



山黧豆活性成分 β -ODAP 的检测方法研究进展

杨玲娟¹, 焦成瑾², 张小寒³, 赵菲佚²

(1 天水师范学院 化学工程与技术学院, 甘肃天水 741001; 2 天水师范学院 生物工程与技术学院, 甘肃天水 741001; 3 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: β -N-草酰-L- α , β -二氨基丙酸(β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid, β -ODAP)是山黧豆中的一种重要非蛋白氨基酸,与三七中的三七素为同一种次生代谢物,具有止血、兴奋神经、抗菌等多种生物活性。自 20 世纪 60 年代和 80 年代在山黧豆等豆类 and 三七等植物中分别发现 β -ODAP 以来,科研工作者建立了多种检测方法。该文对近年来国内外有关检测 β -ODAP 的传统分析法、高效液相色谱法(HPLC)、色谱-质谱法(GC/LC-MS)、毛细管电泳法及酶学分析法等的基本原理及应用研究进展进行了综述,这些检测方法各有所长,具体选择依实验条件和实验目的而定。其中,柱前衍生化高效液相色谱法是目前应用最广泛的方法,高成本同位素内标的 LC-MS 则被誉为“金标准”。但特异、快速和低成本检测方法一直是人们的追求目标,因而进一步完善酶传感器技术是 β -ODAP 检测领域在将来的主要研究方向。

关键词: β -ODAP; 色谱; 毛细管电泳; 酶学分析

中图分类号: Q94-334; Q503; S529 **文献标志码:** A

Progress in Quantitative Analysis of Bioactive Amino Acid β -ODAP in *Lathyrus sativus*

YANG Lingjuan¹, JIAO Chengjin², ZHANG Xiaohan³, ZHAO Feiyi²

(1 College of Chemical Engineering and Technology, Tianshui Normal University, Tianshui, Gansu 741001, China; 2 College of Bioengineering and Biotechnology, Tianshui Normal University, Tianshui, Gansu 741001, China; 3 College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: The important non-protein amino acid β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid (β -ODAP) in *Lathyrus sativus* and dencichine in *Panax notoginseng* are the same secondary metabolite. It has various biological activities, such as hemostasis, nerve stimulation, antibacterial, etc.. Since it was discovered in *L. sativus* and other legumes in the 1960s, and in *P. notoginseng* and other plants in the 1980s, many detection methods for β -ODAP have been developed. In this review, the basic principles and applications of these methods, including traditional analysis, high performance liquid chromatography (HPLC), chromatography-mass spectrometry (GC/LC-MS), capillary electrophoresis and enzymatic analysis, were assessed and compared. Generally, these methods have their own strengths, and the specific choice depends on the experimental conditions and experimental purposes. Among them, HPLC with pre-column derivatization is currently the most widely used method, while high-cost LC-MS with isotope internal standard is known as the “gold standard”. However, it is the pursuit of goals that the specific, rapid and low-cost strategy for β -ODAP determination to be developed. The improvement of enzyme sensor technology is therefore the main research direction for β -ODAP detection in the future.

Key words: β -ODAP; chromatography; capillary electrophoresis; enzymatic analysis

山黧豆(*Lathyrus sativus*)不仅具有抗旱、耐寒、耐贫瘠等生物学特性,而且营养丰富(种子蛋白质含量可达 25%~30%,将近是小麦的 2 倍),一直作为优质的高蛋白小杂粮作物和饲料被广泛种植与利用^[1]。另外,山黧豆还具有很强的抗重金属污染能力^[2-3],可作为环境修复植物用于重金属污染土壤或湿地的修复。但是,山黧豆的内源活性物质 β-N-草酰基-L-α,β-二氨基丙酸(β-N-oxalyl-L-α, β-diaminopropionic acid,β-ODAP)在高浓度时表现为神经毒性^[4],使其作为高蛋白质植物资源的利用和开发受到限制。其实,β-ODAP 不仅存在于山黧豆属植物中^[5],在猪屎豆属^[6]、金合欢属^[7]、苏铁^[8]等植物的不同组织中也均有发现。在三七^[9]、人参^[10]、西洋参^[11]等五加科名贵中药材中也分离鉴定出 β-ODAP,并被命名为三七素(dencichine)。研究表明,β-ODAP 既是山黧豆神经中毒的活性成分,又是三七的止血活性成分,而且还具有抗菌、参与 Zn²⁺ 转运、清除羟基自由基、保护植物光呼吸代谢等其他生物活性;在山黧豆等豆类中,它还参与植物抗逆性等多种代谢反应活动^[12-14]。然而,β-ODAP 的同分异构体 α-ODAP 却基本无生物活性(图 1),在植物中含量也非常低,一般不超过 5%(干重)^[4]。

由于山黧豆神经中毒涉及 β-ODAP 的神经活性作用,自 1964 年被分离鉴定以来,β-ODAP 一直被视为山黧豆种植与利用的负面因子。出于毒理学、山黧豆低毒品种的选育、β-ODAP 生物化学合成及影响因素等研究需要,不同学者建立了一系列 β-ODAP 的检测方法^[14-15]。在三七、人参等中药材中的发现和鉴定则不仅使人们认识到它的功能多样性,而且极大地促进了其检测技术的开发^[16]。回顾这些检测技术,一方面将帮助研究者选择合适的 β-ODAP 检测手段,另一方面将对开发其他氨基酸类植物次生代谢产物检测技术提供有价值的参考。

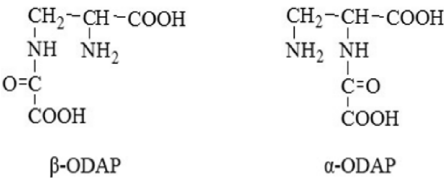
1 传统检测法

β-ODAP 是一种游离氨基酸,早期的含量测定多采用检测氨基酸通用的分离及显色方法,比如色法、

层析法和氨基酸自动分析仪法等。比色法是利用 ODAP 碱水解后的产物 α,β-二氨基丙酸(α,β-Diaminopropionic acid,DAP)与邻苯二甲醛(O-Phthalaldehyde,OPA)在乙硫醇存在下能生成黄色化合物,在 420 nm 比色测定 β-ODAP 的含量^[17]。该方法最早由 Rao^[18] 创建,并经李志孝等^[19] 及 Briggs 等^[20] 进行了改进。该方法设备简单、成本低、显示灵敏,特别适用于大量样品的筛选分析。例如, Priyanka 等^[21] 利用此方法测定了孟加拉国 100 个栽培山黧豆品种的 ODAP,含量范围在 0.13%~0.57%(干重)之间,并结合基因标记技术将这些山黧豆品种分成 4 个 ODAP 含量不同的组。Emmrich 等^[22] 使用 96 孔板对比色法进行了改进并建立了检测 β-ODAP 的高通量平板光度法。在此基础上,郝晓鹏等^[23] 对 137 份国际山黧豆种质资源的叶片 ODAP 含量进行了检测,并据此将其划分为 5 个等级,其中高毒、低毒资源各 8 份^[23]。在 pH = 8 时,β-ODAP 的水解产物 DAP 在巯基乙醇存在下与 OPA 的反应产物具有很强的荧光(激发波长 470 nm,发射波长 530 nm),借此建立了 β-ODAP 的荧光光度分析法,线性范围为 0.01~1 μg/mL,其灵敏度比普通可见光比色法高 2~3 个数量级^[24]。

