

柱前衍生 RP-HPLC 法分析淡豆豉和大豆中氨基酸

李萍萍¹, 崔元璐^{1*}, 蒋庆峰²

1. 天津市现代中药重点实验室, 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 目的 分析淡豆豉 *Sojae Semen Preparatum* 和大豆 *Glycine max* 中游离及水解氨基酸。方法 用 0.1 mol/L HCl 作溶剂超声提取得到淡豆豉和大豆中的游离氨基酸; 用 6 mol/L HCl 水解提取得到水解氨基酸, 以异硫氰酸苯酯 (PITC) 为柱前衍生化试剂, 采用柱前衍生 RP-HPLC 法进行分析。结果 淡豆豉和大豆中均含有 16 种氨基酸, 这 16 种氨基酸浓度在 0.031~1.750 mmol/L 内呈良好的线性关系, r 均大于 0.997 9, 平均回收率 91.02%~102.04%, RSD 1.01%~4.81%。结论 本方法灵敏、准确, 具有良好的重复性和稳定性, 16 种氨基酸能在样品杂质质量较多的情况下得到分离, 且采用普通 C₁₈ 色谱柱成本低, 可广泛应用于富含氨基酸样品的分析。

关键词: 氨基酸; 淡豆豉; 大豆; 异硫氰酸苯酯; 柱前衍生高效液相色谱

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)09-1199-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.09.026

Analysis on amino acids in *Sojae Semen Preparatum* and *Glycine max* by pre-column derivatization RP-HPLC

LI Ping-ping¹, CUI Yuan-lu¹, JIANG Qing-feng²

1. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To analyze the free and hydrolyzed amino acids in *Sojae Semen Preparatum* (SSP) and *Glycine max* (GM) by pre-column derivatization RP-HPLC. **Methods** Free amino acids extracted in HCl (0.1 mol/L) by ultrasonic method and hydrolyzed amino acids extracted in HCl (6 mol/L) by hydrolysis method were both derivated by the agent phenylisothiocyanate so as to analyze them by gradient elution. **Results** There were 16 kinds of amino acids in both SSP and GM. The 16 kinds of amino acids had good linearity in the range of 0.031—1.750 $\mu\text{mol/mL}$ with the coefficients of correlation all over 0.9979. The average recoveries were 91.02%—102.04% and the RSD values were between 1.01% and 4.81%. **Conclusion** The method is not only sensitive and accurate, but also has the high repeatability and stability, and the 16 kinds of amino acids could be separated in the case of the samples with more impurities. The common C₁₈ column is widely used for the determination of many other samples riched in amino acids at lower cost.

Key words: amino acid; *Sojae Semen Preparatum*; *Glycine max* (L.) Merr.; phenylisothiocyanate; precolumn derivatization HPLC

淡豆豉为豆科植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 成熟种子的发酵加工品, 具有解表、除烦、宣发郁热等功效^[1]。淡豆豉及其原材料大豆中含有丰富的氨基酸, 但其定量测定方法以及测定过程中的干扰杂质却不同。异硫氰酸苯酯 (PITC) 柱前衍生法^[2-9] 为目前氨基酸分析^[10-11] 中简便、可靠的方法之一, 本实验采用经优化的 PITC 柱前衍生, 梯度洗脱的

方法, 能同时适用于淡豆豉和大豆中的水解以及游离型氨基酸的定量测定, 分离效果满足定量测定的要求。

1 仪器与材料

Agilent 1100 系列四元梯度泵高效液相色谱仪, UV 检测器 (美国 Agilent 公司); 超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 滤膜 (美国 Millipore 公

收稿日期: 2012-08-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173469); 教育部新世纪优秀人才资助项目 (NCET-09-0899)

作者简介: 李萍萍 (1988—), 女, 山西太原人, 天津中医药大学硕士研究生, 研究方向为药物分析。

Tel: 13821680702 E-mail: lipingping121@126.com

*通信作者 崔元璐 E-mail: cuiyl@tju.edu.cn

网络出版时间: 2013-03-28 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130328.1114.002.html>

司,孔径 0.45 μm);氮吹仪(美国 Organomation 公司);恒温干燥箱(金南仪器制造有限公司)。

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)、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)对照品和氨基酸混合对照品溶液(美国 Sigma-Aldrich 公司);PITC 衍生剂(美国 Alfa Aesar 公司);乙腈(色谱纯,天津康科德公司);其他试剂均为分析纯;超纯水。淡豆豉 *Sojae Semen Preparatum* (SSP) 购自河北安国,大豆 *Glycine max* (L.) Merr. (GM) 产自黑龙江,均经天津中医药大学李天祥副教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 混合氨基酸对照品稀释溶液的制备

