

· 化学与分析 ·

亲水作用色谱串联质谱法分析三七药材中游离氨基酸类成分

朱太雷¹, 郭盛², 唐志书^{1*}, 王明耿³, 李国龙¹, 杨洁¹, 钱大玮², 段金赓²
(1. 陕西中医学院中药资源产业协同创新中心, 陕西 咸阳 712046;
2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 南京 210023;
3. 山东步长制药有限公司, 山东 菏泽 274000)

[摘要] 目的:建立三七药材中游离氨基酸类成分的分析方法。方法:采用亲水作用色谱串联质谱测定三七药材中 22 种游离氨基酸, ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7μm), 流动相 A 含 5 mmol·L⁻¹ 甲酸胺、5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵和 0.15% 甲酸水溶液, B 含 1 mmol·L⁻¹ 甲酸铵、1 mmol·L⁻¹ 乙酸铵和 0.05% 甲酸乙腈溶液, 梯度洗脱 (0~6 min, 15%~20% A; 6~10 min, 20%~30% A; 10~11 min, 30%~46% A), 流速 0.4 mL·min⁻¹, 柱温 35℃; 串联质谱正离子多反应模式检测 (MRM)。结果:在 12 min 内 22 种氨基酸得到较好分离, 22 种氨基酸浓度与峰面积呈良好的线性关系, 相关系数 0.991 7~0.999 9, 回收率 93.7%~104.7%, 日内精密 1.13%~4.95%, 日间精密度 1.84%~5.62%, 10 批三七药材样品中 22 种游离氨基酸总含量在 4.72~5.96 mg·g⁻¹。结论:该方法简便、快速、灵敏, 适用于三七药材中氨基酸类成分的测定, 为三七药材全面质量控制方法的建立提供依据。

[关键词] 质量控制; 三七; 氨基酸; 亲水作用色谱; 串联质谱
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)05-0048-06
[doi] 10.11653/syfy2014050048
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131218.1420.020.html>
[网络出版时间] 2013-12-18 14:20

Hydrophilic Interaction UPLC Coupled with Tandem Mass Spectrometry
Analysis of Free Amino Acids in Notoginseng Radix et Rhizoma

ZHU Tai-lei¹, GUO Sheng², TANG Zhi-shu^{1*}, WANG Ming-geng³, LI Guo-long¹,
YANG Jie¹, QIAN Da-wei², DUAN Jin-ao²

(1. Joint Center for Resource and Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;
2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization,
Nanjing 210023, China; 3. Shandong Buchang Pharmaceutical Co. Ltd, Heze 274000, China)

[Abstract] Objective: To establish a quantitative method for the free amino acids in Notoginseng Radix et Rhizoma. Method: Hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry was used to determine the 22 amino acids in Notoginseng Radix et Rhizoma. An ACQUITY UPLC BEH amide column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) was applied for the separation of these amino acids with a gradient mobile phase consisting of solution A (water, 5 mmol·L⁻¹ ammonium formate, 5 mmol·L⁻¹ ammonium acetate and 0.15% formic acid) and solution B (acetonitrile, 1 mmol·L⁻¹ ammonium formate, 1 mmol·L⁻¹ ammonium acetate and 0.05% formic acid) at a flow rate of 0.4 mL·min⁻¹. The linear gradient conditions were as follows: 0-6 min, 15%-20% A;

[收稿日期] 20130901(005)
[基金项目] 国家十二五“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09401-308-037); 教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目(NCET-10-0931)
[第一作者] 朱太雷, 硕士研究生, 从事中药新剂型新工艺的应用研究, Tel:15891403118, E-mail: ztl139@126.com
[通讯作者] * 唐志书, 博士, 教授, 从事中药新剂型新工艺的应用研究, Tel:029-38183461, E-mail: tzs6565@163.com

6-10 min, 20% -30% A; 10-12 min, 30% -46% A. The column temperature was maintained at 35 °C. Multiple reaction mode detection (MRM) in positive ion mode was used in this assay. **Result:** Good separation of the 22 amino acids was obtained within 12 min. Good correlations were found between the investigated compounds concentrations and their peak areas within the test ranges with the correlation coefficient from 0.991 7 to 0.999 9. The average recoveries were from 93.7% to 104.7%. The overall intra-and inter-day variations (RSDs) based on the peak areas of the analyte were in the range of 1.13% -4.95% and 1.84% -5.62% respectively. The total content of 22 free amino acids in 10 batches samples of Notoginseng Radix et Rhizoma was from 4.72 mg·g⁻¹ to 5.96 mg·g⁻¹. **Conclusion:** The proposed method is simple, rapid, sensitive and suitable for the determination of amino acids in Notoginseng Radix et Rhizoma and could provide the basis for Notoginseng Radix et Rhizoma quality control.

