

· 质量分析研究 ·

不同产地野生和栽培滇重楼中 15 种氨基酸的含量比较研究

许凌峰, 谷文超, 李卓蔚, 杜慧慧, 郭冬琴, 周浓 (重庆三峡学院生物与食品工程学院, 三峡库区道地药材绿色种植与深加工重庆市工程实验室, 重庆 404120)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱(UPLC)柱前衍生法测定滇重楼中 15 种氨基酸含量, 并比较分析不同产地的野生与栽培滇重楼氨基酸含量差异。**方法** 以 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 110°C 水解 22 h, 衍生试剂为异硫氰酸苯酯, 测定 3 个省 27 批滇重楼中 15 种氨基酸的含量。采用 SPSS 20.0 软件对其氨基酸的含量进行 t 检验。**结果** 质量浓度在 $0.354\sim 30.912 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内的 15 种氨基酸线性关系良好($r=0.999\ 7\sim 0.999\ 9$); 平均回收率为 $95.12\%\sim 101.05\%$, RSD 为 $1.32\%\sim 2.82\%$, 检出限为 $0.031\sim 0.089 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 定量限为 $0.104\sim 0.297 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。3 个省 27 批滇重楼均以天门冬氨酸、精氨酸和谷氨酸含量较高; 滇重楼栽培品中氨基酸平均含量均高于滇重楼野生品。**结论** 滇重楼栽培品与野生品中氨基酸种类和含量相似度较高, 质量等同性较好, 一定程度上证明栽培品可以替代野生品使用。

关键词: 滇重楼; 氨基酸; 异硫氰酸苯酯; 柱前衍生化; 栽培品; 野生品; 超高效液相色谱

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2022)02-0235-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2022.02.013

Comparative Study on the Contents of 15 Amino Acids in Wild and Cultivated *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* from Different Producing Areas

XU Lingfeng, GU Wenchao, LI Zhuowei, DU Huihui, GUO Dongqin, ZHOU Nong (College of Food and Biological Engineering, The Chongqing Engineering Laboratory for Green Cultivation and Deep Processing of the Three Gorges Reservoir Area's Medicinal Herbs, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404120, China)

Abstract: **Objective** A method of ultra-high performance liquid chromatography with pre-column derivatization was established for content determination of 15 amino acids in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* from different areas, and the amino acid contents in wild and cultivated *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* were compared. **Methods** The contents of 15 kinds of amino acids in 27 batches of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* from 3 provinces were determined by using phenyl isothiocyanate(PITC) as derivative reagent after hydrolysis at 110°C for 22 h in $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ hydrochloric acid solution. Statistical analysis of the contents of amino acids was carried out using t -test with SPSS 20.0 software. **Results** The mass concentrations of 15 amino acids were all in the range of $0.354\sim 30.912 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the linear relationships were good($r=0.999\ 7\sim 0.999\ 9$), the average recoveries were between 95.12% and 101.05% with RSDs were $1.32\%\sim 2.82\%$, and the detection limits were $0.031\sim 0.089 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the limits of quantification were $0.104\sim 0.297 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The contents of aspartic acid, glutamic acid and arginine were the highest in 27 samples of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* from 3 provinces. The average amino acid contents of cultivated products of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* was higher than those of wild products of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. **Conclusion** The type and quality of amino acids in the cultivated and wild *Paris polyphylla* var.

收稿日期: 2021-08-02

作者简介: 许凌峰, 男, 硕士研究生, 研究方向: 药用植物栽培与应用。Email: xulingfeng953@126.com。通信作者: 杜慧慧, 女, 博士, 硕士研究生导师, 研究方向: 药用植物栽培与质量控制。Email: duhuihui2010@163.com。周浓, 男, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 药用植物栽培与质量控制。Email: erhaizn@126.com。

基金项目: 重庆市自然科学基金项目(cstc2018jcyjAX0267); “成渝地区双城经济圈建设”科技创新项目(KJCX2020046)。

yunnanensis were highly similar, and the quality invariance of them was good. To a certain extent, this study proved that wild *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* can be replaced by cultivated products.

Keywords: *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*; amino acid; phenyl isothiocyanate; pre-column derivatization; cultivated plant; wild plant; ultra-high performance liquid chromatography (UPLC)

滇重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz. 为百合科重楼属多年生药用植物, 主要分布于我国西南地区, 《中国药典》2020 版记载其以干燥根茎入药^[1]。重楼具有较强的抗肿瘤、增强免疫、抗病毒、抗菌等药理活性^[2-4]。近年来随着以重楼为原料药为主的药品、保健品、化妆品的不断增多^[5], 野生滇重楼资源被大肆采挖, 加上其生长周期较长, 野生资源日渐枯竭, 其价格也逐年上升^[6]。培育优良的栽培品代替野生品, 以缓解滇重楼需求已迫在眉睫。滇重楼根茎中含有大量的活性成分, 如甾体皂苷、核苷、多糖和氨基酸等^[7-8]。谷文超等^[9]对 32 个不同产地滇重楼样品甾体皂苷研究表明, 除根茎中重楼皂苷 VII、须根中重楼皂苷 H 外, 样品中其余活性成分含量均无显著性差异, 无法区分野生品与栽培品。孟莹等^[10]研究结果表明, 野生品和栽培品中的核苷类成分含量无明显差异, 具有质量等同性。王骞等^[11]研究显示滇重楼多糖以葡萄糖、D-甘露糖、D-半乳糖、鼠李糖和阿拉伯糖等组成, 且不同产地的野生和移栽滇重楼在单糖组成方面无显著性差异。上述研究表明滇重楼的野生品和栽培品中甾体皂苷、核苷、多糖的含量无明显差异。氨基酸作为蛋白质的基本组成单元和人体代谢过程中的重要物质, 不仅是人体的必需营养成分之一, 也对疾病的治疗和康复有着重要作用^[12]。早期的研究结果证实, 滇重楼氨基酸总量在 2.22%~8.05%, 含有丰富的氨基酸类化合物^[13]。杨芳等^[14]利用 L-8800 氨基酸自动分析仪测定了云南丽江产滇重楼不同部位氨基酸类成分, 表明氨基酸总含量从高到低为: 叶 > 花 > 茎 > 根茎, 而营养价值从高到低依次为: 根茎 > 叶 > 茎 > 花。目前, 对不同产地滇重楼野生品与栽培品中氨基酸含量测定的对比研究鲜有报道。本研究以云南、贵州、四川等滇重楼主产区 11 个野生品和 16 个栽培品共 27 份滇重楼为研究对象, 采用异硫氰酸苯酯(Phenyl isothiocyanate, PITC)试剂柱前衍生法结合超高效液相色谱(UPLC)测定其根茎中 15 种氨基酸含量, 比较野生品与栽培品根茎中氨基酸含量的差异, 以期填补西南地区滇重楼野生品

