

DOI:10.16305/j.1007-1334.2016.08.027

蒙药材家猪心中氨基酸含量测定

于牡丹¹, 高文军¹, 肖云峰², 王玉华^{1,2}

1. 内蒙古医科大学药学院(内蒙古 呼和浩特 010110); 2. 天津中医药大学(天津 300193)

【摘要】 目的 建立家猪心脏组织中 17 种氨基酸的含量测定方法。**方法** 用氨基酸分析仪测定家猪心脏组织中 17 种氨基酸的含量(茚三酮柱后衍生化)。**结果** 在实验的浓度范围内, 17 种氨基酸线性方程的相关系数(r)均大于 0.999 0。甘氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、精氨酸的平均加样回收率($n=6$)分别为 99.0%、99.6%、101.7%、97.9%, RSD 均小于 2.0%。**结论** 该方法简便、准确, 可用于测定家猪心脏组织中氨基酸的含量。

【关键词】 家猪心; 氨基酸; 含量测定

Determination of amino acids in swine heart from mongolian medicine

YU Mu-dan¹, GAO Wen-jun¹, XIAO Yun-feng², WANG Yu-hua^{1,2}

1. School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University(Hohhot, Inner Mongolia, 010110); 2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine(Tianjin, 300193)

Abstract: Objective To determine the content of the 17 types of amino acids in the swine heart tissue. **Methods** 17 types of amino acids in the cardiac tissue of swine were detected by the amino acid analyzer with ninhydrin post-column derivatization. **Results** The correlation coefficient (r) of linear equation of these 17 types of amino acid were all above 0.9990 within the range of concentration. The average recoveries of glycine, tyrosine, phenylalanine and arginine were 99.0%, 99.6%, 101.7% and 97.9% ($n=6$), respectively, and RSD were all less than 2%. **Conclusion** The method was simple and reliable that can be used to determine the content of amino acid in the swine heart tissue.

Keywords: swine heart; amino acids; content determination

蒙医临床治疗“心赫依”病的方剂中常有动物心脏入药^[1-4]。但是,使用动物心脏的来源不确定,常用的有牦牛心、黄牛心、兔心、家猪心。为了研究不同动物心脏入药的差异,需要对不同来源的动物心脏进行对比研究,包括药理药效、化学成分等。本文利用氨基酸分析仪采用茚三酮柱后衍生化法^[5]对家猪心的氨基酸含量测定方法进行了研究,并对 3 批供试品的含量进行了测定。本文的研究是以上整体研究内容的组成部分。

1 材料

1.1 药材与试剂 家猪心冻干粉(内蒙古医科大学药学院制备,批号:20140419、20140308、20140227)。

17 种氨基酸混合标准溶液[原装 H 型氨基酸标准溶液,批号:6006001,包括天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、丝氨酸(Ser)、精氨酸(Arg)、甘氨酸(Gly)、苏氨酸(Thr)、脯氨酸(Pro)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、蛋

氨酸(Met)、酪氨酸(Tyr)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe)、组氨酸(His)、赖氨酸(Lys)的浓度均为 2.5 mmol/L;胱氨酸(Cys)的浓度为 1.25 mmol/L],均购自 SYKAM 公司。

17 种氨基酸的固体对照品,均购自中国食品药品检定研究院。

缓冲液 A(柠檬酸三钠、氢氧化钠、柠檬酸、乙醇、盐酸和辛酸组成, pH 值 3.45, 当量浓度 0.12)、缓冲液 B(柠檬酸三钠、氢氧化钠、硼酸、盐酸和辛酸组成, pH 值 10.85, 当量浓度 0.20)、再生液(氢氧化钠、硼酸和 EDTA 组成, 当量浓度 0.50)、样品稀释液(柠檬酸三钠、氢氧化钠、柠檬酸、盐酸和辛酸组成, pH 值 2.20, 当量浓度 0.12)、钾钠缓冲溶液、茚三酮、抗坏血酸,以上试剂均购自捷盛依科技发展有限公司。

甲醇为色谱纯;水为超纯水;盐酸为优级纯;所用其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 S-433D 氨基酸分析仪,德国 Sykam 公司;JA5003N 型电子分析天平,上海菁海仪器有限公司;AB135-S 型电子分析天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;HX-12D 型氮吹仪,凯特欧净化设备制造有限公司。

1.3 溶液的配制

1.3.1 茚三酮衍生溶液的配制 称取苯酚约 2 g、茚

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81360678)

