

## DNFB 柱前衍生化 RP-HPLC 测定大黄种子氨基酸的含量

刘何春<sup>1,2</sup> 徐文华<sup>1</sup> 沈建伟<sup>1</sup> 宋文珠<sup>1</sup> 臧黎黎<sup>3</sup> 周国英<sup>1\*</sup><sup>1</sup>中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008; <sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100049; <sup>3</sup>电子科技大学, 成都 610041

**摘要:** 采用柱前衍生 RP-HPLC 法测定大黄种子中氨基酸的含量。6 mol/L 盐酸水解得到氨基酸, 以 2,4-二硝基氟苯(DNFB)为柱前衍生化试剂, 梯度洗脱。色谱柱为 Gemini-NX C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm 5 μm); 流动相 A 相为 0.1 M 乙酸钠水溶液, B 相为乙腈-水(1:1), 柱温 37 °C, 检测波长 360 nm。结果表明, 三种正品大黄种子中均含有 17 种氨基酸, 总量在 11.30% ~ 19.26%。该方法灵敏、准确, 有良好的重复性和稳定性。

**关键词:** 大黄种子; RP-HPLC; 2,4-二硝基氟苯; 氨基酸

中图分类号: Q517

文献标识码: A

### Determination of Amino Acids in Rhubarb Seeds with DNFB Pre-column Derivatization by Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography

LIU He-chun<sup>1,2</sup>, XU Wen-hua<sup>1</sup>, SHEN Jian-wei<sup>1</sup>, SONG Wen-zhu<sup>1</sup>, ZANG Li-li<sup>3</sup>, ZHOU Guo-ying<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China; <sup>2</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; <sup>3</sup>University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610041, China

**Abstract:** The aim of the study was to determine the contents of amino acids in rhubarb seeds with pre-column derivatization by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Amino acids extracted by the method of hydrolysis in 6 mol/L HCl were derivatized by 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) and analyzed by RP-HPLC with gradient elution. The chromatographic separation was performed on a Gemini-NX C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm 5 μm) column with 0.1 M aqueous sodium acetate solution (A) and acetonitrile-water (1:1) (B) as mobile phases. The column temperature was maintained at 37 °C, and the detection wavelength was set at 360 nm. The results showed that the three genuine rhubarb seed contained 17 kinds of amino acids, 11.30% to 19.26% of the total content. The experimental results proved that the developed RP-HPLC method was sensitive, accurate and repeatable.

**Key words:** Rhubarb seeds; reversed-phase high performance liquid chromatography; 2,4-dinitrofluorobenzene; amino acids

中药大黄为蓼科植物唐古特大黄(*Rheum tan-guticum* Maxim. ex Balf.)、掌叶大黄(*Rh. palmatum* Linn.)或药用大黄(*Rh. officinale* Baill.)的干燥根及根茎<sup>[1]</sup>。唐古特大黄又名鸡爪大黄、君木扎(藏名),在青海主要生长于 2300 ~ 4200 m 的林缘、林下、沟谷灌丛及草地,其他主要分布于甘肃南部、西藏东北部、四川西北部等<sup>[2]</sup>,栽培或野生。掌叶大黄主产于甘肃、青海、西藏、四川等地,主要为栽培,产量最大。药用大黄主产于四川、贵州、云南、湖北、陕西等地,栽培或野生。据《中国植物志》记载,大黄属植物果实的形态特征为:瘦果 3 棱状,棱缘具

翅,翅上各具 1 条明显纵脉,宿存花被不增大或稍增大。种子具丰富胚乳,胚直,偏于一侧,子叶平坦。3 种正品大黄种子外观形态大体一致,但也存在一定差异,其中唐古特大黄翅与果脐呈褐色,种子部位黑色,翅无皱缩;掌叶大黄翅与果脐灰褐色,种子部位黑色,翅呈现皱缩状;药用大黄全果呈褐色,翅成皱缩状<sup>[3]</sup>。

