

柱前衍生反相高效液相色谱法测定马尾松 (*Pinus massoniana*) 针叶中 γ -氨基丁酸和 17 种游离氨基酸

邓文红¹, 沈应柏^{2,*}, 李镇宇³, 张淑静², 刘雪萍²

(1. 北京林业大学生物中心, 北京 100083; 2. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083;
3. 北京林业大学森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083)

摘要:建立了自动在线柱前衍生反相高效液相色谱法同时测定 γ -氨基丁酸(GABA)和 17 种游离氨基酸含量的方法。以邻苯二甲醛-9-苄基甲基氯甲酸酯(OPA-FMOC)为衍生试剂进行衍生, Agilent Hypersil AA-ODS-C₁₈ 色谱柱分离, 梯度洗脱, 二极管阵列检测器检测, 在 19min 内分离测定了马尾松苗木针叶中 GABA 和 17 种游离氨基酸的含量。该方法测定氨基酸的回收率高于 90.1%, 精密度和重现性均较好(相对标准偏差为 0.21% ~ 2.81%), 经测定, 发现马尾松被马尾松毛虫取食后, 所测 18 种氨基酸总量明显降低, 从 418.3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 降低到 310.4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 鲜重。

关键词:反相高效液相色谱; 柱前衍生; 游离氨基酸; γ -氨基丁酸; 马尾松

文章编号: 1000-0933(2008)08-4023-07 中图分类号: Q948 文献标识码: A

Determination of gamma-aminobutyric acid and seventeen free amino acids in *Pinus massoniana* Needles by reversed-phase high performance liquid chromatography with pre-column derivation

DENG Wen-Hong¹, SHEN Ying-Bai^{2,*}, LI Zhen-Yu³, ZHANG Shu-Jing², LIU Xue-Ping²

1. Biology Center of Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

2. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

3. Key Laboratory for Forest Silviculture and Conservation, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(8): 4023 ~ 4029.

Abstract: An automated pre-column derivation procedure has been developed for the determination of gamma-aminobutyric acid (GABA) and 17 free amino acids by means of reversed-phase high performance liquid chromatography. GABA and the 17 free amino acids in needles of *Pinus massoniana* seedlings were determined with a 0-phthaldialdehyde-9-fluorenylmethyl chloroformate pre-column derivation in 19 min. The amino acid derivatives were separated on an Agilent Hypersil AA-ODS-C₁₈ column by a gradient elution method and identified with a DAD detector. The recovery of amino acids by this method was more than 90.1% with high precision and reproducibility (its relative standard deviation ranged from 0.21% to

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(30330490); 国家林业局重点资助项目(2006-59); 国家“十一五”科技支撑计划课题资助项目(2006BAD01A15; 2006BAD24B04)

收稿日期:2008-03-03; **修订日期:**2008-06-23

作者简介:邓文红(1968~), 女, 河北省人, 硕士生, 主要从事植物生理生态研究. E-mail: dengwh@bjfu.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: ybshen@bjfu.edu.cn

致谢:感谢蒋湘宁教授对本文修改的帮助。

Foundation item: The project was financially supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30330490); the Key Science Program of the State Forestry Administration of China (No. 2006-59); the National Key Project of Scientific and Technical Supporting Programs Funded by Ministry of Science & Technology of China (No. 2006BAD01A15; 2006BAD24B04)

Received date: 2008-03-03; **Accepted date:** 2008-06-23

Biography: DENG Wen-Hong, Master candidate, mainly engaged in plant physiological ecology. E-mail: dengwh@bjfu.edu.cn

2.81%)。The total amount of amino acids in the needles of *P. massoniana* seedling decreased decidedly from 418.3 to 310.4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ after insect damage.