和栽培品根茎中的氨基酸类成分研究的空白, 为更加全面客观地评价滇重楼品质, 解决滇重楼资源匮乏问题提供理论依据。

1 仪器与材料

ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱仪(含 PDA 检测器, Empower 3 色谱工作站, 美国 Waters 公司); 丝氨酸(Ser, 批号: GG202002)、谷氨酸(Glu, 批号: SS021655)、组氨酸(His, 批号: VB202110)、甘氨酸(Gly, 批号: ZH002106)、苏氨酸(Thr, 批号: JA202005)、精氨酸(Arg, 批号: ST170008)、酪氨酸(Tyr, 批号: JB161270)、丙氨酸(Ala, 批号: PP202001)、脯氨酸(Pro, 批号: TL202003)、异亮氨酸(Ile, 批号: XV20191127)、缬氨酸(Val, 批号: YI191221)、亮氨酸(Leu, 批号: LL201912)、苯丙氨酸(Phe, 批号: CB210061)、赖氨酸(Lys, 批号: LS201911), 纯度均≥98%, 北京 BOMEI 公司; 天门冬氨酸(Asp, 批号: DST190806-897, 纯度≥98%), 成都德思特生物; 乙腈为色谱纯, 德国默克公司; 异硫氰酸苯酯(PITC, 含量≥99%), 上海麦克林生化科技有限公司; 水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。27 批滇重楼样品采集于云南、贵州、四川等 3 个主产区^[15], 经大理大学药学院张德全教授鉴定为百合科植物滇重楼 *P. polyphylla* var. *yunnanensis* 的干燥根茎。样品详细信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取 Asp、Glu、Ser、Gly、His、Arg、Thr、Ala、Pro、Tyr、Val、Ile、Leu、Phe、Lys 对照品适量, 用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶解并定容于 5 mL 量瓶中, 配制成浓度分别为 1.420、1.932、0.806、1.000、0.442、0.972、0.778、0.800、0.898、0.548、0.852、1.216、0.920、0.828、1.050 mg·mL⁻¹ 的对照品贮备溶液, 即得。

2.1.2 供试品溶液制备 取样品粉末(50 目)0.1 g, 精

表 1 27 批滇重楼样品信息

Table 1 The sample information of *P. polyphylla* var. *yunnanensis*

编号	采集地点	编号	采集地点
S1	贵州省安顺市西秀区龙宫镇	S15	四川省会东县
S2	贵州省安顺市西秀区安大广城	S16	云南省嵩明县
S3	贵州省清镇市	S17	云南省易门县
S4	贵州省龙里县	S18	云南省楚雄市
S5	贵州省兴仁县	S19	云南省保山市隆阳区黄泥村
S6	贵州省兴义市	S20	云南省保山市隆阳区摆菜村
S7	四川省会东县	S21	云南省龙陵县
S8	云南省楚雄市	S22	云南省芒市
S9	云南省保山市隆阳区	S23	云南省昌宁县
S10	云南省昌宁县	S24	云南省永平县
S11	云南省玉龙县	S25	云南省云龙县
S12	贵州省织金县	S26	云南省玉龙县
S13	贵州省紫云县	S27	云南省剑川县
S14	贵州省龙里县		

注：S1~S11 为野生品；S12~S27 为栽培品

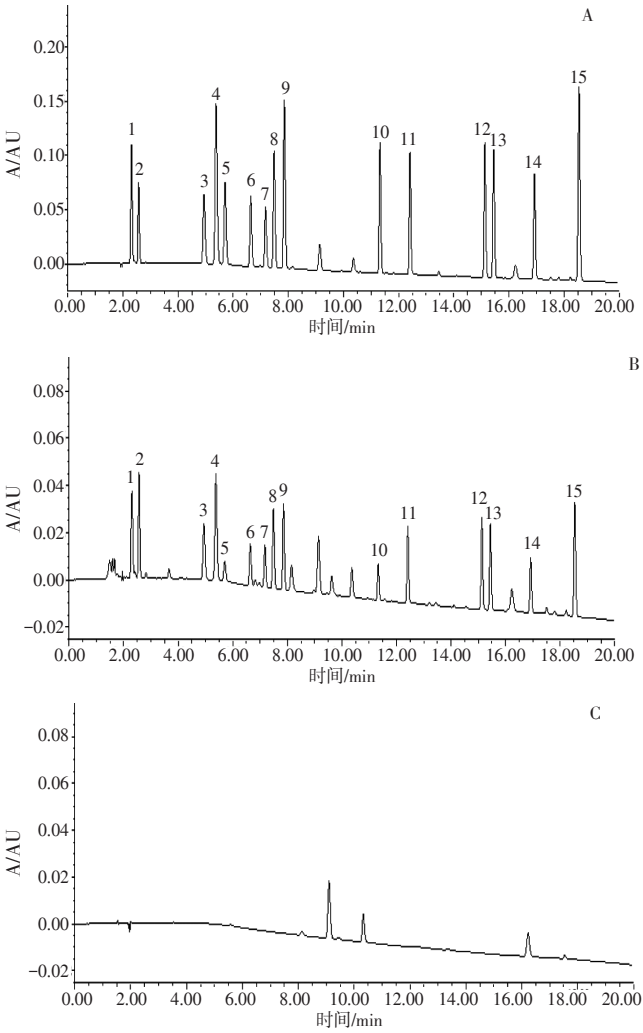
密称定，置于 25 mL 顶空瓶中，加入 10 mL 6 mol·L⁻¹ 盐酸溶液，充入高纯氮气，密封，置于 110 ℃ 烘箱内水解 22 h，过滤，加水定容至 25 mL 量瓶中，混匀，即得。以 6 mol·L⁻¹ 盐酸溶液代替样品粉末制备空白溶液。

