

柱后衍生阳离子交换色谱法测定甘肃紫斑牡丹花粉氨基酸含量*

李运¹, 邱国玉^{1**}, 石晓峰^{1,2**}, 李志俊¹, 王斌利³, 王新娣², 张菁菁¹

(1. 兰州市食品药品检验所, 兰州 730030; 2. 甘肃省医学科学研究院, 兰州 730050; 3. 甘肃中医药大学, 兰州 730030)

摘要 目的: 建立柱后衍生阳离子交换色谱方法, 测定甘肃紫斑牡丹花粉氨基酸的含量。 **方法:** 样品加 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸于 $110 \text{ }^\circ\text{C}$ 水解 22 h。采用柱后衍生阳离子交换色谱法, 对甘肃产紫斑牡丹花粉氨基酸的含量进行分析; 色谱柱: LCAK06/Na 型磺酸基强酸性阳离子交换树脂色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$), 梯度洗脱, 其中 A 泵(溶液泵)流速为 $0.45 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, M 泵(茚三酮泵)流速为 $0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长为 440 nm (脯氨酸)和 570 nm (其余氨基酸), 进样量为 $50 \text{ } \mu\text{L}$ 。 **结果:** 该测定方法中天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸的线性关系良好; 精密度 RSD 范围为 $0.10\% \sim 1.6\%$, 重复性 RSD 范围为 $0.20\% \sim 1.5\%$; 平均回收率 ($n=6$) 在 $89.5\% \sim 98.2\%$ 之间, RSD 在 $0.81\% \sim 2.9\%$ 之间。样品中所含氨基酸的范围为 $4.13 \sim 44.23 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 破壁前后所测得氨基酸含量无显著差异。 **结论:** 所建立的分析方法可作为紫斑牡丹花粉中氨基酸的定量分析。

关键词: 紫斑牡丹; 花粉; 氨基酸; 中药材含量测定; 柱后衍生; 阳离子交换色谱法

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2017)06-0988-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.06.09

Determination of amino acids in *Paeonia rockii* pollen by post-column derivatization cation-exchange chromatography*

LI Yun¹, QIU Guo-yu^{1**}, SHI Xiao-feng^{1,2**}, LI Zhi-jun¹, WANG Bin-li³,
WANG Xin-di², ZHANG Jing-jing¹

(1. Lanzhou Institutes for Food and Drug Control, Lanzhou 730030, China; 2. Gansu Academy of Medical Science, Lanzhou 730050, China;
3. Gansu University of TCM, Lanzhou 730030, China)

Abstract Objective: To establish a method for detection of amino acids in *Paeonia rockii* pollen. **Methods:** The sample was hydrolyzed with $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ hydrochloric acid for 22 hours at $110 \text{ }^\circ\text{C}$. The content of amino acids in *Paeonia rockii* pollen were detected by cation-exchange chromatography with post-column derivatization. The cation exchange resin LCAK06/Na column ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$) with gradient elution was adopted, where

* 兰州市科技计划项目(编号: 2016-3-17)

** 通信作者 邱国玉 Tel:(0931)8271926; E-mail: 837419378@qq.com

石晓峰 Tel:(0931)2302664; E-mail: shixiaofeng2005@sina.com

第一作者 Tel:(0931)8278910, E-mail: lyun04@163.com

A pump (solution pump) and M pump (ninhydrin pump) were at a flow rate of $0.45 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and $0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, respectively. The detection wavelength were set at 440 nm (proline) and 570 nm (the other amino acids), and injection volume was $50 \mu\text{L}$. **Results:** The method showed a good linear relationship for the determination of aspartate acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, cystine, valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, histidine, lysine and arginine; the RSDs of precision were in the range of 0.10% – 1.6% , the RSDs of repeatability were in the range of 0.20% – 1.5% , the average recoveries and RSDs were between 89.5% – 98.2% and 0.81% – 2.9% ($n=6$), respectively. The contents of amino acids ranged from 4.13 to $44.23 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ in the samples, and their contents had no significant difference between wall-unbroken and broken pollen. **Conclusion:** The developed method can be applied to the analysis of amino acids in *Paeonia rockii* pollen.