Key Words: reversed-phase high performance liquid chromatography; pre-column derivation; free amino acid; gamma-aminobutyric acid; *Pinus massoniana*

马尾松(*Pinus massoniana*)是我国南方主要造林树种,但常遭到马尾松毛虫(*Dendrolimus punctatus*)的危害,在我国周期性爆发成灾,给我国林业经济造成了很大损失。马尾松受害后,其体内的营养物质含量下降,使松毛虫取食后得不到正常生长发育所需要的足够营养,从而防止进一步被伤害^[1~3]。氨基酸是松毛虫幼虫发育的主要营养物质之一,除参与蛋白质合成外,还具有缓冲调节血液渗透压、参与能量代谢和脂肪酸合成等功能,大多数昆虫所需要的氨基酸是从食物中获取的,其含量过低或各种氨基酸的相对比例不均衡,都会影响昆虫的正常生长发育和繁衍^[4~8]。GABA 是一种重要的抑制性神经递质,植食性昆虫的活动对植物叶子的机械刺激和破坏可以诱导 GABA 的合成和积累,反过来摄食 GABA 又能破坏昆虫的正常生长和发育^[9,10]。因此,研究胁迫条件下内源氨基酸的变化对揭示植物的抗性生理具有重要意义。为此首先要解决氨基酸的测定问题。

目前,关于医药^[11,12]、食品^[13~16]、饲料^[17]、烟草^[18,19]中 17 种游离氨基酸含量的测定已有一些报道,但对植物样品特别是树木中 GABA 和 17 种游离氨基酸含量的测定国内尚未见报道,本试验以受害后的马尾松为材料,摸索出用反相高效液相色谱测定植物组织中氨基酸含量的分析方法。

1 实验方法

1.1 材料

试验所用树种为盆栽马尾松,来自江西省高安市,盆栽马尾松每两周浇 1 次 1/2Hoagland 营养液,防止营养不良,育苗过程中经常浇水,避免产生干旱胁迫,影响实验结果;马尾松毛虫由中国科学院动物研究所提供,5 龄幼虫,生长良好。

1.2 样品采集

选取树龄相同,长势良好且具有 6 个轮枝的盆栽马尾松 3 株,分别接入一定量的马尾松毛虫幼虫,取食一天后造成轻度伤害(针叶损失量达 25%~40%),在去掉虫后的 4h 从上述松树上采集松针。

另取相同树龄及长势的盆栽马尾松 3 株作为非危害对照,按上述方法采样,采样均匀,随机,采样后立即放入液氮罐中,然后置于 -80℃ 冰箱中保存备用。

1.3 仪器与试剂

仪器:美国 Agilent 公司 HP1100 高效液相色谱仪,系统配置为 G1315B 二极管阵列检测器, G1316A 柱温箱, G1313 自动进样器, G1311A 四元泵, G1322A 在线脱气机以及 Agilent 色谱工作站。

试剂:17 种氨基酸标准品(天门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、苏氨酸、丙氨酸、精氨酸、酪氨酸、胱氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、脯氨酸)、邻苯二甲醛(OPA)、9-苄基甲基氯甲酸酯(FMOC)以及 pH 10.4 的 0.4mol/L 硼酸缓冲液,购自 Agilent 公司;γ-氨基丁酸购自 Sigma 公司;醋酸钠、三乙胺、四氢呋喃为国产分析纯;甲醇、乙腈为美国 Fisher 公司生产;水为去离子水用 MILLI-Q(美国 Millipore 公司)超纯水仪处理。

1.4 色谱分析条件

色谱柱 Agilent Hypersil AA-ODS-C₁₈, 5 μm 200 × 2.1mm 柱和保护柱;流动相 A:20mmol NaAc + 0.018% TEA,用 1%~2% 醋酸调 pH 至 7.2;流动相 B:20% 的 20mmol NaAc,用 1%~2% 醋酸调 pH 至 7.2 + 40% 乙腈和 40% 甲醇;流速:0.45ml/min,梯度洗脱,见表 1;柱温:40℃;DAD 检测器:信号 = 338/10nm,参考 = 390/20nm,16min 时信号 = 262/16nm,参考 = 324/8nm。

