

文章编号:1000-582X(2009)11-1357-06

板蓝根及其制剂中精氨酸和脯氨酸的 配位毛细管电泳检测

王毓嘉^{a,b}, 勾 茜^a, 夏之宁^{a,b}

(重庆大学 a. 生物工程学院; b. 化学化工学院, 重庆 400030)

摘 要:以配位作用毛细管电泳为手段,采用非衍生直接紫外吸收检测,对板蓝根注射液中各组分进行分析。考察运行缓冲液的浓度和酸度、运行电压、进样时间以及毛细管内径等因素对分离和检测的影响。在优化条件下,即运行缓冲液为 30 mmol/L CuSO₄ 水溶液, pH=3.26, 分离电压 22 kV, 位差进样 40 s, 毛细管内径 50.0 μm, 检测波长 254 nm, 对其中含量最多的 2 种氨基酸——精氨酸和脯氨酸进行定量分析。分别考察其线性范围、检测限以及重现性。结果测得板蓝根注射液中精氨酸的含量为 0.63 mmol/L, 脯氨酸的含量为 25.7 mmol/L。并在相同的优化条件下,对天然产物板蓝根提取物进行分析。结果测得其中精氨酸的质量分数为 0.027, 脯氨酸的质量分数为 0.054。

关键词:毛细管电泳;配位作用;氨基酸;板蓝根

中图分类号:O657.8

文献标志码:A

Coordination interaction capillary electrophoresis detection of arginine and proline in radix isatidis and its injection

WANG Yu-jia^{a,b}, GOU Qian^a, XIA Zhi-ning^{a,b}

(a. College of Bioengineering; b. College of Chemistry and Chemical Engineering,
Chongqing University, Chongqing 400030, P. R. China)

Abstract: The separation of primary amino acids in Radix Isatidis and its injection is performed by coordination interaction capillary electrophoresis with non-derivative direct UV detection. This study investigates the effect of concentration of Cu²⁺ and acidity of electrophoretic running buffer, separation voltage, injection time and the internal diameter of the capillary on separation and detection. Under the optimal operation condition, the two amino acids are qualitatively and quantitatively analyzed and its liner range, detection limit and reproducibility are investigated respectively. The results show that the content of arginine is 0.63 mmol/L and the content of proline is 25.7 mmol/L in the Radix Isatidis Injection. Under the same condition, the components of Radix Isatidis extracts are separated by the presented method. The mass fraction of arginine is 0.027 and the mass fraction of proline is 0.054.

Key words: capillary electrophoresis; coordination interaction; amino acids; Radix Isatidis

收稿日期:2009-06-25

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20775096)

作者简介:王毓嘉(1977-),女,重庆大学博士研究生,主要从事毛细管电泳研究。

夏之宁(联系人),男,重庆大学教授,博士生导师,(E-mail)chem_lab_cqu@yahoo.com.cn。

氨基酸是蛋白质的基本组成单位,也是维系生物有机体新陈代谢等过程的基本物质。氨基酸的分析检测是生命科学研究中最重要的技术之一。建立简便、快捷、准确、灵敏的氨基酸分析方法,对蛋白质化学、临床医学以及食品分析等有着十分重要的意义。

氨基酸分析技术中最常用的是色谱技术^[1]和电迁移技术。其中毛细管电泳(Capillary Electrophoresis, CE)技术因其样品用量少、高效以及生物兼容性好等特点而得到了广泛应用^[2-4]。因为大多数氨基酸不含芳香环等生色团,无紫外吸收及荧光发射特性,若要采用 CE 的经典检测方式(直接的紫外吸收检测或荧光发射检测),通常需要将氨基酸衍生为具有紫外吸收^[5]或较强荧光的化合物^[6]。然而,衍生过程复杂费时,也不利于可靠数据的获得。目前,对非衍生化氨基酸的检测可分为直接检测和间接检测。直接检测方式,如电化学检测^[7],灵敏度较高,但其电极易被污染、背景干扰大,影响数据的可靠性;示差折光检测^[8],由于其光程较短而检测灵敏度不高。氨基酸的间接吸收检测^[9]以及间接化学发光检测^[10]通常需要使用背景试剂,这可能给运行介质带来不利影响,削弱分离能力。质谱检测^[11]的定性和定量能力很强,但由于价格昂贵而不能普及。

