

柱前衍生化 HPLC 同时测定霍山石斛中 13 种游离氨基酸含量

郝经文^{1,2},王荣花²,徐文冬²,石敏珠²,陈乃富^{1,2*},陈乃东^{2*}¹安徽中医药大学,合肥 230031;²皖西学院,六安 237012

摘要:为建立柱前衍生化 HPLC 同时测定霍山石斛中 13 种游离氨基酸的方法。采用 Waters XBridge C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为 0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液-乙腈:水(4:1),梯度洗脱;流速 1.0 mL/min,柱温 35 °C;检测波长 254 nm。在该色谱条件下霍山石斛中 13 种游离氨基酸分离较好,平均加样回收率为 92.7%~104.3%,RSD < 2.5%。该方法简便、准确、重现性好,适用于霍山石斛中 13 种游离氨基酸的同时测定。

关键词:霍山石斛;柱前衍生化;游离氨基酸;高效液相色谱法

中图分类号:R284.1;Q946

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.11.001

Simultaneous Determination of 13 Free Amino Acids in *Dendrobium huoshanense* by Precolumn-derivatization HPLC Method

HAO Jing-wen^{1,2}, WANG Rong-hua², XU Wen-dong², SHI Min-zhu², CHEN Nai-fu^{1,2*}, CHEN Nai-dong^{2*}¹Anhui university of Chinese medic, hefei 230031, China; ²West anhui university, Luan 237012, China

Abstract: A pre-column derivatization-HPLC method was developed for the simultaneous determination of the 13 kinds of free amino acids in *Dendrobium huoshanense*. A Waters XBridge C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with 0.1 mol/L sodium acetate buffer (A) and acetonitrile-water (4:1) (B) as mobile phases in gradient elution mode. The flow rate was 1.0 mL/min and the column temperature was 35 °C. The DAD detection wavelength was set at 254 nm. The results showed that, adopted the established HPLC method, the 13 kinds of free amino acids were separated well and the average recoveries were between 92.7%-104.3% with RSD < 2.5%. Our study suggested that the developed HPLC method was simple, accurate and reproducible. It is suitable for the simultaneous determination of the 13 kinds of free amino acids in *D. huoshanense*.

Key words: *Dendrobium huoshanense*; pre-column derivatization; free amino acids; HPLC

霍山石斛(*Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng), 属兰科石斛属多年生草本植物^[1]。现代药理学研究表明霍山石斛具有抗氧化、增强免疫、明目、预防治疗心血管疾病、延缓衰老等功效^[2,3]。霍山石斛生长环境特殊,加之人工过度采集导致野生霍山石斛资源已近灭绝^[4,5],对霍山石斛资源的保护和综合利用显得尤为重要。现代化学研究表明,霍山石斛中含有多糖、生物碱、萜类等化合物^[6-9]。药用植物及药食两用植物中重要组分——游离氨基酸,作为中药炮制或食品加工过程中参与

米拉德反应的底物之一,是影响中药炮制中组分变化和食品风味的关键物质,日益受到人们的重视^[10,11]。开展霍山石斛游离氨基酸研究对于霍山石斛资源的综合利用、揭示霍山石斛的炮制机制具有重要意义。

目前,国内外有关氨基酸的检测方法主要气相色谱法、高效阴离子交换色谱-积分脉冲安培法(离子色谱法)、毛细管电泳法、氨基酸分析仪法及液相色谱法^[12-16]。液相色谱法有柱前衍生,荧光或紫外检测等手段,其中 HPLC 柱前衍生化法操作简单,结果准确,灵敏度高,被广泛应用于氨基酸的分离分析^[17]。检测氨基酸常用的 HPLC 柱前衍生化法有:6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯(AQC)法、2,4-二硝基氟苯(DNFB)法、异硫氰酸苯酯(PITC)法及邻苯二甲醛(OPA)法等。其中 PITC 法具有操作简单、产物稳定、反应迅速等优点,已成为一种经典的氨基酸衍生方法^[18-20]。

收稿日期:2018-06-04 接受日期:2018-09-27

基金项目:国家自然科学基金(81573536,81274021);中国博士基金(2016T90559);中国博士后研究面上项目(2014M551791);安徽省自然基金面上项目(1608 085MH221);安徽省教育厅自然科学基金重点项目(KJ2016A886, KJ2015A361);国家级大学生创新创业项目(006040217104,006040217105)

* 通信作者 E-mail:naifuchen1962@163.com,2004end@163.com

本文建立一种柱前衍生化-HPLC 方法,对霍山石斛中 13 种游离氨基酸同时测定,为深入研究霍山石斛中游离氨基酸在炮制过程中的化学变化、揭示霍山石斛炮制机制提供参考依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 液相色谱仪(美国安捷伦公司,美国;配备 Agilent G4212B 二极管阵列检测器);KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,中国);FA1204B 电子天平(上海越平科技有限公司,中国);PB-10 pH 计(德国 Sartorius 公司,德国);GL-20G-II 离心机(上海隆拓仪器有限公司,中国);VORTEX-5 涡旋振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司,中国);Milli-QA-10 纯水器(美国 Millipore 公司,美国);SY-2000 旋转蒸发仪(上海亚荣仪器有限公司,中国);FD-1A-50 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司,中国)。

