

PITC 柱前衍生反相高效液相法 测定生制仙茅中氨基酸的含量

周远征^{1,2}, 张凡^{1,2}, 鞠成国^{1,2}, 贾天柱^{1,2*}

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600;

2. 国家中医药管理局重点研究室, 辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的: 考察生制仙茅中氨基酸含量的变化情况。方法: 以异硫氰酸苯酯(PITC)为衍生化试剂衍生后进行 HPLC 分析。采用 Ecosil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 41 °C, 检测波长 254 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 二元梯度洗脱, 测定仙茅酒炙前后氨基酸的含量。结果: 17 种氨基酸在 7.51 ~ 144.96 mg·L⁻¹ 呈良好的线性关系($r = 0.9967 \sim 0.9996$); 平均回收率在 95.3% ~ 104.8%, RSD 均 < 3.0%; 仙茅酒炙后 17 种氨基酸总量增加 23.39%, 其中人体必需的 7 种氨基酸总量酒炙后增加 36.19%。结论: 酒制可使仙茅氨基酸含量增加, 并增强滋补作用。

[关键词] 仙茅; 柱前衍生; 氨基酸; 异硫氰酸苯酯(PITC)

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)16-0089-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160089

Amino Acid Content of A Measurement System in Curculigo by HPLC With Pre-column PITC Derivation

ZHOU Yuan-zheng^{1,2}, ZHANG Fan^{1,2}, JU Cheng-guo^{1,2}, JIA Tian-zhu^{1,2*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. The Key Unit of State Administration of Traditional Chinese Medicine of the Peoples' s Republic of China, Chinese Materia Medica Processing Engineering Center of Liaoning Province, Dalian 116600, China)

[收稿日期] 20131106(007)

[第一作者] 周远征, 从事中药炮制研究, E-mail: zhouyuanzheng88@126.com

[通讯作者] * 贾天柱, 教授, 从事中药炮制研究, Tel: 0411-87586114, E-mail: jiatz@lnutcm.edu.cn

- [6] Loke W M, Proudfoot J M, Stewart S. Metabolic transformation has a profound effect on anti-inflammatory activity of flavonoids such as quercetin; lack of association between antioxidant and lipoygenase inhibitory activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 7 (5):1045.
- [7] 龙笑, 曾莹, 张福泉, 等. 槲皮素联合放射线抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞胶原合成[J]. *基础医学与临床*, 2007, 27(3):248.
- [8] Burger A R, Granger S P, Scott I R. Skin care compositons containing naringenin and/or quercetin and a retinoid; US, 5665367 [P]. 1997-09-09.
- [9] Xixiang Ying, Rongxiang Wang, Jing Xu. HPLC determination of eight polyphenols in the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. major [J]. *J Chromatographic Sci*, 2009, 47(3):201.
- [10] 黄兴富, 黎其万, 刘宏程. 高效液相色谱法同时测定苦荞中芦丁、槲皮素和山柰酚的含量[J]. *中成药*, 2011, 33(2):345.
- [11] Xianyin Lai, Hong Liang, Yuying Zhao. Simultaneous determination of seven active flavonols in the flowers of *Abelmoschus manihot* by HPLC [J]. *J Chromatographic Sci*, 2009, 47(3):206.
- [12] Xiuling Yang, Xiaowei Zhang, Zhifang Yuan. Simultaneous determination of myricitrin, hyperin, quercitroside, and quercetin in *Folium Rhododendri Micranthi* by RP-HPLC [J]. *J Chromatographic Sci*, 2009, 47(9):714.

