

# 传统中藏药材小秦艽中 20种氨基酸的测定

孙菁<sup>1</sup>, 李法强<sup>2</sup>, 徐文华<sup>1</sup>, 陈桂琛<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院西北高原生物研究所, 青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室, 西宁 810001

<sup>2</sup>中国科学院青海盐湖研究所, 西宁 810008

**摘要:** 以 1, 2-苯并-3, 4-二氢咔唑-9-乙基氯甲酸酯 (BCEOC) 作为柱前衍生化试剂, 采用梯度洗脱实现了传统中藏药材小秦艽中 20 种氨基酸衍生物的基线分离, 利用电喷雾离子源 (ESI Source) 正离子模式, 实现了小秦艽中氨基酸的定性测定, 可为秦艽类药用植物资源化学成分的深入开发利用提供依据。结果表明, 所建立的方法线性范围宽、重复性较好, 大多数氨基酸衍生物的线性回归系数大于 0.9990, 检测限为 6.5~178.2 fmol。小秦艽中氨基酸组成丰富, 至少含有 18 种氨基酸和 7 种人体必需氨基酸, 营养价值较高。同一氨基酸成分在不同采样点表现出不同含量, 体现了小秦艽该类成分的地理分布差异特征。氨基酸成分与生态环境的相关分析结果显示只有纬度与 Lys 之间达到了极显著的负相关关系, 其余各因子之间均未达到显著水平, 说明纬度对小秦艽氨基酸含量有较大的影响。

**关键词:** 小秦艽; BCEOC; 氨基酸; 生态环境

中图分类号: R917; R927.2 Q948.11

文献标识码: A

## Determination of 20 Hydrolytic Amino Acids in an Important Tibetan and Chinese Medicine *Gentiana dahurica*

SUN Jing<sup>1</sup>, LI Fa-qiang<sup>2</sup>, XU Wen-hua<sup>1</sup>, CHEN Gui-chen<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Qinghai Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Biological Resources, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences Xining 810001, China; <sup>2</sup>Qinghai Institute of Salt Lakes, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China

**Abstract** A simple and sensitive method for the determination of 20 amino acids in an important Chinese and Tibetan medicine *Gentiana dahurica* using pre-column derivatization-reversed phase HPLC with fluorescence detection and mass spectrometric identification was developed. 1, 2-benzotriazol-9-ethyl chloroformate (BCEOC) was used as the fluorescence derivatization reagent. 20 amino acid derivatives were separated on a Hypersil BDS C<sub>18</sub> column with a good baseline resolution and detected with the fluorescence of which excitation and emission wavelengths of derivatives were set at 333 and 390 nm, respectively. Experimental results indicated that the established method had good repeatability and the correlation coefficients for the amino acids derivatization were > 0.9990. The detection limit range (at single noise of 3:1) was 6.5-178.2 fmol. The identification of amino acid derivatives from hydrolyzed *G. dahurica* was obtained on the basis of ESI detection at positive mode. The composition of amino acids in *G. dahurica* was abundant and showed higher nutritional value of which there were 18 amino acids and 7 necessary amino acids for the health of people. The same amino acid had different concentration level in different sampling locality and presented the characteristics of geographical differentiation. Correlation coefficient matrix between amino acids and ecological environments showed that there was no significance among the rest factors except that latitude had a significant negative correlation relationship with Lys at the level of 0.01. Thus, at the present study, the ecological environment, especially the latitude, was one of the important factors influencing the chemical constituents of herbalmedicines. The established method could be used and provided reference for the further development and utilization of *Gentiana* species.