2.1.3 衍生化溶液制备 取“2.1.2”项下样品水解液 0.4 mL 置于氮吹管中，吹干，以 0.1 mmol·mL⁻¹ 盐酸溶液 0.4 mL 复溶解。0.1 mmol·mL⁻¹ PITC-乙腈溶液和 1 mmol·mL⁻¹ 三乙胺-乙腈溶液各 0.2 mL 涡旋混匀，20 ℃ 条件下静置衍生 60 min。加入色谱纯正己烷 1 mL，摇匀，以 4 000 r·min⁻¹ (离心半径 13.5 cm) 离心 10 min，弃上层溶液，重复 3 次。下层溶液定容至 1 mL，摇匀，即得。以 6 mol·L⁻¹ 盐酸溶液代替样品粉末制备空白溶液。

2.2 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (1.7 μm, 2.1 mm×150 mm)；流速：0.2 mL·min⁻¹；进样量：1 μL；检测波长：254 nm；柱温：40 ℃；流动相 A 为乙腈-水 (4:1)，流动相 B 为 0.1 mmol·mL⁻¹ 乙酸钠溶液 (冰乙酸调节 pH6.5)-乙腈 (97:3)，梯度洗脱 (0~1 min, 5%~5% A；1~7 min, 5%~17% A；7~16 min, 17%~35% A；16~20 min, 35%~50% A)。空白衍生溶液、混合对照品及样品色谱图见图 1。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 取“2.1.1”项下各对照品储备液适量，配置成系列混合对照品溶液，按“2.1.3”项下方法衍生后注入超高效液相色谱仪检测，绘制



1. Asp; 2. Glu; 3. Ser; 4. Gly; 5. His; 6. Arg; 7. Thr; 8. Ala; 9. Pro; 10. Tyr; 11. Val; 12. Ile; 13. Leu; 14. Phe; 15. Lys

图 1 混合对照品(A)、供试品(B)及空白溶液(C)超高效液相色谱图

Figure 1 The UPLC chromatograms of amino acids of reference substances solution (A), sample solution (B) and blank solution (C)

标准曲线。以信噪比(S/N)=3 计算出本实验的检出限 (limit of detection, LOD)，以信噪比(S/N)=10 计算出本实验的定量限(limit of quantitative, LOQ)，结果见表 2。结果显示，15 种氨基酸成分在各自线性范围内线性关系良好，表明仪器灵敏度良好。

2.3.2 精密度试验 取“2.3.1”项下 15 种氨基酸混合对照品溶液 0.4 mL，按“2.1.3”项下方法衍生后注入超高效液相色谱仪进行测定，连续进样 6 次，测得 15 种氨基酸对照品峰面积的 RSD 在 0.21%~2.22% 范围。结果显示本实验所用仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 精密称取 0.1 g 样品粉末 (S21)，按“2.1.2”和“2.1.3”项下方法制备，平行 6 份，注入超高效液相色谱仪进行测定，测得 15 种氨基酸

表 2 27 批滇重楼中 15 种氨基酸的线性关系

Table 2 The linearity relationships of 15 amino acids

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Asp	$Y=1.607\times 10^4 X+8.422\times 10^2$	0.999 7	1.363 ~ 27.254	0.048	0.159
Glu	$Y=1.178\times 10^4 X-4.518\times 10^3$	0.999 7	1.546 ~ 30.912	0.089	0.297
Ser	$Y=2.326\times 10^4 X-3.823\times 10^3$	0.999 9	0.645 ~ 12.896	0.056	0.188
Gly	$Y=3.813\times 10^4 X-7.620\times 10^3$	0.999 9	0.800 ~ 16.000	0.035	0.116
His	$Y=1.706\times 10^4 X-1.187\times 10^3$	0.999 8	0.354 ~ 7.072	0.082	0.275
Arg	$Y=1.346\times 10^4 X-1.978\times 10^3$	0.999 8	0.778 ~ 11.664	0.087	0.289
Thr	$Y=1.820\times 10^4 X-2.858\times 10^3$	0.999 8	0.622 ~ 12.448	0.063	0.209
Ala	$Y=2.945\times 10^4 X-5.384\times 10^3$	0.999 9	0.640 ~ 12.800	0.039	0.130
Pro	$Y=2.706\times 10^4 X-4.476\times 10^3$	0.999 9	0.718 ~ 14.368	0.040	0.134
Tyr	$Y=1.904\times 10^4 X-2.574\times 10^3$	0.999 8	0.438 ~ 8.768	0.055	0.183
Val	$Y=2.550\times 10^4 X-4.795\times 10^3$	0.999 9	0.660 ~ 13.200	0.041	0.136
Ile	$Y=2.238\times 10^4 X-3.745\times 10^3$	0.999 8	0.973 ~ 19.456	0.045	0.150
Leu	$Y=2.361\times 10^4 X-4.321\times 10^3$	0.999 9	0.736 ~ 14.720	0.043	0.144
Phe	$Y=1.818\times 10^4 X-2.972\times 10^3$	0.999 9	0.662 ~ 13.248	0.057	0.189
Lys	$Y=3.386\times 10^4 X-7.691\times 10^3$	0.999 9	0.840 ~ 16.800	0.031	0.104

