

表3 正交设计各样品试验指标综合评分

编号	1-(3,4-二羟基苯)-2-乙酰氨基-乙酮/%	酪氨酸/%	综合得分
1	0.175 7	0.020 9	90.29
2	0.161 4	0.011 3	67.83
3	0.185 1	0.007 7	67.72
4	0.173 8	0.013 1	74.82
5	0.152 7	0.018 0	78.16
6	0.194 7	0.015 7	85.78
7	0.188 4	0.009 0	71.16
8	0.209 6	0.013 4	85.64
9	0.123 6	0.007 3	49.35

表4 正交设计各样品实验指标综合评分方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	F	显著性
A	179.782	2	9.634	
B	218.524	2	11.710	
C	831.322	2	44.549	*
D	18.661	2	1.000	

$$F_{1-0.05}(2, 2) = 19.00; F_{1-0.01}(2, 2) = 99.00$$

4 小结与讨论

元朝的《世医得效方》首次提出了盐炙桑螵蛸的方法,桑螵蛸盐炙后引药入肾经,并增强益肾固

精、缩尿止遗的作用^[4]。为了规范桑螵蛸盐炙工艺及制定盐炙桑螵蛸的质量标准,本实验以桑螵蛸中的1-(3,4-二羟基苯)-2-乙酰氨基-乙酮、酪氨酸为指标,以盐炙的关键步骤加盐量、闷润时间、炒制温度、炒制时间为考察因素,采用正交试验法和双指标综合分析方法对桑螵蛸的盐炙工艺进行优化^[5],筛选出桑螵蛸的最佳盐炙工艺条件为每100 g桑螵蛸药材用30 mL盐水(含2.5 g盐),闷润1 h,100℃(锅底温度)炒10 min。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.2005:211.
- [2] 赵荣国,姜波.桑螵蛸炮制的历史沿革[J].中成药,1995,17(10):23.
- [3] 林辉,胡昌江,李兴迎,等.正交试验法优选补骨脂的盐炙工艺[J].中国药业,2008,17(7):35.
- [4] 龚千锋.中药炮制学[M].北京:中国中医药出版社,2003:296.
- [5] 陆兔林,宋坤,季德,等.知母盐炙工艺研究[J].中国中药杂志,2007,32(11):1098.

HPLC 测定不同产地冬虫夏草中氨基酸的含量

王 丽, 宋志峰, 黄 璜, 王巍巍, 蔡红梅, 魏春雁*
(吉林省农业科学院,吉林 长春 130033)

关键词:HPLC;冬虫夏草;氨基酸

摘要:目的:建立一种快速测定冬虫夏草中氨基酸含量的HPLC方法,同时测定了不同产地的冬虫夏草中氨基酸含量。方法:采用柱前邻苯二甲醛和氯甲酸苄甲酯联合在线自动衍生、二元梯度洗脱(流动相A:40 mmol/L NaH₂PO₄·H₂O, pH7.8;流动相B:乙腈-甲醇-水=4.5/4.5/1,v/v)、反相C₁₈短柱分离(色谱柱:Zorbax Eclipse AAA C₁₈柱,75 mm×4.6 mm,3.5 μm)、二极管阵列检测器(检测波长:338 nm;参考波长:390 nm)和荧光检测器(激发波长:340 nm;发射波长:450 nm)联合检测,内标法定量。结果:各氨基酸含量在4.5~1 000 μmol/L范围内线性关系良好(相关系数为0.991 4~0.999 7),除蛋氨酸(部分氧化降解)为85.12%外,其他各氨基酸的加标回收率为95.10%~103.29%,相对标准偏差为2.03%~5.12%(n=5)。结论:本方法适合于冬虫夏草氨基酸含量的测定。对分别采自青海省果洛州和玉树州、四川甘孜州、贵州铜仁市和西藏那曲县等5个地区的冬虫夏草中氨基酸含量进行了测定,氨基酸总量分别为21.10%、16.87%、20.86%、20.94%和20.28%,同时对各种不同类型氨基酸占氨基酸总量的比例进行了分析。