氨基酸是构成机体蛋白质的基本单位,在人体的生理病理过程中起着关键性作用,是合成人体激素、酶类的原料,它参与人体新陈代谢和各种生理作用,在生命中显示特殊作用<sup>[4]</sup>。必需氨基酸的缺乏可减低体液的免疫反应,还可引起抗体合成的障碍<sup>[4]</sup>。氨基酸在医疗保健方面具有重要的功能作用,在某些疾病情况下,为保证病人的氨基酸需要,

收稿日期: 2013-07-04

接受日期: 2013-11-21

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BA105B03)

\* 通讯作者 Tel: 86-971-6159630; E-mail: zhougy@nwipb.cas.cn

可进行混合氨基酸输液,以增强机体免疫力,提高疗效。氨基酸的摄入能够有效提高人体免疫力,在临床上已用于肝昏迷的治疗,大黄保肝利胆的功效可能与此有关<sup>[5]</sup>。李天才<sup>[4]</sup>、兰韬<sup>[5]</sup>、熊辉岩<sup>[6]</sup>等人曾对大黄根和叶柄中的氨基酸进行研究,发现大黄根和叶柄中含有多种人体必需氨基酸。但是大黄种子颗粒较大,且资源丰富,人工栽培后种子产量尤为可观,大黄种子中是否含有氨基酸、含量多少,都未曾报道,有鉴于此,本实验测定了唐古特大黄、掌叶大黄和药用大黄种子中的氨基酸含量,以期为大黄种子的开发利用提供一定的科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验仪器

Agilent(安捷伦)1100型高效液相色谱仪(包括四元泵,DAD检测器,柱温箱,自动进样器,工作站)。

### 1.2 实验材料

唐古特大黄种子与药用大黄种子均于2012年采自青海省湟中县拦隆口镇药材种植基地,掌叶大黄种子于2006年采自甘肃省岷县。经中国科学院西北高原生物研究所周国英研究员鉴定为唐古特大黄种子、掌叶大黄种子和药用大黄种子。

### 1.3 实验试剂

氨基酸混合溶液标准物质,批号:GBW(E)100062,购自中国计量科学研究院;2,4-二硝基氟苯(DNFB)、N,N-二甲基甲酰胺、乙腈(色谱纯)、醋酸钠、盐酸、磷酸二氢钾。

### 1.4 完全酸水解氨基酸样品的制备

称取样品粉末100 mg于安瓿瓶中,精密称定,加入6 mol/L HCl 6 mL,置于酒精喷灯上拉丝封口,涡旋使粉末溶解,在110℃下水解24 h,过滤,在60~80℃水浴中挥去溶剂,然后用蒸馏水溶解残渣,定容至2 mL。

### 1.5 溶剂的配制

#### 1.5.1 缓冲溶液的配制

称取醋酸钠适量,蒸馏水溶解,醋酸调pH值于6.5,配成800 mL,即醋酸钠缓冲溶液,作为流动相使用。

#### 1.5.2 衍生试剂的配制

精密称取2,4-二硝基氟苯(DNFB)适量,用乙腈溶解为浓度10 mmol/L的DNFB衍生化试剂,4℃下避光保存。

#### 1.5.3 十七种氨基酸标准溶液配制

精密称取17种氨基酸混合溶液标准物质于25 mL容量瓶中,加0.05 mol/L盐酸溶液,溶解定容。

#### 1.5.4 样品氨基酸的配制

取样品氨基酸完全水解液0.5 mL,在磷酸二氢钾碱性环境下加DNFB衍生化试剂,60℃水浴衍生1 h,定容至10 mL容量瓶中。

### 1.6 柱前衍生化

取“1.5.3”项下标准溶液于1 mL小试管中,加入DNFB衍生试剂,摇匀,反应2 min。

### 1.7 色谱分析方法

#### 1.7.1 色谱条件

色谱柱为Gemini-NX C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流速1.000 mL/min,进样量10.00 μL。流动相A相为0.1 M乙酸钠水溶液,B相为乙腈-水(1:1);柱温为37℃,检测波长360 nm。梯度洗脱程序为:0~3 min,20% B;3~8 min,20%~30% B;8~10 min,30%;10~20 min,30%~35% B;20~30 min,35% B;30~35 min,35%~60% B;35~40 min,60%~95% B;40~42 min,95% B;42~43 min,95%~20% B;43~50 min,20% B。混合对照品色谱图见图1。