1.5 柱前衍生

采用自动进样器进行 OPA-FMOC 在线衍生,吸取硼酸缓冲液 5 μ l 后,吸取 1 μ l OPA,洗针,吸取 1 μ l 氨基酸标准溶液或样品,混合,洗针,吸取 1 μ l FMOC,洗针,混合后进样。

1.6 氨基酸的提取与纯化

准确称取 0.5g 马尾松针叶鲜样,用 70% 乙醇研磨成匀浆,4 $^{\circ}$ C 冰箱中提取过夜,离心,上清液用 0.1mol/L HCL 调 pH 值为 2.0,用等体积的石油醚:乙醚萃取 3 次,弃去有机相,水相 60 $^{\circ}$ C 条件下旋转蒸发至干,用 500 μ l 0.01mol/L HCL 溶解样品,过 0.45 μ m 微孔滤膜,待上 HPLC。

1.7 氨基酸的定性及定量测定

根据氨基酸标准品的保留时间和其在 190 ~ 400nm 区间的紫外吸收 (ultraviolet, UV) 光谱对样品中的氨基酸定性,用 Agilent 色谱工作站测定纯度后,依据外标曲线计算氨基酸的含量 (μ g $\cdot$ g⁻¹ 鲜重)。每种指标的测定重复 3 次,试验数据用 SPSS 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 检测波长的选择

在所设定的扫描区间内,氨基酸的最大吸收波长为 230、338nm。为使氨基酸测定有最高灵敏度,记录了 230、338nm 两个波长下的色谱图。从中比较了马尾松针叶提取物在 230nm 和 338nm 处的吸收图谱,发现 338nm 处杂质干扰吸收和基线噪音均较小,且氨基酸有较好的吸收,最终选定 338nm 为最佳检测波长。脯氨酸最大吸收波长为 262nm,所以 16min 时检测波长改为 262 nm。

2.2 衍生化混合次数

一级氨基酸的在线 OPA 衍生化,原位最大速度混合 6 次,二级氨基酸 FMOC 衍生化,原位最大速度混合 4 次,衍生化反应最完全,峰面积最大。

2.3 流动相的选择

梯度程序 梯度斜率过大时,各组分的保留时间均缩短,分离度降低,色谱峰出现重叠;梯度斜率较小时,出峰时间延长,且峰形不好,本实验选择梯度程序为:在 0 ~ 17min 内,B 相的浓度由 0 线性上升至 60%,同时 A 相的浓度由 100% 线性下降至 40%,17 ~ 18min B 相的浓度由 60% 线性上升至 100%,在 19min 内有效地分离了 GABA 和 17 种游离氨基酸,同时,马尾松针叶内提取的氨基酸也获得了满意的分离效果(图 1)。

柱温 实验结果表明,柱温 40 $^{\circ}$ C 时分离效果较好,如果柱温低于 38 $^{\circ}$ C,所有色谱峰均延后。

pH 值 流动相的 pH 对氨基酸分离有很大的影响,当 pH 低于 6.8 时,Cys、Val、Met 分离度下降,本实验选择流动相 pH 为 7.2。

2.4 氨基酸标准溶液和马尾松样品的分离结果

氨基酸标准溶液和马尾松针叶中氨基酸的色谱分离结果见图 1。从图 1A 可见,18 种氨基酸标样的分离效果良好。从图 1B 可见,所设定的色谱条件可使氨基酸与其它组分很好的分离,且含量存在明显差异。

2.5 线性关系、检出限、精密度及回收率

分别取 18 种氨基酸浓度均为 3.125、62.5、125.0、250.0、1000.0pmol/ μ l 的标准溶液,其中谷氨酸再加 2000pmol/ μ l 点,按上述方法测定,以各种氨基酸峰面积 Y 为纵坐标,氨基酸浓度 X 为横坐标进行线性回归得到回归方程,以 3 倍信噪比计算最小检出量(表 2),结果表明,各氨基酸的相关系数均大于 0.9949。

