

陈荣珠, 王小平, 高伟城, 等. 柱前衍生-HPLC 法测定五指毛桃中 16 种游离氨基酸含量 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(17): 306-315. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110244

CHEN Rongzhu, WANG Xiaoping, GAO Weicheng, et al. Determination of 16 Free Amino Acids of *Ficus hirta* by Pre-column Derivatization-High Performance Liquid Chromatography[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(17): 306-315. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110244

· 分析检测 ·

柱前衍生-HPLC 法测定五指毛桃中 16 种游离氨基酸含量

陈荣珠, 王小平, 高伟城, 陈育青, 丁其春
(漳州卫生职业学院药学系, 福建漳州 363000)

摘 要:目的: 建立柱前衍生-高效液相色谱法同时测定不同产地、不同叶形五指毛桃 *Ficus hirta* Vahl 根中 16 种氨基酸含量, 评价其质量差异。方法: 采用高效液相色谱法, 以异硫氰酸苯酯进行柱前衍生化, 采用 Ultimate Amino Acid 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以 0.1 mol/L 乙酸钠-乙腈为流动相, 进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 柱温为 40 ℃, 检测波长为 254 nm。结果: 9 个产地 12 份五指毛桃根中 16 种氨基酸线性关系良好, 相关系数均大于 0.9992, 平均加样回收率介于 98.1%~105.9% 之间, RSD 为 0.67%~2.11%, L-天门冬氨酸、L-谷氨酸、L-丝氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-精氨酸、L-苏氨酸、L-丙氨酸、L-脯氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、L-甲硫氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-苯丙氨酸和 L-赖氨酸的平均含量分别为 3.308、3.424、2.750、2.978、1.302、4.549、2.778、3.989、3.818、1.327、3.732、0.395、2.925、4.549、2.873、3.305 mg/g。产地为漳州卫生职业学院的四种叶形五指毛桃根中氨基酸总含量由高到低为, 三指浅裂>七指深裂>五指深裂>全缘; 其余 8 个产地的五指毛桃根中 16 种氨基酸总含量也存在差异, 含量最高的为广西钦州灵山县, 其次为广东河源源城区源南镇, 含量最低的为福建漳州龙海区程溪镇。结论: 该方法能使 16 种氨基酸很好地进行分离, 可靠准确, 且加样回收率较高, 可作为五指毛桃根中氨基酸含量的测定方法, 并可以用氨基酸含量来评价五指毛桃质量。

关键词:五指毛桃, 氨基酸, 柱前衍生化, 异硫氰酸苯酯, 高效液相色谱法

中图分类号: R282.5; R282.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2022)17-0306-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110244



本文网刊:

Determination of 16 Free Amino Acids of *Ficus hirta* by Pre-column Derivatization-High Performance Liquid Chromatography

CHEN Rongzhu, WANG Xiaoping, GAO Weicheng, CHEN Yuqing, DING Qichun

(Department of Pharmacy, Zhangzhou Health Vocational College, Zhangzhou 363000, China)

Abstract: Objects: To evaluate the quality of the root of *Ficus hirta* Vahl, a pre-column derivation-high performance liquid chromatography (HPLC) method was established for the determination of 16 kinds of amino acids in the root of *Ficus hirta* from different origins and leaf shapes. Methods: The contents of 16 kinds of amino acids in *Ficus hirta* were determined by HPLC with phenyl isothiocyanate pre-column derivatization method. The separation was achieved using an ultimate amino acid column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) under the gradient elution with the mobile phases composed of 0.1 mol/L sodium acetate buffer and acetonitrile at the flow rate of 1.0 mL/min, column temperature of 40 ℃ and UV detector wavelength at 254 nm. Results: The contents of 16 kinds of amino acids had a good linear relationship, and the correlation coefficients was more than 0.9992, while the average recovery rates (n=6) were 98.1%~105.9% and RSD were 0.67%~2.11%. The average contents of L-asparaginic acid, L-glutamic acid, L-serine, glycine, L-histidine, L-arginine, L-threonine, L-alanine, L-proline, L-tyrosine, L-valine, L-methionine, L-isoleucine, L-leucine, L-phenylalanine, L-lysine were respectively 3.308,

收稿日期: 2021-11-21

基金项目: 漳州市自然科学基金 (ZZ2021J16); 福建省中青年教育科研项目 (科技类) (JAT210865); 漳州市科技特派员项目 (20210187); 漳州卫生职业学院高学历人才专项 (ZZWYGXL01); 漳州卫生职业学院科技创新团队 (Kjcx-5)。

作者简介: 陈荣珠 (1986-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 中药资源与药用植物生物技术, E-mail: 349074689@qq.com。

3.424, 2.750, 2.978, 1.302, 4.549, 2.778, 3.989, 3.818, 1.327, 3.732, 0.395, 2.925, 4.549, 2.873, 3.305 mg/g. There were differences in the content of total amino acid in *Ficus hirta* from different leaf shapes. Compared with leaf shapes, the three-finger shape had the highest total amino acid, followed by seven-finger shape, and then five-finger shape, and the last was undivided. The content of total amino acid in *Ficus hirta* from different producing areas were also different. The highest content was in Lingshan county of Qinzhou city of Guangxi province, followed by Yuannan town of Heyuan city of Guangdong province, and the lowest content was in Chengxi town of Longhai district of Zhangzhou city of Fujian province. Conclusion: 16 kinds of amino acids were separated by this method, which was reliable, accurate and had high recovery rate. It could be used for the determination of amino acids in *Ficus hirta*, and the content of amino acids could be used to evaluate the quality of *Ficus hirta*.

Key words: *Ficus hirta*; amino acid; pre-column derivatization; phenyl isothiocyanate; high performance liquid chromatography

五指毛桃始载于岭南地区的民间药书《生草药性备要》,为桑科植物粗叶榕 *Ficus hirta* Vahl 的干燥根,有五爪龙、五指牛奶、南芪等别称,在《中药志》、《全国中草药汇编》、《中华本草》等大型辞书中均有简述^[1-2],收录于《广西壮族自治区瑶药材质量标准(第一卷)》(2013 年版)、《广东省中药材标准》(2004 年版)、《湖南省中药材标准》(2009 年版)^[3-5]。五指毛桃主要分布于我国的广东、福建、云南、贵州、广西等地。五指毛桃既是中草药,也是食用佳品,近年来,其研究主要集中在化学成分的测定和生理活性评价等方面^[6-10],其化学成分主要有黄酮类、苯丙素类、甾体类、萜类、酚类和挥发油类等。经研究发现,五指毛桃中的活性物质具有抗炎、抗氧化、提高免疫及保肝等作用^[11-12]。药理活性表现为调节免疫系统、改善呼吸和胃肠道功能,对药物、拘束应激性及酒精性肝损伤具有保护作用,且能抗衰老、抗氧化、抑菌及抗辐射等^[13-19]。

氨基酸既是药用植物中的一种生物活性物质,也是蛋白质的水解产物,在人体中发挥着重要的作用,参与人体生长、代谢、免疫及抗氧化,还是食品质量及营养价值的重要评价指标^[20-27]。氨基酸与人体生命活动息息相关,游离氨基酸可直接被人体吸收,可形成维生素 E、叶酸等营养素^[28]。游离氨基酸的种类和含量的变化会对中药材或食物的品质、营养价值及香气物质造成一定的影响^[29-32]。不同氨基酸具有不同的生理功能,丙氨酸能提高免疫系统,防治血管疾病;谷氨酸参与红细胞的生成,也能治疗神经衰弱和记忆力减退;脯氨酸参与血红蛋白的合成;精氨酸能促进胰岛素的生成与分泌,促进创口愈合;赖氨酸与人体代谢平衡和儿童智力发育等均有关^[33-34]。

我国中药材研究历史悠久,随着其化学成分及活性物质研究的深入,中药材的品质评价体系日趋完善,常见中药材中氨基酸含量和组分测定也陆续完成,如重楼、桑叶、天花粉、三七、天麻等多种中药材中的氨基酸含量已完成了测定^[35-39],然而关于五指毛桃中游离氨基酸的研究未见报道。氨基酸的分析方法主要有氨基酸自动分析仪、毛细管电泳法、高效液相色谱法和气相色谱法等^[40],其中,柱前衍生高效液