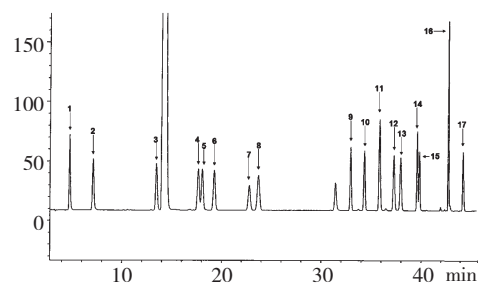


图1 17种氨基酸标准品分离谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of mixed standards of 17 amino acids

1: 天冬氨酸(Asp); 2: 谷氨酸(Glu); 3: 丝氨酸(Ser); 4: 甘氨酸(Gly); 5: 精氨酸(Arg); 6: 苏氨酸(Thr); 7: 脯氨酸(Pro); 8: 丙氨酸(Ala); 9: 缬氨酸(Val); 10: 甲硫氨酸(Met); 11: 半胱氨酸(Cys); 12: 异亮氨酸(Ile); 13: 亮氨酸(Leu); 14: 苯丙氨酸(Phe); 15: 组氨酸(His); 16: 赖氨酸(Lys); 17: 酪氨酸(Tyr)

#### 1.7.2 线性关系考察

取1.6项下的混合标准物质1、5、10、12、15、20 μL,0.45 μm滤膜过滤,注入HPLC,以每种氨基酸质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性分析,结果17种氨基酸的线性回归方程 $R^2$ 在0.9970

~0.9994 之内,在各自的线性范围内氨基酸峰面积 见表 1。  
与其质量浓度呈良好线性关系。线性方程和  $R^2$  值

表 1 17 种氨基酸的线性关系和  $R^2$  值  
Table 1 Regression equations and  $R^2$  values of 17 amino acids

氨基酸 Amino acids	线性方程 Linear equations	$R^2$	线性范围 Linear range( $\mu\text{g}$ )
天冬氨酸 Asp	$y = 0.0013x - 0.0127$	0.9984	0.0587 ~ 1.174
谷氨酸 Glu	$y = 0.0015x - 0.0079$	0.9994	0.0646 ~ 1.291
丝氨酸 Ser	$y = 0.001x - 0.0045$	0.9985	0.0435 ~ 0.8708
甘氨酸 Gly	$y = 0.0007x - 0.0113$	0.9970	0.0291 ~ 0.5819
精氨酸 Arg	$y = 0.0017x - 0.0043$	0.9984	0.0789 ~ 1.578
苏氨酸 Thr	$y = 0.0011x - 0.0096$	0.9984	0.0506 ~ 1.011
脯氨酸 Pro	$y = 0.0015x - 0.0027$	0.9991	0.0486 ~ 0.9712
丙氨酸 Ala	$y = 0.0008x - 0.0041$	0.9990	0.0363 ~ 0.725
缬氨酸 Val	$y = 0.0001x - 0.0009$	0.9986	0.0049 ~ 0.0981
甲硫氨酸 Met	$y = 0.0014x + 0.0089$	0.9987	0.0656 ~ 1.312
半胱氨酸 Cys	$y = 0.0009x - 0.0088$	0.9979	0.0516 ~ 1.031
异亮氨酸 Ile	$y = 0.0012x - 0.0098$	0.9984	0.0577 ~ 1.154
亮氨酸 Leu	$y = 0.0012x - 0.012$	0.9986	0.0583 ~ 1.166
苯丙氨酸 Phe	$y = 0.0015x + 0.0053$	0.9983	0.0736 ~ 1.472
组氨酸 His	$y = 0.0022x - 0.0043$	0.9984	0.0686 ~ 1.372
赖氨酸 Lys	$y = 0.0008x + 0.01$	0.9979	0.0641 ~ 1.282
酪氨酸 Tyr	$y = 0.0002x - 0.0004$	0.9980	0.0082 ~ 0.1648