精确称定已测知含量的马尾松样品,平行 5 份,准确加入 18 种氨基酸标准溶液,按供试品溶液的制备方

表 1 梯度洗脱条件

Table 1 Conditions of gradient separation

时间 Time (min)	流动相 A Mobile phase A (%)	流动相 B Mobile phase B (%)	流速 Flow rate (ml $\cdot$ min ⁻¹)
0.0	100.0	0.0	0.45
17.0	40.0	60.0	0.45
18.0	0.0	100.0	0.45
18.1	0.0	100.0	0.45
18.5	0.0	100.0	0.80
23.9	0.0	100.0	0.80
24.0	0.0	100.0	0.45
25.0	100.0	0.0	0.45

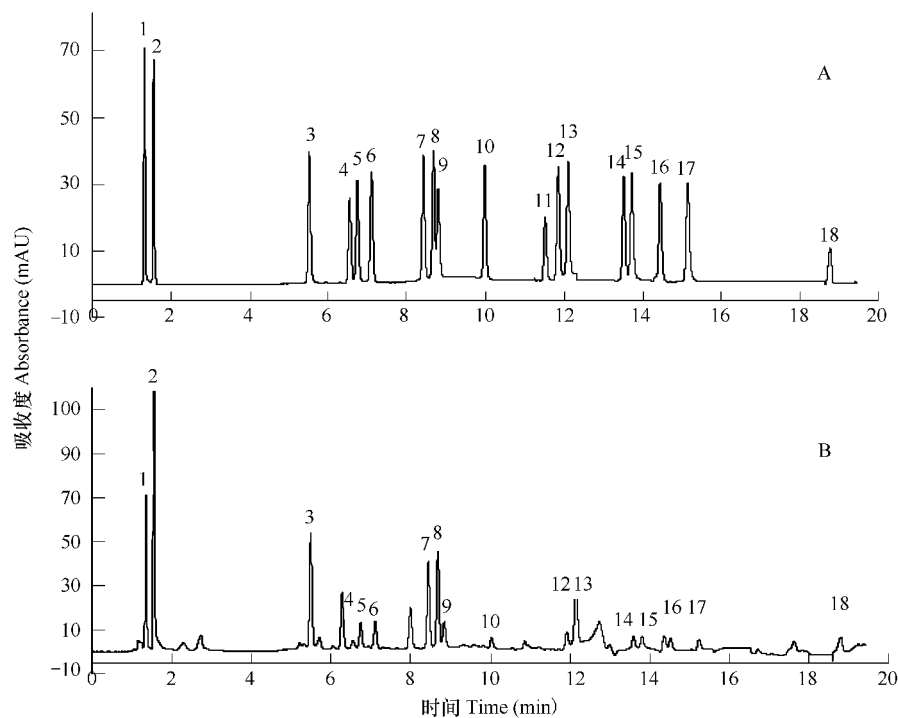


图1 125 pmol·μL⁻¹氨基酸标样溶液(A)和马尾松针叶中氨基酸(B)的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of 125 pmol·μL⁻¹ amino acids standard (A) and *P. massoniana* needles (B)

1. Asp; 2. Glu; 3. Ser; 4. His; 5. Gly; 6. Thr; 7. Ala; 8. Arg; 9. GABA; 10. Tyr; 11. Cys; 12. Val; 13. Met; 14. Phe; 15. Ile; 16. Leu; 17. Lys; 18. Pro

法制备样品,测其回收率和相对标准偏差(表2、表3),结果表明,回收率在90.1%~96.7%范围内,保留时间相对标准偏差为0.03%~0.78%,面积相对标准偏差为0.21%~2.81%,说明该方法准确度高,重现性好,方法可靠。

表2 18种氨基酸的线性回归方程、检出限、相关系数、回收率及精密度

Table 2 Linear regression equation, detection limit, correlation coefficient, recovery and relative standard deviation of 18 amino acids

