

高效毛细管电泳测定中药地龙中氨基酸含量

丁红梅*, 葛尔宁, 许家栋

(浙江中医药大学分析测试中心, 杭州 310053)

[摘要] **目的:**建立用柱前衍生和高效毛细管电泳测定地龙中水解氨基酸含量的方法。**方法:**地龙药材经水煎煮后,先用盐酸水解处理地龙样品,再用 Waters AccQ-Fluor 衍生试剂对水解氨基酸进行柱前衍生,采用高效毛细管电泳方法测定地龙中氨基酸的含量。**结果:**在 pH 2 浓度 $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{H}_3\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 电泳缓冲液,进样量为 $0.5 \text{ psi} \times 4 \text{ s}$,分离电压 20 kV 电泳条件下,在 16 min 内 14 种常规氨基酸分离效果较好,氨基酸浓度 $15.625 \sim 250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好,成功测定地龙水煎液中氨基酸的含量。结果显示地龙药材中 Glu, Ile/Leu, Gly, Ala 含量相对较高, His, Tyr 含量较低, Asp 未检测到。**结论:**采用高效毛细管电泳进行 AQC 衍生后地龙氨基酸的分析,操作简单、分析时间短,测定结果可靠,可适用于动物类中药材中氨基酸的快速检测。

[关键词] 地龙; 氨基酸; 含量; 毛细管电泳

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0117-04

High Performance Capillary Electrophoresis Determination of Amino Acids in *Pheretima*

DIND Hong-mei*, GE Er-ning, XU Jia-dong

(Analytical Testing Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method using pre-column derivation and high-performance capillary electrophoresis for determining amino acids content in *pheretima*. **Method:** *Pheretima*, a kind of Chinese medicinal material was firstly treated with water boiling, and then hydrolyzed by hydrochloride acid. The hydrolysate of amino acids in *pheretima* was derived by Waters AccQ-Fluor reagent. The amino acids in *pheretima* were identified and quantified with the method of high-performance capillary electrophoresis. **Result:** The optimized CZE conditions were as follows: a running buffer composed of $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 2), separation voltage at 20 kV, temperature at 25 centigrade, injection time for 4 sec with 0.5 psi pressure. 15 kinds of amino acids in *pheretima* were determined within 16 minutes. The separation effect of amino acids was perfect and the linear

[收稿日期] 20120428(008)

[基金项目] 浙江省教育厅科研项目(Y200908742)

[通讯作者] *丁红梅,副研究员,研究生学历,从事中药资源药物分析研究, Tel: 0571-86613589, E-mail: littlebaby@zjtcn.net

[参考文献]

- [1] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准. 第 1 册[M]. 广州: 广东科技出版社, 2004: 204.
- [2] 陈建南, 赖小平, 刘念. 广东溪黄草的基源植物调查及商品鉴定[J]. 中药材, 1996, 19(2): 73.
- [3] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编. 上册[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 886.
- [4] 谢兴亮, 盛艳梅. 溪黄草的研究进展[J]. 医药导报,

2011, 30(4): 494.

- [5] Sun W J, Sheng J F. Concise H and book for Natural Active Products (天然活性成分简明手册) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Sciences and Technology Publishing House, 1998.
- [6] 王琿, 张振伙. HPLC 波长切换法同时测定迷迭香中咖啡酸、阿魏酸和迷迭香酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 116.

[责任编辑 顾雪竹]

relationship was good in the range of 15.625-250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ amino acids concentration. The results showed that there was relative high content of Glu, Ile/Leu, Gly, Ala and low content of His, Tyr in *pheretima* of Chinese medicinal material. And Asp was not detected. **Conclusion:** The present established method of AQC derivation and high-performance capillary electrophoresis is simple, rapid and suitable for determination of amino acids in animal medicinal materials.

