

PICO·TAG 法测定王锦蛇中不同部位游离氨基酸含量

任学聪, 盛振华, 程超, 黄真* (浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要: 目的 建立 PITC(异硫氰酸苯酯)柱前衍生化反相高效液相色谱法测定王锦蛇(菜花蛇)中蛇肉、蛇心、蛇肺、蛇肠中的 17 种游离氨基酸含量, 进一步开发和利用王锦蛇的食用与药用价值。方法 Waters PICO·TAG™ 游离氨基酸分析柱 (3.9 mm×150 mm, 5 μm), 以醋酸钠缓冲液为流动相 A, 乙腈-水(60:40)为流动相 B 梯度洗脱, 254 nm 紫外条件下检测分析。结果 20 min 内 17 种氨基酸均得到较好的分离; 17 种氨基酸在各自的浓度范围内线性关系良好, r 在 0.997 6~0.999 9 之间, 平均加样回收率为 98.3%~107.5%。结论 该方法操作简便, 准确、可靠, 重复性好, 适用于王锦蛇中蛇肉、蛇心、蛇肺、蛇肠的氨基酸含量测定, 为王锦蛇资源的进一步开发利用和保护提供了实验依据。

关键词: 王锦蛇; 氨基酸; 高效液相色谱法; PITC 柱前衍生

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)04-0329-04

PICO·TAG Determination of Amino Acid Content of Different Parts in *Elaphe Carinat*

REN Xuecong, SHENG Zhenhua, CHENG Chao, HUANG Zhen* (Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method derived by PITC (phenylisothiocyanate) pre-column for the determination of 17 amino acids content of fresh, heart, lung and intestines in *Elaphe carinat* (Cauliflower), and to develop the edible and medical value of *Elaphe carinat* further. **METHODS** Using Waters PICO·TAG™ column(3.9 mm×150 mm, 5 μm), gradient elution with sodium acetate buffer as mobile phase A, acetonitrile-water (60:40) as mobile phase B, detection wavelength of 254 nm. **RESULTS** All of 17 amino acids were well separated within 20 min; 17 amino acids had a good linear relationship in their respective concentration ranges (0.997 6< r <0.999 9). The average recoveries were in 98.3%–107.5%. **CONCLUSION** This method is simple, accurate and reliable with a good reproducibility and can be used to determine amino acids content of snake fresh, heart, lung and intestines in *Elaphe carinat*, which provides experimental evidence of the further development, usage and protection of the *Elaphe carinat* resource.

KEY WORDS: *Elaphe carinat*; amino acids; HPLC; pre-column derived by PITC

蛇类药材不仅具有祛风除湿、通络止痛、活血化瘀的药用价值, 还拥有很高的食用价值。早在唐代就有用蛇做肴的记载, 而今嗜蛇之风也是相当流行, 同时在日本、美国也把蛇作为菜肴中的佳品^[1]。王锦蛇(*Elaphe carinata*), 又名菜花蛇、大王蛇, 味道鲜美、营养丰富^[2-3]。为了开发其作为食品、药品、保健品的价值, 本实验对其氨基酸的种类及含量进行测定, 对其经济价值的开发亦有重要的参考意义。

由于大多数氨基酸在紫外可见光区无吸收, 因此须将其进行衍生, 才可进行紫外检测。近十几年来, 柱前衍生反相高效液相色谱法得到了飞速的发展, 并且其应用越来越广。常用的衍生剂有 OPA(邻苯二甲醛)、FDNB(二硝基氟苯)、FMOC(9-芴甲基氯甲酸酯)、PITC(异硫氰酸苯酯)等^[4-8]。本实验采用美国 Waters 公司开发的 PICO·TAG 氨基酸分析方法。该方法灵敏度好, 重复性高, 衍生物稳定, 检测成本低, 速度快, 改

作者简介: 任学聪, 男, 硕士生 Tel: 13429159075
13605818929 E-mail: huangzhen@zjtem.net

E-mail: rxc880715@163.com

*通信作者: 黄真, 女, 教授, 博导 Tel:

进了传统方法分离度差的弱点,避免了传统的离子交换柱性能不稳定,流动相平衡时间长的弱点。17种氨基酸均在254 nm处有良好的吸收,建立了王锦蛇蛇肉、蛇心、蛇肺、蛇肠氨基酸分析的方法。