1.2 材料

丝氨酸(Ser)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、苏氨酸(Thr)、脯氨酸(Pro)、酪氨酸(Tyr)、缬氨酸(Val)、甲硫氨酸(Met)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe)、赖氨酸(Lys)、色氨酸(Trp)标准品(均购自 Sigma-Aldrich 公司,美国;纯度均 $\geq 98\%$);醋酸钠(Sigma-Aldrich 公司,美国;纯度 $\geq 99\%$);正己烷(购自阿拉丁试剂公司,中国;纯度 $\geq 95\%$);三乙胺(购自阿拉丁试剂公司,中国;纯度 $\geq 99\%$);乙腈,甲醇,(均购自阿拉丁试剂公司,中国;色谱纯);异硫氰酸苯酯(PITC)(购自中国宿州化学试剂有限公司,中国;纯度 $\geq 99.9\%$);浓盐酸,(购自中国宿州化学试剂有限公司,中国;纯度 $\geq 99.9\%$);冰醋酸,(购自江苏强盛功能化学股份有限公司,中国;纯度 $\geq 99.5\%$);实验用水均为超纯水。

实验材料于 2017 年 10 月采自皖西学院药用植物园霍山石斛栽培基地,品种经皖西学院陈乃东教授鉴定为霍山石斛(*Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng),洗净,取其根、茎、叶,切碎后-50℃冷冻干燥,备用。

2 实验方法

2.1 标准品溶液的制备

精密称取 13 种氨基酸对照品 Trp 15.6 mg、Met 14 mg、Ile 10.2 mg、Val 10.8 mg、Lys 20.7 mg、Leu

12.4 mg、Phe 50.6 mg、His 26 mg、Ser 15 mg、Gly 15.5 mg、Pro 12.3 mg、Thr 22.2 mg、Tyr 20.7 mg,置于 25.0 mL 容量瓶中,加 0.1 mol/L 盐酸定容至刻度。精密量取 1.0 mL 样液于 10.0 mL 具塞试管中,加入 14% 三乙胺乙腈溶液,1.2% 异硫氰酸苯酯乙腈溶液各 0.5 mL 混匀,室温避光放置 30 min,加入正己烷 2.0 mL,涡旋振荡,放置 10 min,5 000 rpm 离心 10 min,取下层溶液,制得衍生化溶液,并逐级稀释,配制成不同浓度的衍生化溶液,用于绘制标准曲线。

2.2 混合对照品衍生化溶液

分别取 13 种氨基酸对照品适量,精密称定,加 0.1 mol/L 盐酸溶液制成每 1 mL 含 Ser 0.12 mg、Gly 0.12 mg、His 0.11 mg、Thr 0.12 mg、Pro 0.12 mg、Tyr 0.11 mg、Val 0.11 mg、Met 0.11 mg、Ile 0.11 mg、Leu 0.11 mg、Phe 0.12 mg、Lys 0.11 mg、Trp 0.11 mg 的混合溶液,即得混合对照品储备液。取上述溶液 1 mL,进行衍生化操作,且衍生化操作同 2.1,制成混合对照品衍生化溶液,用于优化色谱条件。

2.3 供试品衍生化溶液的制备

取霍山石斛根、茎、叶粉末样品(过 4 号筛)2 g,精密称定,置 500 mL 烧瓶中,加入 70% 甲醇溶液 300 mL 混合,在 70℃ 下回流提取 15 min,过滤处理。重复两次,合并滤液,并转移至蒸馏烧瓶中,60℃ 下减压浓缩至干,残渣加 0.1 mol/L HCl 溶液溶解。并转移入 10 mL 具塞试管中,加入 0.1 mol/L HCl 溶液定容至刻度,混匀,按“2.1”项下方法自“加入 14% 三乙胺乙腈溶液”起操作,制备衍生化溶液,即得供试品衍生化溶液。

2.4 色谱条件及优化

在预实验液相条件的基础上,使用“2.2 混合对照品衍生化溶液”作为样品溶液,采用 Waters XBridge C₁₈ 反相柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),柱温 35℃,流动相 A 为 0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液,流动相 B 为乙腈-水(4:1),固定梯度洗脱条件(表 1)、检测波长(254 nm)、进样量为 10 μL,开展优化色谱条件研究。

2.4.1 pH 值的优化

实验考察流动相 A 的 pH 值为 4、6、8、10 和 12 时氨基酸的分离效果,筛选最佳的色谱条件。

2.4.2 流速的优化

实验考察 0.6、0.8、1.0、1.2、1.5 mL/min 五个流速时氨基酸的分离效果,筛选最佳的色谱条件。

表 1 洗脱梯度程序

Table 1 Gradient elution program

时间 Time (min)	流动相 Mobile phase	
	A%	B%
0	100	0
3	100	0
15	88	12
20	80	20
35	75	25
40	65	35
45	0	100
50	0	100

2.4.3 柱温的优化

实验考察柱温为 25、30、35、40、45 °C 五个柱温条件时氨基酸的分离效果,筛选最佳的色谱条件。

2.4.4 离子浓度的优化

实验用 0.050、0.075、0.100、0.125、0.150 mol/L 的醋酸钠溶液作为缓冲盐时氨基酸的分离效果,

确定最佳的离子浓度。

2.5 样品的测定

在相同的色谱条件下进样检测,根据标准曲线,测定各氨基酸的含量结果。

3 实验结果与讨论

3.1 色谱条件优化结果

3.1.1 pH 值优化结果

氨基酸为两性物质,缓冲液 pH 值影响不同氨基酸的解离程度,从而影响氨基酸的保留时间。为了考察流动相中 pH 值变化对分离度的影响,采用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液和 0.1 mol/L 的醋酸溶液将流动相的水相(A 相 表 1)调至 pH 为 4、6、8、10、12,且其他液相条件分别为:流速 1 mL/min,柱温 35 °C,离子浓度 0.100 mol/L。结果如图 1 所示,比较不同 pH 值下图谱的分离度和对称性。当 pH 为 10 时,如图 1-4 所示,图中各个峰的对称性较好,基线平稳,实现基线分离。故实验选择 A 相 pH 值为 10,作为进一步优化液相色谱的分析条件。

