

基于 UPLC-TQ-MS 的地黄中核苷类和氨基酸类成分动态积累研究

徐 卓, 戴新新, 宿树兰*, 严 辉, 郭 盛, 魏丹丹, 钱大玮, 段金廛*

南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心

国家中医药管理局中药资源循环利用重点实验室 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏 南京 210023

摘 要: 目的 分析评价地黄 *Rehmannia glutinosa* 根与叶中 5 种核苷与 14 种氨基酸类成分, 揭示其动态积累规律, 为其合理利用提供科学依据。方法 选取不同生长期的地黄根和叶以及不同产地(河南大封、河南温县、河南南召)的地黄叶为研究对象, 采用超高效液相色谱-三重四极质谱联用技术(ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, UPLC-TQ-MS)分析不同生长期地黄根和叶以及不同产地地黄叶中核苷类与氨基酸类成分动态变化。结果 研究发现地黄根及地黄叶中均含有 5 种核苷类成分和 14 种氨基酸类成分, 2 部位中不同生长期 2 类成分的总含量分别为 3.88~16.97 mg/g 和 4.27~25.32 mg/g; 地黄根和叶中测得的 2 类成分总量分别在 10 月中下旬和 11 月上中旬显著升高, 达到各自峰值, 其中 L-谷氨酰胺与 L-赖氨酸含量最高, 占总含量的 60%以上; 大部分生长期地黄叶中核苷类和氨基酸类成分较地黄根高, 尤其在 10 月下旬; 不同产地地黄叶中以河南南召产者核苷和氨基酸含量较高, 总含量最高可达 30.756 mg/g。结论 阐明了地黄中核苷类和氨基酸类成分的分布和动态积累过程, 为地黄药食两用特性及合理采收期提供了科学依据, 提出了地黄叶可作为新的食用新资源为机体补充核苷类和氨基酸类成分的建议, 为地黄叶资源价值的发现、开发和利用提供了支撑。

关键词: 地黄; 地黄叶; 核苷; 氨基酸; 动态积累; 超高效液相色谱-三重四极质谱联用技术

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)23-7323-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.23.027

Analysis of dynamic accumulation of nucleosides and amino acids in *Rehmannia glutinosa* based on UPLC-TQ-MS

XU Zhuo, DAI Xin-xin, SU Shu-lan, YAN Hui, GUO Sheng, WEI Dan-dan, QIAN Da-wei, DUAN Jin-ao

Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, National and Local Collaborative

Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, State Administration of

Chinese Medicinal Resource Recycling Utilization, Jiangsu Key Laboratory of High-tech Research of Prescriptions, Nanjing

University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To investigate the dynamic accumulation of five nucleosides and 14 amino acids in Dihuang (*Rehmannia glutinosa*) and reveal their dynamic accumulation rules, so as to provide scientific basis for their rational utilization. **Methods** Leaves and roots from *R. glutinosa* at different growth stages and from different cultivation regions (Henan Dafeng, Henan Nanzhao, Henan Wenxian) were determined using ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-TQ-MS) to analyze the dynamic accumulation of nucleosides and amino acids in leaves and roots of *R. glutinosa* from different cultivation regions. **Results** *R. glutinosa* leaves and roots were all found to contain five kinds of nucleotides and 14 kinds of amino acids, and the total content of those in different growing periods was 3.88—16.97 mg/g and 4.27—25.32 mg/g, respectively. The content of nucleosides and amino acids in *R. glutinosa* leaves and roots increased significantly in the second half of October and the first and middle of November, reaching their respective peaks. The content of L-glutamine and L-lysine was the

收稿日期: 2021-06-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81673533); 国家自然科学基金资助项目(81973708); 江苏省科技计划项目(社会发展)(BE2019722)

作者简介: 徐 卓, 博士研究生, 研究方向为中药化学与分析。E-mail: xuzhuo1996@126.com

*通信作者: 宿树兰, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药及方剂功效物质基础与中药资源化学研究。E-mail: sushulan1974@163.com

段金廛, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药资源化学与资源循环利用及产业化研究。国家“973 计划”项目首席科学家、中国中药协会 中药资源循环利用专业委员会主任委员、中药产业资源循环利用发展联盟理事长。E-mail: dja@njucm.edu.cn

highest, accounting for more than 60%. In most growing periods, the content of nucleosides and amino acids in *R. glutinosa* leaves was higher than that in roots, especially in late October. The content of nucleosides and amino acids were higher in the leaves from Henan Nanzhao, and the total content was up to 30.756 mg/g. **Conclusion** The distribution and dynamic accumulation process of nucleosides and amino acids in *R. glutinosa* were described. A scientific basis for the medicinal and edible properties and the reasonable harvest period of *R. glutinosa* was provided. It was suggested that *R. glutinosa* leaves could be used as a new edible resource to supplement nucleosides and amino acids, which provided support for the discovery, development, and utilization of the resources in *R. glutinosa* leaves.