Keywords: *Paeonia rockii*; pollen; amino acids; TCM determination; post-column derivatization; cation exchange chromatography

紫斑牡丹 (*Paeonia rockii*) 为毛茛科 (Ranunculaceae) 芍药属 (*Paeonia*) 牡丹组 (Sect. Moutan) 多年生落叶灌木, 又名甘肃牡丹、西北牡丹, 因花瓣基部有 1 个明显的色斑而得名^[1], 是我国中西部地区的特有中药材和花中珍品, 分布于四川北部、甘肃南部、陕西秦岭中段以西, 也是仅次于中原牡丹品种群的第二大品种群^[2], 被列为国家珍稀濒危三级重点保护植物^[3]。近十年来紫斑牡丹在甘肃陇南、天水、定西、临夏、兰州等地广泛种植, 不仅是一种重要的观赏植物, 其根皮作为药用丹皮被甘肃省中药材标准收载^[4-5]。我国自公布了油菜花粉、松花粉、向日葵花粉、紫云英花粉、荞麦花粉、高粱花粉可作为药食兼用花粉之后, 花粉作为普通食品得到应有的重视^[6-7]。目前国内有关紫斑牡丹花粉发育的细胞形态学^[8]、胚离体培养^[9-10]、染色体核型^[11]、脂肪酸组成^[3]、繁殖技术^[12]等方面的研究较多, 但尚未见对紫斑牡丹花粉氨基酸含量分析的报道。氨基酸的常用检测方法有毛细管电泳法^[13]、近红外法^[14]、氨基酸分析法^[15]及高效液相色谱法^[16], 其中, 利用氨基酸分析仪进行样本的测定, 方法稳定成熟。为此, 本试验采用该法, 对甘肃产紫斑牡丹花粉氨基酸的含量进行分析, 希冀为其进一步开发利用提供参考。

1 仪器与试剂

SYKAM 公司 S-433D 氨基酸全自动分析仪 (含 S7130 溶剂存放单元、S5200 全自动进样器、S4300 氨基酸反应模块、S2100 梯度泵); LCAK06/Na 型磺酸基强酸性阳离子交换树脂色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, 赛卡姆公司产品); Organomation 公司 N-WVAP

112 型氮吹仪; Mettler 公司 S220-K 型酸度计; 上海精宏实验设备有限公司恒温干燥箱; Sartorius 公司 BSA224S-CW 型电子天平; 默克化工技术 (上海) 有限公司 Milli-Q advantage A 10 超纯水系统。

氨基酸对照品 (批号 SLBM6769V, 供氨基酸鉴别和含量测定用, 包括 Ala、Arg、Asp、Cys、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Tyr、Val), 由 SIGMA-ALDRICH 公司提供; 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 茚三酮及其他试剂均为优级纯。

花粉采集于兰州新区兰州中川牡丹产业有限公司牡丹园, 原植物经兰州中川牡丹产业有限公司赵潜龙高级工程师鉴定为毛茛科芍药属植物紫斑牡丹 [*Paeonia rockii* (S.G.Haw. et Laeuner) T.Hang et T.J.Li]; 破壁紫斑牡丹花粉 (破壁率达 100%) 由甘肃省医学科学院药物所提供。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 试液 缓冲液 A: 称取柠檬酸三钠 11.8 g 及柠檬酸 6 g , 加入约 300 mL 的水溶解, 再加入乙醇 65 mL 和浓盐酸 5.6 mL , 然后用水稀释至 1 L (浓盐酸调 pH 至 3.45), 并用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 即得。

缓冲液 B: 称取柠檬酸三钠 19.6 g , 氢氧化钠 3.1 g , 硼酸 5.0 g , 加水溶解并稀释至 1 L (浓盐酸调 pH 至 10.85), 并用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 即得。

再生液 C: 称取氢氧化钠 20.0 g , 乙二胺四乙酸 0.2 g , 用水溶解并稀释至 1 L , 并用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 即得。