中图分类号:R283

文献标识码:A

文章编号:1001-1528(2010)06-0984-04

冬虫夏草[Cordyceps sinensis (Berk) sacc],又名虫草,是我国一种名贵中药,与鹿茸、人参并列为我国中药的三大珍品。为麦角菌科真菌冬虫夏草菌寄

生于蝙蝠科昆虫蝙蝠蛾幼虫上的子座及幼虫尸体的复合体^[1]。在我国西藏、青海、云南、贵州、四川、甘肃、广东及广西都有出产。在祖国医药学中,认为虫

收稿日期:2009-04-29

作者简介:王 丽(1956-),女,副研究员,主要从事农产品品质分析工作。

* 通讯作者:魏春雁,Tel:(0431)87063253 E-mail:weicy820@yahoo.com.cn

草性温而味甘,是能滋肺阴、补肾阳的滋补强壮药,主要用于治疗肺阴虚诸症和肾阳虚诸症等。现代医学研究表明它还具有调节免疫、抗衰老、降血糖、抗脂质过氧化损伤、抗癌和活血等诸多药理作用^[2]。

冬虫夏草主要有效成分有:虫草多糖、蛋白和氨基酸、甘露醇、脂肪和脂肪酸、抗菌活性物质、虫草素和生物碱及微量元素等^[3]。其中氨基酸是虫草补益强壮作用和增强免疫功能的物质基础之一^[4],同时与辅助治疗消化系统及神经系统疾病,抑制病菌等也有着必然的联系^[5],张士善^[6]等还就冬虫夏草氨基酸成分的药理作用进行了专门的研究,表明天然虫草中某些氨基酸具有镇静作用。

本实验对高效液相色谱法(HPLC)快速测定冬虫夏草水解氨基酸含量进行了研究。与传统的氨基酸分析方法相比,本方法具有样品处理简单、自动化程度高、分析时间短、灵敏度和准确性高等优点,适合冬虫夏草水解氨基酸含量的测定。利用本方法对产自青海省果洛州和玉树州、四川甘孜州、贵州铜仁市和西藏那曲县等地的冬虫夏草中水解氨基酸含量进行了测定,并对氨基酸含量及组成进行了分析比较,为其进一步研究和开发利用提供一些参考,同时对冬虫夏草中水解前游离氨基酸含量进行了测定。

1 材料与方法

1.1 仪器设备 Agilent 1100 高效液相色谱仪,包括:真空脱气机、二元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器(DAD)、荧光检测器(FLD)和化学工作站,美国 Agilent 公司;电热恒温干燥箱(最高温度 350℃,控温精度 $\pm 1^\circ\text{C}$),日本 Yamato 公司;高速台式离心机(最大转速 14 000 r/min),德国 Hettich 公司;旋转蒸发器,德国 IKA 公司。

1.2 试剂及配制 甲醇、乙腈(色谱纯),美国 Fisher 公司; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (分析纯),美国 Sigma-Aldrich 公司;硼酸缓冲液、邻苯二甲醛(OPA)、氯甲酸苄基酯(FMOC)和 17 种氨基酸标准混合液,包括:丙氨酸、精氨酸、天冬氨酸、胱氨酸、谷氨酸、组氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸和缬氨酸,Agilent 公司;色氨酸和内标戊氨酸,美国 Sigma-Aldrich 公司。HCl(优级纯)、巯基乙醇、NaOH(分析纯),北京化学试剂厂;水为双蒸水。

内标溶液配制:准确称取适量戊氨酸,用 0.1 mol/L HCl 配制成浓度为 50 mmol/L 的内标贮存液,临用时稀释。

氨基酸混合标准液的配制:准确称取适量色氨

酸,用 0.1 mol/L HCl 配制成浓度为 18 mmol/L 的贮存液,临用时稀释。将不同浓度的 17 种氨基酸混合标准液与适当浓度的戊氨酸和色氨酸溶液按一定比例混合,配制成浓度分别为 4.5、45、225、450 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的氨基酸混合标准溶液(内标戊氨酸浓度均为 250 $\mu\text{mol/L}$)。

