

何首乌中核苷类成分 QTRAP UPLC-MS/MS 分析

徐力¹, 罗益远², 刘娟秀², 刘训红^{2*}, 房克慧¹, 兰才武³, 侯娅², 马阳²
(1. 扬州市药品检验所, 江苏扬州 225000; 2. 南京中医药大学, 南京 210023;
3. 贵州昌昊中药发展有限公司, 贵州凯里 556000)

[摘要] 目的:建立同时测定何首乌中10种核苷类成分的QTRAP UPLC-MS/MS分析方法,分析比较生何首乌和制何首乌中核苷类成分的差异。方法:采用QTRAP UPLC-MS/MS技术,Waters Atlantis T₃色谱柱(2.1 mm×150 mm,3 μm),流动相甲醇-5 mmol·L⁻¹乙酸铵(含0.1%冰乙酸),0.4 mL·min⁻¹梯度洗脱,采用正离子多反应监测模式测定何首乌商品药材中10种核苷类成分的含量。结果:10种核苷类成分具有良好的线性关系,相关系数均>0.99;何首乌商品药材中核苷类成分尿苷、腺嘌呤、鸟苷、胞苷含量均较高;生何首乌与制何首乌中核苷类成分含量差异明显。结论:该方法简便、灵敏、准确。该研究为何首乌药材内在质量的评价和控制提供可靠的检测方法。

[关键词] 何首乌; 超高压液相色谱-质谱联用; 核苷; 碱基

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0055-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200055

Analysis of Nucleosides and Nucleobases in Polygoni Multiflori Radix by UPLC-MS/MS XU Li¹, LUO Yi-yuan², LIU Juan-xiu², LIU Xun-hong^{2*}, FANG Ke-hui¹, LAN Cai-wu³, HOU Ya², MA Yang²
(1. Yangzhou Institute for Drug Control, Yangzhou 225000, China; 2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023 China; 3. Guizhou Chang Hao Chinese Medicine Co. Ltd., Kaili 556000, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a UPLC-QTRAP-MS/MS analysis method for the simultaneous determination of 10 nucleosides and nucleobases in Polygoni Multiflori Radix, and analyze the differences of nucleosides and nucleobases in raw and prepared Polygoni Multiflori Radix. **Method:** QTRAP UPLC-MS/MS technology was performed on a Waters Atlantis T₃ column (2.1 mm×150 mm, 3 μm), eluted by a mobile phase of methanol-5 mmol·L⁻¹ ammonium acetate (0.1% acetic acid) at a flow rate of 0.4 mL·min⁻¹. Ten kinds of nucleosides and nucleobases were analyzed in the positive ion multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Result:** Ten nucleosides and nucleobases had good linearities, correlation coefficient > 0.99; the content of uridine, adenine, guanosine and cytidine was higher in Polygoni Multiflori Radix; there was significant difference in nucleoside compositions between raw and prepared Polygoni Multiflori Radix. **Conclusion:** The method is simple, sensitive, accurate, and can provide a reliable and effective technique for the quality control of Polygoni Multiflori Radix.

[Key words] Polygoni Multiflori Radix; QTRAP LC-MS/MS; nucleosides; nucleobases

何首乌为大宗常用中药材,自古享与人参、灵芝、冬虫夏草并称“四大仙草”的美誉。何首乌商品有生品与制品之分,二者功用各异。生何首乌具解毒、消痈、截疟、润肠通便之功效,用于疮痈、瘰疬、肠燥便秘等;制何首乌具补肝肾、益精血、乌须发、强筋骨之功效,用于血虚萎黄、眩晕耳鸣、须发早白、腰膝

酸软、高血脂^[1-2]。对何首乌的功效物质基础研究主要集中在二苯乙烯苷类^[3]、蒽醌类^[3-4]、黄酮类^[4-5]、磷脂类^[6]等。现版《中国药典》有关何首乌药材的质量评价多以二苯乙烯苷、蒽醌类成分为主要指标,核苷类成分的报道较少。大量研究证实,核苷类成分具有广泛的生理活性,广泛存在于一些补

[收稿日期] 20141104(026)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2011BAI13B04);江苏高校优势学科建设工程资助项目(yxsk-2014)