**Key words** *Gentiana dahurica* Fischer; BCEOC; amino acids; ecological environments

小秦艽 (*Gentiana dahurica* Fischer) 为龙胆科 (Gentianaceae) 龙胆属多年生草本, 是我国著名的传统中藏药材, 收载于 2005 版《中国药典》<sup>[1]</sup> 和藏药志中<sup>[2]</sup>。其生于海拔 800~4500 m 的草原阳坡、河

收稿日期: 2008-12-02 接受日期: 2009-03-30

基金项目: 国家中西部专项 (2001BA901A47) 项目

\* 通讯作者 Tel: 86-971-6143900; E-mail: gcchen@mwjlb.ac.cn

谷阶地等生境下,在我国主要分布于四川北部及西北部、西北、华北、东北等地区<sup>[3]</sup>;以干燥根入药,可用于治疗扁桃体炎、荨麻疹、风湿性关节炎等症<sup>[1,2]</sup>。目前,对小秦艽的研究主要集中在其 RNA 序列的分析<sup>[4]</sup>、龙胆苦苷含量的测定<sup>[5]</sup>以及化学成分的分析上<sup>[6]</sup>,有关其氨基酸含量的测定尚未见报道。氨基酸是广泛分布于动植物体内的有机氮化合物,是构成生物体的蛋白质的重要组成,在生物体内发挥着重要的生理生化作用<sup>[7,8]</sup>,同时也是许多中药药用价值的评价标准之一<sup>[9-11]</sup>。因此,本文采用新型高灵敏度荧光试剂 1,2-苯并-3,4-二氢吡啶-9-乙基氯甲酸酯(BCEOC)<sup>[12]</sup>作为柱前衍生化试剂,室温下在乙腈溶剂中以硼酸钠缓冲溶液控制反应体系的 pH=9.0,10 min 即可衍生完全。衍生物稳定性好,衍生率高,衍生溶液不必预处理可直接进样分析。在乙腈/水作流动相的条件下,采用梯度洗脱达到了 20 种氨基酸衍生物的完全基线分离,实现了小秦艽根部氨基酸的快速、准确分析,可为秦艽类药物植物的治病机理、合理用药以及深入开发利用提供一定的理论依据。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料

小秦艽根部采自青海省 8 个不同地方(表 1),以 GPS 记录海拔和经纬度。采集后,混匀去除杂质等,自然状态下风干,粉碎,过 100 目筛,待分析用。

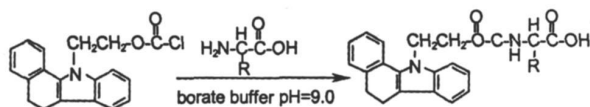


图 1 BCEOC 与氨基酸衍生反应概况

Fig. 1 Derivatization scheme of BCEOC with amino acids

### 1.3 标准溶液的配制

准确称取定量氨基酸标准品,加入少量 6 mol/L 的盐酸溶解后用 6 mol/L 的氢氧化钠溶液调至中性,然后用 pH=9.0 的硼酸钠缓冲溶液定容配成  $1.0 \times 10^{-2}$  mol/L 的溶液,相应低浓度氨基酸标准液 ( $5.0 \times 10^{-4}$  mol/L) 以色谱纯乙腈稀释而成。称取 32.6 mg BCEOC,用无水乙腈溶解并定容至 10 mL,其浓度为  $1.0 \times 10^{-2}$  mol/L。低浓度的衍生试剂 ( $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L) 用无水乙腈稀释而成。

### 1.4 氨基酸标准品的衍生过程

表 1 采样点生态环境调查数据

Table 1 Ecological environmental data of sampling localities

样品编号 No	来源 Origin	海拔 Altitude (m)	经度 Longitude (°)	纬度 Latitude (°)
1	青海平安	2610	101.950	36.383
2	青海湟中	2700	101.683	36.250
3	青海湟中	2810	101.536	36.431
4	青海同仁	2840	102.175	35.657
5	青海海晏	3020	101.041	37.860
6	青海海晏	3020	101.003	36.874
7	青海都兰	3160	97.967	36.067
8	青海刚察	3220	100.242	37.256
9	青海贵德	3260	101.133	35.900
10	青海兴海	3510	99.850	35.883

