

# HPLC 法测定荔枝花粉中氨基酸含量

陈献雄<sup>1</sup>, 杨剑<sup>2</sup> (1. 深圳职业技术学院医护学院, 广东深圳518055; 2. 深圳职业技术学院应用化学与生物技术学院, 广东深圳518055)

**摘要** [目的] 通过研究荔枝花粉中的氨基酸含量, 促进对荔枝花粉资源的开发利用和了解影响不同荔枝品种品质形成的因素。[方法] 采用柱前衍生 RP-HPLC 测定4个荔枝品种(桂味、怀枝、黑叶、妃子笑)花粉的全谱游离氨基酸, 以邻苯二甲酐(OPA)与9-芴基羰酰氯(FMOC-Cl)作衍生剂, 正缬氨酸为内标, 利用二极管阵列(DAD)可变波长检测程序。[结果] 各种氨基酸的保留时间(Rt)RSD为0.01%~3.02%, 相对峰面积(A<sub>x</sub>/A)RSD为1.19%~7.82%, 回收率为95.21%~114.24%。4种荔枝品种花粉的总游离氨基酸含量从大到小排序为(ng/100 ng): 桂味26.88、淮枝21.46、黑叶20.92、妃子笑18.91。[结论] 总游离氨基酸含量的不同会影响到荔枝品质, 其中桂味总游离氨基酸含量最高, 营养价值高, 可在养蜂业和花粉营养品加工业中加以充分利用。

**关键词** 荔枝; 花粉; 全谱游离氨基酸; RP-HPLC法; 可变波长检测

中图分类号 S66 文献标识码 B 文章编号 0517-6611(2008)25-10750-02

## Determination of Free Amino Acid Content in Different Litchi (*Litchichinensis* Sonn.) Varieties Farina by RP-HPLC Method

CHEN Xianxiang et al (Medical Technic and Nursing Department, Shenzhen Polytechnic College, Shenzhen, Guangdong 518055)

**Abstract** [Objective] The research aimed to study the content of free amino acid in different litchi (*Litchichinensis* Sonn.) varieties farina, promoting the development and utilization of *Litchichinensis* Sonn. farina resources and knowing the quality of different varieties of litchi for factor. [Method] The whole free amino acids in farina of 4 *Litchichinensis* Sonn. varieties were assayed by using RP-HPLC method. In this method, Ortho-phthalaldehyde (OPA) and 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) were selected as pre-column derivative reagent, Norvaline as internal standard, and diode array (DAD) variable-wavelength as measure function. [Result] The results showed that the RSD for Rt and A<sub>x</sub>/A of amino acids was from 0.01% to 3.02% and from 1.19% to 7.82% respectively. In the present study, the recovery ratio was from 95.21% to 114.24%. Among 4 litchi farina varieties, the content of total free amino acids from high to low was Guiwei 26.88 ng/100 ng, Hizhi 21.46 ng/100 ng, Heiye 20.92 ng/100 ng, and Feizixiao 18.91 ng/100 ng. [Conclusion] The free amino acid content of different quality would affect *Litchichinensis* Sonn.. Thereinto, the free amino acid of Guiwei was the highest, had high nutritional value. So people could take full advantage of apiculture and pollen nutrition industry.

**Key words** Litchi (*Litchichinensis* Sonn.); Farina; Total free amino acids; RP-HPLC method; Variable-wavelength measure

花粉是花的雄性器官, 通俗地说就是植物的精子, 是植物生命的精华所在。花粉不但包含着生命的遗传信息, 而且还包含着孕育新生命的全部营养物质。据测定, 植物花粉中含有17种氨基酸, 总含量比牛肉、鸡蛋高出5~7倍以上, 其中有8种人体必需的氨基酸<sup>[1]</sup>, 还含有10多种维生素如V<sub>B</sub>群和V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub>、胡萝卜素等<sup>[1]</sup>和20多种微量元素, 包括人体生理必需的铁、碘、锌等15种微量元素<sup>[1]</sup>。花粉总脂含量约为5%左右, 对人大脑及神经系统的发育具有极为重要的作用, 其中磷脂能防止脂肪在肝脏中的堆积<sup>[1]</sup>。花粉具备了人体生存所需要的各种营养物质, 对人体具有多种保健功能。我国中药学家叶桔泉教授认为: “花粉是多功能全方位地治疗与保健的天然珍奇宝物”, “花粉食品是一种新型的高级营养品”。世界上许多专家也认为, 花粉是唯一含有人体健康所需的全部重要的营养的保健食品<sup>[1]</sup>。

