

RP-HPLC法同时测定石韦中4种氨基酸的含量^Δ

龙毅*,杨武德#,袁吉虎(贵阳中医学院药学院化学教研室,贵阳 550002)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)27-3838-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.27.34

摘要 目的:建立同时测定石韦中4种氨基酸含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Welchrom C₁₈,流动相A为0.1 mol/L的醋酸钠缓冲液(以醋酸钠调节pH至6.5)-乙腈(93:7, V/V),流动相B为乙腈-水(4:1, V/V),梯度洗脱,流速为1.0 ml/min,检测波长为254 nm,柱温为30 ℃,进样量为5 μl。结果:谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸的质量浓度分别在4.92~49.2、3.168~31.68、2.6~26、2.88~28.8 μg/ml范围内与各自峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 1, 0.999\ 9, 0.999\ 4, 0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD均 $\leq 2.2\%$;平均加样回收率分别为98.4%、99.6%、98.3%、100.1%,RSD分别为2.2%、2.5%、2.2%、2.3% ($n=9$)。结论:该方法简便、准确、重复性好,可用于石韦中4种氨基酸的含量测定。

关键词 石韦;氨基酸;反相高效液相色谱法;含量测定

Contents Determination of 4 Amino Acids in *Pyrrosia lingua* by RP-HPLC

LONG Yi, YANG Wu-de, YUAN Ji-hu (Dept. of Chemistry, School of Pharmacy, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the contents determination of 4 amino acids in *Pyrrosia lingua*. METHODS: The samples were analyzed by RP-HPLC. It was performed on a column of Welchrom C₁₈ with the mobile phase A of 0.1 mol/L Sodium acetate buffer (pH6.5)- acetonitrile(93:7, V/V) and mobile phase B of acetonitrile-water(4:1, V/V) (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 254 nm, column temperature was 30 ℃ and the sample size was 5 μl. RESULTS: The linear range was 4.92-49.2 μg/ml for glutamate($r=0.999\ 1$), 3.168-31.68 μg/ml for glycine($r=0.999\ 9$), 2.6-26 μg/ml for alanine($r=0.999\ 4$) and 2.88-28.8 μg/ml for leucine ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 2.2%; average recoveries were 98.4% (RSD=2.2%, $n=9$), 99.6% (RSD=2.5%, $n=9$), 98.3% (RSD=2.2%, $n=9$) and 100.1% (RSD=2.3%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the contents determination of 4 amino acids in *P. lingua*.

KEYWORDS *Pyrrosia lingua*; Amino acid; RP-HPLC; Content determination

3 讨论

本研究结果表明,硫磺熏蒸北沙参中5种香豆素类成分含量均低于未熏蒸北沙参。为进一步证实北沙参中5种香豆素类成分的减少与硫磺熏蒸有关,笔者对收集的4批未熏蒸北沙参进行硫磺熏蒸处理后,分别对其进行含量测定,经与未熏蒸北沙参比较,发现5种香豆素类成分的含量明显减少,说明硫磺熏蒸可导致北沙参中补骨脂素、花椒毒素、佛手苷内酯、欧前胡素、异欧前胡素含量减少,但具体机制尚不明确,需进一步研究。

目前,虽有学者对硫磺熏蒸药材的鉴别进行了相关的研究工作^[6],但尚不成熟。为防止中药材粗加工过程中滥用或过度使用硫磺熏蒸的问题,保证中药的质量和用药安全,2010年版《中国药典第二增补本》中收录了中药材及饮片的SO₂残留量标准,除山药、牛膝、粉葛、天冬、天麻、天花粉、白及、白芍、白术、党参10种中药材及饮片中亚硫酸盐残留量(以SO₂计)不得超过400 mg/kg外,其余中药材及饮片中亚硫酸盐残留量

均不得超过150 mg/kg^[6]。为保证中药材及饮片低硫或无硫,必须规范药材产地加工方法,研究先进的饮片贮藏保管技术,加强监管力度,以确保中药饮片的用药安全和疗效。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:205.
- [2] 刘晓, 马晓青, 蔡皓, 等. ICP-AES法检测硫磺熏蒸前后金银花中金属元素及微量元素[J]. 中成药, 2012, 34(2): 293.
- [3] Wang XH, Xie PS, Lam Chris WK, et al. Study of the destructive effect to inherent quality of Angelicae dahuricae radix (BaiZhi) by sulfur-fumigated process using chromatographic fingerprinting analysis[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(5): 1 221.
- [4] 黄山君, 王瑞, 石燕红, 等. 硫磺熏制白芍的安全性评价初步研究[J]. 药学学报, 2012, 47(4): 486.
- [5] 钟越, 雷钧涛, 曹渊. 枸杞子和硫熏枸杞子的鉴别[J]. 中国药房, 2008, 19(27): 2 138.
- [6] 国家药典委员会. 中国药典:第二增补本[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2013:206.