冬虫夏草样品:分别产自青海省果洛州和玉树州、四川甘孜州、贵州铜仁市和西藏那曲县,由吉林大学生命科学学院提供。

1.3 样品制备 水解氨基酸样品制备 按照参考文献^[7]中样品制备项下样品酸水解法进行。

1.4 色谱条件 色谱柱:Zorbax Eclipse AAA C_{18} 柱,75 mm $\times$ 4.6 mm, $3.5 \mu\text{m}$ 。流动相 A:40 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶液, $\text{pH} = 7.8$ 。流动相 B:乙腈/甲醇/水 = 45/45/10 (v/v)。流动相梯度洗脱程序:0.0 ~ 1.0 min (B:0%), 1.0 ~ 9.8 min (B:0% ~ 57%), 9.8 ~ 10.0 min (B:57% ~ 100%), 10.0 ~ 12.0 min (B:100%), 12.0 ~ 12.5 min (B:100% ~ 0%), 12.5 ~ 14.0 min (B:0%)。流速:2 mL/min。柱温:40℃。DAD 检测波长:0 ~ 8.5 min,紫外波长 338 nm(谱带宽 10 nm),参考波长 390 nm(谱带宽 20 nm);FLD 检测波长:0.0 ~ 8.5 min(激发波长 340 nm,发射波长 450 nm), 8.5 ~ 14.0 min(激发波长 266 nm,发射波长 305 nm)。自动衍生程序:分别吸取 2.5 μL 硼酸缓冲液和 0.5 μL 标准溶液或样品水解液,充分混合,静置 30 s;洗针;吸取 0.5 μL OPA 充分混合;洗针;吸取 0.5 μL FMOC 充分混合;吸取 32 μL 水,充分混合;进样量 18 μL 。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理方法的选择 本研究将水解方法进行了改进,即在水解前加入已知浓度的内标物(戊氨酸),来校正组成蛋白质的各种氨基酸在水解过程中的物理和化学损失,同时简化了操作步骤。选择戊氨酸的原因是首先它不存在于天然蛋白质中,并且性质与其它氨基酸相近,其次在色谱分离过程中又能与其它氨基酸很好的分离(见图 1),是十分理想的内标物。

水解液的处理采用加碱中和法,省去了旋转蒸发浓缩等繁琐的操作步骤,同时也减少了误差来源。而对于测定结果不会产生影响^[8]。

2.2 色谱条件的选择 一般 HPLC 法分析氨基酸的分析时间都在 30 min 以上,使用经典的离子交换色谱的分析时间甚至需 1 h 左右。本研究采用反相 C_{18} 短柱(75 mm)和高压二元梯度大流量洗脱测定

