

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录 55,61-65.

[2] 桂建业,张琳. 离子色谱法测定饮用水中的 5 种卤代乙酸[J]. 色谱,2008,26(1):119-121.

[3] LEON B, BRETT P. Use of temperature programming to im-

prove resolution of inorganic anions, haloacetic acids and oxyhalides in drinking water by suppressed ion chromatography[J]. J Chromatography A, 2005, 1072(2): 207-215.

DOI 10.3870/yydb.2012.02.027

柱前衍生生化法测定晶帽石斛中总氨基酸含量*

李光¹, 李学兰¹, 陈曦^{1,2}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所云南分所, 云南景洪 666100; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要 目的 测定晶帽石斛中总氨基酸的种类及含量。方法 以 2,4-二硝基氟苯为衍生试剂,与晶帽石斛中氨基酸柱前衍生,用 Waters 600 高效液相色谱仪,菲罗门公司 Symmetry C₁₈ 色谱柱,以 0.05 mol·L⁻¹ 醋酸钠-醋酸缓冲液 (pH=6.4),加入 1% N,N-二甲基甲酰胺及乙腈:水(1:1)进行梯度洗脱,检测波长为 360 nm,柱温为 35 ℃,进样量为 20 μL。结果 各氨基酸的线性回归方程 r 值为 0.999 5~1.000 0 (n=5),平均回收率 99.34%~101.93%,RSD 0.54%~1.91%,n=6,氨基酸平均含量 3.79%。结论 该方法操作较简便,结果准确,氨基酸的损失量小,能够满足实验要求,为晶帽石斛开发提供了理论依据。

关键词 晶帽石斛;氨基酸;柱前衍生化;色谱法;高效液相

中图分类号 R286;R927.1 文献标识码 A 文章编号 1004-0781(2012)02-0202-04

Contents of Total Amino Acids in *Dendrobium crystallinum* Tchb. F. with Pre-column Derivatization Method

LI Guang¹, LI Xue-lan¹, CHEN Xi^{1,2} (1. Yunnan Branch, Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Jinghong 666100, China; 2. Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

ABSTRACT Objective To analyze the contents of amino acids in *Dendrobium crystallinum* Tchb. F. by using pre-column derivatization method. **Methods** The amino acids in *Dendrobium devonianum* were pretreated with 2,4-dinitrofluorobenzene and their derivatives were analyzed on Waters 600 HPLC using Symmetry C₁₈ column. Gradient eluent consisted of sodium acetate solution (pH=6.4) with 1% N,N-dimethylformamide, acetonitrile and water (1:1) was taken. The detection wavelength was 360 nm and column temperature was 35 ℃ and loading volume was 20 μL. **Results** The calibration curves for amino acids showed good linearity (r=0.999 5-1.000 0, n=5). The mean recoveries of amino acids were 99.34% - 101.93% with RSD as 0.54% - 1.91% (n=6). And the average content of amino acids was 3.79%. **Conclusion** The method is quick, simple with minimum loss of amino acids, which provides a theoretical basis for the *Dendrobium crystallinum* development.

KEY WORDS *Dendrobium crystallinum* Tchb. F.; Amino acids; Pre-column derivatization; HPLC

石斛为名贵中药材,在我国有悠久的药用历史,被《神农本草经》列为上品,认为该药“味甘、平。主伤中,除痹,下气,补五脏虚劳羸瘦,强阴。久服厚肠胃,

轻身延年。”目前广泛用于保健品、药品及石斛汤、石斛酒等饮品。目前市场流通石斛样品多为铁皮石斛、齿瓣石斛、晶帽石斛、金钗石斛等及其枫斗类,临床也多将这几种石斛混合应用。其中晶帽石斛 (*Dendrobium crystallinum* Tchb. F.) 种植技术要求低,产量较高,具有较高的经济价值。笔者在本实验中针对晶帽石斛中营养成分氨基酸类进行测定,以期完善晶帽石斛基础研究,为后期药效学研究提供理论依据。

