

# 柱前衍生化 RP-HPLC 同时测定不同产区锁阳中 17 种游离氨基酸含量及其多元统计分析

顾志荣<sup>1</sup>, 马转霞<sup>2</sup>, 马天翔<sup>2</sup>, 萨日娜<sup>1</sup>, 刘洁丽<sup>2</sup>, 吴国泰<sup>3</sup>, 祁梅<sup>1\*</sup>, 葛斌<sup>1\*</sup>

(1. 甘肃省人民医院, 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000;

3. 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 兰州 730000)

**[摘要]** **目的:** 建立柱前衍生化反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 同时测定不同产区锁阳中 17 种游离氨基酸含量的方法并进行多元统计分析。**方法:** 采用柱前衍生化 RP-HPLC 检测, 以异硫氰酸苯酯 (PITC) 为衍生化试剂, 采用 WondaSil C<sub>18</sub>-WR 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相 A 为 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸钠缓冲液 (pH 6.5), 流动相 B 为乙腈-甲醇-水 (3:1:1), 梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 254 nm, 柱温 35 °C。建立主成分分析 (PCA) 及系统聚类分析 (HCA) 模型进行多元统计分析并进行质量评价。**结果:** 从锁阳中共分离鉴定了 17 种氨基酸, 含 7 种人体必需氨基酸。17 种氨基酸在各自质量浓度范围内呈良好线性关系, *r* 在 0.999 0 ~ 0.999 9; 平均回收率在 98.03% ~ 103.89%, RSD 均 < 3.5%。PCA 和 HCA 结果基本一致, 均可将 12 个市级产区明显区分为 6 个区域; PCA 可根据不同市级或省级产区对锁阳进行聚类, 而 HCA 可根据省级产区对锁阳进行归类, 说明不同市级、省级产区锁阳的氨基酸含量具有产区差异性, 且含量分布表现出明显的地域聚集性特点; PCA 表明甘肃、内蒙古所产锁阳氨基酸含量较高, 质量较佳。**结论:** 所建方法可用于不同产区锁阳中 17 种游离氨基酸的含量测定, 为其综合质量评价提供参考。

**[关键词]** 锁阳; 氨基酸; 异硫氰酸苯酯; 柱前衍生化; 反相高效液相色谱; 主成分分析; 系统聚类分析; 质量评价

**[中图分类号]** R284.1; R917; R289; R22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)10-0148-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200711

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191207.1049.001.html>

**[网络出版时间]** 2019-12-07 14:20

## Pre-column Derivatization RP-HPLC for Simultaneous Determination of 17 Amino Acids in Cynomorii Herba from Different Producing Areas and Its Multivariate Statistical Analysis

GU Zhi-rong<sup>1</sup>, MA Zhuan-xia<sup>2</sup>, MA Tian-xiang<sup>2</sup>, SA Ri-na<sup>1</sup>, LIU Jie-li<sup>2</sup>,

WU Guo-tai<sup>3</sup>, QI Mei<sup>1\*</sup>, GE Bin<sup>1\*</sup>

(1. Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China;

2. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

3. Gansu Province Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a pre-column derivatization reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method for the simultaneous determination of 17 amino acids in Cynomorii Herba from different producing areas and conduct a multivariate statistical analysis. **Method:** RP-HPLC with pre-column

**[收稿日期]** 20191201(007)

**[基金项目]** 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室开放基金项目 (ZDSYS-KJ-2018-010); 甘肃省中药质量与标准研究重点实验室基金项目 (ZYZL18-004); 甘肃省人民医院研发攻关项目 (18GSSY2-3)

**[第一作者]** 顾志荣, 硕士, 主管中药师, 从事中药分析与质量控制研究, E-mail: guzr8817@126.com

**[通信作者]** \* 葛斌, 主任药师, 从事中药分析与质量控制研究, Tel: 0931-8281345, E-mail: gjy0630@163.com;

\* 祁梅, 副主任药师, 从事中药分析与质量控制研究, Tel: 0931-8281933, E-mail: gssyqm@163.com

derivatization was employed, with phenyl isothiocyanate (PITC) as derivatization reagent. Separation was performed on a WondaSil C<sub>18</sub>-WR column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), with 0.05 mol·L<sup>-1</sup> sodium acetate solution (pH 6.5) as mobile phase A, and acetonitrile-methanol-water (3:1:1) as mobile phase B for gradient elution at a flow rate of 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. The detective wave length was set at 254 nm, and the column temperature was maintained at 35 °C. Principal component analysis (PCA) and systematic cluster analysis (HCA) models were established for multivariate statistical analysis and quality evaluation. **Result:** 17 Kinds of amino acid were detected in Cynomorii Herba, 7 of which were essential amino acids. The 17 amino acids showed good linearity in respective concentration range,  $r = 0.999\ 0\text{-}0.999\ 9$ . The average recoveries were between 98.03% -103.89% with RSD <3.5%. The results of PCA and HCA were basically the same, and both methods can be used to clearly distinguish Cynomorii Herba from 12 municipal producing areas into 6 regions. PCA can be used to classify Cynomorii Herba according to different municipal or provincial production areas, and HCA can be used to classify it according to provincial production areas. It showed that the amino acid contents in Cynomorii Herba from different municipal and provincial producing areas had differences, and the content distribution showed obvious geographical clustering characteristics. PCA showed that Cynomorii Herba from Gansu province and Inner Mongolia had higher amino acid contents and better quality as compared with other producing areas. **Conclusion:** The established method can be used for content determination of 17 amino acids in Cynomorii Herba from different producing areas, and provide a reference for its comprehensive quality evaluation.

