

柱前衍生 RP-HPLC 法测定芦笋中门冬氨酸的含量

邵旭¹, 牛海军¹, 李晓亮^{1*}, 高建²

(1. 合肥七星医药科技有限公司, 安徽 合肥 230001; 2. 安徽医科大学, 安徽 合肥 230001)

[摘要] 目的: 建立芦笋中门冬氨酸的含量测定方法。方法: 采用柱前衍生 RP-HPLC 法, 分析色谱柱为氨基酸分析专用 ODS 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 27 °C, 梯度洗脱, 检测波长为 360 nm。结果: 门冬氨酸与其它氨基酸组分基线分离良好, 在所试浓度(2.01~ 50.24) μg·mL⁻¹ 范围内与峰面积值呈良好的线性关系, 回归方程为 $Y = 7.5 \times 10^3 X - 1.3 \times 10^4$, $r^2 = 0.9999$ ($n = 5$); 平均回收率为 98.28%, RSD 为 1.85% ($n = 6$)。结论: 该法样品处理简单, 准确性高, 精密度好, 可用于芦笋中门冬氨酸的含量测定。

[关键词] 反相液相色谱法; 芦笋; 门冬氨酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)01-0008-03

芦笋俗称石刁柏、龙须菜。含有氨基酸、矿物质和其它多种营养元素, 也含有黄酮类等活性成分^[1], 关于氨基酸的含量测定方法, 文献已有不少报导^[2,3]。以往采用氨基酸自动分析仪测定, 但其价格贵, 成本高; 而柱前衍生 RP-HPLC 法测定氨基酸技术取得很大进步, 因 2,4-二硝基氟苯衍生法步骤简单, 反应速度快, 剩余试剂不干扰测定。我们以芦笋中氨基酸含量较高的门冬氨酸为对照品, 采用柱前衍生 RP-HPLC 法测定了芦笋药材中门冬氨酸含量, 并以此作为质量控制指标, 试验结果表明, 该法简便快速, 稳定可靠。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪, 日本岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪; SPD-10A 紫外检测器; N2000 色谱工作站; 氨基酸分析专用 ODS 柱; AB135-S 十万分之一电子天平; ADVENTURER(AR1140) 万分之一电子天平; 门冬氨酸对照品(供含量测定用), 由中国药品生物制品检定所提供; 芦笋药材, 购于安徽萧县市场(经安徽中医学院彭华胜博士鉴定为百合科植物芦笋 *Asparagus officinalis* L. 的嫩茎); 乙腈为色谱纯, 碳酸氢钠、磷酸二氢钾和 2,4-二硝基氟苯为分析纯; 乙酸钠为优级纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

系统适用性试验 色谱柱: 氨基酸分析专用 ODS 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 检测波长: 360 nm; 柱温: 27 °C, 流速: 1.2 mL·min⁻¹, 进样量为 20 μL。流动相: A 相为乙腈-水(50:50); B 相: 为取乙酸钠 8.2 g 加水约 1 800 mL, 用醋酸调 pH 至 6.4, 加 20 mL N-二甲基甲酰胺, 加水定容至 2 000 mL 配制而成的溶液; 梯度洗脱。A 相含量随时间变化: 12% (0~ 5 min), 12%~ 36% (5~ 10 min), 36%~ 65% (10~ 17 min), 65%~ 100% (17~ 28 min), 100% (28~ 30 min), 100%~ 12% (30~ 32 min), 12% (32~ 40 min)。

在此条件下芦笋供试品溶液的门冬氨酸峰与相邻峰达到基线分离。其保留时间为 9.073 min, 色谱柱理论板数按门冬氨酸峰计算为 10 678, 对照品与供试品的色谱图分别见图 1 和图 2。在 (200~ 400) nm 波长进行扫描对照品溶液, 门冬氨酸的最大吸收波长在 360 nm, 故选择 360 nm 为检测波长。

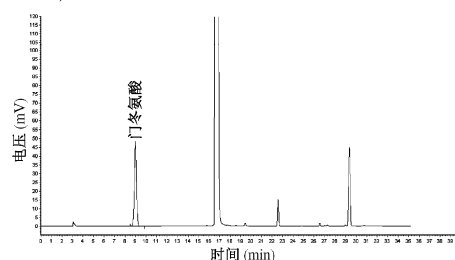


图 1 门冬氨酸的 HPLC 图谱

2.2 对照品溶液的制备 精密称取门冬氨酸对照品 25.12 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加水使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

[收稿日期] 2008-03-25

[通讯作者] * 李晓亮, Tel: (0551) 5399988

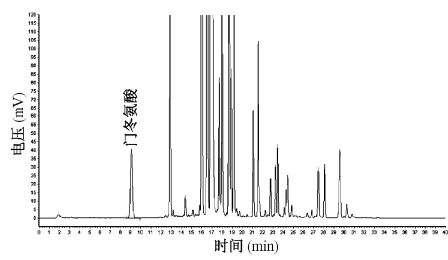


图 2 芦笋的 HPLC 图谱

2.3 提取条件的选择 为了考察提取溶媒、提取方法及提取时间对含量测定的影响,根据氨基酸的性质,选用甲醇、乙醇、水为提取溶媒,回流及超声 30 min,不同的提取方法进行比较,结果以水回流提取所测的含量值最高,于是选用水回流提取。再取 3 份样品,分别回流 30、40、50 min,发现回流 40 min 后含量无明显变化,故提取时间以 40 min 为宜。考虑到芦笋药材为鲜品,提取 1 次不完全,再取 3 份样品,分别回流 1 次、2 次、3 次,分别合并提取液,测定,发现回流 2 次后含量无明显变化,故提取加热回流 2 次为宜。