Key words: *Rehmannia glutinosa* Libosch; *Rehmannia glutinosa* leaves; nucleosides; amino acids; dynamic accumulation; ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry

地黄为玄参科多年生草本植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 的新鲜或干燥块根^[1]。《神农本草经》称地黄为“久服，轻身、不老”的上品，其中生地具有清热凉血、养阴生津的作用；熟地黄具有滋阴补血、益精填髓的作用^[1]。生地黄和熟地黄均被中国国家卫生部列为可用于保健食品的名单。现代药理学研究表明，地黄叶中含有与地黄根中相似的化学成分^[2-3]，包括多种环烯醚萜苷类、苯乙醇苷类、糖类、黄酮类、核苷和氨基酸等^[4-6]。其中，梓醇具有神经保护、治疗破骨神经骨病、防治糖尿病肾病的作用^[7-9]；毛蕊花糖苷具有抑制炎症反应、防治糖尿病引起的骨质疏松症的作用^[10-11]；地黄多糖具有激活免疫细胞，抗癌和降血糖、调血脂等作用^[12-14]，然而对地黄中核苷和氨基酸的研究甚少。

氨基酸与核苷类成分均具有较好的营养价值和药用价值，存在于栝楼、当归、丹参等多种药用植物中^[15-17]。氨基酸是一类既含有氨基又含羧基的化合物，其对抗肿瘤、抑制咖啡因负面作用、调节人体血压、激素的分泌合成、营养和能量代谢等具有重要的作用^[18-22]。人体所需的氨基酸有 2 类，分别为必需氨基酸和非必需氨基酸，前者不能由机体直接合成，而需要从各种饮食中获取^[23]。核苷类化合物是生物细胞维持生命活动的基本组成部分及其歧化产物，参与 DNA 代谢过程和多种生理活动的调节和调制，广泛地存在于各种食材原料以及加工食品中，包括韭菜、蘑菇、婴儿乳制品等^[24-27]。

本实验选取同一栽培区新鲜的不同生长期地黄根与叶及不同产地地黄叶为研究对象，采用超高效液相色谱-三重四极质谱联用技术 (ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, UPLC-TQ-MS) 分析评价地黄根与叶中 5 种核苷类和 14 种氨基酸类成分动态变化，以期为地黄及地黄叶的食用价值与开发利用提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

河南省武陟县大封镇 2017 年 4~11 月的新鲜地黄样品；河南省武陟县大封镇（河南大封）、河南省南阳市南召县（河南南召）与河南省焦作市温县（河南温县）3 个产地 2017 年 7~12 月的新鲜地黄叶样品。经南京中医药大学段金廛教授鉴定为玄参科地黄 *R. glutinosa* Libosc 的新鲜块根和叶。

对照品 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid)、L-亮氨酸 (L-leucine)、L-甲硫氨酸 (L-methionine)、L-苯丙氨酸 (L-phenylalanine)、L-色氨酸 (L-tryptophan)、L-苏氨酸 (L-threonine)、L- α -丙氨酸 (L-alanine)、L-瓜氨酸 (L-citrulline)、L-谷氨酸 (L-glutamic acid)、L-谷氨酰胺 (L-glutamine)、L-天冬酰胺 (L-asparagine)、鸟苷 (guanosine)、L-缬氨酸 (L-valine)、L-脯氨酸 (L-proline)、胞苷 (cytidine)、腺嘌呤 (adenine)、L-赖氨酸 (L-lysine)、胸苷 (thymidine)、肌苷 (inosine) 均购自中国惠兴生化试剂有限公司，质量分数均大于 98 %。分析纯甲酸铵（上海凌峰化学试剂有限公司），分析纯乙酸铵（国药集团化学试剂有限公司）；水为 Millipore 超纯水；甲酸、甲醇及乙腈均为色谱纯；其他化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器

ACQUITY™ UPLC 超高效液相色谱系统与 Xevo™ TQ 质谱系统和 Masslynx 4.1 质谱工作站软件 (Waters 公司)；ML204, MS105 分析天平 (Mettler Toledo 公司)；Millipore Direct-Q3 Advantage 超纯水系统 (Millipore 公司)；DHG-9240A 型鼓风干燥箱 (一恒科学仪器有限公司)；WH-1 型微型涡旋混合仪 (沪西分析仪器厂)；KH-500 型超声波清洗器 (禾创超声仪器有限公司)。Waters 2424 型 ELSD 检测器 (Waters 公司)；MS203 型电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司)；Micofuge 22R Centrifuge 型离

心机（美国 Beckman Coulter 公司）；UV-2000 型紫外-可见分光光度计（莱伯泰仪器有限公司）。

2 方法

2.1 样品处理

选取 2017 年 4~11 月河南省武陟县大封镇的新鲜地黄用于测定不同生长期地黄根与叶中 5 种核苷类成分和 14 种氨基酸类成分分析；分别采集 2017 年 7~12 月河南省武陟县大封镇（河南大封）、河南省南阳市南召县（河南南召）与河南省焦作市温县（河南温县）3 个产地的新鲜地黄叶样品用于测定不同产地地黄叶中 5 种核苷类成分和 14 种氨基酸类成分的动态积累研究。每次采收均以随机抽样的方式选择地黄植株 6 株，摘取各样品的部分叶片和根，分别整理后经 45℃ 鼓风干燥箱烘干后，研细，过 40 目筛，备用。不同生长期地黄根与叶样品信息见表 1，不同产地不同生长期地黄叶样品信息见表 2。