**[Key words]** Cynomorii Herba; amino acid; PITC; pre-column derivatization; RP-HPLC; Principal component analysis; systematic cluster analysis; quality evaluation

锁阳是锁阳科多年生肉质寄生草本植物锁阳的干燥肉质茎,资源主要分布在甘肃、内蒙古、新疆、青海等地区的沙漠和半沙漠地带<sup>[1]</sup>。本品功能补肾助阳、益精养血、润肠通便,是中、藏、蒙古族医的常用药,也是一种常见的功能保健食品,如锁阳咖啡、锁阳茶、锁阳油饼、锁阳酒等<sup>[2]</sup>。现代研究证实,锁阳主要含黄酮类、三萜类、多糖类、有机酸、鞣质等广泛的化学成分,具有提高免疫、改善性机能和肾功能、抗衰老、抗疲劳、益智、抗应激、抗血小板聚集等多种药理作用<sup>[3-4]</sup>,有“不老药”“沙漠人参”等美誉。

氨基酸是蛋白质的基本结构单位和生物代谢过程中的重要物质,是人体必需营养成分之一,能够促进机体新陈代谢,调节生理机能,供应能量物质。对于人体不能自身合成或合成不足的氨基酸,锁阳含有 8 种人体必需氨基酸中的 7 种,以及 5 种人体半必需氨基酸中的全部。其中,精氨酸有促进伤口愈合、调节免疫、抗肿瘤等作用<sup>[5-6]</sup>;胱氨酸具有促进细胞氧化还原、改善肝脏功能、促进白细胞增生等作用<sup>[7]</sup>;亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸一起能够修复肌肉损伤,控制血糖<sup>[8]</sup>;苯丙氨酸既可以抑制肿瘤生长,又可降低抗癌药物的毒副作用<sup>[9]</sup>;蛋氨酸能够促进脂肪吸收,保肝,防治肝脂肪蓄积<sup>[10]</sup>等,这些都与锁阳提高免疫、抗衰老、抗疲劳、抗肿瘤、抗血小板聚集等多种药理作用密切相关。因此,氨基酸是锁阳的

重要功能物质,是其营养优劣及品质评价的重要依据,并对锁阳来源的氨基酸补充剂及新药研发具有重要意义<sup>[11]</sup>。

目前对锁阳的研究主要集中在黄酮类、多糖类等化学成分及其神经系统、生殖系统等药理药效研究方面<sup>[12-13]</sup>,而对锁阳氨基酸含量及其生物功能研究极少,仅有符波等<sup>[14]</sup>采用氨基酸自动分析仪测定氨基酸含量的报道。氨基酸分析仪是早年定量分析氨基酸的技术手段,多采用茚三酮柱后衍生染色,其缺点是样品发色率会随时间推移而降低,常需随时采用已知浓度的氨基酸标准液进行校正,因此检测限与灵敏度均不如当前应用较多的柱前衍生 RP-HPLC 法<sup>[15]</sup>。本实验建立柱前衍生 RP-HPLC 法同时测定锁阳中 17 种游离氨基酸含量的方法,采用多元统计模型比较不同产区锁阳氨基酸含量及其分布特点,并进行质量评价,为锁阳的综合质量评价及道地性研究提供技术参考。

## 1 材料

岛津 LC-16 型高效液相色谱仪(日本岛津仪器有限公司,配置 SIL-16 型自动进样器,SPD-16 型紫外-可见双波长检测器,CTO-16 型柱温箱,LabSolutions 化学工作站);AL204 型 1/1 万电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);SB25-12DTD 型超声波清洗机(宁波新芝公司);DD-5M 型低速大容量离

离心机(湘仪离心机仪器有限公司)。

氨基酸混合对照品(美国 Sigma-Aldrich 公司, 规格 10 mL, 批号 1002340640), 含丙氨酸(Ala), 精氨酸(Arg), 门冬氨酸(Asp), 胱氨酸(Cys), 谷氨酸(Glu), 甘氨酸(Gly), 组氨酸(His), 异亮氨酸(Ile), 亮氨酸(Leu), 赖氨酸(Lys), 蛋氨酸(Met), 苯丙氨酸(Phe), 脯氨酸(Pro), 丝氨酸(Ser), 苏氨酸(Thr), 酪氨酸(Tyr), 缬氨酸(Val) 17 种氨基酸, 其中 Cys 浓度为  $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 其他氨基酸浓度为  $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。PITC(色谱纯, 上海麦克林生化科技有限公司, 纯度  $\geq 99.9\%$ , 批号 C10274304), 乙

腈、甲醇、正己烷为色谱纯, 三乙氨、乙醇为分析纯, 水为超纯水。

65 批锁阳药材, 采集于甘肃、内蒙古、新疆、青海、宁夏 5 个省(区), 包括武威、酒泉、敦煌、张掖、阿拉善右旗、阿拉善左旗、喀什、和田、阿勒泰、海西、海南、石嘴山 12 个市(区/州/旗)。采挖时以 GPS 实时定位并记录海拔, 气候类型。所有样品均经甘肃中医药大学中药鉴定教研室李硕副教授鉴定为锁阳科多年生肉质寄生草本植物锁阳 *Cynomorium songaricum* 的干燥肉质茎。将样品自然阴干, 粉碎至过 80 目筛, 冷藏备用。样品信息见表 1。