样品稀释液: 称取柠檬酸三钠 11.8 g , 浓盐酸

10.4 mL,用水溶解并稀释至1 L(浓盐酸调pH至2.20),并用0.45 μm滤膜过滤,即得。

茛三酮衍生化试剂:称取茛三酮20 g,苯酚2 g,加入600 mL甲醇中,不断搅拌至茛三酮完全溶解,用0.45 μm的滤膜过滤,然后向滤液中加入400 mL钾钠缓冲液(醋酸钾196.0 g和三水乙酸钠272.0 g用适量去离子水溶解,再加入乙酸200 mL,用去离子水定容至1 L,用0.45 μm滤膜过滤,即得),转移至茛三酮试剂瓶中,用氮气从底部吹大约3~5 min,即得。

2.1.2 混合对照品溶液 精密量取混合氨基酸对照品适量,加稀释液制成浓度为50 nmol·L⁻¹(胱氨酸)和100 nmol·L⁻¹(其余16种氨基酸)的混合溶液,即得。4℃保存。

2.1.3 供试品溶液 精密称取已过80目筛的样品粉末0.2 g,置于水解管中,加6 mol·L⁻¹盐酸10 mL,加入新蒸馏的苯酚3滴;将水解管置于-18℃冰箱中冷冻5 min后,通氮气封口,置110℃烘箱内水解22 h,取出放冷至室温,打开水解管,将水解液过滤后,用去离子水多次冲洗水解管,将水解液全部转移至250 mL量瓶中,用去离子水定容;吸取上述溶液1 mL于10 mL烧杯内,蒸干,残留物用1 mL水溶解,再蒸干,反复进行2次。将残渣用1 mL样品稀释液溶解至离心管中,10 000 r·min⁻¹离心10 min,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.2 色谱条件

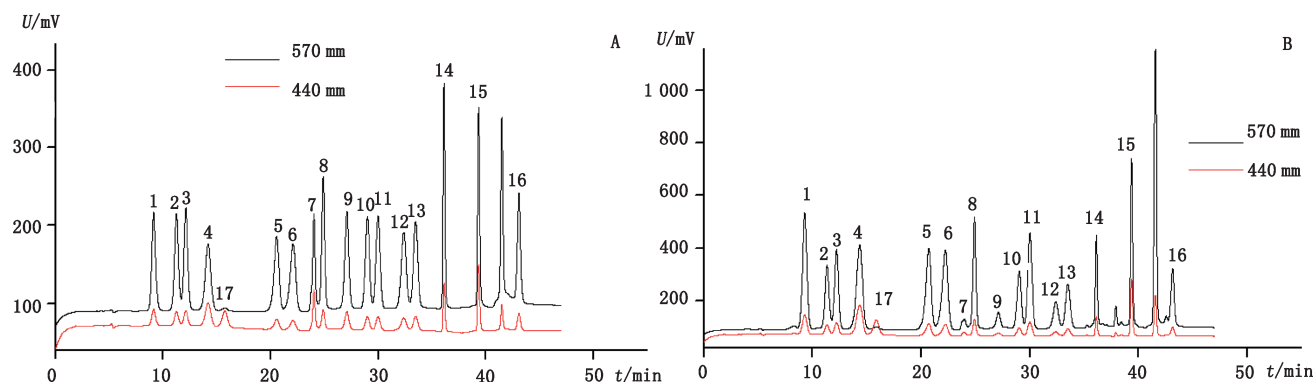
色谱柱: LCAK 06/Na型磺酸基强酸性阳离子交换树脂色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相: 缓冲液A、缓冲液B、再生液C;衍生化试剂: 茛三酮;梯度洗脱程序见表1;流速: A泵(洗脱泵)0.45 mL·min⁻¹, M泵(衍生泵)0.25 mL·min⁻¹;检测波长: 440 nm(脯氨酸)和570 nm(其余氨基酸);进样量: 50 μL。

表1 梯度洗脱程序

时间 (time) / min	缓冲液 A (Buffer A) /%	缓冲液 B (Buffer B) /%	缓冲液 C (Buffer C) /%
0.0	100	0	0
4.0	100	0	0
11.0	85	15	0
17.0	80	20	0
23.0	67	33	0
27.0	20	80	0
29.0	20	80	0
30.0	0	100	0
42.0	0	100	0
42.1	0	0	100
45.1	0	0	100
45.2	100	0	0
58.2	100	0	0
58.3	100	0	0

