

- [9] Li Y. Experiment of the anticancer functions of 8 kinds of Chinese medicinal herb [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2001, 12(7): 587-588.
- [10] Xiao Y L. Clinical application of Juzaowan on anti-tumor in 240 cases [J]. *Chin J Surgery Integrated Tradit West Med* (中国中西医结合外科杂志), 1997, 3(2): 132.
- [11] Gao S. Recent observation of Lianhuabao capsule in treating advanced malignant tumor in 118 cases [J]. *China's Naturopathy* (中国民间疗法), 2000, 8(7): 28-29.
- [12] Xu L, Liu J X. Effect of YiFei Kangliu Yin on lung cancer metastasis and immune function [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1997, 17(7): 401-403.
- [13] Zhang B, Hu P L, Huang G X, et al. Effect observation of Qingduliyuan Pill on nasopharyngeal carcinoma radiation induced acute oropharyngitis [J]. *Guangdong Med J* (广东医学), 2003, 24(6): 658-659.
- [14] Chen N J, Jin Y, Lai Y Q. Clinical observation of Loulian capsule in treating advanced gastrointestinal malignant tumor with a combination of chemotherapy [J]. *Fujian Med J* (福建医药杂志), 1999, 21(6): 42-43.
- [15] Xu Q Y. Pharmacological research survey of Chinese anti-cancer medicine [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2001, 12(2): 165.
- [16] Gao D, Gao Y L, Bai P. Influence of *Rhizoma Paridis* on calcium messenger system in Hela cell [J]. *J Fujian Coll Tradit Chin Med* (福建中医学院学报), 2003, 13(4): 26-28.
- [17] Bian H R, Li X N, Wang H M. Advances in studies and applications of *Rhizoma Paridis* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2002, 25(3): 218-220.
- [18] Wang Q, Xu G J. Inhibition of *Paris polyphlla* Sm. var. on reverse transcription polymerase [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1987, 18(3): 195-198.
- [19] Zhang C L, Wu Z K, Ma H L, et al. Development of studies on the natural steroidal saponins biological activities [J]. *J Northwest Forest Univ* (西北林学院学报), 2003, 18(2): 95-100.

氨基酸的柱前衍生高效液相色谱分析在中草药研究中的应用

罗晓健¹, 吴志鹏¹, 黄璐琦², 吕爱平¹, 杨世林¹

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006; 2. 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

中药中含有大量的多种人类所需的氨基酸, 它不仅是人类补充营养的重要来源, 更在发挥药效时起着不可或缺的作用。因此, 氨基酸分析是中药有效成分分析的重要组成部分。早期的氨基酸分析是通过离子交换树脂分离, 再进行柱后衍生生化反应, 衍生物以紫外检测器检测, 但该方法的分析时间长、操作复杂、灵敏度低, 且仪器价格昂贵, 严重限制了它的推广应用。近年来, 随着色谱法的迅猛发展, 分析速度、灵敏度以及自动化程度不断提高, 氨基酸分析方法也有了长足的进步, 不论是检测手段, 还是衍生方法都趋于完善。本文主要介绍分析中药中氨基酸应用较广的几类反相高效液相色谱分析方法。

1 邻苯二甲酰(OPA)法

OPA 法是由 Roth 等于 1971 年首先提出, 用 OPA 加上巯基试剂, 30 s 内与初级氨基酸在碱性条件下反应生成 1-硫代-2-烷基异吲哚, 可作高灵敏度的荧光检测, 也可作紫外检测, 其检测限可分别达到 10^{-15} 和 10^{-12} mol 水平。巯基试剂早期多采用 2-巯基乙醇, 但考虑到样品分离及实验安全, 继而改进使用 3-巯基丙酸代替。衍生时间一般控制在 2 min 之内, 加入一定量的磷酸 (pH 3.0) 缓冲液可以中止衍生生化反应, 采用梯度洗脱, 可在 15 min 内分离 18 种氨基酸^[1]。本方法的优点是衍生反应迅速, 分辨率、灵敏度高, 成本低, 且过量衍生试剂不干扰分离; 主要缺点是不能与二级氨基酸 (如脯氨酸、羟脯氨酸等) 直接反应, 必要时需配合其他技术 (如氯甲酸苄胺法^[2]), 并且氨基酸衍生物极不稳定, 信号衰减极快。朱智甲^[3]用此方法在 32 min 内分离测定珍珠母中的 8