表 1 锁阳样品信息

Table 1 Sample information of *Cynomorii herba* from 12 producing areas

产地	批次	编号	海拔/m	气候类型
甘肃省酒泉市敦煌市	5	DH1 ~ DH5	958 ~ 1 815	暖温带干旱性气候
甘肃省酒泉市金塔县	7	JQ6 ~ JQ12	1 233 ~ 1 421	温带大陆性荒漠气候
甘肃省酒泉市瓜州县	7	JQ13 ~ JQ19	1 063 ~ 1 590	温带大陆性气候
甘肃省武威市民勤县	7	W20 ~ W26	1 293 ~ 1 545	温带大陆性干旱气候
甘肃省张掖市肃南县	6	ZY27 ~ ZY32	1 475 ~ 3 154	温带大陆性气候
内蒙古阿拉善盟阿拉善左旗苏红图	5	AZ33 ~ AZ37	789 ~ 1 541	中温带大陆性气候
内蒙古阿拉善右旗阿拉腾	4	AY38 ~ AY41	1 299 ~ 1 503	温带大陆性气候
宁夏省石嘴山市平罗县	4	SZ42 ~ SZ45	1 103 ~ 1 247	温带大陆性气候
新疆和田地区和田县	4	HT46 ~ HT49	2 875 ~ 3 436	温带极端干旱荒漠气候
新疆喀什地区喀什市疏附县	4	KS50 ~ KS53	1 229 ~ 1 312	暖温带大陆性干旱气候
新疆阿勒泰地区阿勒泰市	4	AL54 ~ AL57	813 ~ 1 003	温带大陆性气候
青海省海南藏族自治州同德县	4	HN58 ~ HN61	2 926 ~ 3 266	高原大陆性气候
青海省海西蒙古族藏族自治州格尔木戈壁滩	4	HX62 ~ HX65	2 815 ~ 2 833	荒漠、半荒漠大陆性气候

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 采用日本岛津 WondaSil C<sub>18</sub>-WR 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 柱温 35 °C, 流动相 A 为  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸钠缓冲液(以乙酸调 pH 6.5), 流动相 B 为乙腈-甲醇-水(3:1:1), 梯度洗脱(0 ~ 10 min, 6% ~ 13% B; 10 ~ 30 min, 13% ~ 21% B; 30 ~ 40 min, 21% ~ 27% B; 40 ~ 59 min, 27% ~ 48% B; 59 ~ 60 min, 48% ~ 100% B)。流速为  $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 检测波长 254 nm, 进样量 10 μL。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 衍生试剂** 衍生试剂 A: 取三乙胺 1.4 mL, 以乙腈溶液定容到 10 mL 量瓶中, 混匀; 衍生试剂 B: 取 PITC 0.135 2 g, 以乙腈溶液定容到 10 mL 量瓶中, 混匀。均于冰箱中 4 °C 保存<sup>[16]</sup>。

**2.2.2 对照品溶液** 精密吸取氨基酸混合对照品溶液 1 mL, 置于 10 mL 离心管中, 加入衍生试剂 A 和 B 各 150 μL, 混匀, 室温避光放置 1 h, 加入正己烷 5 mL, 振荡, 放置 10 min, 取下层液, 制得混合对照品衍生化溶液。

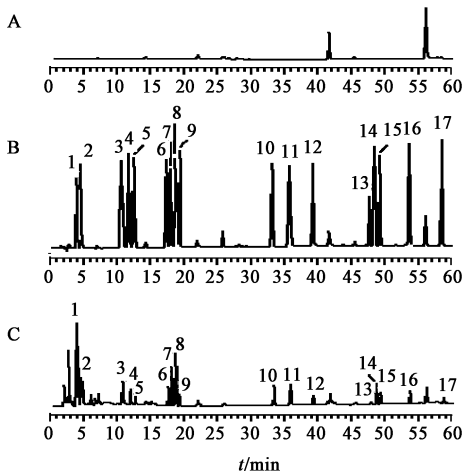
**2.2.3 供试品溶液** 精密称取锁阳粉末约 0.3 g, 置 25 mL 具塞锥形瓶中, 加入 50% 乙醇 25 mL, 称重, 摇匀, 超声(15 °C, 40 kHz) 提取 60 min, 放至室温, 以 50% 乙醇补足减失的质量, 摇匀,  $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 取上清 1 mL, 置于 10 mL 离心管中, 按 2.2.2 项下方法自“加入衍生试剂 A 和 B 各 150 μL”起操作, 制备供试品衍生化溶液。

**2.2.4 空白溶液** 精密吸取  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液 1 mL, 置于 10 mL 离心管中, 按 2.2.2 项下方法自

“加入衍生试剂 A 和 B 各 150  $\mu\text{L}$ ”起操作,制备空白衍生生化溶液。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 系统适用性试验** 取混合对照品衍生生化溶液、供试品衍生生化溶液及空白衍生生化溶液各 10  $\mu\text{L}$ ,按 2.1 项下色谱条件进行检测。结果 17 种氨基酸衍生物的色谱峰分离度良好,空白无干扰,色谱图见图 1。



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

图 1 空白衍生生化溶液 (A), 混合对照品衍生生化溶液 (B) 及典型锁阳供试品衍生生化溶液 (C) HPLC 色谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank derivatization solution (A), reference substance derivatization solution (B) and typical sample derivatization solution (C)

**2.3.2 线性关系考察** 精密吸取 2.2.2 项下混合对照品衍生生化溶液 0.3 mL,置于 5 mL 量瓶中,加入 0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸溶液定容至刻度,再分别精密吸取 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL, 分别置于 100 mL 量瓶中,加入 0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸溶液定容至刻度,按 2.2.2 项下方法自“加入衍生试剂 A 和 B 各 150  $\mu\text{L}$ ”起操作,制备系列混合对照品衍生生化溶液,按 2.1 项下色谱条件进样 10  $\mu\text{L}$ ,测定峰面积。分别以氨基酸质量浓度 ( $X, \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 为横坐标,相应的氨基酸衍生生物峰面积 ( $Y$ ) 为纵坐标,绘制标准曲线,求回归方程。见表 2。