[Key words] quality control; Notoginseng Radix et Rhizoma; amino acids; hydrophilic interaction chromatography; tandem mass spectrometry

三七为五加科人参属植物,是中国特有的名贵中药材。其味甘、微苦,性温,具有散瘀止血、消肿定痛的功效^[1]。现代研究显示,三七药材中的主要活性成分类型有三萜皂苷类、氨基酸类及多糖类等。2010年版《中国药典》只对其中三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 3个皂苷类成分进行含量测定,以控制其质量,而与三七药材止血功效相关的三七素等氨基酸类成分却没有列入质量控制范围^[2]。目前在氨基酸类成分研究中,一般均采用基于柱前或柱后衍生化方法进行测定,存在衍生化试剂不稳定、试剂干扰、耗时以及个别氨基酸衍生化困难等问题^[3-5]。在前期研究的基础上^[6-7],本文建立了一种基于亲水作用色谱串联质谱技术的三七药材中游离氨基酸组成的分析方法,在12 min内22种氨基酸得到很好的分离,以期阐明三七药材的功效物质基础、三七药材质量控制方法的完善、深度开发三七资源提供方法学参考。

1 材料

Waters ACQUITY UPLC 系统(包括四元泵溶剂系统,在线脱气机和自动进样器, Waters 公司), Xevo TQ 型检测器(Waters 公司), MassLynx™ 质谱工作站软件(Waters 公司), BT125D 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司), EPED 型超纯水系统(南京易普达易科技发展有限公司), KH-500DV 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司), Microfuge 22R 型台式微量冷冻离心机(美国贝克曼库尔特公司)。

三七素(Den, **1**, 批号 97H3207V), 色氨酸(Trp, **2**, 批号 DCDB8219V), 苯丙氨酸(Phe, **3**, 批号 CDBA7635V), 亮氨酸(Leu, **4**, 批号 MNHC5718V), 异亮氨酸(Ile, **5**, 批号 MNHD6429V), γ -氨基丁酸

(GABA, **6**, 批号 HBCE5732V), 甲硫氨酸(Met, **7**, 批号 BADF6521V), 缬氨酸(Val, **8**, 批号 NABD7805V), 脯氨酸(Pro, **9**, 批号 CBED7408V), 酪氨酸(Tyr, **10**, 批号 017H3019V), 丙氨酸(Ala, **11**, 批号 023M-7658V), 羧脯氨酸(Hpro, **12**, 批号 NECD6357V), 苏氨酸(Thr, **13**, 批号 DECA9012V), 谷氨酸(Glu, **14**, 批号 BCBD9029V), 谷氨酰胺(Gln, **15**, 批号 BCBC6452V), 丝氨酸(Ser, **16**, 批号 DEFB7906V), 天冬酰胺(Asn, **17**, 批号 021M5416V), 天冬氨酸(Asp, **18**, 批号 036H8901V), 瓜氨酸(Cit, **19**, 批号 FDEC6728V), 精氨酸(Arg, **20**, 批号 093M7904V), 组氨酸(His, **21**, 批号 BDCE6508V), 赖氨酸(Lys, **22**, 批号 CDFN3901V)均购自 Sigma 公司, 乙腈为色谱纯(德国默克公司), 去离子水自制, 其他化学试剂均为分析纯(上海国药化学试剂公司)。