相色谱法检测简便、准确高效,最为常用,以上中药材中氨基酸含量的测定就是用此方法进行的。本研究拟采用异硫氰酸苯酯柱前衍生高效液相色谱法(PITC-HPLC)测定不同叶形、不同产地五指毛桃根中 L-天门冬氨酸、L-谷氨酸、L-丝氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-精氨酸、L-苏氨酸、L-丙氨酸、L-脯氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、L-甲硫氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-苯丙氨酸、L-赖氨酸等 16 种游离氨基酸的含量,以期对五指毛桃品种选育、开发利用及质量评价提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

12 份五指毛桃取自不同产地,植株经漳州卫生职业学院陈育青副教授鉴定为桑科植物粗叶榕,采集详细信息见表 1。

16 种氨基酸混合标准品: L-天门冬氨酸(L-Asp)、L-谷氨酸(L-Glu)、L-丝氨酸(L-Ser)、甘氨酸(Gly)、L-组氨酸(L-His)、L-精氨酸(L-Arg)、L-苏氨酸(L-Thr)、L-丙氨酸(L-Ala)、L-脯氨酸(L-Pro)、L-酪氨酸(L-Tyr)、L-缬氨酸(L-Val)、L-甲硫氨酸(L-Met)、L-异亮氨酸(Ile)、L-亮氨酸(L-Leu)、L-苯丙氨酸(L-Phe)、L-赖氨酸(L-Lys) Sigma 公司,批号为 SLCF7767,浓度为 2.5 $\mu\text{mol/mL}$; 乙腈 色谱纯, Fisher 公司; 异硫氰酸苯酯(PITC) 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 三乙胺、正己烷、无水醋酸钠、冰乙酸、无水乙醇、盐酸(优级纯) 西陇科学股份有限公司; 水为超纯水; 以上试剂无特殊说明均为分析纯。

Agilent 1260 型高效液相色谱仪、Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 美国 Agilent 公司; Ultimate Amino Acid 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 月旭科技(上海)股份有限公司; PE20K 型 pH 计 梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司; 101A-3B 电热鼓风干燥箱 上海实验仪器厂有限公司; PX224ZH/E 型电子天平 奥豪斯仪器(常州)有限公司; TG16-WS 台式高速离心机 湖南湘仪离心机有限公司; KQ-250 DE 型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; HWS-28 型电热恒温水浴锅 常州市江南实验仪器厂; XL-04B 密封型摇摆式粉碎机 广州市旭朗机械设备有限公司。

表 1 样品信息

Table 1 The information of samples

编号	叶形	采样地点	经度(E)	纬度(N)	海拔(m)
1	全缘	漳州卫生职业学院药用植物园	117°37'48.00"	24°31'49"	48
2	三指浅裂	漳州卫生职业学院药用植物园	117°37'48.00"	24°31'49"	48
3	五指深裂	漳州卫生职业学院药用植物园	117°37'48.00"	24°31'49"	48
4	七指深裂	漳州卫生职业学院药用植物园	117°37'48.00"	24°31'49"	48
5	五指浅裂	福建漳州平和县	117°13'25.58"	24°8'22.56"	389
6	五指浅裂	福建漳州龙文区	117°43'39.97"	24°30'48.25"	196
7	五指浅裂	福建漳州南靖县	117°13'54.54"	24°48'55.40"	603
8	七指深裂	福建漳州长泰区岩溪林场	117°45'56.53"	24°46'25.44"	371
9	七指深裂	福建漳州龙海区双弟华侨农场	117°45'42.11"	24°24'2.33"	485
10	七指深裂	福建漳州龙海区程溪镇	117°39'51.47"	24°20'46.46"	307
11	五指浅裂	广西钦州灵山县	109°06'35.28"	22°06'27.11"	117
12	五指浅裂	广东河源源城区源南镇	114°37'52.49"	23°42'56.98"	361

1.2 实验方法

1.2.1 供试品溶液的制备 五指毛桃溶液制备^[29,36,40]的操作步骤如下。将五指毛桃根洗净后阴干,再用 60 ℃ 烘箱烘干,然后将样品粉碎后过 60 目筛;精密称取粉末 0.10 g 置于真空接口蛋白质水解管中,加入 10 mL 6 mol/L 盐酸溶液,充氮气;置于 120 ℃ 油浴锅中水解 12 h,放冷过滤,移入蒸发皿中,置于水浴锅上蒸干,残渣加入 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解并转移到 2 mL 容量瓶中,加 0.1 mol/L 盐酸溶液至刻度,摇匀;最后,将溶液全部转移到离心管中,10000 r/min,离心 15 min,取上清液置于 4 ℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 柱前衍生化 准确吸取氨基酸混合对照品溶液(2.5 μmol/mL)及供试品溶液各 200 μL,分别加入 0.1 mol/L 异硫氰酸苯酯(PITC)乙腈溶液(取 PITC 0.12 mL,用乙腈定容至 10 mL)和 1 mol/L 三乙胺乙腈溶液(取三乙胺 1.35 mL,加乙腈定容至 10 mL)各 100 μL,混匀,置于室温中反应 1 h,然后加入正己烷 400 μL 萃取,振荡 10 s,放置 10 min,重复 3 次,取下层溶液 200 μL,用超纯水定容至 1.4 mL 后用微孔滤膜(0.45 μm)过滤,取续滤液即得。

1.2.3 色谱条件 本试验使用 Agilent 1260 型高效液相色谱仪和 Ultimate Amino Acid 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);色谱柱柱温为 40 ℃;检测波长为 254 nm;进样量 20 μL;流速为 1.0 mL/min;流动相 A:以 0.1 mol/L 的醋酸钠(pH6.50, A)和无水乙腈(B)作为流动相进行梯度洗脱(0~4 min, 95%A; 4.01~31 min, 95%A→67%A; 31.01~40 min, 67%A→65%A; 40.01~45 min, 65%A→10%A; 45.01~53 min, 10%A; 53.01~55 min, 10%A→95%A; 55.01~67 min, 95%A)^[41]。五指毛桃根中 16 种氨基酸含量的测定采用外标法(标准曲线法)计算。

1.3 数据处理

本文表中数据表示形式为平均值±标准差;用 SPSS 26.0 进行数据整理和分析,并采用单因素方差分析法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 供试品溶液提取方法的考察

考虑到试验的安全性及提取效率,结合参考文献[29],本试验考察了样品在 120 ℃ 下用 6 mol/L 盐酸分别水解 10、12、16 h 后各种氨基酸含量及 16 种氨基酸总含量存在显著差异($P<0.05$)。结果如表 2 所示,水解 10 h 时 L-天门冬氨酸、L-谷氨酸、L-丝氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-精氨酸、L-苏氨酸、L-丙氨酸、L-脯氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、L-甲硫氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-苯丙氨酸、L-赖氨酸含量和 L-总氨基酸含量显著低于水解 12 和 16 h($P<0.05$),其原因可能是水解 10 h 不能充分将药材中的氨基酸全部水解,而水解 12 和 16 h 后各种氨基酸含量及氨

表 2 广东河源源城区源南镇五指毛桃不同油浴时间 16 种氨基酸含量测定结果(mg/g, n=3)

Table 2 The content of 16 kinds of amino acids in *Ficus hirta* from Yuannan town, Heyuan, Guangdong Province (mg/g, n=3)