**2.3.3 精密度试验** 取 DH1 样品的供试品衍生生化溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积,结果 17 种氨基酸衍生生物峰面积的 RSD 在 0.9% ~ 2.8%,表明仪器精密度良好。

**2.3.4 稳定性试验** 取 DH1 样品的供试品衍生生化溶液,按 2.1 项下色谱条件分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24 h 进样,记录峰面积,结果 17 种氨基酸衍生生物峰面积的 RSD 在 1.1% ~ 2.9%,表明供试品溶液衍生生化后在 24 h 内稳定。

**2.3.5 重复性试验** 精密称取 DH1 样品 6 份,每份约 0.3 g,按 2.2.3 项下方法制备供试品衍生生化溶液,按 2.1 项下色谱条件测定峰面积,计算 17 种氨基酸含量,结果 RSD 在 1.2% ~ 2.2%,表明该方法重复性良好。

**2.3.6 加样回收率试验** 精密称取已测得含量的

表 2 17 种氨基酸的线性关系

Table 2 Linearity relationships of 17 amino acids

峰号	氨基酸	回归方程	$r$	线性范围/ $\mu\text{g}$
1	Asp	$Y = 2.237 \times 10^5 X + 6.534 \times 10^5$	0.999 0	0.099 8 ~ 0.998 0
2	Glu	$Y = 2.601 \times 10^6 X + 4.083 \times 10^5$	0.999 2	0.110 3 ~ 1.103 0
3	Ser	$Y = 4.114 \times 10^6 X - 2.374 \times 10^5$	0.999 9	0.078 8 ~ 0.788 0
4	Gly	$Y = 7.425 \times 10^6 X - 2.934 \times 10^5$	0.999 1	0.056 3 ~ 0.563 0
5	His	$Y = 2.104 \times 10^6 X + 2.738 \times 10^5$	0.999 5	0.116 3 ~ 1.163 0
6	Arg	$Y = 6.475 \times 10^6 X - 6.413 \times 10^5$	0.999 1	0.130 7 ~ 1.307 0
7	Thr	$Y = 6.881 \times 10^6 X - 7.831 \times 10^5$	0.999 1	0.089 3 ~ 0.893 0
8	Ala	$Y = 5.146 \times 10^6 X + 3.005 \times 10^5$	0.999 5	0.066 8 ~ 0.668 0
9	Pro	$Y = 5.141 \times 10^6 X - 5.175 \times 10^5$	0.999 0	0.086 3 ~ 0.863 0
10	Tyr	$Y = 2.636 \times 10^6 X - 4.990 \times 10^5$	0.999 2	0.135 9 ~ 1.359 0
11	Val	$Y = 3.570 \times 10^6 X - 5.163 \times 10^5$	0.999 9	0.087 9 ~ 0.879 0
12	Met	$Y = 2.889 \times 10^6 X - 4.863 \times 10^5$	0.999 8	0.111 9 ~ 1.119 0
13	Cys	$Y = 3.163 \times 10^6 X - 5.032 \times 10^5$	0.999 0	0.090 1 ~ 0.901 0
14	Ile	$Y = 4.806 \times 10^6 X - 7.775 \times 10^5$	0.999 9	0.098 4 ~ 0.984 0
15	Leu	$Y = 1.737 \times 10^6 X - 3.698 \times 10^5$	0.999 8	0.098 4 ~ 0.984 0
16	Phe	$Y = 1.456 \times 10^6 X - 2.447 \times 10^5$	0.999 4	0.123 9 ~ 1.239 0
17	Lys	$Y = 1.746 \times 10^6 X - 1.328 \times 10^5$	0.999 0	0.109 6 ~ 1.096 0

DH1 样品 6 份, 每份约 0.3 g, 分别加入氨基酸混合对照品溶液适量, 按 2.2.3 项下方法制备衍生化溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定峰面积, 计算回收率和 RSD, 结果见表 3。回收率均符合规定, 表明该方法回收率良好。

表 3 17 种氨基酸加样回收率 (n=6)

氨基酸	平均回收率	RSD
Asp	100.92	2.5
Glu	102.84	1.3
Ser	100.31	2.5
Gly	101.40	2.2
His	98.33	0.9
Arg	100.39	3.1
Thr	99.19	3.0
Ala	102.76	1.5
Pro	101.33	3.1
Tyr	103.89	2.7
Val	100.46	1.7
Met	98.03	1.9
Cys	99.60	3.2
Ile	103.60	3.5
Leu	100.17	2.9
Phe	99.13	2.8
Lys	102.31	1.2

**2.4 不同产区锁阳中氨基酸含量测定** 按 2.2.3 项下方法制备供试品衍生化溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定各氨基酸衍生物峰面积, 代入各回归方程进行计算, 得到各产地锁阳氨基酸含量。见表 4。

**2.5 主成分分析** 以 17 种氨基酸含量为变量, 对 12 个市级产区的 65 批锁阳进行 PCA<sup>[17]</sup>。结果前 4 个主成分的累积贡献率为 91.739%, 能够反映变量的整体特征, 其中前 2 个主成分的贡献率为 75.023%。PCA 得分见图 2, 前 4 个主成分的总因子得分 (F 值) 及排序见表 5。