薄层层析(thin layer chromatography,TLC)和高效薄层层析法(HPTLC)采用吸附、分配、离子交换等不同分离介质,依据不同组分比移值的差异实现分离测定。Paradkar 等^[25] 采用 TLC 法快速检测 ODAP 以判定豆制品中是否掺杂了价格低廉的山黧豆,焦成瑾等^[26] 利用阳离子树脂交换分离与 TLC 分离相结合,将 ODAP 与山黧豆中其他氨基酸完全分开。Tarade 等^[27] 用正丁醇-吡啶-水(10:10:5, V/V/V)为展开剂、0.2%茚三酮溶液显色、光密度仪测定 ODAP 含量,对 3 种烹饪方法加工的山黧豆食品中的 ODAP 降解动力学进行了详细研究。章观德等^[28] 利用荧光胺与 β-ODAP 反应,高效薄层层析法检测了不同三七头中 β-ODAP 含量,发现含量范围在 0.316%~0.382%之间。

氨基酸自动分析仪分析法是基于阳离子交换柱分离、柱后用茚三酮显色、光度法测定氨基酸含量的分析方法。李天荣等^[29] 建立了山黧豆 β-ODAP 检测的氨基酸分析法,并用来分析水分胁迫对山黧豆萌发过程中 β-ODAP 和氨基酸的影响^[30]。此外,氨基酸分析法还用于三七、人参、鲜人参和红参中的 ODAP 含量测定^[31-33],为这些药材止血效果的评估提供了重要参考。



总之,传统分析法仪器设备简单,易实现,灵敏度和准确度也比较低,不能有效区分 β -ODAP 与 α -ODAP,但特别适合处理大量筛选或分等级的样品材料,尤其在野外或实验条件比较差的研究中工作效率很高。因此,这一方法至今仍广泛使用。

2 高效液相色谱法

2.1 直接检测法

除芳香族氨基酸外,绝大多数氨基酸在近紫外区无吸收,因此不能直接用紫外检测器测定其含量。ODAP 分子中含有草酰基团(图 1),而草酸本身有紫外吸收(210 nm 附近),因此,不少学者利用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)以紫外检测器直接测定生物样品中草酸的含量^[34-35]。国内三七等中药材料的 β -ODAP 检测方法主要基于此原理。崔秀明等^[36]在 213 nm 处建立了三七中 β -ODAP 的直接 HPLC 检测方法,发现云南文山产的三七中 β -ODAP 含量比较高,花蕾、茎叶、根茎、主根、侧根和须根含量分别为 0.86%、0.37%、0.88%、0.52%、0.41%和 0.89%;付春梅等^[37]在 220 nm 下检测,发现云南三七制品中 β -ODAP 含量范围在 0.561%~0.582%之间;谢国祥等^[38]将样品抽提液在 HPLC 仪中直接进样,在 214 nm 下检测,从商品三七干燥根中分离纯化了 β -ODAP,并用质谱法进行了确认;张玉萍等^[39]在 213 nm 下检测发现商品三七片中的 β -ODAP 含量范围在 0.428%~0.435%之间;山丽梅等^[40]在 213 nm 下系统检测了云南文山三七产业园中的各种规格的三七头,发现商品规格最差的“无数头”中 β -ODAP 含量最高,可达 1.02%,并且止血效果也最好,而商品规格最高的“13 头”至一般规格的“120 头”的含量在 0.52%~0.69%之间,止血效果也一般,从而第一次发现三七头的止血效果与商品规格不相关,而与 β -ODAP 含量呈正相关,进一步证明 β -ODAP 的止血效果;刘光等^[41-42]利用 HPLC 在 213 nm 检测了三七干燥根和根的总皂苷提取废液中 β -ODAP 含量,为废液中 β -ODAP 的回收利用提供了重要参考。

基于草酸紫外吸收的直接 HPLC 法操作简单,但易受样品中有机酸,尤其是游离草酸的干扰。本课题组采用此方法分析三七和山黧豆中 β -ODAP 含量时发现,在 C_{18} 色谱柱中,草酸与 β -ODAP 的保留时间几乎重合,而且草酸的存在会干扰 β -ODAP 与 α -ODAP 的有效分开。植物新鲜样品中一般都存在含

量可观的草酸,尤其是山黧豆幼苗组织;另外,样品加热处理过程中也容易发生 β -ODAP 向 α -ODAP 转化^[43],更重要的是直接检测法显然无法区分 ODAP 的两种同分异构体,导致检测结果偏高。因此,山黧豆等材料的 β -ODAP 检测一般很少用此方法。

对于无明显可见光吸收的物质来说,蒸发光散射检测器(evaporative light scattering detector, ELSD)和电雾式检测器(charged aerosol detection, CAD)也是 HPLC 中广泛使用的通用检测器^[44-46]。样品抽提液过滤后也可直接进样进行检测。通过 ELSD 检测器^[47]和 CAD 检测器^[11]分别对不同类型的三七及西洋参中的 β -ODAP 进行 HPLC 法测定,结果与其他检测方法相似。

直接进样检测 β -ODAP 之所以能获得比较准确的结果正是得益于 HPLC 的良好分离能力,即不管采用哪种检测器,均遵循先分离再检测。所以,只要能控制好 β -ODAP 和 α -ODAP 在 HPLC 柱子中的分离效果,理论上不管用哪种检测器均能得到准确的检测结果。

2.2 间接检测法(柱前衍生法)

由于 β -ODAP 和 α -ODAP 的偶极距差别不大,即它们的极性很相近,在广泛使用的 C_{18} 色谱柱中很难完全分开。但是与适当的衍生化试剂反应后两者产物的偶极距显著增大(表 1)^[48],这样相应增大的极性差别足以使衍生物在 C_{18} 柱中分开。这正是各种柱前衍生法的分离检测优势。

柱前衍生检测法解决了 ODAP 紫外吸收弱、极性不易在色谱分析碳柱中保留、两种异构体不易分离等问题,是测定 β -ODAP 应用最为广泛的一种分析方法。但不同的衍生试剂,反应条件、衍生物稳定

表 1 β -ODAP 和 α -ODAP 及其部分衍生物的偶极距^[48]
Table 1 Dipole moments of β -ODAP and α -ODAP and some of their derivatives

衍生试剂及衍生物 Derivative reagent and derivative	偶极距 Dipole moment
— β -ODAP	2.38
α -ODAP	3.46
丹磺酰氯(dansyl-Cl) Dansyl chloride	β -ODAP-dansyl 9.94 α -ODAP-dansyl 4.67
对硝基苄氧基碳酰氯(PNZ-Cl) P-Nitrobenzyloxycarbonyl chloride	β -ODAP-PNZ 6.18 α -ODAP-PNZ 2.46
2, 4-二硝基氟苯(FDNB) 2, 4-Dinitrofluorobenzene	β -ODAP-DNB 8.29 α -ODAP-DNB 4.05

