

柱前衍生 RP-HPLC 测定菊米中 17 种氨基酸的含量

宋海燕^{1,2}, 葛乐勇¹, 吴坚², 张新风^{1*}

(1. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 天然药物研发中心, 浙江 临安 311300;
2. 浙江绍兴市质量技术监督检测院, 浙江 绍兴 312071)

[摘要] **目的:**探讨菊米中基本氨基酸组成和不同加工方式、不同采收期对氨基酸含量的影响,为菊米的质量和加工利用提供科学依据。**方法:**采用柱前衍生处理样品,建立 HPLC 方法,分析菊米中氨基酸组成及含量,评价不同加工处理和不同采收期的菊米质量差异。**结果:**菊米中含有 17 种必需和非必需氨基酸,机械加工样品氨基酸含量高于手工加工。通过 *t* 检验,除脯氨酸和胱氨酸外,其余 15 种氨基酸在两种加工方法处理菊米样品中均存在显著差异。通过氨基酸含量的偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA),加工方法对天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、缬氨酸和赖氨酸的影响最大(VIP > 1),两种加工方法区分明显,可以判断加工方法的优劣。不同采收时期的菊米样品氨基酸含量差异不明显($P > 0.05$),说明采收时期对氨基酸成分影响较小。**结论:**利用柱前衍生-HPLC 法分析菊米营养成分氨基酸可作为评价菊米质量评价的方法之一,采用机械加工可保证菊米的质量。

[关键词] 菊米; 氨基酸; 高效液相色谱; 偏最小二乘法-判别分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0082-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200082

Content Determination of 17 Amino Acids in Dendranthema Flos by Pre-column Derivatization and RP-HPLC SONG Hai-yan^{1,2}, GE Le-yong¹, WU Jian², ZHANG Xin-feng^{1*} (1. Nurturing Base for State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Research and Development Center for Natural Medicine, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Lin'an 311300, China; 2. Shaoxing Testing Institute of Quality and Technical Supervision, Shaoxing 312071, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the amino acids of Dendranthema Flos with different harvest periods and processing methods to provide scientific basis for Dendranthema Flos's quality, processing and application. **Method:** The major amino acids content of Dendranthema Flos were determined by pre-column derivatization and RP-HPLC, the quality differences of Dendranthema Flos with different processing methods and harvest periods were evaluated. **Result:** The results showed that Dendranthema Flos contains 17 kinds of essential and non-essential amino acids, and the amino acids content of machined samples was higher than the manually processed ones; *t*-test indicated significant differences in content among 15 amino acids, except proline and cystine. The different processing methods had the most significant impacts on aspartic acid, glutamic acid, serine, valine and lysine (VIP > 1) by partial least squares-discriminate analysis (PLS-DA). In addition, the two processing methods can be clearly distinguished by their advantages and disadvantages. No significant impact of harvest periods were detected on the nutrients according to amino acids content ($P > 0.05$). **Conclusion:** The analysis of amino acids by pre-column derivatization and HPLC methods could be one of the effective methods for evaluating Dendranthema Flos's quality. Mechanical processing can ensure stable and high quality of Dendranthema Flos.

[Key words] Dendranthema Flos; amino acids; high performance liquid chromatography; PLS-DA

[收稿日期] 20150428(011)

[基金项目] 浙江省重大科技计划项目(2009C02005)

[第一作者] 宋海燕,工程师,硕士,从事食品加工与安全研究,Tel:0575-88132300,E-mail:songhaiyan188@126.com

[通讯作者] *张新风,副教授,博士,从事天然药物化学及质量控制研究,Tel:0571-63743855,E-mail:xinfengxh@hotmail.com

