

UPLC-MS/MS 法测定不同产地浮萍中 9 种核苷类成分的量

樊修和¹, 吴启南^{1,2*}, 蒋 征¹, 吴达维², 王 红², 邵 莹²

南京中医药大学药学院, 江苏省中药资源产业化协同创新中心, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱三重四级杆串联质谱法(UPLC-MS/MS)同时测定浮萍中 9 种核苷类成分的方法, 分析比较不同产地样品中 9 种成分的差异。**方法** 采用 Waters XbridgeTM Amide 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 3.5 μm); 以 0.1% 甲酸的水(A)-0.1%甲酸的乙腈(B)溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量为 0.5 mL/min; 柱温 30 ℃, 采用电喷雾离子源, 正离子检测方式, 得到相应的提取离子流图, 以峰面积进行定量, 用主成分分析和聚类分析方法进行综合评价。**结果** 9 种核苷类成分具有良好的线性关系, r 值均大于 0.998 9, 方法精密度、重复性和稳定性的 RSD 值均小于 3.5%, 加样回收率在 94.4%~101.9%, RSD 在 1.73%~3.58%。不同产地浮萍药材中 9 种核苷在组成和量上均有差异, 其中 2'-脱氧尿苷、2'-脱氧肌苷在 13 个产地样品中量均较低, 以胞嘧啶最低; 尿苷、肌苷、黄嘌呤量较高; 13 个产地中安徽黄山浮萍中 9 种核苷总量最高。**结论** 该方法操作简便、准确、重复性好, 可为浮萍药材的质量标准制定提供依据。

关键词: 浮萍; 核苷; UPLC-MS/MS; 胸腺嘧啶; 胸苷; 2'-脱氧尿苷; 尿苷; 2'-脱氧肌苷; 黄嘌呤; 胞嘧啶; 肌苷; 次黄嘌呤

中图分类号: R286.022

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)21-3253-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.21.023

Determination of nine kinds of nucleosides in *Spirodelae Herba* from different habitats by UPLC-MS/MS

FAN Xiu-he¹, WU Qi-nan^{1,2}, JIANG Zheng¹, WU Da-wei², WANG Hong², SHAO Ying²

Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization of Jiangsu Province, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To establish a UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of nine kinds of nucleosides in *Spirodelae Herba*, and analyze and investigate the difference of nucleosides ingredients in samples from 13 habitats. **Methods** The determination was performed on the Waters XbridgeTM Amide-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm), the 0.1% formic acid-water (A) and 0.1% acetonitrile-water (B) in gradient elution as mobile phase. The flow rate was 0.5 mL/min. The column temperature was 30 ℃. MS instrument was equipped with ESI⁺ ion source. Gaining the extracted ion chromatograms, then the peak area for quantitative, principal component analysis (PCA), and hierarchical clustering analysis (HCA) were used to comprehensive evaluation. **Results** All nine kinds of nucleoside showed good linearity ($r \geq 0.998\ 9$). The RSD of the precision, repeatability, and stability tests were less than 3.5%. The average recovery rates were in the range of 94.4%—101.9%, RSD were in the range of 1.73%—3.58%. There are differences in the composition and content from different habitats. The content of 2'-deoxyuridine and 2'-deoxyinosine in the lower levels, cytosine was the lowest, while the contents of uridine, inosine, and xanthine were in higher levels. The largest content was in *Spirodelae Herba* from Huangshan, Anhui province. **Conclusion** The method for the simultaneous determination of the nine kinds of nucleosides is simple, accurate, and reproducible, that will provide the basis for the formulation of herbs *Spirodelae Herba* for quality control standards.

