

与产地的不同,其有效成分也有较大的差异。

3.4 同名异物(种)的指纹图谱研究主要考察市场品种的有效性,资源的可替代性,以及为药材的真伪鉴别、化学分类学做些铺垫。对槲蕨科槲蕨属的槲蕨、中华槲蕨、石莲姜槲蕨、川滇槲蕨、栎叶槲蕨、团叶槲蕨、崖姜蕨属崖姜、骨碎补科骨碎补属的大叶骨碎补8个药材骨碎补来源品种的测定显示8个种的成分有相同性;从成分种类及含量也存在较大差异,槲蕨中成分全面,活性成分含量,从分子水平证明《中国药典》收录的品种是正确的。

3.5 相似度计算结果表明,4组相似度的参数均在0.9以上,说明建立的指纹图谱相似度较好^[3]。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [2] Li S X, Long M, Zhang Z G. Research progress of Gusuibu (*Rhizoma Drynariae*) [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2002, 9 (11): 75-78.
- [3] State Drug Administration. Technic request of fingerprint research of Chinese traditional medicine injection (Temporary) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (10): 671-675.
- [4] Li S X. Study on the kidney tonic components of Gu-sui-bu (*Drynaria fortunei* J. Sm) [A]. *Dissertation of Doctor Degree of Hunan Agricultural University* (湖南农业大学博士学位论文) [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2003.
- [5] Li S X, Zhang Z G, Long M. Determination of naringin in Gusuibu (*Rhizoma Drynariae*) from different places [J]. *Cent South Pharm* (中南药学), 2003, 1 (2): 103-104.

柱前衍生化 RP-HPLC 法分析龟板中氨基酸

李惠芬, 骆 达, 张庆伟, 朱丽丽, 李 黎

(天津医科大学药学院 中药分析国家重点实验室, 天津 300070)

摘 要:目的 采用柱前衍生化 RP-HPLC 法对龟板中 13 种氨基酸进行分析。方法 用 6 mol/L HCl 水解提取龟板中总氨基酸,以异硫氰酸苯酯(PITC)为柱前衍生化试剂,采用外标法,梯度洗脱的方式分析。结果 13 种氨基酸在 40 min 内均可得到很好的分离,回收率(除甘氨酸外)为 91.68%~106.26%,RSD 为 0.718%~4.386%。结论 所建立的方法分离效果好、灵敏、准确、简便,且采用普通的 C_{18} 色谱柱,可广泛用于含有多种氨基酸样品的分析。

关键词: 龟板; 氨基酸; 异硫氰酸苯酯衍生; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2005)11-1637-03

Determination of amino acid in *Chinemys reevesii* by pre-column derivatization RP-HPLC

LI Hui-fen, LUO Da, ZHANG Qing-wei, ZHU Li-li, LI Jun

(State Key Laboratory of Chinese Materia Medica Analysis, College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract: **Objective** To determine the content of 13 amino acids in *Chinemys reevesii* by pre-column derivatization RP-HPLC. **Methods** To extract total amino acids by the method of hydrolysis in 6 mol/L HCl and use phenylisothiocyanate (PITC) as the derivating agent with external standard method to analyze them by gradient elution. **Results** Thirteen kinds of amino acids can be separated well in 40 min, the average recoveries were 91.68%—106.26%, and RSD 0.718%—4.386%. **Conclusion** The method is sensitive, accurate, simple, and reliable for the determination of amino acids in many other samples even by common C_{18} column.

Key words: *Chinemys reevesii* (Gray); amino acid; PITC derivatization; HPLC

龟板是乌龟 *Chinemys reevesii* (Gray) 的干燥腹甲,味甘咸,性微寒,归肝、肾、心经,具有滋阴潜阳、益肾强骨、养血、补心等功能。龟板中含有丰富的氨基酸。以往分析氨基酸多采用氨基酸分析仪,价格昂

贵,用途单一。本法采用 RP-HPLC 梯度洗脱及 PITC、TAG 柱前衍生技术^[1,2],使用普通 C_{18} 分析柱,采用外标法,对龟板中 13 种氨基酸成分进行了分析,取得了满意的结果。

