

· 化学与分析 ·

PITC 柱前衍生 HPLC 测定柴胡炮制前后 17 种氨基酸含量

于欢^{1,2}, 钟凌云², 阳强², 宁希鲜², 张金莲², 李小宁², 龚千锋^{1,2*}

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102; 2. 江西中医药大学 药学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的:建立一种同时测定鳖血柴胡中 17 种氨基酸含量的方法,为该药材的质量控制提供参考。方法:以异硫氰酸苯酯(PITC)为柱前衍生试剂,采用 Prevail C₁₈ 色谱柱,流动相[乙腈-水(4:1)]-[乙酸钠缓冲溶液(pH 6.5)-乙腈(97:3)]梯度洗脱,检测波长 254 nm,测定柴胡炮制前后氨基酸的含量。结果:17 种氨基酸在 32 min 内可良好分离;样品平均加样回收率 93.4%~107.1%,RSD 1.8%~3.9%。结论:与其他柱前衍生测定氨基酸含量的方法相比,该方法具有可操作性强、成本低、易推广等优势,可作为柴胡及其炮制品中氨基酸的含量测定方法。

[关键词] 柴胡; 鳖血柴胡; 柱前衍生; 异硫氰酸苯酯; 氨基酸

[中图分类号] R283.2;R284.1;R943.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0025-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015140025

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150527.1029.005.html>

[网络出版时间] 2015-05-27 10:29

Determination of Amino Acids in Bupleuri Radix Before and After Processing by HPLC with Pre-column Derivatization YU Huan^{1,2}, ZHONG Ling-yun², YANG Qiang², NING Xi-xian², ZHANG Jin-lian², LI Xiao-ning², GONG Qian-feng^{1,2*} (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for simultaneous determination of 17 amino acids in raw and processed Bupleuri Radix. **Method:** HPLC analysis was performed after derivatization by using phenyl isothiocyanate (PITC) as a derivative reagent. Samples were analyzed on Prevail C₁₈ column with gradient elution of acetonitrile-water (4:1) and sodium acetate buffer solution (adjusted to pH 6.5) -acetonitrile (97:3), detection wavelength was 254 nm. **Result:** Seventeen amino acids in Bupleuri Radix could be separated well in 32 min. The average recovery was between 93.4%-107.1% with RSD of 1.8%-3.9%. **Conclusion:** Compared with other pre-column derivatization method for determination of the content of amino acid, this method is reliable with good accuracy and repeatability, which is useful for determination of amino acids in raw and processed Bupleuri Radix.

[Key words] Bupleuri Radix; processed Bupleuri Radix by turtle blood; pre-column derivation; phenylisothiocyanate; amino acids

柴胡具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气的作用,临床用于感冒发热、寒热往来、胸胁胀痛等证^[1]。其化学成分主要为三萜皂苷类、挥发油、黄

酮类、多糖类和少量氨基酸等^[2]。鳖血制柴胡是将柴胡与新鲜鳖血、黄酒拌润后文火炒干制得,源自樟帮特色炮制方法^[3,4]。樟帮炮制法是我国传统三大

[收稿日期] 20150330(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260642)

[第一作者] 于欢,在读博士,从事中药饮片质量与炮制机制研究, Tel:0791-87118852, E-mail: yuhuanhebei@163.com

[通讯作者] * 龚千锋,博士生导师,教授,从事中药炮制传承、饮片质量标准与炮制机制研究, Tel:0791-87118852, E-mail: gongqf2002@163.com

炮制帮派之一,为全国中药炮制的主要流派,其炮制加工自成体系,各具特色,在国内享有较高的声誉。鳖血中富含氨基酸、矿物质及微量元素,自晋朝便开始单独作为药用^[5]。以鳖血炮制可抑制柴胡升浮、劫阴之性,临床用于清肝退热、截疟^[6]。由于鳖血制柴胡是一种有地方习惯炮制的中药,且需临方炮制,故临床文献报道较少,更缺乏饮片的质量标准规范。本实验拟通过测定鳖血柴胡及生品中氨基酸的含量,为鳖血柴胡饮片的质量标准研究提供参考,对于继承与发扬樟帮炮制技术具有重要意义。