种氨基酸含量, 线性良好, 相关系数在 0.998 4~0.99 4, 加样回收率在 95%~105%。陈健等^[4]以该法联合氯甲酸苄胺酯法分离了野马追中的 17 种游离、结合氨基酸, 花蕾中总氨基酸为 65.10 mg/g, 人体必需氨基酸占总氨基酸的 32.44%, 且花蕾中的氨基酸质量分数普遍较高, 大约是茎叶中的 2~4 倍。羚羊角和水牛角都具有清热解毒的功效, 但羚羊角药材较为贵重, 为作有效鉴别, 李晓蒙等^[5]使用该法对羚羊角和水牛角中的氨基酸进行测定, 发现羚羊角中天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、酪氨酸含量相对较高, 水牛角中则丙氨酸、缬氨酸含量相对较高, 为这两种药材的鉴别提供了依据。

2 2,4-二硝基氟苯(FDNB)衍生法

FDNB 与氨基酸在碱性环境中于 60 °C 下衍生 30 min, 生成 2,4-二硝基苯氨基酸, 有很好的稳定性, 4 °C 下避光保存一个月响应值无明显变化。生成的衍生物由于硝基苯环的引入, 在 350 nm 处有强的紫外吸收, 紫外检测灵敏度可达 10^{-12} mol。同时色谱分离时间较短, 分析结果的准确性、重复性均较好^[6]。该法的主要缺点是衍生生化副产物会影响分离效果; FDNB 熔点低, 室温下即熔融, 影响操作。红景天具有抗疲劳、抗衰老、恢复体脑机能等功效, 是较理想的环境适应和滋补强身药, 王陆黎等^[7]应用此法比较不同产地、栽培方式红景天的 18 种水解氨基酸的质量分数, 发现各地氨基酸总量野生红景天根皆高于园栽; 其中 10 种药效、12 种必需、半必需和 13 种甜味氨基酸分别占总量的 36.0%~64.9%、50.6%~70.4%、69.8%~77.9%。虎眼万年青多用全草或球茎入药, 用于消炎和抗癌。杨智蕴等^[8]利用此法检测到虎眼万年青含

收稿日期: 2004-09-13

作者简介: 罗晓健 (1960—), 教授, 博士, 现工作于中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 主要研究中药新药制剂。

Tel: (0971) 7119619 E-mail: luoxj98@yahoo.com.cn

有18种氨基酸,并比较了不同用药部位总氨基酸,发现茎中的总氨基酸质量分数达15.93%,均较根、叶中的高。板蓝根具有清热解毒、凉血利咽之功效,临床上用于防治流感和病毒性感染,长期以来没有统一的质量控制指标。陈矛等^[9]采用该方法对板蓝根颗粒中精氨酸进行检测,结果表明0.67~5.34 mg线性关系良好,相关系数可达0.999 9,平均加样回收率98.4%,可以达到有效质量控制的目的。李芳等^[10]在前基础上进一步改进,采用2,4-二硝基氯苯(CDNB)为衍生化试剂,原理同FDNB法,但衍生化试剂CDNB价廉易得,理化性质稳定,制备试样方便、简单,且过量的试剂对测定无干扰。本方法缺点主要是衍生时间过长,需要约1 h,而赖氨酸会生成二级衍生物,使其定量难度增加。

