

铁皮石斛中总氨基酸的含量测定及提取工艺优选

王培培¹, 鲁芹飞¹, 李婧¹, 黄松^{1,2*}, 陈建南^{1,2}

(1. 广州中医药大学, 广州 510006;

2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808)

[摘要] **目的:** 优选铁皮石斛中总氨基酸提取工艺, 并建立其含量测定方法。 **方法:** 以天冬氨酸为对照品, 采用 UV 测定铁皮石斛中总氨基酸含量; 在单因素试验基础上, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验考察提取时间、提取次数及溶剂用量对铁皮石斛中总氨基酸提取工艺的影响。 **结果:** 最佳提取工艺为加 20 倍量 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 超声提取 30 min, 提取 1 次。 **结论:** 优选的提取工艺稳定可行, 建立的含量测定方法简便、准确、重复性好。

[关键词] 铁皮石斛; 总氨基酸; 紫外分光光度法; 含量测定; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0030-04

[doi] 10.11653/syfy2013140030

Optimization of Ultrasonic Extraction Technology and Content Determination of Total Amino Acids from *Dendrobium officinale*

WANG Pei-pei¹, LU Qin-fei¹, LI Jing¹, HUANG Song^{1,2*}, CHEN Jian-nan^{1,2}

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Dongguan Institution for Mathematics and Theoretics Engineering Research, Dongguan 523808, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of total amino acids from *Dendrobium officinale* and establish its content determination method. **Method:** The content of total amino acids was determined by UV with aspartic acid as reference; Effects of the concentration of extraction solvent, solid-liquid ratio, extraction temperature, extraction time and times on yield of total amino acids were investigated by single factor tests, basis on these, extraction technology was optimized by orthogonal test. **Result:** Optimum ultrasonic extraction conditions were as follow: extracted 1 time at 60 °C with 20 times the amount of $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl for 30 min. **Conclusion:** This optimized technology was stable and feasible, established method of content determination was convenient and accurate with good repeatability.

[Key words] *Dendrobium officinale*; total amino acids; ultraviolet spectrophotometry; content determination; extraction technology

铁皮石斛为我国名贵中药材, 具有独特的药用价值, 主伤中、除弊、下气、补五脏虚劳羸弱、强阴、久服厚肠胃^[1-2], 民间称其为“救命仙草”。现代药理研究表明, 铁皮石斛具有较强的抗肿瘤和增强免疫

功效^[3-4], 其有效成分包括铁皮石斛多糖、氨基酸等。本实验采用紫外-可见分光光度法测定铁皮石斛中总氨基酸的含量, 在单因素试验基础上, 通过正交试验优选氨基酸的提取工艺参数, 为铁皮石斛的

[收稿日期] 20130205(014)

[基金项目] 国家“十二五”科技支撑计划课题(2011BAI01B02); 广东省科技厅中药现代化专项(K5080016); 广东省科技计划项目(2008A030101009); 广东省科技计划项目(2011A030100011); 广东省教育部产学研结合项目(2010B090400474)

[第一作者] 王培培, 在读硕士, 从事中药新药开发研究, E-mail: wangpeipei8201@163.com

[通讯作者] *黄松, 副教授, 硕士生导师, 从事中药新药开发研究, Tel: 020-32503212, E-mail: hsl318@yahoo.com.cn

开发提供实验依据。

1 材料

UV mini 型紫外分光光度计(日本岛津)。天冬氨酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 624-200104),茛三酮(天津大茂化学试剂厂),试剂均为分析纯。

2% 茛三酮溶液配制:精密称取茛三酮 2.00 g 置 100 mL 棕色量瓶中,加乙醇适量溶解后,定容至刻度,摇匀,避光保存。铁皮石斛采于饶平,经广州中医药大学新药开发研究中心陈建南研究员鉴定为兰科植物铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 的干燥茎,标本存放于广州中医药大学新药开发研究中心。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的天冬氨酸对照品 10.14 mg,置于 10 mL 量瓶中,加水定容至刻度,作为对照品储备液。精密移取该储备液 5.0 mL 至 50 mL 量瓶中,加水定容至刻度,即得。

2.2 供试品溶液的制备 准确称取铁皮石斛粗粉 1.00 g 置具塞锥形瓶中,加 20 倍量 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液,密塞,超声提取 30 min,抽滤,滤液用 15% NaOH 溶液调至中性,转移至 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 测定方法考察

2.3.1 检测波长的确定 取适量天冬氨酸对照品溶液和供试品溶液,分别以随行试剂作空白,采用 UV 于 200 ~ 800 nm 扫描,结果显示对照品溶液无吸收,因此考虑添加显色剂。在预试验基础上,选用 CH_3COONa 缓冲盐溶液-茛三酮溶液体系进行显色,发现紫外吸收光谱有 2 个最大吸收峰,因为显色剂和未显色的供试品溶液在 200 ~ 440 nm 有很强的紫外吸收,可能会造成较大试验误差,故选定最大吸收波长 568 nm。