1 材料

UltiMate3000 型高效液相色谱仪(美国戴安),FA1004N 型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司),TN408LC 型红外测温枪(上海仪迷杰光电技术有限公司)。

柴胡药材(批号 20130624)和中华鳖(批号 20140728)分别购于陕西省宝鸡市陈仓区种植基地、江西省军山湖甲鱼养殖基地,经江西中医药大学范崔生教授鉴定分别为 *Bupleurum chinense* 的根茎,鳖科动物鳖 *Trionyx sinensis*。胱氨酸、丝氨酸、门冬氨酸、组氨酸、谷氨酸、精氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、缬氨酸、盐酸赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 140624-200805),黄酒(浙江塔牌绍兴酒有限公司),甲醇、乙腈、冰乙酸为色谱纯,水为自制双蒸水,其他试剂均为分析纯。

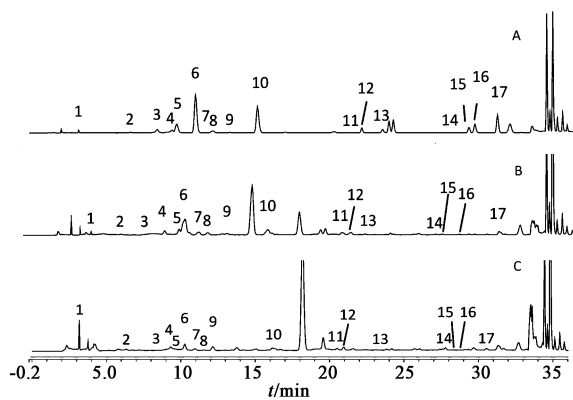
2 方法与结果

2.1 鳖血柴胡制备 取净柴胡段 100 g,加入洁净的新鲜鳖血 50 mL 及黄酒 5 mL 拌匀,闷润至鳖血和酒液被吸尽,150 °C 炒 10 min,取出晾凉,即得。

2.2 色谱条件^[7-8] Prevail C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相[乙腈-水(4:1)](A)-[乙酸铵缓冲溶液(pH 6.5)-乙腈(97:3)](B)梯度洗脱(0~8 min,100%~92.5% B;8~20 min,92.5% B;20~22 min,92.5%~76% B;22~37 min,76% B;37~40 min,76%~70% B;40~45 min,70% B;45~52 min,70%~0% B),检测波长 254 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 20 μL,见图 1。

2.3 对照品、供试品、空白溶剂柱前衍生

2.3.1 对照品溶液的制备及衍生化 分别精密称取各氨基酸对照品适量,用 50% 甲醇配制成一定浓度的对照品溶液,分别吸取各对照品溶液适量,置于同一量瓶中配成混合对照品溶液。吸取混合对照品溶液 2 mL,置于 10 mL 离心管内,加入 0.1 mol·L⁻¹



A. 对照品;B. 柴胡生品;C. 鳖血柴胡;1. 门冬氨酸;2. 胱氨酸;3. 丝氨酸;4. 组氨酸;5. 谷氨酸;6. 苏氨酸;7. 精氨酸;8. 甘氨酸;9. 丙氨酸;10. 脯氨酸;11. 酪氨酸;12. 甲硫氨酸;13. 缬氨酸;14. 盐酸赖氨酸;15. 亮氨酸;16. 异亮氨酸;17. 苯丙氨酸

图 1 柴胡氨基酸 HPLC

Fig. 1 HPLC of amino acids in Bupleuri Radix

异硫氰酸苯酯-乙腈溶液(12:988)1 mL 和 1.0 mol·L⁻¹三乙胺-乙腈溶液(139:861)1 mL,涡旋混合 1 min,暗处放置 1 h,加入正己烷 4 mL,涡旋混合 1 min,静置 10 min,下层溶液过 0.45 μm 滤膜,备用。

