

荧光法测定维药刺糖中氨基酸的含量^①

李改茹^② 常军民 王岩 吴晶
(新疆医科大学药学院 乌鲁木齐市新医路 393 号 830054)

摘要 建立维药刺糖中氨基酸含量测定的荧光分析法。刺糖经蒸馏水超声提取,氨基酸用 0.1% 邻苯二甲醛衍生化后用荧光分析法测其氨基酸含量。测定的线性范围为: 3.0952—15.5071 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r = 0.9990$), 检出限为 $9.70 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 平均回收率为 93.6%—99.7%, RSD 为 1.9%—2.5%。该法灵敏度高, 且简便、快捷, 适用于天然药物中氨基酸的含量测定。

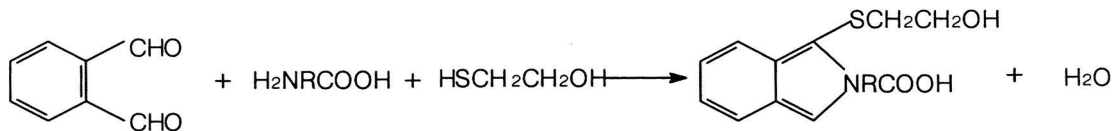
关键词 刺糖; 氨基酸; 荧光分析法

中图分类号: O657.32 文献标识码: A 文章编号: 1004-8138(2011)06-2965-04

1 引言

刺糖(*Saccharum Alhagi*) 为豆科植物骆驼刺(*Alhagi pseudalhagi. Desv*) 叶中分泌液凝结而成的糖粒, 为一味传统维吾尔医药^[1]。在《维吾尔常用药材》中早有记载, 至今临床仍在使用的, 维吾尔医将之与其他药材配伍, 用于治疗痢疾、腹泻、胃脘胀痛、血尿等疾病。刺糖还具有滋补强壮、精液浓缩、益精壮阳、涩肠止痛、祛痰止咳的功效^[2]。

刺糖中主要成分为糖类、维生素、氨基酸等, 其中氨基酸含量测定传统方法是用氨基酸自动分析仪^[3]。测定氨基酸的另一方法是荧光分析法, 尤其是邻苯二甲醛衍生荧光法已用于海水中氨基酸的含量测定^[4]。本文首次用邻苯二甲醛衍生荧光法测定了维药刺糖中的氨基酸成分, 该法原理是 β -巯基乙醇为还原剂时, 邻苯二甲醛与氨基酸类化合物通过环化、缩合反应, 可形成很强的荧光物质, 该物质最大激发波长(λ_{ex}) 约为 340nm, 最大发射波长(λ_{em}) 约为 450nm, 荧光强度与氨基酸浓度成正比。反应式为:



本法简便、快速、灵敏度高, 是天然药物中氨基酸含量测定的较佳方法, 为今后进一步对新疆药用植物资源的开发和利用提供基础研究资料。

① 新疆维吾尔自治区高校科研计划(XJEDU2009S49)

② 联系人, 电话: (0991) 4362471; 手机: (0) 15909000768; E-mail: gruli104@hotmail.com

作者简介: 李改茹(1975—), 女, 山西省忻州市人, 副教授, 硕士, 主要从事天然药物分析工作。

收稿日期: 2011-03-08; 接受日期: 2011-04-06

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

RF-5301PC 荧光分光光度计(日本岛津公司);TP-114 万分之一电子天平(德国赛多利斯公司)。

氨基酸对照品(中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号:140624-200805);刺糖(购于维药市场,批号:20091221);维药制剂刺蜜颗粒(新疆乌鲁木齐市民族医院,批号 1002);邻苯二甲醛、 β -巯基乙醇(天津市光复精细化工研究所,AR);其余试剂均为分析纯。实验用水为二次重蒸水。

2.2 实验方法

2.2.1 磷酸盐缓冲溶液(pH=8.0)和硼酸缓冲溶液(pH=9.5)的制备

准确称取磷酸二氢钾 2.2695g 于烧杯中,用少量水溶解后,转入 250mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。同法称取磷酸氢二钠 2.9675g 用水溶解并定容至 250mL。取上述配好的磷酸二氢钾 10.0 mL 与磷酸氢二钠 190.0mL 混合均匀即得 pH 8.0 的磷酸缓冲溶液。

准确称取硼酸 2.5g 溶于水并稀释至 100mL,再用 2mol/L NaOH 溶液调 pH 至 9.5。

2.2.2 0.1% 邻苯二甲醛衍生生化试剂(OPA)的制备

称取 50mg 邻苯二甲醛,加入 1mL 无水乙醇使其完全溶解,再加入 19mL pH 9.5 的硼酸缓冲溶液和 200 μ L β -巯基乙醇,混匀,用硼酸缓冲液稀释至 50mL,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存,保存期两天。

2.2.3 氨基酸对照品溶液的制备

准确称取苯丙氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、赖氨酸、色氨酸、苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸对照品适量,分别置于 8 个容量瓶中,各加水制成每毫升含 0.2mg 的溶液,即得对照品溶液。