### 1.7.3 精密度实验

精密吸取衍生化标准溶液 100  $\mu\text{L}$ ,连续进样 6 次,17 种氨基酸峰面积的 RSD 在 0.98% ~ 2.33%。表明仪器及进样精密度良好。

### 1.7.4 重复性实验

平行制备 6 份种子水解供试品溶液,衍生化后进样,17 种氨基酸的峰面积 RSD 为 1.13% ~ 2.77%。表明方法重复性较好。

### 1.7.5 稳定性实验

取衍生化的种子水解供试品溶液,常温 0、3、9、18、28、36 h 后分别测定,结果 RSD 为 1.47% ~ 3.40%。表明 36 h 内稳定性良好。

### 1.7.6 加样回收率实验

采用加样回收法,精密吸取已知浓度的种子供试品溶液 5  $\mu\text{L}$  6 份,分别加入 50  $\mu\text{L}$  标准物质溶液,衍生化后进样,测定回收率。回收率和 RSD 值见表 2。

表 2 氨基酸的加样回收率和 RSD

Table 2 Recoveries and RSD of amino acids

氨基酸 Amino acids	回收率% Recovery rate	RSD%
天冬氨酸 Asp	93.61	3.69
谷氨酸 Glu	98.49	1.74
丝氨酸 Ser	102.01	3.39
甘氨酸 Gly	91.02	1.18
精氨酸 Arg	96.70	4.14
苏氨酸 Thr	97.26	1.84
脯氨酸 Pro	100.49	3.75
丙氨酸 Ala	104.02	2.26
缬氨酸 Val	99.27	1.68
甲硫氨酸 Met	95.81	3.02
半胱氨酸 Cys	95.39	1.08
异亮氨酸 Ile	95.99	2.24
亮氨酸 Leu	98.68	2.40
苯丙氨酸 Phe	92.30	1.81
组氨酸 His	100.60	0.98
赖氨酸 Lys	103.90	2.75
酪氨酸 Tyr	101.28	2.20

## 1.8 氨基酸的测定

精密吸取供试品溶液衍生化后测定,按照外标法测定并计算 17 种氨基酸的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 未去除种翅的大黄种子氨基酸含量的测定

DNFB 柱前衍生化 RP-HPLC 测定未去除种翅的大黄种子中氨基酸含量结果见表 3。唐古特大黄

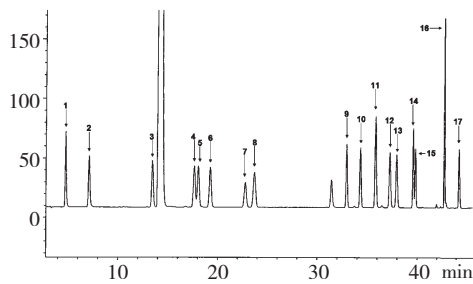


图 2 样品中 17 种氨基酸分离谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of rhubarb seeds sample

1: 天冬氨酸( Asp); 2: 谷氨酸( Glu); 3: 丝氨酸( Ser); 4: 甘氨酸( Gly); 5: 精氨酸( Arg); 6: 苏氨酸( Thr); 7: 脯氨酸( Pro); 8: 丙氨酸( Ala); 9: 缬氨酸( Val); 10: 甲硫氨酸( Met); 11: 半胱氨酸( Cys); 12: 异亮氨酸( Ile); 13: 亮氨酸( Leu); 14: 苯丙氨酸( Phe); 15: 组氨酸( His); 16: 赖氨酸( Lys); 17: 酪氨酸( Tyr)

种子、掌叶大黄种子和药用大黄种子中 17 种氨基酸的总量分别为 18.43%、15.95%、11.81%,即氨基酸总量唐古特大黄种子 > 掌叶大黄种子 > 药用大黄种子。

唐古特大黄、掌叶大黄和药用大黄种子中检测到 7 种必需氨基酸,总量分别为 5.381%、4.890%、3.707%,必需氨基酸含量占氨基酸总量的比例为 29.197%、30.658%、31.389%。除色氨酸之外的 7 种必需氨基酸的含量大致为: 赖氨酸 Tyr > 异亮氨酸 Ile > 甲硫氨酸 Met > 苏氨酸 Thr > 亮氨酸 Leu > 苯丙氨酸 Phe > 缬氨酸 Val。