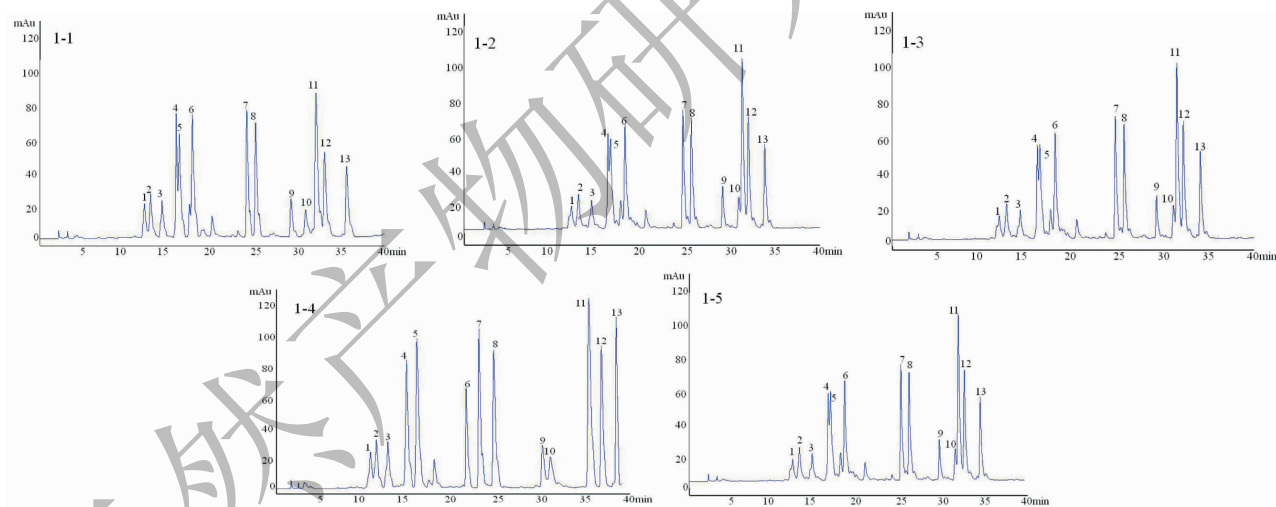


图 1 流动相 pH 值氨基酸分离度的影响

Fig. 1 The effects of the solvent pH on the resolution of mixed amino acids.

注:1-1:pH 为 4;1-2:pH 为 6;1-3:pH 为 8;1-4:pH 为 10;1-5:pH 为 12。

Note:1-1:the result of pH 4;1-2:the result of pH 6;1-3:the result of pH 8;1-4:the result of pH 10;1-5:the result of pH 12.

3.1.2 流速优化结果

对反向色谱柱而言,流速是影响物质分离的重要因素之一,根据范德姆特方程和色谱峰分离度计算方程分析。当流速降低时,物质在色谱柱上的保留效果增强,使物质的保留时间显著延长,因此物质的分离度会有一定的提高,但是流速太慢,物质在色谱柱中的纵向扩散会增加,表现为色谱峰变宽,不利

于微量物质的测定。为了提高分离效果,在分离度达到要求的前提下,尽可能缩短分离时间。本实验采用 0.6、0.8、1.0、1.2、1.5 mL/min 五种流速条件,考察流速对氨基酸分离效果的影响,对 13 种氨基酸混合标准品的液相分离结果进行评价,且其他液相条件分别为:流动相(A 相)pH 值为 10,柱温 35 °C,离子浓度 0.100 mol/L,结果如图 2 所示,以色谱峰

的分离度,峰型及分析时间进行比较,当流速在 1.2 mL/min、1.5 mL/min 的时候,部分色谱峰未实现基线分离,当流速在 0.6 mL/min 和 0.8 mL/min 时,分离效果有所提升,但部分氨基酸的峰出现重叠,无法

进行定量分析,当流速为 1.0 mL/min 时,如图 2-3 所示,13 种氨基酸的峰能实现基线分离,且峰对称性较好,能满足氨基酸的定量分析要求,故使用 1.0 mL/min 的流速,作为进一步优化液相色谱的分析条件。