在我国, 荔枝种植历史悠久, 品种资源丰富, 栽培面积达71.67万hm<sup>2</sup>, 居世界首位, 但只适宜在广西、广东、海南和福建南部等少数气候温暖的省(区)种植。荔枝作为岭南佳果驰名中外, 享有“岭南果王”和“果中珍品”等美誉, 其色丽质优, 香甜可口, 营养丰富, 维生素种类多、含量高, 有健脾、养血的功效<sup>[2]</sup>。随着人们生活水平的不断提高, 人们对荔枝的优良品种, 特别是品质有了进一步的要求。特别是我国加入WTO后, 荔枝这一优质水果品种无疑将会成为国际水果市场上最具竞争力的品种之一, 而氨基酸对荔枝果实的风味和其他营养成分有着重要影响。因此, 笔者研究了荔枝花粉中的氨基酸含量, 这对研究和开发荔枝花粉资源, 全面了解荔枝品质的形成具有十分重要的参考价值。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂配制** 试验固定相为: 色谱柱 Hypersil-(十八烷基硅烷键合硅胶 ODS) C18 柱(5 μm, 200 mm × 4.6 mm, i.d.), 柱温40℃。

流动相包括2种: 流动相A: 0.02 mol/L 醋酸钠溶液1 000 ml, 加入180 μl 三乙醇胺, 用1%~2% 醋酸调pH值为7.200 ± 0.050, 0.45 μm膜过滤后, 加入3 ml 四氢呋喃, 超声处理10 min。流动相B: 0.02 mol/L 醋酸钠(pH值7.200 ± 0.025) 乙腈 甲醇=1:2:2, 超声处理10 min。

1 nmol/μl 正缬氨酸(ISTD)标准液: 称取58.6 ng ISTD溶于50 ml 0.1 mol/L HCl 溶液中配成10 nmol/μl 贮备液, 于0~4℃冰箱保存, 使用时用0.1 mol/L HCl 稀释到1 nmol/μl。

衍生剂邻苯二甲酐(OPA): Agilent 试剂盒, 浓度为10 ng/ml; 衍生剂9-芴基羰酰氯(FMOC): 称取12.5 ng溶于5 ml 乙腈溶液。配制的衍生剂于0~4℃冰箱保存备用。

硼酸盐缓冲溶液(pH值9.500): 自制。

氨基酸工作曲线: 将17种混合氨基酸标准品(浓度为1 nmol/μl), 用0.1 mol/L HCl 依次稀释成500、250、100、25 nmol/μl 5个稀释度, 于0~4℃冰箱保存备用。

17种单氨基酸标准液: 称取25~60 ng 单氨基酸溶于0.1 ml/L HCl 配制成浓度为10 nmol/μl 的标准贮备液, 于0~4℃冰箱保存, 使用时用0.1 mol/L HCl 稀释至2 nmol/μl。

**1.2 材料采集** 试验品种为桂味、妃子笑、黑叶、淮枝的花粉, 树龄5~6年左右。桂味盛花期为3月20日左右, 妃子笑、黑叶盛花期为3月26日左右, 淮枝盛花期为4月2日左右。于3月22日开始采样, 至4月9日样品采集完毕。采集桂味0.5327 g, 妃子笑0.1082 g, 黑叶0.3211 g, 淮枝0.3525 g。