### 2.2 去除种翅的大黄种子氨基酸含量的测定

DNFB 柱前衍生化 RP-HPLC 测定去除种翅的大黄种子中氨基酸含量结果见表 3。唐古特大黄种子、掌叶大黄种子和药用大黄种子中 17 种氨基酸的总量分别为 19.26%、17.56%、11.30%,即氨基酸总量唐古特大黄种子 > 掌叶大黄种子 > 药用大黄种子。

去掉种翅的唐古特大黄、掌叶大黄和药用大黄种子中检测到 7 种必需氨基酸,总量分别为 6.155%、5.264%、3.583%,必需氨基酸含量占氨基酸总量的比例为 31.957%、29.977%、31.708%。

表 3 大黄种子 17 种氨基酸测定结果

Table 3 Contents of 17 amino acids detected in different rhubarb seed samples

氨基酸(%) Amino acids	唐古特大黄种子 Seeds of <i>Rh. tanguticum</i>	掌叶大黄种子 Seeds of <i>Rh. palmatum</i>	药用大黄种子 Seeds of <i>Rh. officinale</i>	唐古特大黄种子(去翅) <i>Rh. Tanguticum</i> (removed wings)	掌叶大黄种子(去翅) <i>Rh. Palmatum</i> (removed wings)	药用大黄种子(去翅) Seeds of <i>Rh. officinale</i> (removed wings)
赖氨酸 Lys	1.523	1.265	0.925	1.525	1.353	0.865
异亮氨酸 Ile	1.018	1.185	0.908	1.632	1.229	0.895
甲硫氨酸 Met	0.933	0.791	0.543	0.936	0.850	0.513
苏氨酸 Thr	0.849	0.645	0.481	0.849	0.753	0.464
亮氨酸 Leu	0.643	0.571	0.448	0.703	0.624	0.437
苯丙氨酸 Phe	0.337	0.363	0.353	0.429	0.379	0.363
缬氨酸 Val	0.078	0.070	0.049	0.081	0.076	0.046
色氨酸 Trp	-	-	-	-	-	-
7 种必需氨基酸总量	5.381	4.890	3.707	6.155	5.264	3.583
丝氨酸 Ser	2.370	2.027	1.382	2.433	2.392	1.373
组氨酸 His	2.072	1.761	1.141	2.157	1.999	1.123
天冬氨酸 Asp	1.714	1.448	1.001	1.722	1.600	0.952
谷氨酸 Glu	1.396	1.165	0.841	1.352	1.205	0.771
精氨酸 Arg	1.204	0.956	0.726	1.181	1.028	0.669

甘氨酸 Gly	1.174	0.963	0.729	1.101	1.113	0.686
半胱氨酸 Cys	1.131	0.941	0.675	1.138	1.027	0.637
丙氨酸 Ala	0.891	0.709	0.526	0.894	0.766	0.488
脯氨酸 Pro	0.806	0.824	0.849	0.848	0.854	0.844
酪氨酸 Tyr	0.295	0.264	0.233	0.275	0.311	0.177
17种氨基酸总量	18.43	15.95	11.81	19.26	17.56	11.30

### 3 讨论

#### 3.1 大黄种子氨基酸在实践领域中的应用前景

由表3可见,3种正品大黄种子中含有丰富的氨基酸营养成分,尤其富含人体必需的7种氨基酸(色氨酸未检测到)。三种大黄种子中氨基酸含量稍有差异,17种氨基酸总量以唐古特大黄种子最高,依次为掌叶大黄种子和药用大黄种子。7种必需氨基酸总量也是唐古特大黄种子最高,依次为掌叶大黄种子和药用大黄种子。但是7种必需氨基酸占17种氨基酸总量的比例却是药用大黄种子最高,依次为掌叶大黄种子和唐古特大黄种子。其中人体必需的7种氨基酸中,以赖氨酸含量为最高,依次为异亮氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸。且含有较高含量的婴幼儿和儿童必需的谷氨酸和组氨酸,这两种氨基酸唐古特大黄种子中含有1.396%和2.072%,掌叶大黄种子中含有1.165%和1.716%,药用大黄种子中含0.841%和1.141%。