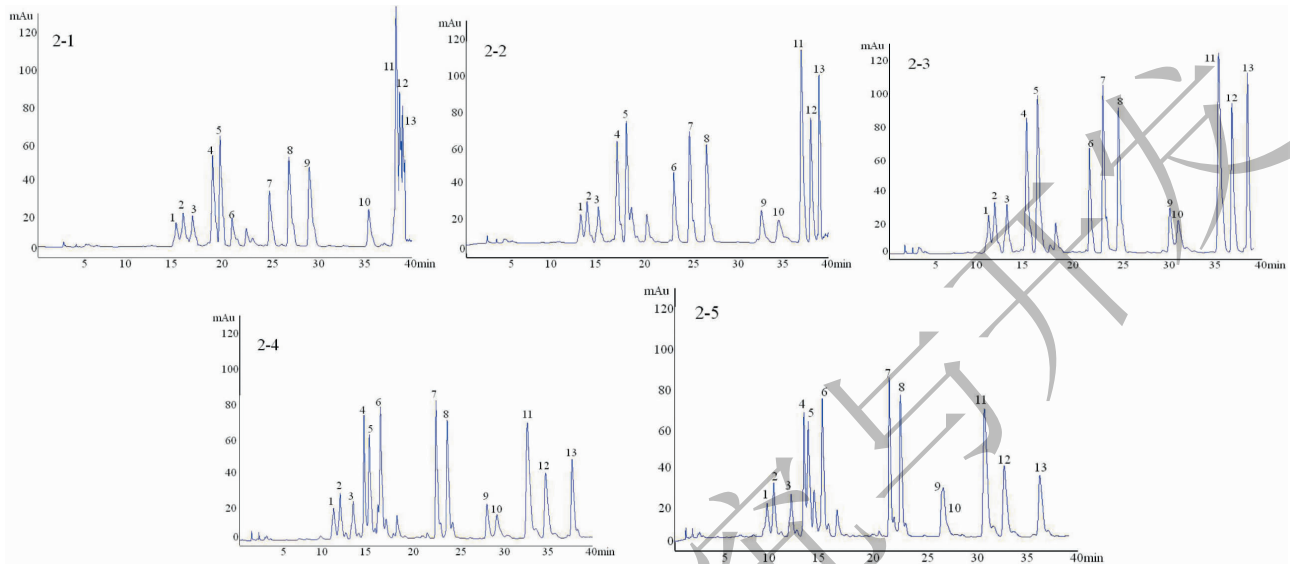


图 2 流速对氨基酸分离度的影响

Fig. 2 The effects of the flow rate on the resolution of mixed amino acids.

注:2-1:流速为 0.6 mL/min;2-2:流速为 0.8 mL/min;2-3:流速为 1.0 mL/min;2-4:流速为 1.2 mL/min;2-5:流速为 1.5 mL/min。

Note:2-1:the result of flow rate 0.6 mL/min;2-2:the result of flow rate 0.8 mL/min;2-3:the result of flow rate 1.0 mL/min;2-4:the result of flow rate 1.2 mL/min;2-5:the result of flow rate 1.5 mL/min.

3.1.3 柱温优化结果

柱温是影响柱效和备压的主要因素之一,随着柱温的升高,系统的备压和化合物在色谱柱上的保留时间都会减少,柱温过高,会使各组分的分配系数 K 值变小,分离度减小;柱温过低,传质速率显著降低,柱能下降,分析时间延长。选择合适的柱温可使难分离的组分提高分离效果。本实验考察 5 个不同柱温,分别是 25、30、35、40、45 $^{\circ}\text{C}$,对 13 种游离氨基酸混合标准品分离度的影响,且其他液相条件分别为:流动相(A 相) pH 值为 10,流速 1.0 mL/min,离子浓度 0.100 mol/L,结果如图 3 所示,当柱温为 25、30 $^{\circ}\text{C}$ 时,图谱中部分色谱峰的分离度下降,没有实现基线分离,当柱温在 40、45 $^{\circ}\text{C}$ 的情况下,在 15~20 min 时,色谱峰也出现了裂分,而柱温在 35 $^{\circ}\text{C}$ 时,柱效较高,峰的对称性较好,各峰之间实现基线分离,故柱温设定为 35 $^{\circ}\text{C}$,作为进一步优化液相色谱的分析条件。

3.1.4 离子浓度优化结果

通过改变缓冲溶液中离子的浓度,能够改变目标化合物与固定相之间的保留时间,改善分离度。同时流动相中缓冲盐可以使流动相溶液保持相对稳

定的 pH 值环境,可以防止氨基酸标准品发生分解出现拖尾现象,影响分离度。本实验考察了 5 组离子浓度分别是 0.050、0.075、0.100、0.125、0.150 mol/L 的醋酸缓冲盐溶液,且其他液相条件分别为:流动相(A 相) pH 值为 10,流速 1.0 mL/min,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,结果如图 4 所示,综合考虑检测分离度和灵敏度选择离子浓度为 0.100 mol/L 的醋酸缓冲盐溶液做流动相缓冲盐。

3.2 HPLC 方法的确立

综合上述色谱条件优化的结果,本实验条件下用于 13 种游离氨基酸分离的色谱条件为:流动相 A 为 0.100 mol/L 醋酸钠缓冲液(以醋酸调 pH 为 10,加入 3% 乙腈混匀),流动相 B 为乙腈-水(4:1),流速为 1.0 mL/min,柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$,检测波长为 254 nm,进样量为 10 μL 。在此条件下,各氨基酸衍生物得到分离(图 5,表 2),且峰型较好,满足对氨基酸的定量要求。

