

★交流★

不同产地半夏的氨基酸分析

莫炫永

(东莞市国药质量检测中心, 东莞 523010)

摘要 目的: 测定不同产地半夏的氨基酸含量。方法: 采用 AccQ-Tag 法, 以 AccQ-Fluor™ 对半夏中 17 个氨基酸进行柱前衍生; 采用 Waters 1525 HPLC 仪器、AccQ-Tag™ 柱, 以 AccQ-Tag 浓液-水 (1: 10) 为流动相 A, 乙腈-水 (60: 40) 为流动相 B 进行梯度洗脱, 检测波长 248 nm, 柱温 37 ℃, 进样量 10 μL。结果: 17 个氨基酸的线性回归方程 r 值均 > 0.9997 , 平均回收率 ($n = 6$) 为 98.7%, RSD 为 1.8%; 不同产地的半夏均含有 17 个氨基酸, 不同产地的半夏总氨基酸含量以湖北产最高 (19.18%), 显著高于河南、贵州两产地 ($P < 0.05$), 但与四川产地比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 本法快速、简便, 结果准确, 不同产地半夏总氨基酸含量差异较大。

关键词: AccQ-Tag 法; 半夏; 氨基酸; 不同产地

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2010)01-0145-04

Amino acids analysis of *Pinellia ternate* in different growing areas

MO Xuan-yong

(Guoyao Quality Inspection Center in Dongguan City, Dongguan 523010, China)

Abstract Objective To determine the contents of *Pinellia ternate* in different growing areas. **Methods** Amino acids in the injections were pretreated with AccQ-Fluor™ separately and their derivatives were analyzed on Waters 1525 HPLC using AccQ-Tag column. Mobile phase consisted of AccQ-Tag concentrated liquid-water (1: 10) (A) and acetonitrile-water (60: 40) (B) with gradient elution. The detection wavelength was 248 nm, column temperature 37 ℃, and injection volume was 10 μL. **Results** The linear regression equation was greater than 0.9997 in 17 amino acids, the average recovery ($n = 6$) was 98.7% with RSD of 1.8%. 17 amino acids from different growing areas were detected, the total content of amino acids in Hubei (19.18%) was the highest and was significantly higher than that of Henan and Guizhou two origin ($P < 0.05$), but the total content of amino acids in Hubei was no significant difference that it compared with that of Sichuan growing areas ($P > 0.05$). **Conclusion** This method is rapid, simple and accurate. The total content of amino acids of *Pinellia ternate* in different growing areas is significant difference.

Key words AccQ-Tag methods; *Pinellia ternate*; amino acids; different growing areas

中药半夏为天南星科多年生草本植物半夏 [*Pinellia ternate* (Thunb.) Breit.] 的干燥块茎, 在我国大部分地区及朝鲜半岛和日本均有分布。半夏入药首载于《神农本草经》, 中国药典 2005 年版收载^[1]。半夏块茎主要含有生物碱、β-谷甾醇、多糖、半夏蛋白、氨基酸、挥发油及无机元素等多种化学成分, 具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结之功效。目前对半夏的化学成分报道较多, 但对半夏中氨基

酸的研究报道少见^[2]。本文采用 AccQ-Tag 方法^[3,4]测定不同产地半夏的氨基酸含量, 旨在为半夏的开发、利用及半夏的质量品质评定提供科学依据。

1 仪器、样品与试剂

Waters 1525 高效液相色谱仪, 包括 1525 泵、2487 紫外检测器、AccQ-Tag™ 色谱柱、Breeze 色谱工作站、温控柱温箱; Beckman 公司 Avanti™ 30 冷冻离心机; 上海沪西分析仪器厂 WH-2 微型旋涡混

合仪 GLSONOR 微量吸液器。

所用样品为 2008 年 8~11 月采自我国 4 个半夏主产地四川、湖北、河南、贵州的栽培品种,经鉴定为半夏 [*Pinellia ternate* (Thunb.) Breit] 的干燥块茎。块茎采收后去皮,洗净,105℃烘箱烘 4 h 后置于 60℃烘箱中烘干至恒重,粉碎过 60 目筛,置干燥器备用。

美国 Waters 公司 AccQ•Tag 氨基酸测定试剂盒:包括 AccQ-Fluor™ 氨基酸专利衍生剂,专用氨基酸分析柱,玻璃样品衍生管,17 个氨基酸混合标准液(每个氨基酸浓度均为 $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$);所用水为 MilliQ 水,所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备 分别精密称取干燥至恒重的不同产地的半夏样品粉末 100 mg,置安瓿底部,加 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 15 mL,通氮气,迅速在喷灯上封口,置 130℃烘箱内水解 6 h 取出放冷至室温,打开安瓿,将水解液过滤于 50 mL 量瓶中,以 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸洗涤安瓿及滤纸,并定容至刻度,精密吸取该水解液 2.0 mL 置小蒸发皿中,水浴蒸干,残渣用 2.0 mL 水溶解并蒸干,如此反复操作 2~3 次,挥尽 HCl 气体,然后精密加入 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 2.0 mL,得不同产地的样品溶液,备用。