1 材料与试剂

1.1 材料

捕获于浙江临安天目山,经浙江中医药大学资源鉴定教研室张水利副教授鉴定为游蛇科(Megapodiidae)锦蛇属(Elaphe)的王锦蛇(Elaphe carinat)。

1.2 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱系统: Waters 1525 二元梯度泵, Waters 2489 紫外检测器(美国 Waters 公司); Waters PICO-TAG 工作站; 2XZ-2 型旋片真空泵(浙江黄岩求精真空泵厂); Eppendorf Centrifuge 5804R 冷冻离心机(德国 Eppendorf); XW-80A 漩涡混合仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

氨基酸混合标准品(ID112568, 美国 Pierce 公司, $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$, 其中胱氨酸为 $1.25 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$); PITC(异硫氰酸苯酯)衍生剂(No.26922, 美国 Pierce 公司, $1 \text{ mL}\times 10 \text{ ampules}$); 乙腈, 甲醇均为色谱纯; 苯酚、盐酸等其余试剂为分析纯; 去离子水; 氮气为高纯氮(纯度 $>99.999\%$)。

2 方法

2.1 试剂配制

样品水解液: 1 g 苯酚溶于 100 mL $6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸中。再干燥液: 乙醇-水-三乙胺=2:2:1, 漩涡混匀。衍生剂(临用前新鲜配制): 乙醇-PITC(异硫氰酸苯酯)-三乙胺-水=7:1:1:1, 漩涡混匀。样品稀释液: 取 355 mg Na_2HPO_4 , 加去离子水至 500 mL , 用 10%磷酸水溶液-乙腈(95:5)溶液调 pH 至 7.4。

2.2 供试品溶液的制备

分别称取蛇肉、蛇心、蛇肺、蛇肠 1.0710 , 1.4321 , 0.9175 , 1.2134 g , 加水 50 mL 煎煮, 沸腾 20 min , 共煎煮 3 次; 放冷, 定容至 50 mL 量瓶。取 $40 \mu\text{L}$ 置样品小管内, 放入反应瓶, 真空(100 mTorr 以下)干燥 $20\sim 30 \text{ min}$ 。在反应瓶底加入 $200 \mu\text{L}$ $6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸, 置换空气后放入恒温加热器 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 水解 24 h 后, 真空干燥 $20\sim 30 \text{ min}$, 再加入 $10 \mu\text{L}$ 再干燥液, 漩涡混匀, 真空干燥 $20\sim 30$

min , 再加入 $20 \mu\text{L}$ 新鲜配制的衍生试剂, 漩涡混匀, 室温下放置 20 min , 真空干燥 $20\sim 30 \text{ min}$, 再加入 $100 \mu\text{L}$ 样品稀释液, 漩涡混匀, $5000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 后吸取上清液, 即供试品溶液, 备用。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Waters PICO-TAG™ 游离氨基酸分析柱($3.9 \text{ mm}\times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 检测波长为 254 nm ; 柱温: $40 \text{ }^\circ\text{C}$; 流动相 A: pH 6.4 的醋酸盐缓冲液-乙腈(94:6)的混合液, 流动相 B: 乙腈-水(60:40)。洗脱条件按表 1 中的条件进行梯度洗脱。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Mobile phase gradient elution program

时间/min	流速/ $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	1.00	100.0	0.0
9.00	1.00	98.0	2.0
30.00	1.00	54.0	46.0
31.50	1.00	0.0	100.0
32.00	1.50	0.0	100.0
32.50	1.50	100.0	0.0
38.00	1.50	100.0	0.0
40.00	1.00	100.0	0.0

3 结果

3.1 外标曲线的制作

精密吸取氨基酸混合标准品溶液 $20 \mu\text{L}$, 注入样品小管中, 加入 $20 \mu\text{L}$ 衍生剂, 抽干后再加 $200 \mu\text{L}$ 稀释液漩涡混匀。分别吸取 2.5 , 5.0 , 7.5 , 10.0 , 12.5 , $15.0 \mu\text{L}$ 氨基酸混合标准品溶液进样分析。混合标准品色谱分析见图 1。以峰面积(Y)为纵坐标, 以氨基酸含量(X)为横坐标, 作标准曲线。各氨基酸标准曲线见表 2。结果表明, 17 种氨基酸在各自浓度范围内线性关系良好。