2.2 对照品溶液制备

分别称取干燥至恒定质量的各对照品适量，加甲醇配制成 γ -氨基丁酸、L-亮氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-色氨酸、L-苏氨酸、L- α -丙氨酸、L-瓜氨酸、L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、L-天冬酰胺、鸟

表 1 不同生长期地黄根与叶样品信息

Table 1 Information of roots and leaves in *R. glutinosa* at different growth periods

采收日期	部位	水分/%
2017-04-15	根	5.36
	叶	7.85
2017-06-15	根	7.98
	叶	4.66
2017-06-30	根	5.93
	叶	9.00
2017-07-15	根	8.08
	叶	7.41
2017-08-15	根	3.75
	叶	5.01
2017-08-30	根	2.60
	叶	7.21
2017-09-15	根	5.38
	叶	10.62
2017-10-04	根	3.12
	叶	6.37
2017-10-14	根	10.01
	叶	6.09
2017-10-30	根	3.25
	叶	3.83
2017-11-17	根	2.60
	叶	5.73

表 2 不同产地、不同生长期地黄叶样品信息

Table 2 Information of different cultivation regions and growth periods of leaves in *R. glutinosa*

产地	采集日期	水分/%
河南大封	2017-07-15	12.05
	2017-08-07	9.46
	2017-08-16	9.07
	2017-09-01	14.31
	2017-09-15	13.10
	2017-10-04	8.87
	2017-10-16	11.06
	2017-10-30	4.94
	2017-11-17	5.34
	2017-12-20	4.66
河南温县	2017-07-17	9.92
	2017-08-05	9.49
	2017-08-17	10.63
	2017-09-02	12.81
	2017-09-18	15.16
	2017-10-04	6.60
	2017-10-20	6.13
	2017-11-03	5.46
	2017-11-20	6.76
	2017-12-04	5.49
河南南召	2017-07-17	9.26
	2017-08-05	11.55
	2017-08-17	9.77
	2017-09-02	9.18
	2017-09-18	8.31
	2017-10-04	7.09
	2017-10-27	6.68
	2017-11-03	6.26
	2017-11-20	5.72
	2017-12-04	6.41

苷、L-缬氨酸、L-脯氨酸、胞苷、腺嘌呤、L-赖氨酸、胸苷、肌苷质量浓度分别为 0.101、0.192、0.067、0.220、0.162、0.144、0.284、0.129、0.303、0.151、0.150、0.116、0.174、0.118、0.126、0.096、0.114、0.116、0.203 mg/mL 的混合对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

取各样品粉末 1.0 g，精密称定，置于 100 mL 具塞锥形瓶中，精密加入 50 mL 水，称定质量，静置 1 h，超声 30 min，称定质量，加水补足失量，摇匀，滤过，取续滤液，离心（13 000 r/min、10 min），取上清液，经 0.22 μ m 滤膜滤过后，即得。

2.4 液质条件

ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱（100 mm $\times$ 2.1 mm，1.7 μ m）。流动相 A（5 mmol/L 甲酸铵、乙酸铵、0.2% 甲酸水溶液）-B（1 mmol/L 甲酸铵、

乙酸铵、0.2%甲酸乙腈溶液)。梯度洗脱: 1~3 min, 10% A; 3~9 min, 10%~18% A; 9~15 min, 18%~20% A; 15~16 min, 20%~46% A; 16~18 min, 46% A。进样量为 2 μ L, 体积流量为 0.4 mL/min, 柱温恒定为 35 $^{\circ}$ C。离子化模式: ESI⁺模式; MRM

方式检测, 毛细管电压为 3.0 kV, 离子源温度为 120 $^{\circ}$ C; 脱溶剂气流量和温度分别为 1000 L/h 和 550 $^{\circ}$ C, 碰撞、锥孔气流量分别为 0.15 mL/min、20 L/h, 取样锥孔电压和碰撞能量分别为 4 V 和 18 eV。各化合物具体质谱检测条件见表 3。

