

柱前衍生反相高效液相色谱法测定 草本水杨梅叶中氨基酸含量

张岳¹, 赵岩^{1*}, 徐殿文², 牛淑静³, 郜玉钢¹, 雷锋杰¹, 刘学周¹, 张连学^{1*}

(1. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; 2. 沈阳军区洮南训练场, 白城 137100;

3. 吉林省食品药品审评中心, 长春 130062)

摘要: **目的** 采用柱前衍生反相高效液相色谱法对草本水杨梅叶中氨基酸进行测定。**方法** 样品以异硫氰酸苯酯(PITC)为衍生化试剂,与草本水杨梅叶中氨基酸柱前衍生,采用 Ultimate Amino Acid 氨基酸分析专用柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相: A 为乙腈-水(80:20, V:V), B 为乙腈-三水合乙酸钠缓冲溶液(7:93, V:V, pH 6.5),梯度洗脱;柱温 35 ℃,流速 1.0 mL/min,检测波长为 254 nm。**结果** 20 种氨基酸在 0.039~1.250 mmol/L 内呈良好的线性关系($r^2>0.9996$)。20 种游离氨基酸平均回收率在 96.51%~108.06%之间, RSD 在 0.36%~2.08%之间($n=6$);水解氨基酸平均回收率在 95.29%~102.13%之间, RSD 在 0.85%~2.45%之间($n=6$)。**结论** 该方法可用于草本水杨梅中氨基酸的检测,其灵敏度高且准确,具有良好的重复性及稳定性。

关键词: 草本水杨梅; 柱前衍生; 氨基酸; 高效液相色谱法

Determination of amino acids in leaves of *Geum aleppicum* Jacq. by precolumn derivatization reversed-phase high performance liquid chromatography

ZHANG Yue¹, ZHAO Yan^{1*}, XU Dian-Wen², NIU Shu-Jing³, GAO Yu-Gang¹, LEI Feng-Jie¹,
LIU Xue-Zhou¹, ZHANG Lian-Xue^{1*}

(1. College of Chinese Medicine Material, Jilin Agriculture University, Changchun 130118, China; 2. Shenyang Military Taonan Training Field, Baicheng 137100, China; 3. Jilin Food & Drug Estimate Center, Changchun 130062, China)

ABSTRACT: Objective To determinate and investigate the amino acids in leaves of *Geum aleppicum* Jacq. after derivatization by a simple and sensitive reversed-phase high performance liquid chromatography method.

Methods The amino acids in leaves of *G. aleppicum* were pretreated with phenyl isothiocyanate (PITC). The separation of *G. aleppicum* derivatives was carried out on a Cltimate Amino Acid of specific column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). Eluent A was acetonitrile-water (80:20, V:V) and eluent B was a mixture of acetonitrile and sodium acetate trihydrate (7:93, V:V, pH6.5), eluting with a gradient. The column temperature was 35 ℃, flow rate was 1.0

基金项目: 国家公益性行业科研专项(201303111)、吉林省科技发展计划项(20140204013YY, 20130303094, 20140311050YY, 20150307012YY)

Fund: Supported by the Special National Public Welfare Industry Research (201303111)、Jilin Province Science and Technology Development Plan (20140204013YY, 20130303094, 20140311050YY, 20150307012YY)

*通讯作者: 赵岩, 博士, 副教授, 主要研究方向为天然药物有效成分及生物活性研究。E-mail: zhyjlu79@163.com

张连学, 博士, 教授, 主要研究方向为药用植物栽培与加工。E-mail: zlx863@163.com

*Corresponding author: ZHAO Yan, Associate Professor, Jilin Agriculture University, No.2888, Xincheng Road, South Gate District, Changchun 130118, China. E-mail: zhyjlu79@163.com

ZHANG Lian-Xue, Professor, Jilin Agriculture University, No.2888, Xincheng Road, South Gate District, Changchun 130118, China. E-mail: zlx863@163.com

mL/min and the detection wavelength was 254 nm. **Results** The linear range of 20 amino acids was 0.039~1.250 mmol/L ($r^2>0.9996$). The average recovery rates of 20 free amino were ranged from 96.51% to 108.06 % and RSD values were from 0.36% to 2.08% ($n=6$). The average recovery of rates of 20 total amino acids was ranged from 95.29% to 102.13% and RSD values were from 0.85% to 2.45% ($n=6$). **Conclusion** This method is flexible, accurate, and repeatable, and stable for the determination of amino acids in leaves of *G. aleppicum*.