2.3 系统适用性试验

分别精密吸取上述混合对照品溶液和供试品溶液各50 μL,按“2.2”项下色谱条件进行测定。结果选择2个检测波长440 nm(脯氨酸)和570 nm(其余氨基酸),混合对照品和样品中的氨基酸得到了很好的分离,色谱图见图1。



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

图1 混合对照品(A)和紫斑牡丹花粉样品(B)色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed amino acids standard (A) and *Paeonia rockii* pollen sample (B)

2.4 方法学验证

2.4.1 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液,配制成浓度分别为20、40、80、160、200 nmol·L⁻¹

的系列对照品溶液,按上述色谱条件注入氨基酸分析仪,测定峰面积,以峰面积Y对氨基酸质量浓度X(μg·mL⁻¹)进行线性回归,得回归方程见表2。

表 2 17 种氨基酸的线性关系

Tab. 2 Linear relations of 17 amino acids

编号 (No.)	氨基酸 (amino acid)	回归方程 (regression equation)	<i>r</i>	线性范围 (linear range)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	天冬氨酸(Asp)	$Y=2.739 \times 10^5 X+256.942\ 06$	0.994 0	2.662~53.240
2	苏氨酸(Thr)	$Y=2.943 \times 10^5 X+394.366\ 15$	0.993 9	2.382~47.648
3	丝氨酸(Ser)	$Y=3.536 \times 10^5 X+348.610\ 63$	0.994 3	2.102~42.036
4	谷氨酸(Glu)	$Y=2.377 \times 10^5 X+331.159\ 58$	0.994 5	2.943~58.852
5	脯氨酸(Pro)	$Y=3.477 \times 10^5 X+121.859\ 92$	0.998 9	2.303~46.052
6	甘氨酸(Gly)	$Y=4.138 \times 10^5 X+326.407\ 33$	0.994 1	1.501~30.028
7	丙氨酸(Ala)	$Y=4.301 \times 10^5 X+387.484\ 72$	0.997 5	1.782~35.636
8	胱氨酸(Cys)	$Y=1.814 \times 10^5 X+340.731\ 02$	0.992 6	2.403~48.060
9	缬氨酸(Val)	$Y=3.256 \times 10^5 X+182.137\ 85$	0.992 9	2.343~46.860
10	蛋氨酸(Met)	$Y=2.430 \times 10^5 X+363.780\ 8$	0.994 5	2.984~59.684
11	异亮氨酸(Ile)	$Y=2.781 \times 10^5 X+320.848\ 84$	0.994 0	2.623~52.468
12	亮氨酸(Leu)	$Y=2.825 \times 10^5 X+347.448\ 29$	0.994 1	2.623~52.468
13	酪氨酸(Tyr)	$Y=1.944 \times 10^5 X+335.435\ 02$	0.994 2	3.624~72.476
14	苯丙氨酸(Phe)	$Y=2.105 \times 10^5 X+245.854\ 05$	0.994 9	3.304~66.076
15	组氨酸(His)	$Y=2.278 \times 10^5 X+543.75\ 57$	0.994 2	3.103~62.064
16	赖氨酸(Lys)	$Y=2.608 \times 10^5 X+296.935\ 51$	0.994 3	2.924~58.476
17	精氨酸(Arg)	$Y=1.860 \times 10^5 X+298.650\ 39$	0.994 3	3.484~69.680

2.4.2 精密度试验 精密吸取“2.4.1”项下浓度为 $160\ \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液 $50\ \mu\text{L}$, 按上述色谱条件连续进样 5 次, 测定峰面积, 结果 17 种氨基酸峰面积的 RSD 在 0.10%~1.6% 之间, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 精密称取同一批次未破壁花粉样品 5 份, 按“2.1.3”项下方法平行制备供试

品溶液, 按上述色谱条件测定含量, 结果 RSD 为 0.20%~1.5%, 表明本方法重复性良好。

2.4.4 加样回收率试验 精密称取已知含量的未破壁花粉样品 200 mg, 共 6 份, 分别精密加入相当于样品各待测氨基酸原有量 100% 的各对照品, 按“2.1.3”项下方法制备供试溶液, 按“2.2”项下条件进样分析, 结果见表 3, 表明该方法加样回收试验结果良好。

