HPLC- ELSD法测定蛹虫草中 6种游离氨基酸的含量

王雅玲[1], 代玲玲[2], 马 堃[2], 赵轶男[2], 李婷婷[2], 孙力军[1]

(1. 广东海洋大学 食品科技学院, 广东 湛江 524088; 2. 大连民族学院 生命科学学院, 辽宁 大连 116600)

摘 要: 建立了反相高效液相色谱-蒸发光散射检测(HPLC- ELSD)直接测定 6种未衍生游离氨基酸(脯氨酸 Pro、缬氨酸 Val、蛋氨酸 Met、异亮氨酸 Ile、亮氨酸 Leu、苯丙氨酸 Phe)含量的分析方法。采用 Venusil MP-C_{18}色谱柱, 以甲醇和水为流动相进行线性梯度洗脱, 流速为 0.8 mL·min^{-1}, 漂移管温度 40 ℃, 氮气流速 2.5 L·min^{-1}; 优化了流动相的洗脱条件。结果表明, 在优化实验条件下, 6种氨基酸峰面积的对数值与氨基酸质量浓度的对数值呈良好线性, 检出限为 10.0~ 15.0 mg·L^{-1}, 方法精密度及稳定性良好。采用该法对微波法提取的蛹虫草子实体中的氨基酸进行测定, 待检蛹虫草样本中不含缬氨酸(Val), 其余 5种氨基酸的总量为 16.00 mg/g 约占蛹虫草总质量的 1.60%, 其中脯氨酸(Pro)(占 0.72%)和苯氨酸(Phe)(占 0.56%)的含量较高。已检出的 5种 Pro、Met、Ile、Leu、Phe含量分别为 7.20、0.88、0.69、1.65、5.58 mg/g。

关键词: 高效液相色谱; 微波提取; 蛹虫草; 蒸发光散射检测器

中图分类号: O657.72; R977.4 文献标识码: A 文章编号: 1004- 4957(2010)10- 1091- 04

doi: 10.3969/j.issn.1004- 4957.2010.10.020

Determination of Six Amino Acids in *Cordyceps militaris* by HPLC- ELSD

WANG Ya-ling[1], DAI Ling-ling[2], MA Kun[2], ZHAO Yi-nan[2], LI Ting-ting[2], SUN Li-jun[1]

(1. College of Food Science Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China)

Abstract A high performance liquid chromatographic method coupled with evaporative light scattering detection (HPLC- ELSD) was developed for the determination of six underivatized free amino acids (Pro, Val, Met, Ile, Leu, Phe). The sample was separated on a Venusil MP-C_{18} column using methanol- water as mobile phase by linear gradient elution. The optimal conditions were as the follows: flow rate: 0.8 mL·min^{-1}, drift tube temperature: 40 ℃, nitrogen flow rate: 2.5 L·min^{-1}. The mobile phase elution conditions were optimized and the working system applicability was tested. The results showed that, under the optimal conditions, the logarithm correlation between peak area and amino acid concentration was in a good linearity. The detection limits of six amino acids were in the range of 10.0- 15.0 mg·L^{-1}. The method was applied in the detection of 6 amino acids in the fruiting body of *Cordyceps militaris*, and the results showed that except for Val, the other five amino acids (Pro, Met, Ile, Leu, Phe) were detected in the tested sample, and their total amount was 16.00 mg/g, accounting for 1.60% of the total mass of *Cordyceps militaris*, in which Pro (occupying 0.72% of the total mass of *Cordyceps militaris*) and Phe (occupying 0.56% of the total mass of *Cordyceps militaris*) were higher than the other three amino acids. The detected contents of five amino acids of Pro, Met, Ile, Leu and Phe were 7.20, 0.88, 0.69, 1.65 and 5.58 mg/g, respectively.

Key words high performance liquid chromatography; microwave extraction; *Cordyceps militaris*; evaporative light-scattering detector

收稿日期: 2010- 05- 08; 修回日期: 2010- 07- 27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30972287)

第一作者: 王雅玲(1965-), 女, 辽宁凤城人, 副教授, 博士

通讯作者: 孙力军, Tel: 0759- 2080309, E- mail: dfsun01@126.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

蛹虫草(*Cordyceps militaris*)又称北冬虫夏草，其功效与冬虫夏草相近，具有免疫调节、抗肿瘤、降血脂及降血压、耐缺氧和抗疲劳等作用，在药化、药理和临床实验中被证明可作为冬虫夏草的重要人工替代品之一[1-2]。蛹虫草含有核苷类、多糖类、虫草酸、甾醇类，此外还含有氨基酸和微量元素等主要成分[2]。测定氨基酸有效成分的含量对研究蛹虫草具有重要意义。