采集方法为人工采样, 即人工采集不同品种荔枝的雄花, 采集时间一般为12:00左右, 此时雄花上水分少, 采集到

**作者简介** 陈献雄(1968-), 女, 广东电白人, 在读硕士, 讲师, 从事生物技术方面的研究。

收稿日期 2008-06-23

的花粉质量高。将采集的花粉置于恒温箱干燥(40 ) ,待雄花花药裂开,花粉自然散出。花粉过筛(60 目) ,再置于恒温箱(40 ) 干燥48 h,之后放入- 20 冰箱冷藏备用。

**1.3 花粉预处理** 荔枝花粉的消化水解处理:分别称取桂味0.024 7 g、妃子笑0.027 4 g、黑叶0.025 3 g、淮枝0.021 8 g 装入玻璃水解管中,再分别加入6 ml/L 盐酸2.7 ml,然后用酒精喷灯把玻璃管的另一端封口。封口后把水解管放在(110 ±1) 的恒温干燥箱中,水解24 h 后,取出冷却。

消化水解后的赶酸:打开水解管,用去离子水多次冲洗水解管,然后倒入10 ml 小烧杯中,放在80 水浴上把水分蒸干,反复进行2 次。赶酸完成后用0.1 mol/L 盐酸定容到50 ml 容量瓶中,放入- 18 冰箱保存备用。

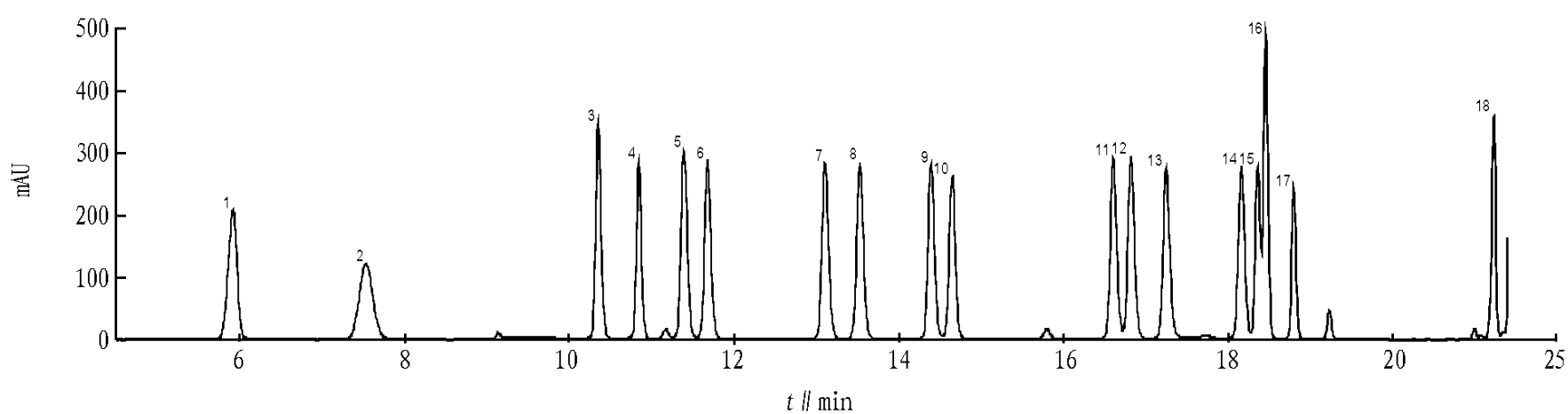
**1.4 方法** 试验采用柱前衍生反相高效液相色谱,采用 OPA 与 FMOC 作柱前衍生物。OPA 在2- 巯基乙醇存在下与

一级氨基酸迅速反应生成1- 硫代2- 烷基异吲哚<sup>[3]</sup>,生成的衍生物在338 nm 处有较强的紫外吸收光谱;FMOC 能与带有仲胺基团的二级氨基酸如脯氨酸反应,生成的衍生物在262 nm 处有较强的紫外吸收光谱。利用 DAD 可变波长检测程序即在同一通道用338、262 nm 双波长检测,可同时检测样品中的一级和二级氨基酸。OPA 柱前衍生操作简单,衍生化反应迅速,灵敏度高,无杂质干扰,是一种快速分析氨基酸的 HPLC 方法。