[**Key words**] *pheretima*; amino acids; content; high performance capillary electrophoresis (HPCE)

地龙又名蚯蚓,始载于《神农本草经》,为天然动物类药材,具有平肝息风、清热止痉、活络、平喘、利尿的功效^[1-3]。研究发现地龙氨基酸含量及组成与其药理作用有很大关系^[4-8],Arg 具有抑菌消炎、延缓肿瘤生长、降压、扩张血管、降低胆固醇、治疗哮喘的作用,Gly 具有抑菌消炎、增强免疫功能、治疗动脉粥样硬化的作用,Glu 具有舒张支气管的作用,Ala,Val,Met 能增强免疫功能,Tyr,Phe 具有降压、扩张血管、降低胆固醇、改善心功能的作用。同时地龙氨基酸分析也从薄层色谱发展到高效液相色谱,分析方法不断地研究改进^[9-12]。本研究以 6-氨基喹啉基-N-羧基琥珀酰亚胺氨基甲酸酯(AQC)为柱前衍生剂,采用高效毛细管电泳(HPCE)对地龙中多种常规氨基酸进行含量测定,对中药材快速氨基酸检测提供一定实验依据。

1 材料

1.1 仪器 Beckman P/ACE™ MDQ 型毛细管电泳仪(贝克曼库尔特),使用 32 Karat 8.0 软件采集和处理数据;Beckman eCAP 未涂层石英毛细管 70 cm × 75 μm ,有效长度 60 cm,检测波长 248 nm。

1.2 试剂 混合氨基酸对照品(Amino Acid Hydrolysate Standard P/N WAT088122,美国 Pierce 公司,2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,其中胱氨酸为 1.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$);衍生试剂 AecQ-Fluor™:包括 borate buffer1, Reagent powder 2A, Reagent Diluent Flammable 2B(美国 Waters 公司, Lot 1383803631); NaH_2PO_4 (无水),浓 H_3PO_4 ,NaOH,浓盐酸,苯酚等试剂均为国产分析纯;试验用水为娃哈哈瓶装纯净水。所用试剂的配制均参考《中国药典》。市售地龙由浙江中医药大学宋捷民教授鉴定为参环毛蚓 *Pheretima aspergilum* E. Perrier 的干燥体。

2 方法

2.1 氨基酸衍生方法 氨基酸的衍生采用 Waters 公司的 AccQ-Fluor 衍生试剂盒,按说明书操作:取 2B 液 1 mL 于 2A 瓶中,震荡 10 s,55 $^\circ\text{C}$ 气浴溶解备用。在衍生管中加入氨基酸样品 10 μL ,加入 70 μL Buffer1,涡旋混合,再加入 20 μL 2A 液,涡旋 10 s;

室温静置 1 min,55 $^\circ\text{C}$ 气浴 10 min,备用。

2.2 样品制备 称取地龙样品 0.150 g,水煎煮 2 h,煎煮液过滤定容至 50 mL 备用。取 20 μL 地龙水煎液于样品小管,置 Waters 干燥台干燥后,加入 1% 的 6 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 200 μL ,104 $^\circ\text{C}$ 恒温水解完后干燥,纯水溶解,按 2.1 中的方法衍生,备用。

2.3 毛细管电泳方法 电泳缓冲液 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_3PO_4 - Na_2HPO_4 (pH 2)缓冲液,分离电压 20 kV,温度 25 $^\circ\text{C}$,压力进样 0.5 psi × 4 s,运行时间 17 min;检测波长 254 nm。为提高迁移时间、峰面积和峰高的重复性,2 次运行之间,用纯水、0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠、纯水、运行缓冲液依次冲洗 2 min^[13]。

2.4 方法学考察 参考《中国药典》2010 年版进行方法学考察。

2.5 含量测定 取 3 个批次地龙样品按 2.2 项下方法制备样品,各样平行电泳 3 次,根据各个氨基酸标准曲线方程计算各氨基酸的含量,测定结果取平均值。

3 结果

3.1 氨基酸对照品的 HPCE 图谱 取混合氨基酸对照品稀释 10 倍,按 2.1 方法衍生后,用 2.3 方法进行毛细管电泳。见图 1。结果显示在 16 min 内,16 中常规氨基酸得到了有效分离。