无芳香环的氨基酸本身不具备紫外吸收,但其分子中含有的 N、O 杂原子能与过渡金属离子发生较强的配位作用,从而产生吸收紫外光的电子跃迁,使非衍生化氨基酸的直接紫外吸收检测成为可能。如 Cu^{2+} 的最大紫外吸收峰在 230 nm 处,与不同的氨基酸发生配位作用后,将发生 18~24 nm 的红移,使得氨基酸与 Cu^{2+} 形成的配位化合物在 254 nm 左右产生电荷迁移吸收带^[12]。这种电荷迁移的摩尔吸光系数 ϵ 通常大于 $10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$,灵敏度足够大且适合于进行定量分析。因此,在缓冲液中加入一定浓度的 Cu^{2+} ,利用配位毛细管电泳(Coordination Interaction Capillary Electrophoresis, CICE)方法^[13],不仅能够实现复杂体系中各组分的分离,且能够不进行衍生直接检出氨基酸(尤其是不含芳香团的氨基酸),实现氨基酸高灵敏度的直接紫外检测。

笔者以成分复杂的板蓝根中的氨基酸分析为例,用直接紫外吸收检测方式对板蓝根注射液及板蓝根提取物中含量最多的 2 种氨基酸——精氨酸和脯氨酸进行定量检测,并对此方法在无需衍生处理

下,背景干扰情况、检测灵敏度及其机理进行讨论。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

自组装毛细管电泳系统(包括高压可调电源 0~30 kV、190~900 nm UV/Vis 分光光度检测系统合 PMT 探测器);数据采集和处理:HW-2003 色谱工作站(南京千谱软件有限公司);未涂层熔融石英毛细管(河北永年锐洋色谱器件有限公司),毛细管内径分别为 50.0、75.0 μm ,总长均为 65.0 cm,有效长度 57.0 cm。

板蓝根注射液(武汉健民药业集团十堰康迪制药有限公司),板蓝根(重庆市桐君阁大药房),L-精氨酸(L-Arg),L-脯氨酸(L-Pro)(纯度大于 99.5%,北京鼎国生物技术有限责任公司),无水硫酸铜(AR,重庆化学试剂总厂),实验用水为二次蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

板蓝根提取液的制备:板蓝根粉末 0.5 g,加 40%乙醇水溶液 40 mL 超声提取 30 min,过滤,滤渣连同滤纸以 40%乙醇 3 次洗涤,合并于滤液中,用 40%乙醇定容至 100 mL 容量瓶中,取 10 mL 挥干,用蒸馏水溶解定容至 10 mL,待用。

初次电泳前,先用 100 mmol/L NaOH 溶液冲洗毛细管 10 min,再用蒸馏水冲洗 5 min,毛细管柱用 50 mmol/L CuSO_4 水溶液预平衡 30 min。采用阳极端手动位差进样方式,进样高度 17.0 cm(进样速度约为 0.025 cm/s),检测波长设置为 254 nm。每次进样前用缓冲液冲洗 2~3 min,每运行 3 次换一次贮液瓶中的缓冲液,以确保较好的重现性。毛细管处于室温(25 $^{\circ}\text{C}$)。运行介质为 CuSO_4 的水溶液,并通过加入适量的醋酸(HAc)来调节 pH 值。

2 结果与讨论

2.1 电泳条件的优化

2.1.1 Cu^{2+} 浓度的考察

Cu^{2+} 被加入到毛细管电泳的运行介质中,它的浓度将影响到各组分间的分离以及检测的灵敏度。图 1 为相同电泳条件下, Cu^{2+} 的浓度对分离及检测的影响。由于试样成分复杂,笔者没有采用分离度来表达分离效果,而采用出峰数目表达分离效果。