性、分离效果、β-ODAP 保留时间等具有明显差异。

2.2.1 邻苯二甲醛衍生法 氨基酸与 OPA 反应产物(图 2)既可以紫外检测,也可以荧光检测^[49],该方法检测 β-ODAP 最早由印度学者 Rao 建立,后被称为“Rao 法”^[50]。该方法操作相对简单,准确灵敏,样品量少;灵敏度比茚三酮高出 10 倍;衍生试剂不干扰分离与检测,不必除去过量试剂;能有效分离 β 和 α 两种异构体。缺点是 β-ODAP 事先需要水解,衍生产物不稳定,需要及时测定,而且 β-ODAP 的出峰时间比较长。如 Thippeswamy 等^[51]在 β-巯基乙醇存在下,用邻苯二甲醛衍生化山黧豆种子粉提取物,在 340 nm 下检测得到 β-ODAP 的灵敏度为(1.54±0.04) mg/L,在 C₁₈ 柱中的保留时间为 13.6 min。Hussain 等^[50]对 6 个不同实验室的改进方法与 Rao 的原始方法进行对比,发现不同方法的检测结果有明显的出入。通过反复试验,发现保证检测结果重复性的关键是使用 0.5 mol/L 四硼酸盐作为缓冲液,并将这种新方法命名为 Campbell 法。

2.2.2 9-苄基甲氧基碳酰氯衍生法 9-苄基甲氧基碳酰氯(9-fluorenylmethyl chloroformate, FMOC)一般用于合成多肽的氨基保护剂,与带有伯及仲氨基的氨基酸反应可生成具有荧光(也有紫外吸收)的衍生物(图 3)。因此,可以利用 FMOC 作为柱前衍生试剂测定氨基酸^[52]。Kisby 等^[53]针对 OPA-DAP 衍生物的不稳定性,建立了以 FMOC 为衍生试剂,荧光检测 ODAP 含量的方法。对该方法改进

后检测山黧豆种子中 ODAP 含量,检出限可达到皮摩尔(pmol)水平^[54]。朱静等^[55]对三七根粉的检测中,以硼酸缓冲液为反应介质,在室温下仅需 1 min 即可完成反应。说明该方法灵敏度高,产物稳定,反应不受样品基质的干扰,但缺点是无法区分 ODAP 的两个异构体。不过,在山黧豆干种子和三七干根粉中几乎不含 α-ODAP。

2.2.3 异硫氰酸苯酯衍生法 异硫氰酸苯酯(Phenylisothiocyanate, PITC)是常见的氨基酸衍生化试剂(图 4)。它作为柱前衍生试剂可有效的区分 β-ODAP 和 α-ODAP,衍生反应在室温下仅 10 min 即可完成;产物在紫外区有强吸收(254 nm),性质稳定,在室温数小时或冰箱数周后均稳定不分解,表现出诸多优点。利用这种方法,Khan 等^[56]分析了山黧豆幼苗中的 β-ODAP 含量;Kuo 等^[57]发现 β-ODAP 广泛存在于人参的种子、幼芽、秧苗和茎中。种子中 β-ODAP 的含量与山黧豆中的含量相近,占种子游离氨基酸的 70%左右。对不同地区、不同基因型的山黧豆中 β-ODAP 及其他游离氨基酸分析发现,所有山黧豆样品中的高精氨酸含量均为最高,β-ODAP 次之;但不同品种的含量变化较大^[58]。但是,衍生反应完成后需真空干燥以除去过量衍生试剂,衍生物不具有荧光,方法灵敏度不够高,PITC 易降低柱的寿命。

2.2.4 2,4-二硝基氟苯衍生法 兰州大学李志孝课题组用 2,4-二硝基氟苯(2,4-Dinitrofluorobenzene,

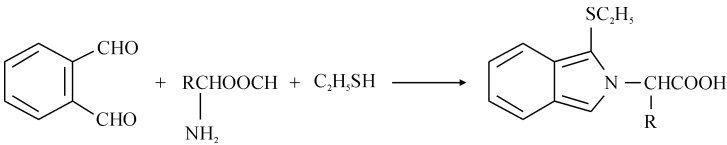


图 2 氨基酸与 OPA 的反应
Fig. 2 The reaction between amino acids and OPA

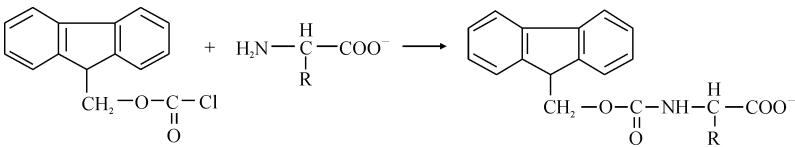


图 3 氨基酸与 FMOC 的反应
Fig. 3 The reaction of amino acids with FMOC

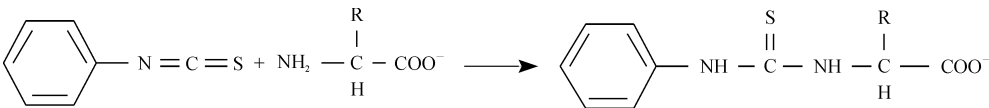


图 4 PITC 与氨基酸的反应
Fig. 4 The reaction of PITC with amino acid

FDNB)为衍生试剂建立了检测β-ODAP可靠的方法^[59](图5)。1 mL样品萃提液(或氨基酸标准溶液)真空干燥后加入100 μL 0.5 mol/L的NaHCO₃溶液溶解,然后加入100 μL FDNB衍生化试剂(100 mg FDNB溶解于100 mL乙腈,每日新制)混匀,于60℃加热30 min,冷至室温,加入0.01 mol/L的KH₂PO₄溶液,旋混数秒,0.45 μm滤膜过滤,取20 μL进行分析,β-ODAP和α-ODAP可良好分离。黄海霞等^[60]采用此方法同时测定了三七不同部位三七素和18种游离氨基酸的含量。该方法的最大优点是β-ODAP和α-ODAP衍生物最先出峰(保留时间2~4 min),大大缩短了分析时间。

张海霞等^[61]和赵兴秀等^[62]进一步优化了色谱条件,采用恒组分洗脱测定了山黧豆中β-ODAP的含量,并对β-ODAP的提取方法进行了筛选。天水师范学院焦成瑾和杨玲娟课题组采用乙腈和HAc-NaAc(17:83,V/V)为流动相,恒组分洗脱,使色谱峰峰形得到优化(图6)^[48],在0.40 μg/mL~1.2 mg/mL范围内线性关系良好;并以此分析了三七和山黧豆不同组织中β-ODAP和α-ODAP含量^[63-64]。该方法的缺点是反应时间长(30 min),反应温度较高(60℃),导致α-ODAP的比例升高,但转化导致的误差通过标准品消除,不影响检测结果。