氨基酸含量(mg/g)	油浴时间(h)		
	10	12	16
L-天门冬氨酸	2.01±0.05 ^b	2.88±0.20 ^a	2.81±0.12 ^a
L-谷氨酸	2.71±0.70 ^b	3.45±1.52 ^a	3.41±0.15 ^a
L-丝氨酸	2.05±0.09 ^b	3.04±0.66 ^a	3.05±0.23 ^a
甘氨酸	2.76±0.17 ^b	3.78±0.69 ^a	3.79±0.73 ^a
L-组氨酸	0.98±0.32 ^b	1.92±0.21 ^a	2.05±0.31 ^a
L-精氨酸	6.01±1.01 ^b	8.15±1.45 ^a	8.03±1.56 ^a
L-苏氨酸	2.12±0.89 ^b	3.32±0.08 ^a	3.42±0.88 ^a
L-丙氨酸	3.97±0.91 ^b	5.07±1.12 ^a	5.01±1.20 ^a
L-脯氨酸	3.81±0.59 ^b	4.60±0.14 ^a	4.68±0.45 ^a
L-酪氨酸	0.57±0.07 ^b	1.33±0.15 ^a	1.37±0.53 ^a
L-缬氨酸	3.54±1.13 ^b	4.73±1.04 ^a	4.84±1.41 ^a
L-甲硫氨酸	0.12±0.04 ^b	0.37±0.31 ^a	0.40±0.10 ^a
L-异亮氨酸	2.19±0.61 ^b	3.66±1.03 ^a	3.63±0.86 ^a
L-亮氨酸	3.17±1.84 ^b	5.55±1.92 ^a	5.65±1.09 ^a
L-苯丙氨酸	2.01±0.43 ^b	3.56±0.90 ^a	3.47±0.65 ^a
L-赖氨酸	3.08±0.99 ^b	4.04±0.33 ^a	3.90±0.12 ^a
L-总氨基酸	41.90 ^b	59.44 ^a	59.51 ^a

注:同行不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),表5、表6同。

氨基酸总含量无显著性差异($P>0.05$)。为保证水解完全并提高效率,最终确定样品水解条件为 6 mol/L 盐酸、120 °C 下水解 12 h。

2.2 色谱柱的选择

本试验考察了 Ultimate Amino Acid 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)在相同流动相下的分离效果。结果如图 1 所示,氨基酸对照品用 Ultimate Amino Acid 色谱柱分离效果良好。因此,本试验选用 Ultimate Amino Acid 色谱柱进行后续试验。

2.3 流动相体系的选择

本试验在流动相体系的选择上,考察了等度洗脱和梯度洗脱这两种流动相体系下氨基酸的分离情况。结果表明,等度洗脱无法将氨基酸混合对照品进行有效分离(图 2),改用梯度洗脱的方式后 16 种氨基酸对照品能有效分离,梯度洗脱参照李松涛等^[36]对桑叶中氨基酸含量测定所用的流动相体系,略作更改,结果发现,在此流动相体系下,16 种氨基酸能有效分离,满足实验要求。在前述优化的色谱条件下对标准品和样品进行测定,16 种氨基酸混合标准品及五指毛桃根提取液的液相色谱图见图 3。

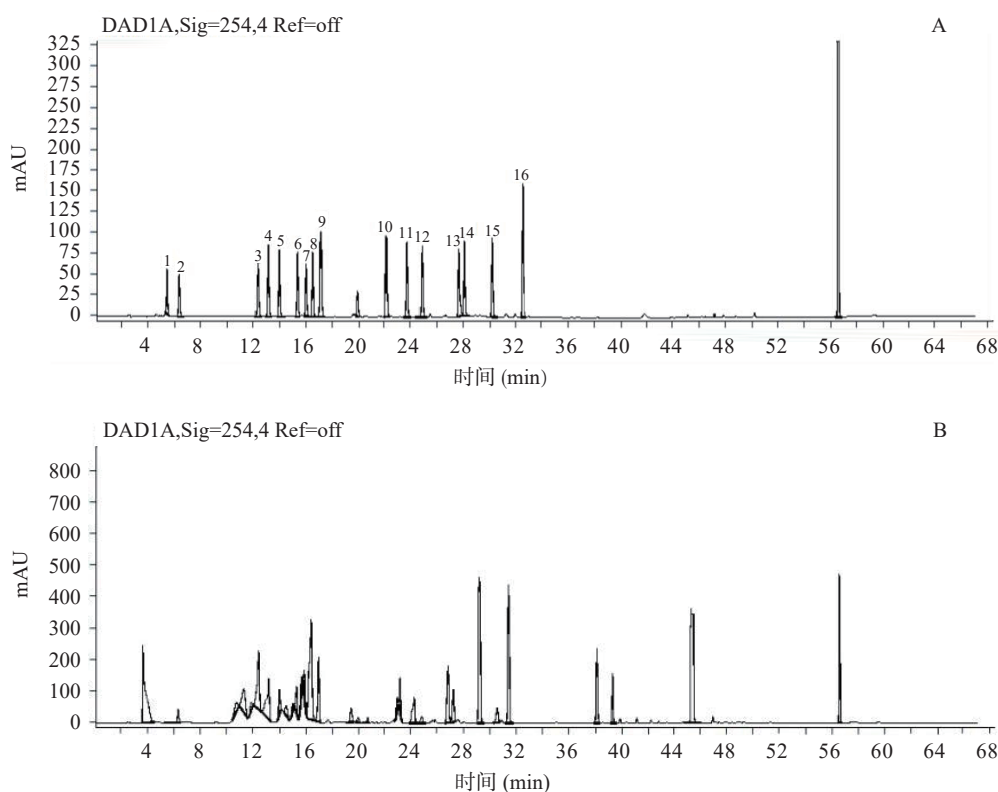


图 1 16 种混合氨基酸标准品在 Ultimate Amino Acid 柱(A)和 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(B)中的液相色谱图

Fig.1 The chromatogram of 16 amino acids on Ultimate Amino Acid (A) and Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (B) columns

注: 1. L-天门冬氨酸(L-Asp); 2. L-谷氨酸(L-Glu); 3. L-丝氨酸(L-Ser); 4. 甘氨酸(Gly); 5. L-组氨酸(L-His); 6. L-精氨酸(L-Arg); 7. L-苏氨酸(L-Thr); 8. L-丙氨酸(L-Ala); 9. L-脯氨酸(L-Pro); 10. L-酪氨酸(L-Tyr); 11. L-缬氨酸(L-Val); 12. L-甲硫氨酸(L-Met); 13. L-异亮氨酸(L-Ile); 14. L-亮氨酸(L-Leu); 15. L-苯丙氨酸(L-Phe); 16. L-赖氨酸(L-Lys); 图 3 同。

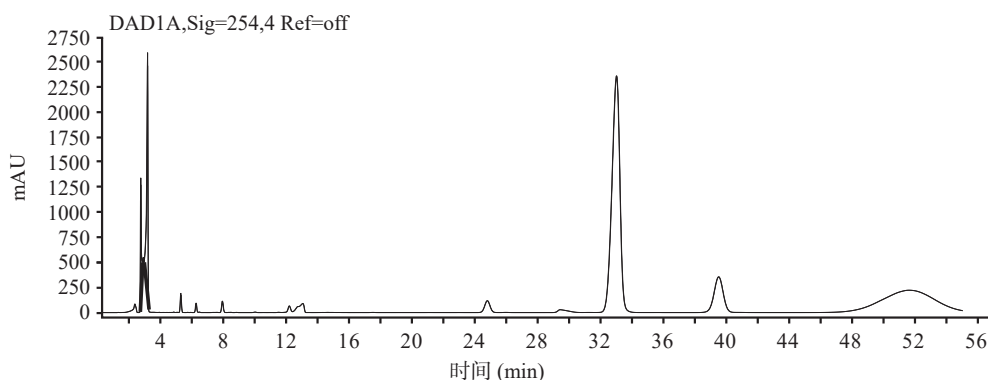


图 2 等度洗脱色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of isometric elution

