

高效液相色谱法鉴别及测定中药吴茱萸中的生物胺

孙艳妮 张宁 王翠玲 刘竹兰 王征 刘建利*

(西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室,西北大学生命科学学院,西安 710069)

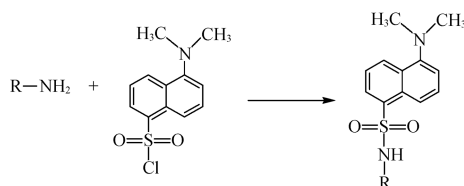
摘要 建立了高效液相色谱法(HPLC)测定中药吴茱萸中生物胺的方法。以丹磺酰氯为柱前衍生试剂,采用岛津高效液相色谱仪(LC-10A),色谱柱 SHIMADZU-C₁₈(150 mm × 4.6 mm × 5 μm)进行测定,确定了最佳色谱条件:乙腈和水为流动相,梯度洗脱,DAD 检测器,检测波长为 334 nm,流速为 0.8 mL/min,柱温 30 °C,进样量 20 μL。10 种常见生物胺在 45 min 内得到良好的分离,在给定的浓度范围内,各生物胺呈现良好的线性相关($R^2 > 0.999$),精密度 RSD < 2%,回收率在 91.87% ~ 101.35% 之间,重现性 RSD < 8%。结果表明,吴茱萸叶中含有 7 种生物胺,枝中含有 4 种,果中含有 5 种。这是首次发现在中药吴茱萸中存在生物胺类成分。

关键词 生物胺; 吴茱萸; 衍生化分析; 高效液相色谱

1 引言

吴茱萸是芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实^[1],始载于《神农本草经》,列为中品。具有散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻之功效,临床常用于治疗厥阴头痛、寒疝腹痛、寒湿脚气、经行腹痛、腕腹胀痛、呕吐吞酸、五更泄泻等。现代药理研究表明,吴茱萸具有舒张血管、降压、强心、止泻、收缩子宫、杀虫、抗炎镇痛、抗菌等活性^[2,3]。吴茱萸属植物化学成分共计约 240 多种,其主要分为生物碱、香豆素、黄酮、萜类、酰胺等。生物碱类成分共计有 104 种,其中喹诺酮类 59 种、吲哚类 36 种、异喹啉类 7 和其它 2 种^[4]。从生源关系分析吲哚类 36 种生物碱中至少有 17 种是由色胺衍生的,即此类成分在植物体内是由色胺和非色胺部分反应生成的。因此,在吴茱萸中色胺的存在是很有可能,可能因为含量小而未被鉴别出来。同时,其它生物胺类成分也可能存在。生物胺根据其结构可分为 3 类:脂肪族,包括腐胺、尸胺、精胺、亚精胺等,它们是生物活性细胞必不可少的组成部分,在调节核酸与蛋白质的合成及生物膜稳定性方面起着重要作用;芳香族,包括酪胺、苯乙胺等;杂环胺,包括组胺、色胺等^[5]。也可根据胺基数目分为单胺和多胺两类。单胺主要有酪胺、组胺、腐胺、尸胺、苯乙胺、色胺等。一定量的单胺类化合物对血管和肌肉有明显的舒张和收缩作用,对精神活动和大脑皮层有重要的调节作用;多胺主要包括精胺和亚精胺,其在生物体的生长过程中能促进 DNA、RNA 和蛋白质的合成,加速生物体的生长发育。微量生物胺是生物体(包括人体)内的正常活性成分,在生物细胞中具有重要的生理功能。生物胺类成分活性很强,它们的存在也应该对吴茱萸的作用有贡献,因此很有必要搞清楚它们存在的种类和含量。

由于大部分生物胺既没有紫外吸收又无荧光,因此目前对生物胺的研究主要是进行衍生化后分析。生物胺的衍生试剂主要有丹磺酰氯(Dansyl-chloride)^[6]、4-二甲胺基苯基偶氮苯磺酰(Dabsyl chloride)^[7]、2-Chloroethylnitrosourea 等^[8]。丹磺酰氯应用最为普遍,生物胺的丹磺酰氯衍生物较为稳定,并同时具有荧光特性和特异的紫外吸收,既可以用荧光检测,也可以用紫外检测^[9],生物胺与丹磺酰氯的反应式如下:



HPLC 是检测生物胺的常用方法,简单有效。为此,本研究以丹磺酰氯为衍生试剂,衍生化色谱法鉴别和测定吴茱萸中的生物胺类成分。本研究在样品的前处理过程中采用液-液萃取步骤对样品进行纯化和富集,适用于测定成分复杂,生物胺含量更低的样品。本方法具有通用性广、灵敏度高、测定结果准确、稳定性好等优点。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

岛津高效液相色谱仪(LC-10A),配备二极管阵列检测器;SHIMADZU- C_{18} 色谱柱(150 mm × 4.6 mm × 5 μm);Milli Q Biocel 超纯水机(美国 Milli-Poreco 公司);移液枪(德国 Eppendorf 公司);粉碎机(黄骅市中兴仪器有限公司);SHA-C 恒温振荡器(国华企业);Anke TDL-40B 离心机(Anke 公司),Filter Unit 滤膜(0.45 μm)。

乙腈(色谱纯);丙酮、三氯乙酸、 $HClO_4$ 、丹磺酰氯(分析纯);甲胺,色胺,苯乙胺,腐胺,尸胺,组胺,5-羟色胺,酪胺,亚精胺,精胺,均购于 Aladdin 公司。实验用水为超纯水,

吴茱萸样品:果、叶、枝采自西安植物园,经西安植物园张莹鉴定。

2.2 色谱条件

SHIMADZU- C_{18} 色谱柱(150 mm × 4.6 mm × 5 μm);检测波长:334 nm;流速:0.8 mL/min;进样量:20 μL;柱温:30 °C。流动相:水(A)-乙腈(B),采用梯度洗脱:0~7 min,45%~50% B;7~25 min,50%~90% B;25~35 min,90% B;35~40 min,90%~45% B;40~45 min,45% B。

2.3 标准溶液的配制

生物胺混合标准储备液:准确称取 10 种生物胺标准品各 10 mg,用 0.1 mol/L HCl 溶解,定容至 10 mL,制成标准品储备液备用。取 10 种生物胺单标储备液各 5 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中,用 0.1 mol/L HCl 定容,于 4 °C 储存备用。

衍生化试剂:精确称取 50 mg 丹磺酰氯溶于丙酮,置于 10 mL 棕色容量瓶中,加入丙酮定容,于 4 °C 储存备用。

2.4 样品的制备

吴茱萸叶、枝、果在 60 °C 下烘干至恒重,粉碎,过 50 目筛(粒径 0.36 mm)。分别准确称取 5.000 g 于 100 mL 锥形瓶中,加入 30 mL 1 mol/L HCl,振荡提取 1 h,过滤上清液(提取 3 次,后两次每次 15 mL),合并滤液,4000 r/min 离心 8 min,上清液定容至 50 mL。取 20 mL 提取液至 50 mL 离心管,用 2 mol/L NaOH 调至 pH 12,加入正丁醇-二氯甲烷(1:1, V/V),涡旋 1 min,4000 r/min 离心 8 min,萃取 3 次,每次 10 mL,合并有机相,氮气吹干,加 1 mL 0.1 mol/L HCl 溶解,取 0.5 mL 至 5 mL 棕色容量瓶,进行衍生化分析;取 0.4 mL 至 5 mL 棕色容量瓶,作为空白对照。

0.5 mL 样品液以及标准胺混合液,加入 1 mL $NaHCO_3/Na_2CO_3$ (pH 10.5),0.5 mL 丹磺酰氯,在空白对照组中加入 0.5 mL 丙酮代替丹磺酰氯。混匀后,60 °C 水浴 45 min,加 100 μL 氨水除去多余的丹磺酰氯,停止反应^[10]。室温放置 30 min 后,以乙腈定容至 5 mL,过 0.45 μm 滤膜,待测。

3 结果与讨论

3.1 样品的提取与衍生化

采用三氯乙酸^[11]、 $HClO_3$ ^[12]、 HCl ^[10] 分别提取吴茱萸叶中的生物胺,结果见表 1,综合比较,HCl 提取效果最好。因此本方法选择 HCl 作为生物胺的提取溶剂。衍生温度、时间和衍生剂用量是影响丹磺酰氯衍生效果的主要因素。反复实验确定的优化条件为:0.5 mL 丹磺酰氯(5 g/L),60 °C 水浴 45 min。