可知, 除 5 批离群外, 60 批锁阳在 PCA 得分图中可被明显区分为 6 个区域。其中, 酒泉、敦煌所产锁阳被聚在一起, 位于第 1 象限; 张掖、武威所产锁阳在第 4 象限可各自聚类; 阿拉善左旗与阿拉善右旗所产锁阳在第 4 象限聚在一起; 石嘴山所产锁阳无明显聚类规律, 但与阿拉善左旗及阿拉善右旗所

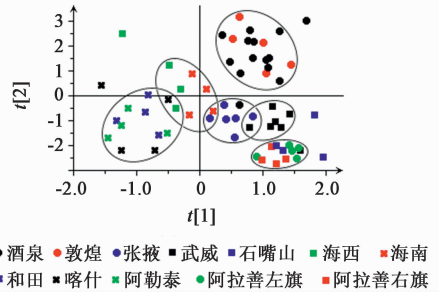


图 2 65 批锁阳的 PCA 得分

Fig. 2 PCA scores plot of 65 batches of Cynomorii Herba

产锁阳在第 4 象限互相靠近并有交叉; 青海海西与海南所产锁阳被聚在一起; 新疆喀什、和田、阿勒泰所产锁阳在第 3 象限被聚在一起。可以看出, 除石嘴山外, 其余锁阳基本可按照不同市级或省级产区进行聚类, 说明不同市级、省级产区锁阳之间的氨基酸含量具有产区差异性, 并且表现为明显的地域聚集性特点, 即产地互相靠近的锁阳氨基酸含量总体较为接近。

由表 5 可知,  $F$  值  $> 1$  (排名前 18) 的样品均为敦煌、酒泉所产锁阳; 敦煌、酒泉、武威、张掖、阿拉善左旗、阿拉善右旗、石嘴山所产锁阳的  $F$  值均大于 0 (排名前 50); 而新疆喀什、和田、阿勒泰所产锁阳的  $F$  值均  $< 0$ 。12 个产区锁阳  $F$  的平均值排序为敦煌  $>$  酒泉  $>$  张掖  $>$  阿拉善左旗  $>$  武威  $>$  阿拉善右旗  $>$  石嘴山  $>$  海西  $>$  海南  $>$  和田  $>$  喀什  $>$  阿勒泰。这表明, 从氨基酸含量的角度讲, 甘肃、内蒙古所产锁阳氨基酸含量较高、质量较佳, 其次为宁夏、青海及新疆所产锁阳。

**2.6 系统聚类分析** 以 17 种氨基酸含量为变量, 以欧氏距离为测度, 采用组间平均链锁法对 65 批锁阳进行 HCA<sup>[18]</sup>, 树状关系见图 3。可知, HCA 可将 65 批锁阳分为 6 类 (I ~ VI)。I 均为敦煌与酒泉所产锁阳, 可在距离为 10 以内归为一类; II 主要为张掖所产锁阳; III 主要为武威所产锁阳; I, II, III 在距离 15 以内可归为一类, 主要为甘肃 4 市所产锁阳; IV 主要为阿拉善左旗、阿拉善右旗及石嘴山所产锁阳, V 均为青海海西、海南所产锁阳, 均可在距离 10 以内归为一类; VI 主要为新疆和田、喀什、阿勒泰所产锁阳, 可在距离 20 以内归为一类。可知, IV, V, VI 所包含的 8 个市级产区均无法根据氨基酸含量进行完全区分, 但可根据省级产区进行明显归类, 表明不同省级产区锁阳的氨基酸含量差异性较为明显。

表 4 12 个市级产区锁阳中氨基酸的含量测定 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Results of determination of amino acids in Cynomorii Herba from 12 producing areas ( $\bar{x} \pm s$ )