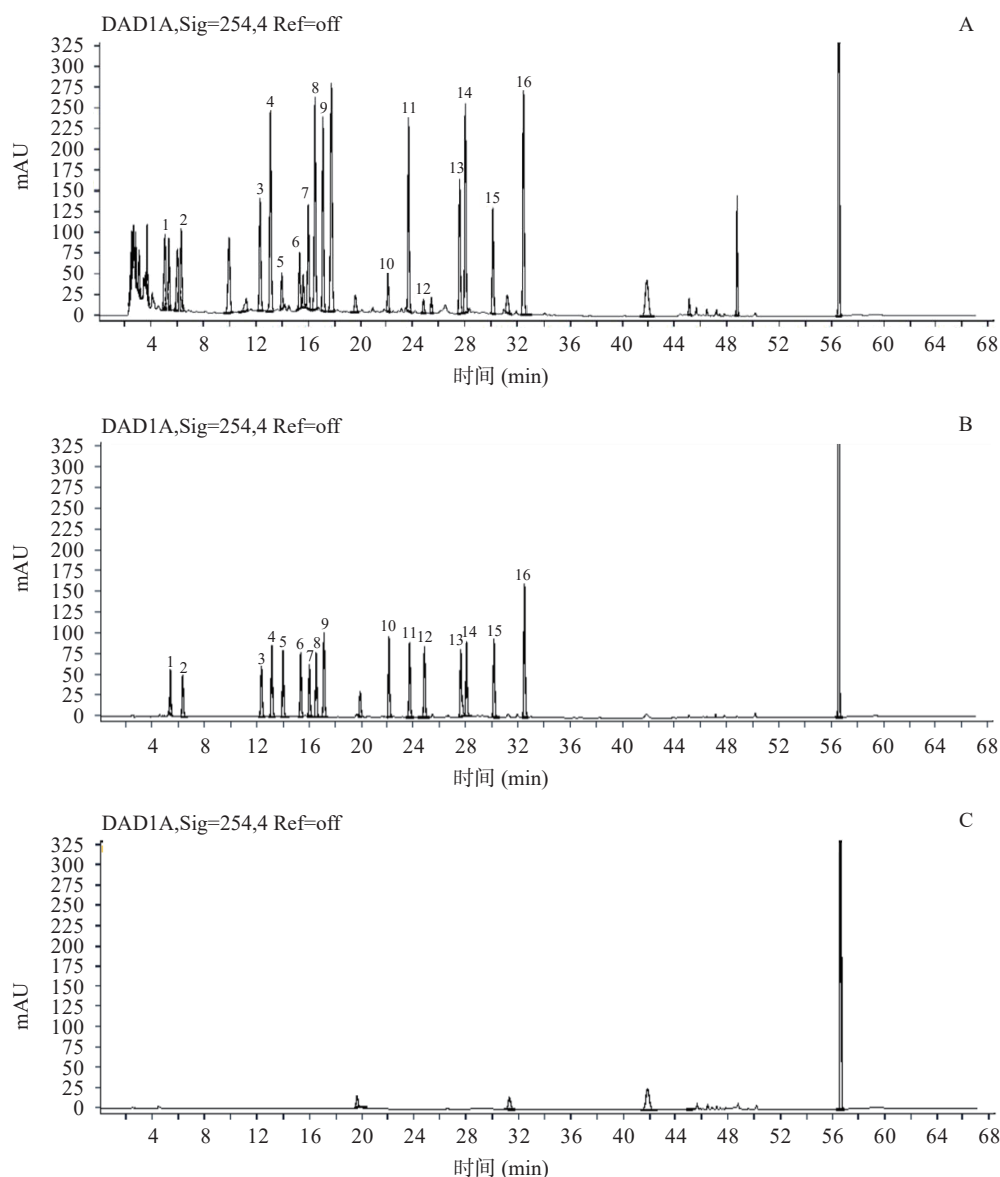


图3 供试品溶液(A)、混合对照品溶液(B)、空白溶液(C)色谱图

Fig.3 HPLC chromatograms of derivatized solution of sample (A), mixed reference standard solution (B), and blank solution (C)

2.4 线性关系、检出限及定量限测定结果

精密移取氨基酸混合对照品溶液 0.25、0.50、1.00、2.00、5.00 mL, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 用 0.1 mol/L 的盐酸稀释至刻度, 摇匀, 并按“1.2.2”方法进行衍生化, 依据本实验的色谱条件测定峰面积。以氨基酸对照品峰面积(Y)对进样量(X, μg)绘制标准曲线, 计算回归方程。采用 0.1 mol/L 盐酸溶液不断稀释处理氨基酸对照品溶液, 与空白溶剂进样, 进样量为 20 μL , 依信噪比法初步预估检出限和定量限, 其中, 以信噪比为 3:1 时确定检出限, 以信噪比为 10:1 时确定定量限。结果如表 3 所示, L-天门冬氨酸、L-谷氨酸、L-丝氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-精氨酸、L-苏氨酸、L-丙氨酸、L-脯氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、L-甲硫氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-苯丙氨酸、L-赖氨酸分别在 0.381~5.950、0.421~7.692、0.301~5.969、0.215~7.633、0.444~6.008、0.498~6.714、0.341~5.936、0.255~3.8717、0.329~4.520、0.518~6.681、

0.335~6.130、0.427~4.254、0.375~4.932、0.375~6.744、0.472~4.544、0.418~5.171 μg 范围内均有良好的线性关系, 相关系数均大于 0.9992, 检出限为 0.364~1.052 ng/mL, 定量限为 1.394~4.207 ng/mL, 表明仪器灵敏度高, 较低质量浓度的氨基酸即可被检测。

2.5 精密性、重复性、稳定性及加样回收率测定结果

2.5.1 精密性测定结果 精密吸取氨基酸混合对照品溶液(2.5 $\mu\text{mol/mL}$), 按“1.2.3”项色谱条件下连续进样 6 次, 测定各种氨基酸的峰面积并计算其 RSD, 结果测得 L-天门冬氨酸、L-谷氨酸、L-丝氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-精氨酸、L-苏氨酸、L-丙氨酸、L-脯氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、L-甲硫氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-苯丙氨酸和 L-赖氨酸峰面积的 RSD 分别为 1.08%、1.85%、1.16%、0.87%、2.20%、1.91%、0.37%、1.18%、1.15%、0.68%、0.54%、0.37%、1.09%、1.20%、0.61%、1.06%, 说明该仪器精密性良好。

表 3 16 种氨基酸的标准曲线、相关系数、检出限和定量限
Table 3 The regression equations, correlation coefficients, limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) for 16 kinds of amino acids

氨基酸	回归方程	相关系数	线性范围(μg)	检出限(ng/mL)	定量限(ng/mL)
L-天门冬氨酸	Y=1004.2X-19.796	0.9997	0.381~5.950	0.952	3.807
L-谷氨酸	Y=910.06X+1.1696	0.9999	0.421~7.692	1.052	4.207
L-丝氨酸	Y=1698.7X-0.0103	0.9994	0.301~5.969	0.751	3.006
甘氨酸	Y=5895.8X-0.0143	0.9998	0.215~7.633	0.390	1.431
L-组氨酸	Y=1349.5X-62.307	0.9999	0.444~6.008	0.807	2.959
L-精氨酸	Y=1132.2X-22.964	0.9997	0.498~6.714	0.906	3.321
L-苏氨酸	Y=1519.7X-71.926	0.9996	0.341~5.936	0.852	2.839
L-丙氨酸	Y=4155.7X-228.49	0.9992	0.255~3.8717	0.463	2.123
L-脯氨酸	Y=2098.8X+67.506	0.9997	0.329~4.520	0.470	2.195
L-酪氨酸	Y=1331.8X+113.45	0.9992	0.518~6.681	0.740	3.455
L-缬氨酸	Y=2906.1X-0.1321	0.9998	0.335~6.130	0.478	2.235
L-甲硫氨酸	Y=1457.6X+55.718	0.9994	0.427~4.254	0.610	2.845
L-异亮氨酸	Y=1800.9X+48.448	0.9996	0.375~4.932	0.536	2.502
L-亮氨酸	Y=2749.4X-95.749	0.9998	0.375~6.744	0.536	2.502
L-苯丙氨酸	Y=1494.3X-38.583	0.9997	0.472~4.544	0.675	3.150
L-赖氨酸	Y=3260.7X-377.4	0.9999	0.418~5.171	0.364	1.394