收稿日期: 2005-03-25

基金项目: 天津市科委技术发展计划重点项目(023617011)

作者简介: 李惠芬(1946—),女,教授,研究方向为中药分析,现为天津医科大学药学院仪器分析中心主任,国家中医药管理局中药分析重点实验室主任。Tel: (022)23529243 E-mail: lihuifen@tjmu.edu.cn

1 仪器与材料

美国 Waters 515 双泵型高效液相色谱仪,配有 2847 双通道紫外检测器,Millennium³² 色谱管理系统(美国 Waters 公司);RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);Brand 移液器(25~250 μL , 100~1 000 μL);MS2 漩涡混合仪;微量进样器(Hamilton Co.)。13 种氨基酸对照品(天津天安药业股份有限公司,质量分数均大于 99%);异硫氰酸苯酯(PITC)(Fluka);龟板(天津中药饮片厂,经天津中医学院第一附属医院尚英和药师鉴定);乙腈、正己烷为色谱纯(自制),重蒸水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 试剂的配制:取 0.3 mL PITC 置于 25 mL 棕色瓶中,乙腈稀释并加至刻度,浓度为 0.1 mol/L,摇匀,作为衍生化试剂^[3,4],需每日更换。三乙胺-乙腈(139:861)作为干燥试剂。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合氨基酸对照品溶液的制备:精密称定一定量各种氨基酸对照品置于 100 mL 量瓶中,用 0.1 mol/L HCl 稀释至刻度,作为对照品储备液,冷藏备用,可使用 3 日。各氨基酸质量浓度见表 1。

表 1 13 种氨基酸的质量及各自质量浓度

Table 1 Weight and each concentration of 13 kinds of amino acids

氨基酸	质量/ mg	质量浓度/ (mg · mL ⁻¹)	氨基酸	质量/ mg	质量浓度/ (mg · mL ⁻¹)
门冬氨酸	20.7	0.207	缬氨酸	18.6	0.186
谷氨酸	61.5	0.615	蛋氨酸	58.6	0.586
丝氨酸	35.2	0.325	异亮氨酸	16.7	0.167
甘氨酸	170.7	1.707	亮氨酸	50.0	0.500
组氨酸	10.9	0.109	苯丙氨酸	14.9	0.149
精氨酸	55.3	0.553	赖氨酸	51.0	0.510
苏氨酸	16.9	0.169			

2.2.2 混合氨基酸对照稀释液的制备:精密吸取 1 mL 对照品溶液,置 10 mL 量瓶中,用 0.1 mol/L HCl 稀释至刻度,每日更换。

2.2.3 龟板供试品溶液的制备:准确称取 2 g 100 目龟板粉末,置 150 mL 平底烧瓶中,加入 20 mL 6 mol/L HCl,于 100 °C 水解 6 h,趁热滤过置 50 mL 量瓶中,残渣用重蒸水反复冲洗,加重蒸水至刻度,作为供试品储备液,冷藏保存,可使用 3 日。

2.2.4 龟板供试品稀释液的制备:准确吸取龟板供试液 1 mL 置 50 mL 圆底烧瓶中,70 °C 减压蒸干。加入 1 mL 重蒸水,相同条件下减压蒸干,如此反复 3 次。蒸干后样品用 0.1 mol/L HCl 转移至 10 mL

量瓶,定容,摇匀。0.45 μm 滤膜滤过,作为供试品溶液,每日更换。

2.3 柱前衍生化步骤:精密移取 200 μL 对照品或供试品的稀释溶液,分置于 1.5 mL 离心管中,依次精密吸取 100 μL 干燥试剂和 200 μL 衍生化试剂,以 600 r/min 涡旋振荡 5 min,静置 1 h 使其充分反应。再于离心管中精密移入 200 μL 正己烷,以 600 r/min 涡旋振荡 5 min,放置 10 min,吸取下层溶液作为两者待测溶液。

2.4 色谱条件:色谱柱:Phenomenex C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相 A: 0.1 mol/L 醋酸钠溶液(pH 6.5)-乙腈(94:6),流动相 B:乙腈-水(80:20);检测波长:254 nm;柱温:40 °C;体积流量:1 mL/min。梯度洗脱,0~8 min, 0% B; 8~12.9 min, 4% B; 12.9~13 min, 13% B; 13~18 min, 14% B; 18~33 min, 16% B; 33~36 min, 36% B; 36~39 min, 0% B。