[第一作者] 徐力,主管药师,从事化学药、中成药分析技术研究和质量控制研究,Tel:13773501882,E-mail:sdfga48@126.com

[通讯作者] *刘训红,教授,从事中药鉴定与品质评价研究,Tel:13951976286,E-mail:liuxunh1959@sohu.com

益药材中,是生物细胞维持生命活动的基本组成元素,参与 DNA 代谢过程,具有抗肿瘤、抗病毒、免疫调节、改善脑细胞代谢等多种生物活性^[7-9];有学者认为核苷可能是补益中药的共同物质基础^[10]。因此核苷可作为何首乌的药效物质基础,以此作为药材质量评价的指标具有一定的科学性。本实验采用 QTRAP UPLC-MS/MS 技术同时测定何首乌商品药材中 10 种核苷类成分的含量,比较生何首乌和制何首乌中核苷类成分的差异,为何首乌药材内在质量的综合评价和全面控制提供可靠的检测方法。

1 材料

UPLC-20ADXR 系列液相(配有溶剂脱气装置、自动进样器,日本 Shimadzu 公司),API 4000 型四级杆-线性离子阱质谱仪(配有离子喷雾接口,美国 AB Sciex 公司),CentriVap 型离心浓缩仪(美国 Labconco 公司),BSA2245 型 1/10 万电子分析天平和 ME36S 型 1/100 万电子分析天平(德国赛多利斯公司)。

尿嘧啶(批号 100469-200401),鸟嘌呤(批号 140631-200904),尿苷(批号 887-200202),腺嘌呤(批号 110886-200001),肌苷(批号 40669-201104),腺苷(批号 110879-200202)对照品购自中国食品药品检定研究院,纯度均 > 98%;胞苷(批号 100982718),鸟苷(批号 1001103046),胸苷(批号 1001182663)对照品购于美国 Sigma 公司,纯度均 > 98%;2'-脱氧胞苷对照品(批号 YSJ-04024)购于上海远慕生物科技有限公司,纯度 > 98%。水为自制超纯水,甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

何首乌药材均为采集或购自当地药材公司,生何首乌药材编号及来源为 S1-亳州产,S2-江苏句容产,S3-南京宣德堂中医门诊药房提供,S4-四川产(批号 110722),S5-广东产(批号 130513287),S6-四川产(批号 131103),S7-贵州赫章产;制何首乌药材编号及来源为 Z1-北京同仁堂南京店提供,Z2-四川产(批号 131209),Z3-江苏产(批号 130223),Z4-江苏省中医院提供,Z5-南京宣德堂中医门诊药房提供,Z6-湖北产(批号 131101),Z7-为 S7 根据《中国药典》2010 年版一部制何首乌方法制得对应的制何首乌样品;所有样品均经南京中医药大学药学院刘训红教授鉴定为何首乌 *Polygonum multiflorum* 的干燥块根,留样凭证保存于南京中医药大学中药鉴定实验室。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters Atlantis T₃ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 3 μm),流动相甲醇(A)-5

mmol·L⁻¹ 乙酸铵(含 0.1% 冰乙酸,B)梯度洗脱(0~4.5 min,3%~4% A;4.5~8 min,4%~18% A;8~10 min,18% A;10~10.1 min,18%~3% A;10.1~13 min,3% A),柱温 35 °C,流速 0.4 mL·min⁻¹,检测波长 254 nm,进样量 5 μL。

2.2 质谱条件 离子源 Turbo V,电离模式 ESI⁺,采集方式 MRM,离子化温度(TEM)650 °C。喷雾电压 5 500 V,雾化气(GS1)65 L·min⁻¹,辅助气(GS2)65 L·min⁻¹,气帘气(CUR)30 L·min⁻¹。10 种核苷的质谱参数见表 1。

表 1 优化的质谱条件参数

Table 1 Optimized MS/MS parameters for the determination of 10 nucleosides and nucleobase

化合物	t _R /min	MRM 参数		
		MRM 离子对 m/z	去簇电压 DP/V	碰撞能量 CE/eV
尿嘧啶	2.03	113.0 ~ 96.1	68	23
胞苷	2.41	243.9 ~ 112.1	95	18
鸟嘌呤	2.92	151.8 ~ 135.0	54	27
尿苷	3.76	244.7 ~ 113.1	40	12
腺嘌呤	4.71	136.0 ~ 119.1	66	29
肌苷	7.19	269.0 ~ 137.0	39	15
鸟苷	7.57	284.3 ~ 152.1	42	16
胸苷	9.12	243.1 ~ 127.2	41	12
腺苷	9.88	268.1 ~ 136.1	73	24
2'-脱氧胞苷	3.37	227.9 ~ 112.1	87	13