### 1.2 仪器与试剂

Agilent1100 型高效液相色谱-质谱联用仪(Agilent 公司)配备四元梯度泵,在线真空脱气机,荧光检测器(Fluorescence Detector),100 位自动进样器,电喷雾电离源(Electrospray Ionization Source, ESI Source),Hypersil BDS C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 200 mm i.d., 5 mm,大连依立特公司)。BCEOC 由山东曲阜师范大学尤进茂教授实验室合成,氨基酸标准样品(Sigma 公司),色谱纯乙腈(禹城化学试剂厂),其它试剂均为分析纯,纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。

向 1.5 mL 安培瓶中依次加入 160 μL 乙腈,300 μL 硼酸钠缓冲溶液(pH=9.0),15 μL 混合氨基酸,60 μL 衍生试剂溶液,于 30 °C 至 40 °C 水浴中反应 10 min,加入 10 μL 30% 的乙酸溶液调至弱酸性后即可直接进样分析。衍生反应概况如图 1。

### 1.5 样品的制备

参照文献<sup>[13]</sup>方法进行:称取约 100 mg 粉碎后的样品,置于 1.5 mL 安培瓶中,加入 6 mol/L 盐酸溶液 1 mL,密封后在 110 °C 水解 24 h,过滤,用 N<sub>2</sub> 吹干后用 1 mL pH=9.0 的硼酸钠缓冲溶液溶解,定容

到 10 mL 容量瓶中, 相应浓度为 1000 ng/ $\mu$ L。低浓度的水解溶液 (10 ng/ $\mu$ L) 用 pH = 9.0 的硼酸钠缓冲溶液稀释而成。

### 1.6 色谱及质谱条件

色谱柱: Hypersil BDS C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm  $\times$  200 mm i.d., 5 mm)。流动相 A: 30% 乙腈水溶液 (含有 30 mmol/L 的甲酸, 用氨水调至 pH = 3.7), B: 50% 的乙腈, C: 95% 的乙腈。流速为 1.0 mL/min, 进样量为 10  $\mu$ L, 柱温 30  $^{\circ}$ C。荧光激发和发射波长分别为:  $\lambda_{ex}$  = 333 nm,  $\lambda_{em}$  = 390 nm。梯度洗脱程序见表 2。

电喷雾离子源 (ESI Source) 正离子模式 (positive ion mode), 喷雾压力为 241.32 kPa, 干燥气流量为 9 L/min, 干燥气温度 350  $^{\circ}$ C, 毛细管电压 3500V<sup>[14-15]</sup>。

表 2 梯度洗脱程序

Table 2 Chromatographic gradient conditions eluted on Hypersil BDS C<sub>18</sub> column

时间 Time (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0	70	30	0
15	55	45	0
20	2	98	0
28	2	96	2
28.3	2	88	10
30	2	83	15
40	0	80	20
50	0	20	80
55	0	5	95
57	0	0	100
65	0	0	100

注: 流动相: A: 30% 乙腈水溶液 (含有 30 mmol/L 的甲酸, 用氨水调至 pH = 3.7), B: 50% 的乙腈, C: 95% 的乙腈。Note: Eluants A, 30% acetonitrile containing 30 mmol/L CH<sub>3</sub>COOH buffer; B: 50% acetonitrile; C: 95% acetonitrile

## 2 结果

### 2.1 标准品的色谱分离及质谱鉴定

按照标准品的衍生过程进行衍生后, 在 Hypersil BDS C<sub>18</sub> 色谱柱上以乙腈/水作流动相, 采用梯度洗脱在 65 min 内实现了 20 种氨基酸衍生物的完全分离, 结果见图 2 所有衍生物均可获得较好的基线分离。各分析组分的定性采用电喷雾电离源