3 异硫氰酸苯酯(PITC)衍生法

PITC作为柱前衍生剂与一、二级氨基酸在碱性条件、室温下衍生10 min左右,然后经两步快速蒸发,经偶合反应生成苯基乙内酰硫脲(PTC)-氨基酸,衍生物单一、稳定,紫外检测(254 nm)灵敏度可达 10^{-12} mol,分辨率高,分析时间短,12 min即可分析18种氨基酸。但该方法也存在以下缺点:氨基酸衍生时需充分干燥以除去干扰因素,杨菁等^[11]改进以正己烷排除干扰,相对简化了实验步骤;本方法需专门的衍生装置在无水状态下进行,且PITC毒性大,还会降低分析柱的使用寿命。香菇多糖-十八氨基酸口服液是一种营养食品类口服液,它具有增强机体抵抗力等功效。林红等^[12]应用PITC法测定该口服液中氨基酸的质量浓度,18种氨基酸的回收率为95.35%~98.54%,RSD为0.87%~3.2%($n=5$),口服液中含总氨基酸3.48 g/100 mL。芦笋是具有抗癌作用的食物,为充分了解、利用其价值,黄莺莺^[13]以本方法12 min检测了其中的18种氨基酸,相关系数均达0.999以上,最低检测浓度为 10^{-12} mol。

4 氯甲酸苄基酯(FMOC)衍生法

FMOC是多肽合成的氨基保护剂,pH 7.7环境中能与一、二级氨基酸在30 s左右衍生完全。反应产物以荧光检测器检测,灵敏度可达 10^{-15} mol水平,且在4℃下避光储存13 d性质稳定。此法的最大缺点是FMOC-Cl及其水解产物FMOC-OH均有同FMOC-氨基酸类似的荧光干扰,用戊烷抽提或采用胺基金刚烷与过量FMOC-Cl试剂反应等方法可相对地减少干扰,但仍不十分完善,有待进一步改进。另外,酪氨酸与半胱氨酸衍生物荧光极易猝灭,不能用此法测定。张琳等^[14]对FMOC法进一步改进,自行合成咪唑-9-乙基氯甲酸酯(CEOC)为衍生试剂,在pH 9.0的环境中与氨基酸反应1~2 min,因在分子内引入一个含孤对电子的氮原子,整个分子的共轭体系加强,使得衍生物荧光发射强度比FMOC强,平均检测限可达 22.8×10^{-15} mol,其中酪氨酸为 5.3×10^{-15} mol,光胱氨酸为 126×10^{-15} mol,且当衍生试剂过量4倍时,在此实验条件下不干扰。衍生物稳定性较好,在24 h内色谱峰高且无明显变化。

5 6-氨基喹啉-N-羧基琥珀酰亚胺基氨基酸酯(AQC)衍生法

1993年Cohen等提出AQC法,AQC是一种具有反应活性的杂环氨基甲酸酯,它本身荧光性很弱,能与伯氨基酸和仲氨基酸反应,迅速生成高稳定性的脲,该衍生物在室温一周内几乎不发生变化。过量的衍生剂对分析没有干扰。AQC与氨基酸在室温下60 min反应完全,而升高温度可加快其反应速度,由于衍生试剂能与水和甲醇反应,高贵等^[15]改进使衍生反应在55℃金属浴中进行10 min便可反应完全。荧光检测限约为 195×10^{-15} mol,紫外检测限是 1.0×10^{-15} mol,整个洗脱程序18 min内可分离18种氨基酸。冯光等^[16]使用AQC法检测出蜂胶中有5种氨基酸。

6 其他

目前国内已报道衍生试剂还有丹酰氯(Dan-Cl),胱氨酸的Dan-Cl衍生物线性响应特别好,是目前柱前衍生法中能定量测定胱氨酸的首选方法。二甲氨基偶氮苯磺酰氯(DABS-Cl)衍生法,衍生物极其稳定,室温下可保持一个月以上。*N*-羧基琥珀酰亚胺-荧光素-*O*-乙酸酯(SIFA)、*N*-羧基琥珀酰亚胺-3-吡啶乙酸酯(SIIA)、*N*-羧基琥珀酰亚胺- α -萘乙酸酯(SINA)等,它们的主要特点是衍生试剂干扰小,且不与羟基、巯基等反应。