2.3 对照品溶液制备 精密称取一定量的尿嘧啶、鸟嘌呤、胞苷、尿苷、腺嘌呤、肌苷、鸟苷、胸苷、腺苷和 2'-脱氧胞苷对照品,分别加水配制成一定质量浓度的对照品储备液。取各对照品储备液适量,置 10 mL 量瓶中,加水定容,配制成质量浓度分别为 10.76,10.30,7.51,10.48,9.64,10.37,9.72,8.74,10.94,9.11 mg·L⁻¹ 的混合对照品照液。

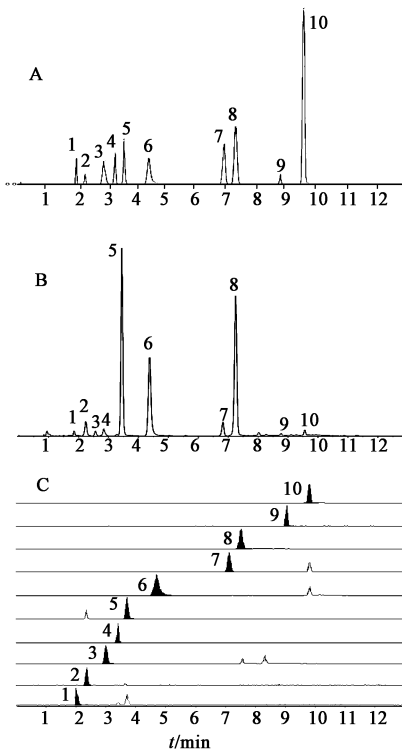
2.4 供试品溶液制备 精密称定干燥恒重的样品 1.0 g(过 80 目),置于 25 mL 具塞锥形瓶中,加入水 10 mL,称重,室温下超声提取 60 min 后取出,放冷以超纯水补足失重,提取液 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取出上清液并于 4 °C 保存,使用时用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.5 标准曲线、检测限和定量限 精密吸取 2.3 项下混合对照品溶液 0.05,0.1,0.5,2.0,5.0,10.0 mL,置 10 mL 量瓶中,定容摇匀。精密吸取 5 μL,按上述色谱-质谱条件进样分析,以对照品的峰面积(Y)对相应的浓度(X)进行线性回归,得回归方程、相关系数、线性范围以及各化合物最低检测限(LOD)、最低定量限(LOQ)。结果见表 2,图 1。

表 2 10 种核苷标准曲线、定量限和检测限

Table 2 Calibration curve, LOD and LOQ of 10 nucleosides and nucleobases

化合物	回归方程	r	线性范围/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	LOD/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	LOQ/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
尿嘧啶	$Y = 112.52X + 14\ 679.79$	0.999 1	0.538 ~ 107.6	3.47	10.85
胞苷	$Y = 64.21X + 4\ 166.42$	0.992 5	0.375 ~ 75.1	6.64	17.26
鸟嘌呤	$Y = 524.14X + 14\ 226.00$	0.999 3	0.515 ~ 103.0	1.05	3.17
尿苷	$Y = 232.19X + 29\ 740.24$	0.999 5	0.524 ~ 104.8	3.61	11.91
腺嘌呤	$Y = 601.96X + 1.297 \times 10^5$	0.997 9	0.482 ~ 96.4	9.68	18.20
肌苷	$Y = 1\ 008.87X + 12\ 608.69$	0.995 5	0.519 ~ 103.7	3.46	10.24
鸟苷	$Y = 1\ 766.93X + 1.23 \times 10^5$	0.998 5	0.486 ~ 97.2	8.61	15.20
胸苷	$Y = 132.14X + 5\ 144.79$	0.990 9	0.437 ~ 87.4	3.04	8.99
腺苷	$Y = 2.74 \times 10^4 X + 1.02 \times 10^6$	0.998 9	0.547 ~ 109.4	3.64	9.41
2'-脱氧胞苷	$Y = 317.00X - 29\ 846.00$	0.997 1	0.455 ~ 91.1	2.29	8.49