2.5.2 重复性测定结果 精密称取 6 份广东河源源城区源南镇的五指毛桃粉末, 每份 0.10 g, 按“1.2.1”和“1.2.2”项下方法制备溶液并进行衍生化, 按上述“1.2.3”项下色谱条件测定含量, 结果发现, L-天门冬氨酸、L-谷氨酸、L-丝氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-精氨酸、L-苏氨酸、L-丙氨酸、L-脯氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、L-甲硫氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-苯丙氨酸和 L-赖氨酸的平均含量分别为 2.91、3.41、3.07、3.75、1.88、8.21、3.30、5.01、4.69、1.23、4.81、0.35、3.71、5.51、3.61、4.02 mg/g, RSD 分别为 1.91%、1.63%、2.01%、1.47%、1.29%、1.85%、1.71%、0.59%、1.88%、0.93%、1.72%、1.39%、1.31%、1.65%、1.50%、0.67%, 说明该方法重复性好。

2.5.3 稳定性试验 精密称取 6 份广东河源源城区源南镇的五指毛桃粉末, 每份 0.10 g, 分别按“1.2.1”和“1.2.2”项下方法制备溶液并进行衍生化, 按“1.2.3”项下色谱条件, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 记录峰面积, 计算 RSD。结果发现, L-天门冬氨酸、L-谷氨酸、L-丝氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-精氨酸、L-苏氨酸、L-丙氨酸、L-脯氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、L-甲硫氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-苯丙氨酸和 L-赖氨酸等 16 种氨基酸峰面积的 RSD 分别为 1.33%、1.17%、0.64%、1.37%、0.89%、1.49%、0.51%、1.20%、1.94%、0.59%、1.01%、1.18%、0.30%、1.76%、1.41%、2.27%, 表明供试品溶液在室温条件下 24 h 内, 稳定性良好。

2.5.4 加样回收率测定结果 精密称取 6 份福建漳州龙文区五指毛桃粉末, 每份约 0.05 g, 精密加入与样品中待测成分含量相当的氨基酸混合对照品溶液, 分别按“1.2.1”和“1.2.2”项下的方法制备供试品溶液并进行衍生化, 按“1.2.3”项下色谱条件进样测定, 记

录峰面积, 计算回收率。由表 4 可知, 16 种氨基酸的平均加样回收率为 98.1%~105.9%, RSD 为 0.67%~2.11%, 说明该方法准确度高。

表 4 加样回收试验结果(n=6)
Table 4 The results of recovery test (n=6)

氨基酸组分	样品中量 (mg)	对照品加入量 (mg)	测定量 (mg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
L-天门冬氨酸	1.09	1.06	2.13	98.1	0.67
L-谷氨酸	1.40	1.42	2.83	100.7	2.03
L-丝氨酸	1.27	1.30	2.55	98.5	1.54
甘氨酸	1.25	1.28	2.51	98.4	2.11
L-组氨酸	0.54	0.52	1.07	101.9	1.59
L-精氨酸	0.83	0.86	1.69	98.8	1.73
L-苏氨酸	1.26	1.28	2.55	100.8	0.36
L-丙氨酸	1.61	1.62	3.21	98.8	1.89
L-脯氨酸	1.44	1.41	2.84	99.3	0.71
L-酪氨酸	0.47	0.50	0.96	98.0	0.43
L-缬氨酸	1.64	1.66	3.31	100.6	1.83
L-甲硫氨酸	0.17	0.17	0.35	105.9	1.90
L-异亮氨酸	1.24	1.21	2.44	99.2	2.07
L-亮氨酸	1.92	1.93	3.83	99.0	1.60
L-苯丙氨酸	1.21	1.18	2.37	98.3	1.78
L-赖氨酸	1.36	1.34	2.71	100.7	1.46

2.6 样品测定结果

精密称取 12 份五指毛桃粉末各 0.10 g, 按“1.2.1”项中的方法制备溶液, 并按“1.2.2”项下方法进行衍生化, 然后按“1.2.3”项下色谱条件进样测定, 将测得的峰面积代入回归方程, 分别计算 16 种氨基酸的含量, 如表 5、表 6 所示。从表 5 中的结果可知, 9 个产地 12 份样品均检测到 16 种氨基酸, 总含量范围为 33.32~72.94 mg/g。16 种氨基酸中 L-精氨酸和 L-亮氨酸平均含量最高(4.549 mg/g), 其次是 L-丙氨酸、

表5 不同叶形五指毛桃根中氨基酸的含量(mg/g, n=3)

Table 5 The content of amino acids in *Ficus hirta* from different leaf shapes (mg/g, n=3)

氨基酸成分	样品编号				平均值
	1	2	3	4	
L-天门冬氨酸 [#]	2.20±0.39 ^b	4.16±0.17 ^a	1.32±0.09 ^c	4.15±0.01 ^a	3.308
L-谷氨酸 [#]	2.81±0.04 ^b	5.27±0.32 ^a	5.63±0.44 ^a	5.18±0.19 ^a	3.424
L-丝氨酸	2.73±0.36 ^b	3.56±0.12 ^a	2.65±0.07 ^b	2.50±0.29 ^{bc}	2.750
甘氨酸 [#]	2.77±0.51 ^{bc}	3.67±0.73 ^a	3.12±1.26 ^b	2.99±0.60 ^b	2.987
L-组氨酸	1.12±0.20 ^c	1.84±0.23 ^a	1.25±0.42 ^{bc}	1.26±0.06 ^{bc}	1.302
L-精氨酸 [#]	3.01±1.09 ^b	5.47±2.13 ^a	5.53±0.13 ^a	5.28±0.77 ^a	4.549
L-苏氨酸 [*]	2.66±0.94 ^b	3.39±2.12 ^a	2.72±0.58 ^b	2.77±0.20 ^b	2.778
L-丙氨酸	3.72±1.13 ^c	5.02±1.85 ^a	4.32±0.49 ^b	3.89±0.41 ^c	3.989
L-脯氨酸	3.47±0.57 ^b	4.94±1.62 ^a	3.68±0.23 ^b	3.57±0.21 ^b	3.818
L-酪氨酸 [#]	1.58±0.48 ^b	2.10±0.41 ^a	1.72±0.18 ^b	1.49±0.16 ^b	1.327
L-缬氨酸 [*]	3.23±0.24 ^b	4.34±1.75 ^a	3.54±0.53 ^b	3.77±0.80 ^b	3.732
L-甲硫氨酸 ^{**}	0.46±0.18 ^a	0.52±0.06 ^a	0.49±0.10 ^a	0.47±0.07 ^a	0.395
L-异亮氨酸 [*]	2.69±0.54 ^b	3.47±1.19 ^a	2.96±0.15 ^b	2.98±0.12 ^b	2.925
L-亮氨酸 ^{**}	4.40±0.71 ^b	5.67±0.51 ^a	4.75±0.20 ^b	4.83±0.35 ^b	4.549
L-苯丙氨酸 ^{**}	2.80±0.31 ^b	3.56±0.38 ^a	3.01±0.57 ^b	2.93±0.31 ^b	2.873
L-赖氨酸 ^{**}	2.97±0.51 ^b	4.33±0.40 ^a	3.26±0.10 ^b	3.27±0.43 ^b	3.305
总氨基酸(TFAA)	42.63 ^c	61.32 ^a	49.94 ^b	51.33 ^b	
必需氨基酸(EAA)	19.21 ^b	25.30 ^a	20.73 ^b	21.02 ^b	
非必需氨基酸(NEAA)	23.42 ^c	36.02 ^a	29.21 ^b	30.31 ^b	
药用氨基酸	23.01 ^c	34.76 ^a	28.83 ^b	30.60 ^b	
EAA/TFAA(%)	45.06	41.25	41.52	40.94	
EAA/NEAA(%)	82.02	70.24	70.97	69.35	
药用氨基酸/TFAA(%)	53.96	56.69	57.72	59.61	

注: *表示人体必需氨基酸; #表示药用氨基酸; 表6同。

表6 不同产地五指毛桃根中氨基酸的含量(mg/g, n=3)

Table 6 The content of amino acids in *Ficus hirta* from different area (mg/g, n=3)

