

不同产地柏子仁中氨基酸成分比较分析

申枢, 纪思宇, 李瑞海*, 贾天柱, 王东
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的: 测定并对比不同产地柏子仁药材中 18 种氨基酸的含量。方法: 采用柱前衍生-HPLC 测定氨基酸含量, 以 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液在 $110 \text{ }^\circ\text{C}$ 下对柏子仁中的氨基酸进行水解, 2,4-二硝基氟苯作为柱前衍生试剂; 以 Elite-AAK 氨基酸专用分析柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$) 为色谱柱; 以乙腈-水 (1:1)-缓冲盐为流动相, 流速 $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 梯度洗脱, 检测波长 360 nm , 柱温 $27 \text{ }^\circ\text{C}$ 。结果: 18 种氨基酸线性相关度 r 均 $> 0.999 1$, 各氨基酸的加样回收率在 $98.03\% \sim 103.21\%$, 加样回收率均值为 100.36% , $\text{RSD} \leq 1.77\%$ 。结论: 柱前衍生-HPLC 测定柏子仁中氨基酸的方法可行, 为柏子仁药材质量和产地的关系提供一定的依据。

[关键词] 柏子仁; 氨基酸; 柱前衍生化; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)09-0125-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014090125

Comparative Analysis of Amino Acid Composition of Semen Platycladi Herbs from Different Origin

SHEN Shu, JI Si-yu, LI Rui-hai*, JIA Tian-zhu, WANG Dong

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To determine and compare the content of 18 amino acids from the Semen Platycladi Herbs of different origins. **Method:** Pre-column derivatization HPLC method was used for determination of amino acid content. The hydrochloric of Semen Platycladi Herbs with $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ hydrochloric acid solution was at $110 \text{ }^\circ\text{C}$, 2, 4-dinitrofluorobenzene as the pre-column derivatization reagent. Elite-AAK amino acid analysis column ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$); the mobile phase was acetonitrile-water (1:1)-buffer solution, the flow rate was set at $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, gradient elution, detection wavelength was 360 nm , the column temperature was $27 \text{ }^\circ\text{C}$. **Result:** The linear correlation of 18 amino acids was larger than $0.999 1$, each amino acids recoveries between $98.03\% - 103.21\%$, recoveries average of 100.36% , $\text{RSD} \leq 1.77\%$. **Conclusion:** Pre-column derivatization HPLC method for determination of amino acids from the Semen Platycladi Herbs is feasible, which reveals the foundation of the relationship between quality and origin of the Semen Platycladi.

[Key words] Semen Platycladi Herbs; amino acids; pre-colum derivatization; HPLC

柏子仁为柏科植物侧柏 *Platycladus orientalis* (L.) Franco 的干燥成熟种仁, 以子粗, 饱满, 黄白色, 油性大而不泛油, 无皮壳杂质者为佳。柏子仁味

甘, 性平, 归心、肾、大肠经, 有养心安神、敛汗、润肠通便、止汗之功^[1], 用于阴血不足、心悸怔忡、失眠健忘、盗汗、肠燥便秘。本实验采用柱前衍生化高效液相色谱法检测柏子仁中含量氨基酸的含量, 并对不同产地的柏子仁药材中 18 种氨基酸进行测定含量测定, 以期对柏子仁药材的质量评价及氨基酸含量研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器 P230II 依利特氨基酸自动分析仪, EC2006-色谱数据处理工作站, UV230II 型紫外检测器 (大连依利特分析仪器有限公司), ALC-110.4 型电

[收稿日期] 20130523(004)

[基金项目] 国家药典委员会国家药品标准科研项目

[第一作者] 申枢, 硕士, 从事中药分析方面研究, Tel: 0411-87581111, E-mail: candyshenshu@163.com

[通讯作者] *李瑞海, 博士, 副教授, 研究生导师, 从事药物制剂研究, Tel: 0411-87581120, E-mail: liruihai_fengli@163.com

子分析天平(北京赛多利斯),HH-4 型数显恒温水浴锅(江苏荣华),SF-130B 型高速粉碎仪器机(上海冠联),DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏)。