以精氨酸峰高来考察检测灵敏度。

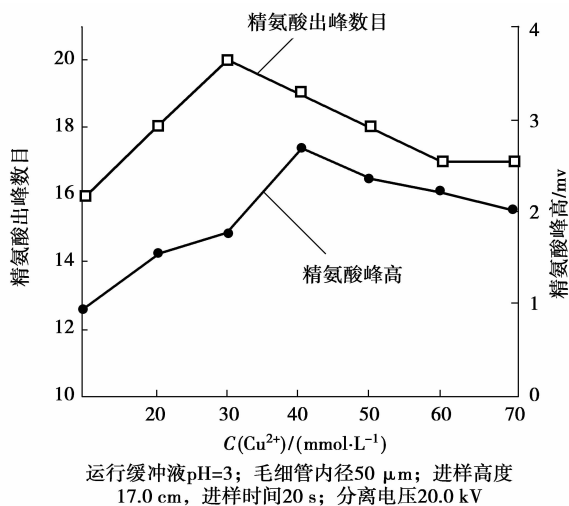


图 1 Cu^{2+} 浓度对分离及检测的影响

从图 1 中可看出,随着 Cu^{2+} 浓度的增大,分离效果得到很大的改善,出峰数目增加,而增加到一定数目后,再增大 Cu^{2+} 浓度,出峰数目反而有所减少。推测其原因是在低浓度范围内,随着 Cu^{2+} 浓度的增大,配位作用增强,组分间的淌度差异增大,出峰数目增多;当配位作用达到饱和后,再增加 Cu^{2+} 浓度,不能继续增大组分间的淌度差异,且由于离子强度增大,分离度有所下降,出峰数目也随之减少。

由于氨基酸与 Cu^{2+} 生成的配合物在 254 nm 处的紫外吸收比 Cu^{2+} 的吸收强,配位作用的程度也将影响其检测灵敏度。从图 1 可以看出, Cu^{2+} 浓度达到饱和前,配合物浓度随 Cu^{2+} 浓度增大而增大,所以检测到的精氨酸峰增高。当 Cu^{2+} 浓度过高时,配位作用达到饱和,配合物浓度不再增加,同时背景吸收影响增大,检测峰相对降低。为了使各组分既能得到有效分离,又具有较高检测灵敏度,选择 Cu^{2+} 浓度为 30 mmol/L。

2.1.2 酸度的考察

在毛细管电泳中,运行介质酸度的控制,影响到电渗流的大小,从而影响分离效果。尤其是在 Cu^{2+} 存在下, Cu^{2+} 浓度越高,水解生成 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 越明显,在这种形式下的 $\text{Cu}(\text{II})$ 配位能力很弱。而且,还可能析出 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 沉淀,造成电泳体系的不稳定。在这样的高 Cu^{2+} 浓度下,更需要控制 CE 运行介质的酸度。这里采用 HAc 来调节酸度,考察不同 pH 值条件下对分离和检测的影响。

研究发现,随着 HAc 量的增加,pH 值下降,出峰数目增加(图 2)。这可能是由于 Cu^{2+} 水解受抑制的程度增加,配位能力增强,出峰数目也增加。

但 Cu^{2+} 水解已经完全被抑制后,再增大 HAc 的量,出峰数目基本保持不变,甚至由于 EOF(电渗流)减小,电泳时间延长,各组分峰展宽严重而使分离度下降,出峰数目迅速减少。另外, Ac^- 与 Cu^{2+} 也有一定配位作用,形成的配合物比 Cu^{2+} 吸收强,随着 HAc 浓度的增大, $\text{Cu}^{2+}-\text{Ac}^-$ 配合物浓度增大,背景吸收增强,S/N(信噪比)降低。因此在满足分离要求的情况下,应尽量降低 HAc 的含量,以保证运行介质有足够大的电渗流,以及较小的背景吸收。优化选择运行介质的 pH 值为 3.26,以丙酮作为电渗流标记物,其迁移时间为 35.40 min。