氨基酸成分	样品编号								平均值
	5	6	7	8	9	10	11	12	
L-天门冬氨酸 [#]	5.14±0.20 ^a	2.18±0.25 ^c	2.59±0.56 ^d	4.57±0.16 ^b	2.92±0.36 ^d	4.15±0.38 ^b	3.43±0.15 ^c	2.88±0.13 ^d	3.308
L-谷氨酸 [#]	2.99±0.04 ^{bc}	2.79±0.16 ^c	2.21±0.47 ^{cd}	1.89±0.67 ^d	2.59±0.79 ^c	2.22±0.39 ^{cd}	4.07±0.19 ^a	3.45±0.11 ^b	3.424
L-丝氨酸	2.06±0.23 ^c	2.58±0.32 ^{bc}	2.83±0.21 ^b	2.18±1.41 ^c	3.08±0.19 ^b	2.12±0.28 ^c	3.67±0.04 ^a	3.04±0.46 ^b	2.750
甘氨酸 [#]	2.18±0.68 ^d	2.53±0.41 ^d	3.19±0.47 ^c	2.07±0.70 ^d	3.00±0.33 ^c	1.93±0.05 ^d	4.50±0.48 ^a	3.78±0.81 ^b	2.987
L-组氨酸	1.11±0.55 ^c	1.11±0.06 ^c	0.93±0.61 ^c	1.61±0.79 ^b	1.17±0.21 ^c	1.41±0.37 ^b	0.89±0.45 ^c	1.92±0.32 ^a	1.302
L-精氨酸 [#]	2.68±0.34 ^d	1.77±0.12 ^c	4.26±0.34 ^c	1.79±0.23 ^c	2.51±0.13 ^d	1.75±0.30 ^f	12.39±0.26 ^a	8.15±0.51 ^b	4.549
L-苏氨酸 [*]	2.00±0.61 ^c	2.48±0.29 ^b	3.14±0.51 ^b	2.17±0.16 ^c	3.04±0.43 ^b	2.03±0.29 ^c	3.62±0.44 ^a	3.32±0.16 ^a	2.778
L-丙氨酸	3.18±0.14 ^d	3.31±0.27 ^d	3.74±0.33 ^c	2.86±0.37 ^d	4.16±0.52 ^c	2.72±0.47 ^d	5.88±0.15 ^a	5.07±0.10 ^b	3.989
L-脯氨酸	3.11±0.37 ^{cd}	2.93±0.10 ^d	3.87±0.26 ^c	2.64±0.36 ^d	3.81±0.58 ^c	2.39±0.94 ^d	6.81±0.18 ^a	4.60±0.44 ^b	3.818
L-酪氨酸 [#]	0.73±0.07 ^c	0.94±0.18 ^c	1.38±0.35 ^b	0.77±0.49 ^c	1.27±0.30 ^b	0.77±0.01 ^c	1.84±0.05 ^a	1.33±0.27 ^b	1.327
L-缬氨酸 [*]	2.82±0.27 ^d	3.23±0.39 ^{cd}	4.01±0.51 ^c	2.82±0.06 ^d	4.04±0.17 ^c	2.58±0.15 ^d	5.67±2.43 ^a	4.73±0.31 ^b	3.732
L-甲硫氨酸 ^{**}	0.30±0.09 ^b	0.31±0.07 ^b	0.46±0.02 ^a	0.20±0.04 ^c	0.35±0.06 ^b	0.24±0.07 ^c	0.57±0.04 ^a	0.37±0.02 ^b	0.395
L-异亮氨酸 [*]	2.19±0.21 ^d	2.47±0.23 ^d	3.16±0.11 ^{bc}	2.08±0.27 ^d	3.06±0.18 ^{bc}	1.99±0.09 ^d	4.40±1.13 ^a	3.66±0.14 ^b	2.925
L-亮氨酸 ^{**}	3.37±0.65 ^d	3.78±0.36 ^d	4.91±0.24 ^c	3.18±0.10 ^d	4.68±0.11 ^c	3.06±0.22 ^d	6.41±2.52 ^a	5.55±0.27 ^b	4.549
L-苯丙氨酸 ^{**}	2.11±0.17 ^c	2.41±0.12 ^c	3.23±0.14 ^b	2.01±0.06 ^c	2.97±0.38 ^b	1.90±0.46 ^c	3.97±0.19 ^a	3.56±0.19 ^a	2.873
L-赖氨酸 ^{**}	2.38±0.18 ^c	2.63±0.49 ^c	3.71±0.29 ^b	2.50±0.61 ^c	3.68±0.55 ^b	2.06±0.07 ^{de}	4.83±0.08 ^a	4.04±0.28 ^b	3.305
总氨基酸(TFAA)	38.35 ^d	37.46 ^c	47.63 ^c	35.33 ^d	46.34 ^c	33.32 ^d	72.94 ^a	59.44 ^b	
必需氨基酸(EAA)	15.18 ^d	17.31 ^d	22.62 ^c	14.96 ^d	21.82 ^c	13.86 ^d	29.48 ^a	25.22 ^b	
非必需氨基酸(NEAA)	23.17 ^c	20.15 ^d	25.01 ^c	20.37 ^d	24.52 ^c	19.46 ^d	43.46 ^a	34.22 ^b	
药用氨基酸	21.89 ^{cd}	19.35 ^d	25.94 ^c	18.97 ^d	23.98 ^c	18.09 ^d	42.01 ^a	33.09 ^b	
EAA/TFAA(%)	39.58	46.22	47.49	42.35	47.08	41.58	40.41	42.43	
EAA/NEAA(%)	65.52	85.91	90.44	73.44	88.99	71.22	67.83	73.70	
药用氨基酸/TFAA(%)	57.07	51.65	54.46	53.69	51.76	54.27	57.59	55.67	

L-脯氨酸和 L-缬氨酸, 而 L-组氨酸和 L-酪氨酸平均含量相对较低, L-甲硫氨酸平均含量最低。亮氨酸和精氨酸作为一种调节因子, 可以调控细胞内信号通路, 并对细胞内蛋白合成、周转及机体免疫和氧化功能等方面^[42]有着重要的生物学作用; 亮氨酸能削弱抗阻运动所导致的骨骼肌损伤与疼痛, 可促进骨骼肌蛋白质合成^[43-44]。这与民间将五指毛桃根作为药膳用于提高免疫力、治疗骨损伤与疼痛是相符的。

采自漳州卫生职业学院的不同叶形五指毛桃根中(表 5), 16 种氨基酸总含量并没有随着叶裂数目的增加而增加, 四种叶形总氨基酸含量由高到低为三指>七指>五指>全缘, 总含量介于 42.63~61.32 mg/g。其中, 三指浅裂五指毛桃根中甘氨酸、L-组氨酸、L-苏氨酸、L-丙氨酸、L-脯氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-苯丙氨酸及 L-赖氨酸的含量显著($P<0.05$)高于其它三种叶形。

同时, 分析了 8 个不同产地五指毛桃根中(表 6) 16 种氨基酸含量, 其总含量介于 33.32~72.94 mg/g。进一步分析发现除了 L-天门冬氨酸、L-组氨酸、L-苏氨酸、L-甲硫氨酸和 L-苯丙氨酸, 其它 11 种氨基酸含量及 16 种氨基酸总含量广西钦州灵山县显著($P<0.05$)高于其它产地, 福建漳州平和县的五指毛桃根中 L-天门冬氨酸含量显著($P<0.05$)高于其它产地, 广东河源源城区源南镇五指毛桃根中 L-组氨酸含量显著($P<0.05$)高于其它产地, 广西钦州灵山县和广东河源源城区源南镇五指毛桃根中 L-苏氨酸含量显著($P<0.05$)高于其它 6 个产地。因此, 同一种中药材种植在不同地区, 受生存环境的影响, 其植物体内活性物质含量不同。

在 16 种氨基酸中包含 7 种人体必需氨基酸, 含量为 13.86~29.48 mg/g, 与氨基酸总量(TFAA)的百分比介于 39.58%~47.49% 之间, 与非必需氨基酸含量的百分比介于 65.52%~90.44% 之间。根据 2007 年 WHO/FAO^[45] 中规定必需氨基酸/总氨基酸、必需氨基酸/非必需氨基酸二者比值其理想模型为 40% 和 60%, 我们可知, 福建漳州平和县和广西钦州灵山县的五指毛桃最接近理想模型, 可考虑将两个产地的五指毛桃作为氨基酸补充剂进行开发。