三七药材由山东步长制药有限公司提供, 均在2012年9月采自云南省文山州砚山县, 为3年生, 由南京中医药大学段金廪教授鉴定为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (BurK.) F. H. Chen 的干燥根及根茎。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取干燥至恒重的各对照品适量, 加水制成浓度分别为 **1** (37.2 mg·L⁻¹), **2** (48.8 mg·L⁻¹), **3** (46.0 mg·L⁻¹), **4** (37.6 mg·L⁻¹), **5** (45.2 mg·L⁻¹), **6** (43.6 mg·L⁻¹), **7** (43.2 mg·L⁻¹), **8** (41.2 mg·L⁻¹), **9** (41.6 mg·L⁻¹), **10** (42.0 mg·L⁻¹), **11** (44.4 mg·L⁻¹), **12** (47.6 mg·L⁻¹), **13** (56.0 mg·L⁻¹), **14** (48.0 mg·L⁻¹), **15** (40.4 mg·L⁻¹), **16** (53.6 mg·L⁻¹), **17** (49.6 mg·L⁻¹), **18** (42.8 mg·L⁻¹), **19** (41.6 mg·L⁻¹) 和 **20** (88.8 mg·L⁻¹), **21** (46.4 mg·L⁻¹), **22** (40.8 mg·

L⁻¹)的混合对照品贮备液。取不同体积的上述贮备液加水稀释后,制成系列不同浓度的对照品溶液,用以线性关系考察。对照品溶液经 13 000 r·min⁻¹离心 10 min 后取上清液进样分析。所有的对照品溶液均在 4 ℃ 条件下贮藏。

2.2 供试品溶液制备 取三七药材粉末(40 目)约 0.5 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 25 mL 水,称定质量,室温超声(功率 50 kHz)提取 50 min 后,放冷,再称定质量,用水补足质量,摇匀,13 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液,0.22 μm 微孔滤膜滤过,4 ℃ 保存,待测。

2.3 色谱分析条件^[6] ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),流动相 A 含 5 mmol·L⁻¹ 甲酸胺、5 mmol·L⁻¹ 乙酸胺和 0.15% 甲酸水溶液, B 含 1 mmol·L⁻¹ 甲酸胺、1 mmol·L⁻¹ 乙酸胺和 0.05% 甲酸乙腈溶液,梯度洗脱(0~6 min,15%~20% A;6~10 min,20%~30% A;10~11 min,30%~46% A),流速 0.4 mL·min⁻¹,柱温 35 ℃。色谱图见图 1。

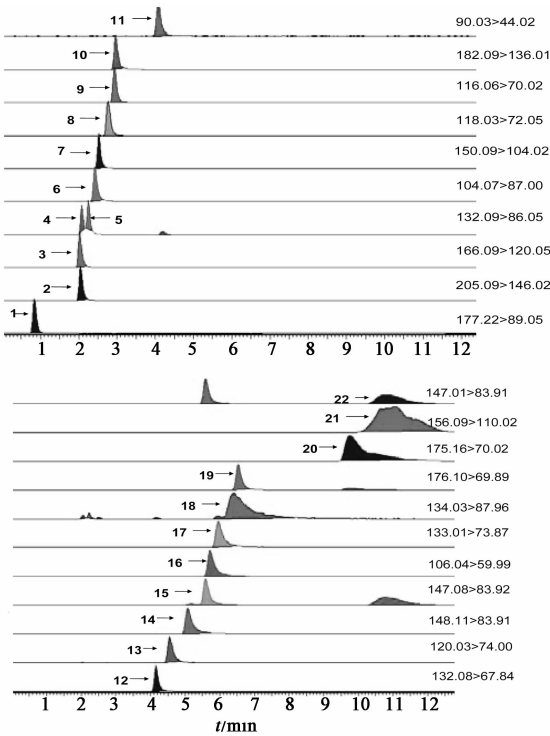


图1 氨基酸 UPLC-MS-MS(MRM) 色谱图

2.4 质谱检测条件 离子化模式为 ESI⁺,检测方式为多反应检测(MRM),毛细管电压 3.0 kV,离子源温度 150 ℃,脱溶剂气温度 550 ℃,脱溶剂气流量 1 000 L·h⁻¹,锥孔气流量 50 L·h⁻¹,碰撞气流量 0.15 mL·min⁻¹,取样锥孔电压及碰撞能量见表 1。