2.3.2 供试品溶液的制备及衍生化 精密称取柴胡样品适量(生品 1 g,炮制品 5 g),准确加入 50% 甲醇 25 mL,称定质量,超声提取 30 min,放至室温,称定质量,加 50% 甲醇补足减失的质量,于 3 500 r·min⁻¹离心 15 min,取上层液 2 mL 置于 10 mL 离心管内,后续试验按 2.3.1 项下方法操作,备用。

2.3.3 空白溶液的制备及衍生化 取 50% 甲醇溶液 2 mL,照 2.3.1 项下方法进行衍生化处理,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系 将 17 种氨基酸混合对照品溶液,稀释配置成 5 个梯度混标,以峰面积对质量浓度进行回归处理,计算线性回归方程,结果见表 1。

2.4.2 精密度试验 精密吸取 2.3.1 项下的混合对照品溶液,连续重复进样 6 次,结果各氨基酸峰面积 RSD 0.1%~1.5%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取 2.3.2 项下的同一份供试品溶液,分别在制备后 0,2,4,6,8,12,24 h 按 2.2 项下条件测定,结果各氨基酸峰面积 RSD 0.3%~1.1%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.4 重复性试验 取同一柴胡样品 6 份,分别按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下条件测定,结果各氨基酸含量 RSD 0.2%~1.1%。

2.4.5 回收率试验 精密称取某一柴胡样品 6 份,添加相应质量浓度的氨基酸对照品溶液适量,按

表 1 柴胡中 17 种氨基酸的含量测定

Table 1 Determination of seventeen amino acids in Bupleuri Radix

成分	回归方程	线性范围/mg·L ⁻¹	R ²	平均加样 回收率/%	质量分数/%	
					生品	鳖血制品
胱氨酸	$Y = 18\ 239X - 0.05\ 96$	0.091 6 ~ 0.916	0.999 9	93.4	0.026 1	0.004 6
丝氨酸	$Y = 5\ 563.7X + 0.315\ 8$	0.501 6 ~ 5.016	0.997 0	94.9	0.062 5	0.049 7
门冬氨酸	$Y = 3\ 781.6X + 2.611\ 1$	0.804 ~ 8.040	0.999 5	102.6	0.098 9	0.065 7
组氨酸	$Y = 3\ 599.9X - 1.317\ 8$	0.828 ~ 8.280	0.991 7	103.2	0.084 1	0.029 5
谷氨酸	$Y = 11\ 471X + 0.045\ 6$	0.325 6 ~ 3.256	0.998 1	105.6	0.021 4	0.024 7
苏氨酸	$Y = 4\ 710.6X + 0.051\ 3$	0.426 ~ 4.260	0.999 4	93.7	0.032 0	0.024 5
精氨酸	$Y = 5\ 243.5X + 0.004\ 4$	0.164 6 ~ 1.646	1.000 0	105.4	0.089 9	0.015 7
甘氨酸	$Y = 17\ 654X - 1.155\ 8$	0.428 ~ 4.280	0.999 9	105.4	0.031 5	0.005 5
丙氨酸	$Y = 43\ 165X - 0.088\ 5$	0.034 56 ~ 0.345 6	0.999 8	104.0	0.002 7	0.001 4
脯氨酸	$Y = 11\ 806X - 1.970\ 5$	0.412 ~ 4.120	0.997 7	99.3	0.028 3	0.008 5
酪氨酸	$Y = 3\ 622.3X - 0.006\ 6$	0.160 8 ~ 1.608	0.998 6	104.0	0.028 0	0.012 1
缬氨酸	$Y = 4\ 037.6X - 0.152\ 0$	0.163 2 ~ 1.632	0.992 6	100.1	0.018 9	0.017 5
甲硫氨酸	$Y = 11\ 627X - 0.271\ 3$	0.161 6 ~ 1.616	0.999 0	97.5	0.016 5	0.007 5
盐酸赖氨酸	$Y = 8\ 845.8X - 0.121\ 5$	0.164 ~ 1.640	0.998 9	98.8	0.017 6	0.013 9
亮氨酸	$Y = 8\ 779.8X - 0.706\ 3$	0.163 1 ~ 1.631	0.993 8	107.1	0.020 7	0.014 9
异亮氨酸	$Y = 1\ 030.4X + 0.068\ 7$	0.832 ~ 8.320	0.999 2	99.4	0.084 5	0.038 8
苯丙氨酸	$Y = 6\ 406.7X + 0.245\ 5$	0.42 6 ~ 4.26	0.998 9	102.8	0.058 0	0.005 4