研究发现, L-天门冬氨酸、L-谷氨酸、甘氨酸、L-精氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸和 L-酪氨酸等 9 种为药用氨基酸^[46], 本研究的测定结果表明, 12 份五指毛桃根中药用氨基酸含量为 18.09~42.01 mg/g, 12 份五指毛桃根中药用氨基酸占氨基酸总量介于 51.65%~59.61% 之间, 其中, 广西钦州灵山县五指毛桃根中药用氨基酸含量最高, 而 9 个地区五指毛桃根中药用氨基酸与总氨基酸比值差异不大, 均高于 50%, 因此, 这几个产区的五指毛桃均可提取药用氨基酸并推广利用。

3 结论

本文构建了异硫氰酸苯酯-柱前衍生 HPLC 法

同时测定不同叶形、不同产地 12 批五指毛桃根中 16 种氨基酸含量的方法, 该方法能使 16 种氨基酸有效分离, 且线性关系良好, 检出限为 0.364~1.052 ng/mL, 定量限为 1.394~4.207 ng/mL, 平均加样回收率在 98.1%~105.9%, RSD 为 0.67%~2.11%。由以上结果可以看出该方法精密度高、稳定性和重复性均良好, 可作为五指毛桃根中氨基酸含量的测定方法, 为完善其质量标准提供了科学依据。

参考文献

- [1] 罗宇东, 蒋林. 瑶药五指毛桃的质量控制、生产工艺及药理作用研究进展[J]. 中国当代医药, 2014, 21(32): 193-196. [LUO Y D, JIANG L. Research progress on quality control, production process and pharmacological action of Yao medicine radix *Ficus hirta*[J]. China Modern Medicine, 2014, 21(32): 193-196.]
- [2] 温玲, 徐刚, 杨文豪, 等. 岭南草药五指毛桃研究概况[J]. 中医药信息, 2007, 24(1): 18-20. [WEN L, XU G, YANG W H, et al. The research situation of lingnan herbal medicine-*Ficus hirta*[J]. Information on Traditional Chinese Medicine, 2007, 24(1): 18-20.]
- [3] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区瑶药材质量标准(第一卷)[S]. 2013: 75-76. [Guangxi Food and Drug Administration. Quality standards of Yao Medicine in Guangxi Zhuang Autonomous Region (Volume I)[S]. 2013: 75-76.]
- [4] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准—第一册[M]. 广州: 广东科技出版社, 2004: 35-36. [Guangdong Food and Drug Administration. Standard of Chinese medicinal materials of Guangdong Province Volume 1[M]. Guangdong: Guangdong Science and Technology Press, 2004: 35-36.]
- [5] 湖南省食品药品监督管理局. 湖南省中药材标准[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2009: 95. [Hunan Food and Drug Administration. Hunan Province standard of Chinese medicinal materials[M]. Changsha: Hunan Science & Technology Press, 2009: 95.]
- [6] CHENG J, YI X M, WANG Y H, et al. Phenolics from the roots of hairy fig (*Ficus hirta* Vahl.) exert prominent anti-inflammatory activity[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 31(1): 79-88.
- [7] GAJUREL P R, TAMULY C, BURAGOHAIN R, et al. Assessment of antioxidant activity of six *Ficus* species-underutilized fruits from Arunachal Pradesh in North East India[J]. International Journal of Fruit Science, 2015, 15(1): 85-99.
- [8] ZENG Y W, LIU X Z, LYU Z C, et al. Effects of *Ficus hirta* Vahl. (Wuzhimaotao) extracts on growth inhibition of HeLa cells[J]. Experimental and Toxicologic Pathology, 2012, 64(7-8): 743-749.
- [9] 李南薇, 黄燕珍. 五指毛桃功能性成分抗氧化活性研究[J]. 食品工业, 2013, 34(6): 127-130. [LI N W, HUANG Y Z. Antioxidant activities of functional components from *Radix ficis simplicissimae*[J]. The Food Industry, 2013, 34(6): 127-130.]
- [10] 陈荣珠, 王小平, 李珍. 不同叶型五指毛桃总酚含量和多酚氧化物酶及抗氧化活性的比较分析[J]. 福建热作科技, 2021, 46(4): 14-17, 28. [CHEN R Z, WANG X P, LI Z. Comparative analysis about total of total phenol content, polyphenol activity and antioxidant[J]. Fujian Science & Technology of Tropical Crops, 2021, 46(4): 14-17, 28.]

- [11] 叶童, 石瑞娟, 吴易武, 等. 五指毛桃的化学成分和药理活性研究进展[J]. 广东药科大学学报, 2019, 35(4): 591–596. [YE T, SHI R J, WU Y W, et al. Research progress of *Ficus hirta* Vahl on their chemical constituents and pharmacological activities[J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2019, 35(4): 591–596.]
- [12] 黄溥玮, 卢健棋, 林浩, 等. 中药五指毛桃的化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(12): 93–96. [HUANG P W, LU J Q, LIN H, et al. Advances in the study on the chemical composition, pharmacological effect and clinical application of *Radix fici simplicissimae*[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2020, 22(12): 93–96.]
- [13] 张茹, 曲中原, 杜娟. 基于 Nrf2-HO-1/CYP2E1 通路探讨五指毛桃醇提取物对酒精性肝损伤小鼠的抗氧化保护机制[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(12): 1769–1775. [ZHANG R, QU Z Y, DU J. Antioxidant protective mechanism of alcohol extract of *fici hirtae Radix* on mice with alcoholic liver injury through Nrf2-HO-1/CYP2E1 pathway[J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2021, 32(12): 1769–1775.]
- [14] 王艳, 叶木荣, 唐立海, 等. 五指毛桃水提液保护胃黏膜及改善微循环的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5): 1181–1182. [WANG Y, YE M R, TANG L H, et al. Experimental study on protection of gastric mucosa and improvement of microcirculation by water extract of *Ficus hirta* Vahl[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2011, 22(5): 1181–1182.]
- [15] 王敏, 何蓉蓉, 李怡芳, 等. 五指毛桃水提物对拘束应激性肝损伤的保护作用[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(6): 522–525. [WANG M, HE R R, LI Y F, et al. Protective effects of *Radix fici hirtae* extracts against liver injury induced by restraint stress[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2015, 35(6): 522–525.]
- [16] 胡昊, 李宁, 宋圆圆, 等. 两种酒精灌胃方案诱导大鼠酒精性肝损伤模型的比较研究[J]. 医学理论与实践, 2020, 33(15): 2420–2422. [HU H, LI N, SONG Y Y, et al. Comparison of two rat models of alcoholic liver injury induced by gradient alcohol gavage or fixed alcohol gavage[J]. The Journal of Medical Theory and Practice, 2020, 33(15): 2420–2422.]
- [17] 吕颖坚, 贾凤兰, 阮明, 等. 五指毛桃水提物对二甲基甲酰胺所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中药材, 2008, 31(9): 1364–1368. [LYU Y J, JIA F L, RUAN M, et al. The hepatoprotective effect of aqueous extracts from *Ficus hirta* on N, N-dimethylformamide induced acute liver injury in mice[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2008, 31(9): 1364–1368.]
- [18] 吕镇城, 陈康, 彭永宏. 五指毛桃抗炎活性成分的分离及鉴定[J]. 热带作物学报, 2017, 38(6): 1134–1137. [LYU Z C, CHEN K, PENG Y H. Isolation and identification of chemical constituents with anti-inflammatory activity from the roots of *Ficus hirta* Vahl[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2017, 38(6): 1134–1137.]
- [19] 王晓平, 黄翔, 段丽菊, 等. 五指毛桃水提液对辐射致小鼠肺细胞 DNA 损伤的保护作用研究[J]. 中国药房, 2011, 22(3): 201–203. [WANG X P, HUANG X, DUAN L J, et al. Preventive effect of aqueous extract from *Ficus simplicissima* on radiation-induced DNA injury of lung cells in mice[J]. China Pharmacy, 2011, 22(3): 201–203.]
- [20] PHILLIPS S M, CHEVALIER S, LEIDY H J. Protein “requirements” beyond the RDA: Implications for optimizing health[J]. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, 2016, 41(5): 565–572.
- [21] 侯娜, 赵莉莉, 魏安智, 等. 不同种质花椒氨基酸组成及营养价值评价[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 113–118. [HOU N, ZHAO L L, WEI A Z, et al. Amino acid composition and nutritional quality evaluation of different germplasms of Chinese prickly ash[J]. Food Science, 2017, 38(18): 113–118.]
- [22] 刘文静, 潘葳, 吴建鸿. 5 种百香果品系间氨基酸组成比较及评价分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(24): 237–241. [LIU W J, PAN W, WU J H. Comparative analysis and evaluation of amino acids composition among five passion fruit varieties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(24): 237–241.]
- [23] CYLWIK D, MOGIELNICKI A, BUCZKO W. L-arginine and cardiovascular system[J]. Pharmacological Reports, 2005, 57(1): 14–22.
- [24] MORRIS C R, KATO G J, POLJAKOVIC M, et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease[J]. JAMA-Journal of the American Medical Association, 2005, 294(1): 81–90.
- [25] PEIXOTO J A B, ÁLVAREZ RIVERA G, ALVES R C, et al. Comprehensive phenolic and free amino acid analysis of rosemary infusions: Influence on the antioxidant potential[J]. Antioxidants, 2021, 10(3): 500–550.
- [26] VAN S J H J, SIZIBA L P, BUCHENAUER L, et al. Free and total amino acids in human milk in relation to maternal and infant characteristics and infant health outcomes: The Ulm SPATZ health study[J]. Nutrients, 2021, 13(6): 2009–2009.
- [27] PRIPIS-NICOLAU L, BERTRAND A, MAUJRAN A, et al. Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(9): 3761–3766.
- [28] EGYDIO A P M, CATARINA C S, FLOH E I S, et al. Free amino acid composition of Annona (*Annonaceae*) fruit species of economic interest[J]. Ind Crops Prod, 2013, 45: 373.
- [29] 郭晓晗, 程显隆, 柳温曦, 等. 柱前衍生化-HPLC 法同时测定不同商品规格鹿茸片中 15 种氨基酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(10): 1780–1789. [GUO X H, CHENG X L, LIU W X, et al. HPLC with pre-column derivatization for simultaneous determination of 15 amino acids in deer velvet slices of different specifications[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2020, 40(10): 1780–1789.]
- [30] MANDRIOLI R, MERCOLINI L, RAGGI M A. Recent trends in the analysis of amino acids in fruits and derived food-stuffs[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(25): 7941–7956.
- [31] 孙嘉卿, 冯涛, 宋诗清, 等. 果蔬风味物质形成的生物化学基础[J]. 中国果菜, 2020, 40(6): 10–15. [SUN J Q, FENG T, SONG S Q, et al. Biochemical basis for the formation of flavor substances in fruits and vegetables[J]. China Fruit & Vegetable, 2020, 40(6): 10–15.]