Key words: *Spirodelae Herba*; nucleosides; UPLC-MS/MS; thymine; thymidine; 2'-deoxyuridine; uridine; 2'-deoxyinosine; xanthine; cytosine; inosine; hypoxanthine

浮萍 *Spirodelae Herba* 为浮萍科(Lemnaceae)紫萍属 *Spirodela* Schleid. 植物紫萍 *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid. 的带根干燥全草, 其味辛,

性寒, 具发汗解表、透疹止痒、利水消肿、清热解毒等功效。浮萍含大量水溶性维生素、无机元素、黄酮及多糖等成分^[1-2]。现代药理研究表明, 浮萍具

收稿日期: 2015-05-26

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 江苏省高校中药资源产业化过程协同创新中心建设专项(2013); 国家公益性行业专项——我国水生、耐盐中药资源的合理利用研究(201407002)

作者简介: 樊修和(1989—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药品质评价。E-mail: fan_miller@163.com

*通信作者 吴启南, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药资源与品质评价研究。Tel: (025)85811507 E-mail: qnwyjs@163.com

有抗癌、抗氧化、保肝、抗菌、增强免疫等多种生理活性^[3]。

核苷类化学成分对人体免疫、代谢以及肝脏、心血管及神经系统等发挥着重要的生理作用,且具有抗菌和抗病毒等生理活性^[4-9]。目前,核苷类成分的同时测定已广泛运用于药材的真伪鉴别和品质评价^[10-12]。本研究运用 LC-MS/MS 法,建立不同产地浮萍药材中 9 种核苷类成分同时测定的方法,分析比较其组成与量差异,为该药材的进一步认识与评价提供科学依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20A 高效液相色谱仪, LC-20ADXR 二元输液泵、DGU-20A3 自动脱气装置、SIL-20A XR 自动进样器、CTO-20AC 柱温箱(日本 Shimadzu 公司); Qtriple 5500 质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); Analyst 1.5.2 Software 质谱工作站软件(美国 AB SCIEX 公司); Sartorius BT125D 型十万分之一电子分析天平, TE124S 型万分之一电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); KH-300SP 型双频数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); TGL-16M 台式高速冷冻离心机(长沙湘鹰离心机有限公司);微量移液器(芬兰 BIOHIT 公司); SAGA-10TY 实验室级超纯水器(南京易普易达科技发展公司)。

1.2 试药

对照品胸腺嘧啶(批号 B1326009)、胸苷(批号 1001569135)、2'-脱氧尿苷(批号 1090557)、尿苷(批号 200202)、2'-脱氧肌苷(批号 L1224040)、黄嘌呤(批号 F1205052)、胞嘧啶(批号 1328014)、肌苷(批号 K1228002)、次黄嘌呤(批号 J1225007)均购自阿拉丁公司,质量分数均大于 98%。

乙腈、甲酸为色谱纯(德国 Merck 公司),其余试剂为分析纯,水为超纯水(实验室自制)。

浮萍样品分别实地采集于安徽、山东、福建等省份,经南京中医药大学吴启南教授鉴定为浮萍科植物紫萍 *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid. 的干燥全草,留样凭证存放于南京中医药大学中药鉴定实验室。具体信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 Waters Xbridge™ Amide 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 3.5 μm); 流动相: 0.1%甲酸的水(A)-0.1%甲酸的乙腈(B)溶液, 梯度洗脱:

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

编号	产地	编号	产地
S1	广东湛江	S8	山东青岛
S2	安徽亳州	S9	山东烟台
S3	安徽合肥	S10	安徽黄山
S4	安徽芜湖	S11	河南郑州
S5	安徽蚌埠	S12	福建福州
S6	河南洛阳	S13	湖北武汉
S7	安徽池州		

0~4 min, 20% A; 4~8 min, 20%~50% A; 8~12 min, 50%~20% A; 12~14 min, 20% A。体积流量为 0.6 mL/min; 柱温 30 °C, 进样量 1 μL。