菊米^[1]呈黄绿色似米粒状,因产自浙江遂昌县石练镇,亦称为石练菊米^[2]。《本草纲目拾遗》中记载菊米可败毒散疔、去风清火、明目^[3],长期饮用能生津养颜、延年益寿,对视力衰退及高血压患者有明显疗效。石练菊米目前以栽培为主,多在 10 月中上旬到 11 月上旬之间采摘,缺少深加工产品和质量评价标准是制约菊米产业发展的一个瓶颈。菊米含有黄酮、挥发油、蛋白质、氨基酸、矿物质等成分^[4],本课题组前期工作中,以黄酮类物质为指标探讨过不同加工方式对菊米质量的影响^[5]。氨基酸是菊米中一类重要的营养成分,目前研究较少。氨基酸分析一般采用盐酸水解氨基酸自动分析或柱前衍生 HPLC 分析^[6-8],因前者的局限性^[9],目前氨基酸分析多采用后者。文献报道常用的柱前衍生试剂有 4 种^[10],本试验以 17 种基本氨基酸为标准,采用异硫氰酸苯酯(PITC)进行柱前衍生,结合反相 HPLC 分析菊米中的氨基酸,了解菊米中氨基酸组成,并分析两种加工方式和不同采摘时间对菊米质量的影响,建立菊米氨基酸检测方法,为菊米产业化发展提供参考。

1 材料

1.1 仪器 A-1260 系列高效液相色谱仪(含四元泵、自动进样器和 DAD 检测器,美国安捷伦),AB204-L 型电子分析天平(Mettler Toledo),MILLT-Q 型超纯水纯化系统(Millipore)。

1.2 试剂 17 种氨基酸混合对照品溶液包括天冬氨酸(Asp),谷氨酸(Glu),丝氨酸(Ser),甘氨酸(Gly),组氨酸(His),精氨酸(Arg),苏氨酸(Thr),丙氨酸(Ala),脯氨酸(Pro),酪氨酸(Tyr),缬氨酸(Val),蛋氨酸(Met),胱氨酸(Cys),异亮氨酸(Ile),亮氨酸(Leu),苯丙氨酸(Phe),赖氨酸(Lys),均购自美国 Waters 有限公司。

异硫氰酸苯酯($\geq 99\%$,东京化成工业株式会社),乙腈(色谱纯,安普试剂),其他试剂均为分析纯,水为自制超纯水。

1.3 药材 菊米是以菊科植物野甘菊(*Dendranthema lavandulifolia*)的花蕾为原料,经杀青烘干制成。于 2011 年采自浙江省丽水市遂昌县石练镇种植基地,在同年度采收期内采摘后,分别应用机械和农户手工两种加工方式进行加工。

机械加工样品为不同批次 10 份样品,为机械控温快速杀青,并采用滚筒式转动加热烘干而成;外观淡黄绿色,色泽均匀,包衣完整,花蕾较紧致。

手工加工样品为种植农户采摘、手工杀青及家

庭简易烘房内托盘烘干而成,共 10 份。外观淡黄褐色,色泽不均匀,包衣较完整,花蕾较松散。

不同采收期样品从菊米成熟开始进行采摘,分为前期(10 月 8 日),中期(10 月 15 日),后期(10 月 22 日),晚期(11 月 2 日)4 个时期,所有样品均采用机械加工处理。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液及试剂配制 对照品溶液:氨基酸混合对照品溶液,胱氨酸浓度为 $1\ 250\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,其余 16 种氨基酸浓度均为 $2\ 500\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,置于冰箱中备用,使用前需在室温下放置 0.5 h。