氨基酸的测定有氨基酸自动测定仪[3]、衍生化反相高效液相色谱法[4]等。前者需要特定的仪器，分析时间长，费用高；后者需进行衍生化反应，还需对衍生化反应条件及产物的稳定性等进行考察，此外衍生剂一般毒性较大，易对实验操作人员造成伤害。蒸发光散射检测器(Evaporative light-scattering detector, ELSD)是一种新型质量型检测器，能检测任何挥发性低于流动相的物质，是紫外检测器的有效补充，适合于无紫外吸收的有效成分的分析，现已应用于萜类内酯、胆固醇、胆汁酸、黄芪甲苷等多种中药成分的分析[5-7]。采用HPLC-ELSD法检测不同样品中未衍生氨基酸的报道较多[8-9]，但该检测方法用于蛹虫草中氨基酸的检测未见报道。本文采用反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD)同步测定蛹虫草中6种未衍生的游离氨基酸(脯氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸)，其中除脯氨酸外均为人体必需氨基酸，而脯氨酸在调节渗透平衡、防止渗透胁迫对植物造成伤害、清除自由基、保护细胞结构方面具有重要意义[10]。因此，测定蛹虫草中这6种氨基酸的含量，对评价蛹虫草的品质有重要作用，同时也可为蛹虫草药理药效的研究提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-20AD型液相色谱仪(配有二元梯度泵)、Shimadzu LCMS Solution色谱工作站(日本岛津公司)；SEDEX-75低温型蒸发光散射检测器(美国迪马公司)；MO-2270M1型微波炉(青岛海尔微波制品有限公司)；SB3200DT型超声波清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

人工蛹虫草固体培养物由浙江康阳生物科技有限公司提供；6种氨基酸标准品：脯氨酸(Pro)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe)(德国Sigma公司)；甲醇(色谱纯，天津市科密欧化学试剂有限公司)；水为二次蒸馏水。

1.2 混合标准溶液与样品溶液的制备

精密吸取6种氨基酸0.10 mL，用蒸馏水配制成2.50、1.25、0.83、0.63、0.50 g·L^{-1}混合标准溶液，置-4 ℃冰箱中保存。将蛹虫草固体培养物于60 ℃烘干，粉碎，精密称取培养物粉末2.50 g，置于锥形瓶中，加100 mL蒸馏水摇匀，将锥形瓶置于微波炉中，中火处理3 min，取样品提取液用滤纸过滤，滤液再经0.22 μm微孔滤膜压滤。

1.3 色谱条件

Venusil MP-C_{18}色谱柱(5.0 μm，4.6 mm×150 mm)。流动相：甲醇(A)，水(B)；线性梯度洗脱程序：0~8 min，3% A，8~20 min，3%~100% A，20~30 min，100% A用以平衡色谱柱；流速0.8 mL·min^{-1}；漂移管温度40 ℃；氮气流速2.5 L·min^{-1}；进样量5.0 μL。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

考察了流动相分别为乙腈-水、甲醇-0.7%三氟乙酸、乙腈-0.7%三氟乙酸与甲醇-水时的分离效果。结果表明，以乙腈-水为流动相时，6个组分能达到完全分离，但峰形较差。而以甲醇-0.7%三氟乙酸溶液或乙腈-0.7%三氟乙酸溶液为流动相时，各组分不能达到完全分离，且易出现基线漂移和基线噪声。以甲醇-水为流动相时分离效果较好，可在较短时间内分离6种氨基酸成分，并提高了分析灵敏度和稳定性。研究了不同梯度洗脱条件对分离效果的影响，实验发现，0~8 min采用等度洗脱，8~20 min采用线性梯度洗脱时各色谱峰对称性好，峰形尖锐，基线平稳。

2.2 系统适用性实验

在上述优化色谱条件下，取标准品混合溶液5.0 μL，进样测定，6种氨基酸可以达到良好的分离，理论塔板数不低于4 000，分离度大于1.5，空白无干扰(见图1A)。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3 线性关系与检出限(LOD)