表 1 22 种氨基酸主要质谱检测参数

氨基酸	相对 分子量	检测离子对	锥孔 电压 /V	毛细管 电压 /eV	出峰 时间 /min
三七素	176	177.22>89.05	32.0	6.0	0.84
色氨酸	204	205.09>146.02	16.0	18.0	2.05
苯丙氨酸	165	166.09>120.05	18.0	14.0	2.05
亮氨酸	131	132.09>86.05	16.0	10.0	2.09
异亮氨酸	131	132.09>86.05	16.0	10.0	2.26
γ-氨基丁酸	103	104.07>87.00	16.0	10.0	2.44
甲硫氨酸	149	150.09>104.02	14.0	10.0	2.54
缬氨酸	117	118.03>72.05	12.0	10.0	2.78
脯氨酸	115	116.06>70.02	20.0	10.0	2.96
酪氨酸	181	182.09>136.01	16.0	16.0	2.97
丙氨酸	89	90.03>44.02	16.0	10.0	4.11
羟脯氨酸	131	132.08>67.84	18.0	16.0	4.20
苏氨酸	119	120.03>74.00	38.0	20.0	4.50
谷氨酸	147	148.11>83.91	12.0	14.0	5.04
谷氨酰胺	146	147.08>83.92	8.0	16.0	5.53
丝氨酸	105	106.04>59.99	14.0	8.0	5.68
天冬酰胺	132	133.01>73.87	12.0	14.0	5.92
天冬氨酸	133	134.03>87.96	12.0	14.0	6.29
瓜氨酸	175	176.10>69.89	16.0	20.0	6.45
精氨酸	174	175.16>70.02	22.0	18.0	9.75
组氨酸	155	156.09>110.02	20.0	16.0	10.97
赖氨酸	146	147.01>83.91	14.0	14.0	11.09

2.5 标准曲线的绘制 取混合对照品溶液稀释成不同浓度的混合对照品溶液,分别注入 UPLC 测定,记录色谱图,以每种氨基酸质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归分析。结果见表 2。

2.6 精密度试验 取 2.1 项下混合对照品溶液,在上述色谱条件下分别在 1 日内重复进样 6 次和在连续 3 日内重复进样 6 次,计算 RSD 评价日内及日间精密度,结果见表 3。

2.7 重复性试验 按照 2.2 项下供试品溶液制备方法,取同批号 130522-06 样品制成供试品溶液(平行 6 份),在上述仪器条件下进样分析,以样品中各成分含量的 RSD 来评价其稳定性。见表 3。

2.8 稳定性试验 取重复性试验中批号为 130522-06 样品供试品溶液,分别于 0,4,8,12,24,48 h 时注入液相色谱仪,以各成分峰面积 RSD 考察其稳定性。结果见表 3,22 种氨基酸在 48 h 内稳定性良好。

2.9 回收率试验 取已知含量批号为 130522-09

表 2 22 种氨基酸线性回归方程

氨基酸	回归方程	R^2	线性范围/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	最低定量限/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
三七素	$Y = 10\,873X - 761.68$	0.999 7	0.372 ~ 37.2	1.16
色氨酸	$Y = 21\,140X + 2\,512.4$	0.999 8	0.048 8 ~ 48.8	4.08
苯丙氨酸	$Y = 67\,980X + 39\,950$	0.997 2	0.046 0 ~ 46.0	2.26
亮氨酸	$Y = 41\,305X + 29\,610$	0.995 4	0.037 6 ~ 37.6	7.59
异亮氨酸	$Y = 52\,529X + 14\,914$	0.999 2	0.045 2 ~ 45.2	8.16
γ -氨基丁酸	$Y = 62\,760X + 52\,906$	0.994 4	0.043 6 ~ 43.6	0.68
甲硫氨酸	$Y = 16\,655X + 1\,223$	0.999 8	0.043 2 ~ 43.2	3.78
缬氨酸	$Y = 66\,698X + 7\,073.7$	0.999 7	0.041 2 ~ 41.2	28.80
脯氨酸	$Y = 101\,533X + 69\,052$	0.995 7	0.041 6 ~ 41.6	1.83
酪氨酸	$Y = 9\,986.9X + 254.61$	0.999 9	0.042 0 ~ 42.0	25.63
丙氨酸	$Y = 8\,617.7X + 1\,279$	0.999 5	0.088 8 ~ 44.4	94.40
羟脯氨酸	$Y = 12\,889X - 2\,394.7$	0.999 6	0.047 6 ~ 47.6	6.41
苏氨酸	$Y = 427.09X + 27.443$	0.991 7	0.560 ~ 56.0	294.00
谷氨酸	$Y = 11\,437X - 3\,354.7$	0.999 3	0.048 0 ~ 48.0	147.21
谷氨酰胺	$Y = 15\,388X - 5\,527.8$	0.999 3	0.040 4 ~ 40.4	21.90
丝氨酸	$Y = 7\,482.7X + 252.21$	0.999 5	0.053 6 ~ 53.6	131.56
天冬酰胺	$Y = 6\,067.5X + 672.43$	0.999 6	0.496 ~ 49.6	247.50
天冬氨酸	$Y = 2\,302.5X + 968.95$	0.996 5	0.085 6 ~ 42.8	244.80
瓜氨酸	$Y = 12\,977X - 2\,863.7$	0.999 4	0.041 6 ~ 41.6	17.75
精氨酸	$Y = 56\,263X - 72\,894$	0.992 7	0.177 6 ~ 88.8	153.73
组氨酸	$Y = 15\,656X + 467.61$	0.999 8	0.464 ~ 46.4	212.86
赖氨酸	$Y = 22\,513X - 7\,431.5$	0.996 1	0.081 6 ~ 40.8	190.45