异硫氰酸苯酯乙腈溶液:准确移取异硫氰酸苯酯溶液 0.12 mL 至 10 mL 量瓶中,用乙腈定容至刻度。

三乙胺乙腈溶液:准确移取三乙胺 1.40 mL 至 10 mL 量瓶中,用乙腈定容至刻度。

10% 乙酸溶液:准确移取乙酸 1.00 mL 于 10 mL 量瓶中,用蒸馏水定容至刻度。

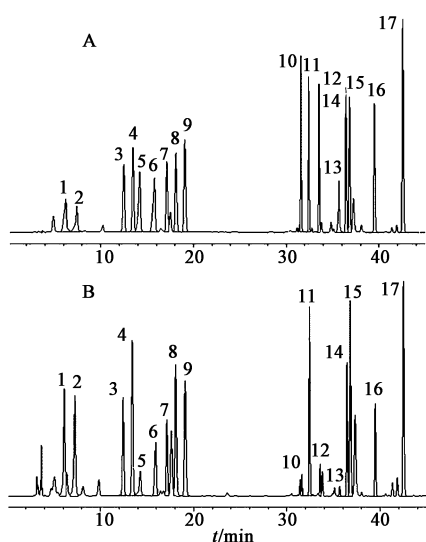
乙酸钠缓冲盐溶液:准确称取三水乙酸钠 2.72 g 溶于 1 000 mL 水中,充分混合后,用 $0.45\ \mu\text{m}$ 水相滤膜过滤,并用 10% 乙酸调 pH 至 6.2,超声 30 min 备用。

2.2 HPLC 色谱条件 Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.02 mol·L⁻¹乙酸钠(含 0.05% 三乙胺,调 pH 6.2)-水,柱温 38 °C,检测波长 254 nm,进样量 10 μL ,流速 1 mL·min⁻¹,梯度洗脱。见图 1。

2.3 菊米样品酸水解及柱前衍生液制备 准确称取 0.5 g 左右的菊米样品,置于水解管中,再加入浓盐酸 7.0 mL,在氮吹仪上向水解管中充入氮气密封后,110 °C 条件下水解 24 h,冷却后过滤至 10 mL 刻度试管中,用少量多次超纯水冲洗水解管,冲洗液合并至刻度试管中,最后用超纯水定容至 10 mL。准确移取 1.0 mL,用三乙胺调 pH 至中性后用超纯水定容至 10 mL。

准确移取酸水解制备液 0.20 mL,置于 2 mL 离心管中,准确加入异硫氰酸苯酯乙腈溶液 0.10 mL,三乙胺乙腈溶液 0.10 mL,摇匀,室温下放置 1 h 后,准确加入 10% 乙酸溶液 30 μL ,摇匀。在离心管中加入正己烷 0.4 mL,振荡 1 min,分层后,取下层溶液,经 $0.45\ \mu\text{m}$ 有机滤膜过滤,待测^[11]。

样品中各氨基酸含量计算公式为 $X = C \times V \times f \times M/m \times 10^6$ 。式中 X 样品中各氨基酸含量, C 为从标准曲线求得样品中各氨基酸的含量, V 为最后



1. Asp; 2. Glu; 3. Ser; 4. Gly; 5. His; 6. Arg; 7. Thr; 8. Ala; 9. Pro; 10. Tyr; 11. Val; 12. Met; 13. Cys; 14. Ile; 15. Leu; 16. Phe; 17. Lys; A. 对照品; B. 供试品

图 1 氨基酸对照和菊米 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatography of 17 amino acids standard and Dendranthema Flos

定容体积, f 为样品稀释倍数为 10, M 为相对分子质量, m 为取样量。

2.4 方法学考察 线性关系:精密移取 2.1 项下混合氨基酸对照品溶液 200, 400, 800, 1 600, 3 200 μL 分别用超纯水定容至 10 mL。按 2.3 项下方法进行衍生处理。依据 2.2 项色谱条件测定各氨基酸峰面积, 以各氨基酸进样浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算的回归方程, 根据 3 倍信噪比 ($S/N = 3$) 确定最低检出限。

稳定性试验:取同一份样品按 2.3 项下方法处理制备样品酸水解液, 按 2.2 项色谱条件, 依次在 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 进样, 测定结果见表 1。

加样回收率试验:精密称取已知含量的同一供试品 9 份, 分别加入 3 个浓度的混合对照品溶液 (分为低、中、高 3 个浓度, $n = 3$)。按 2.3 项下方法处理并衍生, 按 2.2 项下色谱条件测定, 计算各氨基酸含量, 计算回收率, 结果见表 1。