2.2.5 其他衍生试剂法 测定β-ODAP的柱前衍生试剂除了上述几种之外,还有对硝基卞氧基碳酰氯

(PNZ-Cl)、丹磺酰氯(Dansyl-Cl)、6-氨基喹啉机-N-羟基丁二酰亚氨基甲酸酯(AQC)等。Jia等^[65]和Yan等^[66]利用PNZ-Cl为衍生剂在260 nm检测了山黧豆中ODAP的两种异构体,同时分析了其中的高精氨酸和生物胺的含量。该方法在室温下2 min即可完成衍生,产物稳定,缺点是需梯度洗脱,ODAP的两种异构体夹在其他氨基酸中间出峰。Dansyl-Cl衍生物法最早由Tapuhi等^[67]提出,Xing等^[68]将其应用于山黧豆中β-ODAP和α-ODAP的测定,衍生反应在60℃下25 min完成。该方法衍生物稳定,线性关系良好(相关系数为 $r > 0.999$),对β-ODAP的检测限为2~3 ng、平均回收率为98%,可以将山黧豆样品中游离氨基酸及α-ODAP和β-ODAP很好的分离;但反应时间需严格掌握。此外,AQC也可应用于测定山黧豆样品α-ODAP和β-ODAP的含量^[69-70],其保留值分别为6.07和3.85 min,并且与其他氨基酸分离良好,但衍生物在室温下易分解^[71]。

总之,间接法通过与特定的衍生试剂反应,为ODAP分子引入苯环或共轭键,一方面使ODAP分子具有紫外吸收或发射荧光而便于检测,另一方面还可以明显改善分子的偶极矩,增大α-ODAP和β-ODAP极性差异,有效分离这两种同分异构体。相应衍生反应的条件、需要的时间、产物的保留时间以及检出限因衍生试剂而显著不同(表2)。

3 色谱-质谱法

色谱-质谱联用法是将高效率的色谱分离与高灵敏度的质谱鉴定相结合的分析技术,可以很好地解决复杂化合物的分离及分析问题。Pan等^[8]用N-乙

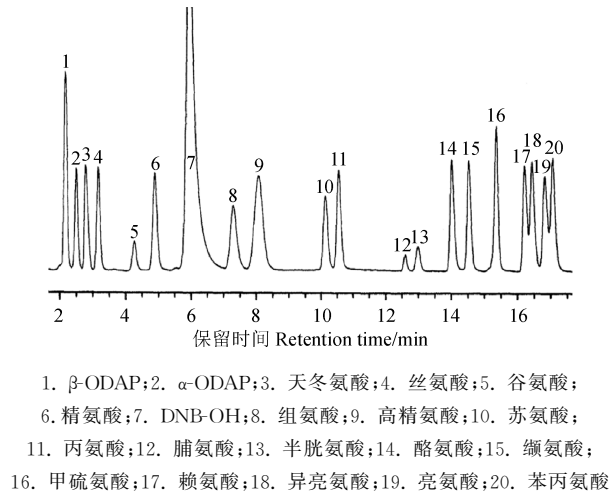
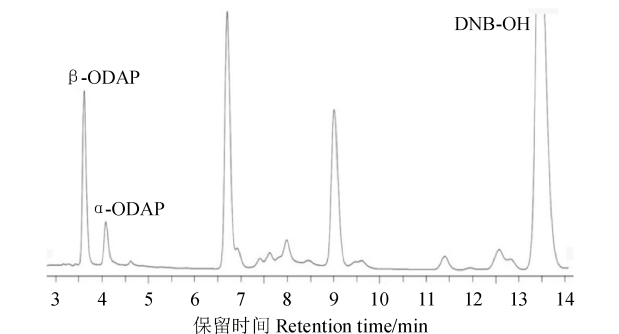


图5 β-ODAP及其他氨基酸与FDNB形成的衍生物的色谱图^[59]

1. β-ODAP; 2. α-ODAP; 3. Asp; 4. Ser; 5. Glu; 6. Arg; 7. DNB-OH; 8. His; 9. Homoarginine; 10. Thr; 11. Ala; 12. Pro; 13. Cys; 14. Tyr; 15. Val; 16. Met; 17. Lys; 18. Ile; 19. Leu; 20. Phe

Fig. 5 Chromatograms of derivatives of β-ODAP and other amino acids with FDNB



保留时间为3.576和4.073的峰分别为β-ODAP和α-ODAP的衍生物

图6 三七叶游离氨基酸的FDNB衍生物色谱图^[48]

The peaks with retention times of 3.576 and 4.073 are derivatives of β-ODAP and α-ODAP, respectively

Fig. 6 Chromatograms of FDNB derivatives of free amino acids in the roots of *Panax notoginseng*

表 2 不同柱前衍生试剂检测 β-ODAP 结果比较

Table 2 A comparison of different derivatization reagents for detecting β-ODAP

衍生试剂 Derivatization reagent	反应时间 Reaction time /min	保留时间 Retention time /min	检出限 Detection limit /($\mu\text{mol/L}$)	检测器 Detector	文献 Reference
OPA	2	<14	17.5	紫外或荧光 UV/Fluorescence	[51]
FMOC	1	<12	0.34	荧光 Fluorescence	[55]
PITC	10	<12	50	紫外 UV	[56]
FDNB	30	<4	30	紫外 UV	[59]
AQC	10	<4	10	荧光 Fluorescence	[69]
DNS-Cl	25	10.5	13	荧光 Fluorescence	[68]
PNZ-Cl	5	12.1	0.2	紫外 UV	[66]

氧甲酰乙酯(N-ethoxycarbonyl ethyl ester,ECEE)作衍生化试剂,通过 GC-MS 技术对 9 种苏铁种子的成分进行了鉴定,发现其中 2 种苏铁种子(*Macrozamia moorei* 和 *M. communis*)含有 β-ODAP。Xie 等^[72]用氯甲酸乙酯(ethyl chloroformate,ECF)为衍生试剂,以 2-氯苯丙氯甲酸乙酯为内标,测定了三七中 β-ODAP 及其他 21 种氨基酸的含量,β-ODAP 的检出限为 0.5 μg/mL,提取液中含量为 2 μg/mL。针对 β-ODAP 熔点高且存在异构化现象,朱静等^[73]选用液相色谱-质谱联用技术研究三七素的两个对映异构体在兔子体内的代谢动力学,发现 D 型、L 型三七素在家兔体内的代谢行为基本一致,都符合二室模型;建立的 HPLC-MS 方法对 D 型和 L 型三七素的检出限分别是 10 和 8 ng/mL。张勇等^[74]以羧甲司坦(carbocystelne)为内标,以甲醇为衍生试剂,生成三七素双甲酯衍生物(羧甲司坦双甲酯衍生物),应用串连质谱(LC-MS-MS)法分析了三七素在大鼠及犬体内的分布、代谢和排泄情况,该方法的线性范围为 0.02~50 μg/mL,大鼠血液中 β-ODAP 的浓度检出限为 0.02 μg/mL,血浆中的提取回收率为 97.1%。值得关注的是,采用稳定同位素标记的 di-¹³C β-L-ODAP 作为内标物进行高灵敏度 LC-MS 检测,可准确测定山黧豆、豌豆和鹰嘴豆中低含量的 β-ODAP,用以判定这些作物不同组织中是否含有 β-ODAP^[22]。这一同位素内标法被誉为测定 β-ODAP 的“金标准”。