(收稿日期:2014-12-29 修回日期:2015-07-25)

(编辑:张静)

^Δ 基金项目:贵州省科技计划课题[No.黔科合中中药字(2010) LKZ7030号]; 贵阳中医学院科研项目[No.贵中医博(2012)05号]

* 副教授, 博士。研究方向:化学生物学。电话:0851-85283051

通信作者:教授。研究方向:中药质量标准及化学成分。

E-mail: ywd_680708@sina.com

石韦为蕨类植物水龙骨科植物石韦 *Pyrrosia lingua* (Thunb.) Farwell 的全草,别名有柄石韦、刀尖药、石茶叶;主治利尿通淋:用于泌尿系感染、小便不利、淋沥涩痛等(治泌尿系结石);清热止血:用于热证吐血、血崩等;此外,石韦水煎剂还有一定的抗过敏作用,还可升高因化疗及放疗引起的白细胞减少^[1]。石韦是贵州各民族的常用药。目前,市面上有治疗结石的复方石韦片等多种制剂,市场效益显著。石韦所含的氨基酸具有调节人体生理机能、增强免疫力的功效^[2-3]。本研究以异硫氰酸苯酯(PITC)为衍生试剂^[4-5],采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法同时对石韦中4种氨基酸进行分析^[6-7]。

1 材料

LC-20AT型HPLC仪,包括SPD-20A检测器、二元高压梯度泵、CTO-20A柱温箱、LC Solution Lite化学工作站(日本岛津公司);JT-5003型千分之一电子天平(余姚市金诺天平仪器有限公司);HS10260D型超声波清洗仪(天津市恒奥科技发展有限公司);SHZ-95型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限公司);YHG-600-BS-II型远红外快速干燥箱(上海贺德实验设备厂);HH-2型数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司)。

亮氨酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:876-200204,纯度:99%);谷氨酸对照品(批号:120515,纯度≥99%)、甘氨酸对照品(批号:120529,纯度≥99%)、丙氨酸对照品(批号:120329,纯度≥99%)均由成都植标化纯生物技术有限公司提供;乙腈为色谱纯,醋酸钠、三乙胺、苯酚、浓盐酸均为分析纯,水为纯净水。

试验药材于2011年6月采自贵州凯里市雷山县,由贵阳中医学院孙庆文副教授鉴定为石韦属水龙骨科蕨类植物石韦 *P. lingua* (Thunb.) Farwell 的全草。植物标本存放于贵阳中医学院中药研究所植物化学教研室(标本凭证:GY20110620)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Welchrom C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相A:0.1 mol/L的醋酸钠缓冲液(以醋酸钠调节pH至6.5)-乙腈(93:7, V/V),流动相B:乙腈-水(4:1, V/V),采用梯度洗脱(0~20 min, 100%→96%A; 20~40 min, 80%→78%A; 40~45 min, 70%→0A; 45~55 min, 0A);检测波长:254 nm;柱温:300 ℃;流速:1.0 ml/min;进样量:5 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 称取研匀后的样品粉末0.6 g,精密称定,置于安瓿瓶中,加入水解液(含0.5%苯酚的50%盐酸溶液)10 ml,熔封安瓿,用纱布包裹,于150 ℃水解1 h,放冷,滤过,用水清洗滤渣,合并滤液和洗液于蒸发皿中,蒸干,残渣用0.1 mol/L盐酸溶液15 ml分3次溶解洗涤,并转移至25 ml量瓶中,加入0.1 mol/L PITC-乙腈溶液^[8]及1 mol/L三乙胺-乙腈溶液各2.5 ml,混匀,室温放置1 h,加50%乙腈至刻度;精密量取10 ml,加正己烷15 ml,放置20 min,取下层溶液,经微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

2.2.2 对照品溶液 取4种氨基酸对照品适量,精密称定,分别加入0.1 mol/L盐酸溶液制成每1 ml分别含谷氨酸0.123 mg、甘氨酸0.079 2 mg、丙氨酸0.065 mg、亮氨酸0.072 mg的溶液,作为对照品贮备液。取上述对照品贮备液5 ml,置于25 ml量瓶中,加入0.1 mol/L PITC-乙腈溶液及1 mol/L三乙胺-乙腈

溶液至刻度,混匀;精密量取10 ml,加正己烷15 ml,放置20 min,取下层溶液,经微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