3.2 色谱条件的选择

在 190~800 nm 波段对生物胺标准溶液衍生化后进行紫外扫描,最大吸收峰为 251 nm,在 334 nm 处也有吸收,但是吴茱萸样品在 251 nm 处干扰比较大,因此选取 334 nm。

流动相的选择对于生物胺的测定非常重要,本实验采用水(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱:

表 1 3 种溶剂对生物胺的提取结果(μg/g)

Table 1 Selection of extraction solvent (μg/g)

生物胺 Biogenic amines	三氯乙酸 Trichloroacetic acid	HClO ₃	HCl	生物胺 Biogenic amines	三氯乙酸 Trichloroacetic acid	HClO ₃	HCl
甲胺 Methylamine	3.46	2.09	3.82	组胺 Histamine	2.05	NQ	2.95
色胺 Tryptamine	6.09	5.87	7.22	5-羟色胺 5-Hydroxy tryptamine	ND	ND	ND
苯乙胺 Phenethylamine	21.2	20.07	21.2	酪胺 Tyramine	ND	ND	ND
腐胺 Putrescine	4.73	3.69	5.03	亚精胺 Spermidine	9.64	8.08	9.99
尸胺 Cadaverine	ND	ND	ND	精胺 Spermidine	3.48	3.32	3.97

NQ:不能定量(Not quantification); ND:未检出(Not detection)。

0~7 min, 45%~50% B; 7~25 min, 50%~90% B; 25~35 min, 90% B; 35~40 min, 90%~45% B; 40~45 min, 45% B。10 种生物胺在梯度洗脱条件下被有效分离见图 1, 10 种生物胺在色谱柱上的保留时间见表 2。

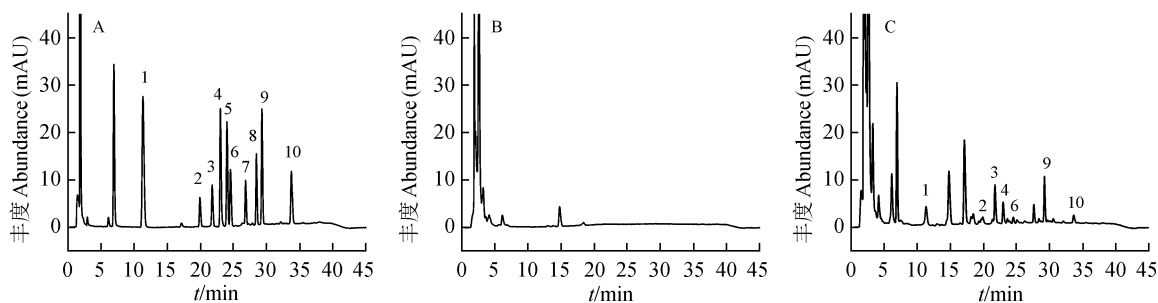


图 1 10 种生物胺的 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of 10 biological amine

A, 标准生物胺衍生化: 1. 甲胺, 2. 色胺, 3. 苯乙胺, 4. 腐胺, 5. 尸胺, 6. 组胺, 7. 5-羟色胺, 8. 酪胺, 9. 亚精胺, 10. 精胺; B, 吴茱萸叶空白对照; C, 吴茱萸叶衍生化。

A, Standards of ten biological amines: 1. Methylamine (MET), 2. Tryptamine (TRY), 3. Phenethylamine (PHE), 4. Putrescine (PUT), 5. Cadaverine (CAD), 6. Histamine (HIS), 7. 5-hydroxy tryptamine (5-HT), 8. Tyramine (TYR), 9. Spermidine (SPD), 10. Spermine (SPM); B, Blank control of leaves of *E. rutaecarpa*; C, Derivatization group of leaves of *E. rutaecarpa*.