4 毛细管电泳法

毛细管电泳(capillary electrophoresis,CE)技术是以高压电场为驱动力,毛细管为分离通道,利用样品中不同带电微粒的电迁移速度不同而实现分离的一种手段。目前 CE 技术在药物分析中有非常广

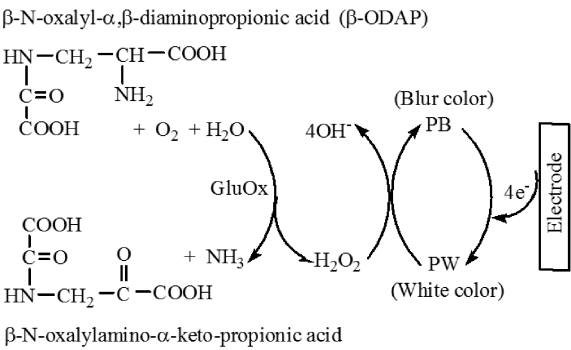


图 7 酶传感器检测 β-ODAP 的反应机理示意图^[71]

Fig. 7 Schematic diagram of the reaction mechanism of enzyme sensor for detecting β-ODAP

泛的应用^[75]。郑萍等^[76]应用毛细管区带电泳(CZE),195 nm 紫外检测,测得三七药材中 β-ODAP 的含量在 0.583%~0.659%之间,这个测定范围与其他方法的测定结果相近。Arentoft 等^[77]及 Zhao 等^[78]利用 CZE 测定了山黧豆种子、苗及叶中的 β-ODAP 和 α-ODAP 含量,测定结果与 HPLC 法的结果基本接近。CE 法能彻底分离 β-ODAP、α-ODAP,操作简单,快速,成本低,适于对大量样品的筛选测定。

5 酶 法

由于酶对底物具有高效且高度专一性的催化效率,利用酶对特定化合物进行识别和含量测定,即为酶分析法。Rao 等^[79]首先提出用酶法测定 β-ODAP 的方法。山黧豆样品提取液经阳离子交换层析及酸水解后加入二氨基丙酸-氨裂合酶,37 ℃保温 45 min 后加入 0.2%的 2,4-二硝基苯肼,于 520 nm 处比色测定,以无活性酶样品为空白对照,方法可准确到 5 μg。此外,可通过谷氨酸氧化酶(glutamate oxidase,GLOx)催化 β-ODAP 氧化分解来检测 β-ODAP。GLOx 氧化分解 β-ODAP 时会产

生 H_2O_2 , H_2O_2 在过氧化物酶(辣根过氧化物酶)的催化下氧化还原性染料使其变色,以光度法分析氧化前后吸光度的差异间接测得 β -ODAP 的含量^[80](图 7)。十多年来, Moges 等^[71] 为提高检测灵敏度,对该方法进行了大量改进,但至今仍未开发出能实际应用的 GlOx 酶传感器。Peng 等^[81] 从绵羊瘤胃中分离到了形态不同的 3 种球菌,它们都可以分解利用 β -ODAP。如果能从中分离出分解 β -ODAP 的酶,进一步开发出酶传感器,则 β -ODAP 的检测会更加简便快捷,特异性好。

6 展 望

目前虽然已经明确 β -ODAP 的止血活性和神经兴奋性作用,但两种不同功能的分子机理至今不完全清楚,对 β -ODAP 多样性生物活性涉及的分子机理进一步阐明将无疑拓展人们对这一神奇氨基酸的应用领域。进一步的深入研究需要纯度较高的 β -ODAP 和高灵敏度的检测方法。纯品 β -ODAP 的获取途径不外乎从天然植物资源中分离提纯和化学合成两种途径。近年出现的分子印迹(molecular imprinting, MI)靶向天然产物分离制备技术因其具有的特异性识别特点而受到广泛重视^[82]。该技术预先以天然产物活性成分或其结构类似物为模板分子,制备具有特异性识别功能的高分子聚合物,并以

其为分离材料,从天然产物中分离得到目标活性成分。谢宏凯等^[83] 通过 MI 技术制备了对三七素具有高度选择识别性和高吸附容量的聚合物,将此聚合物用作固相萃取吸附填料,定向分离制备了三七中的 β -ODAP。吸附实验证明分子印迹靶向聚合材料最大吸附容量为 0.185 mmol/g,在 15 min 内即能达到吸附平衡,靶向分离三七素,其纯度高达 98.7%,平均回收率为 83.7%。以 MI 为介质制备的小柱在 β -ODAP 检测样品前处理中也将会有事半功倍的效果。

除以上提及的 β -ODAP 主流检测方法,还有一些属很少使用但在特定场合下实用的检测手段。目前,柱前衍生色谱法是 β -ODAP 研究中应用最为广泛的分析方法。柱前衍生解决了 ODAP 紫外吸收弱、极性不强、不易在 C_{18} 柱保留、两种异构体不易分离等问题。衍生试剂多样,衍生简单,分析效率高,大多能有效分离两种异构体。毛细管电泳和液质联用法因其高效的分离能力和高灵敏度被广泛应用于极难分离组分的分离;稳定性同位素内标法的 LC-MS 被誉为检测 β -ODAP 的“金标准”,可准确、灵敏、定性定量分析低含量 ODAP 样品。由于 ODAP 热异构化现象的存在,常温提取,常温检测将是 β -ODAP 检测方法努力的方向之一,因此,以 MI 法制备提取,以新型的特异性固定化酶电极或传感器作为检测手段将是未来 β -ODAP 分析检测的研究方向。

参考文献:

- [1] HANBURY C D, WHITE C L, MULLAN B P, *et al.* A review of the potential of *Lathyrus sativus* L. and *L. cicera* L. grain for use as animal feed[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2000, **87**(1-2): 1-27.
- [2] LAMBEIN F, HAQUE R, KHAN J K, *et al.* From soil to brain: zinc deficiency increases the neurotoxicity of *Lathyrus sativus* and may affect the susceptibility for the motorneuron disease neurolathyrism[J]. *Toxicon*, 1994, **32**(4): 461-466.
- [3] BRUNET J, REPELLIN A, VARRAULT G, *et al.* Lead accumulation in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.): a novel plant for phytoremediation systems[J]. *Comptes Rendus Biologies*, 2008, **331**(11): 859-864.
- [4] RAO S L, ADIGA P R, SARMA P S. The isolation and characterization of β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid; a neurotoxin from the seeds of *Lathyrus sativus*[J]. *Biochemistry*, 1964, **3**(3): 432-436.
- [5] 熊友才,焦成瑾,邢更妹. 山黧豆生物学[M]. 北京:科学出版社,2013.
- [6] BELL E A. Occurrence of the neurolathyrigen α -amino- β -oxalylaminopropionic acid in two species of *Crotalaria*[J]. *Nature*, 1968, **218**(5 137): 197.
- [7] QUERESHI M Y, PILBEAM D J, EVANS C S, *et al.* The neurolathyrigen, α -amino- β -oxalylaminopropionic acid in legume seeds[J]. *Phytochemistry*, 1977, **16**(4): 477-479.
- [8] PAN M D, MABRY T J, CAO P, *et al.* Identification of non-protein amino acids from cycad seeds as N-ethoxycarbonyl ethyl ester derivatives by positive chemical-ionization gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 1997, **787**(1-2): 288-294.
- [9] KOSUGE T, YOKOTA M, OCHIAI A. Studies on antihemorrhagic principles in the crude drugs for hemostatics. II. on antihemorrhagic principle in *Sanchi ginseng* Radix[J]. *Yakugaku Zasshi*, 1981, **101**(7): 629-632.
- [10] LONG Y C, YE Y H, XING Q Y. Studies on the neuroexcitotoxin β -N-oxalo-L- α , β -diaminopropionic acid and its isomer α -N-oxalo-L- α , β -diaminopropionic acid from the root of *Panax* species[J]. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 1996, **47**(1-2): 42-46.
- [11] 张艳海,杨远贵,施磊,等. 基于高效液相色谱-电喷雾检测的三七及人参、西洋参中水溶性非皂苷类部位的指纹图谱表征分析和三七素的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2020, **45**(14): 3 475-3 480.