2.2 标准溶液和样品溶液的衍生化^[5] 用移液器移取氨基酸标准溶液 20 μL 和不同产地的样品溶液 10 μL 于对应的干净衍生管中,分别加入硼酸盐缓冲液(称取 $0.085 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的四硼酸钠溶解到水中,定容至 1 L,充分溶解后用盐酸调 pH 至 8.2 即可) 70 μL ,涡旋混和,另将 20 μL 的 AccQ-Fluor™ 氨基酸专利衍生剂(按试剂盒说明配制)在涡旋状态下加入衍生管中,并保持涡旋混匀 10~20 s。在室温下放置 1 min 用石蜡膜封口,于 55℃烘箱内加热 10 min 取出冷却至室温,得浓度为 $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准供试液和样品供试液,供氨基酸分析用。

2.3 色谱条件及系统适用性试验^[5] 色谱柱:Waters AccQ•Tag 氨基酸分析色谱柱 C_{18} (3.9 mm $\times$ 150 mm, 4 μm)。流动相 A:将 AccQ•Tag 浓液(WAT052890)-水(1:10 v/v)倒入洁净的 500 mL 溶剂瓶中,置超声波清洗器中超声脱气 1 min 备用;流动相 B:乙腈-水(60:40 v/v);梯度洗脱程序见表 1。流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长:248 nm;柱温:37℃;进样量:10 μL 。在上述色谱条件下,17 个氨基酸的理论塔板数均不小于 7000 样品中每个氨基

酸与相近峰分离完全,分离度均大于 1.5。见图 1。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间 (time) /min	流速 (flow rate) / $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	流动相 A (mobile phase A) %	流动相 B (mobile phase B) %	曲线 (curve)
起始 (onset)	1.0	100	0	*
0.5	1.0	99	1	6
17.0	1.0	93	7	6
21.0	1.0	90	10	6
30.0	1.0	67	33	6
33.0	1.0	67	33	6
34.0	1.0	0	100	6

注 (note): 梯度运行时间为 60 min (60 min gradient run time)

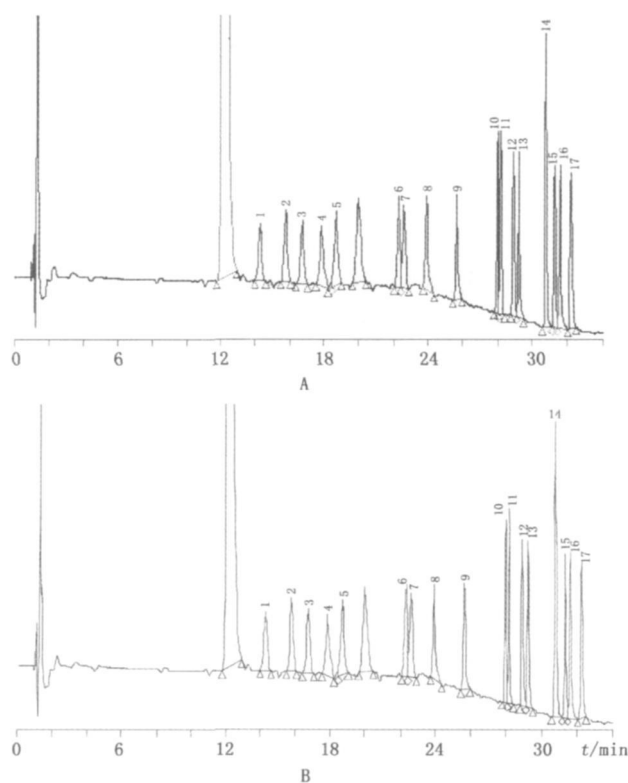


图 1 标准品 (A) 及样品 (B) 色谱图

Fig 1 Chromatograms of an amino acid standard (A) and sample (B)
1~17 同表 2 (same as Tab 2)

2.4 线性关系考察 取浓度为 $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 17 个氨基酸混合标准液 1 mL,分别用水稀释 200 400 600 800 1000 倍,配制成浓度分别为 0.0125 0.0063 0.0042 0.0031 0.0025 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列溶液;精密量取上述不同浓度的溶液各 20 μL ,按“2.2 项”衍生化,得不同浓度的衍生化溶液,精密取此系列溶液 10 μL 分别注入高效液相色谱仪,按上