mg·g<sup>-1</sup>

产区	Asp	Glu	Ser	Gly	His	Arg
敦煌	12.604 7 ± 2.777 6	1.552 9 ± 0.652 8	1.143 4 ± 0.519 0	0.241 0 ± 0.254 4	0.698 4 ± 0.936 1	0.713 7 ± 0.294 6
酒泉	8.276 1 ± 3.870 2	1.668 8 ± 1.201 4	1.581 2 ± 0.980 1	0.404 8 ± 0.194 8	0.774 7 ± 0.692 1	0.912 1 ± 1.227 7
武威	9.920 6 ± 1.370 9	1.115 9 ± 0.197 9	1.698 3 ± 1.058 3	0.239 0 ± 0.157 7	1.276 2 ± 2.626 5	0.822 2 ± 0.389 4
张掖	10.959 2 ± 6.968 1	1.216 7 ± 0.460 9	0.757 0 ± 0.473 2	0.419 5 ± 0.143 7	0.827 3 ± 0.749 9	0.758 5 ± 0.382 4
阿拉善左旗	10.814 8 ± 2.003 4	1.821 9 ± 0.583 1	0.785 2 ± 0.114 2	0.310 5 ± 0.223 1	0.756 4 ± 0.349 8	1.028 5 ± 0.424 0
阿拉善右旗	11.125 4 ± 1.428 8	1.368 0 ± 0.362 9	0.690 8 ± 0.130 8	0.147 9 ± 0.173 6	0.642 3 ± 0.999 9	0.929 8 ± 0.184 6
石嘴山	9.273 9 ± 2.620 9	1.077 2 ± 0.027 5	0.456 8 ± 0.078 1	0.060 9 ± 0.071 0	0.333 4 ± 0.564 9	0.742 7 ± 0.448 5
和田	6.080 5 ± 3.14 06	0.592 0 ± 0.416 5	0.453 9 ± 0.150 7	0.040 1 ± 0.056 1	0.518 0 ± 0.649 1	0.339 4 ± 0.456 0
喀什	3.881 9 ± 3.218 2	0.570 7 ± 0.335 0	0.305 3 ± 0.162 3	0.131 7 ± 0.137 1	0.470 5 ± 0.553 6	0.160 7 ± 0.375 4
阿勒泰	4.767 4 ± 3.612 5	0.564 5 ± 0.385 9	0.323 7 ± 0.212 1	0.115 0 ± 0.135 1	0.469 3 ± 0.510 7	0.109 3 ± 0.293 1
海南	6.596 7 ± 2.459 3	0.504 1 ± 0.448 2	0.386 5 ± 0.227 7	0.056 0 ± 0.056 2	0.466 9 ± 0.588 6	0.339 6 ± 0.460 4
海西	7.500 1 ± 2.361 3	0.615 6 ± 0.449 4	0.436 0 ± 0.206 0	0.156 5 ± 0.229 7	0.402 4 ± 0.483 8	0.518 0 ± 0.427 6
产区	Thr*	Ala	Pro	Tyr	Val*	Met*
敦煌	0.945 6 ± 0.717 1	2.358 3 ± 2.080 6	0.294 0 ± 0.409 2	0.673 9 ± 0.259 8	0.856 1 ± 0.499 5	0.288 3 ± 0.455 5
酒泉	0.631 7 ± 0.831 0	3.013 5 ± 1.801 6	0.475 3 ± 0.608 8	0.370 9 ± 0.341 3	0.380 9 ± 0.418 7	0.123 0 ± 0.373 6
武威	0.301 4 ± 0.516 7	1.546 3 ± 0.869 6	0.298 1 ± 0.788 7	0.532 9 ± 0.388 4	0.295 3 ± 0.505 2	0.099 4 ± 0.099 2
张掖	1.166 8 ± 0.143 0	2.550 4 ± 2.497 8	0.332 8 ± 0.515 6	0.249 2 ± 0.200 3	0.230 2 ± 0.331 9	0.081 0 ± 0.089 2
阿拉善左旗	0.735 6 ± 0.678 8	1.588 9 ± 0.438 9	0.487 4 ± 0.464 1	0.311 4 ± 0.210 8	0.286 0 ± 0.505 4	0.020 9 ± 0.074 2
阿拉善右旗	0.756 8 ± 0.507 4	1.688 0 ± 0.878 2	0.205 5 ± 0.411 0	0.333 6 ± 0.391 3	0.325 2 ± 0.510 4	0.104 6 ± 0.209 3
石嘴山	0.724 0 ± 0.513 3	0.824 2 ± 0.300 1	0.237 2 ± 0.358 4	0.632 2 ± 0.296 8	0.253 0 ± 0.506 1	0.010 6 ± 0.101 3
和田	0.518 3 ± 0.443 0	0.552 7 ± 0.307 9	0.031 9 ± 0.078 1	0.207 3 ± 0.237 5	0.055 7 ± 0.090 6	0.013 6 ± 0.033 2
喀什	0.607 7 ± 0.573 4	0.415 2 ± 0.300 3	0.065 8 ± 0.174 1	0.126 2 ± 0.105 4	0.123 6 ± 0.137 1	0.011 6 ± 0.030 8
阿勒泰	0.171 9 ± 0.310 6	0.523 6 ± 0.333 2	0.057 6 ± 0.162 9	0.128 4 ± 0.125 3	0.096 6 ± 0.128	0.081 6 ± 0.010 9
海南	1.257 2 ± 0.815 8	0.815 2 ± 0.112 7	0.126 3 ± 0.423 4	0.127 3 ± 0.142 6	0.112 4 ± 0.258 7	0.068 6 ± 0.051 1
海西	0.785 7 ± 0.896 5	0.913 3 ± 0.210 7	0.363 2 ± 0.417 7	0.110 5 ± 0.134 2	0.080 8 ± 0.150 9	0.038 6 ± 0.071 7
产区	Cys	Ile*	Leu*	Phe*	Lys*	
敦煌	0.019 9 ± 0.027 3	0.185 1 ± 0.155 2	0.081 4 ± 0.077 8	0.084 2 ± 0.070 4	0.118 9 ± 0.096 9	
酒泉	0.042 5 ± 0.022 6	0.249 1 ± 0.375 6	0.075 7 ± 0.052 1	0.079 4 ± 0.067 2	0.097 4 ± 0.058 2	
武威	0.016 9 ± 0.032 2	0.053 6 ± 0.091 8	0.049 1 ± 0.049 0	0.067 0 ± 0.075 8	0.097 5 ± 0.046 0	
张掖	0.025 7 ± 0.036 3	0.048 2 ± 0.080 0	0.024 1 ± 0.034 5	0.062 2 ± 0.058 8	0.079 7 ± 0.022 5	
阿拉善左旗	0.054 4 ± 0.037 5	0.032 0 ± 0.071 6	0.072 7 ± 0.041 1	0.058 4 ± 0.054 2	0.039 5 ± 0.068 3	
阿拉善右旗	0.022 9 ± 0.045 8	0.047 2 ± 0.094 5	0.054 4 ± 0.048 7	0.054 0 ± 0.055 9	0.070 8 ± 0.090 8	
石嘴山	0.021 9 ± 0.036 9	0.015 9 ± 0.087 7	0.039 6 ± 0.045 7	0.017 8 ± 0.035 7	0.088 8 ± 0.012 3	
和田	0.007 0 ± 0.011 4	0.038 8 ± 0.064 2	0.014 9 ± 0.031 5	0.003 7 ± 0.005 9	0.040 6 ± 0.016 5	
喀什	0.008 5 ± 0.014 7	0.023 2 ± 0.068 8	0.005 6 ± 0.010 9	0.010 3 ± 0.014 2	0.037 6 ± 0.021 3	
阿勒泰	0.010 3 ± 0.015 2	0.009 6 ± 0.071 9	0.004 9 ± 0.010 3	0.007 9 ± 0.013 6	0.021 4 ± 0.017 1	
海南	0.009 9 ± 0.014 9	0.107 1 ± 0.082 7	0.034 3 ± 0.041 7	0.023 9 ± 0.021 9	0.067 5 ± 0.016 0	
海西	0.016 6 ± 0.020 0	0.109 3 ± 0.179 5	0.039 0 ± 0.060 9	0.033 1 ± 0.025 3	0.077 1 ± 0.019 5	