2.1.2 质谱条件 离子源: Turbo V, 电离模式: ESI⁺; 采集方式提取离子流(MRM); 离子源温度: 550 °C, 喷雾电压 5 500 V。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液制备 精密称量干燥至恒定质量的 9 种对照品适量, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加水溶解定容, 配成质量浓度分别为 0.510、0.525、0.687、0.572、0.579、0.501、0.718、0.690、0.526 mg/mL 的各对照品储备液。分别取不同体积的各储备液置于 10 mL 量瓶中逐级加水稀释, 得到不同质量浓度的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 精密称取干燥至恒定质量的各种样品粉末 1.0 g, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 20 mL 超纯水, 室温下超声提取 60 min(功率 500 W、频率 40 Hz), 提取上清液于 12 000 r/min 转速下离心 10 min, 吸取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜待用。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下的混合对照品溶液, 逐级稀释为 6 个不同浓度的系列混合对照品溶液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 在“2.1”项色谱-质谱条件下进样分析, 以对照品的质量浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 建立线性回归方程、相关系数和线性范围; 分别以各化合物的信噪比(S/N)等于 3 和 10 时所对应的浓度确定为最低检测限(LOD)、最低定量限(LOQ), 结果见表 2 和图 1。

2.3.2 精密度、重复性、稳定性试验 精密吸取同一混合对照品溶液连续进样 5 次, 分别记录 9 种核苷的峰面积, 计算其 RSD 在 0.76%~2.67%; 表明仪器精密度良好。取同一样品 5 份, 按照“2.2.2”项方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算

表 2 9 种核苷类成分标准曲线、定量限和检测限

Table 2 Calibration curves, LODs, and LOQs of nine nucleosides

化合物	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LQD/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
胸腺嘧啶	$Y=925.01 X+21\ 778$	0.999 8	0.159~10.20	20.72	69.07
胸苷	$Y=4\ 958 X-137\ 687$	0.999 9	0.164~10.50	6.89	22.97
2'-脱氧尿苷	$Y=7\ 446.1 X+1\ 000\ 000$	0.998 7	0.214~13.70	15.24	50.80
次黄嘌呤	$Y=6\ 656.8 X+808\ 671$	0.998 9	0.175~11.20	1.53	5.10
尿苷	$Y=2\ 091.1 X+42\ 108$	0.999 8	0.181~11.60	5.68	18.93
2'-脱氧肌苷	$Y=7\ 670.4 X-229\ 992$	0.999 8	0.103~9.92	2.11	7.03
黄嘌呤	$Y=4\ 857.2 X+270\ 129$	0.999 1	0.149~14.30	4.99	16.63
肌苷	$Y=6\ 024.3 X-182\ 302$	0.999 9	0.213~13.60	2.10	7.00
胞嘧啶	$Y=2\ 954.9 X+177\ 086$	0.999 1	0.164~10.50	1.79	5.97