对照品峰面积的 RSD 在 1.22%~2.93% 范围。结果显示本方法的重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 精密称取 0.1 g 样品粉末(S21), 按“2.1.2”和“2.1.3”项下方法制备, 分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进行测定, 测得 15 种氨基酸对照品峰面积的 RSD 在 1.29%~2.86% 范围。结果显示 15 种氨基酸在 24 h 内稳定。

2.3.5 加样回收率试验 取已知含量的样品粉末(S21)0.05 g, 按样品所含各氨基酸量, 以 1:1 的比例加入 15 种氨基酸对照品, 按“2.1.2”和“2.1.3”项下方法制备, 平行 6 份, 注入超高效液相色谱仪进行测定, 计算回收率和 RSD, 结果见表 3。结果显示, 15 种氨基酸平均加样回收率在 95.12%~101.05% 范围, RSD 在 1.32%~2.82% 范围, 表明本方法稳定可靠。

2.4 样品含量测定 精密称取 27 份不同产地滇重楼样品 0.1 g, 按“2.1.2”和“2.1.3”项下方法制备, 重复 3 份, 注入超高效液相色谱仪进行测定。结果见表 4 和表 5。本实验测定的 27 批滇重楼中, 不同产地滇重楼 15 种氨基酸含量多数具有显著性差异 ($P < 0.05$)。氨基酸含量差异与产地的生长环境和土壤因子不同有关^[3,16], 其中滇重楼野生品中氨基酸总含量在 20.251~78.253 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 之间, 平均值为 40.027 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 而滇重楼栽培品中氨基酸总含量在 27.116~67.497 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 之间, 平均值为 50.101 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 表明滇重楼中氨基酸含量丰富。整体上来说, 3 个省 27 批滇重楼样品中 Asp、Glu 和 Arg 含量较高, 3 种

表 3 滇重楼中 15 种氨基酸的加样回收率($n=6$)Table 3 The recoveries of 15 amino acids in *P. polyphylla* var. *yunnanensis* from different areas($n=6$)

成分	回收率/%						平均回收率/%	RSD/%
Asp	96.48	102.11	97.18	96.83	95.42	98.59	97.83	2.45
Glu	97.93	98.76	96.07	97.31	94.00	95.86	96.66	1.74
Ser	98.51	99.01	97.03	97.03	94.55	95.54	96.81	1.75
Gly	98.80	99.20	96.80	98.00	96.40	96.00	97.54	1.36
His	101.82	101.82	98.18	99.09	96.36	94.55	98.73	2.82
Arg	104.53	104.94	102.06	102.88	100.00	100.41	95.12	2.17
Thr	97.42	97.94	98.97	97.42	95.36	101.03	97.98	1.79
Ala	99.00	99.50	96.50	97.50	94.50	95.00	97.02	2.04
Pro	99.11	99.11	102.68	99.55	100.00	98.66	99.85	1.37
Tyr	97.11	97.11	95.95	96.53	99.42	94.80	96.89	1.50
Val	98.12	99.06	96.71	98.12	94.37	95.31	96.92	1.83
Ile	100.41	101.65	100.41	99.18	96.71	97.12	99.27	1.94
Leu	101.74	102.61	99.13	101.74	103.48	97.39	101.05	2.29
Phe	100.97	101.93	98.55	99.52	97.10	97.58	99.27	1.89
Lys	99.24	100.38	95.80	97.71	96.95	94.27	97.42	2.36

氨基酸之和约占滇重楼根茎中 15 种氨基酸总含量的 40%, 而 His 和 Tyr 含量较低。野生品与栽培品滇重楼根茎中 15 种氨基酸平均含量均无显著性差异 ($P > 0.05$)。野生品种滇重楼的氨基酸含量的 CV 都较大, 在 36.45%~79.56% 之间, 表明不同产地野生品间的含量差异较大。而栽培品滇重楼中氨基酸含量的 CV 在 18.07%~45.07% 之间, 含量差异相对较小。15 种氨基酸平均总含量约占滇重楼质量的 5.00%, 即 50 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。另外, 云南、四川和贵州不同产地滇

表 4 野生品滇重楼中 15 种氨基酸含量($\bar{x} \pm s$, mg·g⁻¹; n=3)

Table 4 The contents of 15 amino acids in wild *P. polyphylla* var. *yunnanensis*($\bar{x} \pm s$, mg·g⁻¹; n=3)