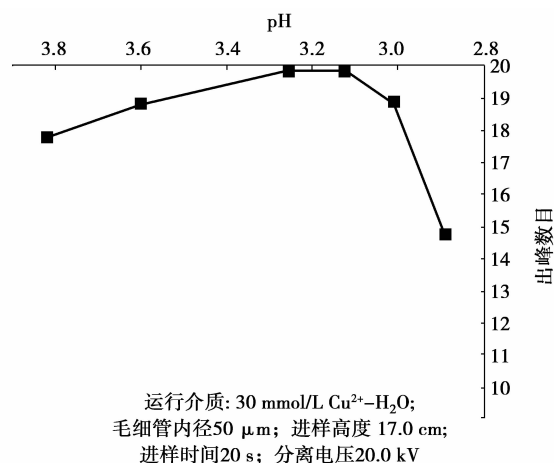


图 2 运行介质 pH 值对出峰数目的影响

2.1.3 运行电压的考察

运行电压对分离的柱效、分离度和迁移时间等方面都有影响。笔者考察了 15.0~28.0 kV 电压范围内样品的分离检测情况。实验结果表明,电压在 15.0~22.0 kV,电流-电压满足线性关系,随着电压的增加,柱效增加。当电压大于 22.0 kV 时,由于焦耳热的影响,使流体温度径向分布明显,电流-电压偏离线性范围,分离度下降。优化选择 22.0 kV 作为分离电压。

2.1.4 进样时间的考察

采用位差进样。在恒定进样高度 17.0 cm 下,考察了进样时间为 5~50 s 的进样量对分离检测的影响。结果发现,随着进样时间的延长,出峰时间缩短,检测峰高度及面积也呈增大趋势,而且相对误差较小。当进样时间超过 40 s 时,峰高和峰面积增加的幅度下降,区带展宽趋于明显,峰拖尾较严重,分离度较小。可能是由于样品柱过长而造成样品各组分出现重叠所致。考虑到信噪比与分离效果,选择进样时间为 40 s。

2.1.5 毛细管内径的考察

研究内径分别为 75.0 μm 和 50.0 μm 的毛细管对 CICE 的影响。结果表明,采用内径为 75.0 μm 的毛细管时,吸收光程较大,灵敏度较高。但同时,由于采用内径较大毛细管,样品组纵向扩散程度也较大,有效塔板数变小。另外,在高离子强度的运行介质中,产生的热量不易散失,毛细管温度升高,增加了组分的扩散。这 2 种情况都会使各组分的分离度下降。而采用内径为 50.0 μm 的毛细管时,虽然响应信号较小,但由于纵向扩散较小,有效塔板数

较大,且散热面积增大,更易散热,所以能够得到更好的分离效果。

2.2 定性分析及含量测定

2.2.1 2 种氨基酸的定量分析

分别配制一系列浓度为 0.05~31.25 mmol/L 的精氨酸和脯氨酸标准溶液($n=5$)。在优化电泳条件下,以氨基酸峰面积和浓度建立工作曲线,得到线性回归方程,考察线性范围、检测限以及重现性,峰高的相对标准偏差($n=5$)均小于 3%。各定量分析结果见表 1。

表 1 2 种氨基酸的定量分析结果

分析物	回归方程 $y=ax+b$ ¹⁾	相关系数 r	线性范围/ (mmol·L ⁻¹)	检测限 ²⁾ /(mmol·L ⁻¹)	相对标准 偏差($n=5$)/%
精氨酸	$y=27.3\times 10^4x-13.7$	0.999 4	0.60~15.0	5.0×10^{-4}	1.6
脯氨酸	$y=17.7\times 10^5x+0.625$	0.999 7	0.43~27.0	3.0×10^{-4}	2.4