(ESI Source) 进行在线的柱后质谱鉴定, 质谱数据见表 3。

### 2.2 线性回归方程、检测限及回收率

不同浓度的氨基酸标准品溶液分别进样 10  $\mu$ L, 标品的进样量在 105.6  $\mu$ mol ~ 51.6 nmol 范围内, 依据各氨基酸衍生物的峰面积和进样量进行线性回归, 所得回归方程、相关系数和各种氨基酸衍生物检测限见表 3。各氨基酸衍生物的线性相关系数均在 0.9990 以上, 检测限在 6.5 ~ 178.2 nmol 之间 (按 S/n = 3.1 计算)。在制备得到的小秦艽根部水解氨基酸样品中加入一定量的氨基酸标准品后, 按照上述衍生化条件和色谱分离条件进行分析测定, 所得 20 种氨基酸衍生物的回收率均大于 93%。在相同洗脱条件下, 对 53  $\mu$ mol 氨基酸衍生物进行六次平行测定, 保留时间相对标准偏差 RSD 小于 0.05%, 峰面积相对标准偏差 RSD 小于 2.3%, 各种氨基酸衍生物保留时间和峰面积的重现性见表 3。

### 2.3 样品的色谱分离和含量测定

按照 1.6 项下色谱分离条件, 对制备后的样品分析其水解氨基酸, 色谱分离图见图 3, 含量测定结果见表 4。

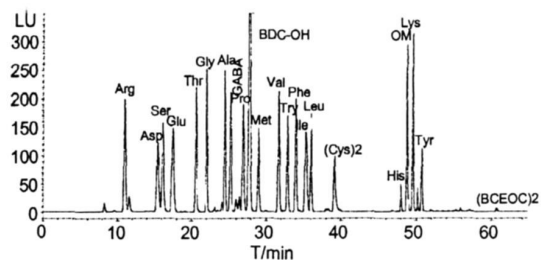


图 2 20 种氨基酸标准品的色谱分离图

Fig. 2 Chromatogram of twenty amino acid standards derivatized with BCEOC

色谱条件: Hypersil BDS C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm  $\times$  200 mm i.d., 5 mm), 柱温 30  $^{\circ}$ C, 流速 1.0 mL/min, 荧光激发和发射波长分别为  $\lambda_{ex}$  = 333 nm,  $\lambda_{em}$  = 390 nm。Chromatographic conditions: Hypersil BDS C<sub>18</sub> column (4.6 mm  $\times$  200 mm, 5 mm, Agilent); Column temperature is set at 30  $^{\circ}$ C; Flow rate = 1.0 mL/min. Excitation wavelength  $\lambda_{ex}$  = 333 nm, Emission wavelength  $\lambda_{em}$  = 390 nm. Peaks: Arg (精氨酸); Asp (天冬酸); Ser (丝氨酸); Glu (谷氨酸); Thr (苏氨酸); Gly (甘氨酸); Ala (丙氨酸); GABA (四氨基丁酸); Pro (脯氨酸); Met (蛋氨酸); Val (缬氨酸 valine); Phe (苯丙氨酸); Trp (色氨酸); Ile (异亮氨酸); Leu (亮氨酸); (Cys)2 (胱氨酸); His (组氨酸); OM (鸟氨酸); Lys (赖氨酸); Tyr (酪氨酸); BDC-OH (1, 2-benzor-3, 4-dihydrocarbazole-9-ethanol); (BCEOC)2 (bis-(1, 2-benzor-3, 4-dihydrocarbazole-9-ethyl) carbonate)

表 3 20 种氨基酸衍生物的线性回归方程及相关指标 ( $n = 6$ )Table 3 Linear regression equations and correlation index of 20 amino acid derivatives ( $n = 6$ )