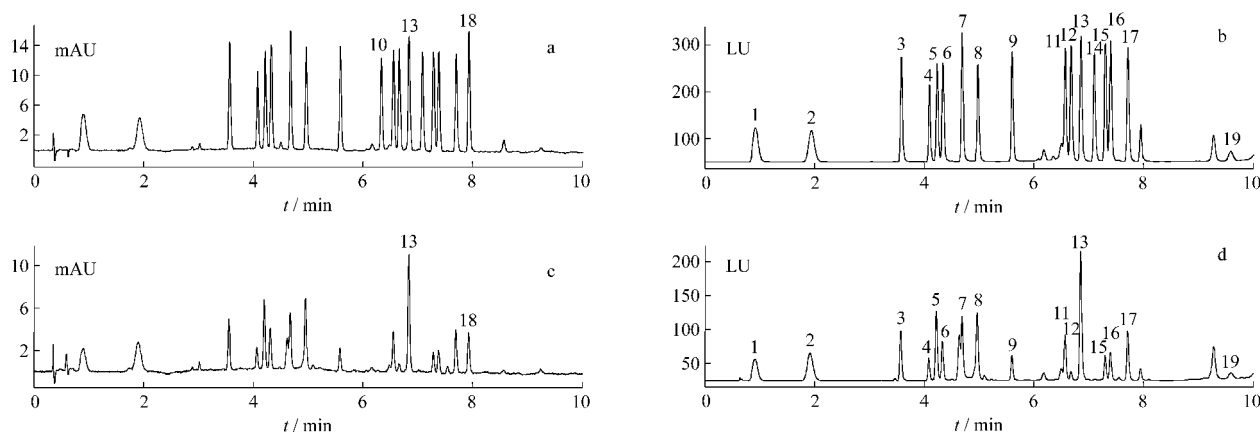


图1 氨基酸标准液(a、b)与样品(c、d)色谱图;其中a、c为DAD检测信号;b、d为FLD检测信号

1. 天门冬氨酸 2. 谷氨酸 3. 丝氨酸 4. 组氨酸 5. 甘氨酸 6. 苏氨酸 7. 精氨酸 8. 丙氨酸 9. 酪氨酸 10. 胱氨酸 11. 缬氨酸 12. 蛋氨酸 13. 戊氨酸 14. 色氨酸 15. 苯丙氨酸 16. 异亮氨酸 17. 亮氨酸 18. 赖氨酸 19. 脯氨酸

氨基酸,将分析时间缩短至14 min,大大提高了分析效率。

OPA和FMOC都是常用的氨基酸衍生试剂,但OPA不能与仲氨基酸反应,将两者联合使用,OPA首先与伯氨基酸发生反应,然后FMOC再与仲氨基酸反应,这样可以起到互补的作用。衍生过程利用自动进样器按1.4项的衍生程序来完成,可以提高自动化程度和重现性。但应该注意的是OPA性质不稳定,易被氧化降解而失效,建议每3天更换,若长期不用应注意隔绝空气并且低温冷冻保存。而FMOC具有挥发性且有微毒,使用时需小心。

本研究使用DAD和FLD联合检测氨基酸的衍生物,可同时测定18种氨基酸含量。使用FLD检测(图1b、d)时杂质干扰小,基线平稳,检测灵敏度比DAD高10倍以上,但是胱氨酸无响应而赖氨酸响应值小,需要使用DAD(图1a、c)来补充。

2.3 方法的线性关系、检出限、定量限、回收率和精密度实验 将1.2项中所配制的5种浓度的氨基酸混合标准液,按1.4项的色谱条件进行测定,以各氨基酸峰面积为纵坐标,氨基酸浓度($\mu\text{mol/L}$)为横坐标进行线性回归得到回归方程,各氨基酸浓度在4.5~1 000 $\mu\text{mol/L}$ 范围内具有良好的线性关系,相关系数 r 在0.990 0~0.999 5之间。以信噪比 $S/N=3$ 计算最小检出限(LOD),以信噪比 $S/N=10$ 计算最小定量限(LOQ),结果见表1。由于胱氨酸和赖氨酸是使用DAD检测,所以比其他氨基酸的检测灵敏度低的多。

准确称取已测定出氨基酸含量的同一产地的冬虫夏草样品5份,分别按氨基酸含量80%、100%和120%左右加入氨基酸标准液,测定其回收率和相对

标准偏差(RSD)。结果表明,各氨基酸的回收率,除Met为85.12%(部分被氧化破坏)外,其他在95.10%~103.29%范围内,RSD为2.03%~5.12%。说明该方法准确度和精密度高,方法可靠。见表1。