精密量取 2.5 mmol/L 氨基酸混合对照品溶液 1.0 mL,用 0.1 mol/L HCl 稀释至 2.5 mL,作为对照品稀释液,4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 水解氨基酸供试品溶液的制备 取淡豆豉和大豆样品适量,粉碎,过筛(100 目),混匀,经石油醚脱脂,密封保存备用。精密称取样品 50 mg 置水解管中,加入 6 mol/L HCl 15 mL,充入高纯氮气,在充氮气状态下封口。将已封口的水解管置于 105 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温干燥箱内水解 24 h,冷却,打开水解管,转移至蒸发皿中,水洗残渣,合并水洗液,滤过,45 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥至恒质量,用 0.1 mol/L 盐酸溶解,并定容至 15 mL,0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,备用。

2.2.2 游离氨基酸供试品溶液的制备 取淡豆豉和大豆样品适量,粉碎,过筛(100 目),混匀,经石油醚脱脂,密封保存备用。精密称取 100 mg 置烧瓶中,加 0.1 mol/L 盐酸 10 mL,超声波处理 20 min,12 000 r/min 低温离心 20 min,Millipore 超滤管滤过除去蛋白等杂质,滤液经 45 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥至恒质量,用 0.1 mol/L 盐酸溶解,并定容至 2 mL,0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,备用。

2.3 柱前衍生化

精密移取 100 μL 对照品或供试品溶液,加入 1 mol/L 三乙胺乙腈溶液 50 μL 和 0.1 mol/L PITC 乙腈溶液 50 μL ,涡旋摇匀,静置 1 h,加入正己烷 400 μL ,涡旋摇匀,静置 10 min,去下层,再加正己烷 400 μL ,涡旋摇匀,静置 10 min,吸取下层溶液作为两者待

测溶液,0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,备用。

2.4 色谱条件

色谱柱为 Thermo C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相 A: 50 mmol/L 醋酸钠 1 000 mL,加入 400 μL 三乙胺,用醋酸调至 pH 6.4;流动相 B: 乙腈-水(3:2);检测波长 254 nm;柱温 44 $^{\circ}\text{C}$;进样量 10 μL ;流动相程序洗脱条件见表 1,色谱图见图 1。

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 $\cdot$ min $^{-1}$)
0	98.0	2.0	1.0
15	97.0	3.0	1.1
19	96.0	4.0	1.2
38	96.0	4.0	1.2
39	95.6	4.4	1.2
43	90.0	10.0	1.2
44	82.0	18.0	1.2
46	78.0	22.0	1.2
47	77.5	22.5	1.0
68	75.3	24.7	1.0
70	65.0	35.0	1.0
75	50.0	50.0	1.0
80	0.0	100.0	1.0

2.5 标准曲线的绘制

将 16 种混合氨基酸对照品溶液(浓度为 2.5 mmol/L)用 0.1 mol/L 盐酸依次稀释成 1.750、1.250、0.825、0.544、0.359、0.156、0.103、0.031 mmol/L,柱前衍生化后进样,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 16 种氨基酸标准曲线均为线性曲线, r 在 0.997 9~0.999 3,在 0.031~1.750 mmol/L 氨基酸峰面积与其质量浓度呈良好线性关系。结果见表 2。