编号	Asp	Glu	Ser	Gly	His	Arg	Thr	Ala
S1	2.829±0.021 ^h	3.090±0.052 ^g	1.603±0.110 ^e	1.404±0.056 ^{gh}	0.419±0.006 ^e	1.425±0.012 ^h	1.299±0.008 ^e	1.566±0.042 ^e
S2	5.849±0.011 ^d	5.982±0.033 ^d	2.897±0.017 ^e	2.925±0.011 ^d	1.304±0.066 ^c	4.044±0.023 ^d	2.707±0.098 ^d	3.360±0.101 ^d
S3	9.754±0.044 ^a	10.189±0.286 ^b	4.398±0.015 ^a	4.546±0.015 ^a	2.090±0.013 ^a	9.554±0.035 ^a	4.407±0.054 ^a	4.627±0.030 ^a
S4	4.897±0.055 ^e	5.775±0.029 ^e	2.818±0.011 ^e	2.543±0.106 ^e	0.785±0.020 ^e	3.669±0.038 ^e	2.267±0.014 ^e	2.806±0.040 ^e
S5	8.533±0.046 ^b	8.510±0.120 ^c	4.493±0.010 ^a	3.960±0.011 ^b	1.769±0.021 ^b	9.413±0.032 ^b	3.855±0.021 ^b	4.179±0.020 ^b
S6	6.816±0.026 ^c	11.136±0.062 ^a	3.419±0.127 ^b	3.556±0.014 ^e	1.696±0.110 ^b	5.607±0.021 ^e	3.130±0.012 ^e	4.073±0.013 ^c
S7	3.728±0.002 ^g	2.881±0.035 ^h	1.559±0.104 ^{ef}	1.478±0.071 ^e	0.690±0.015 ^e	2.707±0.019 ^e	1.267±0.072 ^{gh}	1.491±0.004 ^{gh}
S8	2.630±0.033 ⁱ	2.736±0.021 ^{hi}	1.328±0.075 ^g	1.340±0.079 ^b	0.401±0.019 ^e	1.206±0.112 ⁱ	1.052±0.032 ^{ji}	1.428±0.026 ^{ji}
S9	2.834±0.017 ^h	2.615±0.015 ^{ji}	1.466±0.018 ^f	1.389±0.041 ^{gh}	0.404±0.007 ^e	1.285±0.018 ⁱ	1.144±0.011 ^{hi}	1.355±0.015 ^{ji}
S10	4.381±0.005 ^f	4.120±0.032 ^f	2.108±0.012 ^d	2.068±0.092 ^f	0.892±0.107 ^d	2.828±0.019 ^f	1.711±0.105 ^f	2.250±0.013 ^f
S11	2.807±0.017 ^h	2.454±0.025 ^j	1.506±0.015 ^{ef}	1.354±0.011 ^h	0.565±0.012 ^f	1.098±0.012 ^j	0.990±0.117 ^j	1.310±0.054 ^j
平均值	5.005	5.408	2.509	2.415	1.001	3.894	2.166	2.586
CV/%	49.32	59.30	47.08	48.75	61.16	79.56	55.67	49.52

编号	Pro	Tyr	Val	Ile	Leu	Phe	Lys
S1	1.401±0.018 ^h	0.934±0.075 ^g	1.259±0.051 ^e	1.110±0.072 ^g	1.638±0.079 ^{gh}	1.326±0.064 ^{gh}	0.898±0.020 ^e
S2	2.874±0.016 ^d	1.951±0.010 ^d	2.145±0.053 ^c	1.972±0.082 ^c	3.363±0.308 ^e	2.908±0.011 ^d	2.143±0.010 ^e
S3	4.883±0.011 ^a	3.443±0.011 ^a	3.126±0.017 ^a	2.823±0.016 ^a	4.772±0.020 ^a	4.933±0.027 ^a	4.708±0.028 ^a
S4	2.659±0.127 ^e	1.589±0.114 ^e	2.077±0.015 ^c	1.833±0.096 ^d	2.852±0.055 ^d	2.427±0.046 ^e	2.223±0.010 ^e
S5	4.131±0.020 ^b	3.181±0.034 ^b	2.780±0.015 ^b	2.427±0.025 ^b	4.054±0.040 ^b	4.117±0.048 ^b	4.152±0.051 ^b
S6	3.726±0.010 ^c	2.495±0.113 ^c	2.711±0.011 ^b	2.495±0.067 ^b	3.841±0.188 ^b	3.805±0.016 ^c	4.141±0.045 ^b
S7	1.612±0.075 ^g	0.682±0.012 ^{hi}	1.240±0.013 ^e	1.328±0.076 ^f	2.032±0.020 ^f	1.383±0.022 ^g	1.204±0.056 ^e
S8	1.142±0.082 ⁱ	0.832±0.060 ^{gh}	1.255±0.013 ^e	1.121±0.065 ^g	1.532±0.056 ^h	1.167±0.059 ^j	1.082±0.013 ^f
S9	1.416±0.018 ^h	0.698±0.010 ^{hi}	1.242±0.080 ^e	1.188±0.011 ^g	1.827±0.020 ^{fg}	1.301±0.117 ^{ghi}	1.068±0.119 ^f
S10	2.047±0.071 ^f	1.212±0.092 ^f	1.632±0.038 ^d	1.579±0.068 ^e	2.325±0.012 ^e	1.968±0.141 ^f	1.588±0.035 ^d
S11	1.384±0.012 ^h	0.675±0.140 ⁱ	1.217±0.087 ^e	1.107±0.090 ^g	1.820±0.010 ^g	1.221±0.032 ^{hi}	1.017±0.041 ^f
平均值	2.479	1.608	1.880	1.726	2.732	2.414	2.202
CV/%	51.76	63.76	38.56	36.45	40.91	55.71	65.59

注：数据后字母不同表示差异有显著性意义(P<0.05)

重楼中氨基酸的总量存在差异，贵州产区野生品滇重楼的氨基酸总量高于云南和四川产地，而云南栽培品的氨基酸总含量高于其余两省。

3 讨论

滇重楼根茎中氨基酸类成分主要以结合态形式储存于根茎粗蛋白中，测定滇重楼根茎中氨基酸含量需要用 6 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液将其水解为游离氨基酸^[17]。本研究结合文献方法^[18-19]考察了样品的水解温度、水解时间及 6 mol·L⁻¹ 盐酸用量等提取条件，最终确定了料液比为 1:100(g:mL)、在 110 ℃ 条件下水解 22 h 的水解条件，样品水解完全。柱前衍生化方法中，常用的衍生剂有异硫氰酸苯酯(Phenylisothiocyanate，