KEY WORDS: *Geum aleppicum* Jacq.; precolumn derivatization; ammo acid; high performance liquid chromatography

1 引言

草本水杨梅(*Geum aleppicum* Jacq.)为蔷薇科(Rosaceae)路边青属(*Geum*)植物,别名路边青、海棠菜、老五叶、追风七^[1],主要分布于我国东北、西北、华北、西南等地区^[2],长白山海拔400~1500 m山区分布尤为丰富^[3]。民间以其全草或根入药,具有清热解毒、利尿、消肿止痛之效^[1,4]。目前,关于草本水杨梅的研究主要集中在三萜、黄酮、鞣质、挥发油类成分,该类化合物具有抗艾滋病毒、抗疱疹病毒、抗凝血、抑菌等活性^[3,5-10];而在氨基酸、蛋白质方面的研究报道很少。仅齐志斌等^[11]用高效液相色谱方法对草本水杨梅中15种氨基酸的含量进行测定。张燕^[12]、高向阳^[13]、李兰芳^[14]、刘冬莲^[15]等研究表明植物不同的生长期其氨基酸含量变化较大。本文采用柱前衍生反相高效液相色谱法,对莲座期草本水杨梅叶片中(包括游离氨基酸和水解氨基酸)的20种氨基酸进行测定,旨在为柱前衍生高效液相色谱法测定植物体内游离氨基酸提供参考,为草本水杨梅资源开发利用提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

草本水杨梅:采自吉林农业大学校园后山(2014年8月),为处于莲座期的叶片,经吉林农业大学胡全德教授鉴定为蔷薇科路边青属草本水杨梅(*Geum aleppicum* Jacq.),阴干、粉碎,备用。

试剂:20种氨基酸对照品均购自国药集团化学试剂有限公司;乙腈(色谱纯,济宁汇德化工有限公司);异硫氰酸苯酯(PITC)(化学纯,(克拉玛尔)上海紫一试剂厂);三乙胺(分析纯,天津市光复精细化工研究所);其余试剂购自北京化工厂,均为分析纯。

2.2 仪器与设备

超声波清洗器(CGT-3.5K,江苏省张家港市港威

超声电子有限公司);流水式中药粉碎机(LD-34,中国温岭市大海药材器械厂);高效液相色谱仪(CXTH-3000,北京创新通恒科技有限公司);微型pH酸度剂(PHS-W,上海般特仪器有限公司)等。

2.3 实验方法

2.3.1 色谱条件

Ultimate Amino Acid 氨基酸分析专用柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:A为乙腈-水(80:20, V:V), B为乙腈-三水合乙酸钠缓冲溶液(pH6.5)(7:93, V:V),柱温35℃,流速1.0 mL/min,检测波长为254 nm。梯度洗脱程序:0 min, 100% B; 11 min, 93.0% B; 13.9 min, 88.0% B; 14 min, 85% B; 29 min, 66.0% B; 32 min, 30.0% B; 35 min, 0% B; 42 min, 0% B; 45 min, 100% B; 60 min, 100% B。

2.3.2 氨基酸标准溶液的配制

准确称取20种氨基酸,加0.1 mol/L盐酸超声溶解,配制成氨基酸浓度为1.250 mmol/L(胱氨酸浓度0.625 mmol/L)的混合标准品溶液,4℃保存。