氨基酸名称 Amino acid	线性方程 $Y = AX + B$ X: Injected amount (pmol) Y: Peak area	相关系数 r	检测限 Detection limits (fmol)	质核比 m/z (M+1) <sup>+</sup>	保留时间 Retention time RSD (%)	峰面积 Peak area RSD (%)
Arg	$Y = 28.07X + 3.85$	0.9997	12.3	464	0.009	1.32
Asp	$Y = 17.15X + 0.47$	0.9999	27.0	423	0.012	1.47
Ser	$Y = 25.30X + 3.89$	0.9995	17.4	395	0.010	1.28
Glu	$Y = 24.03X - 3.77$	0.9997	19.9	437	0.011	1.32
Thr	$Y = 24.86X + 3.86$	0.9990	12.7	409	0.006	1.18
Gly	$Y = 27.09X + 4.75$	0.9999	9.4	365	0.005	1.29
Ala	$Y = 26.01X + 3.94$	0.9999	10.4	379	0.004	1.11
GABA	$Y = 25.48X + 1.51$	0.9999	11.8	393	0.005	1.20
Pro	$Y = 25.77X + 3.14$	0.9999	13.2	405	0.004	1.04
Met	$Y = 25.95X + 2.48$	0.9999	13.0	439	0.007	1.48
Val	$Y = 28.04X + 9.39$	0.9999	13.5	407	0.006	1.02
Try	$Y = 25.90X + 9.28$	0.9999	9.2	494	0.004	0.86
Phe	$Y = 27.01X + 9.45$	0.9999	8.1	455	0.007	0.96
Ile	$Y = 26.68X + 4.84$	0.9999	19.4	421	0.005	1.08
Leu	$Y = 24.90X + 5.46$	0.9999	10.4	421	0.006	1.07
(Cys)2	$Y = 19.66X - 6.20$	0.9998	19.4	-	0.045	2.29
His	$Y = 3.60X + 1.63$	0.9998	178.2	734	0.018	1.51
Om	$Y = 32.79X + 4.08$	0.9999	7.7	711	0.013	1.32
Lys	$Y = 34.91X + 6.24$	0.9998	6.5	674	0.009	1.54
Tyr	$Y = 15.40X + 2.16$	0.9999	15.8	758*	0.009	1.43

注: 氨基酸名称的缩写同图 2, \* 负离子模式检测。

Note Abbreviation of 20 amino acids is the same as Fig 2\* detected in negative ion mode

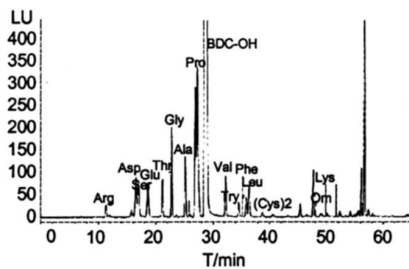


图 3 小秦艽样品中水解氨基酸代表性色谱分离图

Fig. 3 Chromatographic separation of hydrolyzed amino acid from *G. dahurica* samples

## 2.4 氨基酸类成分与生态环境的相关分析

利用 SPSS 统计软件中的相关分析方法对小秦艽中氨基酸类成分与生态环境的相关性进行分析(表 5), 结果表明只有纬度与 Lys 之间达到了极显著的负相关关系 ( $P < 0.01$ ), 即纬度越高, Lys 的含量越低; 其余各因子之间均未达到显著水平。

## 3 讨论

BCEOC 试剂对氨基酸的测定具有较高的灵敏度<sup>[12]</sup>, 此方法能够准确定量且具有线性范围宽、重

表 4 小秦艽根部水解氨基酸含量 (mg/g  $n = 3$ )Table 4 Contents of hydrolyzed amino acid from *G. dahurica* roots (mg/g  $n = 3$ )

氨基酸 Amino acid	采样编号 Sample number										Mean
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Arg	0.783 ± 0.067	1.514 ± 0.076	0.183 ± 0.047	0.163 ± 0.027	0.247 ± 0.042	1.451 ± 0.046	1.155 ± 0.064	0.292 ± 0.032	0.190 ± 0.021	0.248 ± 0.038	0.623