表 2 10 种生物胺的保留时间、回归方程、相关系数、线性范围、检出限及精密度

Table 2 Retention times, regression equation, correlation coefficients, linear range, detection limits and precision of ten biological amine

生物胺 Biogenic amines	保留时间 Retention time (min)	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficients (R^2)	线性范围 Linear range (mg/L)	检出限 Detection limit (mg/L)	精密度 RSD (%)
甲胺 Methylamine	11.29	$Y=21727x+3743.6$	0.9999	2.0~25	0.25	2.0
色胺 Tryptamine	19.89	$Y=3447.7x+1450.7$	0.9999	2.0~25	0.65	1.5
苯乙胺 Phenethylamine	21.74	$Y=5211.9x+860.5$	0.999	2.0~25	0.45	0.9
腐胺 Putrescine	22.99	$Y=14146x+1842.5$	0.9999	2.0~25	0.35	1.5
尸胺 Cadaverine	23.98	$Y=11924x+1385.5$	0.9999	2.0~25	0.55	1.1
组胺 Histamine	24.52	$Y=6795.6x+18.7$	0.9999	2.0~25	0.45	1.3
5-羟色胺 5-hydroxy tryptamine	26.80	$Y=5088.6x-984.8$	0.999	2.0~25	0.50	1.8
酪胺 Tyramine	28.42	$Y=7573.1x+1236.0$	0.9992	2.0~25	0.50	1.6
亚精胺 Spermidine	29.27	$Y=11984x+1506$	0.9996	2.0~25	0.30	2.0
精胺 Spermine	33.72	$Y=7750.7x+365.2$	0.999	2.0~25	0.40	1.9

3.3 回归方程、线性范围、回收率和精密度

HPLC 法测定生物胺的回归方程、相关系数、线性范围、检出限及精密度见表 2, 10 种生物胺在

45 min 内得到良好分离。在给定的浓度范围内,各生物胺呈现良好的线性相关($R^2 > 0.999$),精密度 RSD < 2%。

在 5.000 g 吴茱萸叶样品中,添加 3 个水平的混合胺标准品,进行添加回收实验。3 个添加水平分别为 2.0、10 和 25 mg/L,按照 2.2 节色谱条件和 2.4 节样品制备方法进行检测分析,每个添加水平进行 6 次重复测定。结果表明,10 种生物胺在 3 个添加水平下的平均加标回收率为 91.87% ~ 101.35%, RSD < 8%。本方法的准确度和精密度良好,符合生物样品分析的要求。

3.4 吴茱萸样品分析

采用上述方法对 3 个吴茱萸样品进行测定,结果见表 3 和图 1,所有生物胺的检出浓度均在方法线性范围内。结果表明,吴茱萸叶中含有 7 种生物胺:甲胺、色胺、苯乙胺、腐胺、组胺、亚精胺和精胺;吴茱萸枝中含有 4 种:甲胺、腐胺、亚精胺和精胺;吴茱萸果中含有 5 种:甲胺、色胺、腐胺、亚精胺和精胺。

表 3 吴茱萸样品分析

Table 3 Analysis of *E. rutaecarpa* samples

生物胺 Biogenic amines	吴茱萸叶 Leaves of <i>E. rutaecarpa</i> ($\mu\text{g/g}$)	吴茱萸枝 Stem of <i>E. rutaecarpa</i> ($\mu\text{g/g}$)	吴茱萸果 Fruit of <i>E. rutaecarpa</i> ($\mu\text{g/g}$)
甲胺 Methylamine	3.82	6.20	5.59
色胺 Tryptamine	7.22	NQ	3.21
苯乙胺 Phenethylamine	21.2	NQ	NQ
腐胺 Putrescine	5.03	6.85	5.99
尸胺 Cadaverine	ND	ND	ND
组胺 Histamine	2.95	ND	ND
5-羟色胺 5-hydroxy tryptamine	ND	ND	ND
酪胺 Tyramine	ND	ND	ND
亚精胺 Spermidine	9.99	4.09	4.88
精胺 Spermidine	3.97	3.42	8.04