2.3.3 衍生化试验

(1)衍生化氨基酸标准溶液的制备

精确吸取混合氨基酸标准溶液400 μL于5 mL离心管中,加入衍生试剂A(取三乙胺2.8 mL,加乙腈17.2 mL混匀)、B(取PITC 50 μL,加乙腈4 mL混匀),各200 μL,振摇,室温静置1 h后加入800 μL正己烷,摇匀,放置10 min后取下层溶液,滤膜(0.45 μm)滤过,取20 μL进行色谱分析。

(2)柱前衍生化水解氨基酸供试品溶液

参考李静静^[16]充氮气除氧以防止氨基酸的氧化方法,本实验抽真空充氮气,反复3次,以期让氮气完全充满水解管,更好地防止氨基酸氧化。具体步骤如下:准确称取草本水杨梅样品粉末0.2 g,加入10 mL盐酸(6 mol/L)和1 mL的苯酚(1%),重复3次抽真空充氮气,水解24 h(110℃)后放至室温,水解液用双蒸水定容至10 mL,3000 r/min离心10 min,上清液80℃水浴挥干,加入2 mL水,重复操作3次,挥干;

加入 2 mL 双蒸水, 超声 1 min 使溶解, 然后再用双蒸水定容至 2 mL, 即为水解氨基酸供试品溶液。吸取供试品溶液 1 mL, 如“2.3.3(1)”项下进行衍生化和色谱分析。

(3) 柱前衍生化游离氨基酸供试品溶液

准确称取草本水杨梅样品粉末 1.0 g, 加 50%乙醇溶液^[17]定容至 50 mL, 超声 30 min, 提取两次, 合并滤液 80 °C 水浴挥干, 用蒸馏水定容至 2 mL, 即为游离氨基酸供试品溶液。取供试品溶液 1 mL, 如“2.3.3(1)”项下进行衍生化和色谱分析。

3 结果与分析

3.1 氨基酸含量测定

取草本水杨梅样品, 按上述方法处理, 分别测定并计算其水解氨基酸和游离氨基酸含量。色谱图见图 1。草本水杨梅叶中 20 种氨基酸含量见图 2。

由图 1 可知, 草本水杨梅中均含有所测定的 20 种氨基酸, 其中人体必需氨基酸 7 种, 半必需氨基酸 5 种。

由图 2 可知, 草本水杨梅水解后氨基酸(水解氨基酸)含量较水解前氨基酸(游离氨基酸)显著升高, 草本水杨梅中游离氨基酸总含量为 40.968 mg/g, 水

解氨基酸总含量为 232.233 mg/g。草本水杨梅中游离氨基酸含量较高的为天冬氨酸(8.498 mg/g)和谷氨酸(8.648 mg/g), 其次为苏氨酸+脯氨酸+丙氨酸(5.913 mg/g)和天冬酰胺(5.509 mg/g)。水解氨基酸含量明显高于游离氨基酸, 苏氨酸+脯氨酸+丙氨酸含量最高(21.798 mg/g), 其次为必需氨基酸酪氨酸(33.895 mg/g)和半必需氨基酸色氨酸(22.576 mg/g)。

水解后草本水杨梅中必需氨基酸(除亮氨酸、异亮氨酸)占总量的 16.64%, 半必需氨基酸占总量的 26.83%; 芳香族氨基酸占总量的 17.56%; 增香族氨基酸(除亮氨酸)占总量的 23.37%; 酸性氨基酸占总量的 13.27%; 碱性氨基酸占总量的 8.83%; 中性氨基酸(除异亮氨酸、亮氨酸)占总量的 49.67%。

3.2 方法学考察

参考马爽等^[17]的方法进行方法学考察, 结果表明: 20 种氨基酸的检测浓度在 0.039~1.250 mmol/L 范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系; 仪器精密度高(RSD 在 0.19%~1.58%之间, $n=6$); 供试品溶液在 12 h 内比较稳定(RSD 在 0.15~2.27 之间, $n=6$); 本方法的重复性良好(水解氨基酸的 20 种氨基酸百分含量的 RSD 在 0.24%~2.50%之间, $n=6$; 20 种游离氨基酸百分含量的 RSD 在 0.31%~2.24%之间,