PITC)、邻苯二醛(o-Phthaldialdehyde，OPA)、2,4-二硝基氟苯(2,4-Dinitrobenzene，FDNB)等^[20]。本研究采用操作方便、稳定可靠的 PITC 试剂对氨基酸进行柱前衍生化^[21]，并考察了温度、时间及用量等衍生化条件，最终确定了 0.4 mL 水解液加入 PITC 溶液 0.2 mL，20 ℃ 条件下衍生 60 min，样品衍生完全。同时，在衍生过程中，氨基酸与 PITC 的衍生反应对溶液 pH 要求较高，需在弱碱环境下进行，然而使用碱溶液中和高浓度盐酸溶液会使溶液中盐酸浓度提高，影响色谱峰分离效果。所以，本研究采用氮吹模式，用惰性气体氮气吹去高浓度盐酸溶液，避免了因调节 pH 而产生的溶剂效应，使色谱峰峰形较好。本研究发现 3 省 27 批不同产地滇重楼根茎中

表 5 栽培品滇重楼中 15 种氨基酸含量($\bar{x} \pm s$, mg·g⁻¹; n=3)Table 5 The contents of 15 amino acids in cultivated *P. polyphylla* var. *yunnanensis* ($\bar{x} \pm s$, mg·g⁻¹; n=3)

编号	Asp	Glu	Ser	Gly	His	Arg	Thr	Ala
S12	5.637 ± 0.031 ^h	6.019 ± 0.032 ^g	2.761 ± 0.011 ^{def}	2.833 ± 0.061 ^{de}	1.083 ± 0.044 ^{def}	2.552 ± 0.098 ^m	2.391 ± 0.119 ^e	3.043 ± 0.007 ^e
S13	4.245 ± 0.021 ^k	5.649 ± 0.036 ^j	2.115 ± 0.021 ⁱ	2.067 ± 0.013 ^j	0.609 ± 0.016 ^e	2.600 ± 0.018 ^m	1.821 ± 0.017 ^h	2.994 ± 0.022 ^f
S14	6.047 ± 0.030 ^g	6.341 ± 0.033 ^e	2.687 ± 0.109 ^{efg}	2.545 ± 0.012 ^{gh}	0.987 ± 0.143 ^{ef}	6.462 ± 0.018 ^e	2.241 ± 0.034 ^f	2.737 ± 0.031 ^h
S15	7.800 ± 0.034 ^e	5.821 ± 0.026 ⁱ	2.877 ± 0.007 ^{cd}	2.646 ± 0.048 ^{fg}	1.118 ± 0.022 ^{de}	8.451 ± 0.046 ^d	2.325 ± 0.014 ^{ef}	2.756 ± 0.014 ^h
S16	6.225 ± 0.048 ^f	5.882 ± 0.031 ^{hi}	2.516 ± 0.011 ^{gh}	2.526 ± 0.043 ^{gh}	1.056 ± 0.073 ^{ef}	4.969 ± 0.034 ⁱ	2.291 ± 0.020 ^{ef}	2.604 ± 0.015 ⁱ
S17	6.034 ± 0.141 ^g	8.178 ± 0.041 ^b	2.569 ± 0.309 ^g	3.016 ± 0.017 ^c	1.328 ± 0.017 ^b	4.201 ± 0.017 ^k	2.685 ± 0.013 ^c	3.201 ± 0.015 ^d
S18	7.528 ± 0.052 ^d	8.841 ± 0.040 ^a	3.707 ± 0.010 ^a	3.962 ± 0.058 ^a	1.568 ± 0.014 ^a	8.812 ± 0.025 ^c	3.414 ± 0.012 ^a	4.231 ± 0.015 ^a
S19	5.928 ± 0.015 ^g	6.043 ± 0.015 ^g	2.845 ± 0.015 ^{cde}	2.684 ± 0.014 ^f	1.039 ± 0.013 ^{ef}	6.353 ± 0.021 ^f	2.352 ± 0.015 ^{ef}	2.673 ± 0.010 ⁱ
S20	4.036 ± 0.034 ^l	3.872 ± 0.013 ^l	2.651 ± 0.100 ^{fg}	2.734 ± 0.041 ^{ef}	1.037 ± 0.070 ^{ef}	5.004 ± 0.011 ^j	2.380 ± 0.082 ^e	2.092 ± 0.058 ⁱ
S21	5.156 ± 0.089 ⁱ	6.223 ± 0.068 ^f	3.359 ± 0.007 ^b	2.897 ± 0.015 ^{cd}	1.238 ± 0.021 ^{bc}	5.140 ± 0.047 ⁱ	2.540 ± 0.031 ^d	2.881 ± 0.032 ^e
S22	3.576 ± 0.034 ^m	3.907 ± 0.012 ^l	1.649 ± 0.022 ^j	1.636 ± 0.062 ^k	0.713 ± 0.015 ^e	2.179 ± 0.135 ⁿ	1.369 ± 0.123 ⁱ	1.926 ± 0.046 ^m
S23	4.874 ± 0.019 ^j	5.472 ± 0.043 ^k	2.374 ± 0.014 ^h	2.250 ± 0.022 ⁱ	0.961 ± 0.013 ^f	3.610 ± 0.024 ^l	2.019 ± 0.024 ^g	2.424 ± 0.016 ^k
S24	7.981 ± 0.135 ^b	6.732 ± 0.022 ^d	2.958 ± 0.022 ^c	2.970 ± 0.173 ^c	1.323 ± 0.106 ^b	10.068 ± 0.034 ^b	2.687 ± 0.014 ^c	3.357 ± 0.010 ^e
S25	8.413 ± 0.060 ^a	7.518 ± 0.031 ^c	3.379 ± 0.026 ^b	3.427 ± 0.007 ^b	1.298 ± 0.135 ^b	10.778 ± 0.044 ^a	3.178 ± 0.016 ^b	3.565 ± 0.013 ^b
S26	6.392 ± 0.086 ^e	5.671 ± 0.030 ^j	2.534 ± 0.022 ^{gh}	2.519 ± 0.020 ^h	0.996 ± 0.015 ^{ef}	6.069 ± 0.026 ^e	2.046 ± 0.102 ^d	2.617 ± 0.016 ^j
S27	6.537 ± 0.119 ^e	5.918 ± 0.030 ^h	2.944 ± 0.032 ^c	2.990 ± 0.088 ^c	1.196 ± 0.040 ^{cd}	5.742 ± 0.024 ^b	2.535 ± 0.011 ^g	2.969 ± 0.014 ^f
平均值	6.026	6.130	2.745	2.731	1.097	5.812	2.392	2.879
CV/%	23.76	21.07	18.07	18.48	21.47	45.07	20.33	19.31