**1.5 样品衍生化** 按样品滤液 ISTD 0.4 ml/L 硼酸缓冲液(pH 值9.500) OPA FMOC=1.0 2.0 15.4 1.0 0.6 的比例充分混合衍生2 min 后,取50 μl(20 μl 定量环)进柱分析,以保留时间定性,峰面积用内标法定量。

## 2 结果与分析

### 2.1 18 种氨基酸标准色谱图 见图1。



注:1. 天冬氨酸(Asp);2. 谷氨酸(Gu);3. 丝氨酸(Ser);4. 组氨酸(Hs);5. 甘氨酸(Gy);6. 苏氨酸(Thr);7. 丙氨酸(Ala);8. 精氨酸(Arg);9. 酪氨酸(Tyr);10. 胱氨酸(Cys-cys);11. 缬氨酸(Val);12. 蛋氨酸(Met);13. 正缬氨酸(Nal);14. 苯丙氨酸(Phe);15. 异亮氨酸(Ile);16. 赖氨酸(Lys);17. 亮氨酸(Leu);18. 脯氨酸(Pro)。

Note:1, Asp;2, Gu;3, Ser;4, Hs;5, Gy;6, Thr;7, Ala;8, Arg;9, Tyr;10, Cys-Cys;11, Val;12, Met;13, Nal;14, Phe;15, Ile;16, Lys;17, Leu;18, Pro.

图1 18 种氨基酸标准色谱图

Fig.1 The standard chromatogram of 18 kinds of amino acids

**2.2 线性范围、精密度试验结果** 为保证分析结果的准确性,该文以同一标准氨基酸样品和同一测试样品各重复6 次进样分析,各种氨基酸的相关系数及线性范围、保留时间(Rt)、相对峰面积( $A_x/A_s$ )及标准偏差(RSD)如表1 所示。

由表1 可知,大部分氨基酸工作曲线相关系数接近0.999 9,仅Pro 较差(0.998 10),说明相关性较好。保留时间的最大标准偏差是Asp(3.02%) 和Gu(2.46%),其他氨基酸均小于1.00%,效果较满意。在相对峰面积中,最大标准偏差为Pro(7.82%),其次为Lys(5.90%),效果较差,这可能与其衍生化反应程度或衍生物的稳定性和含量高低有关。

**2.3 回收率试验结果** 该文采用单点和多点加入法将各种单氨基酸标准液定量加入分析试样作回收率试验。结果表明:各种氨基酸的回收率范围为95.21%~114.24%,结果令人满意。

**2.4 4 个荔枝花粉中游离氨基酸检测结果** 从表2 可以看出,在4 个品种荔枝花粉的游离氨基酸中,以Lys 的含量最高,4 个品种花粉合计总含量为143.7 mg/g,总量超过游离氨基酸总量的15.00%。其次是Leu 和Hs,4 个品种花粉合计总含量分别为98.7、96.5 mg/g,总量均超过游离氨基酸总量的10.00%。不同品种中,桂味以Asp、Gy、Lys 和Leu 含量较