氨基酸 Amino acids	线性回归方程 Regression equation	检出限(pmol·μl ⁻¹) Detection limit	相关系数 Correlation coefficient	精密度 RSD(n=5, %)	
				tR(min)	A
天门冬氨酸 Asp	$Y=0.61X+5.02$	0.583	0.99980	0.12	2.74
谷氨酸 Glu	$Y=0.72X+5.64$	0.602	0.99892	0.25	1.02
丝氨酸 Ser	$Y=0.59X+7.76$	1.034	0.99930	0.14	1.12
组氨酸 His	$Y=0.41X+3.91$	1.643	0.99946	0.11	0.21
甘氨酸 Gly	$Y=0.52X+3.32$	1.378	0.99985	0.10	1.13
苏氨酸 Thr	$Y=0.57X+5.53$	1.236	0.99955	0.14	1.12
丙氨酸 Ala	$Y=0.58X+8.31$	1.095	0.99917	0.08	1.44
精氨酸 Arg	$Y=0.57X-5.15$	1.274	0.99945	0.09	2.23
γ-氨基丁酸 GABA	$Y=0.06X+22.74$	1.983	0.99491	0.09	0.94
酪氨酸 Tyr	$Y=0.53X+8.08$	1.208	0.99895	0.09	1.24
胱氨酸 Cys	$Y=0.58X+7.03$	2.066	0.99934	0.08	1.76
缬氨酸 Val	$Y=0.29X+6.44$	1.229	0.99641	0.07	1.06
蛋氨酸 Met	$Y=0.58X+5.81$	1.204	0.99946	0.07	1.24
苯丙氨酸 Phe	$Y=0.54X+4.86$	1.347	0.99964	0.08	0.91
异亮氨酸 Ile	$Y=0.56X+6.16$	1.324	0.99948	0.09	0.60
亮氨酸 Leu	$Y=0.58X+7.64$	1.390	0.99922	0.06	2.60
赖氨酸 Lys	$Y=0.91X-17.59$	1.265	0.99842	0.03	1.38
脯氨酸 Pro	$Y=0.30X+10.13$	2.015	0.99568	0.78	2.81

表 3 马尾松针叶中氨基酸的分析结果

Table 3 Determination results of amino acids in needles of *Pinus massoniana*

氨基酸 Amino acids	对照 Control($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	虫害 Insect-damaged ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	加入量 Added(μg)	测得量 Total Found(μg)	回收率 Recovery($n=5, \%$)
天门冬氨酸 Asp	78.1 $\pm$ 8.3A	39.4 $\pm$ 4.06B	66.6	99.1	90.1
谷氨酸 Glu	234.6 $\pm$ 25.7A	130.5 $\pm$ 7.94B	147.1	254.7	93.4
丝氨酸 Ser	NDA	25.7 $\pm$ 4.9 B	4.4	4.1	93.2
组氨酸 His	4.7 $\pm$ 1.39 A	2.5 $\pm$ 0.28 B	4.9	7.0	94.8
甘氨酸 Gly	1.8 $\pm$ 0.4 A	5.2 $\pm$ 0.78 B	4.7	5.4	95.2
苏氨酸 Thr	NDA	6.7 $\pm$ 0.54 B	3.7	3.4	92.4
丙氨酸 Ala	17.9 $\pm$ 3.49a	21.0 $\pm$ 1.05a	14.9	22.4	90.6
精氨酸 Arg	28.9 $\pm$ 6.09a	12.6 $\pm$ 2.9b	21.8	35.5	96.7
γ -氨基丁酸 GABA	4.1 $\pm$ 0.92a	11.1 $\pm$ 1.5b	6.5	8.1	92.7
酪氨酸 Tyr	3.4 $\pm$ 0.8a	4.1 $\pm$ 0.99a	5.7	7.0	93.2
胱氨酸 Cys	NDa	NDa	5.0	4.7	94.3
缬氨酸 Val	3.0 $\pm$ 0.8a	3.6 $\pm$ 1.04a	4.9	6.0	91.9
蛋氨酸 Met	16.3 $\pm$ 2.65a	20.2 $\pm$ 1.31a	12.4	20.0	95.4
苯丙氨酸 Phe	5.5 $\pm$ 1.66a	7.5 $\pm$ 0.72a	5.2	7.4	90.2
异亮氨酸 Ile	2.3 $\pm$ 0.73a	2.2 $\pm$ 0.38a	4.1	4.9	90.7
亮氨酸 Leu	2.1 $\pm$ 0.37a	1.7 $\pm$ 0.79a	4.1	4.8	92.3
赖氨酸 Lys	5.0 $\pm$ 1.98a	3.9 $\pm$ 1.02a	4.6	6.7	90.5
脯氨酸 Pro	10.6 $\pm$ 1.86a	12.5 $\pm$ 1.17a	9.6	14.1	91.5
氨基酸总量 Total amino acids	418.3 $\pm$ 21.42A	310.4 $\pm$ 15.27 B			