目前已经报道的用于氨基酸柱前衍生的衍生试剂很多,主要有 2,4-二硝基氟苯(DNFB, 2,4-Dinitrofluoro

收稿日期 2011-07-31 修回日期 2011-09-13

基金项目 * 云南省科技重大项目“傣药南药特色资源评分及保育技术研究”(2008IF018);中国医学科学院药用植物研究所中央级公益性科研院所基本科研业务专项(YZYN-10-01)

作者简介 李光(1985-),男,河北安国人,硕士,研究方向:保健品及新药研发。电话:0691-2136981, E-mail:lhbg311@hotmail.com。

benzene)^[1]、邻苯二甲醛(OPA, O-Phthalic aldehyde)^[2]、氯甲酸苄甲酯(VMOC-Cl, 9-fluorenylmethyl chloroformate)^[3]、异硫氰酸苯酯(PITC, phenyl isothiocyanate)^[4]、丹磺酰氯(Dansyl-Cl, Dansylchloride)^[5]及 6-氨基喹啉-N-羧基琥珀酰亚胺氨基甲酸酯(AQC, 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidy carbamate)^[6]等。不同的衍生剂都有各自的不足,其中 DNFB 作为衍生剂具有成本低、衍生物稳定、操作简便等优点,被广泛应用。笔者利用 DNFB 柱前衍生化方法针对晶帽石斛中总氨基酸类成分进行测定。

1 仪器与试剂

1.1 实验药材 晶帽石斛药材购自晶帽石斛种植户,样品信息见表 1。

表 1 晶帽石斛样品信息表

Tab. 1 The sample informations of *Dendrobium crystallinum* Tchb. F.

编号	产地	采购日期
S1	云南勐海	2010 年 11 月 31 日
S2	云南勐腊	2011 年 1 月 7 日
S3	云南景洪	2011 年 1 月 5 日
S4	云南勐伴	2011 年 1 月 7 日
S5	老挝	2010 年 12 月 1 日
S6	云南勐腊尚勇镇	2011 年 1 月 7 日
S7	云南勐腊(老条)	2011 年 3 月 13 日
S8	云南勐腊(新条)	2011 年 3 月 14 日
S9	云南勐腊	2011 年 1 月 7 日
S10	云南勐腊	2011 年 1 月 7 日

1.2 实验试剂 醋酸钠(成都格雷西亚化学技术有限公司,分析纯,批号:20100322),醋酸(天津市光复精细化工研究所,分析纯,批号:20081112),N,N-二甲基甲酰胺(成都格雷西亚化学技术有限公司,分析纯,批号:20100317),DNFB(成都格雷西亚化学技术有限公司,分析纯,批号:201006211),碳酸钠(成都格雷西亚化学技术有限公司,分析纯,批号:201005161),乙腈(天津市风船化学试剂科技有限公司,分析纯,批号:071001),乙腈(美国 Fisher 公司,色谱纯,批号:L071012911),磷酸二氢钾(成都格雷西亚化学技术有限公司,分析纯,批号:201004Z71),氢氧化钠(成都格雷西亚化学技术有限公司,分析纯,批号:21004771),苯酚(天津市大茂化学试剂厂,分析纯,批号:100516),十八种氨基酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号:140624-200805)。

1.3 仪器 Waters 600 高效液相色谱仪,配 Waters 2489 紫外检测器,Empower 色谱工作站(美国沃特世公司);TGL16M 湘智离心机(安徽诚信启动设备有限公司);数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);电子天平(赛多利斯公司);分析天平(赛多利斯公司);酒精喷灯(上饶市教学仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters 600 高效液相色谱仪配 Waters 2489 紫外检测器,Empower 色谱工作站(美国沃特世公司)。色谱柱:菲罗门公司 Symmetry C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相(A):0.05 mol·L⁻¹醋酸钠-醋酸缓冲液(pH=6.4),加入 1% N,N-二甲基甲酰胺。流动相(B):乙腈:水(1:1),洗脱程序如表 2。检测波长:360 nm,流速:1 mL·min⁻¹,柱温:30 ℃。

表 2 梯度洗脱程序表

Tab. 2 Gradient elution program

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	82	18
10	55	45
11	60	40
24	50	50
25	45	55
30	32	68
38	30	70
45	0	100
60	0	100

