

## 柱前衍生 RP-HPLC 法测定泽泻中氨基酸的含量

崔淑芬<sup>1,2</sup>, 许柏球<sup>1</sup>, 王小如<sup>2,3\*</sup>

(1. 深圳职业技术学院 生物应用工程系, 广东 深圳 518055; 2. 厦门大学化学化工学院 现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005; 3. 国家海洋局第一海洋研究所 青岛现代分析技术及中药标准化重点实验室, 山东 青岛 266061)

**摘要:**目的 分析不同产地泽泻中氨基酸含量及其特征性。方法 采用邻苯二甲醛(OPA)、氯甲酸苄甲酯(FMOC)联合柱前衍生 RP-HPLC 测定泽泻中的 17 种氨基酸。结果 氨基酸质量浓度与峰面积呈良好的线性关系,  $r$  均在 0.99 以上。不同产地泽泻中氨基酸含量有一定差别。结论 该方法适宜泽泻药材中氨基酸含量的测定。

**关键词:** 泽泻; 氨基酸; 反相高效液相色谱; 柱前衍生

**中图分类号:** R286.02 **文献标识码:** B **文章编号:** 0253-2670(2004)08-0867-03

## Determination of amino acids in *Alisma orientale* by pre-column derivatization of RP-HPLC

CUI Shufen<sup>1,2</sup>, XU Bai-qiu<sup>1</sup>, WANG Xiao-ru<sup>2,3</sup>

(1. Department of Biological Applied Engineering, Shenzhen Polytechnic College, Shenzhen 518055, China;

2. The key Laboratory of Analytical Science, Ministry of Education, College of Chemistry and Chemical

Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. Qingdao Key Laboratory of Analytical

Technology Development and Standardization of Chinese Medicines, First Institute

Oceanography of State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China)

**Abstract:** **Object** To determine the contents of amino acids and study the characters of *Alisma orientale* (Sam. Juzep.) from different habitats. **Methods** The samples of *A. orientale* from three different areas were derived with  $\alpha$ -phthalaldehyde (OPA) and 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) in pre-column, and separated by RP-HPLC. Seventeen kinds of amino acids were determined. **Results** The concentration of amino acids and peak areas achieved a nice linear relations ( $r$  is higher than 0.99). There were differences of the amino acid in *A. orientale* from different habitats. **Conclusion** This method is suitable for the determination of amino acid in *A. orientale*.

**Key words:** *Alisma orientale* (Sam.) Juzep.; amino acid; RP-HPLC; pre-column derivatization

泽泻为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientale* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎, 为利水渗湿之要药。主产福建、四川和江西等地, 药材分别称为“建泽泻”、“川泽泻”和“江泽泻”, 以福建、四川产者最为著名, 其中又以建泽泻质量最佳, 被载入中国道地药材的南药。近年来, 柱前衍生 RP-HPLC 法测定氨基酸的技术取得了很大的进展并有逐渐取代传统氨基酸分析仪的趋势。邻苯二甲醛(OPA)衍生法具有衍生步骤简单、反应速度快、剩余试剂不干扰测定的特点, 因此在柱前衍生试剂中应用最广泛, 但此法不能测定胱氨酸和脯氨酸的含量<sup>[1]</sup>。氯甲酸苄甲酯(FMOC)能与胱氨酸和脯氨酸生成稳定的荧光衍生物<sup>[2]</sup>。本实验采用 OPA 和 FMOC 做衍生剂, 优化色谱分离条件, 测定了泽泻中氨基酸含量, 可为泽泻

的质量评价提供依据。

### 1 仪器与材料

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪, 四元梯度泵, 在线真空脱气机, 7725i 手动进样器 (20  $\mu$ L 定量环), 二极管阵列检测器; 分析柱: Hypersil ODS C<sub>18</sub> 柱 (200 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m); HP-A.09.01 化学工作站; Grant XB14 超声波清洗机; 滤膜 (美国 Millipor Corporation, 孔径 0.45  $\mu$ m)。

天冬氨酸 (Asp)、谷氨酸 (Glu)、丝氨酸 (Ser)、组氨酸 (His)、甘氨酸 (Gly)、苏氨酸 (Thr)、丙氨酸 (Ala)、精氨酸 (Arg)、酪氨酸 (Tyr)、胱氨酸 (Cys)、缬氨酸 (Val)、蛋氨酸 (Met)、苯丙氨酸 (Phe)、异亮氨酸 (Ile)、亮氨酸 (Leu)、赖氨酸 (Lys)、脯氨酸 (Pro) 标准品和混合品、OPA 衍生剂购于 Agilent 公司; 正缬氨酸 (Norvaline), 内