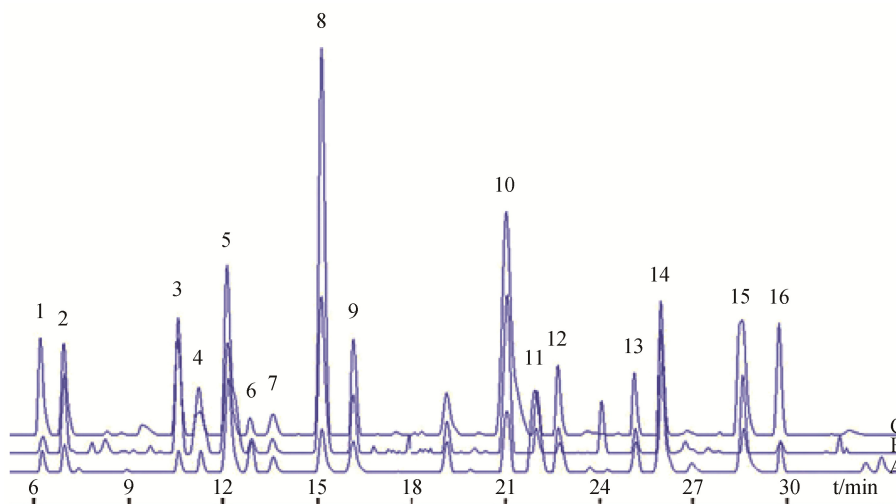


图 1 氨基酸的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of amino acids

A. 对照品(standard amino acids); B. 游离氨基酸(free amino acids); C. 水解氨基酸(hydrolyzed amino acids)

1. 天冬氨酸(Asp); 2. 谷氨酸(Glu); 3. 天冬酰胺(Asn); 4. 丝氨酸(Ser); 5. 甘氨酸(Gly); 6. 谷氨酰胺(Gln); 7. 组氨酸(His); 8. 苏氨酸(Thr)、脯氨酸(Pro)、丙氨酸(His); 9. 精氨酸(Arg); 10. 酪氨酸(Tyr); 11. 缬氨酸(Val); 12. 胱氨酸(Cys-Cys); 13. 甲硫氨酸(Met); 14. 半胱氨酸(Cys)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile); 15. 苯丙氨酸(Phe); 16. 色氨酸(Trp)

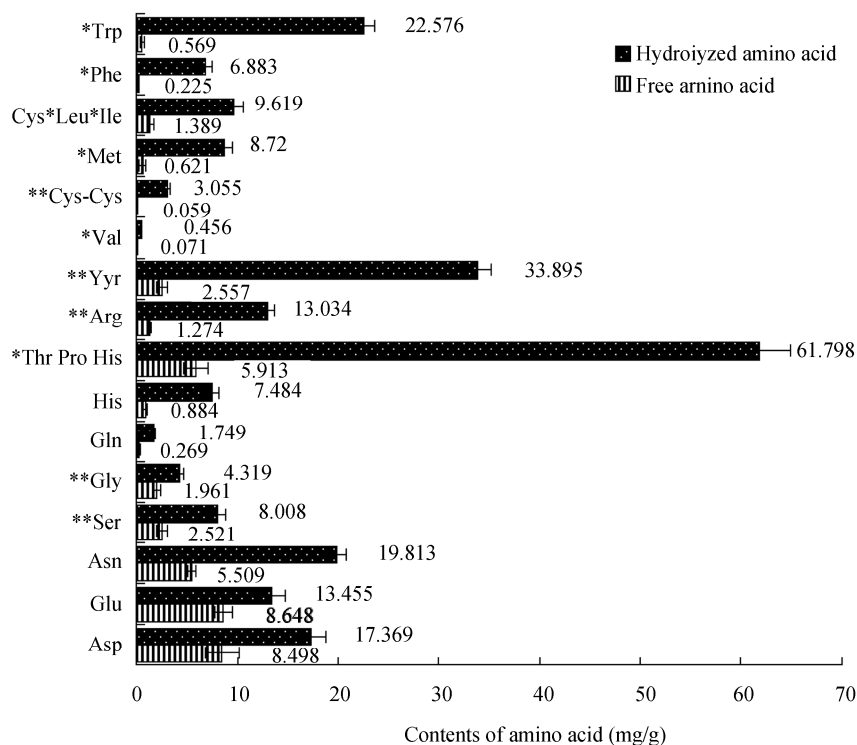


图 2 草本水杨梅中游离氨基酸和水解氨基酸的种类及含量($n=3$)