2.2 标准溶液的配制 分别精密称取氨基酸对照品适量,置 50 mL 容量瓶,加水至刻度摇匀,精密量取 1.0 mL 置 10 mL 量瓶,依次加入 0.5 mol·L⁻¹碳酸钠(pH 为 9.0)溶液和 1% DNFB 乙腈溶液各 1.0 mL,摇匀后在 50 ℃水浴中避光加热 90 min,取出后加入磷酸盐缓冲液(称取磷酸二氢钾 0.68 g,加 0.1 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液 29.1 mL,加水定容至 100 mL,测得 pH 为 7.0)至刻度,作为对照品溶液。

2.3 样品水解及衍生化 精密称取过内径 297 mm(50 目)筛样品 0.500 0 g,置 20 mL 安瓿,加入含 3% 苯酚的 6 mol·L⁻¹盐酸溶液 10 mL,酒精喷灯封口,于 105 ℃加热 22 h,取出放至室温,过滤,蒸干,定容至 10 mL。取定容液 1 mL,依次加入 0.5 mol·L⁻¹碳酸钠(pH 9.0)溶液和 1% DNFB 乙腈溶液各 2.0 mL,酒精喷灯封口,50 ℃避光加热 90 min,得到溶液用孔径为 0.45 μm 微孔滤膜过滤,进样。

2.4 精密度实验 精密量取水解定容后样品溶液

1.0 mL,按“2.3”项制备供试品溶液。连续进样6次,分别测定样品中各氨基酸峰面积的RSD。结果表明RSD在0.231%~2.246%。说明仪器精密度良好,此仪器测得的数据可靠。

2.5 重复性实验 重复5次精密量取水解定容后样品溶液1.0 mL,按“2.3”项制备供试品溶液。测定样品中各氨基酸峰面积的RSD。结果表明RSD在0.128%~2.073%,RSD<3%,说明实验重复性结果良好。

2.6 线性关系考察 分别精密称取处方量氨基酸对照品适量,置100 mL量瓶,加水至刻度,摇匀,分别精密吸取1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL置10 mL安瓿,按“2.3”项制备供试品溶液。分别精密吸取2 μL注入液相色谱仪,记录色谱图,以样品浓度为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,进行线性回归,得线性方程,结果见表3。

表3 氨基酸线性实验结果

Tab.3 Linear test of amino acids

成分	线性方程	r	线性范围/ (mg·mL ⁻¹)
门冬氨酸	Y=28 383X-334.3	0.999 2	0.383 5~1.917 5
谷氨酸	Y=161 215X+121.8	0.999 6	0.098 6~0.493 0
丝氨酸	Y=33 764X-3 927.6	0.999 8	0.222 1~1.110 5
精氨酸	Y=14 546X+35 587	0.999 5	0.789 3~3.946 5
甘氨酸	Y=55 075X-339 873	0.999 5	1.072 2~5.361 0
苏氨酸	Y=33 388X-5 953.1	0.999 1	0.638 9~3.194 5
脯氨酸	Y=26 839X-154.3	0.999 5	0.334 0~1.670 0
丙氨酸	Y=46 252X-227.1	0.998 9	0.622 7~3.113 5
缬氨酸	Y=34 287X+916.3	0.999 7	0.451 9~2.259 5
异亮氨酸	Y=31 288X-730.7	1.000 0	0.554 1~2.770 5
半胱氨酸	Y=5 973.5X+112.5	0.999 4	0.646 8~3.234 0
赖氨酸	Y=32 166X+2 221	1.000 0	1.254 9~6.274 5
酪氨酸	Y=20 884X+23.667	0.999 9	0.036 5~0.182 5

结果表明,各氨基酸进样浓度在上述范围内,峰面积与浓度呈良好的线性关系。

2.7 溶液稳定性实验 精密量取水解定容后样品溶液1.0 mL,按“2.3”项制备供试品溶液。分别在0,2,4,6,8 h进样,共测定5次,结果氨基酸基本稳定。建议样品溶液制备完后8 h内完成。