1. 尿嘧啶; 2. 胞苷; 3. 鸟嘌呤; 4. 2'-脱氧胞苷; 5. 尿苷; 6. 腺嘌呤; 7. 肌苷; 8. 鸟苷; 9. 胸苷; 10. 腺苷; A. 对照品; B. 供试品; C. 10 种核苷的 MRM

图 1 何首乌总离子流及 10 种核苷的 MRM

Fig. 1 TIC of extract from Polygoni Multiflori Radix, MRM chromatograms of each nucleosides and nucleobases in mixture standards

2.6 方法学考察 精密度、重复性、稳定性试验: 精密吸取同一混合对照品溶液分别重复进样 6 次, 分别计算 10 种核苷的峰面积的 RSD; 取同一样品, 按照样品制备方法制备供试品溶液, 进样, 重复测定 6 次, 计算各核苷的含量的 RSD; 取同一样品制备供试品溶液, 分别在 1, 3, 6, 12, 18, 24 h 测定 10 种核苷的含量并计算其 RSD, 结果见表 3。

加样回收率试验: 取已知含量的样品 0.5 g (6

表 3 精密度、重复性、稳定性和加样回收率试验 (n=6)

Table 3 Precision, repeatability and stability recovery of 10 nucleosides and nucleobases (n=6) %

化合物	精密度 RSD	重复性 RSD	稳定性 RSD	加样回收率	
				平均回收率	RSD
尿嘧啶	2.1	2.6	3.2	100.81	2.2
胞苷	3.0	1.9	1.5	98.86	2.0
鸟嘌呤	4.4	3.6	1.9	100.28	2.0
尿苷	1.6	1.9	2.7	99.71	2.5
腺嘌呤	0.9	2.0	4.1	100.39	2.3
肌苷	3.1	4.5	3.7	102.54	1.8
鸟苷	3.7	0.6	2.5	99.82	3.0
胸苷	1.4	3.4	1.7	100.46	2.8
腺苷	1.9	1.4	2.7	98.80	2.1
2'-脱氧胞苷	3.1	1.9	1.5	101.61	1.9

份), 精密称定, 置锥形瓶中, 分别精密加入一定量各对照品溶液, 根据 2.4 项下方法制备加样回收率供试品溶液, 根据样品测定方法进样, 计算各核苷的平均回收率及 RSD, 结果见表 3。

2.7 样品含量测定 取方法制备各何首乌供试品溶液, 按照上述色谱-质谱条件测定, 根据相应线性关系计算供试样品中 10 种核苷的含量, 结果见表 4。

3 讨论

3.1 色谱-质谱条件的优化 Waters Atlantis T₃ C₁₈ 色谱柱, 其采用三官能团 C₁₈ 烷基键合相, 保证键合密度能提升极性化合物的保留并且 100% 水相流动相兼容, 对强极性物质有很好的保留, 本实验选择 T₃ 色谱柱进行分离。另外, 实验中对流动相的甲醇-水、乙腈-水、甲醇-(0.1% 甲酸) 乙酸胺、乙腈-(0.1% 甲酸) 乙酸胺、流速、柱温等进行考察, 最终确定了最佳的色谱条件, 见 2.1 项。在优化的色谱条件下, 各化合物的分离度均 > 1.5。考虑到同时检测多种核苷及碱基, 因此选择正离子模式作为质谱的离子化模式。

表 4 何首乌商品药材中核苷类成分含量 (n=2)