\* 收稿日期: 2004-02-18

基金项目: 国家自然科学基金 2003 重点项目 (20235020); 福建省泽泻 GAP 研究项目 (2002 Y024)

作者简介: 崔淑芬 (1969—), 女, 辽宁抚顺人, 在职博士研究生, 主要从事中药及海洋药物研究。Tel: (0755) 26731146

E-mail: shufencui@163.com

标)、Fmoc 衍生剂为 Sigma 公司产品;甲醇、乙腈(色谱纯),其他试剂均为分析纯,超纯水。

泽泻采自福建建瓯,四川都江堰和江西广昌,由本院张少艾副教授鉴定为泽泻 *Alisma orientale* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备:将泽泻生药低温烘干,粉碎,过 60 目筛。称取 100 mg 置玻璃试管中,加 6 mol/L 盐酸 10 mL,抽真空立即封管,放入烘箱,在 110 ℃ 下水解 24 h,冷却后打开水解管,转移至蒸发皿中,水浴挥干盐酸,再用水洗数次,彻底挥干盐酸,用 0.1 mol/L 盐酸溶解,并定容至 25 mL,0.45 μm 滤膜滤过,滤液备用。精密量取滤液 10 μL,定量加入 10 μL 正缬氨酸和 72 μL 0.4 mol/L 硼酸缓冲液(pH 9.5),最后加入 5 μL 邻苯二甲醛(OPA)、3 μL 氯甲酸苄酯(Fmoc)衍生剂,混匀,衍生 2 min,即得。

2.2 分析条件:流动相 A:1 000 mL 20 mmol/L 醋酸钠(pH 7.2),加入 180 μL 三乙醇胺,加 3 mL 四氢呋喃,超声混合 10 min;流动相 B:20 mmol/L 醋酸钠(pH 7.2)-乙腈-甲醇(1 2 2),超声处理 10 min。流动相程序洗脱条件见表 1。柱温:40 ℃;检测波长:338 nm,带宽 10 nm;参比波长:399 nm,带宽 20 nm;20 min 后检测波长:262 nm,带宽 16 nm;参比波长:324 nm,带宽 8 nm。进样量 20 μL。以保留时间定性,内标法定量。

表 1 流动相梯度洗脱程序

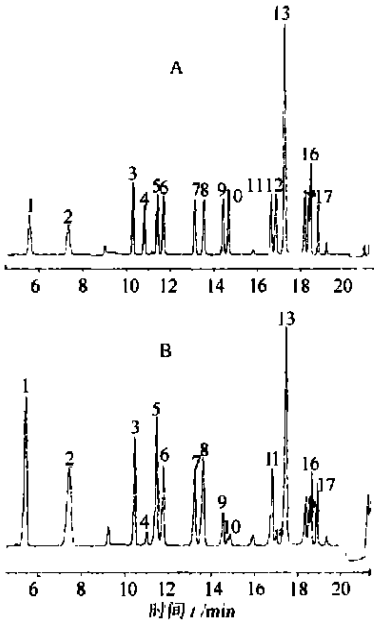
| Table 1 Gradient elution of flow phase |          |          |                              |
|----------------------------------------|----------|----------|------------------------------|
| 时间/min                                 | 流动相 A/ % | 流动相 B/ % | 体积流量/(mL·min <sup>-1</sup> ) |
| 0                                      | 100.0    | 0.0      | 0.45                         |
| 17.00                                  | 40.0     | 60.0     | 0.45                         |
| 18.10                                  | 0.0      | 100.0    | 0.45                         |
| 18.50                                  | 0.0      | 100.0    | 0.80                         |
| 23.90                                  | 0.0      | 100.0    | 0.80                         |
| 24.00                                  | 0.0      | 100.0    | 0.45                         |
| 25.00                                  | 100.0    | 0.0      | 0.45                         |