ELSD是一种响应值不呈线性规律的检测器[7]，线性标准曲线可通过双对数坐标获得[11]：$\lg A = b\lg C + \lg a$。其中，C为氨基酸的质量浓度(mg·L^{-1})，A为峰面积，a和 b为常数[12]。将“1.2”中配制好的标准品混合溶液在优化色谱条件下分析，各浓度重复进样 5次，以峰面积的对数为纵坐标($y = \lg A$)，以氨基酸质量浓度(mg·L^{-1})对数的 1.3倍为横坐标($x = 1.3\lg C$)[13]，进行线性回归，得到的线性回归方程如表 1所示，线性范围为 57.55~413.00 mg·L^{-1}。当信噪比为 3时，各氨基酸组分的检出限为 10.0~15.0 mg·L^{-1}。

2.4 方法的精密度与稳定性

取 6种氨基酸标准样品混合溶液 5 μL，连续进样 5次，测定峰面积。实验测得各组分色谱峰的保留时间波动小于 0.2 min，峰面积的相对标准偏差(RSD)为 0.68%~2.2%，说明方法精密度良好。

取 6种氨基酸标准样品混合溶液，分别在保存 0、2、4、6、8、10 h后进样，测定峰面积。实验所得峰面积的 RSD为 2.3%。说明标准样品溶液在 10 h内稳定性良好。

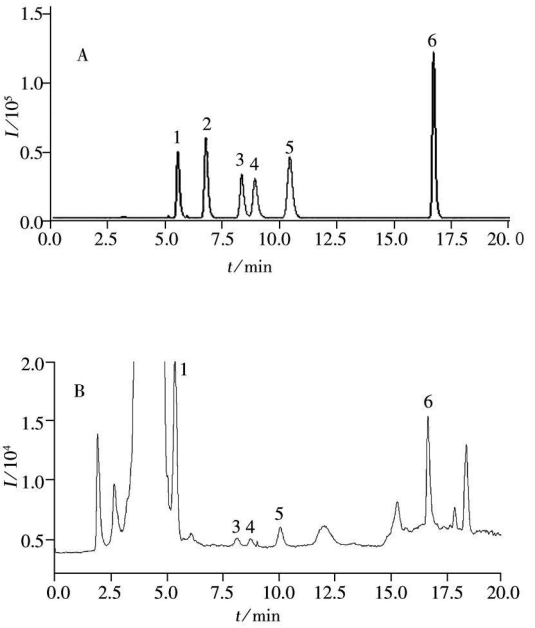

图 1　混合标准溶液(A)与蛹虫草样品(B)的 HPLC－ELSD色谱图

Fig. 1　Chromatograms of 6 amino acids mixed standards(A) and *Cordyceps militaris* sample(B)

1. Pro, 2. Val, 3 Met, 4. Ile, 5. Leu, 6. Phe

表 1　6种氨基酸的线性方程与检出限

Table 1　Regression equations and the limits of detection(LODs) of 6 amino acids

Amino acid	Linear range ρ/(mg·L^{-1})	Linear equation	r^2	LOD ρ/(mg·L^{-1})
Pro	57.55~287.75	$y = 0.902\,2x + 2.708\,3$	0.999 5	15.0
Val	58.60~293.00	$y = 1.071\,4x + 2.375\,2$	0.999 5	15.0
Met	74.60~373.00	$y = 0.921\,1x + 2.499\,6$	0.999 2	15.0
Ile	65.60~328.00	$y = 0.874\,9x + 2.687\,6$	0.999 4	10.0
Leu	65.60~328.00	$y = 1.086\,3x + 2.313\,3$	0.999 2	15.0
Phe	82.60~413.00	$y = 1.204\,3x + 1.940\,6$	0.995 6	10.0

2.5 样品的测定

精密称取 3批蛹虫草粉末 2.50 g，制备成样品溶液后测定，连续进样 3次，在优化色谱条件下进样分析。测得峰面积，代入线性回归方程，分别计算出蛹虫草样品溶液中 6种氨基酸的质量浓度(mg·L^{-1})，然后计算待测蛹虫草样品中 6种氨基酸的含量。样品溶液的 HPLC－ELSD色谱图见图 1B。研究结果表明，待测蛹虫草中不含游离的 Val、Pro、Met、Ile、Leu、Phe的含量依次为 7.20、0.88、0.69、1.65、5.58 mg/g，占蛹虫草总质量的 0.07%~0.72%，Pro(0.72%)和 Phe(0.56%)的含量较高。待测蛹虫草样本中 5种游离氨基酸的总量为 16.00 mg/g，约占蛹虫草总质量的 1.60%。