参照李天才<sup>[4]</sup>和兰韬<sup>[5]</sup>对大黄根的氨基酸含量的研究,湟中群加的人工栽培大黄氨基酸总量最高,为14.27%,大坂山野生大黄氨基酸总量为5.58%,大连野生大黄氨基酸总含量为4.22%。大黄种子中除了药用大黄种子氨基酸总量(11.81%)稍低于湟中群加的人工栽培大黄氨基酸含量外,唐古特大黄种子氨基酸总量(18.43%)和掌叶大黄种子氨基酸总量(15.95%)均高于不同地点大黄根的氨基酸含量。

唐古特大黄、掌叶大黄和药用大黄种子的氨基酸种类齐全,总含量高,人体必需氨基酸含量也高,使该类植物种子具有一定的药用、食品、保健价值。除少量种子被采摘用作育种外,大量的大黄种子资源均未被充分开发利用,造成了极大的资源浪费。上述实验结果表明,大黄种子具有极好的开发利用前景,为进一步研究开发利用大黄种子资源提供了线索和依据。

#### 3.2 大黄种子氨基酸在大黄种子质量分级中的应用前景

药材种子是药材生产和发展的源头,是决定中药材质量的内在因素,是发展优质中药材生产的科学前提<sup>[7]</sup>。我国中药材种子质量与检验研究主要参考农作物种子研究方法,对质量标准或检验规程开展研究的中药材种子占我国药材种子比例很小,远落后于作物种子和蔬菜种子,研究内容主要涉及净度、千粒重、含水量、生活力和发芽率,部分种子描述了真实性和健康度等质量要求和检验方法,对发芽率研究内容较多<sup>[8]</sup>。

目前,大黄种子检验规程和质量分级标准也多是围绕在发芽率、千粒重、净度分析、含水量、生活力测定等指标上,氨基酸、蛋白质等含量的多少并未被纳入检验规程和分级标准中,但是蛋白质是生命的基础,氨基酸是构成机体蛋白质的基本单位<sup>[4]</sup>。种子萌发期间,游离氨基酸是由可溶性蛋白质降解而成,氨基酸在干燥种子萌发时随蛋白质降解,氨基酸含量迅速增加,这些氨基酸可参与细胞内的能量代谢和物质代谢,合成新的蛋白质用于新细胞的合成<sup>[9]</sup>,因此氨基酸在种子萌发过程中发挥着特殊作用,它的种类和含量也可以作为种子质量的一项重要指标。况且唐古特大黄种子的氨基酸含量高达18.43%,药用大黄种子氨基酸含量为15.95%,药用大黄种子氨基酸含量为11.81%。

### 4 结论

本实验结果证明,唐古特大黄种子、掌叶大黄种子和药用大黄种子中含有氨基酸,且含量丰富。DNFB衍生法产物稳定、操作简便、成本低。实验建立的HPLC测定方法灵敏、准确,有良好的重复性和稳定性,均符合生物样品测定要求,可用于大黄种子氨基酸含量的测定。