2.5 标准曲线的制作:精密吸取对照品液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,用 0.1 mol/L HCl 稀释至刻度,柱前衍生化后进样 5 μL ,记录色谱图。以每种氨基酸质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归分析。结果 13 种氨基酸标准曲线均为线性曲线,相关系数在 0.997 5~0.999 6,在各自的线性范围内氨基酸峰面积与其质量浓度呈良好线性关系。结果见表 2。

表 2 13 种氨基酸的线性方程

Table 2 Linear equation of 13 kinds of amino acids

氨基酸	回归方程	线性范围/(mg · mL ⁻¹)	r 值
门冬氨酸	$Y=2E+07 X+88\ 379$	0.004 1~0.033 1	0.999 5
谷氨酸	$Y=1E+07 X-6\ 831.7$	0.012 3~0.098 4	0.998 9
丝氨酸	$Y=1E+07 X-23\ 599$	0.007 0~0.056 3	0.998 4
甘氨酸	$Y=1E+07 X-8\ 731.4$	0.034 1~0.273 1	0.999 0
组氨酸	$Y=1E+06 X-3\ 535.4$	0.002 2~0.017 4	0.999 1
精氨酸	$Y=2E+07 X-11\ 335$	0.011 1~0.088 5	0.998 8
苏氨酸	$Y=1E+07 X-18\ 757$	0.003 4~0.027 0	0.997 5
缬氨酸	$Y=1E+07 X-28\ 257$	0.003 7~0.029 8	0.999 4
蛋氨酸	$Y=1E+07 X-11\ 802$	0.011 7~0.093 76	0.999 1
异亮氨酸	$Y=2E+07 X-88\ 811$	0.003 3~0.026 7	0.999 6
亮氨酸	$Y=2E+07 X-30\ 330$	0.010 0~0.080 0	0.999 4
苯丙氨酸	$Y=6E+06 X-57\ 133$	0.003 0~0.023 8	0.998 0
赖氨酸	$Y=8E+06 X-30\ 227$	0.010 2~0.081 6	0.998 5

2.6 精密度试验:精密吸取对照品稀释液 200 μL ,柱前衍生化后进样 5 μL ($n=6$)。13 种氨基酸峰面积的 RSD 在 0.09%~1.52%。

2.7 重现性试验:平行制备 5 份供试品稀释液,柱前衍生化后进样 5 μL ,测定计算。13 种氨基酸峰面积的 RSD 在 0.03%~1.20%。

2.8 稳定性试验:取供试品稀释液 200 μL ,置于 1.5 mL 离心管内,柱前衍生化后分别于 0、2、4、6、8、24 h 进样 5 μL ,13 种氨基酸峰面积 RSD 在 0.07%~1.78%,表明龟板氨基酸供试品稀释液在 24 h 内稳定性良好。

2.9 回收率试验:采用加样回收法。精密吸取已知质量浓度的供试品稀释液 100 μL 5 份,分别加入对照品稀释液 100 μL ,柱前衍生化后进样 5 μL ,测定,计算回收率。结果见表 3。

2.10 龟板样品中氨基酸的测定:吸取供试品稀释

液 5 μL 进样,每批取 3 份,按外标法测定并计算 13 种氨基酸的质量分数,结果见表 4。

表 3 氨基酸回收率 ($n=5$)Table 3 Results of recovery test ($n=5$)

氨基酸	平均回收率/%	RSD/%	氨基酸	平均回收率/%	RSD/%
门冬氨酸	106.26	0.718	缬氨酸	100.39	1.238
谷氨酸	96.07	1.450	蛋氨酸	96.75	2.530
丝氨酸	95.32	2.462	异亮氨酸	99.81	3.832
甘氨酸	63.38	3.117	亮氨酸	94.51	2.935
组氨酸	100.25	4.386	苯丙氨酸	101.99	4.207
精氨酸	91.68	1.868	赖氨酸	100.81	2.352
苏氨酸	101.77	3.496			