Fig. 2 Species and content of free amino acids and the hydrolyzed amino acids in *Geum aleppicum* Jacq. ($n=3$)

注: *为人体必需氨基酸; **半必需氨基酸

$n=6$); 平均回收率在 95.29%~102.13%之间, RSD 在 0.85%~2.45%之间($n=6$)。20 种游离氨基酸平均回收率在 96.51%~108.06%之间, RSD 在 0.36%~2.08%之间($n=6$)。

4 讨论

目前, 消费者越来越追求健康、营养、天然的食品, 而氨基酸作为不可缺少的营养物质和蛋白质基本组成物质, 是各类食品的重要组成部分。研究发现, 氨基酸可参加生物体中多种活动, 如作为生长因子、抗氧化剂、DNA 和 RNA 的稳定剂、代谢调节剂、营养成分等^[18]。因此, 测定植物中氨基酸的含量, 有利于植物的开发与利用。

目前, 氨基酸的测定方法主要有氨基酸自动分析仪分析法、高效液相色谱法、毛细管电泳法、紫外检测法等, 而高效液相色谱柱前衍生法更为普遍, 具有以下优点: 直到衍生反应完全可不考虑衍生化反应的动力学; 可以选定任意衍生化条件提高衍生生产

率; 可以预处理衍生化的副产物, 降低或消除副产物的干扰; 流动相不必与分离时柱前衍生化反应的溶剂相匹配。柱前衍生法测定氨基酸所采用的衍生化试剂主要有邻苯二甲醛(OPA)、二甲氨基萘磺酰氯(dansyl-Cl)、2,4-二硝基氟苯(FDNB)、异硫氰酸苯酯(PITC)、异硫氰酸荧光素(FITC)、氯甲酸酯类、氨基苯甲酸酯类等^[19]。由于 PITC 与一级氨基酸和二级氨基酸均能反应, 且室温下氨基酸能与 PITC 反应生成稳定、单一的苯氨基硫甲酰衍生物, 故本试验采用反高效液相色谱法并以 PITC 为衍生试剂对草本水杨梅进行氨基酸测定。

草本水杨梅在我国已有较长的药用历史, 适用于腰腿疼痛、痢疾、跌打损伤、小儿惊风、肠炎、月经不调、白带异常, 外用可用来治疗疮、痈肿等症, 具有利尿、清热解毒、消肿止痛之功效^[11,20], 开发和应用前景广阔。由于草本水杨梅夏季采挖入药, 故本文特对夏季采挖的处于莲座期草本水杨梅叶片进行研究, 测定其水解氨基酸总含量为 232.233 mg/g, 明显

高于游离氨基酸总含量(40.968 mg/g)。表明此时期草本水杨梅氨基酸多以结合态存在,这可能由于氮素供应充足,氨基酸在植物体内形成后,通过谷氨酰胺合成酶进一步胺化成酰胺。虽然多数氨基酸在酸性条件下均较稳定,但在酸水解过程中,处于结合态的氨基酸可能会先被水解出来而含量增加,但随着水解时间的增加,如色氨酸会被破坏、天冬酰胺和谷氨酰胺也会脱酰胺基而使含量降低。但此时期草本水杨梅水解氨基酸含量仍明显高于齐志斌等^[11]水解后测得的已抽苔期草本水杨梅地上茎(53.08 mg/g)、叶(52.85 mg/g)的含量。这可能由于植物在进行生殖生长时,植株体内的蛋白质被大量分解,形成的游离氨基酸分子转运到植物的营养储存器官——果实或籽粒之中,故而未抽苔的莲座期草本水杨梅的叶片较其他时期的叶片氨基酸含量较高。