[责任编辑 顾雪竹]

[Abstract] Objective: This study aimed at inspecting the content changes of amino acids in curculigo. **Method:** The HPLC analysis was performed after derivatization by using phenyl isothiocyanate (PITC) as a derivative reagent. Ecosil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) chromatographic column was used, and the column temperature was 41 °C, with a detection wavelength of 254 nm and a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. Dual gradient elution method was applied in determination of amino acid content in curculigo before and after toasting with wine. **Result:** The concentration of 17 amino acids showing good linear relationship ($r = 0.996\ 7-0.999\ 6$) was in the range of 7.51 to 144.96 mg · L⁻¹. The average recovery was between 95.3% and 104.2%. The RSD was less than 3.0%. The total contents of 17 amino acids in curculigo increased by 23.39% after roasting with wine, while the total contents of 7 essential amino acids increased by 36.19%. **Conclusion:** Roasting with wine can increase the amino acid contents in curculigo for better nourishing function.

[Key words] curculigo; pre- column; amino acids; derivatizationphenylisothiocyanate (PITC)

仙茅具有补肾壮阳、强筋骨、祛寒湿的功效^[1],其主要化学成分有酚苷、皂苷、黄酮和木脂素类等,以酚苷类化合物的含量较高^[2-5]。仙茅具有清除氧自由基、增强免疫、抗骨质疏松、补肾壮阳等药理作用^[6]。

中药炮制可以使药性缓和、改变或增强。用药性相反的辅料来炮制,可以使寒性或热性缓和或改变,称为“以热制寒”或“以寒制热”;而用药性相同的辅料来炮制,则可以使寒性或热性增强,称为“寒者益寒”或“热者益热”。仙茅本身的辛热之性,再用辛热的黄酒炮制,符合热性增强的“热者益热”理论^[7]。但迄今尚无系统的研究来证明这个炮制机制。杜中梅等^[8]研究表明,仙茅酒炙后其化学成分仙茅苷含量有所增加。但对于其他化学成分炮制前后的变化,尚未有文献报道。冯帅等^[9]通过比较 18 种不同药性的中药所含氨基酸的差异,得出氨基酸含量与中药寒热药性具有相关性的结论。本实验采用异硫氰酸苯酯柱前衍生法,对仙茅酒炙前后 17 种游离氨基酸含量变化进行研究,以期解释仙茅酒炙“热者益热”的炮制机制做出进一步解释。

1 材料

仙茅药材(批号 20120401)购于安国市神禾中药材饮片有限责任公司,经辽宁中医药大学药用植物教研室王冰教授鉴定为 *Curculigo orchioides* Gaerten. 的根茎。

酒仙茅制备:取净仙茅段,加入 10% 的黄酒拌匀,闷润,待酒被吸尽后,置炒制容器内,100 °C 炒制 10 min,取出放凉。

异硫氰酸苯酯(PITC)(批号 F1214047,购自 aladdin 公司,纯度 99%),17 种混合氨基酸对照品(批号 SLBF8136V,购自 sigma 公司),乙腈色谱纯,其他试剂均为分析纯,黄酒(酒精度 9.0%,浙江古

泉酿酒有限公司)。

1100 系列液相色谱仪(美国安捷伦公司,包括 agilent-1100 系列 VWD 检测器,Agilent chemstation 色谱工作站),TB215D 型 1/10 万天平(上海精密科学仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Ecosil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),柱温 41 °C,检测波长 254 nm,进样量 5 μL,流速 1 mL · min⁻¹,流动相 A:醋酸钠缓冲溶液(pH 6.5)-乙腈溶液,即 15.2 g 醋酸钠溶于 1 850 mL 水中,溶解后用冰醋酸调 pH 6.5,然后加入 140 mL 乙腈,混匀,用 0.45 μm 滤膜过滤;B 乙腈-水(4:1)溶液。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

t/min	A-B 比例	t/min	A-B 比例
0.00	100:0	45.01	70:30
15.00	97:3	50.00	0:100
20.00	97:3	55.00	100:0
25.00	80:20	60.00	100:0
45.00	78:22		

2.2 对照品、样品、黄酒溶液、空白溶剂柱前衍生

2.2.1 对照品溶液衍生 准确吸取氨基酸标准溶液 200 μL,置 4 mL 离心管中,加入三乙胺乙腈溶液 100 μL,异硫氰酸苯酯-乙腈溶液 100 μL,混匀,室温放置 1 h,然后加入正己烷 400 μL,振摇后放置 10 min,取下层溶液(PTA-AA),置 5 mL 量瓶中,加入 50% 乙腈溶液至刻度,0.45 μm 滤膜滤过,即得,进样 2 μL。