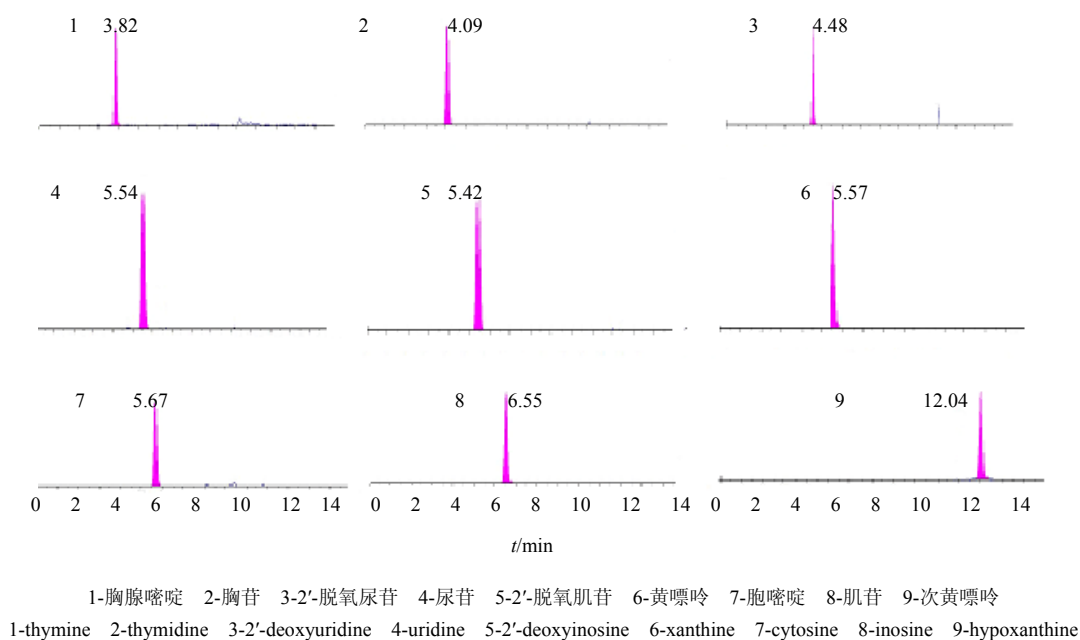


图 1 9 种核苷样品的 MRM

Fig. 1 MRM of nine nucleosides in *Spirodela Herba*

各核苷成分质量分数的 RSD 值在 1.42%~2.78%；表明方法重复性良好。取同一样品供试品溶液，分别在 0、2、4、8、12、18、24 h 测定 9 种核苷的峰面积并计算其 RSD 值在 1.02%~3.07%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 加样回收试验 精密称取 6 份已测定的浮萍样品 1.0 g，分别加入一定量的各对照品溶液，根据“2.2”项下方法制备供试品溶液，根据样品测定方法进样，计算各核苷的平均回收率及 RSD，结果表明，该 9 种核苷的平均回收率在 94.4%~101.9%，RSD 在 1.73%~3.58%。

2.4 样品测定

取 13 批样品，分别按照“2.2.2”项下方法制备

供试品溶液，按“2.1”项条件分析，以标准曲线法计算 13 批样品中 9 种类成分的质量分数，结果见表 3。

2.5 样品中 9 种核苷的组成与量分析

浮萍样品中 9 种核苷测定表明，浮萍中 9 种目标核苷在组成上无差异均能用该方法检出，而质量分数差异较大，从核苷总量来看，S10 最大，其次为 S12、S9；S3、S4、S6、S7、S8、S11、S13 居中；S1、S2、S5 最小。各核苷所占比例显示，2'-脱氧尿苷、2'-脱氧肌苷在 13 个产地样品中质量分数均较低；胞嘧啶最低；次黄嘌呤、尿苷、肌苷、黄嘌呤量较高。

2.6 样品中 9 种核苷的主成分分析

以核苷类成分量为分析指标，应用 SPSS19.0 统计软件进行主成分分析。提取特征值大于 1 的 3

表 3 浮萍中核苷类成分质量分数 ($n=3$)Table 3 Contents of nucleosides in *Spirodelae Herba* ($n=3$)

样品	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)									总量
	胸腺嘧啶	胸苷	2'-脱氧尿苷	次黄嘌呤	尿苷	2'-脱氧肌苷	黄嘌呤	肌苷	胞嘧啶	
S1	70.87	67.13	39.50	20.00	105.91	43.67	172.93	97.12	5.75	622.88
S2	60.50	57.70	35.61	139.42	104.23	44.63	104.71	76.00	4.00	626.80
S3	5.32	39.51	52.78	229.10	242.30	63.30	235.32	170.02	22.16	1 059.81
S4	78.92	79.71	27.21	192.65	270.19	60.05	86.43	200.61	30.05	1 025.82
S5	63.03	50.83	38.60	138.07	84.72	44.19	96.20	62.12	3.98	581.74
S6	34.39	66.56	14.03	156.90	255.08	37.78	65.85	150.40	25.06	806.05
S7	55.16	38.00	7.11	160.91	318.27	25.55	51.31	288.70	27.94	972.95
S8	78.43	73.17	28.72	187.73	232.35	55.83	99.00	172.95	23.68	951.86
S9	40.32	84.25	44.39	231.02	408.30	67.20	156.37	213.04	45.63	1 290.52
S10	143.23	145.73	129.24	218.53	392.71	129.30	451.05	294.73	15.84	1 920.36
S11	57.57	99.52	69.65	229.17	34.21	77.82	348.15	97.29	2.35	1 015.71
S12	65.67	132.87	92.42	231.30	367.83	109.75	210.30	250.03	20.47	1 480.64
S13	40.05	80.80	45.91	163.82	139.93	59.43	117.10	172.12	12.09	831.25