齐志斌等^[11]分别测定了水解后已抽苔期草本水杨梅根、茎、叶中 15 种氨基酸的含量,而蛋白质在体内被吸收水解成氨基酸后才能被吸收,游离氨基酸则可直接被吸收,故测定草本水杨梅中的游离氨基酸是必要的。本文与齐志斌等^[11]方法相比,对未抽苔期草本水杨梅叶中 20 种氨基酸含量(与齐志斌等^[11]相比多测的氨基酸:丝氨酸,色氨酸,甲硫氨酸,半胱氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺;未测氨基酸:蛋氨酸)进行了测定,并对比了游离氨基酸和水解氨基酸含量差异。结果表明未抽苔的莲座期草本水杨梅的叶片含量更高,该方法更适合测定草本水杨梅中氨基酸含量,为草本水杨梅的开发与利用提供依据。本试验存在同一个峰含有 3 种氨基酸(苏氨酸+脯氨酸+丙氨酸,半胱氨酸+亮氨酸+异亮氨酸),未抽苔的莲座期草本水杨梅的叶片中这几种氨基酸是否都存在,还有待进一步研究与验证。

参考文献

- [1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京:人民卫生出版社,1975.
"The national assembly of Chinese herbal medicine" editorial committee. The national assembly of Chinese herbal medicine [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1975.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(37 卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1985.
Chinese academy of sciences, China flora editor committee. China flora (37 volume) [M]. Beijing: Science Press, 1985.
- [3] 李怀林. 草本水杨梅挥发油及羰基类化合物的结构鉴定[D]. 长春: 吉林大学, 2005.
Li HL. Structure identification of essential oils and carbonyl compounds from *Geum aleppicum* Jacq.[D]. Changchun: Jilin University, 2005.
- [4] 刘安, 杨晓虹, 董雷, 等. 草本水杨梅的研究进展[J]. 特产研究, 2012, 3: 67-71.
Liu A, Yang XH, Dong L, et al. The studies on *Geum aleppicum* Jacq. [J]. Spec Wild Econ Anim Plant Res, 2012, 3: 67-71.
- [5] 李建宽, 刘宏伟, 王乃利, 等. 柔毛水杨梅化学成分研究[J]. 中国药物化学杂志, 2009, 19(2): 135-139.
Li J K, Li H W, Wang N L, et al. Research of chemical constituents from *Geum japonicum* Thunb. var. chinense F. Bolle [J]. Chin J Med Chem, 2009, 19(2): 135-139.
- [6] 赵晶, 高文远, 段宏泉, 等. 日本水杨梅的化学成分研究[J]. 中草药, 2008, 39(7): 978-981.
Zhao J, Gao WY, Duan HQ, et al. Research of chemical constituents from *Geum japonicum* Thunb. [J]. China Tradit Herb Drugs, 2008, 39(7): 978-981.
- [7] 牟凤辉. 草本水杨梅中黄酮类化学成分的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2007.
Mou FH. The studies on the flavones from *Geumaleppicum* Jacq. [D]. Changchun: Jilin University, 2007.
- [8] 李怀林. 草本水杨梅挥发油及羰基类化合物的结构鉴定[D]. 长春: 吉林大学, 2005.
Li HL. Structure identification of essential oils and carbonyl compounds from *Geum aleppicum* Jacq. [D]. Changchun: Jilin University, 2005.
- [9] Xu HX, Ming DS, Dong H, et al. A new anti-HIV triterpene from *Geum japonicum* [J]. Chem Pharm Bull, 2000, 48(9): 1367-1369.
- [10] Xu HX, Kadota S, Wang H, et al. New hydrolyzable tannin from *Geum japonicum* and its antiviral activity [J]. Heterocycles, 1994, 38(1): 167-175.
- [11] 齐志斌, 杨晓虹, 李刚, 等. 草本水杨梅根、茎、叶氨基酸的比较分析[J]. 吉林中医药, 2006, 26(1): 53-54.
Qi ZB, Yang XH, Li G, et al. Comparison and analysis of amino acid in roots, stems and leaves of *Geum aleppicum* Jacq. [J]. Jilin J Trad Chin Med, 2006, 26(1): 53-54.
- [12] 张燕, 张洪斌, 王和飞, 等. 一点红不同生长期氨基酸含量分析[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(32): 15831-15832.
Zhang Y, Zhang HB, Wang HF, et al. Analysis of amino acid content in *Emilia sonchifolia* (Linn.) DC at different growth stage [J]. J Anhui Agric Sci, 2009, 37(32): 15831-15832.
- [13] 高向阳, 张娜, 史可夫. 不同生长期续断菊中氨基酸柱前衍生 RP-HPLC 同时测定及营养特性比较[J]. 广东农业科学, 2013,