2.2.2 样品、黄酒溶液、空白溶剂衍生 分别取生制仙茅粉末(3 号筛)0.4 g、蒸馏水 10 倍稀释的黄酒溶液 0.4 g(即含黄酒 0.04 g)、蒸馏水 0.4 g,精密

称定。分别置 5 mL 安瓿中,加入水解液(50% 盐酸溶液)2 mL,熔封安瓿瓶,将熔封后的安瓿瓶置 100 °C 环境下,水解 24 h。取出,放冷。将安瓿瓶中的溶液置蒸发皿中,蒸干。残渣用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 5 mL 分 3 次溶解洗涤过滤,并用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液洗滤渣,合并滤液,转移至 25 mL 量瓶中,加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液至刻度。取定容后的溶液 5 mL。置 25 mL 量瓶中,加入 0.1 mol·L⁻¹ 的 PITC-乙腈溶液及 1 mol·L⁻¹ 的三乙胺-乙腈溶液各 2.5 mL,静置 1 h,加 50% 乙腈溶液至刻度。用正己烷 25 mL 萃取上述溶液,静置 20 min,取上层,过 0.45 μm 的微孔滤膜,即得,进样 5 μL。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性试验 分别取混合对照品溶液 2 μL、供试品溶液及空白溶液各 5 μL,按 2.1 项下色谱条件进行测定,17 种氨基酸色谱峰分离度良好,空白无干扰。氨基酸对照品 17 个色谱峰的分度及理论塔板数见表 2。

表 2 氨基酸对照品各峰分离度及理论塔板数

峰号	氨基酸	t/min	理论塔板数	分离度
1	天冬氨酸	7.292	10 209	7.68
2	谷氨酸	8.258	12 150	3.28
3	丝氨酸	11.259	22 584	10.00
4	甘氨酸	12.442	21 659	3.70
5	组氨酸	13.333	18 147	2.42
6	精氨酸	16.060	22 873	6.64
7	苏氨酸	17.269	16 860	2.52
8	丙氨酸	18.913	25 008	3.25
9	脯氨酸	19.853	25 750	1.93
10	酪氨酸	21.661	24 220	3.43
11	缬氨酸	30.117	658 445	31.86
12	蛋氨酸	31.090	429 754	5.74
13	胱氨酸	31.713	359 058	3.10
14	异亮氨酸	35.449	201 136	14.13
15	亮氨酸	36.058	184 905	1.86
16	苯丙氨酸	39.145	147 086	6.30
17	赖氨酸	45.236	96 834	6.85

2.3.2 线性关系 精密吸取 2.2 项下对照品储备液 1,2,4,5,6,8 μL 注入高效液相色谱仪。按上述色谱条件进样,测定峰面积。分别以氨基酸对照品峰面积 Y 为纵坐标,17 种氨基酸对照品质量浓度 X (g·mL⁻¹) 为横坐标,绘制工作曲线,计算回归方程。见表 3。