2.2.3 阴性空白溶液 取空白安瓿瓶,自“2.2.1”项下“加入水解液(含0.5%苯酚的50%盐酸溶液)10 ml”起操作制备,即得。

2.3 系统适用性试验

精密称取上述对照品溶液、供试品溶液、对照品加供试品溶液、阴性空白溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果,样品中谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸的理论板数分别为5 760.1、6 542.1、3 421.3、4 250.6,分离度分别为2.3、2.0、1.5、1.6,分离度符合要求。色谱见图1。

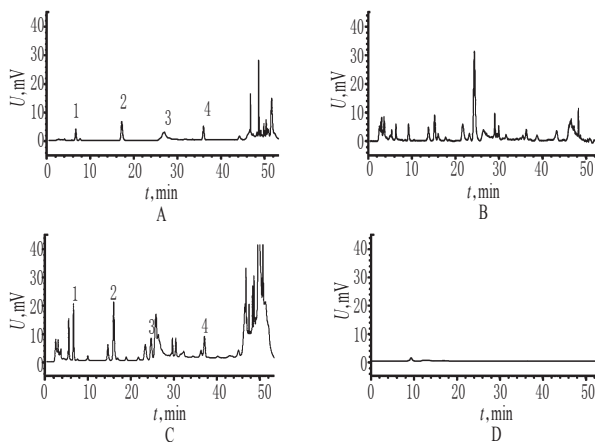


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.供试品加对照品;D.阴性空白;1.谷氨酸;2.甘氨酸;3.丙氨酸;4.亮氨酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A. reference substances; B. test samples; C. reference substance and test samples; D. negative blank solution; 1. glutamate; 2. glycine; 3. alanine; 4. leucine

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.2”项下对照品贮备液1、2、3、5、10 ml,分别置于25 ml量瓶中,按“2.2.2”项下方法自“置25 ml量瓶中,加入0.1 mol/L PITC-乙腈溶液”起操作,得系列浓度溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸的回归方程分别为 $y=1.6 \times 10^7 x - 21 487$ ($r=0.999 1$)、 $y=4.3 \times 10^7 x - 35 870$ ($r=0.999 9$)、 $y=2.8 \times 10^7 x - 23 652$ ($r=0.999 4$)、 $y=3.8 \times 10^7 x + 6 646.9$ ($r=0.999 9$)。结果表明,谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸的质量浓度分别在4.92~49.2、3.168~31.68、2.6~26、2.88~28.8 μg/ml范围内与各自峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取“2.2.2”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸峰面积的RSD分别为1.9%、1.8%、1.6%、1.6% ($n=6$),表明仪器精密度良好^[9]。

2.6 稳定性试验

取“2.2.1”项下供试品溶液适量,分别于放置0、4、6、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样,记录峰面积。结果,谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸峰面积的RSD分别为1.4%、2.1%、1.9%、2.2% ($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

精密称取样品6份,每份约0.6 g,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样,记录峰面积。结果,谷氨酸平均含量为1.19 mg/g(RSD=2.2%,n=6);甘氨酸平均含量0.699 mg/g(RSD=1.7%,n=6);丙氨酸平均含量为0.359 mg/g(RSD=1.9%,n=6),亮氨酸平均含量为0.344 mg/g(RSD=2.1%,n=6),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品9份,每份约0.3 g,分别置于5 ml安瓿中,精密加入对照品溶液(0.123 mg/ml的谷氨酸2.89 ml,0.079 2 mg/ml的甘氨酸2.65 ml,0.065 mg/ml的丙氨酸1.66 ml,0.072 mg/ml的亮氨酸1.43 ml),加入1%苯酚盐酸溶液适量,摇匀,按“2.2.1”项下自“熔封安瓿,用纱布包裹,于150 ℃水解1 h”起操作,制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