2.6 精密度试验

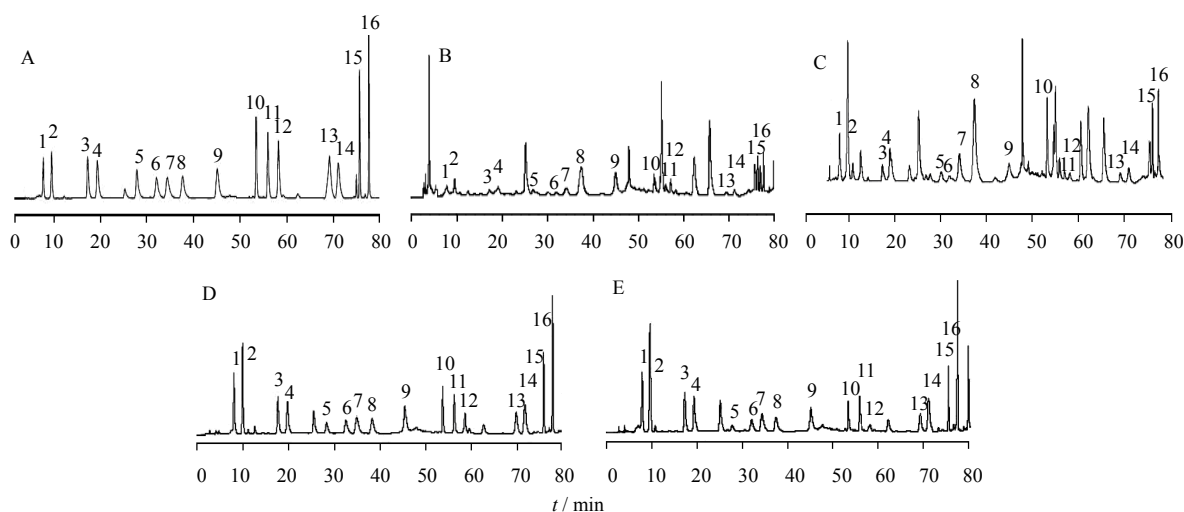
精密吸取对照品稀释液 100 μL ,经衍生化后连续进样 6 次,16 种氨基酸峰面积的 RSD 在 0.93%~1.68%。

2.7 重复性试验

平行制备 6 份淡豆豉水解供试品溶液,经衍生化后进样,测定。16 种氨基酸峰面积的 RSD 在 1.46%~2.39%。

2.8 稳定性试验

取衍生后的淡豆豉水解供试品溶液,常温放置 0、3、9、18、28、36 h 后分别予以测定,结果 16



1-Asp 2-Glu 3-Ser 4-Gly 5-His 6-Thr 7-Ala 8-Arg 9-Pro 10-Tyr 11-Val 12-Met 13-Ile 14-Leu 15-Phe 16-Lys
 A-氨基酸混合对照品溶液 B-淡豆豉游离氨基酸供试液 C-大豆游离氨基酸供试液 D-淡豆豉水解氨基酸供试液 E-大豆水解氨基酸供试液
 A-amino acids mixed reference solution B-free amino acids in SSP C-free amino acids in GM D-hydrolyzed amino acids in SSP E-hydrolyzed amino acids in GM

图1 氨基酸的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of amino acids

表2 16种氨基酸的线性方程

Table 2 Linear equations of 16 kinds of amino acids

氨基酸	回归方程	相关系数
Asp	$Y=1\ 035.6X-18.179$	0.999 3
Glu	$Y=1\ 334.0X+19.423$	0.998 6
Ser	$Y=1\ 595.2X+20.648$	0.998 1
Gly	$Y=1\ 843.9X-39.785$	0.997 9
His	$Y=1\ 565.5X-23.361$	0.998 8
Thr	$Y=1\ 436.5X-7.238\ 1$	0.998 9
Ala	$Y=1\ 674.0X-20.521$	0.998 2
Arg	$Y=1\ 615.8X-8.292\ 1$	0.998 2
Pro	$Y=2\ 005.3X-40.816$	0.998 8
Tyr	$Y=2\ 435.7X-44.406$	0.998 9
Val	$Y=2\ 202.4X-30.632$	0.998 2
Met	$Y=2\ 349.6X-27.019$	0.998 5
Ile	$Y=3\ 070.7X-68.333$	0.998 6
Leu	$Y=2\ 271.2X-15.967$	0.998 4
Phe	$Y=2\ 407.0X-42.420$	0.998 3
Lys	$Y=4\ 492.1X-72.672$	0.998 3

种氨基酸的RSD为1.12%~1.77%。

2.9 加样回收率试验

精密吸取已知质量浓度的淡豆豉水解供试品溶液50 μL 6份,分别精密加入50 μL氨基酸对照品稀释液,经衍生化后进样测定,计算回收率。

Asp、Glu、Ser、Gly、His、Thr、Ala、Arg、Pro、Tyr、Val、Met、Ile、Leu、Phe、Lys的平均回收率分别为101.00%、93.16%、99.48%、93.87%、91.02%、97.60%、97.62%、100.94%、102.04%、99.72%、95.10%、95.93%、95.91%、96.88%、93.20%、100.80%;RSD分别为3.69%、1.47%、3.93%、1.81%、1.88%、4.41%、4.81%、4.75%、2.22%、1.66%、3.93%、3.49%、1.08%、3.34%、2.42%、2.40%。