1.2 试药 氨基酸对照品(大连依利特,批号 20100108),衍生化试剂为 2,4-二硝基氟苯(大连依利特分析仪器有限公司),乙腈为色谱纯,*N,N*-二甲基酰胺,冰醋酸为分析纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。不同产地柏子仁药材经辽宁中医药大学教授尹海波鉴定均为柏科植物侧柏 *Platycladus orientalis* (L.) Franco 的干燥成熟种仁,药材产地:S1 河北购于江西、S2 江苏、S3 安徽亳州、S4 福建福州、S5 江西樟树、S6 贵州贵阳、S7 山东购于浙江宁波、S8 江西、S9 河北安国、S10 安徽亳州、S11 四川、S12 山东购于湖南、S13 内蒙古赤峰、S14 河北购于山东济宁、S15 山东购于辽宁本溪、S16 广东、S17 山东购于天津、S18 河北购于辽宁朝阳。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用氨基酸色谱柱,柱温 27 °C,检测波长 360 nm^[2],流速 1.2 mL·min⁻¹,进行梯度洗脱,梯度洗脱曲线设定时间(A 相百分比):0(16),0.3(16),4(31),9.5(36),17(55),28(65),34(100),36(100),38(16)。

2.2 流动相的配制 流动相 A 为乙腈-水(1:1);流动相 B 为流动相固体组分 B4.1 g 加水 950 mL 溶解,再用冰醋酸调至 pH 为 6.4~6.8,加入 10 mL *N,N*-二甲基酰胺,以水定容于 1 000 mL 量瓶中,摇匀,备用。

2.3 衍生缓冲溶液的配制 分别称取衍生缓冲溶液固体组分 A 1.24 g,固体组分 B 7.63 g,加入至 500 mL 量瓶中,以水定容,摇匀,备用。

2.4 平衡缓冲溶液的配制 分别称取平衡缓冲溶液固体组分 A 0.91 g,固体组分 B 3.58 g,加入至 250 mL 量瓶中,以水定容,摇匀,备用。

2.5 对照品溶液的制备 取氨基酸对照品,精密称定,加入衍生缓冲溶液适量于 60 °C 水浴中溶解,冷却至室温,加衍生缓冲液定容至 250 mL 量瓶中,混匀,备用。

2.6 供试品溶液的制备^[3-4] 称取样品粉末约 0.05 g,精密称定,置具塞试管中,加入 3 mL 6 mol·L⁻¹ 盐酸^[5],混匀,放至烘箱中 110 °C 水解 24 h。将水解后样品转入蒸发皿中,并多次用水洗涤,洗液一并转入蒸发皿中,于 80 °C 水浴中蒸干,再以衍生缓冲溶液多次洗涤蒸发皿,洗液转入 25 mL 量瓶中定容,混匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.7 溶液的衍生化反应 分别精密吸取氨基酸对

照品 4 mL、样品溶液 2 mL 置于 10 mL 棕色量瓶中,再分别加入衍生化试剂 2 mL 和 1 mL,混匀,于 60 °C 水浴中暗处反应 1 h,反应完毕,取出冷却至室温,加平衡缓冲溶液定容,混匀,静置 15 min,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.8 标准曲线的绘制 分别精密量取经衍生化处理后的氨基酸对照品溶液 4,8,12,16,20 μL,按 2.1 项下的色谱条件,进样测定,以各氨基酸对照品溶液的进样量 *X* (μg) 为横坐标,其相应的峰面积为纵坐标 *Y*,绘制标准曲线,各氨基酸成分的回归方程及线性范围见表 1。结果表明,18 种氨基酸线性关系良好,可用外标法进行测定。