2.4 供试品溶液的制备 取芦笋药材适量切碎混匀,称取 8.0 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加水回流 2 次,每次分别加 50 mL 水回流 40 min,趁热同一滤纸滤过,合并滤液,蒸干,残渣加水溶解并转移至 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.5 衍生方法 精密量取 1.0 mL 对照品溶液(或样品溶液)置 10 mL 棕色容量瓶中,再加入衍生缓冲溶液 1.0 mL,混匀,加入 1.0 mL 衍生化溶液,用封口膜封口,放入 60 ℃ 水浴中,暗处反应 60 min,取出,冷却至室温,用平衡缓冲液稀释至刻度。静置 15 min,用 0.45 μm 微孔膜滤过,量取 20 μL 进样分析。

衍生缓冲溶液的配制方法:称取碳酸氢钠 4.2 g 加入至 100 mL 量瓶中,定容并摇匀,即得。

平衡缓冲溶液的配制方法:称取磷酸二氢钾 3.4 g 加入至 100 mL 量瓶中,加入 0.1 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液 145.5 mL,定容并摇匀后即得。

衍生化溶液的配制方法:取 100 mg 2,4-二硝基氟苯,加 10 mL 乙腈使其完全溶解即得。

2.6 标准曲线的制备及线性范围的考察 将门冬氨酸对照品溶液加流动相分别稀释 2、5、10、25、50 倍,制成一系列浓度的溶液,精密量取上述溶液 20 μL,按上述色谱条件依法测定峰面积值,实验数据经直线回归,得回归方程为 $Y=7.5 \times 10^3 X - 1.3 \times 10^4$, $r=0.999\ 9$ ($n=5$)。结果表明:门冬氨酸对照品在所试浓度(2.01~50.24) μg·mL⁻¹ 范围内与峰面积值

呈良好的线性关系。

2.7 精密度试验 精密量取同 1 供试品溶液,连续重复进样 6 次,按上述色谱条件测定门冬氨酸的峰面积积分值,结果经统计学处理,其相对标准偏差 RSD=0.71%,表明精密度较好。

2.8 重复性试验 取同 1 批号的样品 6 份,按上述色谱条件测定供试品中门冬氨酸的含量,结果经统计学处理,其 RSD=1.26%。实验表明重复性较好。

2.9 稳定性试验 量取同 1 供试品溶液,进样 20 μL,分别在配制后 0、2、4、6、8、10 h 依法测定,结果表明:供试品在所试的 10 h 内基本稳定,其 RSD=0.49%。

2.10 回收率试验 取同 1 批芦笋药材 6 份,切碎混匀并称取 4 g,精密称定,置圆底烧瓶中,分别在每份样品中加入门冬氨酸对照品 1 mL (浓度为:0.44 mg·mL⁻¹)。按上述色谱条件依法测定,同时取 1 组样品,测定其门冬氨酸的含量,作为对照样品含量,结果平均回收率为 98.28%,RSD=1.85%,实验表明:本法准确性较好。结果见表 1。

表 1 加样回收率试验

编号	取样量 (g)	已知含量 (mg)	加入量 (mg)	测得总量 (mg)	回收率 (%)
1	4.023 4	0.432 9	0.44	0.862 7	97.67
2	3.974 2	0.427 6	0.44	0.859 2	98.08
3	4.081 1	0.439 1	0.44	0.863 9	96.54
4	3.986 3	0.428 9	0.44	0.876 8	101.80
5	3.967 8	0.426 9	0.44	0.858 8	98.16
6	4.012 3	0.431 7	0.44	0.860 4	97.42

统计学处理 $\bar{x}=98.28$ RSD=1.85%

2.11 样品中门冬氨酸的含量测定 按供试品溶液制备项下的方法,制备供试品溶液,依法对 6 批药材进行门冬氨酸的含量测定,结果见表 2。

表 2 芦笋药材中门冬氨酸含量测定结果

批次	平均含量(mg·g ⁻¹)
071115	0.123 6
071117	0.106 7
071119	0.090 6
071201	0.105 0
071203	0.082 9
071205	0.091 5

3 小结与讨论

3.1 梯度洗脱条件 通过改变梯度洗脱的比例和

时间,使门冬氨酸与其它氨基酸分离开,且与相邻杂质峰基线分离,使其在较短时间内分析结束。

3.2 色谱柱 采用氨基酸分析专用 ODS 柱(Elite-AAK, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 比普通的 C₁₈ 分离更好, 且理论塔板数较高, 重复性好, 方法灵敏。

3.3 衍生条件 氨基酸大部分没有紫外或荧光响应, 采用 2,4-二硝基氟苯衍生试剂, 在一定条件氨基酸与其反应生成具有紫外吸收的二硝基氟苯氨基酸衍生物, 在 360 nm 波长下检测, 除去了试剂的干扰, 且剩余试剂也不干扰测定, 分析更准确。

3.4 衍生过程 应注意避光, 因为衍生物对光敏感, 所以在操作的过程中用棕色的量瓶进行衍生及样品的保存。

此法测定鲜芦笋中门冬氨酸含量快速、准确, 操

作简便, 成本低, 可用于芦笋或芦笋制品中的质量控制。

[参考文献]

- [1] 赵 静, 安利国, 张福森, 等. RP-HPLC 法测定芦笋中黄酮类化合物芦丁的含量[J]. 中国野生植物资源, 2007, 26(3): 61-63.
- [2] 付宜和, 杨国庆, 龚道芬, 等. 2,4-二硝基氟苯柱前衍生法测定复方氨基酸注射液 HPLC 色谱条件的优化[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(7): 762-764.
- [3] 王 棘, 战祥友, 滕艳坤, 等. DNFB 柱前衍生化 RP-HPLC 法测定安肽速的氨基酸含量[J]. 沈阳医科大学学报, 2003, 20(6): 428-430.