2.8 回收率实验 按预实验中测定的各氨基酸含量,精密称取各氨基酸对照品适量,与样品混合,按“2.3”项制备供试品溶液,取20 μL注入高效液相色谱仪,测

定,计算各氨基酸回收率。结果表明各氨基酸含量平均值在99.34%~101.93%,RSD在0.54%~1.91%,说明各氨基酸的回收率数据符合要求。

2.9 样品测定 取晶帽石斛样品约0.5 g,按照“2.3”项制备进样,所得结果如图1~4及表4所示。

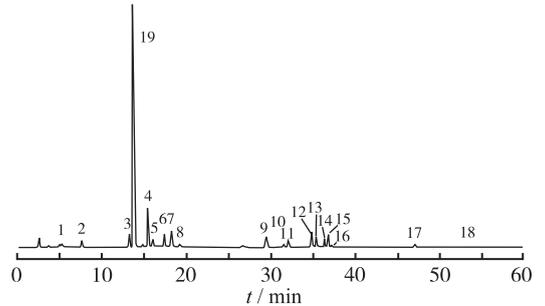


图1 18种氨基酸混合标准品色谱图

1. 门冬氨酸;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. 缬氨酸;10. 甲硫氨酸;11. 胱氨酸;12. 异亮氨酸;13. 亮氨酸;14. 色氨酸;15. 苯丙氨酸;16. 组氨酸;17. 赖氨酸;18. 酪氨酸;19. 衍生化试剂

Fig. 1 HPLC chromatograph of 18 amino acids

1. Aspartate; 2. Glutamate; 3. Serine; 4. Glycine; 5. Arginine; 6. Threonine; 7. Proline; 8. Alanine; 9. Valine; 10. Methionine; 11. Cystine; 12. Isoleucine; 13. Leucine; 14. Tryptophan; 15. Phenylalanine; 16. Histidine; 17. Lysine; 18. Tyrosine; 19. Derivatization reagents

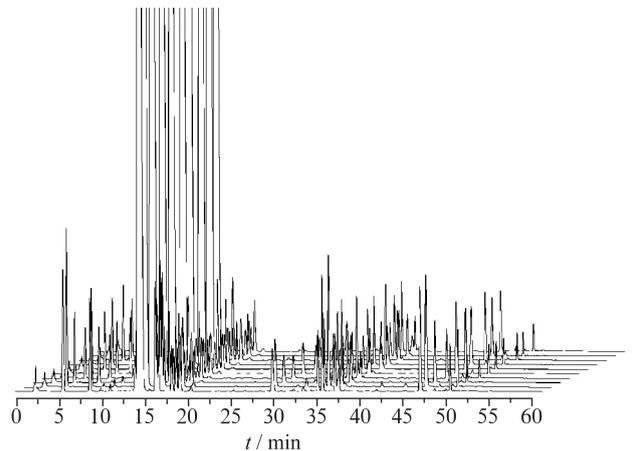


图2 S1-S10晶帽石斛样品色谱图

Fig. 2 HPLC Chromatograph of *Dendrobium crystallinum* Tchb. F. samples

3 讨论

采用DNFB与氨基酸的柱前测定晶帽石斛药材中各氨基酸的含量,衍生反应条件易于控制,反应简单,分析结果的精密度、线性相关性、重复性均较好,回收率高。

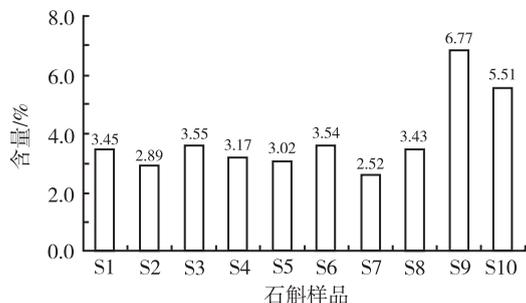


图3 晶帽石斛样品中总氨基酸含量

Fig. 3 Total content of amino acids in *Dendrobium crystallinum* Tchb. F. samples