注：\* 为人体必需氨基酸；各产区样品批次同表 1。

表 5 65 批锁阳的 PCA 得分及排序

Table 5 Rank of PCA scores of 65 batches of Cynomorii Herba

排序	编号	F	排序	编号	F	排序	编号	F	排序	编号	F	排序	编号	F
1	DH2	1.666	14	DH3	1.093	27	AZ33	0.794	40	AY40	0.515	53	HT48	-0.277
2	JQ7	1.519	15	JQ11	1.091	28	ZY31	0.793	41	SZ42	0.511	54	HX64	-0.287
3	DH1	1.506	16	JQ18	1.043	29	SZ44	0.744	42	AY41	0.455	55	HT49	-0.730
4	JQ19	1.425	17	DH4	1.025	30	W22	0.726	43	SZ45	0.236	56	HT47	-0.828
5	JQ8	1.367	18	JQ14	1.015	31	AZ36	0.71	44	HX63	0.187	57	KS50	-0.831
6	JQ12	1.351	19	ZY29	0.978	32	AZ35	0.683	45	ZY28	0.169	58	KS52	-1.128
7	JQ13	1.331	20	ZY32	0.965	33	AZ37	0.655	46	HX62	0.135	59	AL57	-1.325
8	DH5	1.300	21	ZY27	0.928	34	W20	0.642	47	SZ43	0.131	60	KS51	-1.334
9	JQ17	1.261	22	JQ6	0.926	35	W26	0.616	48	HN59	0.127	61	AL55	-1.357
10	JQ10	1.237	23	ZY30	0.915	36	AY38	0.609	49	HN60	0.093	62	HT46	-1.378
11	JQ16	1.179	24	AZ34	0.893	37	W24	0.602	50	HN61	0.003	63	KS53	-1.395
12	JQ9	1.132	25	W23	0.864	38	W21	0.588	51	HX65	-0.103	64	AL56	-1.408
13	JQ15	1.097	26	W25	0.844	39	AY39	0.565	52	HN58	-0.273	65	AL54	-1.466

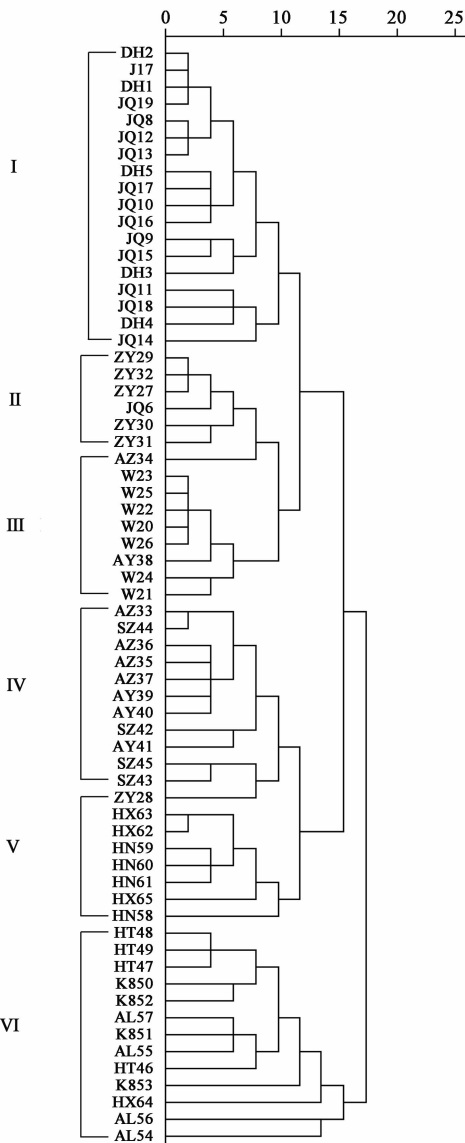


图 3 65 批锁阳的 HCA 树状

Fig. 3 Dendrogram of HCA of 65 batches of Cynomorii Herba

### 3 讨论

2015 年版《中国药典》锁阳项下仅有“浸出物”检查,而无有效成分、指标性成分或总黄酮、总多糖等含量测定方面的质控项目<sup>[1]</sup>,其内在质量综合评价与有效控制是目前存在的难题之一。因此,探讨包括氨基酸在内的锁阳定量质控方法,是完善锁阳质控的重要途径及综合质量评价的重要参考。本实验首次采用柱前衍生化 RP-HPLC 法同时测定了锁阳中 17 种游离氨基酸并进行多元统计分析,结果表明锁阳氨基酸种类非常丰富,且含有 Thr, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Lys 等 8 种人体必需氨基酸中的 7 种,以及 Arg, Cys, Gly, Ser, Tyr 5 种人体半必需氨基酸中的全部种类。氨基酸是锁阳的主要功能物质之一,目前锁阳茶、锁阳酒、锁阳咖啡等功能性氨基酸食品广受欢迎,可作为一种绿色、方便的氨基酸摄入替代剂。