NQ: 不能定量(Not quantification); ND: 未检出(Not detection)。

References

- 1 Chinese Pharmacopoeia. The First Volume. **2010**: 160-160
中国药典. 一部. **2010**: 160-160
- 2 GONG Mu-Xin, SONG Ya-Fang, WANG Zhi-Min, ZHANG Qi-Wei, YAN Li-Hua, ZHU Jing-Jing. *China Journal of Chinese Materia Medica*, **2009**, 34(6): 792-794
龚慕辛, 宋亚芳, 王智民, 张启伟, 闫利华, 朱晶晶. 中国中药杂志, **2009**, 34(6): 792-794
- 3 Choi Y H, Shin E M, Kim Y S, Cai X F, Lee J J. *Arch. Pharm. Res.*, **2006**, 29(4): 293-297
- 4 WANG Ya-Xun, GONG Mu-Xin, WANG Zhi-Min, ZHANG Qi-Wei, GAO Hui-Min, SONG Ya-Fang. *Chin. Pharm. J.*, **2010**, 45(9): 641-646
王雅寻, 龚慕辛, 王智民, 张启伟, 高慧敏, 宋亚芳. 中国药学杂志, **2010**, 45(9): 641-646
- 5 LIU Jing, REN Jing, SUN Ge-Jie. *Journal of Food Science*, **2013**, 34(5): 322-326
刘景, 任婧, 孙克杰. 食品科学, **2013**, 34(5): 322-326
- 6 Dadáková E, Křížek M, Pelikánová, T. *Food Chemistry*, **2009**, 116: 365-370
- 7 Romero R, Bagur M G, Sánchez-Viñas M, Gázquez D. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, 376: 162-167
- 8 Vandenaabee O, Garrelly L, Ghelfenstein M, Commeyras A, Mion L. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 795(2): 239-250
- 9 LI Zhi-Jun, XUE Chang-Hu, WU Yong-Ning. *Science and Technology of Food Industry*, **2005**, 26(4): 175-178
李志军, 薛长湖, 吴永宁. 食品工业科技, **2005**, 26(4): 175-178
- 10 Mardiana S, Bahruddin S, Noor H H, Abdussalam S M A, Muhammad I S. *Food Chemistry*, **2009**, 113: 1356-1362
- 11 Shruti S, Hae-Kyong P, Jong-Kyu K, Myunghee K. *Food Chem. Toxicol.*, **2010**, 48: 1191-1195
- 12 Gosetti F, Mazzucco E, Gianotti V, Polati S, Gennaro M C. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1149: 151-157

Identification and Determination of Biogenic amines in *Evodia Rutaecarpa* (Juss.) Benth by High Performance Liquid Chromatography

SUN Yan-Ni, ZHANG Ning, WANG Cui-Ling, LIU Zhu-Lan, WANG Zheng, LIU Jian-Li*

(Key Laboratory of Resource and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract The reversed phase high performance liquid chromatography (HPLC) was applied to identification and determination of biogenic amines in *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. The dansyl chloride was used as derivative reagent, SHIMADZU LC-10A system equipped with on line degasser was used, SHIMADZU reversed phase-C₁₈(150 mm × 4.6 mm × 5 μm) column as stationary phase, acetonitrile and water as mobile phase and gradient elution were set. The flow rate was 0.8 mL/min, the column temperature was 30 °C, the injection volume was 20 μL and the detection wavelength was 334 nm. Ten biogenic amines had a good resolution within 45 min. In the given concentration range, the biogenic amines present good linear correlation ($R^2 > 0.999$) with the RSD of precision lower than 2%, the recovery rate between 91.87%–101.35%, and the RSD of repeatability lower than 8%. The results showed that the leaves of *E. rutaecarpa* contained seven biogenic amines, the stem contained four biogenic amines, the fruit contained five biogenic amines. This is the first report that biogenic amines are existed in *E. rutaecarpa*.

Keywords Biogenic amine; *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth; High performance liquid chromatography

(Received 25 September 2013; accepted 23 November 2013)

This work was supported by the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. IRT1174) and the National Natural Science Foundation of China (Nos. 20872118, 30070905)

《化学实验室安全与环保手册》

本书针对高校教学和科研实验室的具体情况,着重从化学实验室的规范化管理和安全意识建立角度,从实验室安全的一般知识入手,系统地介绍了可能危及人员安全的易燃、易爆、有毒或有污染的物质及相关设备的安全使用方法;给出废弃物的处理原则与方法;推荐紧急事故的应急处置措施;并探讨实验室的信息化管理与信息安全保护方法。

书号: 978-7-122-17186-3 定价: 68.0 元

出版时间: 2013 年 10 月 开本: 16 化学工业出版社出版