1) y 和 x 分别代表峰高和氨基酸浓度;2)检测限定义为信噪比为 3 时的氨基酸浓度。

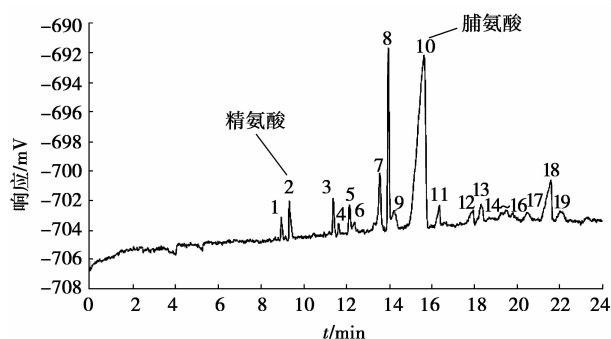
虽然该方法对这 2 种氨基酸——精氨酸和脯氨酸的检测限均在 10^{-7} mol/L 的数量级,所达到的检测灵敏度仍然不够理想。特别是与电化学检测(10^{-8} ~ 10^{-9} mol/L)和激光诱导荧光检测(10^{-10} mol/L 甚至更低)相比,差距仍很大。造成这种差距的原因有 2 个方面,一是紫外检测方式的灵敏度本来就欠缺;二是与开展研究的自组装仪器相关。当然, 10^{-7} mol/L 水平的检测限,还是能够与紫外直接检测非衍生化氨基酸的灵敏度相比拟的。

2.2.2 板蓝根注射液中 2 种氨基酸的定性及定量分析

在优化条件下,即运行缓冲液为 30 mmol/L CuSO_4 水溶液, $\text{pH}=3.26$, 分离电压 22 kV, 位差进样 40 s, 毛细管内径 50.0 μm , 检测波长 254 nm, 板蓝根注射液电泳谱图见图 3, 精氨酸和脯氨酸的分离度 $R=14.8$ 。根据 CICE 的原理可知, 电泳谱图中的峰主要是本身有紫外吸收的组分以及含有 N、O 等杂原子的化合物, 组分出峰顺序与组分同 Cu^{2+} 的配位能力有关。采用内标法, 在 1 mL 板蓝根注射液中分别加入 20 mmol/L 的精氨酸和脯氨酸各 200 μL , 对比前后电泳谱图, 确定图 3 中的峰 2 为精氨酸, 峰 10 为脯氨酸。计算得脯氨酸的含量为 25.7 mmol/L, 精氨酸的含量为 0.63 mmol/L。分别在 5 个样品中加入 20 mmol/L 的氨基酸标准品,

进行加标回收率实验, 平均回收率分别为精氨酸 100.3%, 脯氨酸 98.7%。

图 3 中, 峰 10 较宽。为了考察该峰纯度, 配制脯氨酸标准溶液 20 mmol/L, 在相同的电泳条件下, 得到的峰型与图 3 中的峰 10 一致, 可能是由于脯氨酸本身性质引起的电泳谱带展宽而并不是该峰包含多个组分。



运行缓冲液 30 mmol/L Cu^{2+} - H_2O ; $\text{pH}=3.26$;
毛细管内径 50 μm ; 进样高度 17.0 cm; 进样时间 40 s;
分离电压 22.0 kV

图 3 板蓝根注射液的毛细管电泳谱图

采用非过渡金属 Mg^{2+} 在相同的电泳条件下对板蓝根注射液进行毛细管电泳分析, 见图 4。板蓝根注射液中很多组分未被分离开, 并且无法检测到没有紫外吸收的组分。另采用非过渡金属 Mg^{2+} 在

相同的电泳条件下对 2 种氨基酸的标品混合溶液进行检测,无法检测到峰,认为 Mg^{2+} 与板蓝根注射液中的氨基酸没有发生作用。这一实验研究证明,当使用 Cu^{2+} 的溶液作为电泳介质时,2 种氨基酸才能相互分离,而分离的机理是由于这 2 种氨基酸与 Cu^{2+} 的配位作用的能力不同。