表中数据是平均值 $\pm$ 标准差,“ND”指未检测到;数据采用 LSD 多重比较分析,不同字母表示差异达显著水平,小写字母表示 $P < 0.05$,大写字母表示 $P < 0.01$ The data in the table are mean $\pm$ sd;“ND”not detected. Data were analyzed using LSD test, values within the same row followed by different letters are significantly different (capital letters, $P < 0.01$; small letters, $P < 0.05$)

2.6 马尾松针叶中氨基酸的含量

从表 3 可以看出,马尾松被马尾松毛虫取食后,与健康对照相比,氨基酸总量明显降低,在所检测的 18 种氨基酸中天门冬氨酸、谷氨酸、组氨酸、精氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和赖氨酸含量下降;其它氨基酸含量升高,表明植物体受伤后短时间内即可对伤害做出反应,LSD 多重比较结果显示,虫害与对照之间的氨基酸总量差异极显著,其中天门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、苏氨酸含量差异极显著,精氨酸、 γ -氨基丁酸含量差异显著。说明虫害对氨基酸含量的变化有显著影响。

3 讨论

柱前衍生反相高效液相色谱法测定氨基酸是近年来发展起来的一种新方法。与氨基酸分析仪相比,柱前衍生法具有灵敏度高,分析过程简捷,更重要的是不需要用昂贵的专用仪器,整个衍生化过程在自动进样器中即可进行。

关于氨基酸的提取方法,国内多采用溶剂浸提,0.45 $\mu\text{mol/L}$ 滤膜过滤,不经过任何纯化步骤,衍生化后直接用高效液相色谱测定其含量^[12,19,20]。此方法虽具有提取时间短,简单、快速的特点,但不适合马尾松针叶中氨基酸的测定,主要原因是马尾松针叶中含有较多的色素和油脂类物质,对氨基酸的测定干扰较大。而本文采用等体积的石油醚:乙醚溶液萃取可以去掉大部分杂质,使氨基酸得到较好分离。

植物在长期进化过程中形成了一套完整的防御机制,当植物受到昆虫胁迫时,体内会发生许多生理生化变化^[21],通过调节体内化学物质的数量和组成,产生诱导化学防御。已有的研究表明,马尾松受害后,体内的营养物质含量下降^[22~24]。用本文所建立的反相高效液相色谱方法成功的测定了轻度虫害 4h 及未受害马尾松苗木针叶中 18 种氨基酸的含量,发现虫害后马尾松苗木针叶中氨基酸总量明显降低,在所检测的 18 种氨

基酸中天门冬氨酸、谷氨酸、组氨酸、精氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和赖氨酸含量下降,其它氨基酸的含量升高。马尾松苗木诱导抗性与氨基酸各组分更进一步的关系,则有待于深入的研究。通过测定马尾松虫害后氨基酸组成及含量的变化,揭示出虫害与马尾松苗木针叶中氨基酸组成及其含量变化的关系,探索了马尾松的抗虫机理,以为害虫防治提供理论依据。