表 3 核苷类与氨基酸类物质质谱参数

Table 3 Mass spectrometry parameters of nucleosides and amino acids

化合物	简称	t_R /min	m/z	碰撞能/eV	锥孔电压/V	MRM
γ -氨基丁酸	γ -NH ₂	3.58	103	10	16	103.904>87
L-亮氨酸	Leu	3.86	131	10	16	132.096>86.052
L-甲硫氨酸	Met	4.70	149	10	14	150.096>104.026
L-苯丙氨酸	Phe	3.62	165	14	18	166.096>120.05
L-色氨酸	Try	3.83	204	18	16	205.096>146.026
L-苏氨酸	Thr	8.51	119	20	38	120.032>74
L- α -丙氨酸	Ala	7.45	89	10	16	90.032>44.022
L-瓜氨酸	Cit	11.26	174	20	16	175.968>69.89
L-谷氨酸	Glu	9.15	147	14	12	147.91>83.91
L-谷氨酰胺	Gln	10.02	146	16	8	146.97>83.917
L-天冬酰胺	Asn	10.43	131	14	12	132.89>73.87
鸟苷	Guad	3.22	283	20	30	152>152
L-缬氨酸	Val	4.99	117	10	12	118.032>72.058
L-脯氨酸	Pro	5.31	115	10	20	115.968>70.023
胞苷	Cytd	4.24	243	10	28	243.968>111.902
腺嘌呤	Ade	1.82	135	20	30	135.968>136
L-赖氨酸	Lys	10.05	146	14	14	147.01>83.91
胸苷	Thyd	1.17	241	10	10	242.968>126.896
肌苷	Ino	2.74	268	14	10	269.032>136.856

2.5 方法学考察

2.5.1 线性方程的绘制 线性关系和定量限 (LOQ) 考察: 取“2.2”项下对照品储备液, 用甲醇成倍稀释成不同质量浓度的对照品溶液, 按“2.4”项条件下测

定, 以各化合物峰面积为纵坐标 (Y), 对照品溶液质量浓度为横坐标 (X), 进行线性回归分析, 结果见表 4。LOQ 在信噪比 (S/N) 为 10 时测定。

2.5.2 精密度试验 取“2.2”项下混合对照品溶液,

表 4 19 个化合物的标准曲线、线性范围和 LOQ

Table 4 Standard curve, linear range and LOQ of 19 compounds

化合物	线性方程	R^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	LOQ/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
γ -NH ₂	$Y=8\,214.3\,X-2\,418.5$	0.999 9	0.101~50.500	0.156
Leu	$Y=10\,088\,X-6\,776.3$	0.997 2	0.192~19.200	0.233
Met	$Y=1\,053.8\,X-375.32$	0.999 0	0.067~33.500	0.028
Phe	$Y=55\,910\,X+3\,019.9$	0.993 7	0.220~22.000	0.008
Try	$Y=23\,389\,X-1\,307.5$	0.998 9	0.162~162.000	0.123
Thr	$Y=231.98\,X-386.92$	0.995 6	0.144~72.000	0.391
Ala	$Y=191.36\,X-108.07$	0.999 6	0.284~28.400	0.082
Cit	$Y=2\,486.3\,X-890.26$	0.993 5	0.129~12.900	0.006
Glu	$Y=824.86\,X+258.27$	0.999 0	0.303~303.000	0.106
Gln	$Y=7\,757.3\,X-1\,466.7$	0.995 4	0.151~151.000	0.124
Asn	$Y=315.28\,X-549.51$	0.998 5	0.150~150.000	0.365
Guad	$Y=1\,155.7\,X+120.3$	0.993 6	0.116~58.000	0.076
Val	$Y=13\,603\,X-31\,521$	0.995 2	0.174~87.000	0.012
Pro	$Y=7\,259\,X-4\,567.6$	0.999 5	0.118~59.000	0.119
Cytd	$Y=1\,951.4\,X-1\,143.3$	0.998 9	0.126~63.000	0.135
Ade	$Y=86\,481\,X+72\,985$	0.993 6	0.096~9.600	0.058
Lys	$Y=7\,616\,X-14\,175$	0.998 4	0.114~114.000	0.081
Thyd	$Y=1\,622.4\,X-287.62$	0.999 3	0.116~11.600	0.255
Ino	$Y=6\,551.3\,X-2\,577.8$	0.999 9	0.203~101.500	0.298

在“2.4”项条件下连续进样 6 次,记录各成分峰面积,分别计算各成分峰面积 RSD, RSD 均小于 4.91%。

2.5.3 重复性试验 取样品(2017-08-15 地黄叶)6 份,按照“2.3”项下方法制备成供试品溶液,在“2.4”项条件下进样检测,记录各成分含量,分别计算各成分峰面积 RSD, RSD 均小于 4.54%。

2.5.4 稳定性试验 取样品(2017-08-15 地黄叶)。按照“2.3”项下方法制备成供试品溶液,分别于 0、4、8、12、18、24 h 时,按照“2.4”项条件进行测定,记录各成分峰面积,分别计算各成分峰面积 RSD, RSD 均小于 4.97%。

2.5.5 加样回收率试验 称取已测定的样品(2017-08-15 地黄叶)约 0.5 g,平行 6 份,加入一定量的混合对照品溶液,按“2.3”项条件制备供试品溶液,并按照“2.4”项条件测定各成分含量,计算其回收率,各化合物的平均加样回收率为 96.4%~105.7%, RSD 为 1.19%~4.41%。

3 结果与分析

3.1 UPLC-TQ-MS 分析检测条件的确定

所用 UPLC-TQ-MS 分析检测条件可使 5 种核苷与 14 种氨基酸类成分有效分离,可用于不同生长期地黄根与叶中各样品中核苷类和氨基酸类成分的测定。色谱图见图 1。