3.3 方法学考察

3.3.1 线性关系考察及检测限、定量限测定

取 2.1 项标准品溶液进样 10 μL ,最佳色谱条件下检测。以氨基酸质量为横坐标,相应的氨基酸

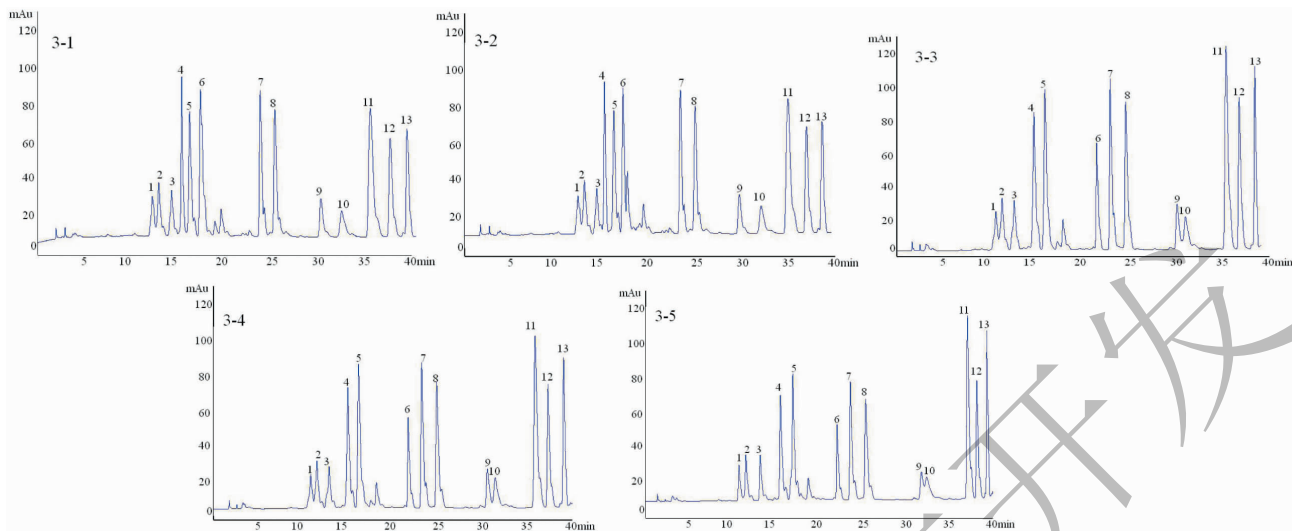


图3 柱温对氨基酸分离度的影响

Fig. 3 The effects of the column temperature on the resolution of mixed amino acids

注:3-1:柱温为 25 °C;3-2:柱温为 30 °C;3-3:柱温为 35 °C;3-4:柱温为 40 °C;3-5:柱温为 45 °C。

Note:3-1:the result of column temperature at 25 °C;3-2:the result of column temperature at 30 °C;3-3:the result of column temperature at 35 °C;3-4:the result of column temperature at 40 °C;3-5:the result of column temperature at 45 °C.

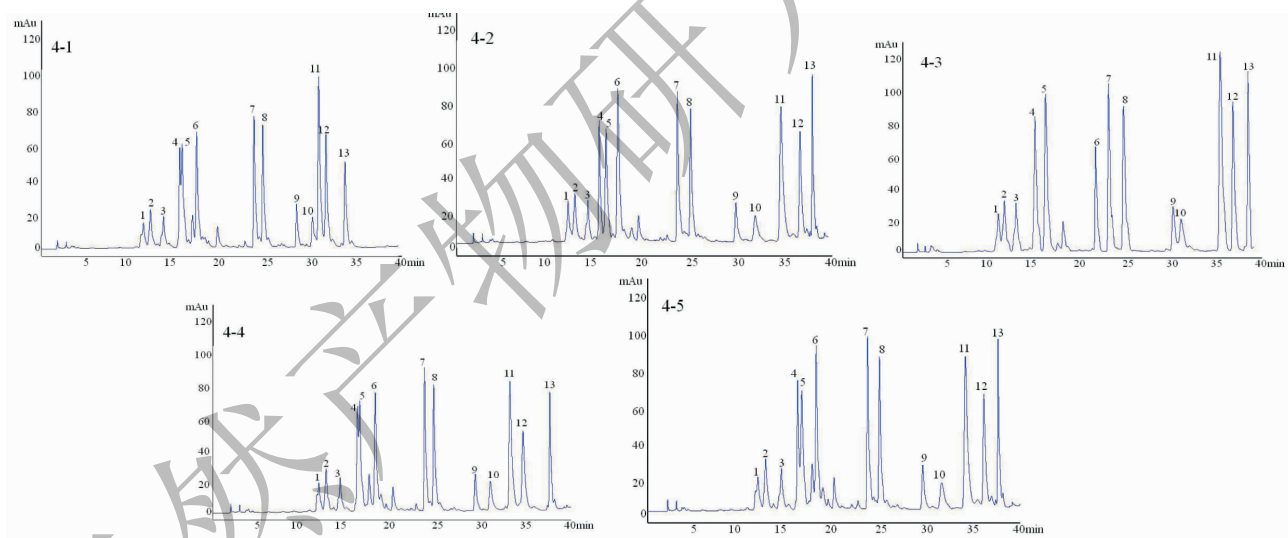


图4 离子浓度对氨基酸分离度的影响

Fig. 4 The effects of the ion concentration on the resolution of mixed amino acids

注:4-1:离子浓度为 0.050 mol/L;4-2:离子浓度为 0.075 mol/L;4-3:离子浓度 0.100 mol/L;4-4:离子浓度为 0.125 mol/L;4-5:离子浓度为 0.150 mol/L。

Note:4-1:the result of mixed amino acids isolated by the 0.050 mol/L eluent;4-2:the result of mixed amino acids isolated by the 0.075 mol/L eluent;4-3:the result of mixed amino acids isolated by the 0.100 mol/L eluent;4-4:the result of mixed amino acids isolated by the 0.125 mol/L eluent;4-5:the result of mixed amino acids isolated by the 0.150 mol/L eluent.