表 3 17 种氨基酸线性关系

氨基酸种类	回归方程	r	线性范围 /mg·L ⁻¹
天冬氨酸	$Y=3\ 967\ 843.73X+2.00$	0.999 6	13.31 ~ 106.48
谷氨酸	$Y=4\ 771\ 651.94X-5.91$	0.998 6	14.71 ~ 117.68
丝氨酸	$Y=7\ 817\ 887.73X+7.76$	0.998 7	10.51 ~ 84.08
甘氨酸	$Y=11\ 440\ 388.97X+8.81$	0.998 8	7.51 ~ 60.06
组氨酸	$Y=5\ 793\ 556.70X-4.19$	0.998 8	15.52 ~ 124.16
精氨酸	$Y=5\ 157\ 060.85X-0.86$	0.999 1	17.42 ~ 139.36
苏氨酸	$Y=5\ 728\ 379.51X+19.63$	0.997 5	11.91 ~ 95.28
丙氨酸	$Y=9\ 964\ 157.30X+3.95$	0.998 0	8.91 ~ 71.27
脯氨酸	$Y=7\ 920\ 851.43X+10.40$	0.998 7	11.51 ~ 92.08
酪氨酸	$Y=2\ 102\ 663.70X+1.21$	0.998 2	18.12 ~ 144.96
缬氨酸	$Y=8\ 565\ 273.04X+62.67$	0.998 9	11.72 ~ 93.76
蛋氨酸	$Y=6\ 851\ 943.70X+68.40$	0.996 7	14.92 ~ 119.36
胱氨酸	$Y=84\ 045\ 576.36X+43.95$	0.998 4	12.02 ~ 96.12
异亮氨酸	$Y=7\ 536\ 737.80X+6.03$	0.998 7	13.12 ~ 104.96
亮氨酸	$Y=7\ 539\ 100.61X+4.83$	0.998 5	13.12 ~ 104.96
苯丙氨酸	$Y=5\ 881\ 961.26X+6.18$	0.998 3	16.52 ~ 132.16
赖氨酸	$Y=12\ 692\ 270.86X+3.82$	0.998 2	14.62 ~ 116.96

2.3.3 精密度试验 取仙茅生品的供试品溶液,按上述色谱条件连续进样 6 次,17 种氨基酸的 RSD 皆在 0.97% ~ 2.89%,表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 精密称取仙茅生品 6 份,每份约 0.4 g。按 2.2 项下方法制备供试品溶液,依上述色谱条件进样测定,计算各氨基酸含量,17 种氨基酸的 RSD 在 0.65% ~ 2.19%,表明试验重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 取仙茅生品的供试品溶液,按上述色谱条件分别于 0,4,8,12,16,20,24 h 进样按上述色谱条件测定,计算各峰面积的 RSD 在 0.93% ~ 2.56%,表明供试品溶液的稳定性良好。

2.3.6 加样回收率 精密称取已测知含量的样品 6 份各 0.4 g,分别置 5 mL 安瓿中,精密加入氨基酸对照品溶液 1 mL。按前述方法进行衍生后进行测定,天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸的平均回收率分别为 95.3%, 97.3%, 98.1%, 102.5%, 104.8%, 98.3%, 96.9%, 100.6%, 99.4%, 103.7%, 98.4%, 95.7%, 104.6%, 104.2%, 99.4%, 97.2%, 99.4%, RSD 依次为 0.2%, 1.9%, 2.4%, 2.9%, 0.8%, 1.8%, 2.4%,

2.2%, 1.9%, 0.6%, 0.3%, 1.7%, 2.0%, 2.8%, 1.4%, 0.7%, 1.6%, 均 < 3.0%。

2.4 对照品、样品、空白色谱图 按照上述色谱条件,对衍生处理后的标准品溶液、黄酒溶液、生制仙茅以及空白溶液进行测定,并对标准品、生制仙茅、黄酒的图谱进行扣除空白处理。见图 1。