Asp	9 153 ± 0 879	2 231 ± 0 106	0 970 ± 0 092	0 931 ± 0 052	1 343 ± 0 426	4 472 ± 0 248	10 377 ± 2 374	1 585 ± 0 347	0 806 ± 0 084	1 465 ± 0 074	3 333
Ser	0 901 ± 0 102	0 549 ± 0 055	0 366 ± 0 021	0 323 ± 0 017	0 574 ± 0 067	1 378 ± 0 037	1 060 ± 0 066	0 597 ± 0 055	0 356 ± 0 052	0 462 ± 0 044	0 657
Glu	2 076 ± 0 045	1 135 ± 0 113	0 668 ± 0 038	0 617 ± 0 046	1 035 ± 0 089	4 272 ± 0 310	2 612 ± 0 089	1 142 ± 0 098	0 679 ± 0 034	0 945 ± 0 102	1 518
Thr	0 750 ± 0 067	0 463 ± 0 034	0 315 ± 0 032	0 271 ± 0 021	0 454 ± 0 102	0 978 ± 0 055	0 868 ± 0 045	0 490 ± 0 054	0 303 ± 0 061	0 364 ± 0 036	0 526
Gly	0 892 ± 0 044	0 585 ± 0 046	0 381 ± 0 038	0 323 ± 0 083	0 544 ± 0 067	1 265 ± 0 062	1 073 ± 0 074	0 620 ± 0 067	0 352 ± 0 047	0 484 ± 0 042	0 652
Ala	0 832 ± 0 123	0 522 ± 0 057	0 346 ± 0 042	0 314 ± 0 067	0 506 ± 0 066	1 271 ± 0 073	0 970 ± 0 068	0 543 ± 0 034	0 337 ± 0 022	0 427 ± 0 035	0 607
GABA	0 125 ± 0 052	0 117 ± 0 012	0 047 ± 0 022	0 097 ± 0 020	0 056 ± 0 021	0 147 ± 0 022	0 114 ± 0 022	0 070 ± 0 022	0 055 ± 0 013	0 688 ± 0 064	0 152
Pro	5 571 ± 0 973	4 105 ± 0 426	1 778 ± 0 249	3 379 ± 0 349	2 734 ± 0 673	5 391 ± 0 379	5 396 ± 0 106	3 008 ± 0 786	2 574 ± 0 056	2 363 ± 0 201	3 630
Met	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Val	0 780 ± 0 085	0 495 ± 0 038	0 324 ± 0 043	0 277 ± 0 064	0 459 ± 0 059	1 172 ± 0 045	0 932 ± 0 084	0 522 ± 0 064	0 327 ± 0 042	0 415 ± 0 037	0 570
Try	0 824 ± 0 066	0 508 ± 0 043	0 279 ± 0 027	0 258 ± 0 028	0 448 ± 0 058	1 229 ± 0 058	1 014 ± 0 033	0 491 ± 0 038	0 299 ± 0 028	0 411 ± 0 051	0 576
Phe	0 005 ± 0 004	0 052 ± 0 024	0 004 ± 0 002	0 045 ± 0 011	0 005 ± 0 003	0 021 ± 0 009	0 009 ± 0 005	0 007 ± 0 004	0 008 ± 0 006	0 003 ± 0 003	0 016
Ile	1 066 ± 0 057	0 618 ± 0 022	0 393 ± 0 062	0 352 ± 0 037	0 604 ± 0 052	1 648 ± 0 037	1 253 ± 0 067	0 657 ± 0 067	0 424 ± 0 045	0 545 ± 0 065	0 756
Leu	0 029 ± 0 010	0 016 ± 0 008	0 011 ± 0 007	0 018 ± 0 009	0 015 ± 0 009	0 010 ± 0 005	0 026 ± 0 012	0 013 ± 0 007	0 015 ± 0 009	0 013 ± 0 009	0 017
(Cys) <sub>2</sub>	0 025 ± 0 009	0 024 ± 0 009	0 022 ± 0 010	0 029 ± 0 010	0 029 ± 0 010	0 035 ± 0 010	0 024 ± 0 011	0 030 ± 0 012	0 007 ± 0 005	0 021 ± 0 010	0 025
His	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Om	0 016 ± 0 007	0 014 ± 0 010	0 016 ± 0 009	0 017 ± 0 00	0 017 ± 0 009	0 015 ± 0 008	0 012 ± 0 009	0 011 ± 0 006	0 007 ± 0 006	0 013 ± 0 008	0 014
Lys	0 006 ± 0 005	0 010 ± 0 006	0 011 ± 0 007	0 007 ± 0 005	0 007 ± 0 005	0 031 ± 0 011	0 048 ± 0 024	0 032 ± 0 010	0 020 ± 0 010	0 015 ± 0 007	0 019
Tyr	0 121 ± 0 023	0 038 ± 0 010	0 028 ± 0 012	0 065 ± 0 023	0 021 ± 0 012	0 071 ± 0 030	0 053 ± 0 020	0 060 ± 0 024	0 059 ± 0 020	0 021 ± 0 012	0 054