ZHANG Y H, YANG Y G, SHI L, *et al.* Fingerprinting analysis of non-saponins from water-soluble part and determination of dencichine from *Panax notoginseng*, *P. ginseng* and *P. quinquefolium* based on liquid chromatography coupled with charged aerosol detection[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2020, **45**(14): 3 475-3 480.

[12] JIAO C J, JIANG J L, KE L M, *et al.* Factors affecting β -ODAP content in *Lathyrus sativus* and their possible physiological mechanisms[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, **49**(3): 543-549.

[13] SCHENK S U, LAMBEIN F, WERNER D. Broad antifungal activity of β -isoxazolinonyl-alanine, a non-protein amino acid from roots of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1991, **11**(3): 203-209.

[14] 徐全乐, 蒋景龙, 焦成瑾, 等. 山黧豆 160 年研究历程及进展[J]. 西北植物学报, 2021, **41**(9): 1 583-1 604.

XU Q L, JIANG J L, JIAO C J, *et al.* Process and progress of researches on *Lathyrus sativus* L. over the past 160 years[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, **41**(9): 1 583-1 604.

[15] 严则义, 邢更妹, 王崇英, 等. 家山黧豆及其毒素 ODAP 的研究[J]. 西北植物学报, 2004, **24**(5): 911-920.

YAN Z Y, XING G M, WANG C Y, *et al.* Recent advance in *Lathyrus sativus* and toxin ODAP[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2004, **24**(5): 911-920.

[16] 焦成瑾, 杨玲娟, 赵菲佚, 等. 三七素检测方法研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2015, **37**(3): 15-20.

JIAO C J, YANG L J, ZHAO F Y, *et al.* Progress in quantitative analysis of dencichine[J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2015, **37**(3): 15-20.

[17] LAMBEIN F, KUO Y H, KUSAMA-EGUCHI K, *et al.* 3-N-oxalyl-L-2,3-diaminopropanoic acid, a multifunctional plant metabolite of toxic reputation[J]. *ARKIVOC*, 2007, 9: 45-52.

[18] RAO S L N. A sensitive and specific colorimetric method for the determination of α , β -diaminopropionic acid and the *Lathyrus sativus* neurotoxin [J]. *Analytical Biochemistry*, 1978, **86**(2): 386-395.

[19] 李志孝, 蔡文涛, 许主国, 等. 邻苯二甲醛比色测定山黧豆毒素 ODAP[J]. 兰州大学学报, 1987, **23**(2): 130-132.

[20] BRIGGS C J, PARRENO N, CAMPBELL C G. Phytochemical assessment of *Lathyrus* species for the neurotoxic agent, β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid[J]. *Planta Medica*, 1983, **47**(3): 188-190.

[21] GUPTA P, UDUPA S M, SEN GUPTA D, *et al.* Population structure analysis and determination of neurotoxin content in a set of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) accessions of Bangladesh origin[J]. *The Crop Journal*, 2018, **6**(4): 435-442.

[22] EMMRICH P M F, REJZEK M, HILL L, *et al.* Linking a rapid throughput plate-assay with high-sensitivity stable-isotope label LCMS quantification permits the identification and characterisation of low β -L-ODAP grass pea lines[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, **19**(1): 489.

[23] 郝晓鹏, 王 燕, 董 雪, 等. 基于分光光度法的 137 份山黧豆种质资源 ODAP 含量分析[J]. 山西农业科学, 2021, **49**(2): 211-214.

HAO X P, WANG Y, DONG X, *et al.* Analysis of ODAP content in 137 *Lathyrus sativus* germplasm resources based on spectrophotometric method[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2021, **49**(2): 211-214.

[24] 李志孝, 张东辉, 陈耀祖. 荧光光度法测定山黧豆毒素[J]. 分析化学, 1989, **17**(12): 1 090-1 094.

LI Z X, ZHANG D H, CHEN Y Z. Fluorometric assay of a neurotoxin in *Lathyrus sativus*[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 1989, **17**(12): 1 090-1 094.

[25] PARADKAR M M, SINGHAL R S, KULKARNI P R. Detection of *Lathyrus sativus* in processed chickpea-and red gram-based products by thin layer chromatography[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2003, **83**(7): 727-730.

[26] 焦成瑾, 杨玲娟, 雷新有, 等. 山黧豆毒素的薄层分离[J]. 氨基酸和生物资源, 2007, **29**(4): 76-80.

JIAO C J, YANG L J, LEI X Y, *et al.* Separation of ODAP in *Lathyrus sativus* by thin layer chromatography[J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2007, **29**(4): 76-80.

[27] TARADE K M, SINGHAL R S, *et al.* Kinetics of degradation of ODAP in *Lathyrus sativus* L. flour during food processing[J]. *Food Chemistry*, 2007, **104**(2): 643-649.

[28] 章观德, 崔建芳. 三七中止血成分 Dencichine 荧光衍生化高效薄层分析方法的研究[J]. 药物分析杂志, 1990, **10**(4): 209-212.

[29] 李天荣, 路 苹, 张林生, 等. 用 121MB 型氨基酸分析仪测定山黧豆中的毒素[J]. 生物化学与生物物理进展, 1984, **6**: 73-73, 84.

[30] 薛 崧, 张林生, 曹 让, 等. 水分胁迫对山黧豆萌发过程中 β -ODAP 和氨基酸的影响[J]. 西北植物学报, 2001, **21**(4): 620-624.

XUE S, ZHANG L S, CAO R, *et al.* Effect of drought on β -ODAP and amino acids in the process of *Lathyrus* seed germination. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2001, **21**(4): 620-624.

[31] 鲁 歧, 李向高. 三七止血成分的分离鉴定与含量测定[J]. 中成药, 1988, **10**(9): 34-35.

[32] 李向高, 郑毅勇, 魏春雁. 人参止血成分的化学研究[J]. 吉林农业大学学报, 1989, **11**(2): 32-35, 122.

LI X G, ZHENG Y N, WEI C Y. Studies on antihemorrhagic principles in *ginseng* roots[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 1989, **11**(2): 32-35, 122.

