	$Y=15\ 301X-89\ 876$	0.999 7	13.04~26.08
Val	$Y=24\ 676X-26\ 987$	0.999 9	7.24~14.48
Ile	$Y=34\ 595X-70\ 610$	0.999 9	13.60~27.20
Leu	$Y=29\ 809X-56\ 833$	0.999 9	14.28~28.56
Phe	$Y=25\ 636X-55\ 230$	0.999 9	15.08~30.16
Lys	$Y=41\ 850X-56\ 128$	0.999 9	13.20~26.40

2.5 精密度试验 取同一对照品溶液(取 1 ml 混合对照品溶液用 0.1 mol/L 盐酸稀释定容至 10 ml 容量瓶, 混匀), 按“2.3.1”项下方法进行衍生化, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算 14 种氨基酸的精密度, 色谱图见图 1B。结果 RSD 范围为 0.26%~1.97%, 说明该仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 精密称取珐菲亚样品 6 份, 每份 1.0 g。按“2.2.2”和“2.3.2”项下方法制备供试品溶液并衍生化, 依“2.1”项下色谱条件, 进样测定 14 种氨基酸的含量, 色谱图见图 1C。RSD 范围为 1.41%~1.97%。

2.7 稳定性试验 取供试品的衍生化溶液,按“2.1”项下色谱条件,分别在0、2、4、8、12、24 h进样

测定,记录峰面积,RSD范围为0.61%~1.99%,表明衍生化溶液在24 h内稳定存在。

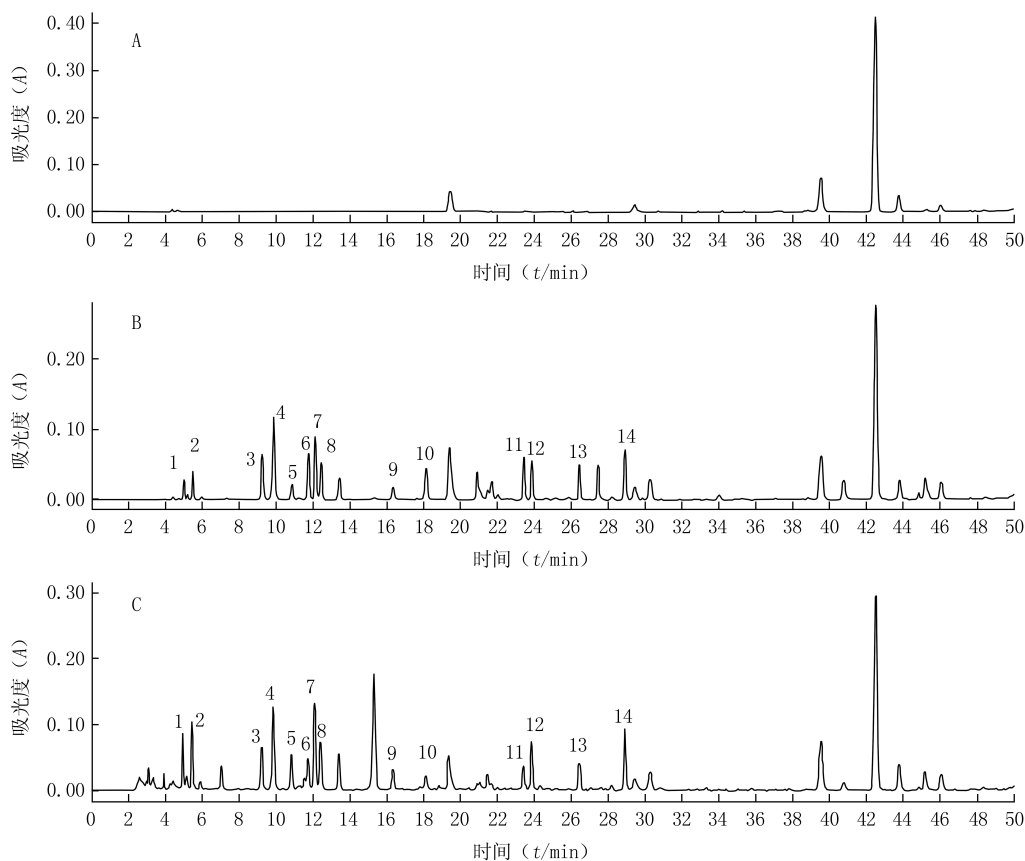


图1 空白(A)、混合对照品(B)、1号样品(C)的HPLC图

1. 天冬氨酸;2. 谷氨酸;3. 丝氨酸;4. 甘氨酸;5. 精氨酸;6. 苏氨酸;7. 脯氨酸;8. 丙氨酸;
9. 胱氨酸;10. 缬氨酸;11. 异亮氨酸;12. 亮氨酸;13. 苯丙氨酸;14. 赖氨酸

