

HILIC-HPLC-MS/MS 测定酸枣仁内氨基酸类成分的含量

毛叶勤*, 姚鑫, 陈琳

(苏州大学附属第一医院, 江苏 苏州 215006)

[摘要] 目的:建立酸枣仁药材中游离氨基酸类成分的分析方法。方法:采用多反应离子监测(MRM)方式用 Waters Xevo™ TQ 质谱仪进行检测。以 A(含 5 mmol·L⁻¹乙酸胺,0.15% 甲酸和 5 mmol·L⁻¹甲酸胺的水溶液)和 B(含 0.05% 甲酸,1 mmol·L⁻¹甲酸胺和 1 mmol·L⁻¹乙酸胺的乙腈溶液)作为流动相,采用梯度洗脱,色谱柱为 Acquity UPLC BEH Amide (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),柱温 35 °C,流速 0.4 mL·min⁻¹。结果:所测氨基酸成分在 12 min 内分离良好,在相应的浓度范围内与各峰面积呈良好的线性关系,相关系数均 >0.990 4;加样回收率(n=6)为 95.57% ~ 105.36%,RSD 均 <6.7%。结论:本文所建立的分析方法可用于酸枣仁的质量分析及控制,并为氨基酸类成分的检测提供了方法学参考。

[关键词] 亲水色谱-高效液相色谱-质谱联用仪;酸枣仁;氨基酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)21-0067-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016210067

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160906.0937.072.html>

[网络出版时间] 2016-09-06 9:37

Determination of Underivatized Amino Acids from Ziziphi Spinosae Semen by HILIC-HPLC-MS/MS

MAO Ye-qin*, YAO Xin, CHEN Lin

(The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a quantitative method for the free amino acids in Ziziphi Spinosae Semen. **Method:** Acquity UPLC BEH Amide column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) was used for chromatographic separation, temperature of the column was set at 35 °C. The flow rate was 0.4 mL·min⁻¹. Waters Xevo™ TQ worked in multiple reaction monitoring mode (MRM). **Result:** In 12 min, the investigated compounds were determined without derivatization. Our method was validated in terms of sensitivity, recovery, linearity as well as repeatability. **Conclusion:** The established method can be helpful for evaluation the quality control of Ziziphi Spinosae Semen.

[Key words] HILIC-UPLC-MS/MS; Ziziphi Spinosae Semen; amino acid

酸枣仁为鼠李科植物酸枣的干燥成熟种子,一般在秋季果实成熟时采收,采收时去果肉及硬核,取种子,一般生用或微炒用。酸枣仁性甘、酸、平。归肝、胆、心经。具有养心补肝,宁心安神,敛汗,生津之功效。多用于虚烦不眠,惊悸多梦,体虚汗,津伤口渴^[1]。现代研究表明酸枣仁主要为皂苷类、黄酮类、生物碱类、氨基酸类等成分,具有镇静催眠、抗

心律失常、抗惊厥、镇痛、增强免疫功能等作用^[2-3]。

蛋白氨基酸(组成蛋白质的氨基酸)和非蛋白氨基酸(不组成蛋白质的氨基酸)是自然界的氨基酸存在形式。氨基酸是大自然组成重要组成部分,它是形成酶和蛋白质的基础物质。蛋白质对于个体来说具有营养价值,还是神经递质形成的前体^[4-7]。此外氨基酸在生物体内还有其他重要的生物功能,

[收稿日期] 20160417(004)

[基金项目] 江苏省卫生厅医学科研项目(Z201304)

[通讯作者] *毛叶勤,主管中药师,从事临床中药学、中药制剂开发相关研究, Tel:0512-67780433, E-mail:yaobest@163.com

因此测定氨基酸有一定的意义^[8-9]。

关于酸枣仁氨基酸类成分的研究报道较少^[10-11],主要采用氨基酸分析仪,测定酸枣仁中谷氨酸、脯氨酸等 17 种游离氨基酸,其中包括蛋氨酸等 8 种人体必需氨基酸。

现代测定氨基酸的方法主要分为间接测定和直接测定。间接测定主要采用柱前或者柱后衍生化。使用异硫氰酸苯酯,9-氯甲酸苄甲酯等^[12-13]衍生化试剂衍生化后测定,虽然能够得到合适的分离度和灵敏度^[14-17],但缺点是多数衍生化试剂本身性质非常不稳定,测定较为繁琐,部分氨基酸衍生效果差。直接测定的方法虽然步骤简便,但是往往特异性低、选择性差,也存在一定的缺陷^[18]。目前文献研究表明^[19-22],使用 HILIC 模式,对大极性氨基酸、核苷等重要化合物可以得到良好的分离效果和效率。