2.3 工作曲线的绘制:将 17 种混合氨基酸标准品(浓度为 1 nmol/μL)用 0.1 mol/L 盐酸依次稀释成 0.500、0.250、0.100、0.025 nmol/μL,备用。取 58.6 mg 正缬氨酸溶于 50 mL 0.1 mol/L HCl 溶液中,配成 10 nmol/μL 储备液,于 0~4 ℃ 冰箱保存,使用时用 0.1 mol/L HCl 稀释至 1 nmol/μL。取上述氨基酸混合标准品溶液各 10 μL,分别加入等体积的 1 nmol/μL 正缬氨酸(Nval)内标溶液,进行 HPLC 分析。以各氨基酸与内标物的色谱峰峰面积之比为纵坐标,氨基酸浓度为横坐标作图,得各氨基酸的工作曲线,其线性回归方程见表 2。18 种氨基

酸混合标准溶液和泽泻样品中氨基酸的液相色谱图见图 1。可见,在选定的条件下,氨基酸混合标准品得到了较理想的分离,样品中的氨基酸也得到了很好的分离。

表 2 17 种氨基酸的回归分析结果

| Table 2 Regression analysis of 17 kinds of amino acids |                          |        |
|--------------------------------------------------------|--------------------------|--------|
| 氨基酸                                                    | 线性方程                     | r      |
| Asp                                                    | $Y = 0.9054X - 0.005959$ | 0.9998 |
| Glu                                                    | $Y = 1.0130X - 0.001492$ | 0.9999 |
| Ser                                                    | $Y = 1.0204X - 0.002801$ | 0.9999 |
| His                                                    | $Y = 0.7890X - 0.007129$ | 0.9994 |
| Gly                                                    | $Y = 1.0299X - 0.008143$ | 0.9996 |
| Thr                                                    | $Y = 0.9952X - 0.005748$ | 0.9999 |
| Ala                                                    | $Y = 1.0332X - 0.005887$ | 0.9999 |
| Arg                                                    | $Y = 1.0313X - 0.005784$ | 0.9998 |
| Tyr                                                    | $Y = 0.9583X - 0.004321$ | 0.9999 |
| Cys                                                    | $Y = 0.8601X - 0.007983$ | 0.9995 |
| Val                                                    | $Y = 1.0264X - 0.003728$ | 0.9999 |
| Met                                                    | $Y = 1.0448X - 0.004881$ | 0.9999 |
| Phe                                                    | $Y = 0.9543X - 0.005262$ | 0.9998 |
| Ile                                                    | $Y = 0.7347X - 0.001974$ | 0.9994 |
| Lys                                                    | $Y = 1.2515X - 0.017340$ | 0.9992 |
| Leu                                                    | $Y = 0.5728X - 0.001067$ | 0.9999 |
| Pro                                                    | $Y = 0.7098X - 0.009903$ | 0.9981 |



1-Asp 2-Glu 3-Ser 4-His 5-Gly 6-Thr 7-Ala  
8-Arg 9-Tyr 10-Cys 11-Val 12-Met 13-Nval  
14-Phe 15-Ile 16-Lys 17-Leu 18-Pro

图 1 氨基酸混合标准溶液(A)和福建省泽泻样品(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of amino acids mixed standard solution (A) and *A. orientale* samples collected from Fujian Province (B)

2.4 精密度试验:用氨基酸混合标准溶液做 5 次平行试验,结果 Pro 和 Lys 的偏差较大,RSD 分别为

7.82 %、5.90 % ,这可能与其衍生化反应程度或衍生物的稳定性有关。其他氨基酸 RSD 均在 1 % ~ 5 %。

2.5 回收率试验:采用单点和多点加入法将各氨基酸标准溶液定量加入样品溶液中,进行试验,结果各种氨基酸的回收率为 95.2 % ~ 114.2 %。

2.6 样品分析:对福建、四川和江西 3 个泽泻主产区的泽泻样品中氨基酸含量进行分析,结果见表 3。可见,3 个产地的泽泻中都含有大量的氨基酸,总量在 17.24 % ~ 18.86 % ,含量较高的是天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸和亮氨酸,质量分数在 1.40 % ~ 2.30 %。不同产地泽泻中氨基酸含量与分布都有一定差异,天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、苏氨酸、丙氨酸、赖氨酸和脯氨酸 9 种氨基酸及总氨基酸含量由高到低的顺序皆为:建泽泻、川泽泻和江泽泻。但江泽泻中的精氨酸和胱氨酸的含量比建泽泻和川泽泻高。其余氨基酸含量相差不大。