2.3.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下条件测定,计算回收率,结果见表 1, RSD 1.8% ~ 3.9%。

2.5 样品测定 取柴胡生、制品适量,分别按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下条件测定,每个样品平行 3 份,每份测定 3 次,见表 1。

3 讨论

氨基酸对人体和植物体的生命活动具有极其重要的意义,在动物类、菌类、果实种子类、补益类中药中含量较多,可直接干预疾病的治疗。柴胡的化学成分比较复杂,现代研究报道多集中在皂苷类和挥发油成分,对于柴胡中氨基酸含量报道较少。柴胡经鳖血炮制后,其氨基酸含量是衡量鳖血柴胡饮片质量的重要方面,测定该炮制品中氨基酸含量对探讨其炮制机制具有十分重要的意义。随着现代技术的不断发展,氨基酸分析速度、灵敏度与自动化程度不断提高,柱前衍生 HPLC 具有分析时间较短、可操作性强的特点,采用常规 C₁₈ 色谱柱和 UV 检测器即可达到要求,且产物稳定,已被广泛应用于氨基酸检测^[9-10]。预试验对衍生方法进行优化后建立的分析方法,实现了短时间内分离多种氨基酸,成本低、操作简单且准确度相对较高,可满足定量要求,适用于柴胡及鳖血柴胡中氨基酸含量的检测。

由表 1 可知,鳖血柴胡与生品相比,除谷氨酸含量略有升高外,其余氨基酸含量均有所降低,其中组氨酸、精氨酸、异亮氨酸和苯丙氨酸含量降低明显。这是由于在炮制过程中,炒制使大多数氨基酸发生了环化脱水、共聚或熔融的反应,导致炮制品中氨基

酸含量下降。鳖血可填阴滋血,鳖血柴胡临床上养阴制疟效果显著,但鳖血腥味重,历来多以酒拌之并炒干,本文结果提示在鳖血柴胡饮片炮制过程中,应尽量控制炒制时间与温度,对炮制品的氨基酸水平进行测定,以更好地保证鳖血柴胡饮片的临床疗效。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:263.
- [2] 史青,聂淑琴,黄璐琦. 柴胡属植物化学成分及药理研究新进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2002,8(5): 53-56.
- [3] 龚千锋. 樟树中药炮制全书[M]. 南昌:江西科学技术出版社,1990:111.
- [4] 龚千锋. 中药材炮制加工方法图解[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:91.
- [5] 葛洪. 肘后备急方[M]. 北京:人民卫生出版社,1956:16.
- [6] 陆以湜. 冷庐医话[M]. 上海:上海科学技术出版社,1959:115.
- [7] 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):1997-2000.
- [8] 梁琨,张丹,史辑,等. 柱前衍生化 RP-HPLC 测定鸡内金中 16 种氨基酸的含量[J]. 中国中药杂志,2014,39(8):1463-1467.
- [9] 丁永胜,牟世芬. 氨基酸的分析方法及其应用进展[J]. 色谱,2004,22(3):210-215.
- [10] 曾念辉. 氨基酸的分析方法综述[J]. 江西化工,2007,3(1):49-51.

[责任编辑 刘德文]