2.3.2 缓冲盐溶液 pH 考察 精密移取对照品溶液 2.0 mL 于 25 mL 量瓶中,加水补足至 4.0 mL,加入 pH 分别为 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.5, 8.0 的 CH_3COONa 缓冲盐溶液和 2% 茛三酮溶液各 1.0 mL,于沸水浴加热 40 min,放冷 15 min,加水定容。以相应试剂为空白,于 568 nm 处测定吸光度(A)。结果显示,在 pH 6.5 处有最大吸光度,说明氨基酸在 pH 6.5 条件下反应最完全。

2.3.3 缓冲盐溶液用量考察 精密移取对照品溶液 2.0 mL 于 25 mL 量瓶中,加水补足至 4.0 mL,分别加入 pH 6.5 的 CH_3COONa 缓冲盐溶液 0.2, 0.5,

1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,各加入 2.0% 茛三酮溶液 1.0 mL,按 2.3.2 项下方法处理,测定 A。结果显示,当 CH_3COONa 缓冲盐溶液用量为 1.0 mL 时,A 最大,之后随缓冲盐用量的增加,A 有变小的趋势。

2.3.4 显色剂用量考察 精密移取对照品溶液 2.0 mL 于 25 mL 量瓶中,加水补足至 4.0 mL,加入 pH 6.5 的 CH_3COONa 缓冲盐溶液 1.0 mL,分别加入 2.0% 茛三酮溶液 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL,按 2.3.2 项下方法处理,测定 A。结果显示,随显色剂用量的增加,A 不断增大,当显色剂用量为 1.0 mL 时,A 接近最大值。

2.3.5 沸水浴加热时间考察 精密移取对照品溶液 2.0 mL 于 25 mL 量瓶中,加水补足至 4.0 mL,加入 pH 6.5 的 CH_3COONa 缓冲盐溶液 1.0 mL,精密加入 2% 茛三酮溶液 1.0 mL,于沸水浴中分别加热 10, 20, 30, 40, 50, 60 min,放冷 15 min,加水定容,测定 A。结果显示,加热时间为 40 min 时,A 最高;之后随加热时间延长,A 无明显变化。

2.4 标准曲线的绘制 精密移取对照品溶液 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,加水补足至 4.0 mL,精密加入 pH 6.5 的 CH_3COONa 缓冲盐溶液和 2% 茛三酮溶液各 1.0 mL,摇匀,置沸水浴中加热 40 min,取出,放冷 15 min,加水定容。以相应溶剂为空白,于 568 nm 处测定 A,以天冬氨酸溶液质量浓度为横坐标,A 为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 2.6297X - 0.0864 (r = 0.9997)$ 。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 分别精密移取对照品溶液 2.0 mL 和供试品溶液 12.0 mL,按 2.4 项下方法显色,以相应溶剂为空白,于 568 nm 处测定 A ($n = 6$),结果对照品溶液吸光度的 RSD 0.11%,供试品溶液的 RSD 0.14%。

2.5.2 稳定性试验 精密移取供试品溶液 12.0 mL,按 2.4 项下方法显色,分别于 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 min 测定 A,结果表明显色完成后 35 min 内 A 的 RSD 2.6%,故该显色反应尽量控制在 35 min 内。

2.5.3 重复性试验 取同一批次药材,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,精密移取该供试品溶液 12.0 mL,按 2.4 项下方法显色 ($n = 6$),结果氨基酸质量分数 (0.217 ± 0.002)%, RSD 1.1%,表明该方法重复性良好。

2.5.4 加样回收率试验 取已知含量的铁皮石斛药材粗粉 2.0 g,精密称定,平行 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液(氨基酸 0.247 2 mg),按 2.4 项下方法显色,精密加入天冬氨酸对照品 0.24 mg,结果见表 1。

表 1 总游离氨基酸含量测定的加样回收率试验

药材量 /g	测得量 /mg	回收率 %	平均回 收率/%	RSD /%
2.000 2	0.489 5	100.95	99.87	1.7
2.000 0	0.501 2	100.34		
2.000 1	0.479 8	96.91		
2.000 2	0.484 4	98.82		
2.000 4	0.488 7	100.60		
2.000 4	0.491 1	101.60		

2.6 总游离氨基酸含量测定 取一年生不同批次铁皮石斛茎、叶、原球茎,剪成 ≤ 3 mm 小段,研碎,混合均匀,精密称定 2~4.0 g,置具塞锥形瓶中加 20 倍量 0.1 mol·L⁻¹HCl 溶液,密塞,超声提取 45 min,抽滤,滤液用 15% 氢氧化钠溶液调 pH 至中性,转移至 100 mL 量瓶中,加水定容。精密移取该溶液 6.0 mL 于 25 mL 量瓶中,按 2.4 项下方法显色,以相应试剂为空白,于 568 nm 处测定 A,计算总游离氨基酸含量,结果见表 2。