表 1 各氨基酸的回归方程及线性范围

| 氨基酸组分 | 回归方程 | 线性范围/μg |
|-------|--|-------------|
| 天冬氨酸 | $Y=5.2738 \times 10^3 X + 8.1440 (r=0.9991)$ | 0.034~0.169 |
| 谷氨酸 | $Y=4.9908 \times 10^3 X + 3.1960 (r=0.9993)$ | 0.032~0.160 |
| 丝氨酸 | $Y=6.6080 \times 10^3 X + 0.7950 (r=0.9994)$ | 0.031~0.153 |
| 精氨酸 | $Y=2.2998 \times 10^3 X + 9.4750 (r=0.9992)$ | 0.034~0.169 |
| 甘氨酸 | $Y=1.0839 \times 10^4 X + 0.3120 (r=0.9994)$ | 0.032~0.156 |
| 苏氨酸 | $Y=5.5166 \times 10^3 X + 7.1380 (r=0.9994)$ | 0.032~0.160 |
| 脯氨酸 | $Y=5.1410 \times 10^3 X + 8.3570 (r=0.9991)$ | 0.032~0.156 |
| 丙氨酸 | $Y=8.4926 \times 10^3 X - 1.6190 (r=0.9993)$ | 0.033~0.163 |
| 缬氨酸 | $Y=6.3008 \times 10^3 X + 4.7190 (r=0.9991)$ | 0.032~0.156 |
| 蛋氨酸 | $Y=1.3805 \times 10^3 X + 1.0080 (r=0.9993)$ | 0.032~0.156 |
| 半胱氨酸 | $Y=1.1480 \times 10^3 X + 1.3660 (r=0.9991)$ | 0.032~0.160 |
| 异亮氨酸 | $Y=5.9109 \times 10^3 X + 1.5140 (r=0.9995)$ | 0.031~0.153 |
| 亮氨酸 | $Y=6.0631 \times 10^3 X + 2.7040 (r=0.9994)$ | 0.033~0.163 |
| 色氨酸 | $Y=4.7919 \times 10^3 X + 2.1370 (r=0.9992)$ | 0.033~0.163 |
| 苯丙氨酸 | $Y=1.7840 \times 10^3 X + 0.4290 (r=0.9991)$ | 0.033~0.163 |
| 组氨酸 | $Y=5.5291 \times 10^3 X + 2.7540 (r=0.9994)$ | 0.032~0.160 |
| 赖氨酸 | $Y=6.5413 \times 10^3 X + 10.208 (r=0.9992)$ | 0.032~0.160 |
| 酪氨酸 | $Y=3.1078 \times 10^3 X - 1.2930 (r=0.9992)$ | 0.018~0.086 |

2.9 方法学考察

2.9.1 精密度试验 吸取经衍生化处理后氨基酸对照品混合溶液 10 μL,连续进样 6 次,结果各氨基酸峰面积的 RSD 均 < 1.96%,说明仪器精密度良好。

2.9.2 重复性试验 分别称取 S2 样品 6 份(每份约 0.05 g),精密称定,按 2.6 项下方法制备供试品溶液,按 2.7 项下方法进行衍生化,依据 2.1 项下色谱条件,分别测定,结果各氨基酸峰面积 RSD < 1.98%,表明方法重复性良好。

2.9.3 稳定性试验 取 S2 供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件,于 0,2,4,6,8,10,12,24 h 进样测定,

结果各氨基酸峰面积的 RSD < 1.97%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9.4 加样回收率试验 取 S2 样品各 6 份(每份 0.025 g),精密称定,按 2.6 项下进行制备,精密加入 10 mL 于 50 mL 棕色量瓶中,再分别精密加入 2.5 项下对照品溶液 5 mL 后,按 2.7 项下方法进行衍生化,定容,混匀,按 2.1 项下色谱条件测定,结果

各氨基酸峰面积的 RSD < 1.85%,说明此方法准确度良好。

2.10 含量测定 分别吸取已衍生化的各供试品溶液 10 μ L,按 2.1 项下色谱条件测定,记录各供试品所含相对应的 18 种氨基酸的色谱图,采用外标一点法依据各标准曲线的回归方程,计算个氨基酸的含量,见表 2。