衍生物峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程。根据峰高以信噪比 $S/N = 3$ 确定检出限, $S/N = 10$ 确定定量限。实验结果结果如表 3,测得 13 种氨基酸标准品的线性范围为 0.1 ~ 193.8 μg ,相关性

系数均在 0.999 5 以上,线性关系良好。

3.3.2 精密度试验

取单一标准品的衍生化溶液,按“3.1”项下色谱条件连续进样 6 次,测定 13 种氨基酸衍生物进样

精密度;13种氨基酸衍生物峰面积的RSD均小于2.0%,说明仪器精密度良好。

表2 13种氨基酸对照品衍生物峰保留时间及理论塔板数

Table 2 Retention time and theoretical plate numbers of 13 kinds of amino acid derivatives isolated by the established optimal HPLC methods

序号 No.	氨基酸衍生物 Amino acid derivatives	t_R Time (min)	理论塔板数 Theoretical plate number (n)
1	Ser	12.672	5.850×10^3
2	Gly	13.405	9.624×10^3
3	His	14.709	5.502×10^3
4	Thr	17.059	1.874×10^4
5	Pro	18.584	1.514×10^4
6	Tyr	24.014	1.011×10^5
7	Val	25.430	7.110×10^4
8	Met	27.021	4.847×10^4
9	Ile	31.306	3.757×10^4
10	Leu	32.184	4.348×10^4
11	Phe	32.184	3.721×10^4
12	Phe	39.687	5.454×10^4
13	Lys	42.116	1.615×10^5

表3 13种氨基酸标准曲线

Table 3 The calibrations of 13 amino acids

氨基酸 Amino acid	回归方程 Regression equation	R	线性范围 Linear range (μg)	LOD (μg)	LOQ (μg)
Ser	$Y = 3.000 \times 10^6 X + 753.92$	1	7.5 ~ 37.5	0.013 40	0.044 73
Gly	$Y = 1.543 \times 10^4 X - 277.51$	1	38.8 ~ 193.8	0.211 83	0.706 10
His	$Y = 9.950 \times 10^5 X + 20.017$	0.999 7	13.0 ~ 68	0.000 66	0.002 19
Thr	$Y = 1.375 \times 10^4 X - 787.26$	0.999 9	27.8 ~ 138.8	0.005 05	0.016 80
Pro	$Y = 1.879 \times 10^4 X + 1264.7$	0.999 9	7.7 ~ 38.4	0.044 30	0.147 68
Tyr	$Y = 5.522 \times 10^3 X + 85.657$	0.999 9	2.1 ~ 10.4	0.018 59	0.061 95
Val	$Y = 2.000 \times 10^7 X + 140.89$	0.999 9	0.1 ~ 0.7	0.000 08	0.000 28
Met	$Y = 2.000 \times 10^6 X + 320.12$	0.999 9	1.4 ~ 14	0.000 15	0.000 51
Ile	$Y = 6.036 \times 10^3 X + 172.89$	0.999 9	2 ~ 10	0.035 54	0.118 49
Leu	$Y = 3.000 \times 10^6 X - 820.65$	0.999 9	2.5 ~ 12.4	0.000 08	0.000 29
Phe	$Y = 2.000 \times 10^6 X + 833.32$	0.999 5	10.1 ~ 50.6	0.005 69	0.018 98
Tyr	$Y = 2.000 \times 10^6 X + 28.005$	1	3.9 ~ 19.5	0.000 72	0.002 41
Lys	$Y = 3.000 \times 10^6 X + 230.98$	1	2.72 ~ 13.6	0.000 14	0.000 469

3.3.3 稳定性试验

取单一标准品的衍生化溶液,按“3.1”项下色谱条件分别于0、2、4、6、8、10天进样,测定峰面积,计算RSD,考察13种氨基酸衍生物稳定性。结果甲

硫氨基酸衍生物在第4天后发生变质,4天内13种氨基酸衍生物峰面积的RSD均达0.92%~2.37%,说明供试品衍生化溶液在96h内稳定。

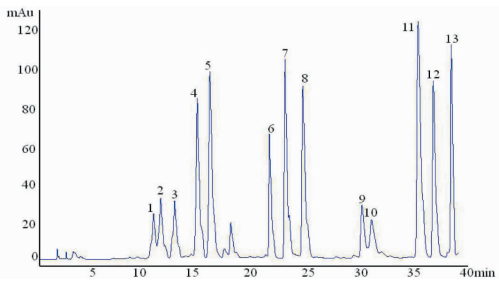


图5 13种氨基酸混合标准品 HPLC 检测结果

Fig. 5 The results of 13 kinds of standard amino acids isolated by the optimal HPLC method

3.3.4 重复性试验

精密称取 6 份标准样品,每份 0.2 g,按“2.1”项下方法制备供试品衍生化溶液,按“3.1”项下色

谱条件测定峰面积,计算 13 种氨基酸含量,其 RSD 在 0.96% ~ 2.01% 之间,说明方法重复性良好。

3.3.5 加样回收率试验

精密称取已测得含量的霍山石斛样品 6 份,各 2 g,分别置 500 mL 烧瓶中,加入“2.1”项下混合对照品储备液,按“2.3”项下方法制备衍生化溶液,按“3.1”项下色谱条件测定峰面积,计算回收率和 RSD。且 13 种氨基酸类化合物加标回收率在 92.7% ~ 104.3% 之间,其 RSD 结果均小于 2.5%,即石斛样品的基质效应对测定方法的影响较小,加标回收率满足实验要求,且方法稳定可靠。