Table 4 Content of nucleosides and nucleobases in <i>Polygoni Multiflori Radix</i> (n=2)											μg·g ⁻¹
No.	尿嘧啶	胞苷	鸟嘌呤	尿苷	腺嘌呤	肌苷	鸟苷	胸苷	腺苷	2'-脱氧胞苷	总量
S1	5.504	15.024	0.419	93.245	40.401	2.286	21.112	4.055	2.693	1.287	186.025
S2	9.926	29.608	2.725	55.688	31.927	0.691	6.935	1.592	0.155	1.269	140.517
S3	6.049	34.742	2.771	145.040	45.909	3.405	20.777	3.012	0.008	1.253	262.967
S4	6.280	97.170	5.876	116.695	27.461	0.885	16.099	2.229	0.198	1.254	274.145
S5	3.279	31.153	7.252	71.309	27.043	0.488	5.082	3.284	0.054	1.252	150.196
S6	14.994	35.513	0.506	109.400	31.409	0.376	26.798	0.878	-	1.245	221.120
S7	4.947	3.376	tr	45.883	32.464	1.533	7.918	1.801	0.494	1.248	99.663
Z1	8.075	22.520	3.074	89.018	6.732	0.958	10.952	9.768	3.964	1.232	156.293
Z2	10.735	17.769	3.756	142.374	44.205	0.786	30.136	6.151	6.024	1.238	263.174
Z3	18.241	58.161	0.636	207.455	15.915	1.344	26.183	48.200	4.055	1.232	341.421
Z4	9.669	27.163	3.637	140.541	40.879	0.762	30.127	2.872	5.359	1.231	262.242
Z5	13.484	17.148	2.381	100.387	9.330	0.219	13.206	3.075	3.413	1.246	163.890
Z6	3.831	14.097	0.577	68.306	36.146	2.825	11.510	1.532	1.464	1.235	141.523
Z7	5.331	5.508	0.710	87.691	31.448	1.945	18.423	3.734	12.289	1.243	168.321

注：“tr”表示痕量。

3.2 供试品制备方法的优化 实验中对提取溶剂(水,30%及50%甲醇),料液比(1:5,1:10,1:15,1:20,1:25),提取方法(回流、超声处理)及提取时间(15,30,45,60 min)进行了单变量考察。结果表明,水作为最适合的溶剂可以提取出更多待测物;超声提取效果比回流提取好,且方便易行;因此选择水作溶剂,超声提取。料液比和提取时间优化后分别为1:10,60 min。

3.3 实验结果分析 本研究中以 QTRAP UPLC-MS/MS 测定何首乌商品药材中 10 种核苷类成分的含量。结果表明何首乌不同商品药材中 10 种核苷含量差异明显,其中尿苷、腺嘌呤、鸟苷、胞苷的含量均较高。由表 4 可知制何首乌中尿嘧啶、尿苷、鸟苷、胸苷、腺苷的含量比生何首乌高,且炮制后核苷类成分含量均有不同程度的增加,这可能与制何首乌补益作用增强的功效物质基础有关。

关于何首乌药材的质量评价,目前多以二苯乙烯苷、蒽醌类成分为主要指标,核苷类成分具有广泛的生理活性,可作为药材质量评价的一项指标。本文建立了 QTRAP UPLC-MS/MS 技术同时测定何首乌中 10 种核苷类成分含量的方法,比较生何首乌和制何首乌中核苷类成分及炮制前后的变化,从而为何首乌药材内在质量的综合评价和全面控制提供可靠的检测方法。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:164-165.
[2] 杨红莉,葛珍珍,孙震晓. 何首乌药理研究新进展

[J]. 中药材, 2013, 36(10):1713-1717.

[3] Li S G, Chen L L, Huang X J, et al. Five new stilbene glycosides from the roots of *Polygonum multiflorum*[J]. J Asian Nat Prod Res, 2013, 15(11):1145-1151.
[4] 陈庆堂,卓丽红,徐文,等. 何首乌炮制过程中 5 种化学成分的含量变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5):66-71.
[5] Zhu Z W, Li J, Gao X M, et al. Simultaneous determination of stilbenes, phenolic acids, flavonoids and anthraquinones in *Polygoni Multiflori Radix* by LC-MS/MS[J]. J Pharm Biomedical Anal, 2012, 62(2):162-166.
[6] 万益群,吴世芳. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法分析何首乌中磷脂类化合物[J]. 分析科学学报, 2008, 24(4):417-420.
[7] Kinahan J J, Kowal E P, Grindey G B. Biochemical and antitumor effects of the combination of thymidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine against leukemia L1210[J]. Cancer Res, 1981, 41(2):445-450.
[8] 张奉苏,陈菲,傅兴圣,等. 高效毛细管电泳法同时测定牛樟芝中 5 种核苷类成分的含量[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(12):1018-1021.
[9] Chen F, Zhang F S, Yang N Y, et al. Simultaneous Determination of Ten Nucleosides and Nucleobases in *Antrodia Camphorata* using QTRAP LC-MS/MS[J]. J Chromatogr Sci, 2013, doi:10.1093/chromsci/bmt128.
[10] 孔德平,钱大玮,郭盛,等. 9 种果实、种子类补益中药的核苷类成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4):98-101.

[责任编辑 顾雪竹]