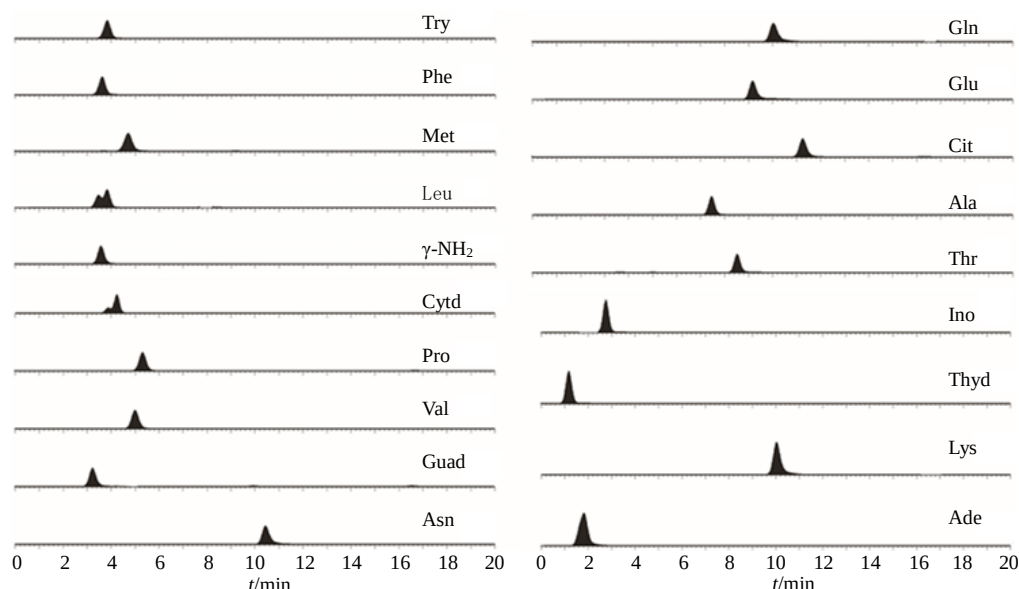


图 1 核苷类和氨基酸类 UPLC-TQ-MS 色谱图

Fig. 1 UPLC-TQ-MS chromatogram of nucleosides and amino acids

3.2 不同生长期地黄根与叶中核苷类和氨基酸类成分动态积累分析

不同生长期地黄根与叶中核苷类和氨基酸类成分含量测定结果如图 2 所示。不同生长期地黄中 *L*-瓜氨酸、*L*-谷氨酸、*L*-谷氨酰胺和 *L*-赖氨酸含量根>叶。不同生长期地黄中 γ -氨基丁酸、*L*-亮氨酸、*L*-甲硫氨酸、*L*-苯丙氨酸、*L*-色氨酸、*L*-苏氨酸、*L*- α -丙氨酸、*L*-天冬酰胺、鸟苷、*L*-缬氨酸、*L*-脯氨酸、胞苷、腺嘌呤、胸苷和肌苷含量地黄叶>根。地黄根和叶中测得的核苷类和氨基酸类成分总量分别在 10 月下旬和 11 月中旬含量最高,分别为 25.32、16.97 mg/g,其中 *L*-谷氨酰胺与 *L*-赖氨酸含量最多,占总含量的 60%以上。所测核苷类成分中,4 月中旬至 7 月中旬,

鸟苷含量相对较高;而 8 月中旬至 11 月中旬,胞苷和肌苷含量相对较高。

3.3 不同产地不同生长期地黄叶中核苷与氨基酸类成分分析

由图 3 可看出,来自河南大封、河南温县、河南南召 3 个产地中各生长期地黄叶中核苷与氨基酸类成分总含量普遍在 9 月中旬到 10 月中下旬较高,最高可达 30.756 mg/g,后有所降低。其中河南温县与河南南召含量较高,且后者出现了 2 次明显的峰值,而河南大封在不同生长期的含量变化较为平稳。