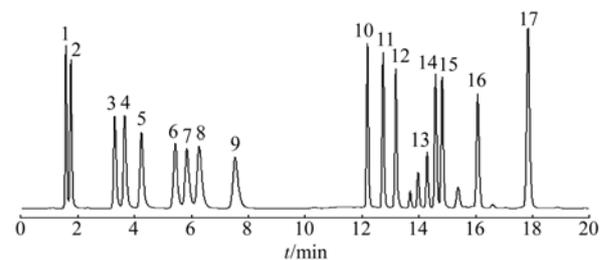


图 1 17 种氨基酸标准品

1-天冬氨酸; 2-谷氨酸; 3-丝氨酸; 4-甘氨酸; 5-组氨酸; 6-精氨酸; 7-苏氨酸; 8-丙氨酸; 9-脯氨酸; 10-酪氨酸; 11-缬氨酸; 12-甲硫氨酸; 13-胱氨酸; 14-异亮氨酸; 15-亮氨酸; 16-苯丙氨酸; 17-赖氨酸

Fig 1 17 kinds of amino acid standard

1-ASP; 2-GLU; 3-SER; 4-GLY; 5-HIS; 6-ARG; 7-THR; 8-ALA; 9-PRO; 10-TYR; 11-VAL; 12-MET; 13-CTS; 14-ILEU; 15-LEU; 16-PHE; 17-LYS

表 2 17 种氨基酸的保留时间、回归方程、相关系数与线性范围

Tab 2 Retention time, regression equation, correlation coefficient and linearity range of 17 kinds of amino acid

氨基酸	保留时间/ min	回归方程	相关系数 <i>r</i>	线性范围/ μg
ASP	1.58	$Y=66\ 027X-2\ 529.6$	0.999 8	0.083 2~0.499 1
GLU	1.75	$Y=69\ 666X+621.4$	0.999 8	0.091 9~0.551 6
SER	3.30	$Y=63\ 466X+9\ 061.4$	0.999 8	0.065 7~0.394 1
GLY	3.65	$Y=73\ 026X+35\ 961$	0.999 5	0.046 9~0.281 6
HIS	4.24	$Y=72\ 932X-22\ 495$	0.999 8	0.097 0~0.582 0
ARG	5.45	$Y=68\ 374X+6\ 662.9$	0.999 9	0.108 9~0.653 3
THR	5.86	$Y=67\ 880X-3\ 540.8$	0.999 9	0.074 4~0.446 6
ALA	6.30	$Y=80\ 490X+62\ 293$	0.998 8	0.055 7~0.334 1
PRO	7.50	$Y=74\ 222X+38\ 185$	0.999 5	0.071 9~0.431 6
TYR	12.40	$Y=76\ 832X+22\ 316$	0.999 7	0.113 3~0.679 5
VAL	12.88	$Y=76\ 555X-16\ 501$	0.999 6	0.073 2~0.439 1
MET	13.30	$Y=70\ 358X+36\ 415$	0.999 4	0.093 3~0.559 5
CYS	13.72	$Y=32\ 284X+20\ 617$	0.997 6	0.037 9~0.227 3
ILEU	14.55	$Y=74\ 715X+66\ 087$	0.998 7	0.082 0~0.492 0
LEU	14.75	$Y=84\ 419X-3\ 774.9$	0.999 9	0.082 0~0.492 0
PHE	15.94	$Y=79\ 918X-12\ 971$	0.999 8	0.103 3~0.619 5
LYS	17.77	$Y=14\ 778X-42\ 246$	0.999 8	0.091 4~0.548 3

3.2 仪器精密度和重复性试验

精密吸取 10 μL 标准品溶液,经衍生、稀释后,按“2.3”项下色谱条件连续进样 6 次,以各氨基酸的峰面积计算 RSD。结果表明:17 种氨基酸峰面积的 RSD 均在 1.09%~2.54%之间,该仪器精密度良好。

取同一批蛇心供试品溶液 5 份,按“2.3”项下的供试品溶液处理方法处理,经色谱分析后计算各氨基酸含量。结果表明,17 种氨基酸含量 RSD 均在 1.36%~4.04%之间,该方法重复性良好。

3.3 稳定性试验

取同一批蛇心供试品溶液,按“2.3”项下的供试品溶液处理方法处理,每隔 2 h 进样一次,共进样 6 次,以各氨基酸的峰面积计算 RSD。结果表明:17 种氨基酸的 RSD 均在 1.09%~3.28%之间,供试品溶液稳定性良好。