2.10 氨基酸的测定

精密吸取供试品溶液3份,按上述色谱条件测定,外标法计算16种氨基酸的量,结果见表3。

3 讨论

淡豆豉和大豆中均含有大量脂肪,不仅会使水解液变浑浊,无法进行衍生化,而且游离的少量脂肪酸会降低柱效,使柱压升高。

本实验分别进行了15、20、40 min的超声提取,结果表明20 min时所测氨基酸质量分数最高,40 min质量分数有所降低可能因为时间过长,部分氨基酸被破坏。

配制流动相加醋酸及三乙胺时以及衍生过程中的PITC乙腈溶液。由于量极少,样品中没有测到胱氨酸。为保持样品稳定,必须4℃密封保存,且最多3 d,最好是临用前配制。

本研究所建立的方法,各氨基酸衍生化后分离

表3 16种氨基酸的测定结果 ($n=3$)Table 3 Determination of 16 kinds of amino acids in different samples ($n=3$)

氨基酸	质量分数 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)			
	淡豆豉水解氨基酸	大豆水解氨基酸	淡豆豉游离氨基酸	大豆游离氨基酸
Asp	40.34	43.02	1.42	0.44
Glu	48.12	68.06	3.32	0.29
Ser	16.49	16.49	0.31	0.07
Gly	11.60	12.82	0.26	0.16
His	11.64	5.76	0.28	0.25
Thr	13.54	11.97	0.30	0.10
Ala	12.90	13.17	0.15	0.21
Arg	22.54	20.69	4.39	2.02
Pro	22.45	18.43	0.54	0.62
Tyr	17.01	11.17	1.06	0.35
Val	12.79	14.70	0.21	0.13
Met	10.09	4.26	0.23	0.09
Ile	11.44	8.86	0.21	0.10
Leu	20.30	22.10	0.33	0.12
Phe	19.73	15.90	0.45	0.08
Lys	19.55	17.37	0.59	0.18

良好, 不仅相互之间无干扰, 而且测定游离氨基酸时, 在干扰杂质很多的情况下也能较好分离, 应用性强。普通高效液相色谱仪和 C_{18} 色谱柱即可完成测试, 易于分析实验室推广使用。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 杨菁, 孙黎光, 白秀珍, 等. 异硫氰酸苯酯柱前衍生化反相高效液相色谱法同时测定 18 种氨基酸 [J]. 色谱, 2002, 20(4): 369-371.
- [3] Schwarz E L, Roberts W L, Pasquali M. Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiodearray and fluorescence detection [J]. *Clin Chim Acta*, 2005, 354(1/2): 83-90.
- [4] Battaglia A, Bertoluzza A, Calbucci F, *et al.* High-performance liquid chromatographic analysis of physiological amino acids in human brain tumors by pre-column derivatization with phenylisothiocyanate [J]. *J Chromatogr B*, 1999, 730(1): 81-93.
- [5] Hayakawa K, Hirano M, Yoshikawa K, *et al.* Separation of phenylthiohydantoin-amino acids by temperaturecontrolled reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1999, 846(1/2): 73-82.
- [6] 梁军, 夏永刚, 杨炳友, 等. 柱前衍生化-HPLC 法分析麻黄多糖 ESP-B1 的单糖组成 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 1985-1988.
- [7] Persson B, Eaker D. An optimized procedure for the separation of amino acid phenylthiohydantoins by reversed-phase HPLC [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 1990, 21(4): 341-350.
- [8] 刘有平, 张佳蕊, 邵华, 等. 柱前衍生化 RP-HPLC 法测定地黄中葡萄糖、半乳糖和蜜二糖 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 974-976.
- [9] Gheshlaghi R, Scharer J M, Moo-Young M, *et al.* Application of statistical design for the optimization of amino acid separation by reverse-phase HPLC [J]. *Anal Biochem*, 2008, 383(1): 93-102.
- [10] Woo K L, Hwang Q C, Kim H S. Determination of amino acids in the foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with a new precolumn derivative, butylthiocarbamyl amino acid, compared to the conventional phenylthiocarbamyl derivatives and ion-exchange chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 740(1): 31-40.
- [11] Hariharan M, Naga S, Van Noord T. Systematic approach to the development of plasma amino acid analysis by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection with precolumn derivatization using phenylisothiocyanate [J]. *J Chromatogr*, 1993, 621(1): 15-22.