 表 3 样品加样回收试验 ($n=6$)

Tab. 3 Results of recovery test

成分 (component)	样品含量 (content)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (detected)/mg	回收率 (recovery)/%	RSD/ %
天冬氨酸(Asp)	3.620	3.328	6.891	98.2	2.0
苏氨酸(Thr)	1.683	1.490	3.134	97.4	1.5
丝氨酸(Ser)	1.801	1.575	3.264	92.9	1.9
谷氨酸(Glu)	4.211	3.675	7.810	98.0	2.2
脯氨酸(Pro)	0.398	0.575	0.916	91.2	1.3
甘氨酸(Gly)	1.700	1.688	3.311	95.5	1.7
丙氨酸(Ala)	2.013	2.003	3.895	93.9	1.3
胱氨酸(Cys)	0.256	0.300	0.549	97.7	1.2
缬氨酸(Val)	2.120	2.048	4.103	96.8	1.4
蛋氨酸(Met)	0.458	0.559	0.992	95.4	2.5
异亮氨酸(Ile)	1.679	1.625	3.128	89.5	2.9
亮氨酸(Leu)	2.755	2.763	5.410	96.1	2.1
酪氨酸(Tyr)	1.182	1.350	2.437	92.8	1.4
苯丙氨酸(Phe)	1.731	1.650	3.372	99.4	1.1
组氨酸(His)	1.204	1.163	2.349	98.5	0.81
赖氨酸(Lys)	2.516	2.555	4.916	94.0	1.6
精氨酸(Arg)	1.807	1.740	3.500	97.3	1.8

2.5 样品测定

精密称取破壁前后紫斑牡丹花粉样品,分别按“2.1.2”项下方法平行制备供试品溶液各3份;按上述色谱条件,分别精密吸供试品溶液各50 μL 进样测定,以外标法计算含量,测定结果:破壁前紫斑牡丹花粉中平均总氨基酸含量为31.669%,破壁紫斑牡丹花粉中平均总氨基酸含量为33.048%,见表4。

表4 紫斑牡丹花粉中水解氨基酸的测定结果(%, $n=3$)

编号 (No.)	氨基酸 (amino acid)	未破壁花粉 (wall-unbroken pollen)	破壁花粉 (wall-broken pollen)
1	天冬氨酸(Asp)	3.740	3.952
2	苏氨酸(Thr)	1.678	1.817
3	丝氨酸(Ser)	1.818	1.959
4	谷氨酸(Glu)	4.244	4.423
5	脯氨酸(Pro)	0.413	0.427
6	甘氨酸(Gly)	1.732	1.736
7	丙氨酸(Ala)	2.189	2.198
8	胱氨酸(Cys)	0.270	0.342
9	缬氨酸(Val)	2.091	2.120
10	蛋氨酸(Met)	0.475	0.512
11	异亮氨酸(Ile)	1.699	1.739
12	亮氨酸(Leu)	2.867	2.948
13	酪氨酸(Tyr)	1.190	1.292
14	苯丙氨酸(Phe)	1.696	1.785
15	组氨酸(His)	1.224	1.178
16	赖氨酸(Lys)	2.552	2.639
17	精氨酸(Arg)	1.792	1.981
总氨基酸含量 (total content of amino acids)		31.669	33.048

3 讨论

3.1 最佳取样量的优选

本研究前期利用福斯凯氏定氮仪对紫斑牡丹花粉中氮含量进行测定,结果表明含氮量为 $62.16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,依氮与蛋白质的换算系数 $6.25^{[17]}$ 进行计算,该花粉中粗蛋白含量为38.85%。结合粗蛋白含量,对供试品溶液制备称样量进行考察,分别称取含蛋白质20、60、120、240、300及360 mg的样品进行水解,制备供试品溶液,以各峰面积的总和计,评价最佳样品取样量。含量测定结果表明,伴随着取样量的增加,各供试品溶液中色谱峰峰面积总和近乎呈现线性