3.4 加样回收率试验

精密吸取已知 17 种氨基酸含量的蛇心供试品溶液 9 份,3 份一组,分别加入高、中、低 3 个浓

度的标准品溶液(80%, 100%, 120%各 3 份),按“2.3”项下的供试品溶液处理方法处理,色谱分析后计算其平均加样回收率。结果表明:17 种氨基酸的平均加样回收率均在 98.3%~107.5%之间。

3.5 样品含量测定

分别取 40 μL 的蛇肉、蛇心、蛇肺、蛇肠供试品溶液,经水解、干燥、衍生、稀释后进行色谱分析,根据峰面积计算各样品 17 种氨基酸的含量。各样品的色谱分析见图 2。各样品的 17 种氨基酸含量见表 3。

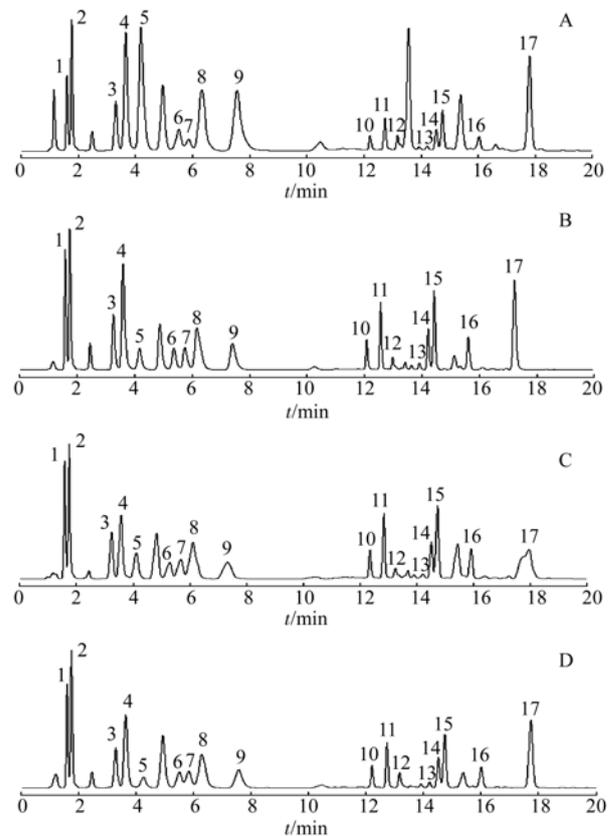


图 2 王锦蛇蛇肉、蛇心、蛇肺、蛇肠的氨基酸分析图谱 A-肉; B-心; C-肺; D-肠

Fig 2 The amino acid analysis of fresh, heart, lung and intestines in *Elaphe carinat*

A-fresh; B-heart; C-lung; D-intestines

4 讨论

本实验通过 PITC 柱前衍生反相高效液相色谱法对王锦蛇 4 个部位的游离氨基酸种类及含量进行测定。结果表明,王锦蛇四个部位均含有 17 种氨基酸,其氨基酸含量高低依次为蛇心>蛇肠>蛇肺>蛇肉,通常人们只食其蛇肉,而本实验研究表明,其心、肠、肺也均富含氨基酸,甚至超

表3 蛇肉、蛇心、蛇肺、蛇肠的17种氨基酸含量

Tab 3 17 kinds of amino acid content of the fresh, heart, lung, intestine in snake

氨基酸	蛇肉/g·g ⁻¹	蛇心/g·g ⁻¹	蛇肺/g·g ⁻¹	蛇肠/g·g ⁻¹
ASP	0.000 734	0.002 937	0.002 240	0.002 562
GLU	0.001 446	0.004 216	0.003 201	0.004 069
SER	0.000 634	0.001 881	0.001 352	0.001 566
GLY	0.001 057	0.002 583	0.001 277	0.001 965
HIS	0.003 203	0.001 500	0.001 495	0.000 956
ARE	0.000 809	0.001 708	0.001 150	0.001 476
THR	0.000 284	0.001 325	0.001 033	0.001 182
ALA	0.001 101	0.002 015	0.001 435	0.001 769
PRO	0.001 773	0.001 710	0.001 103	0.001 362
TYR	0.000 205	0.001 059	0.000 743	0.000 877
VAL	0.000 303	0.001 526	0.001 212	0.001 157
MET	0.000 240	0.000 416	0.000 346	0.000 626
CYS	0.000 0207	0.000 389	0.000 174	0.000 342
ILEU	0.000 252	0.000 776	0.000 806	0.000 915
LEU	0.000 484	0.002 116	0.001 706	0.001 660
PHE	0.000 276	0.001 346	0.000 962	0.001 030
LYS	0.000 952	0.002 042	0.001 658	0.001 898