据研究报道，蛹虫草菌丝体和子座均含有 17种氨基酸[14-15]。研究人员通过测定不同氨基酸组分的线性方程考察其响应因子，结果表明不同氨基酸 HPLC－ELSD检测的响应因子明显不同[16]。因为 ELSD的响应不依赖于样品的光学特性，而取决于流动相组成和流速，以及样品的挥发性。由于不同氨基酸的相对分子质量不同，挥发度也不同，在蒸发管中形成蒸汽的速度不同，从漂移管进入到光散射检测池的时间不同，因此，其它的氨基酸如天冬氨酸(Asp)、精氨酸(Arg)等在该色谱条件下，不会对所测定的 6种氨基酸的定性与定量分析产生干扰。

3 结　论

本文建立了反相高效液相色谱－蒸发光散射检测(HPLC－ELSD)同步测定蛹虫草中 6种未衍生游离氨基酸含量的方法，由于 ELSD弥补了紫外检测器和荧光检测器的不足，使没有紫外或荧光吸收的

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

物质可以直接进样分析，无需柱前或柱后衍生化反应，避免了对衍生化条件的筛选，减小了测定误差，操作简便。该方法用于检测 6种氨基酸，快速、准确，每个样品只需 30 min，检出限比国内同类报道（20~ 56 mg• L^{-1}）[14]低，灵敏度高，且价格低廉，为蛹虫草中氨基酸的快速检测技术的开发提供了参考。

参考文献:

[1] 连云岚，杨中林. 北虫草化学成分及药理作用研究进展[J]. 山西医药杂志，2006，35(1)：44-46.

[2] 廖春丽，方改霞，王莲哲，王国贞，万亚涛. 蛹虫草主要有效成分分析[J]. 安徽农业科学，2008，36(12)：5050-5052.

[3] 万丹晶，陈妙芬，翟咏虹. 用 HPLC法和氨基酸分析仪测定多维氨基酸片中 18种氨基酸[J]. 药学服务与研究，2006，6(3)：212-214.

[4] 刘霄玲. HPLC法测定乳制品中的氨基酸含量[J]. 乳业科学与技术，2006，121(6)：284-286

[5] 颜玉贞，谢培山. HPLC-ELSD法测定银杏叶中的 4种萜类内酯含量[J]. 药物分析杂志，2001，21(3)：173-176

[6] 冯芳，马永建，陈明，张正行，安登魁. 反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时测定人工牛黄中多组分含量[J]. 药物学报，2005，35(3)：216-219.

[7] 田南卉，杨国红，方颖，厉进忠，张鲲. 高效液相色谱法蒸发光散射检测器测定黄芪和制剂中黄芪甲苷的含量[J]. 药物分析杂志，2000，20(3)：199-200.

[8] 郑伟刚，蔡恒，万红贵，王涛，贾伟. HPLC-ELSD检测发酵液中 *L*-天冬氨酸含量[J]. 食品科技，2008，33(6)：192-194.

[9] 陈鼎雄，林立. HPLC-ELSD法测定复方氨基酸注射液(3AA)中三组分的含量[J]. 药物分析杂志，2007，27(10)：1649-1651.

[10] 全先庆，张渝洁，单雷，毕玉平. 高等植物脯氨酸代谢研究进展[J]. 生物技术通报，2007，(1)：14-18

[11] PETRITIS K，DE PERSON M，ELFAKIR C，DREUX M. Validation of an ion-interaction chromatography analysis of underivatized amino acids in commercial preparation using evaporative light scattering detection[J]. Chromatographia，2004，60(9)：293-298.

[12] FEKKES D，VAN DALEN A，EDELMAN M，VOSKUILEN A. Validation of the determination of amino acids in plasma by high-performance liquid chromatography using automated pre-column derivatization with *o*-phthaldialdehyde[J]. J Chromatogr B，1995，669(2)：177-186.

[13] DREUX M，LAFOSSE M. Evaporative light scattering detection of carbohydrates in HPLC //EL RASSI Z. Carbohydrate analysis[M]. Amsterdam：Elsevier，1995，58：515-540.

[14] 鄢丹，张毅，韩玉梅，董小萍，肖小河. HPLC-ELSD法测定疏血通注射液中 17种未衍生氨基酸含量[J]. 药物分析杂志，2007，27(4)：558-560

[15] 夏春雨，孙巍，刘学铭. 虫草有效成分的研究进展[J]. 中国食用菌，2009，28(2)：3-7.

[16] 赵宇新，李曼玲. 氨基酸类成分以 HPLC-ELSD进行检测的响应因子分析[J]. 中国实验方剂学杂志，2006，12(3)：16-18

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net