表1 18种氨基酸的线性相关系数、检出限、定量限、回收率和精密度

氨基酸	相关系数	检出限 /($\mu\text{mol/L}$)	定量限 /($\mu\text{mol/L}$)	回收率 /%	RSD/% ($n=5$)
天门冬氨酸	0.999 2	0.123	0.411	98.75	2.55
谷氨酸	0.998 9	0.141	0.469	103.14	3.16
丝氨酸	0.992 7	0.044	0.148	97.11	3.64
组氨酸	0.991 4	0.087	0.292	99.26	4.88
甘氨酸	0.999 3	0.032	0.107	101.07	3.03
苏氨酸	0.997 6	0.051	0.170	102.00	2.80
精氨酸	0.999 6	0.039	0.131	98.85	2.99
丙氨酸	0.999 0	0.046	0.154	99.13	3.45
酪氨酸	0.998 8	0.052	0.174	98.60	2.03
胱氨酸	0.994 1	1.021	0.410	—	—
缬氨酸	0.998 5	0.035	0.117	97.23	4.04
蛋氨酸	0.999 1	0.060	0.202	85.12	2.76
色氨酸	0.997 5	0.054	0.180	—	—
苯丙氨酸	0.999 1	0.029	0.096	96.95	2.31
异亮氨酸	0.999 7	0.033	0.111	97.98	3.24
亮氨酸	0.999 5	0.028	0.094	103.29	2.98
赖氨酸	0.996 3	0.614	2.044	102.91	4.88
脯氨酸	0.996 6	0.345	1.159	95.10	5.12

2.4 样品测定 对分别采自青海省果洛州和玉树州、四川省甘孜州、贵州省铜仁市、西藏那曲县等5个地区的冬虫夏草中的水解氨基酸含量进行了测定,每个产地3次重复取平均值,同时计算RSD值,结果见表2。5个产地冬虫夏草中水解氨基酸总和平均值依次为21.10%、16.87%、20.86%、20.94%和20.28%,其中除玉树州冬虫夏草氨基酸含量较低外,其余地区氨基酸总量相当;5个地区的冬虫夏草中必需氨基酸和半必需氨基酸(组氨酸、苏氨酸、精

氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和赖氨酸)之和分别占总量的 49.72%、50.14%、50.96%、50.58% 和 49.81%。另外 5 个地区的冬虫夏草中芳香族氨基酸(酪氨酸和苯丙氨酸)分别占总量的 7.58%、8.65%、10.83%、8.21% 和 7.50%;增香族氨基酸(精氨酸、酪氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、赖氨酸和脯氨酸)分别占总量的 42.61%、43.86%、42.57%、43.03% 和 42.50%;输液氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、精氨酸、酪氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸和赖氨酸)分别占总

表 2 不同产地冬虫夏草氨基酸含量测定结果(干基)($n=3$)

序号	氨基酸	产地									
		青海果洛		青海玉树		四川甘孜		贵州铜仁		西藏那曲	
		含量/%	RSD/%	含量/%	RSD/%	含量/%	RSD/%	含量/%	RSD/%	含量/%	RSD/%
1	天冬氨酸	1.87	2.63	1.49	2.71	2.24	3.03	1.87	2.67	1.82	2.75
2	谷氨酸	3.06	3.48	2.54	3.63	2.75	3.80	2.91	3.29	2.95	3.66
3	丝氨酸	1.15	3.81	0.86	3.72	1.16	3.91	1.13	4.04	1.11	3.94
4	组氨酸	1.35	5.15	0.98	5.03	0.64	4.91	1.33	5.24	1.25	4.87
5	甘氨酸	1.19	3.51	0.90	3.10	1.17	3.22	1.21	3.11	1.15	3.55
6	苏氨酸	1.11	3.06	0.84	3.13	1.34	2.95	1.07	2.90	1.08	3.28
7	精氨酸	2.26	2.89	1.66	3.45	1.60	3.33	2.18	3.21	2.09	3.27
8	丙氨酸	1.50	3.38	1.09	3.77	1.59	3.80	1.47	3.92	1.43	3.72
9	酪氨酸	0.82	2.54	0.77	2.76	1.22	3.02	0.92	2.88	0.78	2.67
11	缬氨酸	1.03	4.89	0.83	5.02	1.13	4.93	1.04	5.11	1.01	4.23
12	蛋氨酸	0.24	2.74	0.21	2.78	0.28	2.84	0.25	2.93	0.24	2.90
15	苯丙氨酸	0.78	2.22	0.69	2.45	1.04	2.38	0.80	2.91	0.74	2.54
16	异亮氨酸	0.64	3.83	0.56	3.82	0.81	3.60	0.69	3.94	0.63	3.55
17	亮氨酸	1.19	3.12	1.02	3.06	1.39	3.86	1.26	3.37	1.18	3.41
18	赖氨酸	1.07	5.20	0.90	5.00	1.18	5.32	1.05	5.15	1.10	5.39
19	脯氨酸	1.84	5.05	1.53	5.54	1.32	5.87	1.76	5.20	1.72	5.18
4,7,9	半必需氨基酸	4.43		3.41		3.46		4.43		4.12	
6,11,12,15-18	必需氨基酸	6.06		5.05		7.17		6.16		5.98	
9,15	芳香族氨基酸	1.60		1.46		2.26		1.72		1.52	
7,9,11,15,17-19	增香族氨基酸	8.99		7.40		8.88		9.01		8.62	
1,2,5,7,9,12,15,17,18	输液氨基酸	12.48		10.18		12.87		12.45		12.05	
1,2	酸性氨基酸	4.93		4.03		4.99		4.78		4.77	
4,7,18	碱性氨基酸	4.68		3.54		3.42		4.56		4.44	
3,5,6,8,9,11,12,15-17,19	中性氨基酸	11.49		9.30		12.45		11.60		11.07	
1-9,11,12,15-19	总和	21.10		16.87		20.86		20.94		20.28	