表1 氨基酸线性范围及精密度试验结果

Table 1 The linear range and precision test results of amino acids

氨基酸 Amino acids	工作曲线 Working curve		精密度试验 Precision test			
	相关系数 Correlation coefficient	线性范围 Linear range pmol/μl	R min	RSD <sub>R</sub> %	$A_x/A_s^*$	RSD <sub><math>A_x/A_s</math></sub> %
Asp	0.999 84	0.5~165	5.687	3.02	0.935	1.36
Gu	0.999 92	0.5~240	7.323	2.46	1.953	1.65
Ser	0.999 94	0.5~160	10.237	0.09	0.569	3.04
Hs	0.999 44	1.0~180	10.738	0.10	0.520	1.51
Gy	0.999 63	0.5~160	11.360	0.11	0.107	1.87
Thr	0.999 86	0.5~160	11.647	0.14	0.095	5.14
Ala	0.999 85	0.5~500	13.053	0.11	2.137	1.58
Arg	0.999 83	0.5~400	13.486	0.06	1.097	2.20
Tyr	0.999 86	0.5~160	14.371	0.13	0.035	1.71
Cys-Cys	0.999 46	1.0~160	14.643	0.71	0.011	4.78
Val	0.999 91	0.5~160	16.587	0.10	0.285	1.19
Met	0.999 89	0.5~180	16.814	0.78	0.361	1.39
Nal	1.000 00	-	17.271	0.75	1.000	0
Phe	0.999 76	0.5~360	18.152	0.17	0.113	1.23
Ile	0.999 44	1.0~160	18.354	0.05	0.154	1.89
Lys	0.999 18	0.5~160	18.452	0.04	0.042	5.90
Leu	0.999 91	1.0~160	18.792	0.06	0.031	4.63
Pro	0.998 10	0.5~160	21.215	0.02	0.391	7.82

注:\* 表示只对测试样品作统计分析。

Nte: \* stands for only making the statistical analysis on test samples.

### 3 讨论

水稻愈伤组织诱导和再生频率是决定能否成功转化的重要因素。尤其是籼稻品种,由于其再生能力普遍偏低,极大地影响了遗传转化在籼稻上的应用。试验结果表明,各品种的愈伤诱导率、胚性愈伤诱导率和绿苗分化率差异很大,说明基因型也是影响杂交籼稻亲本以成熟胚为外植体的组培效率的重要因素。培养基类型对籼稻组培愈伤诱导有着十分重要的影响。笔者研究了16个杂交籼稻亲本(恢复系和保持系)成熟胚在MS和CC培养基中的愈伤诱导情况。结果表明,MS较CC培养基有着更好的广谱适应性。为了提高籼稻基因型植株分化能力,许多学者研究了激素及其配比对籼稻组培植株分化率的影响。王兴春等研究表明,6-BA与NAA的配合使用较Kt与NAA的配合使用效果更好<sup>[7]</sup>。Rachmawati等对难以组织培养的爪哇稻品种Rjddle进行愈伤组织分化率诱导,发现以2 ng/L 6-BA+1 ng/L NAA的激素配比植株再生频率最高<sup>[8]</sup>。这与该研究结果相似,即6-BA用于植株分化可取得更好的效果。张平等报道了以2 ng/L 6-BA+0.5 ng/L NAA+0.5 ng/L Kt的激素配比,其愈伤组织的分化率最高<sup>[9]</sup>。在对4个基因型进行6-BA、NAA和Kt 3因素3水平植株分化培养试验时,发现不同基因型所需的最优激素配比不同。籼稻基因型间植株再生能力存在差异有多方面的原因,其中植物内源激素成分和浓度是重要原因。罗琼等研究表明,对于内源激动素与内源生长素比低的籼稻基

因型,通过增加分化培养基中外源激动素浓度可以提高植株分化率<sup>[10]</sup>。该研究通过优化分化培养基中的激素配比,进一步提高了籼稻绿苗分化率,尤其是对于植株再生培养力低的基因型极为有效。对植株分化力低的基因型R998和R463进行的激素优化结果显示,通过提高培养基(外源)激动素浓度水平(3 ng/L 6-BA+1 ng/L Kt,结合0.5 ng/L NAA),有效地提高了植株分化率。