增加,而后增加不明显。最终确定最佳取样量为约含蛋白质20~120 mg。

3.2 最佳酸水解浓度的选择

考察了不同浓度盐酸($3, 6, 9 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)水解作用的影响,以各峰面积总和计算,结果表明随着盐酸浓度的增加,各色谱峰的峰面积增加。但用 $9 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸进行样品水解时,水解管上层可见有少量已碳化的黑色颗粒,同时各色谱峰面积总和降低,且小于用 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸进行样品的水解;综合考量,最终确定用 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸作为水解溶剂。

3.3 小结

花粉是植物生命的精华,具有很高的营养价值、药用价值和区域的特有性,富含蛋白质、黄酮等多种活性成分。在花粉的利用过程中,由于其外部有一层坚硬的孢子壁,阻碍了内部营养物质的溶出,破壁有利于活性物质的释放^[3],提高生物利用率。通过对紫斑牡丹花粉破壁前后水解氨基酸的含量进行测定,发现花粉破壁前后氨基酸的总量及各氨基酸含量没有显著性差异,究其原因可能与它们均经过水解且都水解的比较彻底有关。

目前,国内外氨基酸分析方法主要采用衍生化分析法,分为柱前、柱上和柱后衍生化3种模式,有各自的优势^[18-19]。本试验将样品酸水解处理,采用柱后衍生阳离子交换色谱法,建立的测定甘肃紫斑牡丹花粉中17种氨基酸的方法,具有操作方便、快捷、稳定性好等特点。分析结果表明:紫斑牡丹花粉中,含有人体必须氨基酸总含量达 $130.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,营养丰富,值得深入开发和利用。

参考文献

- [1] 李熙莉,李平平,岳桦. 紫斑牡丹研究进展[J]. 北方园艺, 2007(5): 129
LI XL, LI PP, YUE H. Advances of the study on *Paeonia rockii* [J]. Northern Horticulture, 2007(5): 129
- [2] 何登文. 紫斑牡丹的研究概况[J]. 甘肃中医, 2005, 18(3): 34
HE DW. A brief review on *Paeonia rockii* [J]. Gansu J Tradit Chin Med, 2005, 18(3): 34
- [3] 李子璇,秦公伟,何建华等. 紫斑牡丹种仁种皮中脂肪酸组成比较分析[J]. 种子, 2010, 29(1): 34
LI ZX, QIN GW, HE JH, et al. Comparative analysis of fatty acids in seed kernel and seed coat of *Paeonia rockii* [J]. Seed, 2010, 29(1): 34
- [4] 甘肃省卫生厅. 关于颁布《第四批24种中药材质量标准(试行)》的通知[S]. 1996: 58