表 3 不同产地泽泻中氨基酸测定结果

Table 3 Amino acids in *A. orientale* collected from different habitats

| 氨基酸 | 质量分数/ % |         |         |
|-----|---------|---------|---------|
|     | 江西      | 四川      | 福建      |
| Asp | 1.639 7 | 1.866 8 | 2.296 0 |
| Glu | 1.402 8 | 1.640 2 | 1.965 2 |
| Ser | 0.672 5 | 0.787 3 | 0.888 5 |
| His | 0.372 7 | 0.334 6 | 0.411 7 |
| Gly | 0.692 7 | 0.834 2 | 0.949 4 |
| Thr | 0.819 4 | 0.830 9 | 1.053 4 |
| Ala | 0.707 8 | 0.761 6 | 0.800 6 |
| Arg | 2.175 5 | 1.902 0 | 1.933 6 |
| Tyr | 1.074 5 | 1.143 7 | 1.011 6 |
| Cys | 1.089 0 | 0.690 7 | 0.732 8 |
| Val | 1.158 4 | 1.322 8 | 1.316 6 |
| Met | 0.425 2 | 0.374 5 | 0.372 3 |
| Phe | 1.447 0 | 1.254 6 | 1.354 4 |
| Ile | 0.592 9 | 0.725 4 | 0.617 9 |
| Lys | 0.559 1 | 0.591 3 | 0.690 7 |
| Leu | 1.680 4 | 1.830 3 | 1.638 9 |
| Pro | 0.730 5 | 0.639 8 | 0.829 7 |

3 讨论

3.1 氨基酸分析在医药、食品和动植物代谢产品检测等方面应用非常广泛,国外早已开展了氨基酸高效液相色谱检测方法的研究工作<sup>[3,4]</sup>,国内也进行了这方面的探索<sup>[5,6]</sup>。本实验采用 OPA 与 FMOC 联合柱前衍生,衍生化反应 2 min 内完成,带伯、仲氨基的氨基酸同时得到测定,是一种理想的全谱氨

基酸分析方法。18 种氨基酸在 22 min 内峰完全,分析时间短。良好的梯度洗脱使各个氨基酸峰得较好分离,定量结果比较可靠。

3.2 pH 值对本法的分析结果有重要影响,流动相的最佳 pH 值为 7.2 ±0.025。pH 值小于 7.1,氨基酸出峰不完全;pH 值大于 7.3,色谱峰出峰时间提前,尤其 10 ~ 16 min 出峰的氨基酸提前明显,影响色谱分离度。OPA 衍生化反应的 pH 值要大于 8.5,而 FMOC 衍生化反应的 pH 值必须大于 9.5。采用 6 mol/L 盐酸水解样品后,残留的酸必须挥发干净,否则会严重影响氨基酸的测定,多数氨基酸不出峰。

3.3 在方法的建立过程中,几个主要环节需要特别注意:样品水解时,一定要水解充分(110 °C 水解 24 h),否则就会造成不出峰的现象。样品衍生时应严格控制衍生的时间,保证衍生时间足够;另外温度不可过低,否则将造成衍生不完全。本法流动相中含有无机盐,应控制柱温(40 °C 较佳),柱温不可过低,过低将易导致流动相中出现结晶,堵塞色谱柱,产生柱压过高等现象。

致谢:样品收集得到厦门大学-开元区高新技术研究开发基地王文慎经理的帮助;深圳职业技术学院 2002 级制药专业陈颖珠、林丽琼参加了本研究的实验工作。

References :

[1] Antoine F R, Wei C. HPLC method for analysis of free amino acids in fish using *o*-phthaldialdehyde pre-column derivatization [J]. *J Agr Food Chem*, 1999, 47:5100-5107.

[2] Peter A. High performance liquid chromatographic determination of free amino acids in algae [J]. *Liq Chromatogr Technol*, 1999, 22(7): 1077-1093.

[3] Tapuhi Y, Miller N, Karqer B L. Practical considerations in the chiral separation of *o*-amino acids by reversed-phase liquid chromatography using metal chelate additives [J]. *J Chromatogr*, 1981, 205: 325-337.

[4] Rene K, You C. Liquid chromatographic determination of amino acids after gas-phase hydrolysis and derivatization with (dimethylamino) azobenzenesulfonyl chloride [J]. *Anal Chem*, 1986, 58(12): 2375-2379.

[5] Mou D H. Determination of amino acids by pre-column derivatization with *o*-phthaldialdehyde (OPA) and reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 1997, 15(4): 319-321.

[6] Chen P, Na P J, Mao X F, et al. Determination of amino acids of the wall paintings of Dunhuang Mogao Grottoes by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *Anal Test Technol Instrum* (分析测试技术与仪器), 2002, 8(2): 99-102.