[33] 吴锦忠, 李向高, 杨继祥. 鲜人参与红参氨基酸成分比较研究[J]. 中药材, 1990, **13**(5): 27-28.

[34] 董彩霞, 董园园, 王 健, 等. 同一流动相测定植物体内 12 种有机酸和维生素 C 的高效液相色谱法[J]. 土壤学报, 2005, **42**(2): 331-335.

DONG C X, DONG Y Y, WANG J, *et al.* Determination of the contents of twelve organic acids and vitamin c in plants with one mobile phase by HPLC[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2005, **42**(2): 331-335.

[35] 郭 燕, 梁 俊, 李敏敏, 等. 高效液相色谱法测定苹果果实中的有机酸[J]. 食品科学, 2012, **33**(2): 227-230.

GUO Y, LIANG J, LI M M, *et al.* Determination of organic

- acids in apple fruits by HPLC[J]. *Food Science*, 2012, **33**(2): 227-230.
- [36] 崔秀明,徐璐珊,王 强,等. 三七中三七素的含量测定[J]. 中国药学杂志,2005, **40**(13): 1 017-1 019.
- CUI X M, XU L S, WANG Q, *et al.* Determination of dencichine in *Radix notoginseng* [J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2005, **40**(13): 1 017-1 019.
- [37] 付春梅,朱 静,刘三康,等. HPLC 法测定三七及其制剂中三七素[J]. 中草药,2006, **37**(1): 68-69.
- [38] 谢国祥,邱明丰,赵爱华,等. 三七中三七素的分离纯化与结构分析[J]. 天然产物研究与开发,2007, **19**(6): 1 059-1 061.
- XIE G X, QIU M F, ZHAO A H, *et al.* Separation, purification and structural analysis of dencichine from *Panax notoginseng* [J]. *Natural Product Research and Development*, 2007, **19**(6): 1 059-1 061.
- [39] 张玉萍,刘 艳. HPLC 法测定三七片中三七素的含量[J]. 河南中医,2009, **29**(11): 1 074-1 075.
- [40] 山丽梅,赵艳玲,洪 玮,等. 三七止血活性与商品规格划分的相关分析[J]. 中草药,2011, **42**(9): 1 779-1 782.
- SHAN L M, ZHAO Y L, HONG W, *et al.* Correlation analysis between hemostatic activity and commercial grades of *Panax notoginseng* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2011, **42**(9): 1 779-1 782.
- [41] 刘 光,刘云江,胡炜彦. 高效液相色谱法测定三七芦头中三七素的含量[J]. 云南医药,2009, **30**(2): 203-204.
- [42] 刘 光,刘云江,胡炜彦. HPLC 法测定三七总皂苷提取废液中三七素的含量[J]. 云南中医中药杂志,2010, **31**(2): 61-62.
- [43] KHAN J K, KEBEDE N, KUO Y H, *et al.* Analysis of the neurotoxin β -ODAP and its α -isomer by precolumn derivatization with phenylisothiocyanate [J]. *Analytical Biochemistry*, 1993, **208**(2): 237-240.
- [44] WU P Y, CHEN H, SU N W, *et al.* First determination of glycidyl ester species in edible oils by reverse-phase ultra-performance liquid chromatography coupled with an evaporative light-scattering detector[J]. *Molecules*, 2021, **26**(9): 2 702.
- [45] 赵宇新,李曼玲. 蒸发光散射检测器在中药成分分析中的应用[J]. 中国中药杂志,2003, **28**(10): 913-917.
- ZHAO Y X, LI M L. Application of evaporative light-scattering detector in analysis of the active constituents in Chinese herbal medicine[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2003, **28**(10): 913-917.
- [46] QIAN X Y, NIE L X, DAI Z, *et al.* Determination of free amino acids in Banlangen granule and its fractions by solid phase extraction combined with ion-pair high performance liquid chromatography using a Corona-charged aerosol detector (SPE-HPLC-CAD) [J]. *Current Pharmaceutical Analysis*, 2021, **17**(7): 838-846.
- [47] 宋丽丽,张玉萍. HPLC-ELSD 法测定三七中三七素的含量[J]. 北京中医药,2010, **29**(3): 216-217.
- [48] 杨玲娟,焦成瑾,高二全. 三七中三七素及其异构体的高效液相色谱检测[J]. 中药材,2015, **38**(2): 311-314.
- YANG L J, JIAO C J, GAO E Q. Determination of dencichine and its isomer in *Panax notoginseng* by pre-column derivatization HPLC[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2015, **38**(2): 311-314.
- [49] JONES B N, GILLIGAN J P. O-phthalaldehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids[J]. *Journal of Chromatography A*, 1983, 266: 471-482.
- [50] HUSSAIN M, CHOWDHURRY B, HAQUE R, *et al.* A comparative study of the O-phthalaldehyde method for the neurotoxin 3-N-oxalyl-L-2, 3-diaminopropanoic acid as modified by various laboratories[J]. *Phytochemical Analysis*, 1994, **5**(5): 247-250.
- [51] THIPPESWAMY R, MARTIN A, GOWDA L R. A reverse phase high performance liquid chromatography method for analyzing of neurotoxin β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropanoic acid in legume seeds[J]. *Food Chemistry*, 2007, **101**(3): 1 290-1 295.
- [52] EINARSSON S, JOSEFSSON B, LAGERKVIST S. Determination of amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 1983, 282: 609-618.
- [53] KISBY G E, ROY D N, SPENCER P S. A sensitive HPLC method for detection of β -N-oxalylamino-L-alanine in *Lathyrus sativus* and animal tissue[C]. In: Spencer PS and Fenton MB (Eds). The grass pea: Threat and promise. Proceedings of the International Network for the Improvement of *Lathyrus sativus* and the eradication of Lathyrism, New York: Third World Medical Foundation, 1989: 133-138.
- [54] GEDA A, BRIGGS C J, VENKATARAM S. Determination of the neurotoxin β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid using high-performance liquid chromatography with fluorometric detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 1993, **635**(2): 338-341.
- [55] 朱 静,刘三康,付春梅,等. 柱前衍生化高效液相色谱法测定三七及其制剂中三七素含量[J]. 中国中药杂志,2006, **31**(22): 1 865-1 868.
- ZHU J, LIU S K, FU C M, *et al.* Analysis of dencichine by HPLC with pre-column derivatization[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2006, **31**(22): 1 865-1 868.
- [56] KHAN J K, KUO Y H, KEBEDE N, *et al.* Determination of non-protein amino acids and toxins in *Lathyrus* by high-performance liquid chromatography with precolumn phenyl isothiocyanate derivatization[J]. *Journal of Chromatography A*, 1994, **687**(1): 113-119.
- [57] KUO Y H, Ikegami F, Lambein F. Neuroactive and other free amino acids in seed and young plants of *Panax ginseng* [J]. *Phytochemistry*, 2003, **62**(7): 1 087-1 091.
- [58] FIKRE A, KORBU L, KUO Y H, *et al.* The contents of the neuro-excitatory amino acid β -ODAP (β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid), and other free and protein amino acids in the seeds of different genotypes of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) [J]. *Food Chemistry*, 2008, **110**(2): 422-427.
- [59] WANG F, CHEN X, CHEN Q, *et al.* Determination of neurotoxin 3-N-oxalyl-2, 3-diaminopropionic acid and non-protein amino acids in *Lathyrus sativus* by precolumn derivatization with 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene[J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, **883**(1-2): 113-118.