从图谱中可知,对照品、样品中 17 种氨基酸分离度良好,可以进行含量测定。通过对比,在本实验所使用的黄酒中,只检测到了酪氨酸(10 号峰)。

2.5 样品含量测定 按照上述液相条件,取仙茅生、制品溶液进行含量测定,每个样品平行做 3 份,每份测定 3 次。结果见表 4。

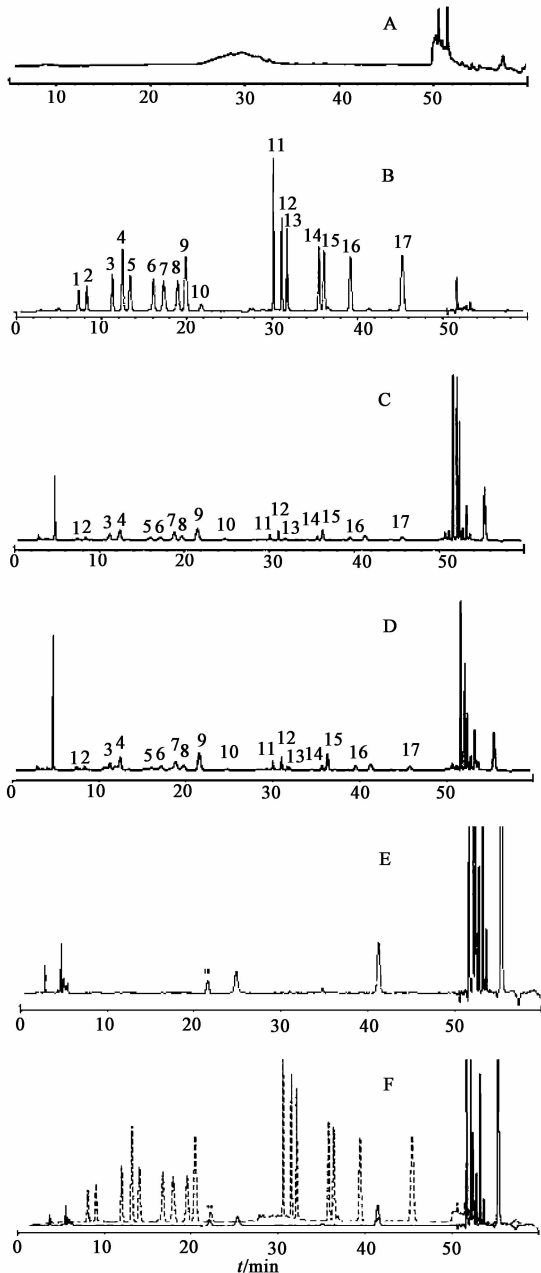
表 4 仙茅酒炙前后氨基酸含量

名称	仙茅 /mg·g ⁻¹	酒仙茅 /mg·g ⁻¹	增长率/%
天冬氨酸	0.57	0.92	61.40
谷氨酸	0.77	0.83	7.79
丝氨酸	1.37	1.12	-18.25
甘氨酸	1.65	1.70	3.03
组氨酸	0.26	0.20	-23.08
精氨酸	1.30	1.05	-19.23
苏氨酸	1.15	1.32	14.78
丙氨酸	1.66	2.16	30.12
脯氨酸	1.14	1.38	21.05
酪氨酸	11.29	14.47	28.17
缬氨酸	0.22	0.42	90.91
蛋氨酸	0.75	1.05	40.00
胱氨酸	0.03	0.18	600.00
异亮氨酸	0.55	0.68	23.64
亮氨酸	1.61	2.46	52.80
苯丙氨酸	0.82	1.13	37.81
赖氨酸	0.51	0.58	13.73
总氨基酸	25.65	31.65	23.39
7 种必须氨基酸总量	5.61	7.64	36.19

4 讨论

氨基酸是蛋白质组成的基本单位,大约有 200 多种,但在机体的营养中起重要作用而且被人们广泛认识的只有 20 多种,称之为标准氨基酸。氨基酸是构建生物机体的众多生物活性大分子之一,是构建细胞、修复组织的基础材料。氨基酸被人体用于制造抗体蛋白以对抗细菌和病毒的侵染,制造血红蛋白以传送氧气,制造酶和激素以维持和调节新陈代谢,是合成神经介质的不可缺少的前体物质,还能够为机体和大脑活动提供能源,是一切生命之元。其中有 8 种氨基酸是人体需要从食物中摄取,为人体必需氨基酸。