目前,常见的氨基酸测定方法主要有柱后衍生法(氨基酸分析仪)<sup>[19]</sup>及柱前衍生 RP-HPLC, HPLC-ELSD 法<sup>[20]</sup>等。与柱后衍生法相比,本研究采用的柱前衍生 RP-HPLC 法具有检测限与灵敏度高、衍生化产物稳定、重复性好、简便可靠等优点。常见的氨基酸衍生化试剂有 PITC, 邻苯二甲醛, 茚甲基氯甲酸酯, 2,4-二硝基氟苯, 丹磺酰氯等。本研究选用 PITC 柱前衍生化法,结果表明衍生产物单一、稳定,衍生化的副产物对氨基酸测定无干扰。本实验对衍生化过程中的氨基酸混合对照品溶液取用量(0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL)及样品取用量(0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8 g)进行了匹配性优化,避免了样品浓度与标准曲线线性范围不匹配的问题;以色谱分离情况为指标设计单因素实验,分别考察了 30, 35,

40, 43 ℃ 等柱温下色谱分离情况, 最终发现 35 ℃ 时分离效果最好, 故选取柱温为 35 ℃。

不同产区锁阳氨基酸的多元统计分析, 能够为突出锁阳道地产区的区域比较优势, 打造区域性锁阳品牌提供技术参考。PCA 表明酒泉、敦煌所产锁阳的氨基酸含量总体较为接近, 阿拉善左旗、阿拉善右旗与石嘴山所产锁阳的氨基酸含量总体较为接近, 青海海西与海南所产锁阳的氨基酸含量总体较为接近, 这也与 *F* 值排序分析及 HCA 结果相一致。PCA 与 HCA 均表明不同市级、省级产区锁阳之间的氨基酸含量具有产区差异性, 并且表现为明显的地域聚集性特点。地理位置相近的产区锁阳氨基酸含量较为接近, 原因可能是地理位置相近的产区往往具有相近的环境因子。

#### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 346.

[2] 王友华, 田振军. 有氧运动和锁阳多糖干预对糖尿病大鼠主动脉舒张功能的影响及其机制研究[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2017, 45(5): 117-124.

[3] XIE Y, LI X, XU J, et al. Two phenolic antioxidants in Suoyang enhance viability of OH-damaged mesenchymal stem cells: comparison and mechanistic chemistry[J]. Chem Cent, 2017, 11(1): 84.

[4] MENG H C, WANG S, LI Y, et al. Chemical constituents and pharmacologic actions of *Cynomorium* plants[J]. Chin J Nat Med, 2013, 11(4): 321-329.

[5] 彭曦, 尤忠义, 汪仕良. 精氨酸对机体免疫功能的影响及临床应用研究进展[J]. 中国临床营养杂志, 2005, 13(6): 388-390.

[6] 陈亚军, 齐玉梅. 精氨酸免疫营养作用的研究进展[J]. 中国临床营养杂志, 2007, 15(5): 310-314.

[7] 官清华, 丁启龙. 细胞外半胱氨酸/胱氨酸氧化还原电位对 NAFLD 肝细胞线粒体功能的影响[J]. 中国

病理生理杂志, 2015, 31(7): 1266-1271.

[8] 袁雪薇. 亮氨酸改善非酒精性脂肪性肝病的机制研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2015.

[9] 胡磊, 陈小敏, 童洋, 等. *L*-苯丙氨酸二肽衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究[J]. 中国药学杂志, 2016, 51(21): 1831-1838.

[10] 欧强, 杨华, 赵亚娟, 等. 蛋氨酸-胆碱缺乏饮食诱导的大、小鼠非酒精性脂肪性肝病模型的特点及差异[J]. 肝脏, 2017, 22(10): 933-937.

[11] 任梦云, 杨光, 杜乐山, 等. 药用植物锁阳的研究进展[J]. 生物学杂志, 2018, 35(5): 95-98.

[12] 杨帆, 赵鹏伟, 孙鹏, 等. 锁阳多糖对肺癌细胞端粒的影响[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(5): 917-921.

[13] 薛海燕, 焦婵媛, 姚军. 锁阳药理作用的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(3): 709-712.

[14] 符波, 乔晶, 堵年生. 中药锁阳的微量元素与氨基酸分析[J]. 新疆医学院学报, 1997, 20(2): 127-128.

[15] 梁琨, 张丹, 史辑, 等. 柱前衍生化 RP-HPLC 测定鸡内金中 16 种氨基酸的含量[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(8): 1463-1467.

[16] 祝洪艳, 张获, 张力娜, 等. 柱前衍生化 HPLC 法检测紫苏子和紫苏叶中氨基酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(10): 1858-1864.

[17] 郭慧清, 李娅琦, 王梓轩, 等. 不同商品规格羌活药材的 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7): 184-188.

[18] 刘梦云, 毕晓黎, 陈伟韬, 等. 金边土鳖 HPLC 指纹图谱及氨基酸含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(14): 63-68.

[19] 盖丽娟, 刘永刚. 氨基酸分析仪测定玉米浆中 17 种游离氨基酸的不确定度评定[J]. 食品工业科技, 2014, 35(7): 303-307.

[20] 王雅玲, 代玲玲, 马堃, 等. HPLC-ELSD 法测定蛹虫草中 6 种游离氨基酸的含量[J]. 分析测试学报, 2010, 29(10): 1091-1094.

[责任编辑 顾雪竹]