的样品约 0.25 g,平行 6 份,按样品中各成分的含量,分别加入等量相应的对照品溶液,按 2.2 项下供试品溶液制备方法制备供试品溶液,按 2.3 项下方法测定,计算其回收率,结果见表 3。

2.10 样品测定 按照 2.2 项下制备供试品溶液,精密吸取各批次供试品溶液 1 μL ,注入 UPLC 测定,按外标法计算三七药材中 22 种游离氨基酸的含量。10 批三七药材中 22 种游离氨基酸类成分测定结果见表 4。

从表中可知 10 批样品总氨基酸含量在 4.72 ~ 5.96 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,其中以 1301522-09 号样品最高,1301522-10 号样品最低;精氨酸平均含量高达 2.03 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,占总氨基酸含量的 38.3%;三七素平均含量为 0.41 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,占总氨基酸含量的 7.72%;人体必需氨基酸(Trp,Phe,Leu,Ile,Met,Val,Thr 和 Lys)平均含量为 0.063 5 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,占氨基酸总量的 1.19%,其中以赖氨酸含量最高,蛋氨酸含量最低; γ -氨基丁酸含量为 0.45 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,占总氨基酸含量的 8.45%,羟脯氨酸占总氨基酸的 0.13%。

3 讨论

采用单变量法,分别对提取方法(加热回流提取、超声提取)、提取溶剂(水、20% 甲醇和 50% 甲醇)、提取溶剂用量(10,25,50 mL)和提取时间(30,50,90 min)等因素进行了考察,以获得最佳的提取效率。结果显示超声提取与加热回流提取对目标化合物的提取率无显著影响;水较其他提取溶剂可获得较高的提取效率;提取时间考察结果显示提取 50 min 时提取效率达到最高,之后随提取时间延长,提取得率无显著差异;提取溶剂用量考察结果显示,以固液比为 1:50 时提取效率可达最大,且提取液浓度适宜于 UPLC-MS-MS 分析。综上,最终选择提取条件为 25 mL 水超声(功率 50 kHz)提取 50 min。

参考文献^[6-7]首先对不同型号的亲水色谱柱进行了比较,结果显示 ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μm)较 ACQUITY UPLC BEH HILIC 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μm)对氨基酸类化合物有较强的保留及分离效能。流动相考察结果显示 pH 为影响色谱分离及峰形的

表 3 精密度、重复性、稳定性和回收率试验 ($n=6$)