- (12): 11–114.
- Gao XY, Zhang N, Shi KF. Simultaneous determination of amino acids in during different growth periods *Sonchus asper* by reversed phase HPLC with pre-column derivatization [J]. Guangdong Agric Sci, 2013, (12): 11–114.
- [14] 李兰芳, 吴树勋, 张魁. 不同生长期白羊草中游离氨基酸的含量[J]. 氨基酸和生物资源, 1997, 19(3): 3–31.
- Li LF, Wu SX, Zhang K, *et al.* Content of free amino acids in *Bothriochloa ischaemum* in different growing phase [J]. Amino Acids Biotic Resources, 1997, 19(3): 3–31.
- [15] 刘冬莲. 不同生长期中菰蓝多糖和氨基酸含量变化规律研究[J]. 分子科学学报, 2010, 26(3): 199–202.
- Liu DL. Studies of polysaccharide and amino acid content in different growth period of *Isatis indigotica* fort [J]. Mol Sci, 2010, 26(3): 199–202.
- [16] 李静静. 甘露聚糖肽口服液中氨基酸的测定以及指纹图谱研究[D]. 西安: 西安理工大学, 2010.
- Li JJ. Studies on determination and fingerprint of amino acids in mannate oral solution [D]. Xi'an: Xi'an University of Technology, 2010.
- [17] 马爽, 赵岩, 赵晓红, 等. 柱前衍生 RP - HPLC 法测定黄芩中氨基酸含量[J]. 上海中医药杂志, 2014, 48(5): 3–31.
- Ma S, Zhao Y, Zhao XH, *et al.* Content determination of amino acids in *radix scutellariae* by precolumn derivatization RP-HPLC [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2014, 48(5): 113–116.
- [18] Guo MC, Shi TY, Duan YH, *et al.* Investigation of amino acids in wolfberry fruit (*Lycium barbarum*) by solid-phase extraction and liquid chromatography with precolumn derivatization [J]. J Food Compos Anal, 2015, 42: 84–90.
- [19] 瞿其曙, 汤晓庆, 胡效亚, 等. 柱前衍生法在氨基酸分析测定中的应用[J]. 化学进展, 2006, 18(6): 789–793.
- Qu QS, Tang XQ, Hu XY, *et al.* Applications of pre-column derivatization for amino acids analysis [J]. Prog Chem, 2006, 18(6): 789–793.
- [20] 薛漓, 饶伟文. 路边青的鉴别研究[J]. 中草药, 2004, 35(4): 455–457.
- Xue L, Rao WW. Identification of *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz. [J]. China Tradit Herb Drugs, 2004, 35(4): 455–457.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



张岳, 在读研究生, 主要研究方向为天然产物化学。

E-mail: zy869006846@163.com



赵岩, 博士, 副教授, 主要研究方向为天然药物有效成分及生物活性。

E-mail: zhyjlu79@163.com



张连学, 博士, 教授, 主要研究方向为药用植物栽培与加工。

E-mail: zlx863@163.com