2.2.4 氨基酸荧光衍生物的制备

准确吸取氨基酸对照品溶液 1.0mL 于 10mL 具塞试管中,依次加入 pH 8.0 磷酸盐缓冲溶液 2.0mL 和 0.1% 邻苯二甲醛衍生生化试剂 2.0mL,用水定容至刻度,暗处反应 30min,待测。

2.2.5 供试品溶液的制备

准确称取刺糖 2.0g,置于 50mL 烧杯中,加入水 20mL,常温下超声处理 30min,过滤,收集滤液,同法用 10mL 水对滤渣进行提取,合并滤液,用水定容至 50mL,即得样品溶液。准确移取该样品溶液 5mL 至 50mL 容量瓶中,用水定容至刻度,待测。

2.2.6 氨基酸含量测定

在激发波长 λ_{ex} =352nm,发射波长 λ_{em} =451nm 的条件下测定亮氨酸衍生物标准系列的荧光强度,绘制校准曲线。然后在上述相同的条件测定样品的荧光强度,再用回归方程求取含量。

3 结果与讨论

3.1 8 种氨基酸荧光衍生物的荧光激发和发射光谱

按 2.2.4 项下方法制得上述氨基酸荧光衍生物,上机扫描,结果见表 1。8 种氨基酸荧光衍生物最大激发波长在 343—356nm,最大发射波长在 448—456nm。考虑到荧光发射波长不受激发波长的影响,故本文以亮氨酸为对照品选择 λ_{ex} =352nm, λ_{em} =451nm 为测定波长。

表 1 氨基酸荧光衍生物最大激发和发射波长

(nm)

	苯丙氨酸	蛋氨酸	亮氨酸	赖氨酸	色氨酸	苏氨酸	缬氨酸	异亮氨酸
λ_{ex}	345	348	352	353	343	356	355	348
λ_{em}	451	448	451	456	456	451	453	451

3.2 测定条件的选择

3.2.1 溶液酸度的影响

为了考察溶液 pH 对氨基酸衍生物荧光强度的影响, 分别在“2.2.3 项”下 8 种氨基酸中加入不同 pH 值的磷酸盐缓冲溶液, 进行衍生化反应, 暗处反应 30min 后测其荧光强度。实验结果表明, 当 pH 值等于 8.0 时, 荧光强度较大(如图 1 所示), 且趋于稳定。所以本文选用 pH 值为 8.0 的磷酸盐缓冲液控制衍生化酸度。

3.2.2 衍生化时间的影响

取亮氨酸对照品 1mL 于 10mL 试管中, 在上述实验条件下进行衍生化反应, 记录荧光强度随衍生化时间的变化。实验结果表明, 反应时间为 10min 时, 亮氨酸荧光强度达最大值, 之后略有下降, 但 30min 后趋于稳定(如图 2 所示), 故本文选择衍生化反应的时间为 30min。

3.2.3 OPA 加入量的影响

取亮氨酸对照品 1mL 于 10mL 试管中, 在上述实验条件下加入不同体积的衍生化试剂, 进行衍生化反应, 暗处反应 30min 测其荧光强度。实验结果表明, 当衍生化试剂用量大于 1mL 时, 荧光强度达最大且趋于稳定(如图 3 所示), 说明荧光反应已进行完全。为了使反应更彻底, 本文选择 0.02% OPA 加入量为 2.0mL。

3.3 校准曲线及方法的检出限

在选定的最佳实验条件下, 按“2.2.4 项”配制不同浓度的亮氨酸对照品, 对线性范围进行考察。实验结果表明, 荧光强度与亮氨酸浓度在 $3.1-15.51 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 具有良好的线性关系, 回归方程为 $y = 6.5777x - 3.0157$, 式中: y ——荧光强度, x ——亮氨酸浓度($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 相关系数 $r = 0.9990$, 说明衍生物荧光强度与亮氨酸浓度线性显著相关。以 $S/N > 3$ 计, 方法检出限为 $9.70 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.4 回收率实验

称取已知含量的刺糖样品(批号: 20091221)共 9 份, 每份约 1g, 准确称定, 按低($0.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中($1.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、高($4.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)浓度分别准确加入亮氨酸对照品溶液 2.0、4.0、12.0mL, 每个浓度平行 3 份, 按“2.2.5 项”下进行处理得所需溶液, 用上述实验方法进行测定并计算回收率, 实验结果见表 2。平均回收率为 93.6%—99.7%, RSD 为 1.9%—2.5% ($n = 3$)。