- Gansu Health Department. Notice on Promulgating Fourth Batch Quality Standard of 24 Kinds Chinese Herbal Medicine (Trial Implementation) [S]. 1996: 58
- [5] 杨树声, 宋平顺, 罗兴平, 等. 紫斑牡丹各部位中丹皮酚和芍药苷的含量分析 [J]. 西北药学杂志, 2001, 16 (3): 108
 YANG SS, SONG PS, LUO XP, *et al.* Analysis of paeonol and paeoniflorin in different parts of *Paeonia rockii* (S. G. Haw et L. A. Laeuner) T. Hong et J. J. Li [J]. Northwest Pharm J, 2001, 16 (3): 108
- [6] 王开发. 我国常见八种花粉的功效探讨 [J]. 蜜蜂杂志, 2010, 30 (12): 5
 WANG KF. Research on efficacy of 8 pollen in China [J]. J Bee, 2010, 30 (12): 5
- [7] 李彬彬. 卫生部公布第三批药食两宜名单 [J]. 江苏调味副食品, 1999 (3): 23
 LI BB. China Ministry of Health' s third batch name list of medicine and food dual purposes material [J]. Jiangsu Hortic Subsidiary Food, 1999, (3): 23
- [8] 成仿云. 紫斑牡丹花粉发育的细胞形态学研究 [J]. 园艺学报, 1998, 25 (4): 367
 CHENG FY. Cytomorphological studies on the pollen development of blotched tree peony (*Paeonia rochii*) [J]. Acta Hortic Sin, 1998, 25 (4): 367
- [9] 曹小勇. 濒危植物紫斑牡丹胚离体培养 [J]. 氨基酸与生物资源, 2003, 25 (2): 35
 CAO XY. *In vitro* culture of embryo of endangered plant *Paeonia rochii* [J]. Amino Acid Biotic Res, 2003, 25 (2): 35
- [10] 安阿莉, 苏小玲, 毛娟, 等. 紫斑牡丹幼胚离体培养试验 [J]. 甘肃农业大学学报, 2009, 44 (6): 63
 AN AL, SU XL, MAO J, *et al.* A study on immature embryo culture of *Paeonia rochii* *in vitro* [J]. J Gansu Agric Univ, 2009, 44 (6): 63
- [11] 于玲, 何丽霞, 李嘉珏. 甘肃紫斑牡丹与中原牡丹类群染色体的比较研究 [J]. 园艺学报, 1997, 24 (1): 79
 YU L, HE LX, LI JJ. Comparative studies on chromosome in varieties of *Paeonia rochii* and *Paeonia suffruticosa* [J]. Acta Hortic Sin, 1997, 24 (1): 79
- [12] 刘文兰, 唐红, 张亮, 等. 甘肃紫斑牡丹茎扦插繁殖技术初探 [J]. 东北林业大学学报, 2012, 40 (11): 19
 LIU WL, TANG H, ZHANG L, *et al.* Propagation techniques of stem cuttings of *Paeonia suffruticosa* var. *papaveracea* in Gansu [J]. J Northeast Forest Univ, 2012, 40 (11): 19
- [13] 杨新, 梅兴国, 汪爱顺, 等. 高效毛细管电泳法测定红豆杉悬浮培养细胞中游离芳香氨基酸 [J]. 氨基酸和生物资源, 2002, 24 (1): 50
 YANG X, MEI XG, WANG AS, *et al.* Direct determination of free aromatic amino acid in suspension of *Taxus chinensis* cell by high performance capillary electrophoresis [J]. Amino Acids Biotic Resour, 2002, 24 (1): 50
- [14] 石岩, 王钢力, 林瑞超. 近红外技术测定冬虫夏草中氨基酸含量 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27 (1): 90
 SHI Y, WANG GL, LIN RC. NIR determination of amino acid from *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. [J]. Chin J Pharm Anal, 2007, 27 (1): 90
- [15] 王棘, 潘雪妍, 杨宏伟. HPLC 法和氨基酸分析仪 (AAA) 法测定肠外营养注射液 (25) 中 18 种氨基酸的含量的比较 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32 (6): 1085
 WANG J, PAN XY, YANG HW. Comparison of HPLC and amino acid analyzer methods in analyzing 18 different amino acids in total parenteral nutrition injection (25) [J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32 (6): 1085
- [16] 赵岩, 侯莹莹, 唐国胜, 等. 柱前衍生 RP-HPLC 测定淫羊藿中氨基酸含量 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34 (8): 1412
 ZHAO Y, HOU YY, TANG GS, *et al.* Determination of amino acids in *Epimedium brevicornu* Maxim. by RP-HPLC [J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34 (8): 1412
- [17] 潘葳, 宋永康, 黄星. 自动凯氏定氮仪测定灵芝中蛋白质的不确定度评定 [J]. 现代科学仪器, 2009 (2): 92
 PAN W, SONG YK, HUANG X. Evaluation of uncertainty measuring protein content in Ganoderma with Kjeltac 2300 protein analyzer [J]. Mod Sci Instr, 2009 (2): 92
- [18] 程显隆, 肖新月, 邹秦文, 等. 柱前衍生 HPLC 法同时测定阿胶中 4 种主要氨基酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28 (12): 1997
 CHENG XL, XIAO XY, ZOU QW, *et al.* Pre-column derivatization HPLC simultaneous determination of 4 main amino acids in donkey-hide glue [J]. Chin J Pharm Anal, 2008, 28 (12): 1997
- [19] 艾则孜·莫合买提, 沙丽娜, 巴哈尔古丽·黄尔汗, 等. 柱后衍生阳离子交换色谱法测定桦菌芝中氨基酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32 (11): 1972
 AZIZ MHMT, SHA LN, BAHARGULI HEh, *et al.* Determination of amino acids in *Pyropolyporus fomentarius* by post-column derivatization cation-exchange chromatography [J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32 (11): 1972

(本文于 2016 年 6 月 25 日收到)