4 讨论

本研究采用 UPLC-TQ-MS 法同时分析测定地黄叶与根中 5 种核苷类成分与 14 种氨基酸类成分,结果显示核苷类成分主要存在于地黄叶中,同时地

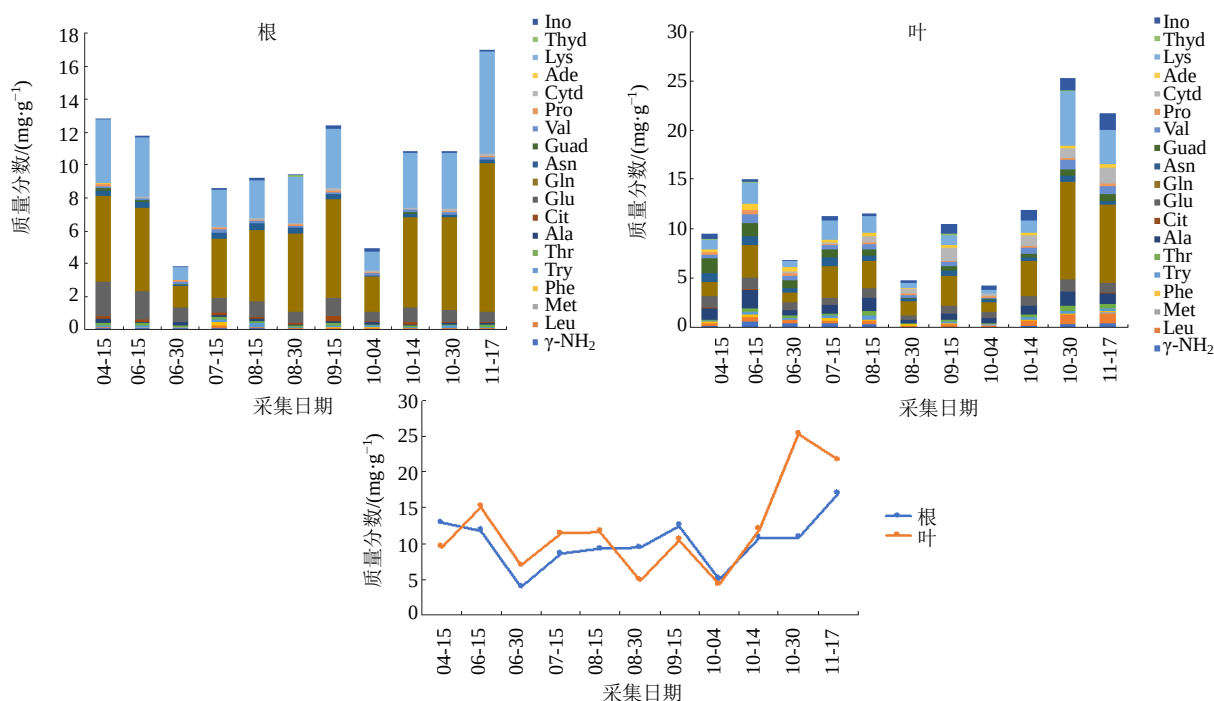


图 2 不同生长期地黄根与叶中核苷与氨基酸动态积累规律

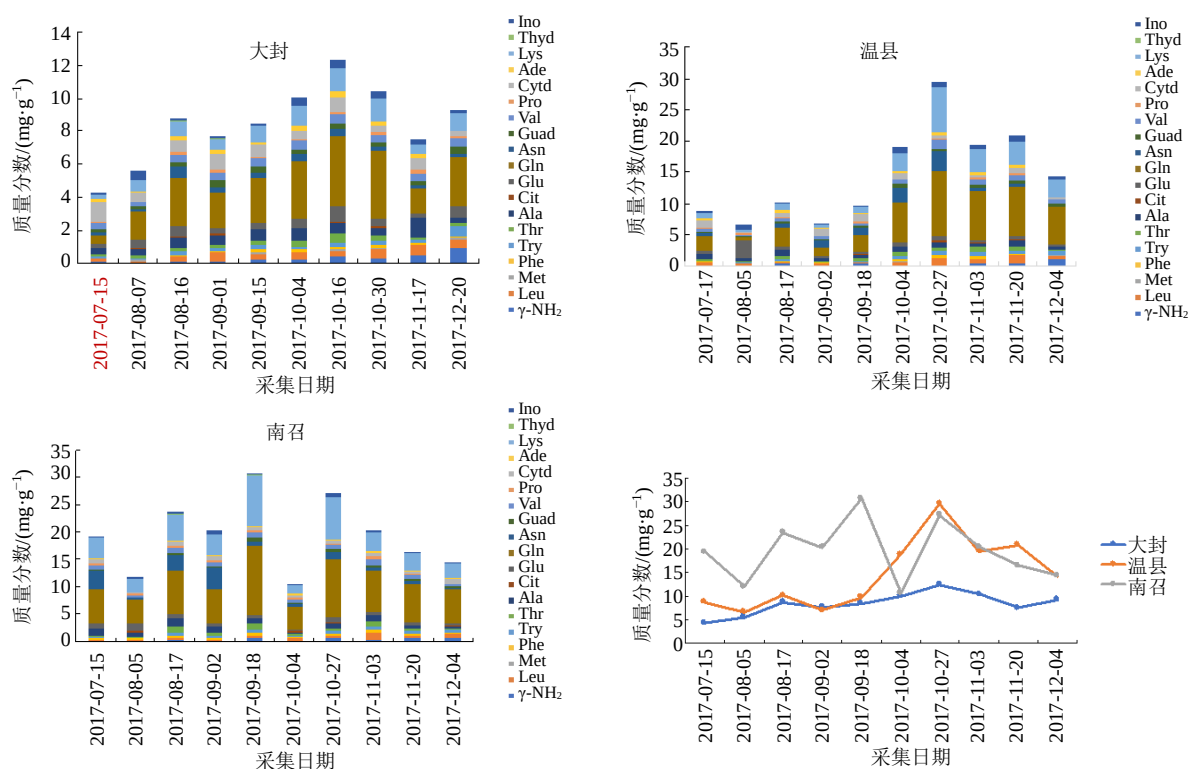
Fig. 2 Dynamic accumulation of nucleosides and amino acids in roots and leaves of *R. glutinosa* at different growth periods