2.5 样品含量测定及数据分析

2.5.1 不同加工方法的菊米样品测定 收集机械加工与手工加工的菊米样品各 10 批, 烘干后, 对样品中的氨基酸进行测定, 结果见表 2。按 2.3 项下方法对菊米样品进行处理, 按 2.2 项色谱条件对样品进行氨基酸含量测定。利用 t 检验比较两种加工方法处理后菊米各氨基酸含量的差异, 方差分析考察不同采收时期的菊米样品氨基酸含量的差异, 使

表 1 衍生液各氨基酸稳定性分析 ($n = 9$)

Table 1 Analysis of amino acid derivatives solution stability ($n = 9$)

氨基酸	平均质量分数 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD / $\%$	平均回收率 / $\%$
天冬氨酸	1 592.60	1.3	97.76
谷氨酸	1 578.75	0.8	94.10
丝氨酸	1 211.11	1.2	93.28
甘氨酸	2 015.46	0.9	91.23
组氨酸	460.25	1.1	97.60
精氨酸	883.30	1.0	95.75
苏氨酸	978.30	0.8	100.95
丙氨酸	1 837.98	1.5	95.95
脯氨酸	1 803.71	0.9	95.06
酪氨酸	118.10	1.6	96.34
缬氨酸	1 608.10	1.2	96.78
蛋氨酸	213.72	1.2	98.27
胱氨酸	105.54	1.5	95.87
异亮氨酸	1 254.33	2.2	89.26
亮氨酸	1 936.90	0.2	95.60
苯丙氨酸	909.42	1.1	92.83
赖氨酸	2 261.62	0.2	96.33

用 SIMCA-P 统计软件 (Version 11.0, Umea, Sweden) 进行偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA), 该分析方法可提供变量重要性投影 (VIP) 参数定量估计每个单元的区分能力, VIP 值可根据自己区分不同类别的能力对描述对象进行分类^[12]。以不同氨基酸含量为变量进行偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA), 分析不同加工方法对菊米氨基酸含量的影响, 结果见图 2。

2.5.2 不同采收时期菊米中氨基酸含量的比较 在采摘期内, 每隔一周采摘一批样品, 采用机械加工, 对样品中的氨基酸进行测定, 结果见表 3 (单位为 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 由数据方差分析结果表明不同采收时期氨基酸含量无显著差异。见表 3。

3 讨论

本试验中采用异硫氰酸苯酯 (PITC) 法柱前衍生处理样品, 利用 HPLC 对石练菊米中 17 种氨基酸进行含量测定, 该方法简便稳定, 可对菊米的氨基酸成分作全面分析。从表 2 统计结果来看, 机械加工样品必需氨基酸和非必需氨基酸含量都比手工加工方法高。此外, 菊米中鲜味和甜味氨基酸占氨基酸总量的 60% 以上 (手工为 63.1%, 机械为 62.3%), 2 种加工样品中苦味氨基酸都占氨基酸总量的

表 2 机械加工与手工加工氨基酸含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Amino acid content of *Dendranthemae* Flos by mechanical and manual processing ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