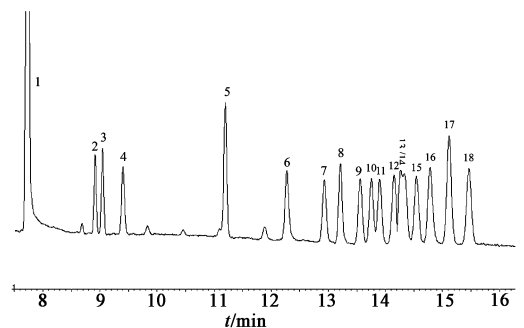
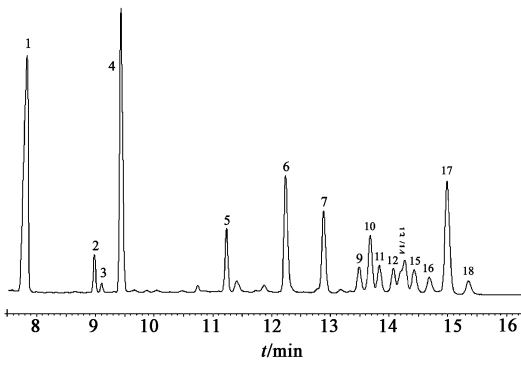


图 1 氨基酸标准品 HPCE 谱

3.2 地龙氨基酸的 HPCE 图谱 取地龙样品按 2.2 方法处理,再按 2.1 方法衍生后,用 2.3 方法进行毛细管电泳得地龙氨基酸 HPCE 谱图,见图 2。

3.3 方法考察 吸取 100 μL 氨基酸标样于一



1. 6. 氨基喹啉 (AMQ); 2. 精氨酸 (Arg); 3. 组氨酸 (His);
4. NH_3 ; 5. 赖氨酸 (Lys); 6. 甘氨酸 (Gly); 7. 丙氨酸 (Ala);
8. 天冬氨酸 (Asp); 9. 脯氨酸 (Pro); 10. 丝氨酸 (Ser);
11. 缬氨酸 (Val); 12. 苏氨酸 (Thr);
13/14. 异亮氨酸/亮氨酸 (Ile/Leu); 15. 蛋氨酸 (Met);
16. 苯丙氨酸 (Phe); 17. 谷氨酸 (Glu); 18. 酪氨酸 (Tyr)

图2 地龙氨基酸 HPCE 谱

1.5 mL 试管,加入 900 μL 纯水,混匀。分别吸取 100,50,25,12.5,6.25 μL 氨基酸标样于 1 mL 试管中,分别加入纯水至 1 mL。各吸取 10 μL 按 2.1 中的方法进行衍生,按 2.3 中方法电泳分离,以峰面积 X 为横坐标,浓度 Y ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 为纵坐标,绘制标准曲线。各氨基酸的标准曲线回归方程和线性范围见表 1。