References:

- [1] Wang Y, Li Z Y, Ge F. Lag-change of chemical components in needles of injured pine, *Pinus massoniana*. *Acta Entomologica Sinica*, 2000, 43 (3): 291—296.
- [2] Wang Y, Ge F, Li Z Y. Spatial-tempetial trends of induced chemical change in pine *pinus massoniana*. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21(8): 1256—1261.
- [3] Li Z Y, Wang Y, Chen H S, *et al.* Induced chemical defenses and delayed induced resistance of *Pinus tabulae* formis carr to dendrolimus spectabilis butler. *Scientia Silvae Sinicae*, 2000, 36(1): 66—70.
- [4] Yan S C, Li J G, Wen A T, *et al.* Association between the damage of *Xylotrechus rusticus* (Coleoptera: Cerambycidae) and the compositions and contents of amino acids in different poplar strains. *Acta Entomologica Sinica*, 2006, 49(1): 93—99.
- [5] Cai W Z, Pang X F, Hua B Z, *et al.* General entomology. Beijing: China Agriculture University Publishing House, 2001. 127.
- [6] Wang Y C. Insect biochemistry. Beijing: China Agriculture Publishing House, 2001. 60, 92—96.
- [7] Harvey G T. Nutritional studies of eastern spruce budworm I. soluble sugars. *Can. Entomol*, 1974, 93: 594—602.
- [8] Zhang K H, Chen C P, Liu X P, *et al.* Influences of induced resistance of pine on growth and development of the larvae of pine caterpillar. *Entomological knowledge*, 2002, 39(4): 292—296.
- [9] Wallace W, Secor J, Schrader L E. Rapid accumulation of gamma-aminobutyric acid and alanine in soybean leaves in response to an abrupt transfer to lower temperature, darkness, or mechanical manipulation. *Plant Physiol*, 1984, 75: 170—175.
- [10] Ramputh A I, Bown A W. Rapid gamma-aminobutyric acid synthesis and the inhibition of the growth and development of oblique-banded leaf-roller larvae. *Plant Physiol*, 1996, 111: 1349—1352.
- [11] Yan D, Li G. Direct determination of 14 underivatized amino acids in leech by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2006, 34(5): 705—708.
- [12] Wan S H, Yang H, Geng X M. Determination of amino acids in *Isatis indigotica* fort by reversed phase high performance liquid chromatography with pre-column derivatization. *Chinese Journal of Chromatography*, 2005, 23(4): 408—410.
- [13] Wu G B, Chen F H. Determination of amino acids in food by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization. *Journal of Zhongkai University of Agriculture and Technology*, 2006, 19(3): 26—30.
- [14] Chen F H, Wu G B, Tao J H. Determination of amino acids in shellfish sample with precolumn derivatization. *Food Science*, 2006, 27(7): 188—190.
- [15] Miao H, Yang T, HUO J S, *et al.* Determination of amino acids in food samples by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2000, 28(9): 1091—1095.
- [16] Chen H P, Chen L, Wei Y M, *et al.* Simultaneous determination of amino acids in wheat by reversed phase high performance liquid chromatography with pre-column derivatization. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2005, 12(33): 1689—1692.
- [17] Zhang H M, Zhu H L, Fei X M, *et al.* Simultaneous determination of amino acids in feed by reversed phase high performance liquid chromatography with pre-column derivatization. *Anhui Agri. Sci. Bull.*, 2007, 13(7): 27—29.
- [18] Chen W, Wang G H, LI D, *et al.* Determination of free amino acids in tobacco by reversed phase high performance liquid chromatography. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2002, 24(1): 54—56.
- [19] Feng L, Chen Z Y, Wang B X, *et al.* The determination of free amino acids in tobacco by pre-column derivatization of Rp-HPLC. *Journal of Yunnan University*, 2003, 25: 241—245.
- [20] Liu B D, Wang W, Guan J R, *et al.* Determination of free amino acids in wines by reversed phase liquid chromatography. *Journal of Instrumental Analysis*, 1997, 16(6): 5—7.