氨基酸	手工加工/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	机械加工/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	<i>t</i> 检验	VIP
天冬氨酸 (Asp)	15.70 ± 1.85	19.05 ± 1.51	0.000	1.106 09
谷氨酸 (Glu)	23.46 ± 2.29	27.44 ± 3.33	0.004	1.204 8
丝氨酸 (Ser)	5.81 ± 0.44	7.28 ± 0.64	0.000	1.107 5
甘氨酸 (Gly)	5.68 ± 0.34	6.65 ± 0.58	0.000	0.969
组氨酸 (His)	2.76 ± 0.38	3.40 ± 0.27	0.000	0.902 943
精氨酸 (Arg)	6.72 ± 0.75	8.28 ± 0.97	0.000	0.985 427
苏氨酸 (Thr)	5.62 ± 0.47	6.57 ± 0.51	0.000	0.945 908
丙氨酸 (Ala)	6.98 ± 0.60	8.11 ± 0.63	0.000	0.960 388
脯氨酸 (Pro)	7.01 ± 0.84	7.59 ± 0.57	0.071	
酪氨酸 (Tyr)	0.99 ± 0.13	1.26 ± 0.24	0.005	0.898 528
缬氨酸 (Val)	6.76 ± 0.42	8.06 ± 0.68	0.000	1.012 9
蛋氨酸 (Met)	1.13 ± 0.31	1.58 ± 0.25	0.001	0.921 767
胱氨酸 (Cys)	1.42 ± 0.11	1.51 ± 0.17	0.157	
异亮氨酸 (Ile)	5.63 ± 0.35	6.61 ± 0.54	0.000	0.986 937
亮氨酸 (Leu)	8.63 ± 0.55	10.34 ± 0.97	0.000	0.970 048
苯丙氨酸 (Phe)	5.23 ± 0.34	6.19 ± 0.58	0.000	0.974 407
赖氨酸 (Lys)	5.83 ± 0.63	7.75 ± 0.80	0.000	1.004 28
总量	115.37 ± 9.16	137.68 ± 11.19		
必需氨基酸	38.84 ± 2.69	47.11 ± 4.10		
非必需氨基酸	76.54 ± 6.72	90.57 ± 7.31		
鲜味氨基酸	39.16 ± 3.87	46.49 ± 4.22		
甜味氨基酸	33.65 ± 2.63	39.29 ± 2.70		
苦味氨基酸	41.57 ± 3.09	50.64 ± 4.58		
涩味氨基酸	0.99 ± 0.13	1.26 ± 0.24		

注:在测定的 17 中氨基酸中,必需氨基酸有 Lys, Phe, Thr, Ile, Leu, Val;鲜味氨基酸有 Glu, Asp;甜味氨基酸有 Asp, Gly, Phe, Pro;涩味氨基酸有 Tyr;除甜味和苦味氨基酸外其余均为苦味氨基酸。

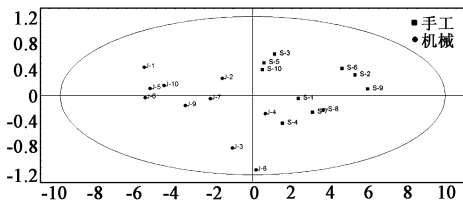


图 2 2 种加工方法菊米的 PLS-DA 分析 Scores

Fig. 2 PLS-DA scores plot of *Dendranthemae* Flos with two processing methods

36%。通过 *t* 检验,两种加工方法处理的菊米 17 种氨基酸中,除脯氨酸和胱氨酸外,其余氨基酸都存在显著差异。通过氨基酸含量 PLS-DA 的分析,两种加工方法具有明显的区分,并且加工方法对天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、缬氨酸和赖氨酸的影响最大 (VIP > 1)。通过氨基酸含量的分析,两种加工方法

具有明显的区分,因此通过氨基酸成分的测定可以判断加工方法的优劣。本课题组曾利用黄酮类等有效成分作为质量指标认为机械加工方法可保证菊米产品的质量^[5],氨基酸分析结果也证明机械加工具有较大优势。菊米采摘后采用机械快速杀青、滚动烘干,可快速杀酶、除去水分,质量易控制,因此菊米在采收期内各批次质量比较均匀,产品均一、质量稳定;而手工加工的菊米产品由于加工过程中受人为因素影响较大,产品色泽、颗粒均匀度较差,造成质量不稳定,批次间差异较大。在整个菊米采收时期,及时采摘成熟的花蕾,并用机械加工处理,分析表明氨基酸含量差异不明显,说明在采收期内,加工方法对菊米的营养成分有一定影响。本试验采用高效液相色谱法分析菊米的营养成分氨基酸含量进行质量评价,也同样