编号	Pro	Tyr	Val	Ile	Leu	Phe	Lys
S12	2.769 ± 0.017 ^f	2.000 ± 0.182 ^e	2.269 ± 0.021 ^{cd}	2.042 ± 0.014 ^{de}	3.089 ± 0.010 ^f	2.829 ± 0.025 ^e	1.446 ± 0.016 ^l
S13	2.077 ± 0.079 ⁱ	1.537 ± 0.125 ^{hi}	1.658 ± 0.067 ^h	1.569 ± 0.010 ^h	2.311 ± 0.029 ^j	2.056 ± 0.014 ⁱ	1.210 ± 0.011 ^m
S14	2.572 ± 0.127 ^g	1.835 ± 0.094 ^{de}	1.984 ± 0.015 ^f	1.631 ± 0.115 ^{gh}	2.690 ± 0.082 ⁱ	2.465 ± 0.015 ^g	2.435 ± 0.011 ^f
S15	2.734 ± 0.012 ^f	1.613 ± 0.099 ^{ghi}	2.226 ± 0.048 ^{de}	2.289 ± 0.010 ^b	3.531 ± 0.018 ^d	2.554 ± 0.010 ^f	2.298 ± 0.011 ^g
S16	2.492 ± 0.012 ^g	1.762 ± 0.059 ^{ef}	1.827 ± 0.010 ^g	1.697 ± 0.020 ^g	2.846 ± 0.023 ^h	2.498 ± 0.015 ^{fg}	2.300 ± 0.022 ^g
S17	3.004 ± 0.013 ^{de}	2.428 ± 0.017 ^{ab}	2.463 ± 0.024 ^b	2.258 ± 0.011 ^b	3.337 ± 0.014 ^e	3.048 ± 0.061 ^c	3.359 ± 0.020 ^b
S18	3.877 ± 0.065 ^a	2.514 ± 0.044 ^a	3.187 ± 0.016 ^a	2.958 ± 0.013 ^a	4.527 ± 0.015 ^a	3.927 ± 0.020 ^a	4.443 ± 0.032 ^a
S19	3.243 ± 0.025 ^c	1.483 ± 0.072 ⁱ	2.362 ± 0.076 ^{bc}	2.263 ± 0.090 ^b	3.854 ± 0.014 ^{bc}	2.777 ± 0.105 ^e	2.206 ± 0.022 ^h
S20	2.989 ± 0.077 ^{de}	1.665 ± 0.023 ^{gh}	1.988 ± 0.012 ^f	2.149 ± 0.039 ^c	3.431 ± 0.013 ^{de}	2.755 ± 0.078 ^e	1.842 ± 0.048 ^j
S21	2.945 ± 0.036 ^e	1.726 ± 0.013 ^{efg}	2.384 ± 0.044 ^b	2.302 ± 0.034 ^b	3.757 ± 0.054 ^c	2.805 ± 0.033 ^e	2.521 ± 0.045 ^e
S22	1.587 ± 0.078 ^j	1.038 ± 0.005 ^j	1.364 ± 0.020 ^j	1.268 ± 0.031 ⁱ	1.857 ± 0.155 ^k	1.524 ± 0.013 ^j	1.523 ± 0.016 ^k
S23	2.326 ± 0.011 ^h	1.508 ± 0.011 ⁱ	1.922 ± 0.048 ^{fg}	1.724 ± 0.017 ^g	2.855 ± 0.044 ^{gh}	2.223 ± 0.012 ^h	1.958 ± 0.015 ⁱ
S24	3.071 ± 0.015 ^d	1.856 ± 0.050 ^{de}	2.226 ± 0.017 ^{de}	1.937 ± 0.081 ^{ef}	3.341 ± 0.022 ^e	2.951 ± 0.024 ^d	3.027 ± 0.052 ^c
S25	3.693 ± 0.018 ^b	2.326 ± 0.061 ^b	2.376 ± 0.141 ^{bc}	2.293 ± 0.030 ^b	3.869 ± 0.029 ^b	3.576 ± 0.026 ^b	3.39 ± 0.055 ^b
S26	2.526 ± 0.011 ^g	1.594 ± 0.053 ^{dhi}	1.897 ± 0.064 ^{fg}	1.927 ± 0.093 ^f	2.952 ± 0.014 ^g	2.434 ± 0.040 ^g	2.215 ± 0.011 ^h
S27	3.053 ± 0.072 ^{de}	1.941 ± 0.065 ^{cd}	2.149 ± 0.076 ^e	2.124 ± 0.017 ^{cd}	3.494 ± 0.022 ^d	2.959 ± 0.043 ^d	2.712 ± 0.016 ^d
平均值	2.810	1.802	2.143	2.027	3.234	2.711	2.430
CV/%	20.20	21.18	18.99	19.64	20.18	20.80	34.03

注: 数据后字母不同表示差异有显著性意义($P < 0.05$)

Glu 平均含量最高, 其次是 Asp, 而 His 平均含量最低, 与苏豹等^[22]测定的结果一致。本研究测定了滇重楼中 15 种氨基酸, 不仅包含了 8 种药用氨基酸 (Asp、Glu、Gly、Arg、Tyr、Leu、Phe、Lys), 还含