3.4 供试样品测定结果

运用 3.2 构建的 HPLC 条件,测得霍山石斛的根,茎,叶游离氨基酸总提取物检测结果如图 6 所示。

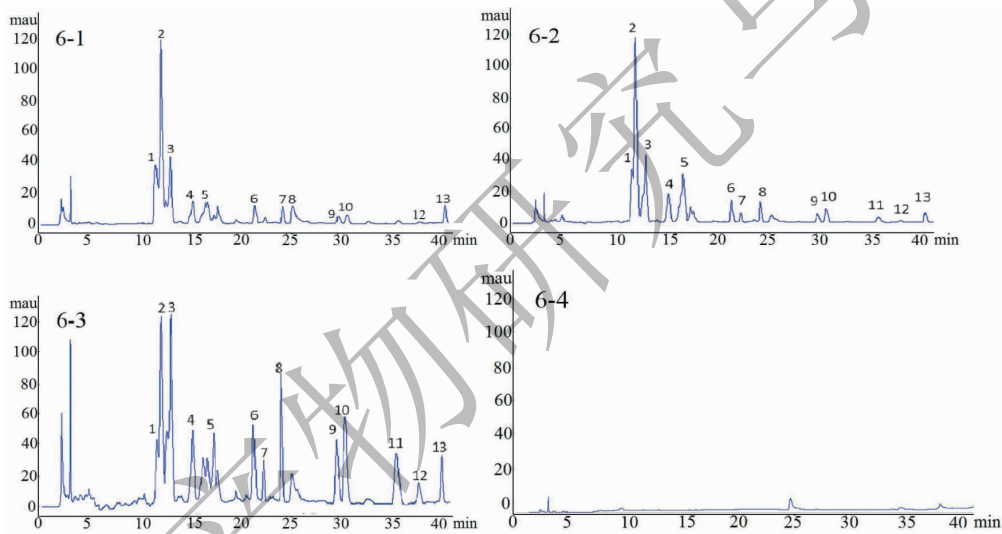


图6 霍山石斛根、茎、叶总游离氨基酸 HPLC 检测结果

Fig. 6 The HPLC chromatograms of free amino acids in roots, stems and leaves from *D. huoshanense*

注:6-1:霍山石斛根供试品衍生化溶液 HPLC 色谱图;6-2:霍山石斛根供试品衍生化溶液 HPLC 色谱图;6-3:霍山石斛根供试品衍生化溶液 HPLC 色谱图;6-4:空白衍生化溶液 HPLC 色谱图。

Note:6-1:HPLC chromatograms of roots of *D. huoshanense*;6-2:HPLC chromatograms of stems of *D. huoshanense*;6-3:HPLC chromatograms of leaves of *D. huoshanense*;6-4:HPLC chromatograms of blank derivatization solution.

霍山石斛根,茎,叶中游离氨基酸含量如表 4 所示,由表中可知,霍山石斛的茎和叶中检测出 13 种氨基酸,且 8 种必需氨基酸和 5 种非必需氨基酸,但霍山石斛的根中未检出苯丙氨酸,其中霍山石斛的游离氨基酸主要有甘氨酸,组氨酸,苏氨酸,脯氨酸,缬氨酸,在霍山石斛的叶中苯丙氨酸和亮氨酸的相对含量也较高。

4 结论

霍山石斛根、茎、叶中游离氨基酸的含量不同,

在本实验条件下,对游离氨基酸的种类进行比较,霍山石斛的茎和叶中检测出 13 种游离氨基酸,而霍山石斛的根中未检测出苯丙氨酸,而甘氨酸在 3 种样品中含量相对较高,就游离氨基酸的总量而言,霍山石斛叶 > 霍山石斛茎 > 霍山石斛根。由于霍山石斛在一定生长状态下,游离氨基酸合成主要集中在叶子部位,而茎和根中合成和储存游离氨基酸的含量较少,故叶子中游离氨基酸含量相对较高。

霍山石斛在炮制成枫斗的过程中经分拣、清洗、炒制、揉搓、绕条、烘焙、整形、复火等多种工序制成

表 4 霍山石斛根,茎,叶中游离氨基酸含量(μg/g)
Table 4 The contents of 13 amino acids in *D. huoshanense* (μg/g)

氨基酸 Amino acid	霍山石斛根 Root	霍山石斛茎 Stem	霍山石斛叶 Leaf
Ser	60.993	52.185	19.622
Gly	592.394	707.220	276.113
His	262.637	374.196	384.857
Thr	361.065	693.114	431.876
Pro	175.050	51.568	102.515
Tyr	5.084	8.714	22.904
Val	180.927	332.802	879.965
Met	45.623	29.427	29.542
Ile	10.555	22.021	42.441
Leu	34.351	51.482	124.800
Phe	-	48.512	366.631
Tyr	3.137	6.544	24.518
Lys	49.572	37.575	79.113
总含量 Total content	1781.388	2366.848	2418.226

的弹簧状干品,其中炒制、烘焙、复火三种工序中的温度是影响霍山石斛枫斗品质的关键因素,且根据霍山石斛枫斗炮制国家标准,炒制温度应设定在(110~120℃),在该温度下霍山石斛发生米拉德反应从而组分变化,产生风味物质。而游离氨基酸是参与米拉德反应的反应底物之一,其种类和含量将直接影响反应产物的种类及含量。

本实验构建了柱前衍生化高效液相色谱法对霍山石斛中13种游离氨基酸的含量测定方法,并经方法学考察,所建立的方法简单可行,准确性高,重现性好,获得霍山石斛的不同部位中13种游离氨基酸的含量结果,对研究霍山石斛中游离氨基酸在炮制过程中的化学变化,揭示霍山石斛炮制机制提供参考依据。

参考文献

- Lu DR(卢荣德),Tao XG(陶小平),Sun Q(孙晴),*et al.* Advances in studies on biochemical characteristics and photosynthesis process of *Dendrobium huoshanense*[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2010,41:1917-1921.
- Zha XQ,Deng YY,Li XL,*et al.* The core structure of a *Dendrobium huoshanense*, polysaccharide required for the inhibition of human lens epithelial cell apoptosis[J]. *Carbohydr Polym*,2017,155:252-260.