述色谱条件分析,记录色谱图,以峰面积 (A)对质量浓度 (C)进行线性回归,得 17个氨基酸的回归方程

及线性范围(表 2), $r \geq 0.9997$ 。结果表明 17个氨基酸在各自的浓度范围内具有良好的线性关系。

表 2 回归方程及线性范围

Tab 2 Regression equations and linear range

序号 (No)	氨基酸 (amino acid)	回归方程 (regression equations)	线性范围 (linear range) / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
1	天门冬氨酸 (Asp)	$A = 2.221 \times 10^4 C + 1.332 \times 10^3$	1.56~ 22.59
2	丝氨酸 (Ser)	$A = 2.057 \times 10^4 C + 6.782 \times 10^3$	0.67~ 10.11
3	谷氨酸 (Glu)	$A = 2.180 \times 10^4 C + 5.188 \times 10^3$	1.28~ 19.25
4	甘氨酸 (Gly)	$A = 2.080 \times 10^4 C + 8.186 \times 10^3$	1.13~ 16.91
5	组氨酸 (His)	$A = 1.958 \times 10^4 C + 4.554 \times 10^3$	0.27~ 4.03
6	精氨酸 (Arg)	$A = 2.190 \times 10^4 C + 2.642 \times 10^3$	1.15~ 17.23
7	苏氨酸 (Thr)	$A = 2.170 \times 10^4 C + 2.580 \times 10^3$	0.75~ 11.27
8	丙氨酸 (Ala)	$A = 2.187 \times 10^4 C + 1.962 \times 10^3$	0.78~ 11.77
9	脯氨酸 (Pro)	$A = 2.070 \times 10^4 C + 5.505 \times 10^3$	0.46~ 9.88
10	胱氨酸 (Cys)	$A = 2.141 \times 10^4 C + 3.785 \times 10^3$	0.91~ 9.14
11	酪氨酸 (Tyr)	$A = 2.180 \times 10^4 C + 1.525 \times 10^3$	0.30~ 5.00
12	缬氨酸 (Val)	$A = 2.126 \times 10^4 C + 5.247 \times 10^3$	0.96~ 14.64
13	蛋氨酸 (Met)	$A = 1.786 \times 10^4 C + 5.322 \times 10^3$	0.25~ 4.68
14	赖氨酸 (Lys)	$A = 2.070 \times 10^4 C + 5.017 \times 10^3$	0.42~ 6.32
15	异亮氨酸 (Ile)	$A = 2.030 \times 10^4 C + 5.326 \times 10^3$	0.54~ 8.09
16	亮氨酸 (Leu)	$A = 2.198 \times 10^4 C + 1.381 \times 10^3$	1.32~ 19.85
17	苯丙氨酸 (Phe)	$A = 2.212 \times 10^4 C + 1.254 \times 10^3$	0.79~ 11.76

2.5 精密度试验和稳定性考察 精密量取标准供试液,按上述确定的色谱条件,连续进样 6次,测定峰面积,考察精密度;另取标准供试液分别于 0, 1, 2, 4, 6, 8 h进样,测定峰面积,考察稳定性。结果精密度考察结果的 $\text{RSD} = 1.8\%$,说明本实验精密度良好;稳定性试验结果的 $\text{RSD} = 2.1\%$,说明溶液中被测成分在 8 h内稳定。

2.6 加样回收率试验 取样品粉末 50 mg 按“2.1”项下方法制备样品溶液。平行取氨基酸标准溶液 6份,每份约 1 mL,分别置于 100 mL量瓶中,精密加入样品溶液 10 mL(含氨基酸量为 $74.41 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),用水定容至刻度,分别取上述混合溶液 20 μL ,按“2.2”项下方法制备供试液,按上述确定的色谱条件测定,计算回收率。结果平均回收率 ($n = 6$)为 98.7%, $\text{RSD} = 1.8\%$ 。表明方法可行、准确,符合含量测定要求。

2.7 样品含量测定 分别精密量取按“2.1”及

“2.2”项下方法制备的不同产地的样品供试液 10 μL 按确定的色谱条件进样测定,记录色谱图,按回归方程计算含量,结果见表 3 图 1-B。采用 SPSS13.00 数据统计软件对不同产地半夏总氨基酸含量进行 F 双样本方差检验,湖北产地的半夏总氨基酸含量最高,显著高于河南、贵州两产地 ($P < 0.05$),但与四川产地比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),四川、河南、贵州三产地半夏总氨基酸含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

本文利用 Waters 公司的 $\text{AcQ} \cdot \text{Tag}$ 柱前衍生高效液相色谱方法测定了不同产地的半夏中氨基酸的含量,该法线性范围较宽,相关系数均大于 0.9997,其检出限符合国家标准要求,并在 35 min 内完成待测样品中 17个氨基酸的测定;本研究所建立的方法简便、快速、经济,具有良好的灵敏度、精密度和准确度,可以满足半夏样品中氨基酸分析要求。