7 结语

与柱后衍生(如氨基酸自动分析仪)相比较,柱前衍生分析的成本低、灵敏度高、分析时间短;而蒸发光散射-高效液相色谱法(ELSD-HPLC)相对来说增加了样品的稳定性,但需专门配备仪器,且灵敏度不高,所以柱前衍生高效液相色谱法是值得推广应用的一种氨基酸分析方法。基于中药化学成分的复杂性和多样性,在选择氨基酸衍生方法时,更需全面地考虑各因素的影响,如衍生速度、条件、可控性及简便程度,衍生物稳定性,分析时间,杂质干扰,灵敏度,选择性和成本等方面,根据不同的需求选择适宜的方法。

References

- [1] Feng L, Chen Z Y, Wang B X, et al. The determination of free amino acids in tobacco by pre-column derivatization of RP-HPLC [J]. *J Yunnan Univ-Nat Sci* (云南大学学报·自然科学版), 2003, 25(增刊): 241-245.
- [2] Ye Y. RP-HPLC determination of amino-acids with OPA-FMOC pre-column derivatization [J]. *Food Sci* (食品科学), 2002, 23(9): 91-93.
- [3] Zhu Z J. Determination of amino acids in peral shell by RP-HPLC with OPA pre-column derivatization PTCA B [J]. *Physi Test Chem Anal Part B: Chem Anal* (理化检验—化学分析), 2000, 36(3): 97-99.
- [4] Chen J, Yao C. Determination of amino acids in *Eupatorium lindleyanum* DC. by pre-column derivatization RP-HPLC [J]. *J Chem Ind Forest Prod* (林产化工通讯), 2003, 37(5): 7-9.
- [5] Li X M, He X R. The differentiation of *bubalus bubalis* Linnaeus. and *Saiga tatarica* Linnaeus. by HPLC [J]. *Acad J Guangdong Coll Pharm* (广东药学院学报), 2003, 19(2): 96-97.
- [6] Liu H Z, You R C. Improved determination of amino acids by pre-column derivation with 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene [J]. *Subtrop Plant Res Commun* (亚热带植物通讯), 1999, 28(1): 47-50.
- [7] Wang L L, Zhang J S, Xiao G S, et al. Determination of amino acid contents in the roots of *Rhodiola sachalinensis* A.

Bar [J]. *J Norman Bethune Univ Med Sci* (白求恩医科大学学报), 1999, 25(1): 26-28.

[8] Yang Z Y, Li J X, Guo Y X, et al. Determination of amino acids and inorganic elements in ornithogalum caudatum [J]. *Spec Wild Econ Animal Plant Res* (特产研究), 1996, 1: 48-49.

[9] Chen M, Zeng L J, Chen S G. Determination of arginine in Banlangen Granule by a pre-column derivatization HPLC method [J]. *Res Prac Chin Med* (现代中药研究与实践), 2003, 17(5): 42-44.

[10] Li F, Shi X Y. Study on determination of amino acids by reversed-phase high performance liquid chromatography (QP-HPLC) with 2, 4-dinitrochlorobenzene derivatization [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 1995, 13(3): 200-202.

[11] Yang J, Sun L G, Bai X Z, et al. Simultaneous determination of 18 amino acids by reversed-phase high performance liquid chromatography with precolumn phenylisothiocyanate derivatization [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2002, 20(4): 369-371.

[12] Lin H, Ke D. Determination of amino acid in oral mushroom-18 amino acid by RP-HPLC [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1995, 26(3): 154-156.

[13] Huang Y Y. Determination of amino acids in asparagus officinalis by RP-HPLC [J]. *Appar Anal Monitor* (仪器仪表与分析监测), 2001, (3): 32-34.