%

氨基酸	精密度 (RSD)		重复性 (RSD)	稳定性 (RSD)	回收率	
	日内	日间			回收率	RSD
三七素	1. 62	3. 01	2. 76	3. 64	95. 7	6. 33
色氨酸	1. 57	2. 89	4. 18	2. 93	95. 4	4. 33
苯丙氨酸	2. 45	3. 49	3. 78	2. 54	101. 7	2. 48
亮氨酸	3. 93	4. 12	4. 28	4. 42	96. 8	5. 46
异亮氨酸	2. 36	3. 51	1. 37	2. 39	97. 3	3. 12
(-氨基丁酸	2. 44	3. 25	2. 40	4. 02	94. 6	4. 49
甲硫氨酸	2. 74	3. 65	4. 50	4. 20	96. 9	3. 85
缬氨酸	1. 64	2. 89	4. 07	5. 27	97. 6	5. 03
脯氨酸	2. 66	3. 52	4. 05	3. 74	93. 7	4. 68
酪氨酸	4. 40	4. 81	3. 33	3. 51	96. 3	4. 16
丙氨酸	3. 02	3. 15	4. 45	4. 05	94. 8	4. 29
羟脯氨酸	3. 36	3. 65	2. 68	4. 91	96. 8	4. 40
苏氨酸	3. 82	4. 12	2. 27	3. 65	94. 8	4. 16
谷氨酸	1. 13	1. 84	3. 73	3. 74	93. 7	4. 37
谷氨酰胺	2. 67	3. 49	4. 09	3. 85	103. 2	5. 46
丝氨酸	3. 03	3. 61	3. 57	3. 74	97. 7	4. 26
天冬酰胺	1. 95	3. 11	1. 08	1. 01	104. 7	2. 48
天冬氨酸	2. 03	3. 49	1. 64	3. 29	94. 5	2. 71
瓜氨酸	1. 59	2. 12	3. 77	3. 51	93. 8	3. 65
精氨酸	4. 61	4. 84	2. 75	2. 24	95. 7	2. 99
组氨酸	4. 95	5. 62	5. 79	5. 84	95. 4	6. 33
赖氨酸	1. 60	3. 12	2. 59	3. 62	95. 4	4. 35

表 4 三七药材氨基酸分析测定

$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

样品批号	氨基酸含量																						Total
	1	2 *	3 *	4 *	5 *	6	7 *	8 *	9	10	11	12	13 *	14	15	16	17	18	19	20	21	22 *	
1301522-01	427.9	47.07	62.74	97.88	27.16	396.8	—	47.98	231.6	66.32	259.4	6.804	38.80	123.2	428.8	99.87	254.3	423.7	29.88	2073	273.2	118.9	5 536
1301522-02	416.1	56.22	72.77	115.1	39.87	498.1	—	56.38	219.1	72.11	301.4	6.537	25.68	115.8	363.3	116.2	158.6	303.1	21.80	2423	208.6	134.9	5 725
1301522-03	395.9	64.65	79.81	114.5	30.98	441.1	—	53.67	128.1	70.12	313.8	6.633	30.64	72.1	1360.4	94.14	210.1	118.9	17.22	2044	223.0	127.0	4 997
1301522-04	443.4	62.54	80.32	127.7	42.00	501.4	—	60.34	218.8	69.98	346.1	6.978	38.79	102.9	351.3	108.8	201.6	214.3	37.18	2267	264.8	136.9	5 683
1301522-05	410.3	45.24	70.34	115.5	26.74	376.4	2.140	51.22	227.1	62.52	273.5	6.949	22.33	120.5	361.8	86.15	149.0	376.1	19.67	1929	240.2	136.8	5 109
1301522-06	447.8	61.46	79.21	113.8	26.84	484.0	—	57.60	191.7	67.39	318.2	6.943	31.33	128.7	386.8	99.73	195.4	184.8	23.67	2106	241.1	155.6	5 408
1301522-07	424.0	43.05	70.15	108.3	27.62	411.6	—	52.44	197.3	55.07	247.8	6.254	24.02	107.6	439.3	149.7	197.3	357.9	18.83	1829	145.6	119.3	5 033
1301522-08	375.2	72.39	71.95	80.97	41.78	384.5	—	51.62	175.0	51.11	239.1	6.681	32.10	97.6	60360.5	94.34	200.2	330.8	16.44	2019	99.08	106.5	4 907
1301522-09	422.8	118.6	127.8	164.5	23.99	599.5	4.831	74.12	199.1	92.24	364.8	7.328	63.37	88.18	416.4	448.9	124.2	534.4	53.45	1929	232.8	165.7	5 957
1301522-10	365.4	48.98	72.43	117.4	31.61	390.4	—	49.34	186.0	69.20	248.4	6.055	30.00	102.1	404.1	97.20	166.3	395.3	23.04	1716	97.13	100.1	4 716

注：“*”所示为必需氨基酸，“—”所示为低于定量限。

主要因素。高 pH 时,色谱保留性能较好,但峰形较差,多数色谱峰存在拖尾现象;低 pH 时,色谱峰形较好,但保留性能较差。综合评价后确定选择甲酸-甲酰胺-乙酸铵缓冲系统,并对其组成比例进行了优化,最终确认以含 5 mmol·L⁻¹ 甲酸胺、5 mmol·L⁻¹