中药氨基酸含量测量的方法有许多种,有凯氏定氮法、分光光度法、液相色谱法、气相色谱法、电化学法等^[10]。液相色谱法又分为柱前衍生和柱后衍



A. 空白; B. 对照品扣除空白; C. 生品扣除空白;
D. 制品扣除空白; E. 黄酒扣除空白; F. 黄酒与对照品比较
1. 天冬氨酸; 2. 谷氨酸; 3. 丝氨酸; 4. 甘氨酸; 5. 组氨酸;
6. 精氨酸; 7. 苏氨酸; 8. 丙氨酸; 9. 脯氨酸; 10. 酪氨酸;
11. 缬氨酸; 12. 蛋氨酸; 13. 胱氨酸; 14. 异亮氨酸;
15. 亮氨酸; 16. 苯丙氨酸; 17. 赖氨酸

图 1 仙茅酒炙前后氨基酸 HPLC

生液相色谱法,本文采用实验室较常使用的 PITC 柱前衍生反向液相色谱法。具有成本低,操作相对简单,高分辨率、高灵敏度,并可在短时间内分离多种氨基酸的优点。而且 PITC 与氨基酸和亚氨基酸均能反应,是目前最常用的氨基酸分析方法。

从图中可以看出,本实验所使用的黄酒,在实验条件下,只检测到含量最大的酪氨酸(10号峰),与文献报道^[11]的氨基酸种类数目不同。原因可能是其余氨基酸含量太低,未能达到检测限。在最后实验结果中,我们减去了辅料黄酒中酪氨酸的含量,但酒仙茅的酪氨酸含量仍然是增加的。

从本实验结果可以看出,仙茅酒炙后丝氨酸、组氨酸、精氨酸3种氨基酸含量下降,其中丝氨酸和精氨酸作为中药寒性的标记物质^[12],二者的减少在一定程度上减低了酒仙茅的寒性。其余14种游离氨基酸含量都有不同程度的增加,17种氨基酸总含量增加了23.39%。其中蛋氨酸、缬氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸7种作为人体必需氨基酸总含量增加36.19%,更加有利于满足人体所必需的氨基酸需求。这一结果提示我们,仙茅酒炙热性的增强或许与其总氨基酸含量增加有关。

[参考文献]

- [1] 贾天柱. 中药炮制学[M]. 上海:上海科学技术出版社. 2008:177.
- [2] 刘晴,施建蓉,杨颖,等. 从二仙汤拆方对大鼠卵泡颗粒细胞分泌功能的影响探讨方剂组成原理[J]. 中国

药学杂志,2005,40(21):1622.

- [3] JIAO L, CAO D P, ZHANG Q Y, et al. Antiosteoporotic activity of phenolic compounds from *Curculigo orchioides* [J]. *Phyto Medicine*, 2009, 16(9):874.
- [4] MA C J, ZHANG J Y, Fu J H, et al. Up-regulation of VEGF by MC3T3-E1 cells treated with curculigoside [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(6):922.
- [5] WANG Y K, HONG Y J, WEI M, et al. Curculigoside attenuates Human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂ [J]. *JE Thnopharm Acol*, 2010, 132(1):233.
- [6] 薛春苗,张冰,林志健. 仙茅及其有效成分对不同 LO2 细胞 PXR-CYP3A 的影响研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(19):3348.
- [7] 叶定江. 中药炮制学[M]. 上海:上海科学技术出版社. 1996:13.
- [8] 杜中梅,关复敏,贾天柱. 正交法优选酒炙仙茅的最佳炮制工艺[J]. 中成药, 2008, 30(6):883.
- [9] 冯帅,李峰,周正礼,等. 氨基酸含量与寒热药性相关性的研究与统计分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11):91.
- [10] 章丽,刘松雁. 氨基酸测定方法的研究进展[J]. 河北化工, 2009, 32(5):27.
- [11] 钟其顶,高红波,熊正河,等. PITC 柱前衍生高效液相色谱法测定黄酒中 17 种氨基酸方法研究[J]. 酿酒, 2010, 37(5):74.
- [12] 冯帅,刘杨,李峰,等. 氨基酸含量与寒热药性的多元统计分析[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2013, 15(4):672.

[责任编辑 顾雪竹]