本文在 HILIC 模式下,采用 HILIC-UPLC-MS/MS 方法直接测定酸枣仁中氨基酸类成分含量的方法。为进一步的阐明酸枣仁药材的药效物质基础、质量控制并深度开发酸枣仁提供了一定的基础。

1 材料

ACQUITY 型 UPLC 系统, Xevo TQ 型检测器(Waters 公司); XPI05DR 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); 超纯水系统(默克有限公司); KQ-250E 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); Anke GL-16GII 型离心机(上海安亭科学仪器有限公司)。

对照品色氨酸(**1**, 批号 DCDB8219V), 苯丙氨酸(**2**, 批号 CDBA7635V), 亮氨酸(**3**, 批号 MNHC5718V), 异亮氨酸(**4**, 批号 MNHD6429V), γ -氨基丁酸(**5**, 批号 HBCE5732V), 甲硫氨酸(**6**, 批号 BADF6521V), 缬氨酸(**7**, 批号 NABD7805V), 脯氨酸(**8**, 批号 CBED7408V), 酪氨酸(**9**, 批号 017H3019V), 丙氨酸(**10**, 批号 023M7658V), 羟脯氨酸(**11**, 批号 NECD6357V), 苏氨酸(**12**, 批号 DECA9012V), 谷氨酸(**13**, 批号 BCB9029V), 谷氨酰胺(**14**, 批号 BCBC6452V), 丝氨酸(**15**, 批号 DEFB7906V), 天冬酰胺(**16**, 批号 021M5416V), 天冬氨酸(**17**, 批号 036H8901V), 精氨酸(**18**, 批号 093M7904V), 组氨酸(**19**, 批号 BDCE6508V) 以及赖氨酸(**20**, 批号 CDFN3901V) 均购自 Sigma 公司。乙腈为色谱纯, 去离子水经易普易达超纯水制备系统自制, 其他化学试剂均为分析纯。10 批酸枣仁分别购自于亳州永刚饮片厂(批次 20140801 ①, 20150915 ②), 亳州中药饮片厂(批号 20140825 ③,

20151104 ④), 常州泰和国药制品有限公司(批号 20130706 ⑤, 20140917 ⑥), 上海雷允上中药饮片厂(批次 20130312 ⑦, 20140511 ⑧), 南京海源中药饮片有限公司(批次 20130410 ⑨, 20130911 ⑩), 经苏州大学附属第一医院陈琳主管中药师鉴定为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* 的干燥成熟种子。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取干燥至恒重的对照品适量, 加水制成质量浓度分别为 **1** ($140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), **2** ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), **3** ($145 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), **4** ($155 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), **5** ($157 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), **6** ($149 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), **7** ($150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), **8** ($127 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), **9** ($135 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), **10** ($161 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), **11** ($144 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), **12** ($157 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), **13** ($104 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), **14** ($155 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), **15** ($140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), **16** ($110 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), **17** ($120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), **18** ($115 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), **19** ($122 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 **20** ($142 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的混合对照品贮备液。取不同体积的上述对照品贮备液加水稀释后, 制成系列浓度的对照品溶液, 用以线性关系考察。对照品溶液经 $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后取上清液进样分析。所有的对照品溶液均在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

2.2 供试品溶液制备 精密称取样品粉末(40 目) 0.2 g, 置 100 mL 锥形瓶中, 加入水 50 mL, 室温超声提取 30 min 后, 静置, $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 待测。

2.3 分析条件 ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱 ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.7 \text{ } \mu\text{m}$)。以 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸胺, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸胺和 0.15% 甲酸水溶液为流动相 A, 以 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸胺, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸胺和 0.05% 甲酸乙腈溶液为流动相 B, 梯度洗脱 (0 ~ 6 min, 15% ~ 20% A; 6 ~ 10 min, 20% ~ 30% A; 10 ~ 12 min, 30% ~ 46% A), 流速 $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样体积 $1 \text{ } \mu\text{L}$ 。

质谱检测条件: 离子化模式 ESI^+ , 检测方式多反应检测 (MRM), 毛细管电压 3.0 kV , 离子源温度 $150 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂气温度 $550 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂气流量 $1\,000 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, 锥孔气流量 $50 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, 碰撞气流量 $0.15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 取样锥孔电压及碰撞能量见表 1。在上述色谱与质谱条件下所测各成分典型 MRM 色谱见图 1。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系、最低定量限 (LOQ) 和最低检测限 (LOD) 考察 取混合对照品贮备液, 加水稀释成一系列浓度的对照品溶液, 按 2.3 项下色谱条件依法测定, 以提取离子流峰面积为纵坐标, 对照品溶液质