表 2 不同批次铁皮石斛各部位的总游离氨基酸质量分数 %

No.	产地	鲜品茎	鲜品叶	鲜品原球茎	干品茎
1	饶平基地-1				0.348
2	饶平基地-2				0.342
3	饶平基地-3	0.06	0.127	0.333	0.308
4	饶平基地-4	0.045	0.143	0.328	0.206
5	饶平基地-5	0.062	0.233	0.369	0.201
6	饶平基地-6	0.137	0.158	0.354	0.444
7	饶平基地-7			0.311	0.394
8	饶平基地-8				0.227
9	饶平基地-9				0.241
10	饶平基地-10	0.122	0.123		0.212
11	云南师宗	0.091	0.132		0.175
12	云南思茅	0.056	0.141	0.352	0.145
13	广东河源	0.047	0.116		0.108
14	广东南雄	0.068	0.107		0.101
15	福建武夷山	0.07	0.146		0.175
16	浙江雁荡山	0.099		0.355	
17	云南德宏州	0.099	0.171		

2.7 单因素试验考察

2.7.1 提取溶媒及提取方法 准确称取铁皮石斛药材粗粉 6 份,每份 2.0 g,分别加 20 倍量水、70% 乙醇和 0.1 mol·L⁻¹盐酸回流或超声提取 2.0 h,滤过,用少量水洗涤药渣和容器,滤液与洗涤液定容至 100 mL。精密移取该溶液 6.0 mL 于 25 mL 量瓶中,按 2.4 项下方法显色,以相应试剂为空白,于 568 nm 处测定 A,结果回流法中总游离氨基酸提取量分别为 4.12,4.10,4.14 mg·g⁻¹,超声法中则分别为 4.12,4.09,4.13 mg·g⁻¹,故采用 0.1 mol·L⁻¹盐酸超声提取。

2.7.2 提取温度 准确称取铁皮石斛药材粗粉 4 份,每份 2.0 g,置具塞锥形瓶中,加入 20 倍量 0.1 mol·L⁻¹HCl,密塞,分别于 20,30,40,45 °C 超声提取 30 min,抽滤,滤液用 15% 氢氧化钠调 pH 至中性,转移至 100 mL 量瓶中,加水定容,精密移取 4.0 mL 于 25 mL 量瓶中,按 2.4 项下方法显色,测定 A,结果总游离氨基酸提取量分别为 4.14,4.14,4.13,4.13 mg·g⁻¹,故选择 30 °C。

2.7.3 提取时间 准确称取铁皮石斛药材粗粉 5 份,每份 2.0 g,置具塞锥形瓶中,加入 20 倍量 0.1 mol·L⁻¹HCl,密塞,分别于 30 °C 超声提取 10,20,30,40,50,60 min,其他操作同 2.7.2 项,结果总游离氨基酸提取量分别为 4.10,4.11,4.14,4.14,4.14,4.14 mg·g⁻¹,故选择提取 30 min。

2.7.4 提取次数 准确称取铁皮石斛药材粗粉 3 份,每份 2.0 g,置具塞锥形瓶中,各加入 20 倍量 0.1 mol·L⁻¹HCl,密塞,于 30 °C 分别提取 1,2,3 次,每次 30 min,其他操作同 2.7.2 项,结果总游离氨基酸提取量分别为 4.00,4.01,4.14 mg·g⁻¹,故采用提取数 1 次。

2.7.5 提取溶媒用量 准确称取铁皮石斛药材粗粉 5 份,每份 2.0 g,置具塞锥形瓶中,分别加入 6,8,10,15,20,25,30 倍量 0.1 mol·L⁻¹HCl,密塞,于 30 °C 超声提取 1 次,其他操作同 2.7.2 项,结果总游离氨基酸提取量分别为 2.52,5.54,3.37,3.98,4.14,4.14,4.14 mg·g⁻¹,故选择 20 倍量。

2.8 正交试验设计 在单因素试验基础上,选择溶剂用量、提取时间、提取次数为考察因素,各因素分别设定 3 个水平,以天冬氨酸标示铁皮石斛总游离氨基酸的浸出量为指标,确定最佳超声提取工艺。准确称取铁皮石斛药材粗粉 9 份,每份 2.00 g,选择 L₉(3⁴) 正交表进行试验,因素水平见表 3,试验安排及结果见表 4,方差分析见表 5。