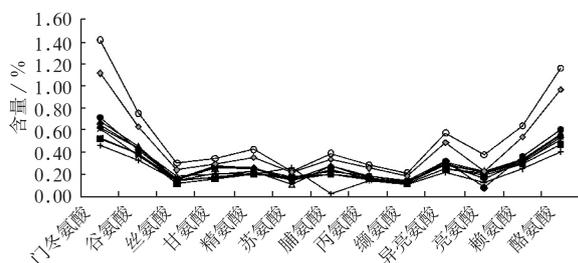


图4 各晶帽石斛样品中氨基酸含量

◆ S1; ■ S2; ▲ S3; ▽ S4; ✕ S5; ● S6; + S7; ◆ S8; ◇ S9; ○ S10

Fig. 4 Content of amino acids in each of *Dendrobium crystallinum* Tchb. F. samples

◆ S1; ■ S2; ▲ S3; ▽ S4; ✕ S5; ● S6; + S7; ◆ S8; ◇ S9; ○ S10

表4 晶帽石斛样品中氨基酸保留时间及含量

Tab. 4 Retention time and content of amino acids in *Dendrobium crystallinum* Tchb. F. samples

成分	保留时间/min	样品平均含量/%
门冬氨酸	5.35	0.70
谷氨酸	8.08	0.43
丝氨酸	13.38	0.15
甘氨酸	15.64	0.21
精氨酸	15.75	0.23
苏氨酸	16.16	0.15
脯氨酸	17.60	0.21
丙氨酸	18.38	0.16
缬氨酸	29.58	0.11
异亮氨酸	34.93	0.30
亮氨酸	35.33	0.18
赖氨酸	47.13	0.34
酪氨酸	50.71	0.61
总计		3.78

笔者在本实验中分别针对水解条件及衍生化条件进行了考察,发现衍生化的温度与时间对结果影响较大,建议衍生化温度为 50 ℃,时间为 90 min。衍生化试剂量增加,峰面积没有明显改善。水解温度对结果影响较大,可能是因为随着水解时间的延长,会破坏氨基酸的结构或导致各类氨基酸之间相互转化而影响结果。

现代营养学表明^[7],谷氨酸、天冬氨酸、丙氨酸等在人体氮平衡中发挥重要作用,晶帽石斛中这几种氨基酸含量较高,并且所含氨基酸种类符合世界粮农组织/世界卫生组织/联合国大学^[8]提出的成人氨基酸需求量模式,也为确定晶帽石斛的营养价值提供了理论依据。

(志谢:感谢王云强老师在样品采集过程中给予的大力支持!)

参考文献

[1] 程勇,陈玲,邓晓春. 柱前衍生 HPLC 法测定烟叶中 20 种游离氨基酸含量[J]. 烟草科技,2010,(8): 34-40.

[2] 朱智甲. 邻苯二甲酰柱前衍生反相高效液相色谱法测定水牛角中氨基酸的含量[J]. 分析化学,2000,28(5): 609-612.

[3] 楼永明. FMOc 柱前衍生化 HPLC 法测定阿仑膦酸钠片含量及有关物质 4-氨基丁酸[J]. 中国药事,2009,23(10):974-977.

[4] 邹秦文,肖新月,程显隆,等. 百令胶囊中 17 种氨基酸的柱前衍生化 RP-HPLC 法含量测定[J]. 药物分析杂志,2010,30(9):1630-1635.

[5] 朱晓伟,高新星,安芳,等. 柱前衍生化 HPLC-荧光检测法测定高血压患者尿液中 22 种游离氨基酸的浓度[J]. 中国药房,2010,21(30):2823-2825.

[6] 侯松崑,孙敬,何红波,等. AQC 柱前衍生反相高效液相色谱法测定土壤中氨基酸[J]. 分析化学,2006,34(10): 1395-1400.

[7] 鲍曼·拉塞尔. 现代营养学[M]. 北京:化学工业出版社,2004:54.

[8] MILLWARD D J. The nutritional value of plant-based diets in relation to human amino acid and protein requirements [J]. Proc Nutri Soc,1999,58(2): 249-260.

DOI 10.3870/yydb.2012.02.028