注：“-”表示未检出。下同。Note “-” refers to undetected.

表 5 小秦艽氨基酸与生态环境相关分析

Table 5 Correlation coefficient matrix between amino acids in *G. dahurica* and ecological environments

	海拔 Altitude	经度 Longitude	纬度 Latitude
Arg	-0 326	-0 164	-0 004
Asp	-0 222	-0 441	-0 100
Ser	-0 077	-0 355	0 250
Glu	-0 058	-0 287	0 183
Thr	-0 117	-0 390	0 224
Gly	-0 077	-0 404	0 223
Ala	-0 091	-0 341	0 223
GABA	0 564	-0 292	-0 325

Pro	-0 359	-0 173	-0 045
Val	-0 068	-0 376	0 208
Try	-0 075	-0 390	0 175
Phe	-0 459	0 413	-0 318
Ile	-0 063	-0 357	0 200
Leu	-0 351	-0 171	-0 268
(Cys) <sub>2</sub>	-0 276	0 041	0 507
Om	-0 609	0 421	0 250
Lys	0 481	-0 832* *	0 019
Tyr	-0 435	0 260	-0 149

注: 0.01 水平时相关系数显著。Note \*\* Correlation coefficient is significant at the level of 0.01 (2-tailed).

现性好等优点, 在氨基酸的分析研究中具有重要的

作用。应用于小秦艽氨基酸含量的测定,取得了较好的效果。

在所测定的 20种氨基酸中,小秦艽药用部位富含 18种氨基酸,氨基酸种类较丰富,其含量测定结果与另一藏药波棱瓜的结果近似<sup>[11]</sup>,其中包括 7种人体必需的氨基酸(Thr Val Ile Leu Phe Try, Lys),占氨基酸总量的 24.78%,有较高的营养价值。必需氨基酸的缺乏可减低体液的免疫反应,如 Try能够维持正常的抗体生成, Phe缺乏使抗体不能发生正常的反应。必需氨基酸的缺乏,还可引起抗体合成的障碍。因此,氨基酸既可作为营养成分,提供或补充生命体的生命活动所需,又可用于防治多种疾病。其中 Arg Asp和 Glu对于治疗肝胆类疾病有直接的作用效果<sup>[16]</sup>,小秦艽中 Asp平均含量较高(3.333 mg/g),其具有的药理生物活性是否与上述氨基酸组成和含量有关尚需进一步药理研究证明。

由表 4可以看出,同一氨基酸成分在不同采样点含量不同,以含量较高的 Asp为例,其最高含量达到 10.377 mg/g,最低含量则为 0.806 mg/g,相差 12倍之多。显示出小秦艽氨基酸类成分的地理分布差异特征。氨基酸类成分与环境因子的相关分析结果显示,纬度越高,即越往北的地方,小秦艽中 Lys含量越低。可见,纬度是影响小秦艽中氨基酸含量的首要因子。同时也表明,环境是决定药用植物化学成分的一个重要因素<sup>[17]</sup>。