表 2 不同产地柏子仁药材中各氨基酸含量

mg·g⁻¹

| 氨基酸组分 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 天冬氨酸 | 22.79 | 19.60 | 31.87 | 21.17 | 20.48 | 8.36 | 22.93 | 16.64 | 18.38 |
| 谷氨酸 | 51.34 | 45.68 | 70.39 | 45.71 | 46.46 | 14.95 | 50.37 | 35.27 | 40.93 |
| 丝氨酸 | 12.18 | 10.32 | 15.67 | 10.45 | 10.75 | 4.68 | 11.49 | 9.88 | 9.48 |
| 精氨酸 | 49.47 | 39.43 | 66.21 | 43.70 | / | 8.58 | 49.74 | 29.26 | 30.36 |
| 甘氨酸 | 16.17 | 13.95 | 22.28 | 14.78 | 24.08 | 5.49 | 16.66 | 11.62 | 12.26 |
| 苏氨酸* | 6.37 | 5.62 | 8.88 | 5.85 | 5.90 | 2.95 | 6.37 | 5.06 | 5.53 |
| 脯氨酸 | 9.93 | 8.97 | 13.85 | 9.30 | 8.98 | 3.64 | 9.83 | 7.38 | 8.28 |
| 丙氨酸 | 11.04 | 9.95 | 14.84 | 10.02 | 10.19 | 4.80 | 10.99 | 8.45 | 9.04 |
| 缬氨酸* | 11.47 | 9.86 | 14.69 | 9.70 | 34.59 | 3.74 | 11.28 | 7.67 | 8.49 |
| 蛋氨酸* | 8.68 | 7.24 | 8.35 | 5.04 | 3.42 | / | 9.02 | 4.25 | 6.10 |
| 半胱氨酸 | 13.24 | 11.39 | 20.46 | 11.43 | 10.47 | / | 13.13 | 7.11 | 5.40 |
| 异亮氨酸* | 9.60 | 8.22 | 12.47 | 8.32 | 8.33 | 3.38 | 9.46 | 6.66 | 7.38 |
| 亮氨酸* | 13.65 | 11.83 | 18.62 | 12.50 | 12.43 | 5.16 | 13.54 | 9.87 | 10.80 |
| 色氨酸* | 11.73 | 9.95 | 15.74 | 10.62 | 10.52 | 3.93 | 11.80 | 8.13 | 8.50 |
| 苯丙氨酸* | 13.68 | 10.50 | 18.14 | 12.31 | 11.10 | 3.15 | 13.86 | 8.85 | 7.66 |
| 组氨酸 | 12.56 | 15.52 | 33.11 | 24.58 | 19.89 | 27.02 | 19.94 | 25.93 | 22.07 |
| 赖氨酸* | 9.39 | 6.77 | 8.76 | 6.82 | 1.43 | 3.41 | 8.36 | 5.86 | 3.64 |
| 酪氨酸 | 9.37 | 10.66 | 4.16 | 4.34 | 1.09 | 7.98 | 10.26 | 3.54 | 1.89 |
| T | 292.66 | 255.46 | 398.49 | 266.64 | 240.12 | 111.22 | 299.03 | 211.43 | 216.19 |
| E | 131.34 | 115.82 | 187.91 | 126.49 | 137.25 | 61.18 | 137.58 | 105.22 | 102.89 |
| 天冬氨酸 | 16.64 | 23.80 | 22.42 | 14.43 | 19.25 | 23.81 | 20.79 | 17.42 | 17.00 |
| 谷氨酸 | 34.36 | 50.95 | 49.34 | 32.70 | 42.21 | 51.87 | 43.93 | 38.21 | 34.92 |
| 丝氨酸 | 8.61 | 12.27 | 11.23 | 7.45 | 9.25 | 11.52 | 10.18 | 8.65 | 8.80 |
| 精氨酸 | 30.65 | 48.11 | 43.36 | 28.21 | 31.17 | 52.90 | 41.96 | 34.21 | 30.55 |
| 甘氨酸 | 11.54 | 17.45 | 15.77 | 10.43 | 12.40 | 16.84 | 14.34 | 12.06 | 11.68 |
| 苏氨酸* | 4.86 | 6.43 | 6.40 | 4.40 | 5.76 | 6.60 | 5.84 | 4.82 | 4.87 |
| 脯氨酸 | 6.96 | 9.93 | 9.77 | 6.57 | 7.78 | 10.11 | 8.93 | 7.39 | 7.17 |
| 丙氨酸 | 1.05 | 11.65 | 10.74 | 7.40 | 8.89 | 11.35 | 9.90 | 8.82 | 8.23 |
| 缬氨酸* | 7.92 | 11.50 | 11.14 | 7.16 | 9.00 | 11.53 | 9.43 | 8.17 | 7.64 |
| 蛋氨酸* | 5.14 | 7.23 | 9.02 | 5.23 | 6.96 | 8.40 | 6.33 | 5.31 | 3.36 |
| 半胱氨酸 | 7.34 | 12.39 | 11.83 | 7.86 | 7.86 | 12.42 | 11.03 | 7.18 | 7.55 |
| 异亮氨酸* | 6.71 | 9.63 | 9.40 | 6.01 | 7.58 | 9.79 | 8.21 | 7.04 | 6.72 |
| 亮氨酸* | 9.71 | 13.74 | 13.63 | 9.29 | 11.39 | 14.00 | 12.27 | 10.10 | 10.04 |
| 色氨酸* | 8.03 | 11.77 | 11.58 | 7.53 | 8.85 | 12.04 | 10.48 | 8.48 | 8.31 |
| 苯丙氨酸* | 8.59 | 13.18 | 13.77 | 9.03 | 9.90 | 14.05 | 11.51 | 8.66 | 9.14 |
| 组氨酸 | 18.07 | 19.67 | 18.10 | 17.87 | 29.20 | 19.65 | 27.55 | 17.19 | 27.69 |
| 赖氨酸* | 4.85 | 7.79 | 8.34 | 5.16 | 6.19 | 8.74 | 7.80 | 5.66 | 5.72 |
| 酪氨酸 | 4.43 | 8.17 | 6.74 | 5.75 | 8.52 | 7.79 | 7.40 | 8.49 | 5.19 |
| T | 195.46 | 295.66 | 282.58 | 192.48 | 242.16 | 303.41 | 267.88 | 217.86 | 214.58 |
| E | 89.23 | 134.91 | 133.72 | 93.51 | 119.36 | 138.68 | 129.28 | 98.82 | 102.84 |