#### 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会).

- Pharmacopoeia of the People's Republic of China ( 中华人民共和国药典 ). Beijing: China Medical Science Press , 2010. Vol I 22.
- 2 Liu SW( 刘尚武 ). Flora Qinghaiica. ( 青海植物志 ). Xining: Qinghai People's Publishing House ,1997. Vol. 1 ,165.
  - 3 Xiao SP( 肖苏萍 ) ,Chen M( 陈敏 ) ,Huang LQ( 黄璐琦 ) *et al.* Primary study on shapes of fruits and germination characters of seeds of Radix et Rhizoma Rhei. *China J Chin Mater Med*( 中国中药杂志 ) 2007 32: 195-198.
  - 4 Li TC( 李天才 ) ,Chen GC( 陈桂琛 ). Analysis of the amino acids of cultivated Rheum in Qinghai province. *Anhui Agric Sci*( 安徽农业科学 ) 2005 33: 1861.
  - 5 Lan T( 兰韬 ) ,Wang FY( 王风云 ) ,Tang T( 唐涛 ) *et al.* Determination of amino acids content in Rhubarb with pre-column derivatization by high performance liquid chromatography. *Life Sci Instr*( 生命科学仪器 ) 2007 5: 41-43.
  - 6 Xiong HY( 熊灰岩 ) ,Zhang XF( 张晓峰 ). Nutritional components analysis of petiole from *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. *Nat Prod Res Dev*( 天然产物研究与开发 ) 2003 ,15: 515-517.
  - 7 Xie XL( 谢小龙 ). Studies on testing rules and quality grading standards for *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. seed. Xining: Northwest Institute of Plateau Biology ,Chinese Academy of Sciences ( 中国科学院西北高原生物研究所 ) , PhD. 2009.
  - 8 Wang JP( 王金鹏 ) ,Zhao L( 赵磊 ) ,Wang SL( 王书林 ) *et al.* Research progress of seed quality and inspection of Chinese herbal medicine. *Guizhou Agric Sci*( 贵州农业科学 ) , 2012 40: 160-164.
  - 9 Bai YF( 白永富 ) ,Lu XP( 卢秀萍 ). The correlation between the soluble protein content and the free amino acids during germination of tobacco seeds. *Chin Agric Sci Bull*( 中国农学通报 ) 2006 22: 286-288.
- 
- ( 上接第 1008 页 )
- 6 Zhang JC( 张建超 ) ,Gao XZ( 高新周 ) ,Yi DL( 易德亮 ). Study on extraction process of polydatin in *Polygonum cuspidatum*. *Lishizhen Med Mater Med Res*( 时珍国医国药 ) , 2003 ,14: F003-F004.
  - 7 Jiang S( 江曙 ) ,Zhu RR( 朱蓉蓉 ) ,Jin SL( 井山林 ) *et al.* Optimization of extraction of polydatin from *Polygonum cuspidatum*. *Chin J New Drugs*( 中国新药杂志 ) 2008 ,17: 1953-1956.
  - 8 Zhao YK( 赵愉快 ) ,Liu ZH( 刘仲华 ) ,Mo ZQ( 莫卓群 ). Absorptive effect and separating effect of macroporous adsorption resin on polydatin from *Polygonum cuspidatum*. *Hunan Agric Sci*( 湖南农业科学 ) 2011 9: 123-126.
  - 9 Zhang D ,Li X ,Hao D *et al.* Systematic purification of polydatin ,resveratrol and anthraglycoside B from *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. *Sep Purif Technol* 2009 66: 329-339.
  - 10 Chu X ,Sun A ,Liu R. Preparative isolation and purification of five compounds from the Chinese medicinal herb *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 2005 ,1097( 1-2 ) : 33-39.
  - 11 Han W( 韩伟 ) ,Ma WW( 马婉婉 ) ,Luo KR( 骆开荣 ) *et al.* Surfactant assisted microwave extraction of total flavonoids from *Microcos paniculata*. *J Nanjing Univ Tech*( 南京工业大学学报 ,自科版 ) 2012 34( 2 ) : 91-94.
  - 12 Zhu H( 朱荣华 ) ,Wang X( 王晓 ) ,Liu JH( 刘建华 ) *et al.* Extraction and enrichment of total alkaloids of *Plumula Nelumbinis* by ultrahigh pressure-assisted micellar extraction combined with cloud-point extraction. *Shandong Sci*( 山东科学 ) 2013 26( 3 ) : 15-20.
  - 13 Xu Y( 徐艳 ) ,Hang TJ( 杭天娇 ). Study on extraction of berberine from *Coptis chinensis* by Polysorbate-80. *Lishizhen Med Mater Med Res*( 时珍国医国药 ) 2008 ,19: 672-674.
  - 14 Liu C( 刘超 ) ,Luo J( 罗晶 ) ,Ma H( 马辉 ). Research on the extraction of flavones from *Hypericum perforatum* L. by cloud point extraction. *Northwest Pharm J*( 西北药学杂志 ) 2012 , 27: 296-298.