表 1 20 种氨基酸类成分的主要质谱检测参数

Table 1 Molecular weight (MW), MRM transitions, cone voltage, collision energies, and retention times (Rt) of 20 target compounds

氨基酸	采样时间/s	相对分子质量	MRM 监测离子	碰撞能量/eV	锥孔电压/V
1	2.19	204	205.09 > 146.02	18.0	16.0
2	2.19	165	166.09 > 120.05	14.0	18.0
3	2.22	131	132.09 > 86.05	10.0	16.0
4	2.40	131	132.09 > 86.05	10.0	16.0
5	2.55	103	104.07 > 87.00	10.0	16.0
6	2.71	149	150.09 > 104.02	10.0	14.0
7	2.99	117	118.03 > 72.05	10.0	12.0
8	3.15	115	116.06 > 70.02	10.0	20.0
9	3.21	181	182.09 > 136.01	16.0	16.0
10	4.43	89	90.03 > 44.02	10.0	16.0
11	4.55	131	132.08 > 67.84	16.0	18.0
12	4.99	119	120.03 > 74.00	20.0	38.0
13	5.74	147	148.11 > 83.91	14.0	12.0
14	6.12	146	147.08 > 83.92	16.0	8.0
15	6.28	105	106.04 > 59.99	8.0	14.0
16	6.54	132	133.01 > 73.87	14.0	12.0
17	7.53	133	134.03 > 87.96	14.0	12.0
18	10.16	174	175.16 > 70.02	18.0	22.0
19	11.25	155	156.09 > 110.02	16.0	20.0
20	11.28	146	147.01 > 83.91	14.0	14.0

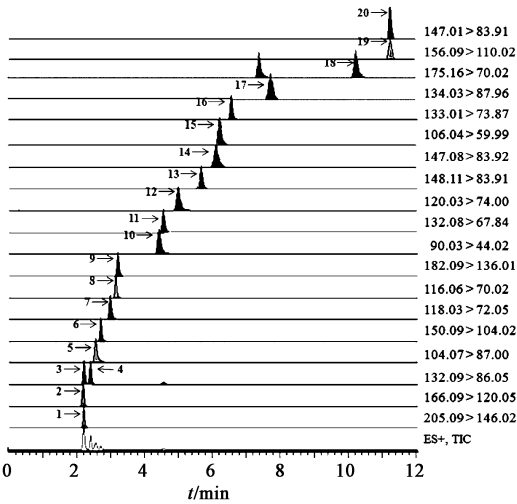


图 1 氨基酸 UPLC-MS/MS (MRM) 色谱

Fig.1 UPLC-MS/MS chromatograms (MRM) of amino acids

量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 为横坐标, 进行线性回归分析, 计算相关系数; LOQ 和 LOD 分别在信号对噪音比值 (S/N) 为 10 和 3 时测定, 结果见表 2。

2.4.2 精密性、重复性和稳定性试验 精密性试验: 取 2.1 项下的混合对照品溶液, 在上述色谱条件下分别在 1 d 内重复进样 6 次, 在连续 3 d 内重复进

样 6 次, 计算 RSD 评价日内及日间精密性, 结果见表 3。

重复性试验: 按 2.2 项下的方法制备 6 份酸枣仁的供试品溶液 (批次①)。在上述色谱与质谱条件下, 进样分析。批次①中氨基酸 1 ~ 20 平均质量分数分别为 99.5, 321.1, 585.1, 186.8, 2.1, 0.9, 376.3, 330.5, 298.1, 506.5, 1.8, 234.6, 680.4, 66.9, 137.3, 24.1, 16.2, 987.3, 78.3, 266.5 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 以样品中各成分含量的 RSD 来评价其稳定性, 见表 3。

稳定性试验: 取重复性试验中的一份供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按上述色谱与质谱条件进样测定, 以各成分峰面积 RSD 考察其稳定性。结果见表 3。

2.4.3 回收率试验 取已知含量的同一样品约 0.1 g, 精密称定, 平行 6 份, 分别加入等量对照品, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3 项下方法测定, 计算其回收率, 结果见表 3。