- Wang FH(王凤华),Han JC(韩吉春),Li DF(李德芳),*et al.* Protective effect of *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng water extract on alcohol-induced acute liver injury by inhibiting NF-κB/p65 and p38 MAPK[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发)2017,29:569-574.
- Chen ND(陈乃东),Chen H(陈瀚),Li J(李俊),*et al.* Discrimination and similarity evaluation of tissue-cultured and wild *Dendrobium* species using fourier transform infrared spectroscopy[J]. *J Molecular Structure*,2015,1086:255-265.
- Chen ND(陈乃东),Jia XY(贾晓玉),Cheng QB(程启斌),*et al.* Comparative pharmacognostical investigation of *Dendrobium huoshanense* and *Dendrobium henanense*[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发)2016,28:1060-1065.
- Hao JW,Chen ND,Chen CW,*et al.* Rapid quantification of polysaccharide and the main onosaccharides in *Dendrobium huoshanense* by near-infrared attenuated total reflectance spectroscopy[J]. *J Pharm Biomed Anal*,2018,151:331-338.
- Chen ND(陈乃东),Chen NF(陈乃富),Wang TT(王陶陶),*et al.* Accumulation of polysaccharides and ethanol-soluble extract in tissue-cultured and wild *Dendrobium huoshanense* and *Dendrobium henanense*[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发)2015,27:2090-2094.
- Chen CW(陈存武),Chen ND(陈乃东),Meng YF(孟云

- 飞), *et al.* Quick recognition of unknown alkaloids from *Dendrobium officinale* Kimura et Migo by an alkaloid-knocking-out method and the on-line HPLC-UV-CL analysis of their antioxidant activity[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发) 2014, 26:1000-1003.
- 9 Chen ND(陈乃东), Gao F(高峰), Lin X(林欣), *et al.* Comparative study on alkaloids of tissue-culture seedling and wild plant of *Dendrobium huoshanense*[J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2014, 37:953-973.
- 10 Yang WY(杨文字), Tang S(唐盛), Shi DJ(石冬俊), *et al.* Preliminary processing, processing and usage of *Dendrobii Caulis* in history[J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2015, 40:2893-2897.
- 11 Zhang R(张儒), Zhang BL(张变玲), Yi T(易俊), *et al.* Antioxidant activity of Maillard reaction products prepared from Ginsenoside Re with L-Arginine[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017, 29:1818-1823.
- 12 Zhang J(张佳), Wang CP(王川丕), Ruan JY(阮建云). Determination of main free amino acids in tea by Gas Chromatography-Mass spectrometry(GC-MS) and Gas chromatography-flame ionization detector(GC-FID)[J]. *J Tea Sci*(茶叶科学), 2010, 30:445-452.
- 13 Ferreira CR, Cusmanoozog K. Spurious elevation of multiple urine amino acids by ion-exchange chromatography in patients with prolidase deficiency[J]. *Jimd Reports*, 2016, 31(4):45-49.
- 14 Chen B(陈冰), Li XG(李小戈), He P(何萍), *et al.* Simultaneous determination of amino acids in food by capillary electrophoresis with indirect ultraviolet detection[J]. *Chi J Chrom*(色谱), 2004, 22(1):74-76.
- 15 Zhang SP(张苏平), Qiu WQ(邱伟强), Lu Q(卢祺), *et al.* Determination of glutathione and free amino acids in muscles of four shellfish species by automatic amino acid analyzer[J]. *Food Sci*(食品科学), 2017, 38:170-176.
- 16 Chen H, Jin L, Chang Q, *et al.* Discrimination of botanical origins for Chinese honey according to free amino acids content by HPLC-FLD with Chemometric approaches[J]. *J Sci Food Agr*, 2016, 97:2042-2062.
- 17 Li N, Liu Y, Zhao Y, *et al.* Simultaneous HPLC determination of amino acids in tea infusion coupled to pre-column derivatization with 2, 4-Dinitrofluorobenzene[J]. *Food Anal Meth* 2016, 9:1307-1314.
- 18 Sun YC(孙言春), Xu XZ(许宪祝), Xu YL(徐衍岭), *et al.* Determination of 17 amino acids in fish eggs by ultra performance liquid chromatography coupled with precolumn derivatization[J]. *Chi J Chrom*(色谱), 2013, 31:275-280.
- 19 Cheng Y(程勇), Chen L(陈玲), Deng XC(邓晓春). Determination of twenty free amino acids in tobacco leaves by HPLC with pre-column derivatization[J]. *Tobacco Sci Tech*(烟草科技), 2010, 47(10):35-38.
- 20 Zhang W(张维), Zhang T(张铁), Wang WW(王伟伟), *et al.* Chemical composition and antioxidant activity analysis of different parts of Maca cultivated in Yunnan[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2014, 26:813-812.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

广西壮族自治区药用植物园

广西科学院

重庆市药物种植研究所

昆明医科大学药学院