表 4 龟板中 13 种氨基酸的测定结果 ($n=3$)Table 4 Determination of 13 kinds of amino acids in *C. reevesii* ($n=3$)

批号	质量分数/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)												
	门冬氨酸	谷氨酸	丝氨酸	甘氨酸	组氨酸	精氨酸	苏氨酸	缬氨酸	蛋氨酸	异亮氨酸	亮氨酸	苯丙氨酸	赖氨酸
20040501	1.89	9.76	7.48	48.92	1.66	15.32	6.25	1.47	2.12	2.32	7.55	3.65	2.45
20040502	1.99	9.77	7.41	44.06	1.65	14.89	6.28	1.48	2.06	2.30	7.44	3.75	2.51
20040503	1.98	9.67	7.34	43.56	1.69	14.92	6.22	1.49	1.98	2.37	7.35	3.68	2.55

3 讨论

3.1 龟板水解时间的选择:龟板水解时间以往报道有 6、24 h 等,本实验为确切了解水解时间,分别进行了 6、9、12 h 的水解时间^[6]实验。结果表明这 3 种条件下 13 种氨基酸的峰面积无明显的差异,故选用 6 h,既达到了龟板中氨基酸全部水解的目的,又节省了能源与时间。

3.2 梯度洗脱程序的优化选择:最先选用的梯度洗脱程序为 0~11 min, 0% B; 11~13.9 min, 6% B; 13.9~14 min, 10% B; 14~29 min, 15% B; 29~33 min, 34% B; 33~38 min, 0%B。发现峰形不是很理想,特别是在 14~18 min 出峰集中,且赖氨酸峰与衍生化试剂和杂质峰有部分重合,无法进行定量分析。经摸索梯度洗脱程序,最终确定本实验所述程序。该条件下,龟板中 13 种氨基酸色谱峰达基线分离,保留时间也适当。

3.3 正己烷的作用:初期以为在衍生化过程中所加的正己烷作用为萃取试剂,但实验中发现正己烷处于上层,并不是原先认为的下层。推断正己烷并不起萃取作用,而是除杂作用。另外正己烷的加入量与最后进样的苯氨基酸代甲醇-氨基酸(PTC-AA)的浓度无关,因此加入 PTC-AA 的量只与取样量、干燥试剂的量和衍生化试剂的量有关,为后续定量分析提供了依据。

3.4 甘氨酸回收率偏低原因分析:初步分析可能由于龟板中甘氨酸较多,导致色谱柱或检测器超载,使甘氨酸回收率较低。实验中改进时曾尝试进样 10 μL ,峰形明显混乱,改回 5 μL 后,峰形回归正常,进一步确证进样 10 μL 明显超载。由此可推断,色谱柱超载可能是导致甘氨酸回收率偏低的主要原因。

3.5 衍生化试剂加入量的选择:在 1 mL 混合氨基酸对照品稀释液加入 100、150、200、250 μL 衍生化试剂,结果表明 13 种氨基酸峰面积随衍生化试剂的加入量增加而略增,但 200 μL 与 250 μL 无明显变化,故选用 200 μL 衍生化试剂。

References:

- [1] Du W L, Meng C, Shi Z J, et al. Analysis of amino acid by HPLC [J]. *Hebei Med J* (河北医药杂志), 2004, 26 (1): 69-70.
- [2] Dong S J, Liang F Q, Cai N S, et al. Development of analytical technology for amino acids using pre-column derivatization of high-performance liquid chromatography [J]. *Amino Acids Biotic Res* (氨基酸和生物资源杂志), 1996, 18 (3): 46-51.
- [3] Lin H, Ke D R, Chen R J, et al. 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, 28 (3): 154-156.
- [4] Sun X Q, Chen S J. Determination of amino acid in haw juice by HPLC [J]. *J Shanxi Food Ind* (山西食品工业杂志), 1997 (1): 13-16.
- [5] Chen Q Y. Study on effects of two processing medicinal herb methods on the content in *Chinemys reevesii* [J]. *Bull Chin Mater Med* (中药通报), 1985, 10 (8): 22-23.