表3 铁皮石斛中总氨基酸提取工艺优选正交试验因素水平

水平	A 提取时间 /min	B 溶剂用量 /倍	C 提取数 /次	D 空白
1	20	10	1	1
2	30	15	2	2
3	40	20	3	3

表4 铁皮石斛中总氨基酸提取工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	总游离氨基酸 浸出量/mg·g ⁻¹
1	10	10	1	1	3.308
2	10	15	2	2	4.012
3	10	20	3	3	4.353
4	20	10	2	3	3.532
5	20	15	3	1	4.025
6	20	20	1	2	4.257
7	30	10	3	2	3.601
8	30	15	1	3	3.987
9	30	20	2	1	4.136
K ₁	11.67	10.44	11.55	11.47	
K ₂	11.81	12.02	11.68	11.87	
K ₃	11.72	12.75	11.98	11.87	
R	0.05	0.77	0.14	0.13	

表5 铁皮石斛提取工艺优选方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.00	2	0.002	0.1	>0.05
B	0.93	2	0.463	25.72	<0.05
C	0.03	2	0.016	0.016	>0.05
D(误差)	0.04	2	0.018	0.018	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0$, $F_{0.01}(2,2) = 99.0$ 。

由直观分析可知,各因素对铁皮石斛总游离氨基酸的提取量影响顺序为 $B > C > A$ 。方差分析表明 B 因素的影响具有显著性意义,其他因素则无显著影响,结合生产实际考虑,确定最佳提取条件为 $A_2B_3C_1$,即铁皮石斛药材加 20 倍量 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 超声提取 30 min,提取 1 次。

2.9 验证试验 准确称取铁皮石斛药材粗粉 2.00 g,置具塞锥形瓶中,按优选的工艺条件提取,结果总游离氨基酸平均提取量 0.327%,RSD 1.8%($n=9$)。

3 讨论

用于测定氨基酸的显色剂主要有茚三酮、吡啶酮等,其中茚三酮使用最多,同时也是色谱定量分离和分析、柱后衍生和检测的主要手段^[5-6]。采用茚三酮

比色法测定铁皮石斛中总游离氨基酸含量,其原理为 α -氨基酸与茚三酮共同加热氧化分解产生二氧化碳、氨和比氨基酸少一个碳原子的醛,此时茚三酮被还原;在弱酸性溶液中,还原茚三酮与氨及另一分子茚三酮缩合成蓝紫色化合物茚三酮胺在 570 nm 处有最大吸收^[7-8]。使用氨基酸分析仪测得野生铁皮石斛,人工栽培铁皮石斛和人工培养原球茎、分化苗、一年生铁皮石斛植株中均以天冬氨酸含量最高^[9-10]。

以天冬氨酸为指标测定铁皮石斛中总游离氨基酸含量,结果显示原球茎中氨基酸含量较其他 3 个部位要高,且不同品种原球茎中总游离氨基酸含量差异最小。此差异可能是由于铁皮石斛组织培养物相对一年生的植株具有生产周期较短、栽培方式简便、栽培条件可控、产品质量均一等特点引起的。不同产地或基地不同批次间的干品铁皮石斛中总游离氨基酸含量差异较大,其中广东南雄和河源 2 个批次的样品中含量非常低,可能是由于品种差异引起的;而饶平基地栽培品种的总游离氨基酸含量普遍高于其他品种,可能是由于土壤、水质、采收时间、加工方式等因素造成的。

[参考文献]

- [1] 马继兴. 神农本草经辑注[M]. 北京:人民卫生出版社,1995.
- [2] 吕圭源,陈素红,张丽丹,等. 铁皮石斛对小鼠慢性酒精性肝损伤模型血清 2 种转氨酶及胆固醇的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):192.
- [3] 李琰,付欣彤. 石斛明目丸质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(18):65
- [4] 张爱莲,魏涛,斯金平,等. 铁皮石斛中基本氨基酸含量变异规律[J]. 中国中药杂志,2011,36(19):2632.
- [5] 吴红梅,杨明. 闪式与回流提取动物药美洲大蠊总氨基酸工艺比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(21):22.
- [6] 明兴加,伍淳操,钟国跃,等. 中国石斛属植物文献计量研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(14):221.
- [7] 曾俊,苏俊黎. 一种比较实用的氨基酸定量测定方法-茚三酮法[J]. 饲料工业,2003,24(10):42.
- [8] 朱瑾,李新霞,陈坚. 茚三酮比色法测定蒜氨酸原料药中总氨基酸的含量[J]. 西北药学杂志,2008,23(3):136.
- [9] 郭梦璧,封良燕,田茂军,等. 人工培养铁皮石斛营养成分分析研究[J]. 云南化工,2006,33(2):15.
- [10] 黎万奎,胡之璧,周吉燕,等. 人工栽培铁皮石斛与其他来源铁皮石斛中氨基酸与多糖及微量元素的比较分析[J]. 上海中医药大学学报,2008,22(3):80.

[责任编辑 全燕]