致谢:本研究中衍生试剂 BCEOC由山东曲阜师范大学尤进茂教授实验室赠送,实验过程中得到了赵先恩等同学的热诚帮助,在此一并表示感谢。

#### 参考文献

- 1 Pharmacopoeia of P. R. China Vol 1(中华人民共和国药典(一部)). Beijing Chemical Industry Press, 2005. 210
- 2 Yang YC(杨永昌). Tibetan Medicines(藏药志). Xinjing Xining People's Press, 1991. 11
- 3 Ho TN, Liu SW. A worldwide monograph of *Gentiana* Beijing Science Press, 2001. 174-175
- 4 Ji KP(姬可平), Zhang XL(张西玲), Liu LS(刘丽莎), et al. Primary study on measuring the internal transcribed spacer I regions of rRNA gene in seeds of *Gentiana dahurica*. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), 2003, 28: 313-316
- 5 Ni H(倪慧), Makhabel B(波拉提·马卡比力), Qing DG(卿德刚), et al. Determination and comparison of gentiopicroside of various parts of five species of genus *Gentiana* collected from Xinjiang by TLC-MS. *J Chin Mat Med*(中药材), 2004, 27: 500-501
- 6 Yang J(杨婕), Ma J(马骥), Zhou DX(周东星), et al. Study on the chemical constituents of *Gentiana dahurica*. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2006, 37: 187-189
- 7 Aslan M, Travis RL, Rains DW. Differential effect of amino acids on nitrate uptake and reduction systems in barley roots. *Plant Sci*, 2001, 160: 219-228
- 8 Li XZ, Larson DE, Gelibetic M, et al. Effect of glutamine on the induction of nitrate reductase. *Physiol Plantarum*, 1995, 93: 740-744
- 9 Wang DG(王德贵), Yao HY(姚惠英), Su ZW(苏中武). Analyses on the amino acids and trace elements of 3 species of *Pinnella*. *J Plant Resources and Environ*(植物资源与环境学报), 1994, 3(4): 61-62
- 10 Hong YL(洪燕龙), Du SY(杜守颖), Yang G(杨刚), et al. 瓜蒌皮药材及其注射液中总氨基酸的含量测定方法研究. *Chin J Experin Tradit Med Formulac*(中国实验方剂学杂志), 2004, 10(3): 10-12
- 11 Li YL(李玉林), Zhou CF(周昌范), Wang HL(王洪伦), et al. Analysis of amino acids in Tibetan Medicine *Herpetospermum penduculosum*. *Amino Acids & Biotic Resources*(氨基酸和生物资源), 2005, 27(4): 11-12
- 12 You M, Ming YF, Shi YW, et al. Development of a sensitive fluorescence derivatization reagent 1,2-benzotriazin-4-ylidene-9-ethyl carbazole and its application for determination of amino acids from seeds and biophyte plants using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and identification with electrospray ionization mass spectrometry. *Talanta*, 2005, 68: 448-458
- 13 Weiss M, Mannerberg M, Juranville JF, et al. Effect of the hydrolysis method on the determination of the amino acid composition of proteins. *J Chromatogr A*, 1998, 795: 263-275
- 14 Ndjoko K, Wolfender JL, Hostettmann K, et al. Determination of trace amounts of ginkgolic acids in *Ginkgo biloba* L. leaf extracts and phytopharmaceuticals by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 2000, 744: 249-255
- 15 Friso S, Choi SW, Dolnikowski GG, et al. A method to assess genomic DNA methylation using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2002, 74: 4526-4531
- 16 Yu CL(余传隆). 氨基酸与人类健康. *Amino Acids & Biotic Resources*(氨基酸和生物资源), 1999, 21(4): 4-8
- 17 Tao SH(陶曙红), Wu FE(吴凤钊). Effect of ecological environment on active constituents of medicinal plants. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2003, 15: 174-177