图 3 不同产地和不同生长期地黄叶中核苷与氨基酸动态积累规律

Fig. 3 Dynamic accumulation of nucleosides and amino acids in leaves of *R. glutinosa* at different cultivation regions and growth periods

黄叶中氨基酸类成分的含量和种类也比地黄根中的多；尤其是在 6 月中旬至 8 月中旬和 10 月下旬，2 类成分在地黄叶的总含量均高于地黄根中的总含量，其中 *L*-谷氨酰胺与 *L*-赖氨酸含量占比最高。研究表明^[28-32]，谷氨酰胺是人体内含量最高的氨基酸，对人体具有提高机体免疫、预防肥胖、改善疲劳等广泛而重要的作用；赖氨酸是人类食用谷类作物中的第一限制氨基酸，常被作为营养补充剂应用于食品行业。由此可见，日常生活中若将地黄作为食材食用，可为机体提供丰富的营养。

地黄根与叶中 5 种核苷和 14 种氨基酸成分含量均于 10 月中旬左右开始呈现较明显的上升趋势，与文献报道^[33]地黄块根中总氨基酸含量动态积累的结果一致，且与地黄传统采收期在 10 月份前后相吻合。有研究发现^[34]不同地区的地黄中 5 种核苷和碱基成分（次黄嘌呤、尿苷、腺嘌呤、鸟苷和腺苷）含量存在显著差异。黄春跃等^[35]的研究结果也显示不同产地的地黄，由于经纬度及生长环境的不同，其指纹图谱也有一定程度的差异。本研究发现来自河南大封、温县、南召 3 个产地各生长期地黄叶中的 5 种核苷和 14 种氨基酸类物质含量存在明显的不同，其中以河南南召产者含量较高，总含量最高可达 30.756 mg/g。该发现提示在种植地黄药材时需要充分遵循因地制宜的原则，为其提供有利的生长环境。本实验还发现河南南召地黄叶中所测成分的总含量出现了 2 次显著的峰值，分别在 9 月中旬和 10 月下旬，且前者具有更高的峰值，为其作为食品或具有营养价值的资源利用的合理采收提供了一定的依据，以充分开发和利用其叶作为核苷类和氨基酸类成分补充剂。

本实验首次建立了 UPLC-TQ-MS 同时分析测定地黄叶与根中核苷类与氨基酸类成分，此方法操作简便、精密度和重复性较好，快速且准确。本文阐明了地黄中核苷类和氨基酸类成分的分布和动态积累过程；从核苷类和氨基酸类成分角度为地黄叶资源的药食两用价值发现提供了科学依据，并提出根据地黄不同的药食需求，在不同时间对不同地区地黄的不同部位进行合理采收的策略，为地黄资源的综合利用效率提升提供了理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 115.
- [2] Xu Z, Dai X, Su S, et al. Investigation of dynamic

accumulation and regularity of nine glycosides and saccharides in *Rehmannia glutinosa* by rapid quantitative analysis technology [J]. *J Sep Sci*, 2019, 42(8): 1489-1499.

- [3] 庞静. 地黄叶活性成分及质量控制研究 [D]. 太原: 山西中医药大学, 2019.
- [4] 陈金鹏, 张克震, 刘毅, 等. 地黄化学成分和药理作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(6): 1772-1784.
- [5] 郭嘉吻, 马慧, 何伟明, 等. 地黄中活性成分的提取及抑菌实验研究 [J]. *上海化工*, 2013, 38(12): 6-10.
- [6] 郑晓珂, 杨雁芸, 张艳丽, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定地黄饮片中 7 种核苷类成分的含量 [J]. *中药材*, 2018, 41(5): 1142-1144.
- [7] Wang L Y, Yu X, Li X X, et al. Catalpol exerts a neuroprotective effect in the MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 11: 316.
- [8] Meng J, Zhang W, Wang C, et al. Catalpol suppresses osteoclastogenesis and attenuates osteoclast-derived bone resorption by modulating PTEN activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 171: 113715.
- [9] Chen Y, Liu Q, Shan Z, et al. The protective effect and mechanism of catalpol on high glucose-induced podocyte injury [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 244.
- [10] Gong W, Zhang N D, Cheng G, et al. *Rehmannia glutinosa* libosch extracts prevent bone loss and architectural deterioration and enhance osteoblastic bone formation by regulating the IGF-1/PI3K/mTOR pathway in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(16): 3964.
- [11] Qiao Z, Tang J, Wu W, et al. Acteoside inhibits inflammatory response via JAK/STAT signaling pathway in osteoarthritic rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 264.
- [12] Xu L, Kwak M, Zhang W, et al. *Rehmannia glutinosa* polysaccharide induces toll-like receptor 4 dependent spleen dendritic cell maturation and anti-cancer immunity [J]. *Oncoimmunology*, 2017, 6(7): e1325981.
- [13] Zhou J, Xu G, Yan J Y, et al. *Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) DC. polysaccharide ameliorates hyperglycemia, hyperlipemia and vascular inflammation in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 164: 229-238.
- [14] Xu L, Zhang W, Zeng L, et al. *Rehmannia glutinosa* polysaccharide induced an anti-cancer effect by activating natural killer cells [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 105(pt 1): 680-685.