2.5 样品测定 分别取不同批次酸枣仁, 按 2.2 项下方法制备供试溶液, 按 2.3 项下的色谱与质谱条

表 2 线性回归方程及 LOD 和 LOQ 测定

Table 2 Linear regression data, LOD and LOQ of investigated compounds

氨基酸	线性方程	<i>r</i>	线性范围/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	检测限/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
1	$Y = 65\ 432X + 23\ 456$	0.999 1	0.02 ~ 52.00	2.12	7.32
2	$Y = 32\ 984X - 12\ 531$	0.999 3	0.02 ~ 12.70	2.01	5.77
3	$Y = 41\ 532X + 71\ 732$	0.994 2	0.02 ~ 16.11	2.66	7.80
4	$Y = 65\ 820X + 11\ 907$	0.996 6	0.02 ~ 15.51	3.46	11.11
5	$Y = 47\ 103X + 31\ 820$	0.996 2	0.01 ~ 16.63	1.31	3.45
6	$Y = 19\ 753X - 5\ 901$	0.993 3	0.01 ~ 14.05	1.21	3.90
7	$Y = 51\ 242X - 25\ 374$	0.997 5	0.02 ~ 14.50	5.33	15.44
8	$Y = 91\ 483X + 23\ 784$	0.991 2	0.02 ~ 11.30	0.61	1.90
9	$Y = 10\ 532X - 2\ 312$	0.996 3	0.04 ~ 11.50	8.01	27.31
10	$Y = 12\ 491X - 9\ 513$	0.998 5	0.20 ~ 35.50	20.21	66.11
11	$Y = 16\ 031X - 19\ 672$	0.994 2	0.02 ~ 13.50	1.80	6.21
12	$Y = 707.12X - 1\ 753.1$	0.999 9	0.90 ~ 88.60	15.41	53.21
13	$Y = 11\ 082X - 14\ 871$	0.990 4	0.35 ~ 33.40	55.41	151.51
14	$Y = 21\ 873X - 10\ 372$	0.991 1	0.22 ~ 18.70	16.01	52.22
15	$Y = 4\ 321X - 2\ 742$	0.990 5	0.31 ~ 16.30	41.81	135.44
16	$Y = 9\ 536X - 6\ 029$	0.992 2	0.34 ~ 28.55	85.51	252.31
17	$Y = 2\ 362X - 1\ 787$	0.991 7	0.88 ~ 76.00	98.21	284.66
18	$Y = 51\ 574X - 12\ 758$	0.999 3	0.41 ~ 36.66	55.22	155.46
19	$Y = 40\ 294X + 8\ 864$	0.995 5	0.42 ~ 60.50	75.52	216.31
20	$Y = 37\ 853X - 40\ 482$	0.998 2	0.83 ~ 67.30	65.17	193.62

表 3 精密度、重复性、稳定性和回收率试验 ($n = 6$)

Table 3 Precision, repeatability, stability and recovery of 20 analytes ($n = 6$)

%

氨基酸	精密度 RSD		重复性 RSD	稳定性 RSD	回收率	
	日间	日内			回收率	RSD
1	2.3	2.9	1.6	2.4	100.17	4.7
2	1.3	2.7	2.0	2.1	105.36	5.8
3	0.8	1.2	2.6	2.0	98.64	5.8
4	1.1	3.1	2.8	2.6	99.23	5.2
5	0.7	2.5	4.9	6.4	101.12	4.5
6	0.9	2.4	4.9	4.6	95.57	4.9
7	2.3	3.3	2.7	2.4	99.33	4.8
8	1.8	1.8	2.7	3.3	102.17	3.3
9	0.5	1.8	3.6	3.8	97.54	2.0
10	1.8	2.8	1.1	1.1	102.59	4.6
11	2.2	2.4	1.7	5.4	101.75	4.1
12	3.3	3.5	2.9	4.0	100.49	6.8
13	3.2	2.9	4.1	4.1	102.48	5.4
14	5.1	5.2	4.7	6.0	99.54	4.6
15	2.2	3.2	2.4	3.1	100.49	4.6
16	3.0	3.0	2.0	3.6	98.39	5.0
17	3.7	3.8	4.8	4.6	102.27	2.9
18	2.7	3.1	2.1	3.1	104.94	2.6
19	3.2	3.3	2.6	4.6	103.64	3.2
20	3.6	3.2	3.9	5.0	101.75	4.7