2.8 加样回收率试验 取6份混合氨基酸对照溶液各2 ml(每毫升氨基酸混合对照品溶液分别含Asp 0.784 mg, Glu 0.506 mg, Ser 0.242 mg, Gly 0.215 mg, Arg 0.526 mg, Thr 0.193 mg, Pro 0.299 mg, Ala 0.298 mg, Cys 0.313 mg, Val 0.115 mg, Ile 0.163 mg, Leu 0.285 mg, Phe 0.181 mg, Lys 0.264 mg)置于25 ml SCOTT 蓝盖瓶中,采用氮吹的方法将溶剂挥干,分别加入精密称定的珐菲亚样品0.5 g,按“2.2.2”和“2.3.2”项下方法制备供试品溶液并衍生化,依“2.1”项下色谱条件,进样分析,计算14种氨基酸的回收率和平均回收率($n=6$)均在90.2%~105.1%之间,RSD值除Ser为3.2%外,其他13种氨基酸RSD值均<3.0%。

2.9 样品测定 精密称取珐菲亚样品3份,每份1 g,按“2.2.2”和“2.3.2”项下方法制备供试品溶液并衍生化,按“2.1”项下色谱条件测定14种水解氨基酸的含量,结果见表2。

表2 珐菲亚中14种氨基酸的含量

氨基酸	每份珐菲亚中氨基酸的含量(mg/g)			
	样品1	样品2	样品3	平均值
Asp	2.58	2.59	2.59	2.59
Glu	1.93	1.91	1.97	1.94
Ser	0.86	0.87	0.88	0.87
Gly	0.76	0.76	0.76	0.76
Arg	1.97	1.95	1.98	1.97
Thr	0.72	0.72	0.74	0.73
Pro	1.16	1.16	1.15	1.16
Ala	1.18	1.18	1.18	1.18
Cys	1.15	1.14	1.14	1.14
Val	0.43	0.43	0.43	0.43
Ile	0.55	0.56	0.57	0.56
Leu	1.04	1.04	1.06	1.05
Phe	0.73	0.73	0.73	0.73
Lys	0.96	0.96	0.97	0.96
总氨基酸	16.02	16.01	16.15	16.06

3 讨论

目前,氨基酸直接分析法发展迅速,以离子交换

为基础的氨基酸分析仪已经成为主要的直接分析方法。但氨基酸分析仪专属性比较强,价格相对昂贵,这些因素都限制了该分析方法的推广与使用。由于绝大部分的氨基酸本身不具有紫外吸收,故可通过对氨基酸进行衍生化,以提高分析检测方法的灵敏度以及分离的选择性。茚三酮柱后衍生化^[12,13]分离度和准确度均较低,而且成本较高。常见的柱前衍生化试剂有异硫氰酸苯酯(PITC)、邻苯二甲酰(OPA)、茚甲基氯甲酸酯(FMOC-Cl)、2,4-二硝基氟苯(DNFB)、丹磺酰氯等。本实验选用的 PITC 柱前衍生化法,衍生产物单一且稳定,衍生化的副产物对氨基酸的测定没有干扰。

样品的前处理时根据样本以及实验目的不同而选择不同的处理方法,酸水解是水解氨基酸含量测定的一种最常用的方法。有文献表明可根据供试品的不同选择最佳水解条件,通常酸水解的方法为在 6 mol/L 的盐酸中 110 °C 水解 22~24 h,或者在 150 °C 下水解 1 h^[11]。为此,实验前期笔者考察了在 120 °C 条件下水解 1、6、12 h 对氨基酸含量的影响,结果表明超过 6 h 后氨基酸的含量没有明显变化,故进一步筛选最佳水解时间,分别水解 2、3、4、5 h 后对氨基酸含量进行测定,发现 120 °C 条件下水解 3 h,水解较完全,故最终选择 120 °C 油浴条件下水解 3 h。另外,对水解的溶剂体积进行考察,分别在 20 和 40 ml 的水解溶剂中 120 °C 水解 3 h,测定氨基酸含量结果表明,20 ml 的水解溶剂可以使 1 g 珙菲亚样品完全水解。