- [60] 黄海霞,徐 怡,牛延菲,等. 柱前衍生 RP-HPLC 检测三七中三七素和 18 种游离氨基酸[J]. 广州化工,2021,**49**(3): 66-69.
HUANG H X, XU Y, NIU Y F, *et al.* RP-HPLC analysis of dencichine and eighteen free amino acids in *Panax notoginseng* by using pre-column derivatization [J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2021,**49**(3): 66-69.
- [61] 张海霞,刘满仓,靳小舜,等. 2,4-二硝基氟苯柱前衍生测定山黧豆毒素 β -ODAP[J]. 分析化学,2006,**34**(1): 100-102.
ZHANG H X, LIU M C, JIN X S, *et al.* Determination of β -oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid in *Lathyrus sativus* by pre-column derivatization with 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2006,**34**(1): 100-102.
- [62] 赵兴秀,何义国,邓 静,等. HPLC 测定不同方法提取的山黧豆中 β -ODAP[J]. 食品研究与开发,2011,**32**(9): 145-148.
ZHAO X X, HE Y G, DENG J, *et al.* Determination of β -N-oxalyl- α , β -diaminopropionic acid in *Lathyrus sativus* by HPLC with different extraction methods[J]. *Food Research and Development*, 2011,**32**(9): 145-148.
- [63] 杨玲娟,高二全,焦成瑾. 柱前衍生 HPLC 法测定三七中的三七素[J]. 资源开发与市场,2015,**31**(1): 1-3.
YANG L J, GAO E Q, JIAO C J. Determination of dencichine in *Panax notoginseng* by pre-column derivatization HPLC[J]. *Resource Development & Market*, 2015,**31**(1): 1-3.
- [64] 张小寒,董晓宇,杨玲娟. 柱前衍生高效液相色谱法测定山黧豆中 β -二氨基丙酸的方法研究[J]. 化学世界,2020,**61**(6): 416-420.
ZHANG X H, DONG X N, YANG L J. Determination of toxin β -diaminopropionic acid in *Lathyrus sativus* with pre-column derivatization high performance liquid chromatography [J]. *Chemical World*, 2020,**61**(6): 416-420.
- [65] JIA Y R, ZHANG W M, ZHAO T, *et al.* RP-HPLC method for the simultaneous determination of daidzein, genistein and formononetin in *Solanum lyratum* Thunb[J]. *Academic Journal of Xian Jiaotong University*, 2010,**22**(3): 156-159.
- [66] YAN Z Y, WANG Y P, JIAO C J, *et al.* High-performance liquid chromatographic analysis of neurotoxin β -N-oxalyl- α , β -diaminopropionic acid (β -ODAP), its non-neurotoxic isomer α -ODAP and other free amino acids in *Lathyrus sativus* [J]. *Chromatographia*, 2005,**61**(5-6): 231-236.
- [67] TAPUHI Y, SCHMIDT D E, LINDNER W, *et al.* Dansylation of amino acids for high-performance liquid chromatography analysis[J]. *Analytical Biochemistry*, 1981,**115**(1): 123-129.
- [68] XING G M, WANG F, CUI K R, *et al.* Assay of neurotoxin β -odap and non-protein amino acids in *Lathyrus sativus* by high-performance liquid chromatography with dansylation [J]. *Analytical Letters*, 2001,**34**(15): 2 649-2 657.
- [69] CHEN X, WANG F, CHEN Q, *et al.* Analysis of neurotoxin in 3-N-oxalyl-L-2, 3-diaminopropionic acid and its α -isomer in *Lathyrus sativus* by high-performance liquid chromatography with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) derivatization[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000,**48**(8): 3 383-3 386.
- [70] COHEN S A, MICHAUD D P. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography[J]. *Analytical Biochemistry*, 1993,**211**(2): 279-287.
- [71] MOGES G, WODAJO N, GORTON L, *et al.* Glutamate oxidase advances in the selective bioanalytical detection of the neurotoxic amino acid β -ODAP in grass pea: A decade of progress[J]. *Pure and Applied Chemistry*, 2004,**76**(4): 765-775.
- [72] XIE G X, QIU Y P, QIU M F, *et al.* Analysis of dencichine in *Panax notoginseng* by gas chromatography-mass spectrometry with ethyl chloroformate derivatization[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007,**43**(3): 920-925.
- [73] 朱 静. 三七素手性药物代谢动力学研究噻唑硫磷质量控制及残留监测[D]. 成都:四川大学,2006.
- [74] 张 勇. 三七素临床前药物动力学和雷贝拉唑抑制剂生物等效性研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2006.
- [75] 张 丽. 毛细管电泳在中药研究中的应用[J]. 中医药导报, 2012,**18**(2): 94-96.
- [76] 郑 萍. 毛细管区带电泳法测定三七药材中的三七素[J]. 华西药理学杂志,2012,**27**(4): 453-454.
ZHENG P. Determination of dencichine in *Panax notoginseng* by capillary zone electrophoresis[J]. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012,**27**(4): 453-454.
- [77] ARENTOFT A M K, GREIRSON B N. Analysis of 3-(N-oxalyl)-L-2, 3-diaminopropanoic acid and its α -isomer in grass pea (*Lathyrus sativus*) by capillary zone electrophoresis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995,**43**(4): 942-945.
- [78] ZHAO L, CHEN X G, HU Z D, *et al.* Analysis of β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid and homoarginine in *Lathyrus sativus* by capillary zone electrophoresis[J]. *Journal of Chromatography A*, 1999,**857**(1-2): 295-302.
- [79] RAO D R, HARIHARAN K, VIJAYALAKSHMI K R. Specific enzymic procedure for the determination of neurotoxic components (derivatives of L-alpha, beta-diaminopropionic acid) in *Lathyrus sativus*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1974,**22**(6): 1 146-1 148.
- [80] MOGES G, JOHANSSON G. Flow injection assay for the neurotoxin β -ODAP using an immobilized glutamate oxidase reactor with prereactors to eliminate glutamate interferences [J]. *Analytical Chemistry*, 1994,**66**(21): 3 834-3 839.
- [81] PENG H H, BROOKER J D. Isolation of ODAP-degrading bacteria from the sheep rumen[J]. *Lathyrus Lathyrism Newsletter*, 2000, 1: 33.
- [82] 孙晓宇,马润恬,师彦平. 分子印迹技术在蛋白质分离分析中的研究进展[J]. 色谱,2020,**38**(1): 50-59.
SUN X Y, MA R T, SHI Y P. Recent advances in molecular imprinting technology for the separation and analysis of proteins [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2020,**38**(1): 50-59.
- [83] 谢宏凯. 分子印迹技术靶向制备三七素和天麻素[D]. 山东泰安:山东农业大学,2016.