过了其肉中的氨基酸含量,这说明王锦蛇心、蛇肺、蛇肠均具有食用方面的价值。通过实验发现王锦蛇中谷氨酸较其它氨基酸含量高,谷氨酸是中枢神经系统中重要的氨基酸类神经递质,在神经突触信息传递中起重要作用^[9],其健脑,促进脑细胞进行呼吸,提高智力等作用为开拓王锦蛇在医药方面的应用提供了一定的科学基础^[10],而王锦蛇在改善大脑机能方面的作用有待进一步研究。

本次实验采用的 Waters 公司的 PICO·TAG 氨基酸分析方法,该方法灵敏度好,重复性高,衍生物稳定,改进了传统方法分离度差的弱点,成功的分离测定了王锦蛇中的 17 种氨基酸,为王锦蛇在食用与药用两方面的开发利用提供了一定的实验依据。

由于本次实验使用的是 PICO·TAG 氨基酸分析方法,实验中的干燥、衍生等都是定量反应,

因此反应前的真空抽干显得尤为重要,真空度须达到 100 mTorr 以下,若未达到则会影响干燥、衍生等过程,影响实验结果。加入的干燥液和衍生剂都要通过漩涡与样品混匀,使反应充分。衍生剂必须临用前现配,否则会导致氨基酸衍生不完全,最终影响色谱分析结果。再者,本次实验所用到的流动相 A 为醋酸盐缓冲液,对 pH 值的要求较高(与要求值差不得超过±0.02),不准确的 pH 值会严重影响色谱分析结果。目前,国内外鲜有对王锦蛇中氨基酸含量测定的报道,因此本实验可以为王锦蛇资源的进一步开发利用和保护提供实验依据。

REFERENCES

- [1] LI Z X. Discussing on the snake medicine, food value and market development prospects [J]. Med World(医药世界), 2006(10): 5.
- [2] LIU J, ZHONG F S, HE H X, et al. Study the technique on feeding *Elaphe carinata* efficiently [J]. J Snake(蛇志), 2005, 17 (2): 72-75.
- [3] LU Y Y, LIU X H, WANG J, et al. The Keeled Ratsnake in Shandong Peninsula [J]. Sichuan J Zoology(四川动物), 2004, 24 (3): 281-283.
- [4] YU H, MOU S F. Method development for amino acid analysis [J]. Chin J Anal Chem (分析化学), 2005, 33(3): 398-404.
- [5] QIAN G S, SU X, LIU S K, et al. Determination of amino acids of Tianshen Anjisuan capsule by HPLC with 2,4-dinitrofluorobenzene derivation [J]. West China J Pharm Sci (华西药科学杂志), 2005, 20(2): 145-147.
- [6] YANG J, CHEN J, LI X X, et al. Determination of fingerprint of amino acids in garlic by derivation HPLC [J]. J Xinjiang Med Univ(新疆医科大学学报), 2010, 33(5): 509-511.
- [7] JIN W W, ZHAO Z X, LIU X H, et al. Determination of amino acids in protein of silk worm by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2010, 21(3): 537-539.
- [8] HAN L Q, ZHU H S, GUO Y J, et al. Comparative studies on the colostral amino acid content of three mammal species [J]. Sichuan J Zoology(四川动物), 2009, 28(4): 575-578.
- [9] WANG F Y, JIANG S Y, ZHANG Q J, et al. Analysis of amino acids of *Pterula umbrinella* Bres [J]. Food Sci(食品科学), 2004, 25(11): 233.
- [10] WEN M, ZHOU B, KANG C S, et al. Morphological changes of glutamic acid and GABA neurons in the CA3 area of hippocampus associated with aging in rats [J]. Chin J Gerontol(中国老年学杂志), 2009, 29(1): 8-11.

收稿日期: 2011-08-19