[作者简介] 于牡丹,女,硕士生,主要从事中蒙药材及方剂药效物质基础与质量控制的研究工作

[通讯作者] 王玉华,教授,博士生导师。

E-mail: yuhua wang59@163.com

三酮约 20 g,用 600 ml 甲醇溶解,用有机系滤膜(0.45 μm)滤过,将滤液置于茚三酮试剂瓶中,再加入 400 ml 钾钠缓冲溶液(pH=5.51),氮气吹 5 min 后,加入 0.2 g 抗坏血酸,再氮气吹 5 min 后,将氮气通入茚三酮溶液中密封 10 h(气压约 0.5 bar)后,即得。

1.3.2 清洗液的配制 配制 20 % 的甲醇水溶液,即得。

1.3.3 供试品溶液的制备 称取家猪心冻干粉约 100 mg,精密称定,置于 20 ml 厌氧水解管中(以下简称水解管),精密加入 10 ml 的 6 mol/L HCl(含 0.1 % 的苯酚),放入冰水浴中放置 10 min,氮气吹 2 min。停止氮气后立即盖好软塞,密封,将水解管置于 110 ℃ 恒温烘箱中水解 22 h。水解完成后,冷却,摇匀,精密量取 0.5 ml 水解液置 10 ml 玻璃试管中,于 45 ℃ 条件下氮气吹至近干,再精密加入 5 ml 样品稀释液,涡旋,混匀,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 LCA KO/Na 氨基酸色谱专用柱(4.6 mm×150 mm,7 μm,10 % 交联);流动相 A、B、C 分别为缓冲液 A、缓冲液 B、再生液,流速为 0.45 ml/min,梯度洗脱过程见表 1;茚三酮溶液为衍生液,衍生泵流速 0.25 ml/min,茚三酮溶液运行时间为 0~43 min,用清洗液来冲洗反应器;柱温进行梯度控温,控温过程见表 2;衍生化反应器温度为 130 ℃;检测波长为 440 nm、570 nm;进样量为 10 μl。

表 1 流动相梯度洗脱程序

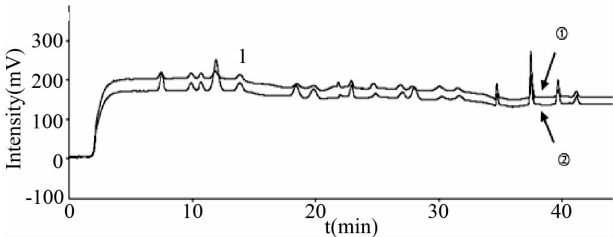
时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)	流动相 C(%)
0	100	0	0
3.50	100	0	0
11.00	85	15	0
17.00	80	20	0
23.50	67	33	0
26.00	20	80	0
28.00	20	80	0
29.00	0	100	0
42.00	0	100	0
42.01	0	0	100
45.00	0	0	100
45.01	100	0	0
57.10	100	0	0
57.20	100	0	0

表 2 柱温程序

时间(min)	温度(℃)
0.0	58.0
21.0	58.0
26.0	74.0
46.0	74.0
50.0	58.0
57.0	58.0

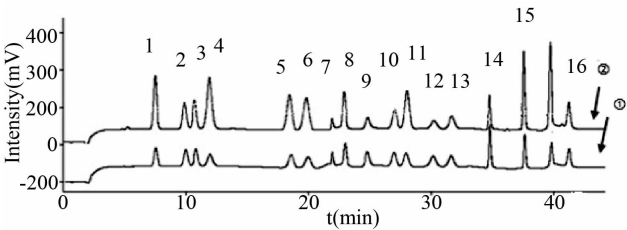
2.2 色谱峰归属研究 本次实验在 440 nm 处记录的色谱图见图 1。图 1 结果显示,对氨基酸检出的峰信号弱且检出氨基酸数目少(1 为脯氨酸峰)。图 2 结果显示,在 570 nm 处氨基酸检出信号强度大,检出数目多;除脯氨酸之外的 16 种氨基酸均可以被检出,并由氨基酸混合标准溶液色谱图对相应氨基酸作出定位。

本实验在 440 nm 处对脯氨酸进行定量测定;在 570 nm 处对其余 16 种氨基酸进行测定。



注:①为混合标准溶液;②为供试品溶液(1. Pro)

图 1 供试品溶液与混合标准溶液色谱图(440 nm)



注:①为混合标准溶液;②为供试品溶液(1. Asp、2. Thr、3. Ser、4. Glu、5. Gly、6. Ala、7. Cys、8. Val、9. Met、10. Ile、11. Leu、12. Tyr、13. Phe、14. His、15. Lys、16. Arg)

图 2 供试品溶液与混合标准溶液色谱图(570 nm)

3 方法学考察^[6-9]