表 3 不同产地样品中氨基酸含量测定结果 (%)

Tab 3 Detemination results of an ino acid content from different origins (%)

序号 (No.)	氨基酸 (amino acid)	四川 (Sichuan)	湖北 (Hubei)	河南 (Henan)	贵州 (Guizhou)
1	天门冬氨酸 (Asp)	2.00	2.40	1.87	1.65
2	丝氨酸 (Ser)	0.78	1.02	0.66	0.75
3	谷氨酸 (Glu)	1.94	1.01	1.81	1.09
4	甘氨酸 (Gly)	1.05	0.93	0.93	0.72
5	组氨酸 (His)	0.33	2.33	0.22	0.64
6	精氨酸 (Arg)	1.22	1.25	1.10	0.48
7	苏氨酸 (Thr)	0.82	0.27	0.70	0.57
8	丙氨酸 (Ala)	0.85	1.49	0.74	1.70
9	脯氨酸 (Pro)	0.68	0.74	0.57	0.07
10	胱氨酸 (Cys)	0.78	0.43	0.67	0.78
11	酪氨酸 (Tyr)	0.51	0.87	0.40	0.39
12	缬氨酸 (Val)	0.97	1.11	0.86	0.43
13	蛋氨酸 (Met)	0.23	0.39	0.13	0.99
14	赖氨酸 (Lys)	0.58	1.57	0.47	0.32
15	异亮氨酸 (Ile)	0.62	0.60	0.51	0.16
16	亮氨酸 (Leu)	1.34	1.16	1.22	0.61
17	苯丙氨酸 (Phe)	0.93	1.61	0.82	0.82
总氨基酸 (total amino acid)		15.64	19.18	13.69	12.18

从测定结果看,不同产地的半夏均含有 17个氨基酸,其中 8个为人体必需,即组氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸及缬氨酸。不少氨基酸有很强的药理活性,其中天冬氨酸具有镇咳去痰作用^[6],本文不同产地的半夏,均以天冬氨酸的含量最高,这与半夏的功效有吻合之处,值得进一步探讨研究。不同产地的半夏总氨基酸含量以湖北产最高 (19.18%),显著高于河南、贵州两产地,相比较有显著性差异 ($P < 0.05$),但与四川产地比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。本文所分析的 4个产区均为 2005年版中国药典所规定的主产区,从总氨基酸的含量来看,4个产区的差异较大,此结果是由于本研究中样本数太少,还是存在产地品质间的差异尚有待于进一步研究。

参考文献

1 LÜ Ai-juan(吕爱娟), ZHANG Zhi-cheng(张志澄), ZHANG Ke-we(张科卫), *et al*. RP-HPLC determination of five nucleosides in Rhizoma Pinelliae(RP-HPLC法同时测定半夏中 5种核苷含量的研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2007, 27(7): 1051

2 WU Hao(吴皓), CUI Xiao-bing(崔小兵), LI Wei(李伟), *et al*. Comparison between amino acid and inorganic element content of

Pinellia processed with ginger made in two ways(2种工艺姜半夏中氨基酸及无机元素含量的比较). *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* (南京中医药大学学报), 1999, 15(5): 287

3 HOU Song-mei(侯松媚), SUN Jing(孙敬), HE Hong-bo(何红波), *et al*. Simultaneous determination of amino acids in soil by reversed phase high performance liquid chromatography by using 6-aminocaproyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate as a precolumn derivatization reagent(AQC柱前衍生反相高效液相色谱法测定土壤中氨基酸). *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2006, 34(10): 1395

4 WU Guang-bin(吴光斌), CHEN Fa-he(陈发河). Determination of amino acids in food by high performance liquid chromatography with precolumn derivatization(柱前衍生高效液相色谱法测定食品中的氨基酸含量). *J Zhongkai Univ Agric Technol*(仲恺农业技术学院学报), 2006, 19(3): 26

5 CHEN Yu-kun(陈宇堃), XUE Xiao-nu(薛巧如), WANG Miao(王淼), *et al*. Contents of 17 amino acids in compound amino acid injection(AccQ-Tag法测定复方氨基酸注射液(18AA-V)中 17种氨基酸的含量). *J Guangdong Coll Pharm* (广东药学院学报), 2008, 24(2): 243

6 WEI Yun-jiao(魏运姣), LU Han-lu(鲁汉兰), QIAO Ming(乔明), *et al*. Determination of amino acids from Rhizoma Pinelliae(法半夏中氨基酸的测定). *Hubei J Tradit Chin Med*(湖北中医杂志), 2008, 30(11): 57

(本文于 2009年 12月 17日修改回)