件依法测定,利用已建立的标准曲线,计算酸枣仁中 20 个氨基酸成分的含量,结果见表 4。由表 4 可见,各氨基酸的含量具有一定的差异。

由表 4 可见,10 批样品总氨基酸质量分数在

3 062.7 ~ 6 200.4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,其中以⑨号样品含量最低,②号样品最高。各种氨基酸类成分中,精氨酸含量最高(平均占总氨基酸 21.11%),甲硫氨酸含量最低(平均占总氨基酸 0.04%)。

表 4 不同批次酸枣仁中氨基酸质量分数

Table 4 Contents of amino acids in Ziziphi Spinosa Semen

批次	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	总氨基酸
①	99.5	312.1	585.1	186.8	2.1	0.9	376.3	330.5	298.1	506.5	1.8	234.6	680.4	66.9	137.3	24.1	16.2	987.3	78.3	266.5	5 191.3
②	120.9	341.4	596.2	199.4	3.5	1.8	380.2	354.8	315.1	557.8	2.7	276.1	729.3	85.2	174.1	468.3	27.7	1165.2	90.3	310.4	6 200.4
③	78.7	243.1	312.6	146.6	1.1	0.8	275.1	198.8	145.7	335.4	1.0	108.1	341.3	47.8	89.9	341.7	10.2	784.5	56.2	134.3	3 652.9
④	89.8	265.9	298.5	155.3	1.5	1.1	268.4	210.5	165.2	349.1	1.1	130.2	401.2	52.1	97.3	150.4	17.8	865.3	79.3	140.2	3 740.2
⑤	93.8	300.4	417.5	149.3	1.0	0.9	199.4	179.2	170.3	241.1	1.2	137.1	356.2	48.6	87.1	14.7	13.1	802.1	56.1	141.1	3 410.2
⑥	110.1	325.3	421.8	130.4	1.1	1.0	200.8	199.8	179.4	342.1	2.3	179.3	412.1	58.4	124.1	56.7	16.2	881.2	76.3	152.3	3 870.7
⑦	100.2	295.3	574.2	199.3	2.4	1.1	356.1	310.4	321.3	488.8	2.1	199.4	668.1	67.2	127.8	50.7	15.8	954.9	69.1	277.1	5 081.3
⑧	118.9	280.3	569.4	200.1	3.0	1.3	355.2	348.4	350.4	551.4	2.9	263.8	734.4	99.4	168.2	22.3	28.1	1078.4	85.2	315.1	5 576.2
⑨	89.8	214.7	190.4	109.1	0.9	-	198.9	100.2	101.5	205.1	-	98.5	273.1	44.9	78.1	494.4	9.3	700.3	43.4	110.1	3 062.7
⑩	108.9	253.1	206.5	121.4	1.2	1.1	201.3	105.4	133.7	231.4	1.1	124.9	356.1	57.9	98.2	60.7	13.0	812.3	60.1	141.3	3 089.6

注: - 表示未检出。

3 讨论

3.1 提取方法优化 采用单变量法,分别对提取时间(50,30,10 min)、提取溶剂(50% 甲醇、水和 20% 甲醇)、提取溶剂用量(70,50,30 mL)和提取方法(超声提取、加热回流提取)等因素进行了考察,以获得最佳提取效率。结果发现,水较 50% 甲醇和 20% 甲醇可获得较高的提取效率;提取 30 min 时提取效率达到最高;超声提取与加热回流提取对各氨基酸提取率无显著差异;提取溶剂用量考察结果显示,固液比为 1:250 时氨基酸提取效率可达最大,且氨基酸浓度适宜于质谱分析。所以,最终选择的提取条件为水 50 mL 超声提取 30 min。

3.2 色谱分析条件的优化 首先比较 ACQUITY UPLC BEH HILIC 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)与 ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),结果显示发现后者对氨基酸类化合物具有较强的保留及分离效能。流动相考察发现 pH 为影响色谱分析的主要因素,最终确认以含 0.05% 甲酸,1 mmol·L⁻¹ 乙酸胺和 1 mmol·L⁻¹ 甲酸胺乙腈溶液作为有机相,以含 0.15% 甲酸,5 mmol·L⁻¹ 乙酸胺和 5 mmol·L⁻¹ 甲酸胺水溶液为水相较为适宜。

3.3 质谱分析条件的优化 氨基酸类化合物分子结构中特有的官能团,使其不仅可以形成稳定的羧基基团(负离子),还可以形成稳定的氨基/亚氨基

(正离子)。本实验比较正、负离子模式下氨基酸类化合物的响应强度,结果显示在 ESI⁺ 模式下所测定氨基酸类化合物均可呈现稳定的准分子离子[M + H]⁺,且响应强度多大于 ESI 模式。因此本实验选择在 ESI⁺ 模式下,应用 IntelliStart 功能自动采集用于 MRM 测试的离子碎片及最佳锥孔电压和碰撞能量。

3.4 小结 本实验所建立的方法可适用于酸枣仁中氨基酸类成分的分析评价,为其质量控制提供了有效的方法。

[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,2015: 366-367.