个主成分,其特征值、贡献率和累积贡献率如表 4 所示。前 3 个主成分的累积贡献率达到 86.629%,采用方差极大法得到的解释总方差和旋转因子载荷图表明浮萍药材的第 1 主成分与胸腺嘧啶、胸苷、2'-脱氧尿苷、黄嘌呤、胞嘧啶呈正相关;第 2 主成分与 2'-脱氧肌苷、肌苷、次黄嘌呤呈正相关;第 3 主成分与胸腺嘧啶呈正相关。因浮萍药材中 9 种核苷总方差的 70%以上贡献率来自第 1、2 主成分,故胸腺嘧啶、胸苷、2'-脱氧尿苷、2'-脱氧肌苷、黄嘌呤、胞嘧啶、肌苷、次黄嘌呤为浮萍药材的特征核苷类成分。各产地浮萍样品的主成分分析综合得分见表 5,可以看出山东烟台(S9)得分最高,河南郑州(S11)得分最低。

表 4 主成分的初始特征值及贡献率

Table 4 Initial eigenvalues and contribution rate of principal components

成分	初始特征值		
	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%
1	4.691	52.121	52.121
2	2.030	22.555	74.677
3	1.076	11.952	86.629
4	0.492	5.463	92.091
5	0.278	3.089	95.180
6	0.226	2.512	97.692
7	0.116	1.288	98.981
8	0.065	0.723	99.704
9	0.027	0.296	100

表 5 不同产地浮萍样品的主成分综合得分

Table 5 Comprehensive scores of principal component in *Spirodelae Herba* from different habitats

编号	主成分 1	主成分 2	F	综合排名
S1	-0.852 8	-1.234 8	-0.423 8	12
S2	-0.842 0	-0.871 9	-0.299 2	10
S3	-0.189 3	0.475 0	0.163 0	5
S4	-0.009 9	0.734 0	0.251 9	3
S5	-0.918 4	-0.959 9	-0.329 4	11
S6	-0.728 3	0.661 9	0.227 1	4
S7	-0.625 3	1.435 3	0.492 6	2
S8	-0.173 0	0.355 8	0.122 1	6
S9	-0.406 9	1.604 3	0.550 6	1
S10	2.533 5	-0.670 7	-0.230 2	9
S11	0.323 4	-1.504 2	-0.516 2	13
S12	1.393 9	0.230 6	0.079 9	7
S13	-0.311 9	-0.255 3	-0.087 6	8

2.7 浮萍药材中 9 种核苷聚类分析及结果

应用 SPSS19.0 统计软件对本实验所测 13 种产地浮萍样品中 9 种核苷量进行聚类分析,将其聚为 2 大类,第 1 类: S2、S5、S1、S6、S13、S4、S8、S7、S3、S11;第 2 类: S9、S12、S10,第 1 类又可根据量差异分为 3 大类,见图 2。

3 讨论

3.1 实验方法的优化

本实验从提取方法到检测波长与色谱柱的选择均通过实验和文献考察,超声提取法具有操作简单、耗时短、提取率高等特点,经优化后选择料液比为

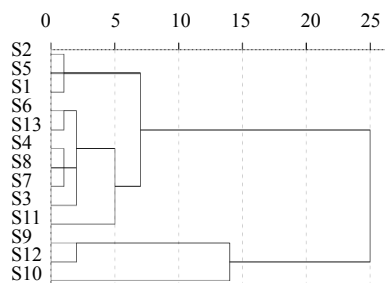


图2 系统聚类分析图

Fig. 2 Systematic cluster analysis

1:10, 提取时间 60 min。核苷类成分在 260 nm 附近有较高吸收, 因此选择 260 nm 作为检测波长。Waters Xbridge™ Amide 色谱柱对极性较强的化学物质具有较好的保留作用, 适合于核苷类成分的分离。另外, 色谱与质谱条件均最佳。