待测成分	称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
谷氨酸	0.300	0.357 0	0.284 4	0.634 4	97.5	98.4	2.2
	0.300	0.357 0	0.284 4	0.636 1	98.1		
	0.300	0.357 0	0.284 4	0.636 3	98.2		
	0.300	0.357 0	0.355 5	0.710 8	99.5		
	0.300	0.357 0	0.355 5	0.716 8	101.2		
	0.300	0.357 0	0.355 5	0.718 5	101.7		
	0.300	0.357 0	0.426 6	0.776 3	98.3		
	0.300	0.357 0	0.426 6	0.764 4	95.5		
	0.300	0.357 0	0.426 6	0.765 7	95.8		
甘氨酸	0.300	0.209 7	0.167 9	0.370 7	95.9	99.6	2.5
	0.300	0.209 7	0.167 9	0.376 9	99.6		
	0.300	0.209 7	0.167 9	0.376 7	99.5		
	0.300	0.209 7	0.209 9	0.417 7	99.1		
	0.300	0.209 7	0.209 9	0.428 9	104.4		
	0.300	0.209 7	0.209 9	0.423 5	101.9		
	0.300	0.209 7	0.251 9	0.458 8	98.9		
	0.300	0.209 7	0.251 9	0.460 9	99.7		
	0.300	0.209 7	0.251 9	0.454 7	97.3		
丙氨酸	0.300	0.107 7	0.086 3	0.192 9	98.7	98.3	2.2
	0.300	0.107 7	0.086 3	0.191 0	96.5		
	0.300	0.107 7	0.086 3	0.192 1	97.8		
	0.300	0.107 7	0.107 9	0.212 1	96.8		
	0.300	0.107 7	0.107 9	0.213 9	98.4		
	0.300	0.107 7	0.107 9	0.216 4	100.7		
	0.300	0.107 7	0.129 5	0.234 3	97.8		
	0.300	0.107 7	0.129 5	0.231 5	95.6		
	0.300	0.107 7	0.129 5	0.240 4	102.5		
亮氨酸	0.300	0.103 2	0.082 4	0.186 1	100.6	100.1	2.3
	0.300	0.103 2	0.082 4	0.189 9	105.2		
	0.300	0.103 2	0.082 4	0.183 7	97.7		
	0.300	0.103 2	0.103 0	0.203 6	97.5		
	0.300	0.103 2	0.103 0	0.206 8	100.6		
	0.300	0.103 2	0.103 0	0.204 5	98.3		
	0.300	0.103 2	0.123 6	0.228 0	101.0		
	0.300	0.103 2	0.123 6	0.226 1	99.4		
	0.300	0.103 2	0.123 6	0.227 5	100.6		

2.9 样品含量测定

取样品粉末0.6 g,精密称定,按“2.2.1”项下方法制备供试

品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样并计算样品含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=6)

Tab 2 Results of contents determination of samples(n=6)

待测成分	含量, mg/g
谷氨酸	1.189
甘氨酸	0.700
丙氨酸	0.360
亮氨酸	0.343

3 讨论

3.1 氨基酸的柱前衍生化RP-HPLC法注意事项

本试验在制备供试品溶液时,最重要的就是衍生化反应要完全,衍生化程度能决定氨基酸检测的准确性。本试验采用茚三酮与氨基酸生成紫色化合物或黄色化合物计算所需衍生剂的量。试验所需的衍生化试剂PITC有一定毒性,保存时须防止与水接触,以保持良好活性。氨基酸为两性物质,pH对其分离度影响较大,因此要保证流动相pH的准确与稳定。

3.2 柱前衍生化原理

本试验所选用的PITC可与一、二级氨基酸发生反应,生成苯氨基硫甲酰衍生物(PTC),该衍生产物单一、稳定,对测定无干扰。衍生化试剂、反应条件和反应时间的选择不受色谱系统的限制。

综上所述,本方法操作简便,结果准确,重复性好,可用于石韦中4种氨基酸的含量测定。

参考文献

- [1] 杨武德,崔敏.黔产石韦的化学成分[J].贵州农业科学,2014,42(1):65.
- [2] 刘恒霞,余鹏,王慧忠.高效液相色谱法测定蕨类植物中氨基酸含量[J].氨基酸和生物资源,2011,33(3):30.
- [3] 于永辉,籍国霞,臧恒昌.中药中氨基酸分析测定技术研究进展[J].食品与药品,2014,16(5):371.
- [4] 曾文珊,廖海明,杨昭鹏,等.重组人甲状旁腺激素1-34的氨基酸组成分析[J].药物生物技术,2003,10(2):108.
- [5] 程显隆,肖新月,邹秦文,等.柱前衍生化HPLC法同时测定阿胶中4种主要氨基酸的含量[J].药物分析杂志,2008,28(12):1997.
- [6] 赵岩,冷艳涛,于婷,等.柱前衍生RP-HPLC法测定苍耳子和意大利苍耳子中氨基酸的种类[J].中国科技论文,2015,10(12):1431.
- [7] 阙微娜,滕艳坤,杨宏伟,等.DTDPA-PITC联合柱前衍生化HPLC法同时测定复方氨基酸注射液中18种氨基酸的含量[J].中国药房,2014,25(12):1122.
- [8] 李洁,童玉懿.石韦有效成分的高效液相色谱测定[J].药学学报,1992,27(2):153.
- [9] 曾玉梅,陈繁华.RP-HPLC法测定氯霉素地砷软膏中3种主药的含量[J].中国药房,2015,26(9):1271.

(收稿日期:2015-02-09 修回日期:2015-07-21)

(编辑:余庆华)