本实验首次采用柱前衍生反相高效液相色谱法对珙菲亚中水解氨基酸的组分及含量进行分析,结果显示珙菲亚中氨基酸种类丰富,共检测到 14 种氨基酸,其中有 6 种人体必需的氨基酸,分别为苏氨酸(Thr)、缬氨酸(Val)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe)、赖氨酸(Lys)。珙菲亚水解产物中天冬氨酸的含量最高,有报道称具有高天冬氨酸含量的特定蛋白质和(或)肽部分可调节哺乳动物血浆葡萄糖浓度和增加胰岛素敏感性。珙菲亚中非必需氨基酸——谷氨酸的含量较高,谷氨酸是生物体内氮代谢的基本氨基酸之一,是动物体内中枢神经系统的一种重要的兴奋性神经递质,在医药、食品及化工等行业有广泛应用,并参与氨的去毒作用^[14,15]。珙菲亚中半必需氨基酸——精氨酸的含量也相对较高,它在细胞分裂、伤口复原、免疫功能调节和激素分泌等方面发挥重要作用^[16,17]。

综上所述,珙菲亚是一类富含氨基酸类成分的

药材,本研究为珙菲亚的进一步开发利用提供了理论依据。

【参考文献】

- [1] 卞庆亚,罗崇念,马小军. 国外对珙菲亚研究进展[J]. 中草药, 2002,33(5):1.
- [2] Caleffi ER, Krausová G, Hyršlová I, *et al*., Isolation and prebiotic activity of inulin-type fructan extracted from *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen roots [J]. *Inter J Biolog Macromol*, 2015,80: 392-399.
- [3] 凌征柱,杨东爱,马小军,等. 引种栽培珙菲亚与原产地珙菲亚主要成分的比较研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(12): 2649-2650.
- [4] 凌征柱,覃文流,马小军,等. 引种珙菲亚与原产地珙菲亚的氨基酸及微量元素分析[J]. 种子, 2007,26(8):86-87.
- [5] 蓝祖裁. 珙菲亚引种栽培及化学成分与药理研究概况[J]. 北方园艺, 2011(19):155-157.
- [6] 赵东升,马晓丽,李新霞,等. 柱前衍生-高效液相色谱法同时测定可食用葱属植物中 18 种游离氨基酸含量[J]. 药物分析杂志, 2013,33(6):963-968.
- [7] 欧金秀,谷陟欣,张妮瑜,等. 柱前衍生 HPLC 同时测定驴胶补血颗粒中 6 种水解氨基酸[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16):93-96.
- [8] 谢 谊,易 艳,刘 阳,等. 柱前衍生 HPLC 测定阿胶中 17 种水解氨基酸含量[J]. 湖南中医药大学学报, 2012, 32(5): 46-49.
- [9] 赵 岩,赵天琦,徐殿文,等. 柱前衍生 RP-HPLC 法测定仙鹤草中氨基酸含量[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(12):117-120.
- [10] Takemoto T, Nishimoto N, Nakai S, *et al*., Pfaffic acid, a novel nortriterpene from *Pfaffia paniculata* Kuntze[J]. *Tetrahedr Lett*, 1983,24(10):1057-1060.
- [11] 李海生,李华龙. 用于氨基酸分析供试品的水解和处理方法[J]. 天津药学, 1999,11(3):54-55.
- [12] 龚 焯. 测定茶叶中游离氨基酸总量研究[J]. 商情, 2014(21):125-125.
- [13] 黄 松,吴月娜,刘 梅,等. 茚三酮比色法测定青天葵中总游离氨基酸的含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2010,17(12):50-52.
- [14] 邓毛程,梁世中,王 瑶,等. 二次接种叠加生物素的谷氨酸发酵工艺研究[J]. 食品与发酵工业, 2007,33(7):1-5.
- [15] 李赛钰,王 晓,马广存,等. 毛白杨雄花序营养成分分析及评价[J]. 山东科学, 2004,17(3): 10-12.
- [16] 陈亚军,齐玉梅,项 琦,等. 谷氨酰胺和精氨酸对创伤后大鼠血浆蛋白和抗氧化能力的影响[J]. 天津医科大学学报, 2008, 14(2):229-231.
- [17] 陈亚军,齐玉梅. 精氨酸免疫营养作用的研究进展[J]. 中国临床营养杂志, 2007,15(5): 310-314.

【收稿日期】 2016-10-13 【修回日期】 2016-12-16

【本文编辑】 李睿旻