3.2 实验结果分析

本实验以各样品核苷总量为出发点, 初步得出 13 批样品中 9 种核苷总量的差异; 并对样品中各种核苷的比例进行分析, 得到 13 个不同产地浮萍样品中 9 种核苷的分布趋势。采用主成分分析法对 13 个产地浮萍样品进行综合得分排名, 评价了 9 种核苷成分的量差异; 采用系统聚类分析方法再次分类。3 种分析方法所得结果基本一致, 山东烟台核苷量最高, 河南郑州最低。主成分分析中排名在 2、3 的分别是安徽池州与安徽芜湖的样品; 排名中间的有河南洛阳、安徽合肥、山东青岛、福建福州、湖北武汉; 安徽黄山、安徽亳州、安徽蚌埠、广东广州、河南郑州依次排名最后。聚类分析结果中, 9 种核苷量能在一定程度上将浮萍药材按产区分开, 如安徽亳州与合肥、芜湖与池州药材相似, 这也和主成分分析的结果相一致。山东青岛与烟台两地又自成一类, 这表明各产区浮萍药材中该 9 种核苷成分具有较强的地域差异性, 同一省份不同城市的药材也存在差异。

从整体上来看, 9 种核苷量的测定并不能直观的区分浮萍的产地, 造成这种差异的原因有以下 2 个方面: 第一, 地理位置上的差异, 气候、海拔、经纬度、温度等大环境都会造成浮萍的质量差异, 从而引起各项检测指标的变化; 第二, 水体环境的差异, 浮萍属水生植物, 生长环境和陆生药用植物完全不同, 影响其生长发育的外界因素复杂, 不同产地的浮萍核苷量差异是由不同的水环境决定的,

受水体污染的影响, 水生药用植物的品质每况愈下。且水具有流动性, 聚类分析结果中不同省份所产浮萍能聚为一类极有可能是流动的水体所致, 另外, 浮萍生长的水环境周围相同或相似的工业模式也是造成这一结果的重要原因, 故浮萍药材的品质评价还可间接反映生长地区的水体情况。

本实验建立了从 9 种核苷量的差异来比较不同产地浮萍质量的方法, 得出了 13 个产地浮萍药材的量变化, 可为浮萍药材的进一步开发提供依据, 但仍存在局限性, 除核苷外多糖、氨基酸及一些次生代谢物也是影响浮萍品质的主要成分。此外, 药材的干燥方式也能引起量差异, 因此, 还需综合考虑各种因素, 进一步探索评价浮萍药材品质的新方法。

参考文献

- [1] 凌云, 万峰, 洪菁, 等. 中药浮萍的微量元素分析 [J]. 微量元素与健康研究, 1999, 16(2): 45-46.
- [2] 凌云, 何板作, 鲍燕燕, 等. 浮萍的化学成分研究 [J]. 中草药, 1999, 30(2): 88-90.
- [3] 谢天艳, 何开泽, 赵海, 等. 4 种浮萍提取物的抗菌活性和黄酮量 [J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(2): 238-244.
- [4] 周菁, 王伯初, 王阳. 浮萍多糖总糖量测定与评价 [J]. 重庆大学学报: 自然科学版, 2005, 28(10): 114-117.
- [5] 陆轶峰. 浮萍在水污染治理中的应用研究 [J]. 云南环境科学, 2004, 23(1): 44-47.
- [6] 肖川. 香豆素和嘌呤核苷类化合物的合成及其生物活性的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2012.
- [7] 侯晓蓉. 生物样品中核苷的分析方法研究及应用 [D]. 杭州: 浙江大学, 2004.
- [8] 白仕侠. 6-位手性氨基酸及其衍生物取代嘌呤核苷类化合物的合成研究 [D]. 郑州: 河南师范大学, 2012.
- [9] 张鹏, 赵启韬, 杨培民, 等. 白花蛇舌草核苷体外抗肿瘤作用实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(8): 1901-1902.
- [10] 张文萌, 贾玉荣, 付锦楠, 等. RP-HPLC 法同时测定熟地黄中 5 个核苷类成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(1): 94-97.
- [11] 薛俊杰. 北冬虫夏草主要有效成分的量测定研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [12] Li F, Duan J A, Qian D, et al. Comparative analysis of nucleosides and nucleobases from different sections of elaphuri davidiani cornu and cervi cornu by UHPLC-MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 83: 10-18.