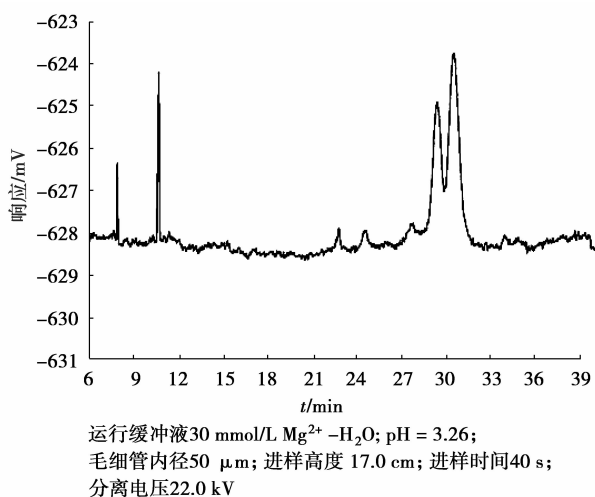


图 4 $MgCl_2$ 溶液作为缓冲液时的板蓝根注射液毛细管电泳谱图

2.2.3 板蓝根提取物中 2 种氨基酸的定性及定量分析

在相同的电泳条件下,即运行缓冲液为 30 mmol/L $CuSO_4$ 水溶液, pH = 3.26, 分离电压 22 kV, 位差进样 40 s, 毛细管内径 50.0 μ m, 检测波长 254 nm, 对板蓝根提取物进行分析, 并采用内标法, 在 1 mL 板蓝根提取物中分别加入 20 mmol/L 的精氨酸和脯氨酸各 200 μ L, 对比前后电泳谱图, 确定图 5 中的峰 2 为精氨酸, 峰 11 为脯氨酸, 精氨酸和脯氨酸的分离度 $R=10.25$ 。计算得精氨酸的含量为 0.76 mmol/L, 脯氨酸的含量为 2.39 mmol/L。则在 0.5 g 板蓝根粉末中含有精氨酸 0.013 g, 精氨酸的质量分数为 0.027; 含有脯氨酸 0.027 g, 脯氨酸的质量分数为 0.054。分别在 5 个样品中加入 20 mmol/L 的氨基酸标准品, 进行加标回收率实验, 平均回收率分别为精氨酸 98.1%, 脯氨酸 98.4%。精氨酸的含量与文献值^[14]基本相符, 脯氨酸的含量稍高。2 种氨基酸的平均加标回收率与文献值^[14]基本相符。引起差异的原因是多方面的, 既可能是实验方法、仪器及条件造成的, 也可能是板蓝根的产地不同引起的, 或是脯氨酸自身性质引起的电泳谱带展宽而造成计算含量偏高。

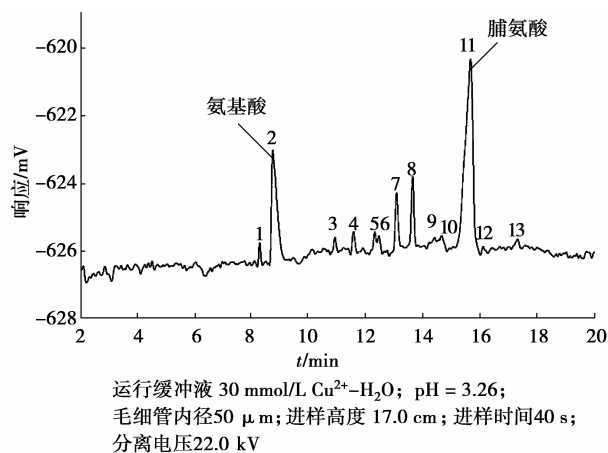


图 5 板蓝根提取物的毛细管电泳谱图

3 结 语

利用过渡金属离子 Cu^{2+} 作为配位中心离子, 可以对成分复杂的板蓝根注射液和板蓝根提取物进行 CICE 分析。对板蓝根中所含的 2 种主要氨基酸进行直接紫外检测, 不需要进行繁琐的氨基酸衍生, 可有效避免衍生试剂的干扰。而且由于在 CICE 中, 活化后的毛细管壁带负电, 与 Cu^{2+} 发生静电作用, 且管壁上的硅羟基氧原子能与 Cu^{2+} 发生较弱的配位作用, 使 Cu^{2+} 吸附于管壁, 管壁所带负电荷减少, EOF 受到一定程度的抑制。所以采用 CICE 不需要对毛细管进行改性以增大检测时间窗口、提高峰容量。CICE 操作较简单, 是一种快速、简便, 适合于中药提取液与中药注射液等复杂体系中氨基酸的分离分析方法。

参考文献:

- [1] GIOIA M G, ANDREATTA P, BOSCHETTI S. Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of branched-chain amino acids in new dosage forms [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, 45(3): 456-464.
- [2] LADAROLA P, FERRARI F, FUMAGALLI M. Determination of amino acids by micellar EKC: Recent advances in method development and novel applications to different matrices [J]. Electrophoresis, 2008, 29(1): 224-236.
- [3] MOSINA A G, MELNIKOVA I O, NAZIMOV I V, et al. Capillary electrophoresis on unmodified genetically coded amino acids [J]. Journal of Analytical Chemistry, 2009, 64(6): 637-641.