乙酸铵和 0. 15% 甲酸水溶液作为水相,含 1 mmol·L⁻¹ 甲酸铵、1 mmol·L⁻¹ 乙酸铵和 0. 05% 甲酸乙腈溶液作为有机相较为适宜。

参考文献^[6-7] 本实验首先比较正、负离子模式下各目标化合物的响应强度,结果显示在 ESI⁺ 模式

下三七素及其他测定化合物均可呈现稳定的准分子离子 $[M+H]^+$,且响应强度多大于ESI⁻模式。因此本实验选择在ESI⁺模式下,应用IntelliStart功能自动采集用于MRM测试的离子碎片及最佳锥孔电压和碰撞能量。经优化后的质谱检测参数见表2。

三七药材中不仅含有皂苷类有效成分,同时含多种游离氨基酸,这些氨基酸对其功效的发挥起到至关重要的作用。三七中游离氨基酸成分以精氨酸最丰富,与文献^[8,9]报道相一致,精氨酸作为半必需氨基酸,缺乏精氨酸会导致血氨过高影响机体正常的生长和发育^[10];三七素作为三七中特殊的氨基酸类成分,也是三七止血功效的主要活性成分^[11];γ-氨基丁酸和羟脯氨酸是首次从三七中检出的2个非蛋白氨基酸,其中γ-氨基丁酸具有降低血压、抗焦虑、预防和治疗癫痫、促进睡眠,增强记忆力、解毒等作用^[12]。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:11.

[2] 鲍建才, 刘刚, 丛登立, 等. 三七的化学成分研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(2):246.

[3] 黄松, 王杰, 丁捷, 等. 三七中十八种游离氨基酸的柱前衍生化-HPLC法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2011, 42(1):54.

[4] 欧金秀, 谷陟欣, 张妮瑜, 等. 柱前衍生 HPLC 同时测定驴胶补血颗粒中 6 种水解氨基酸[J]. 中国实验

方剂学杂志, 2012, 18(16):93.

[5] 武文, 李卓明, 苏冀彦, 等. 鹿茸柱前衍生化高效液相指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(9):58.

[6] Zhou Guisheng, Pang Hanqing, Tang Yuping, et al. Hydrophilic interaction ultra-performance liquid chromatography coupled with triple-quadrupole tandem mass spectrometry for highly rapid and sensitive analysis of underivatized amino acids in functional foods [J]. Amino Acids, 2013(44):1293.

[7] Wang Hanqing, Duan Jiniao, Guo Sheng, et al. Development and validation of a hydrophilic interaction Ultra-high-performance liquid chromatography with triple quadrupole MS/MS method for the absolute and relative quantification of amino acids in *Sophora alopecuroides* L. [J]. J Separation Sci, 2013, 36(14):2244.

[8] 陈中坚, 孙玉琴, 董婷霞, 等. 不同产地三七的氨基酸含量比较[J]. 中药材, 2003, 26(2):86.

[9] 李聪, 张红, 马衡, 等. 三七中氨基酸的分析[J]. 氨基酸杂志, 1992(4):45.

[10] 刘兆金, 印遇龙, 邓敦, 等. 精氨酸生理营养研究[J]. 氨基酸与生物资源, 2005, 27(4):54.

[11] 鲍建才, 刘刚, 邓友兰, 等. 三七的化学成分研究进展[J]. 人参研究, 2004(2):10.

[12] 杨胜远, 陆兆新, 吕凤霞, 等. γ-氨基丁酸的生理功能和研究开发进展[J]. 食品科学, 2005, 26(9):546.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国中药杂志》2014 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于1955年7月,是创刊最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平,主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、研究院所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊,128页,2014年定价每期30元,全年24期定价为720元。国内刊号11-2272/R,国际刊号1101-5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公,如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 www. cjcm. com. cn 或 www. 中国中药杂志. com。

联系电话:稿件查询 010-64045830 转 602;主任电话 010-64058556;资源与栽培栏编辑:010-64048925;制剂栏编辑:010-64040392;化学栏编辑:010-64040113;药理栏编辑:010-84022522;临床栏编辑:010-64059766;电子杂志制作发行及网上维护:010-64030625。