有人体所需的 6 种必需氨基酸 (Thr、Val、Ile、Leu、Phe、Lys)^[3]。说明滇重楼作为传统名贵濒危药用植物, 氨基酸类成分的含量丰富, 可提供药用价值较高的植物源蛋白。滇重楼栽培品根茎各氨基酸平均

含量均高于野生品, 原因可能是栽培滇重楼在生长过程中, 人为施加氮肥较多, 增加了土壤中的氮元素, 进而促进了氨基酸的合成^[23-24]。

以滇重楼 15 种氨基酸总含量平均值比较, 贵州产区野生品的氨基酸总含量高于云南、四川; 云南产区栽培品的氨基酸总含量高于贵州、四川。氨基酸平均总含量约占滇重楼质量的 5.00%, 即 $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 极具开发作为补充氨基酸的功能性食品和保健品的潜力。滇重楼野生品和栽培品无论是 15 种氨基酸的种类还是平均含量无显著性差异, 与王骞等^[10]对不同产地滇重楼单糖的研究结果一致。表明栽培品滇重楼可以代替野生品入药使用, 以解决滇重楼资源匮乏问题。

本试验建立的 PITC 柱前衍生 UPLC 法能够准确测定滇重楼中 15 种氨基酸的含量, 灵敏度高、分离效果好、结果稳定可靠, 可作为滇重楼的品质评价指标之一。同时比较了西南地区野生与栽培滇重楼根茎中氨基酸含量差异, 为滇重楼品种选育, 解决其资源匮乏等问题提供了理论参考。

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, 2020: 271-272.
- [2] WANG Y H, SHI M, NIU H M, Et al. Substituting one Paris for another? In vitro cytotoxic and in vivo antitumor activities of Paris forrestii, a substitute of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 2(18): 45-50.
- [3] 杨勤, 黄小兰, 沈力, 等. 基于氨基酸成分分析不同品种重楼品质评价[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(6): 87-92.
- [4] QIN X J, NI W, CHEN C X, et al. Seeing the light: Shifting from wild rhizomes to extraction of active ingredients from above-ground parts of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 2(24): 134-139.
- [5] 赵飞亚, 陶爱恩, 夏从龙. 基于国内专利结合资源、应用与开发发现的重楼发展策略探讨[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(2): 404-409.
- [6] 杨斌, 李绍平, 严世武, 等. 滇重楼资源现状及可持续利用研究[J]. 中药材, 2012, 35(10): 1698-1700.
- [7] 杨敏, 郭冬琴, 沈昱翔, 等. 正交试验优化滇重楼核苷提取工艺[J]. 南方农业学报, 2017, 48(5): 876-882.
- [8] 谷文超, 赵顺鑫, 杨敏, 等. 不同产地滇重楼须根中氨基酸类成分的 UPLC 分析与评价[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(9): 1562-1575.
- [9] 谷文超, 郭冬琴, 杨敏, 等. 超高效液相色谱法测定野生与栽培滇重楼根茎及须根中 9 种甾体皂苷的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(7): 838-847.
- [10] 孟莹, 王骞, 周浓, 等. 滇重楼野生品种与栽培品种核苷类成分质量等同性研究[J]. 西南农业学报, 2019, 32(8): 1723-1729.
- [11] 王骞, 杨敏, 郭冬琴, 等. PMP 柱前衍生 HPLC 法测定野生与移栽滇重楼多糖的单糖组成[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(12): 1503-1509.
- [12] 陈蓉, 张超, 顾倩, 等. 柱前衍生-HPLC 法同时测定不同产地茯苓中 18 种氨基酸含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(2): 297-303.
- [13] 王强, 徐国钧. 七叶一枝花类中药的氨基酸分析[J]. 氨基酸杂志, 1989, 15(1): 53-56.
- [14] 杨芳, 严世武, 马维思, 等. 滇重楼不同部位氨基酸测定及营养评价[J]. 西南农业学报, 2017, 30(8): 1760-1766.
- [15] 王骞, 丁媛, 杨敏, 等. 滇重楼品质与产地和表型性状相关性分析[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(15): 3203-3212.
- [16] 杨永红, 戴丽君, 何昆鸿, 等. 土壤营养与人工栽培滇重楼品质相关性评价[J]. 中药材, 2012, 35(10): 1557-1561.
- [17] 赵加茜, 朱卫丰, 陈丽华, 等. 基于主成分分析和聚类分析的发酵虫草菌粉类产品氨基酸比较研究[J]. 中草药, 2018, 49(12): 2866-2872.
- [18] GB/5009.124-2016, 食品安全国家标准食品中氨基酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [19] 陈文, 王湘君, 王玉杰, 等. 响应曲面法优化海参氨基酸提取工艺[J]. 食品工业, 2018, 39(8): 154-160.
- [20] 赫欣睿, 武中庸, 叶永丽, 等. 高效液相色谱法测定氨基酸的研究进展[J]. 分析测试学报, 2016, 35(7): 922-928.
- [21] 魏祖晨, 赵顺鑫, 周浓, 等. 响应面法优化浙贝母氨基酸提取工艺及含量测定[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(8): 180-188, 196.
- [22] 苏豹, 杨志雷, 杨永红, 等. 滇重楼药材及腐烂根茎中氨基酸和元素的测定[J]. 中国现代中药, 2013, 15(7): 587-589.
- [23] 徐宇, 肖化云, 郑能建, 等. 植物组织中游离氨基酸在盐胁迫下响应的研究进展[J]. 环境科学与技术, 2016, 39(7): 40-47.
- [24] 许丽卫, 刘杰云, 汤宏, 等. 稻田温室气体减排措施对稻米氨基酸含量的影响[J]. 生态学报, 2014, 34(16): 4561-4571.

(编辑: 梁进权)