[2] 王茜,张艳强,杨艳婷,等. 酸枣仁的化学成分及应用研究进展[J]. 黑龙江医药, 2015, 28(2): 259-261.

[3] 张琨,王越,刘春梅,等. 酸枣仁药理作用及新用途[J]. 黑龙江医药, 2010, 23(2): 247.

[4] Hannelore K, Katja D, Wolfram G, et al. Advances in amino acid analysis[J]. Anal Biochem, 2009, 393(2): 445-452.

[5] Innocenzo G C, Michela C. Isocratic ion chromatographic determination of underivatized amino acids by electrochemical detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 478(2): 179-189.

[6] Yan D, Li G, Xiao X H, et al. Direct determination of fourteen underivatized amino acids from *Whitmania pigra*

- by using liquid chromatography-evaporative light scattering detection [J]. *J Chromatogra A*, 2007, 1138 (1/2): 301-304.
- [7] 陈国华, 邓富良, 刘健平, 等. 银杏叶中氨基酸和维生素含量的分析 [J]. *湖南医科大学学报*, 2001, 26 (4): 335-338.
- [8] Teodor H, Monica C, Claudia C, et al. Separation, identification and quantitative determination of free amino acids from plant extracts [J]. *J Pharm Sci*, 1998, 18 (3): 319-323.
- [9] Lleo B, Wim P, Yair S, et al. Ultra-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in protein hydrolysates using an automated pre-column derivatisation method [J]. *J Chromatogra A*, 2008, 1189 (1/2): 406-409.
- [10] 张照荣, 周凤琴, 战旗, 等. 山东产酸枣仁中微量元素及氨基酸分析 [J]. *微量元素与健康研究*, 1997, 14 (3): 29-30.
- [11] 张亚利. 陕西省不同产区酸枣仁品质比较研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- [12] Jia S D, Kang Y, Park J, et al. Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogra A*, 2011, 1218 (51): 9174-9182.
- [13] Kazutaka S, Akihisa Y, Kazuo H, et al. Multifunctional and highly sensitive precolumn reagents for amino acids in liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2009, 81 (35): 5172-5179.
- [14] Jenny A, Diego C, Joho P, et al. Sensitive and rapid method for amino acid quantitation in malaria biological samples using AccQ. Tag ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization-MS/MS with multiple reaction monitoring [J]. *Anal Chem*, 2010, 82 (2): 548-558.
- [15] Qu J, Wang Y, Luo G A, et al. Validated quantitation of underivatized amino acids in human blood samples by volatile ion-pair reversed-phase liquid chromatography coupled to isotope dilution tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2002, 74 (9): 2034-2040.
- [16] Tomoyoshi S, Yuji K, Maitin R, et al. Qualitative and quantitative analysis of amino acids by capillary electrophoresis-electrospray ionization-tandem mass spectrometry [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25 (13): 1964-1972.
- [17] Yu H, Ding Y S, Mou S F. Some factors affecting separation and detection of amino acids by high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection [J]. *J Chromatogra A*, 2003, 997 (1/2): 145-153.
- [18] Geasella I, Contursi M. Isocratic ion chromatographic determination of underivatized amino acids by electrochemical detection [J]. *Anal Chim Acta*, 2003, 478 (2): 179-189.
- [19] Pavel J. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review [J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 692 (1/2): 1.
- [20] David N, Dominic A, Tetty B. Hydrophilic interaction liquid chromatography of anthranilic acid-labelled oligosaccharides with a 4-aminobenzoic acid ethyl ester-labelled dextran hydrolysate internal standard [J]. *J Chromatogra A*, 2012, 1233(7): 66-70.
- [21] Chen P, Li W, Li Q, et al. Identification and quantification of nucleosides and nucleobases in *Geosaurus* and *Leech* by hydrophilic-interaction chromatography [J]. *Talanta*, 2011, 85 (3): 1634-1641.
- [22] Cai X M, Zou L J, Dong J, et al. Analysis of highly polar metabolites in human plasma by ultra-performance hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 650 (1): 10-15.

[责任编辑 顾雪竹]