注:带*的为人必需氨基酸,T为氨基酸总量,E为必需氨基酸总量。

药用植物三尖杉内生真菌的分离鉴定及抗菌活性

刘兆迪¹, 解修超^{1,2}, 陈文强^{1,2*}, 阮昌应¹, 彭浩^{1,2}, 邓百万^{1,2}

(1. 陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001;

2. 陕西省食药菌工程技术研究中心, 陕西 汉中 723001)

[摘要] 目的: 研究药用植物三尖杉 *Cephalotaxus fortunei* 内生真菌的分离鉴定及抗菌活性。方法: 用组织培养方法从野生三尖杉的根、茎、叶中分离内生真菌, 采用滤纸片扩散法对分离得到的内生真菌的代谢产物做抑菌活性研究。结果: 分别从三尖杉根、茎、叶中共分离得到 30 株内生真菌; 抑菌活性研究显示, 有 20 株内生真菌的代谢产物至少对 1 种靶标菌有抑制活性, 占总分离菌株的 66.7%, 其中菌株 CFEF013 对所有靶标菌均有抑制作用; 经形态学和分子生物学鉴定, 对 7 株具有较强抑菌活性的菌株分属镰孢菌属 *Fusarium* 4 株, 壳囊孢属 *Cytospora* 1 株, 拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* 1 株, 毛霉菌属 *Mucor* 1 株。结论: 药用植物三尖杉内生真菌种类具有一定的多样性, 内生真菌代谢产物抑菌活性良好。

[关键词] 三尖杉; 内生真菌; 分离; 鉴定; 抗菌活性

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)09-0128-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014090128

Isolation, Identification and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi from Medical Plant *Cephalotaxus fortunei*

LIU Zhao-di¹, XIE Xiu-chao^{1,2}, CHEN Wen-qiang^{1,2*}, RUAN Chang-ying¹, PENG Hao^{1,2}, DENG Bai-wan^{1,2}

(1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China;

2. Shaanxi Engineering Research Center of Edible and Medicated Fungi, Hanzhong 723001, China)

[收稿日期] 20130624(002)

[基金项目] 陕西省教育厅专项科研计划基金项目(08JK247); 陕西理工学院人才引进科研启动项目(SLGQD0717)

[第一作者] 刘兆迪, 在读硕士, 从事植物内生菌的资源开发利用研究, E-mail: seven9870@126.com

[通讯作者] * 陈文强, 教授, 从事微生物资源保护与开发利用研究, E-mail: wenqiange@126.com

3 小结

由结果可知, 各样品中所含氨基酸成分均以谷氨酸含量最高, 而谷氨酸具有益智、活跃思维等作用。亮氨酸可以缓解偏头痛, 缓和焦躁及紧张情绪, 色氨酸有促进睡眠的作用, 二者在柏子仁中所占比例也较高, 这些与柏子仁所具有的益智、宁心安神的功效是相一致。研究结果还发现, 不同产地柏子仁中所含上述 3 种氨基酸含量、总氨基酸含量及必需氨基酸含量均以安徽亳州(S3)的含量最高, 以贵州贵阳(S6)的含量最低, 而且未检出蛋氨酸和半胱氨酸。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北

京: 中国医药科技出版社, 2010: 231.

[2] 罗兰, 张素中, 黄月纯, 等. 玉屏风煎剂中氨基酸类成分 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 64.

[3] 王殿波, 陈斌, 单舒筠, 等. 不同生境及地区哈蟆油药材中氨基酸成分比较分析[J]. 中国现代中药, 2012, 14(2): 8.

[4] 肖培云, 杨永寿, 施贵荣, 等. 美洲大蠊药材中氨基酸含量的柱前衍生化高效液相色谱法测定[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 525.

[5] 欧金秀, 谷陟欣, 张妮瑜, 等. 柱前衍生 HPLC 同时测定驴胶补血颗粒中 6 种水解氨基酸[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 93.

[责任编辑 邹晓翠]