说明了机械加工的优势,因此建议在石练菊米的产区推广机械加工处理方法,可有效控制菊米产品质量。

表 3 不同采收时期的菊米氨基酸含量分析

Table 3 Amino acid content of *Dendranthema Flos* in different harvest times

氨基酸	前期	中期	后期	晚期
天冬氨酸(Asp)	21.54	19.59	19.87	21.98
谷氨酸(Glu)	28.22	28.86	29.19	27.65
丝氨酸(Ser)	7.43	7.05	6.78	7.41
甘氨酸(Gly)	6.94	6.64	6.44	6.76
组氨酸(His)	4.03	3.54	4.37	3.62
精氨酸(Arg)	9.71	9.07	8.67	9.33
苏氨酸(Thr)	7.81	7.40	7.18	7.61
丙氨酸(Ala)	8.90	8.62	8.25	8.70
脯氨酸(Pro)	7.36	7.93	9.15	7.36
酪氨酸(Tyr)	1.37	1.37	1.16	1.33
缬氨酸(Val)	8.42	7.68	8.01	8.19
蛋氨酸(Met)	1.41	1.53	0.80	1.82
胱氨酸(Cys)	1.56	1.51	1.55	1.45
异亮氨酸(Ile)	6.85	6.34	6.60	6.69
亮氨酸(Leu)	10.68	9.98	10.02	10.48
苯丙氨酸(Phe)	6.41	6.05	6.06	6.29
赖氨酸(Lys)	8.32	7.51	7.66	7.74
总量	146.97	140.69	141.75	144.41
必需氨基酸	49.90	46.50	46.33	48.82
非必需氨基酸	97.07	94.19	95.43	95.59
鲜味氨基酸	49.76	48.45	49.05	49.62
甜味氨基酸	41.43	40.69	40.15	41.11
苦味氨基酸	54.41	50.18	51.39	52.35
涩味氨基酸	1.37	1.37	1.16	1.33

[参考文献]

[1] 郑群雄,朱咸浩,姜慧萍.菊米提取物对亚硝化反应抑制作用的研究[J].食品科技,2009,34(2):192-195.

[2] 朱宜根,李子山,罗春华,等.遂昌菊米无公害栽培技术[J].浙江农业科学,2003(4):176-178.

[3] 赵学敏.本草纲目拾遗[M].北京:中国中医药出版社,1998.

[4] 叶挺梅,徐和靖,汪洋,等.菊米提取液舒张血管作用及其机制研究[J].中国病理生理杂志,2007,23(4):644-647.

[5] 孙淑芳,叶拥军,潘心禾,等.不同加工方法对菊米功效成分含量的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(3):79-82.

[6] 张爱莲,魏涛,斯金平,等.铁皮石斛中基本氨基酸含量变异规律[J].中国中药杂志,2011,36(19):2632-2635.

[7] Wang L, Xu R J, Hu B, et al. Analysis of free amino acids in Chinese teas and flower of tea plant by high performance liquid chromatography combined with solid-phase extraction[J]. Food Chemistry, 2010, 123(4):1259-1266.

[8] Kim M Y, Chung L M, Lee S J, et al. Comparison of free amino acid, carbohydrates concentrations in Korean edible and medicinal mushrooms [J]. Food Chem, 2009, 113(2):386-393.

[9] 高向阳,游新侠,牛云辉.柱前衍生-反相高效液相色谱法测定栎果及黄山栎果中的氨基酸含量[J].分析检测,2013,34(16):49-52.

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

[11] 钟其顶,高红波,熊正河,等.PITC柱前衍生高效液相色谱法测定黄酒中17种氨基酸方法研究[J].酿酒,2010,37(5):74-76.

[12] Westerhuis J A, Hoefsloot H C J, Smit S, et al. Assessment of PLS-DA cross validation [J]. Metabolomics, 2008, 4(1):81-89.

[责任编辑 顾雪竹]