3.1 标准曲线的绘制 精密量取 17 种氨基酸混合标准溶液 0.1、0.2、0.3、0.5、0.8、1.0、2.0 ml,置 5 ml 量瓶中,用盐酸(0.02 mol/L)溶液稀释至刻度,混匀,即得。精密吸取上述系列浓度溶液各 10 μl,分别注入色谱仪,记录各浓度溶液的色谱图。以各氨基酸峰面积积分值(Y)为纵坐标,以相应氨基酸浓度(X;mg/L)为横坐标作图。试验结果显示,17 种氨基酸在各自浓度范围内与相应峰面积积分值呈良好的线性关系,相关系数(r)均大于 0.999 0。见表 3。

3.2 精密度试验 取同一供试品(批号:20140419)按“1.3.3”项下方法制备溶液,连续进样 6 次,进样量为 10 μl,记录峰面积。结果显示,17 种氨基酸峰面积的 RSD 在 0.68%~2.0% 之间,表明仪器精密度好。

3.3 稳定性试验 取同一供试品(批号:20140419)按“1.3.3”项下方法制备溶液,分别在 1、3、6、9、12、15 h 进样,记录峰面积。结果显示,17 种氨基酸峰面积的 RSD 在 0.59%~2.0% 之间,表明供试品溶液在 15 h 内稳定性好。

3.4 重复性试验 取同一批号供试品(批号:20140419)平行精密称取 6 份,按“1.3.3”项下方法制备

表 3 17 种氨基酸的回归方程及相关系数

氨基酸	回归方程	<i>r</i>	氨基酸	回归方程	<i>r</i>
ASP	Y =88.67X -1.71	0.999 6	PHE	Y =72.95X -12.25	0.999 7
THR	Y =101.13X +8.53	0.999 6	LEU	Y =94.67X -71.22	0.999 6
SER	Y =117.49X +19.52	0.999 6	TYR	Y =66.36X +42.39	0.999 2
GLU	Y =85.54X -19.11	0.999 6	ILE	Y =95.18X -90.06	0.999 5
ALA	Y =135.42X -42.11	0.999 6	PRO	Y =21.13X -15.59	0.999 5
GLY	Y =163.10X -0.56	0.999 5	LYS	Y =87.90X +26.49	0.999 0
VAL	Y =104.49X -70.02	0.999 3	ARG	Y =69.56X -166.98	0.999 2
CYS	Y =59.03X +44.26	0.999 2	HIS	Y =75.40X +618.72	0.999 2
MET	Y =82.84X +12.15	0.999 2			

溶液,每份进样 2 次,记录峰面积。结果显示,测定结果的 RSD 值在 0.6% ~3.0% 之间,表明本方法的重复性好。见表 4。

3.5 加样回收率试验 取同一批已知含量的供试品(批号:20140419)约 50 mg,共 6 份,精密称定,分别精确加入精氨酸、酪氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸对照品适量。按“1.3.3”项下方法制备 4 种氨基酸的加样回收率溶液,进行测定。结果表明,精氨酸、酪氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸的加样回收率分别为 97.9%、99.6%、99.0%、101.7%,RSD 值在 1.48% ~2.0% 之间,表明本方法的准确度好。见表 5 ~表 8。

4 供试品测定

取 3 批供试品(批号:20140419、20140308、20140227),每批平行 2 份,按“1.3.3”项下方法制备溶液,记录峰面积。结果表明,3 批供试品的氨基酸的含量差异不明显。见表 9。

表 4 17 种氨基酸的重复性试验结果

氨基酸	平均含量(%)	RSD(%)
GLY	3.32	2.28
TYR	2.25	1.30
PHE	2.99	2.42
ARG	3.89	1.79
ASP	6.08	1.94
ALA	4.08	2.23
CYS	0.83	2.63
VAL	3.49	2.37
MET	1.65	2.61
ILE	2.91	1.88
LEU	5.86	2.20
THR	3.02	2.30
SER	2.72	2.24
HIS	1.85	2.59
LYS	5.25	2.29
GLU	9.82	2.00
PRO	2.68	0.60

表 5 精氨酸加样回收率试验结果

供试品取样量(mg)	对照品加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
50.33	1.866	3.728	99.4	97.9	1.48
50.18	1.938	3.744	96.8		
50.74	1.924	3.773	97.9		
50.63	1.914	3.771	98.6		
50.27	1.917	3.773	99.2		
50.56	1.928	3.728	95.7		

表 6 酪氨酸加样回收率试验结果

供试品取样量(mg)	对照品加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
50.33	1.061	2.135	100.8	99.6	1.57
50.18	1.069	2.131	99.9		
50.74	1.074	2.118	97.2		
50.63	1.075	2.131	98.6		
50.27	1.065	2.146	101.5		
50.56	1.064	2.130	99.6		

表 7 甘氨酸加样回收率试验结果

供试品取样(mg)	对照品加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
50.33	1.699	3.305	97.9	99.0	1.76
50.18	1.641	3.315	102.3		
50.74	1.639	3.271	98.5		
50.63	1.663	3.270	97.3		
50.27	1.651	3.277	99.1		
50.56	1.680	3.309	98.8		