取同一试样衍生后,于 1 天内连续电泳 6 次,以峰面积的标准偏差 (s) 和 RSD 考察日内精密度,见表 2。结果显示峰面积 5.0%,表明重复性良好。

取同一试样衍生,分别于 0,2,4,6,8 h 后电泳,

表2 精密度稳定性准确度试验

氨基酸	精密度/ s	精密度 RSD/%	稳定性/ s	稳定性 RSD/%	平均回收率	回收率/ s	回收率 RSD/%
Arg	75.828	1.803	218.743	3.461	96.340	4.611	4.783
His	89.204	2.165	170.754	2.819	91.362	3.287	3.598
Lys	181.352	1.876	292.673	2.077	99.112	2.211	2.231
Gly	157.204	2.629	245.903	2.857	90.509	4.233	4.677
Ala	104.173	1.605	292.528	2.857	85.356	3.183	3.729
Asp	149.601	2.234	337.860	3.641	94.411	2.236	2.369
Pro	177.978	2.950	356.536	4.050	86.445	4.053	4.689
Ser	189.515	2.792	342.140	3.562	99.278	3.0989	3.121
Val	133.144	2.094	372.792	4.124	87.780	3.5160	4.006
Thr	141.247	2.167	372.250	4.016	85.457	4.132	4.835
Ile/Leu	379.158	2.879	304.003	1.588	90.062	2.663	2.956
Met	173.956	2.926	271.926	3.172	85.000	1.858	2.185
Phe	146.017	2.269	337.861	2.701	85.674	3.119	3.640
Glu	299.029	2.232	325.649	1.736	90.756	1.384	1.525
Tyr	214.294	3.605	248.651	2.835	95.972	1.915	1.996

表1 各氨基酸标准曲线回归方程

氨基酸	线性范围 $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	回归方程	R^2
Arg	15.625 ~ 250	$Y=0.035X-0.334$	0.999
His	15.625 ~ 250	$Y=0.031X-2.817$	0.999
Lys	15.625 ~ 250	$Y=0.014X+0.950$	0.999
Gly	15.625 ~ 250	$Y=0.024X-0.096$	0.999
Ala	15.625 ~ 250	$Y=0.023X-0.084$	0.999
Asp	15.625 ~ 250	$Y=0.017X-9.618$	0.999
Pro	15.625 ~ 250	$Y=0.021X+1.403$	0.999
Ser	15.625 ~ 250	$Y=0.021X+1.403$	0.999
Val	15.625 ~ 250	$Y=0.021X+1.281$	0.999
Thr	15.625 ~ 250	$Y=0.021X+2.742$	0.998
Ile/Lue	15.625 ~ 250	$Y=0.011X+0.798$	0.999
Met	15.625 ~ 250	$Y=0.020X+1.033$	0.998
Phe	15.625 ~ 250	$Y=0.015X-3.130$	0.998
Glu	15.625 ~ 250	$Y=0.011X-0.180$	0.999
Tyr	15.625 ~ 250	$Y=0.017X-10.080$	0.999

注:线性范围均为 15.625 ~ 250 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

以峰面积 s 和 RSD 考察稳定性。见表 2。结果显示峰面积 RSD $\leq 5.0\%$,表明所制样品在 8 h 内稳定。

精密称取地龙样品 0.1500 g 3 份,每份加入 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照品溶液 1 mL,按 2.2 项下方法制备供试样品溶液,分别进样电泳,计算回收率及其 RSD,结果见表 2。结果显示平均回收率 $\geq 85\%$,

RSD ≤ 5.0% ,表明该法准确度较好。

3.4 含量测定 按 2.2 方法平行处理 3 份地龙样品,按 2.3 HPCE 方法各平行电泳测定 3 次,取其峰面积平均值,根据各氨基酸标准曲线确定浓度,计算含量,结果见表 3。结果显示地龙药材中 Glu, Ile/Leu, Gly, Ala 含量相对较高, His, Tyr 含量较低, Asp 未检测到。

表 3 地龙中氨基酸的含量 mmol·mg⁻¹

氨基酸	样品 1	样品 2	样品 3	平均含量
Arg	4.372	4.402	4.465	4.413
His	0.950	0.976	0.989	0.972
Lys	5.350	5.389	5.444	5.394
Gly	7.444	7.462	7.536	7.481
Ala	7.211	7.248	7.322	7.260
Pro	3.308	3.348	3.410	3.355
Ser	6.215	6.313	6.334	6.287
Val	3.650	3.682	3.720	3.684
Thr	3.214	3.242	3.291	3.249
Ile/Leu	8.948	8.972	9.105	9.008
Met	4.397	4.438	4.463	4.433
Phe	2.271	2.322	2.359	2.317
Glu	17.920	17.980	18.040	17.980
Tyr	1.713	1.736	1.780	1.743