- [21] Bristow C M. Host development offers new insight into insect plant interaction. *Trends Ecol Evol*, 1989, 5(4): 123—124.
- [22] Haukioja E. Induction of defenses in trees. *Annual Review of Entomology*, 1990, 36:25—42.
- [23] Karban R, Nihho C. Induced resistance and plant density for a native shrub, *Gossypium thurberi*. *Ecology*, 1993, 74(1): 9—19.
- [24] Leather S R, Watt A F. Insect-induced chemical changes in young lodgepole pine (*Pinus contorta*); the effect of previous defoliation on oviposition, growth and survival of the pine beauty moth, *Panolis flammea*. *Ecological Entomology*, 1987, 12:275—281.

参考文献:

- [1] 王燕,李镇宇,戈峰. 马尾松受害诱导的化学物质滞后变化. *昆虫学报*, 2000, 43(3): 291~296.
- [2] 王燕,戈峰,李镇宇. 马尾松诱导化学物质的时空动态. *生态学报*, 2001, 21(8): 1256~1261.
- [3] 李镇宇,王燕,陈华盛. 油松对赤松毛虫的诱导化学防御及滞后诱导抗性. *林业科学*, 2000, 36(1): 66~70.
- [4] 严善春,李金国,温爱亭,等. 青杨脊虎天牛的危害与杨树氨基酸组成和含量的相关性. *昆虫学报*, 2006, 49(1): 93~99.
- [5] 彩万志,庞雄飞,花保祯,等. 普通昆虫学. 北京:中国农业大学出版社, 2001. 127.
- [6] 王荫长. 昆虫生物化学. 北京:中国农业出版社, 2001. 60, 92~96.
- [8] 章康华,陈春平,刘兴平,等. 马尾松诱导抗性对马尾松毛虫幼虫生长发育的影响. *昆虫知识*, 2002, 39(4): 292~296.
- [11] 鄢丹,李果. 反相高效液相色谱法直接测定水蛭中 14 种未衍生氨基酸的含量. *分析化学研究简报*, 2006, 34(5): 705~708.
- [12] 万绍晖,杨浩,耿秀梅. 柱前衍生化反相高效液相色谱法测定板蓝根中的氨基酸. *色谱*, 2005, 23(4): 408~410.
- [13] 吴光斌,陈发河. 柱前衍生高效液相色谱法测定食品中的氨基酸含量. *仲恺农业技术学院学报*, 2006, 19(3): 26~30.
- [14] 陈发河,吴光斌,陶金华. 柱前衍生高效液相色谱法测定贝类产品中氨基酸含量. *食品科学*, 2006, 27(7): 188~190.
- [15] 苗虹,杨涛,霍君生,等. 柱前衍生高效液相色谱法测定食物中氨基酸含量. *分析化学研究简报*, 2000, 28(9): 1091~1095.
- [16] 陈华萍,陈黎,魏育明,等. 柱前衍生反相高效液相色谱法测定小麦中氨基酸含量. *分析化学研究简报*, 2005, 12(33): 1689~1692.
- [17] 张红梅,朱洪亮,费贤明,等. 柱前衍生反相液相色谱法测定饲料中氨基酸的含量. *安徽农学通报*, 2007, 13(7): 27~29.
- [18] 陈文,王光辉,李丹,等. 反相高效液相色谱法测定烟叶中的游离氨基酸. *氨基酸和生物资源*, 2002, 24(1): 54~56.
- [19] 冯雷,陈章玉,王保兴,等. 柱前衍生反相液相色谱法测定烟草中的游离氨基酸. *云南大学学报(自然科学版)*, 2003, 25(增刊): 241~245.
- [20] 刘保东,王维,关家锐,等. 葡萄酒中游离氨基酸的高效液相色谱法测定. *分析测试学报*, 1997, 16(6): 5~7.