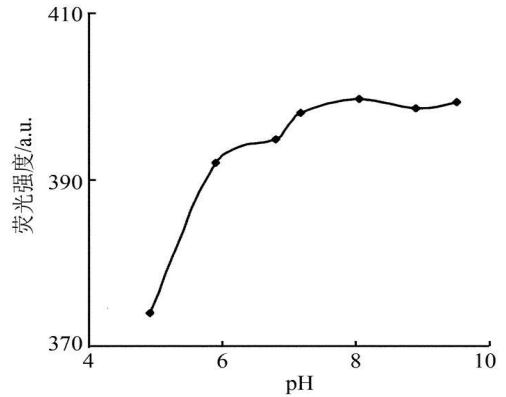


图 1 pH 值对亮氨酸衍生物荧光强度的影响

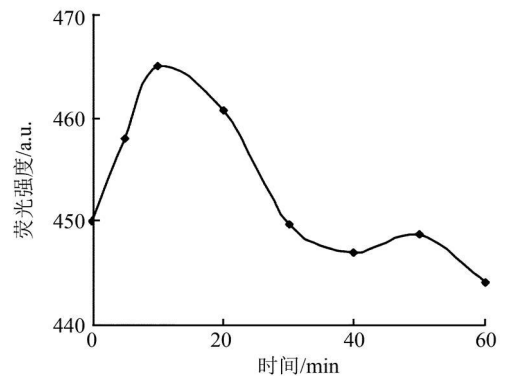


图 2 衍生化时间对亮氨酸荧光强度的影响

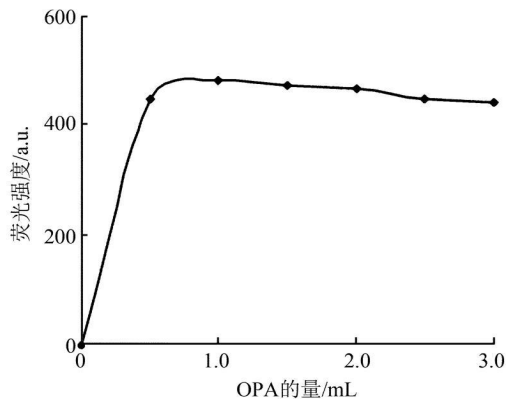


图 3 OPA 加入量对亮氨酸荧光强度的影响

表 2 刺糖回收率实验结果

(n=3)

序号	加样量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.4	0.3728	93.2		
2	0.4	0.3824	95.6	93.6	1.9
3	0.4	0.3684	92.1		
4	0.8	0.8096	101.2		
5	0.8	0.7833	97.9	99.7	1.3
6	0.8	0.7992	99.9		
7	2.4	2.3208	96.7		
8	2.4	2.3808	99.2	96.7	2.5
9	2.4	2.2632	94.3		

3.5 样品测定

用上述实验方法测定了维药原药材刺糖(批号: 20091221)和维药制剂刺蜜颗粒(批号: 1002)中氨基酸的含量,原药材刺糖中游离总氨基酸为 $0.9163\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,维药制剂刺蜜颗粒中游离总氨基酸为 $0.6534\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,实验结果见表 3。制剂中游离总氨基酸略低于原药材,是因为在制剂工艺过程中部分氨基酸不稳定或损失所致。

表 3 样品测定结果表

(n=5)

样品	含量(mg/g)					平均含量(mg/g)
刺糖药材	0.9128	0.9223	0.9132	0.9198	0.9136	0.9163
刺蜜颗粒	0.6554	0.6542	0.6499	0.6530	0.6544	0.6534

4 结论

本文建立了维药刺糖中总游离氨基酸含量测定的荧光分析法,考察了 pH、OPA 用量、衍生化时间等实验条件对氨基酸衍生物荧光强度的影响。该法操作简单,快速准确,测定灵敏度高,检出限达 $9.70 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,是天然药物中氨基酸含量测定的较佳方法。

参考文献

- [1] 李君山,刘勇民,蔡少青等. 维吾尔医用骆驼刺类药材的资源、商品流通及民间应用研究[J]. 中国民族医药杂志, 1996, 2(2): 39—40.
- [2] 张贵杰,李宁,倪慧等. 骆驼刺属植物的化学成分与生物活性[J]. 国外医药(植物药分册), 2008, 23(4): 157—159.
- [3] 阿布拉提·阿布都热西提,库尔班江·吾斯曼. 刺糖中氨基酸成分的研究[J]. 中草药, 2003, 34(4): 324—325.
- [4] 刘效兰. 氨基酸荧光分析法应用[J]. 理化检验(化学分册), 2004, 40(8): 457—458.

Determination of Amino Acid in *Saccharum Alhagi* from Uygur Medicine by Fluorimetry

LI Gai-Ru CHANG Jun-Min WANG Yan WU Jing

(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, P. R. China)

Abstract The method for the determination of the content of amino acid in *Saccharum alhagi* from uygur medicine was established by fluorimetry. Amino acid was extracted from *Saccharum alhagi* by ultrasound with distilled water, and determined by fluorimetry after derived by 0.1% orthophthalaldehyde (OPA). The linear range was $3.0952\text{—}15.5071 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r = 0.9990$). The detection limit was $9.70 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The average recoveries of samples were 93.6%—99.7% with RSD in the range of 1.9%—2.5%. The method is simple, rapid and high sensitivity, which can be used for the determination of the contents of amino acids in natural drugs.

Key words *Saccharum Alhagi*; Amino Acids; Fluorimetry