[14] Zhang L, You J M, Shan Y C, et al. Analysis of amino acids by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization of 2-(9-carbazol)-ethyl-chloroformate [J]. *J Instrumen Anal* (分析测试学报), 2002, 21(5): 16-19.

[15] Gao G. Determination of amino acid in Encephalon Protei Hydrolyte by pre-column derivatization of AQC with fluorescence detector [J]. *Chin J Biol* (中国生物制品学杂志), 2003, 16(6): 365-368.

[16] Feng G, Liu X J, Liu D X. Determination of amino acid content in bee glue by waters AQC precolum derivatization [J]. *China Pharm* (中国药师), 2002, 5(6): 354-355.

中药指纹图谱技术的研究与应用

房德敏

(天津市天津医院, 天津 300211)

中药作为中华民族的瑰宝,从神农尝百草开始利用中草药治病已有悠久的历史。然而,在国际植物药领域中,却很少能得到认可。中药由于成分复杂,药效部位常常不是单一成分,而是群体疗效,所以如何控制中药材、中成药的质量,成为中药现代化、中药走出国门的瓶颈。随着现代分析手段的发展,中药指纹图谱技术以较为宏观、综合地反映中药的内在质量,已成为国际公认的控制中药或天然药物质量的最有效的手段。

1 指纹图谱的作用和意义

中药指纹图谱技术源于指纹鉴定学。通过利用现代信息技术和质量分析手段,较全面地反映中药所含化学成分的种类和数量。对于中药材而言,它可以用来鉴别真伪,评判优劣,区分不同产地、采收时间、炮制方法、用药部位的同种药材;对于中成药,它可以鉴别产品真伪,评判合理的制备工艺,有效地控制产品的质量。现阶段中药的有效成分大多尚未明确,中药指纹图谱的整体性和模糊性正好符合此要求,较单一成分的质控方法,更具有科学性和全面性。

2 中药指纹图谱的特点

2.1 专属性、唯一性。指纹图谱必须反映出该药材(或成药)有别于其他任何物质。对于中药材,指纹特征能反映出产地和采收期不同而造成的差异;对于中成药,则能反映出同一产品不同批次间的质量差异。

2.2 物种的唯一性和个体的相似性。利用色谱技术进行指纹图谱分析的中药材因生长年限、生长环境的变化而可能产生个体间较为明显的差异,但个体间必然有群体共有的相似

性。应该即具有判断该药材真伪的“共性”,又可能反映不同的产地、不同采收期、不同处理加工工艺的“特性”特征。

2.3 整体性和模糊性:整体性是指中药化学成分的整体组成及特性,即图谱应能相对全面、系统地体现中药成分的整体面貌;模糊性是指个体样品本身就存在着未知因素,难以对所有化学成分进行精确的定性定量分析,故在解决实际问题时应采用模糊数学等手段。

3 中药指纹图谱的检测方法

根据供试品的特点和所含化学成分的理化性质选择相应的测定方法。常用的检测方法有薄层色谱(TLC)、高效液相色谱(HPLC)、高效逆流色谱(HSCCC)、气相色谱(GC)、高效毛细管电泳(HPCE)、紫外光谱(UV)、红外光谱(IR)、X-射线衍射图谱、核磁共振波谱(NMR)、质谱(MS)及DNA指纹图谱等。其中HPLC是应用较多的方法,此法具有较高的分离能力,随着检测器灵敏度、种类的增加,其适用范围越来越广,已成为最有前途的一种分析方法。

4 指纹图谱的应用

中药指纹图谱技术已成为当前植物药领域国内外公认的质量控制方法,国家食品药品监督管理局已对中药注射剂提出了建立中药指纹图谱质量控制的要求,并将以此为突破口逐步实现中药材、中成药质量标准的现代化。目前,采用指纹图谱技术鉴别中药品种和评介中药质量。中药材、中成药中所含药效物质基础成分主要有生物碱类、醌类、黄酮类、苷类、糖类、鞣质类、挥发油等。

4.1 生物碱类:生物碱(alkaloids)是生物体内一类含氮有机