表 8 苯丙氨酸加样回收率试验结果

供试品取样量(mg)	对照品加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
50.33	1.354	2.705	100.2	101.7	1.80
50.18	1.350	2.737	103.2		
50.74	1.371	2.718	99.2		
50.63	1.382	2.794	104.1		
50.27	1.363	2.736	102.0		
50.56	1.346	2.720	101.5		

表 9 不同批次家猪心冻干粉中 17 种氨基酸测定结果

氨基酸	20140419(%)	20140308(%)	20140227(%)
GLY	3.26	3.22	3.23
TYR	2.11	2.10	2.08
PHE	2.68	2.62	2.61
ARG	3.72	3.75	3.73
ASP	6.23	6.21	6.17
ALA	4.18	4.16	4.19
CYS	0.85	0.84	0.85
VAL	3.56	3.51	3.48
MET	1.57	1.52	1.54
ILE	2.77	2.80	2.78
LEU	5.89	5.88	5.86
THR	3.04	3.05	2.99
SER	2.69	2.71	2.75
HIS	1.97	2.00	1.97
LYS	5.30	5.32	5.33
GLU	10.24	10.17	10.19
PRO	2.53	2.55	2.57

5 讨论

5.1 水解温度对氨基酸测定的影响 为使家猪心冻干粉中结合的氨基酸尽可能游离出来,本实验考察了温度对水解程度的影响。结果显示,当水解温度逐渐升高时,回收率呈上升趋势,当水解温度达到 110 ℃ 时,水解程度较完全,继续升高水解温度水解程度反而开始降低,可能是由于温度太高破坏氨基酸的内部结构。故本实验的水解温度确定为 110 ℃。酸水解氨基酸是一种常用的方法,多数氨基酸在酸性条件下均较稳定,但色氨酸在酸性条件下会被破坏,故在实验过程中未检测到色氨酸。

5.2 从氨基酸角度研究家猪心入药的意义 从本实验含量测定结果可知,蒙药材家猪心中含有 17 种常见的游离氨基酸,其中包含 7 种人体必需氨基酸(赖氨

酸、缬氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸),2 种人体半必需氨基酸(精氨酸、组氨酸),占总家猪心总量的 31% 左右。由此可见,蒙药材家猪心中氨基酸种类齐全、含量丰富,具有很高的入药价值。另据文献报道,甘氨酸^[10]、酪氨酸、苯丙氨酸^[11]、精氨酸^[12]等与心血管系统健康密切相关,具有降压、降低胆固醇、改善心功能和保护心脏等作用。本实验从氨基酸角度为家猪心入药治疗心血管系统疾病提供了理论依据。

参考文献:

[1] 内蒙古自治区卫生厅. 内蒙古蒙成药标准[S]. 赤峰:内蒙古科学技术出版社,1984:401.

[2] 内蒙古自治区卫生厅. 内蒙古蒙药材标准[S]. 赤峰:内蒙古科学技术出版社,1986: 460-478.

[3] 吉格木德丹金扎木苏. 通瓦嘎吉德[M]. 敖特根毕力格,段·官布扎布,仁庆稍,译. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,1999:178.

[4] 伊希巴拉珠尔. 甘露点滴[M]. 章巴拉沙努朝·贡布却诺,译. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,1998:365.

[5] 吴华,林琼芳,黄鸿,等. 茛三酮柱后衍生化氨基酸分析仪测定桑叶中痕量草甘膦[J]. 农药,2009,48(8):593-594.

[6] 任国萍,田璐,李铮,等. 板蓝根药材中氨基酸含量测定研究[J]. 中国新药杂志,2014,23(1):99-104.

[7] 苏建坤. 清开灵注射液氨基酸类成分含量测定方法研究[D]. 北京:北京中医药大学,2013.

[8] 莫润宏,汤富彬,丁明,等. 氨基酸分析法测定竹笋中游离氨基酸[J]. 化学通报,2012,75(12):1126-1131.

[9] 赵东升,马晓丽,李新霞,等. 柱前衍生-高效液相色谱法同时测定可食用葱属植物中 18 种游离氨基酸含量[J]. 药物分析杂志,2013,33(6):963-968.

[10] 周琼,陆大祥,付咏梅,等. 甘氨酸对小鼠心肌缺血性损伤的防治作用研究[J]. 中国病理生理杂志,2002,18(4):360-362.

[11] 丁红梅,葛尔宁,许家栋. 高效毛细管电泳测定中药地龙中氨基酸含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(2):117-120.

[12] 韩静,赵有玺,刘雪翠,等. 精氨酸在心血管疾病中的作用[J]. 氨基酸和生物资源,2003,25(4):66-68.