4 讨论

本方法对 Ile 和 Leu 未能达到完全分离,可能是两者相对分子量和结构比较接近而导致的,有待于进一步的研究。同时混合氨基酸标样中没有检测到 Cys,可能与其含量低有关。本方法在地龙样品中共检出 15 中氨基酸,其中 Glu, Ile/Leu, Gly, Ala 含量相对较高,这与地龙平喘、活络的药理作用有关,与文献报道的一致^[9,11]。而 Asp 未检出可能是水煎液中 Asp 含量太低的原因。

A ccQ. Tag 方法是 Waters 公司专为柱前衍生 HPLC 分析氨基酸而开发的,采用氨基苯甲酸酯类衍生剂 AQC,其原理是 AQC 与一、二级氨基酸在碱性条件下反应生成稳定的不对称尿素衍生物和 NH₃,同时部分水解产生 6-氨基喹啉(AMQ),因此 HPCE 谱图中存在 AMQ 峰和 NH₃ 峰^[14-15]。该法衍生步骤简单、迅速,衍生物稳定、紫外检测灵敏度高,且反应过剩的衍生试剂以及反应副产物对分离无干扰,但梯度洗脱约需 1 h,试剂消耗量大,同时氨基酸分析柱的柱效下降较快。我们采用 HPCE 进行

AQC 衍生后氨基酸的分析,能在 16 min 内对十几种常规氨基酸进行分离,试剂消耗少,分析时间短,测定结果可靠,可适用于动物类中药材中氨基酸的快速检测。

[参考文献]

[1] 杨明,杨虹,陈锦香. 地龙提取液对兔急性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 吉林医学, 2011, 32(19):3847.

[2] 黄维琳,孙亭,唐晓伟,等. 复方地龙胶囊对哮喘小鼠血清 IL-4 分泌的影响[J]. 黔南民族医学学报, 2011, 24(2):82.

[3] 李小励,尹友生,韦家智,等. 加减地龙活血汤联合激素治疗原发性肾病综合征[J]. 临床肾脏病杂志, 2011, 11(8):374.

[4] 刘亚明,郭继龙,刘必旺,等. 中药地龙的活性成分及药理作用研究进展[J]. 山西中医, 2011, 27(3):44.

[5] 周琼,陆大祥,付咏梅,等. 甘氨酸对小鼠心肌缺血性损伤的防治作用研究[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(4):360.

[6] 褚襄萍,徐朝晖,邱明丰,等. 药对麻黄地龙单煎合用与合煎的比较[J]. 中成药, 2007, 29(5):777.

[7] 韩静,赵有玺,刘雪萍,等. 精氨酸在心血管疾病中的作用[J]. 氨基酸和生物资源, 2003, 25(4):66.

[8] 何红,车庆明,孙启时. 地龙提取物的抗凝血作用[J]. 中草药, 2007, 38(5):733.

[9] 蒋艳红,刘敏彦,李向军,等. 地龙中游游离氨基酸的含量测定[J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(2):36.

[10] 李予蓉,王四旺,谢艳华,等. 地龙胶囊的质量标准研究[J]. 中国新医药, 2003, 12(2):21.

[11] 裴福成,李长新,任桂萍. 柱前衍生 HPLC 法测定地龙中氨基酸的含量[J]. 中医药学报, 2007, 35(3):26.

[12] 詹云丽,黄璐敏,翁嘉. 地龙注射液 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 广东药学院学报, 2009, 25(3):245.

[13] 丁红梅,盛振华,葛尔宁. 毛细管区带电泳法测定侧柏叶中槲皮苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11):73.

[14] 车兰兰,李卫华,林勤保,等. 氨基酸分析检测方法的研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2011, 33(2):39.

[15] 覃婷婷,白海娇,黄哲苏,等. AQC 柱前衍生法在氨基酸分析测定中的应用[J]. 天津药学, 2010, 22(5):51.

[责任编辑 顾雪竹]