- [15] Zhang H Q, Liu P, Duan J A, *et al.* Comparative analysis of carbohydrates, nucleosides and amino acids in different parts of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. by (ultra) high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry and evaporative light scattering detector methods [J]. *Molecules*, 2019, 24(7): 1440.
- [16] Zhu S Q, Guo S, Duan J A, *et al.* UHPLC-TQ-MS coupled with multivariate statistical analysis to characterize nucleosides, nucleobases and amino acids in *Angelicae Sinensis Radix* obtained by different drying methods [J]. *Molecules*, 2017, 22(6): 918.
- [17] Xiang X, Sha X, Su S, *et al.* Simultaneous determination of polysaccharides and 21 nucleosides and amino acids in different tissues of *Salvia miltiorrhiza* from different areas by UV-visible spectrophotometry and UHPLC with triple quadrupole MS/MS [J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(5): 996-1008.
- [18] Zhou G, Pang H, Tang Y, *et al.* Hydrophilic interaction ultra-performance liquid chromatography coupled with triple-quadrupole tandem mass spectrometry for highly rapid and sensitive analysis of underivatized amino acids in functional foods [J]. *Amino Acids*, 2013, 44(5): 1293-1305.
- [19] Wang L, Xu R J, Hu B, *et al.* Analysis of free amino acids in Chinese teas and flower of tea plant by high performance liquid chromatography combined with solid-phase extraction [J]. *Food Chem*, 2010, 123(4): 1259-1266.
- [20] Poggiogalle E, Fontana M, Giusti A M, *et al.* Amino acids and hypertension in adults [J]. *Nutrients*, 2019, 11(7): 1459.
- [21] Genchi G. An overview on d-amino acids [J]. *Amino Acids*, 2017, 49(9): 1521-1533.
- [22] Dato S, Hoxha E, Crocco P, *et al.* Amino acids and amino acid sensing: Implication for aging and diseases [J]. *Biogerontology*, 2019, 20(1): 17-31.
- [23] Wang G P, Xu M Y, Wang W Y, *et al.* Fortifying horticultural crops with essential amino acids: A review [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6): 1306.
- [24] Jacobson K A, Jarvis M F, Williams M. Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets [J]. *J Med Chem*, 2002, 45(19): 4057-4093.
- [25] Gu S, Wang X Y, Zhou R, *et al.* Isolation and identification of nucleosides/nucleotides raising testosterone and NO levels of mice serum from Chinese chive (*Allium tuberosum*) leaves [J]. *Andrologia*, 2019, 51(2): e13191.
- [26] Phan C W, Wang J K, Cheah S C, *et al.* A review on the nucleic acid constituents in mushrooms: Nucleobases, nucleosides and nucleotides [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2018, 38(5): 762-777.
- [27] Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines [J]. *Pharmacol Rev*, 1998, 50(3): 413-492.
- [28] Cruzat V, Macedo Rogero M, Noel Keane K, *et al.* Glutamine: Metabolism and immune function, supplementation and clinical translation [J]. *Nutrients*, 2018, 10(11): 1564.
- [29] Olaniyi K S, Olatunji L A. Inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase-4 by l-glutamine protects pregnant rats against fructose-induced obesity and hepatic lipid accumulation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 59-67.
- [30] Coqueiro A Y, Rogero M M, Tirapegui J. Glutamine as an anti-fatigue amino acid in sports nutrition [J]. *Nutrients*, 2019, 11(4): 863.
- [31] Rutherford S M. Use of the guanidination reaction for determining reactive lysine, bioavailable lysine and gut endogenous lysine [J]. *Amino Acids*, 2015, 47(9): 1805-1815.
- [32] Cheng J, Chen P, Song A, *et al.* Expanding lysine industry: Industrial biomanufacturing of lysine and its derivatives [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2018, 45(8): 719-734.
- [33] 陈燕, 姜迪, 张飞, 等. 温 9302 地黄块根中化学成分动态积累规律研究 [J]. 中国现代中药, 2014, 16(5): 395-398.
- [34] 张文萌, 付文卫, 孙明瑜, 等. HPLC 法同时测定地黄中的 5 种核苷和碱基的含量 [J]. 药学报, 2011, 46(11): 1380-1384.
- [35] 黄春跃, 欧阳丹薇, 牛莉鑫, 等. 基于 HPLC 二维指纹图谱结合化学计量分析对生地黄质量评价研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(8): 1667-1674.

[责任编辑 时圣明]