#### 参考文献

- [1] 田文忠, IANNRANCE, ELUNALA SVAMAN, 等. 提高籼稻愈伤组织再生频率的研究[J]. 遗传学报, 1994, 21(3): 215-221.
- [2] 高振宇, 黄大年. 影响籼稻愈伤组织形成和植株再生能力的因素[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(3): 227-230.
- [3] 何琼英, 王润华. 山梨醇对籼稻愈伤组织培养效应[J]. 华南农业大学学报, 1991, 12(1): 36-42.
- [4] 孙宗修, 斯华敏, 程式华, 等. 麦芽糖提高水稻花药培养效率的研究[J]. 中国水稻科学, 1993, 7(4): 227-231.
- [5] 刘巧泉, 张景六, 王宗阳, 等. 根癌农杆菌介导的水稻高效转化体系的建立[J]. 植物生理学报, 1998, 24(3): 259-271.
- [6] 肖向文, 李苹, 杨正林, 等. 5个骨干籼型恢复系再生能力的比较研究[J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2005, 27(3): 278-281.
- [7] 王兴春, 方红明, 徐惠兰, 等. 提高籼稻优质米品种成熟胚培养力的研究[J]. 种子, 2001(1): 26-27.
- [8] RACHMAWATI DAH, TAKEHKO HOSAKA, HIICH INOUE, et al. Agrobacterium mediated transformation of javanica rice cv. Rjddle[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68(6): 1193-1200.
- [9] 张平, 左示敏, 李爱宏, 等. 提高农杆菌转化水稻频率几个因素的研究[J]. 中国水稻科学, 2004, 18(1): 11-15.
- [10] 罗琼, 胡延玉, 周开达. 内源激素对水稻成熟胚培养力的影响[J]. 中国水稻科学, 1998, 12(4): 238-240.

(上接第10751页)

表2 4种荔枝花粉中游离氨基酸含量比较

	ng/g			
氨基酸	桂味	妃子笑	黑叶	淮枝
Amino acids	Guiwei	Feizixiao	Heiye	Huizhi
Asp	20.7	7.4	9.2	13.7
Gu	14.2	9.8	15.2	22.4
Ser	13.1	3.7	6.1	8.8
Hs	1.6	18.0	33.4	45.7
Gy	23.6	4.1	14.3	21.2
Tr	2.2	0.8	1.5	2.6
Ala	18.1	5.0	11.1	17.1
Arg	16.0	12.3	13.3	5.3
Tyr	10.2	8.7	6.9	4.6
Gys Gys	1.6	1.8	1.5	1.2
Val	9.1	7.0	5.9	5.6
Met	5.7	4.8	3.3	1.3
Phe	14.3	10.7	8.6	5.3
Ile	13.6	10.7	9.4	1.6
Lys	46.5	41.0	30.5	25.7
Leu	35.5	28.8	23.1	9.1
Pro	2.1	7.1	6.7	9.7
总含量 Total content	268.8	189.1	209.2	214.6

高, 占总游离氨基酸的46.98%; 妃子笑以Hs、Arg、Lys和

Leu含量最高, 占总游离氨基酸的52.93%; 黑叶以Gu、Hs、Lys和Leu含量最高, 占总游离氨基酸的48.85%; 淮枝以Gu、Hs、Gy、和Lys含量较高, 占总游离氨基酸的53.59%。妃子笑的总游离氨基酸含量偏低, 可能与花粉成熟度和树龄有关。

### 3 结论与讨论

(1) pH值对分析测试有影响。该试验中, 流动相的最佳pH值为7.200±0.025, pH值小于7.100氨基酸出峰不完全, pH值增大色谱峰出峰时间提前, 尤其是10~16 min出峰的氨基酸提前明显; OPA衍生化反应的pH值要大于8.500, 而FMOC衍生化反应的pH值必须大于9.500。

(2) 该试验中, 衍生化反应2 min内完成, 18种氨基酸在22 min内出峰完全且分离良好, 溶剂峰(22 min之后出峰)不影响检测, 是一种理想的全谱氨基酸分析方法。

(3) 4个荔枝品种花粉的总游离氨基酸含量从大到小排序为: 桂味268.8 ng/g > 淮枝214.6 ng/g、黑叶209.2 ng/g > 妃子笑189.1 ng/g。

#### 参考文献

- [1] 郭芳彬. 花粉的神奇妙用[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 7-8, 26-72.
- [2] 佚名. 荔枝 EB/OL. (2003-11-13) [2008-06-24] <http://www.jibaoping.com/ShowArticle.asp?ArticleID=177&ArticlePage=1>.
- [3] 傅亮, 倪冬姣. 氨基酸高效液相色谱分析[J]. 仲恺农业技术学院学报, 1994, 7(2): 77.