3 结论

本研究采用OPA和FMOC联合柱前在线自动衍生,反相 C_{18} 短柱分离,二元梯度洗脱,DAD 和 FLD 联合检测的高效液相色谱法测定冬虫夏草氨基酸含量。结果表明:本方法样品前处理简单、灵敏度、准确度高,分析时间短。对 5 种不同产地冬虫夏草氨基酸含量进行了测定,发现不同产地冬虫夏草氨基酸总量存在一定差异,但是各种不同类型氨基酸占总量的比例相当。

参考文献:

[1] 赵彦青,孙望伦,高颖,等.冬虫夏草的心脑血管药理作用研究概况[J].中国中医急症,2005,14(11):1114-1116.

量的 59.15%、60.34%、61.70%、59.46% 和 59.42%。结果表明:虽然氨基酸总量因冬虫夏草的产地不同而存在一定差异,但是各种不同类型氨基酸所占比例差别不大。本研究在测定水解氨基酸之前对游离氨基酸含量同时进行了测定,青海省果洛州和玉树州、四川省甘孜州、贵州省铜仁市、西藏那曲县等 5 个地区产冬虫夏草游离氨基酸含量分别为 1.61%、1.68%、1.73%、1.71% 和 1.82%,各地差异不显著。样品各个氨基酸 3 次重复测定的 RSD 值为 2.22%~5.87%,说明精密度较高。

[2] 程宏霞,田宏伟,展筱林.冬虫夏草药理作用研究进展[J].中医药导报,2005,11(10):86-88.

[3] 刘彦威,刘娜,刘利强.冬虫夏草有效成分研究进展[J].动物医学进展,2004,25(3):51-53.

[4] 孟祥贤,张志光,刘选明,等.古尼虫草生理活性物质的检测与分析[J].湖南大学学报,2002,29(1):14-17.

[5] 纪莎,施小兵,易骏.冬虫夏草化学成分研究概况[J].福建中医学院学报,1999,9(2):46-47.

[6] 张士善,张丹参,朱桐,等.冬虫夏草氨基酸成分的药理分析[J].药学报,1991,26(5):326-330.

[7] 宋志峰,王丽,黄璜,等.高效液相色谱法快速测定黄粉虫氨基酸含量[J].中国饲料,2008,19(5):39-41.

[8] 宋志峰,王丽,纪锋,等.柱前在线衍生-反相高效液相色谱内标法测定饲料中氨基酸[J].分析化学,2007,35(1):25-30.