- [4] 丁永胜, 牟世芬. 氨基酸的分析方法及其应用进展[J]. 色谱, 2004, 22(3):210-215.
DING YONG-SHENG, MOU SHI-FEN. Development of analytical methods for amino acids and their applications[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2004, 22(3):210-215.
- [5] ZHANG L Y, SUN M X. Capillary electrophoresis of phosphorylated amino acids with fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography B, 2007, 859(1):30-36.
- [6] 李志明, 何巧红, 陈恒武. 表面活性剂对 NBD-Cl 衍生氨基酸的荧光增敏和芯片电泳分离的影响[J]. 分析化学, 2008, 36(7):967.
LI ZHI-MING, HE QIAO-HONG, CHEN HENG-WU. Effect of surfactants on detection and separation of 4-Cl-7-nitrobenzofurazan derived amino-acids by chip-based capillary electrophoresis[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2008, 36(7):967.
- [7] INNOCENZO G C, MICHELA C. Isocratic ion chromatographic determination of underivatized amino acids by electrochemical detection [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 478(2):179-189.
- [8] IVANOV A R, NAZIMOV I V, LOBAZOV A P, et al. Direct determination of amino acids and carbohydrates by high-performance capillary electrophoresis with refractometric detection [J]. Journal of Chromatography A, 2000, 894 (1/2): 253-257.
- [9] 付国妮, 何友昭, 王晓葵, 等. 采用隔离池的毛细管电泳: 间接紫外吸收法测定茶叶中的氨基酸[J]. 色谱, 2007, 25(2):193-196.
FU GUO-NI, HE YOU-ZHAO, WANG XIAO-KUI, et al. Determination of amino acids in tea Samples by capillary electrophoresis with partition cell and indirect ultraviolet detection [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2007, 25(2):193-196.
- [10] ZHU L Y, TU C H, LEE H K. On-line concentration of acidic compounds by anion-selective exhaustive injection-sweeping-micellar electrokinetic chromatography [J]. Analytical Chemistry, 2002, 74 (22): 5820-5825.
- [11] 储艳秋, 潘婷婷, 戴兆云, 等. 谷胱甘肽与 D 型氨基酸非共价复合物的质谱[J]. 物理化学学报, 2008, 24(11): 1981-1987.
CHU YAN-QIU, PAN TING-TING, DAI ZHAO-YUN, et al. Probing non-covalent complexes of glutathione with D-amino acids by mass spectrometry [J]. Acta Physico-Chimica Sinica, 2008, 24(11):1981-1987.
- [12] 林秀丽, 主沉浮, 邹时复. 铜-氨基酸络合物的紫外光谱性质及其应用: 络合物组成及稳定常数的测定[J]. 分析化学, 1996, 24(2):175-179.
LIN XIU-LI, ZHU CHEN-FU, ZHOU SHI-FU. Ultraviolet-spectral properties of copper (II): Amino acid complexes and determination of their composition and stability constants [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 1996, 24(2):175-179.
- [13] 魏为力, 陈志涛, 石开云, 等. 配位作用毛细管电泳方法研究[J]. 分析化学, 2006, 34(9):1219-1222.
WEI WEI-LI, CHEN ZHI-TAO, SHI KAI-YUN, et al. Novel capillary electrophoresis technique based on coordination interaction [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006, 34(9):1219-1222.
- [14] 万绍晖, 杨浩, 耿秀梅. 柱前衍生化反相高效液相色谱法测定板蓝根中的氨基酸[J]. 色谱, 2005, 23(4): 408-410.
WAN SHAO-HUI, YANG HAO, GENG XIU-MEI. Determination of amino acids in isatis indigotica fort by reversed-phase high performance liquid chromatography with pre-column derivatization [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2005, 23(4):408-410.

(编辑 张 苹)