- [32] 陈华峰,唐玉情,潘亚婕,等.果实风味的代谢基础及其调控机制研究进展[J].植物研究,2021,41(3):474-480. [CHEN H F, TANG Y Q, PAN Y J, et al. Progress on the metabolic basis and regulation mechanism of fruit flavor[J]. Bulletin of Botanical Research, 2021, 41(3): 474-480.]
- [33] 邓博一,申铨日,邓用川.海南百香果、莲雾、青枣营养成分的比较分析[J].食品工业科技,2013,34(12):335-338,343. [DENG B Y, SHEN X R, DENG Y C. Analysis of nutritional ingredients of Hainan *Passiflora edulis Sims*, *Syzygium samarangense* and *Ziziphus muarritiana*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(12): 335-338, 343.]
- [34] 朱奕凡,王妍,汪国云,等.不同杨梅品种果实游离氨基酸组成分析[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2021,47(6):736-742. [ZHU Y F, WANG Y, WANG G Y, et al. Analysis of free amino acid composition in fruits of different bayberry (*Morella rubra*) varieties[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2021, 47(6): 736-742.]
- [35] 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. [YANG Q, HUANG X L, SHEN L, et al. Comprehensive quality evaluation of different varieties Chonglou (*Paris*) based on principal components analysis of amino acids[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2021, 39(6): 87-92.]
- [36] 李松涛,甄占莹,尹志峰,等.河北省特种桑叶中游离氨基酸的含量测定[J].食品科技,2015,40(9):309-311,315. [LI S T, ZHEN Z X, YIN Z F, et al. Determination of contents of free amino acids in special melberry leaves of Hebei province[J]. Food Science and Technology, 2015, 40(9): 309-311, 315.]
- [37] 龚道锋,王甫成,纪东汉,等.不同产地天花粉中 15 种氨基酸的测定[J].中成药,2019,41(3):607-613. [GONG D F, WANG F C, et al. Determination of fifteen amino acids of *Trichosanthes kirilowii* from different growing areas[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2019, 41(3): 607-613.]
- [38] 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.]
- [39] 蒋清伟,王威,刘姝畅,等.柱前衍生 HPLC 法测定天麻提取物中 18 种氨基酸含量[J].中国新药杂志,2020,29(15):1785-1790. [JIANG Q W, WANG W, LIU S C, et al. Determination of 18 amino acids in *Rhizoma gastrodiae* extract by precolumn derivation HPLC[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2020, 29(15): 1785-1790.]
- [40] 何继杰,张晓凤,钱莉莉,等.痕量氨基酸分析方法研究进展[J].分析科学学报,2019,5(4):507-513. [HE J J, ZHANG X F, QIAN L L, et al. Recent progress on analysis of trace amino acid[J]. Journal of Analytical Science, 2019, 5(4): 507-513.]
- [41] 唐翎,魏伟,赵勇.柱前衍生高效液相色谱测定猴头菌丝体中 15 种游离氨基酸的含量[J].中国药学杂志,2017,52(21):1899-1902. [TANG L, WEI W, ZHAO Y. Determination of free amino acids in *Hericium erinaceus* mycelium by HPLC with precolumn derivatization[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2017, 52(21): 1899-1902.]
- [42] 田雯.功能性氨基酸(亮氨酸和精氨酸)对奶牛乳蛋白合成调控作用及机制的研究[D].扬州:扬州大学,2017. [TIAN W. Mechanism and regulation of functional amino acids (leucine and arginine) on milk protein synthesis in dairy cows[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2017.]
- [43] XIA Z, CHOLEWA J, ZHAO Y, et al. Hypertrophy-promoting effects of *Leucine supplementation* and moderate intensity aerobic exercise in pre-senescent mice[J]. Nutrients, 2016, 8(5): E246.
- [44] 夏志,赵艳,孟思进,等.大剂量补充亮氨酸对抗阻运动所致骨骼肌损伤的影响[J].北京体育大学学报,2017,40(10):56-62. [XIA Z, ZHAO Y, MENG S J, et al. Effects of high-dose leucine supplementation on skeletal muscle damage induced by resistance exercise[J]. Journal of Beijing Sport University, 2017, 40(10): 56-62.]
- [45] 彭真汾,王威,叶清华,等.高效液相色谱-串联质谱法定量分析橄榄果实氨基酸组分[J].食品科学,2018,39(24):231-238. [PENG Z F, WANG W, YE Q H, et al. Quantitative analysis of amino acids in Chinese olive using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Science, 2018, 39(24): 231-238.]
- [46] 王晓媛,王彦兵,陈玉芹,等.6 种石斛属植物氨基酸组成及营养价值评价[J].天然产物研究与开发,2019,31(4):601-607. [WANG X Y, WANG Y B, CHEN Y Q, et al. Amino acid composition and nutritional value evaluation of 6 species of *Dendrobium* [J]. Nat Prod Res Dev, 2019, 31(4): 601-607.]