

# 基于液质联用技术对不同产地淡豆豉 核苷和氨基酸类成分的分析

柴川<sup>1</sup>, 周礼明<sup>2</sup>, 崔小兵<sup>1</sup>, 戴贞丽<sup>1</sup>, 于生<sup>1</sup>, 单晨啸<sup>1</sup>, 文红梅<sup>1\*</sup>

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210029; 2. 南京易亨制药有限公司, 南京 211800)

**[摘要]** **目的:**建立液质联用技术同时测定不同产地淡豆豉中38种核苷和氨基酸类含量的方法。**方法:**采用超快速液相色谱和三重四极杆-线性离子阱串联质谱以及亲水色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm),流动相0.2%甲酸水-0.2%甲酸乙腈梯度洗脱,流速0.6 mL·min<sup>-1</sup>,采用电喷雾正离子化及多反应监测模式(MRM),对安徽、江苏、河南3个产区不同采收期共8个批次淡豆豉中的22种氨基酸类和16种核苷类成分进行含量测定;并对结果进行PCA-DA聚类分析及*t*检验。**结果:**所建方法使淡豆豉中22种氨基酸类和16种核苷类成分得到较好分离,浓度与峰面积呈良好的线性关系,加样回收率在93.74%~104.32%,RSD在0.6%~3.5%;8个批次样品基本可以测得22种氨基酸类和16种核苷类成分,各批次间核苷与氨基酸的含量都有明显差异,总氨基酸质量分数在7.241~34.21 mg·g<sup>-1</sup>,总核苷质量分数在14.21~82.53 mg·g<sup>-1</sup>;不同产地样品的氨基酸含量高低排序为安徽产>江苏产>河南产,不同产地样品的核苷含量高低排序为江苏产与安徽产>河南产,同一产地贮存时间短的样品总氨基酸和总核苷含量也高于贮存时间长的。**结论:**该方法适用于38种核苷和氨基酸类成分含量的同时测定,比较了不同产地淡豆豉的差异性,在一定程度上反应了不同产区间淡豆豉的质量优劣,为后续药效活性研究提供参考。

**[关键词]** 淡豆豉;液质联用技术;氨基酸;核苷;多反应监测模式;产地差异

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)23-0060-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2016230060

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160920.0954.068.html>

**[网络出版时间]** 2016-09-20 9:54

## Determination of Amino Acids and Nucleosides in Semen Sojae Praeparatum from Different Regions by Using UFLC-MS/MS

CHAI Chuan<sup>1</sup>, ZHOU Li-ming<sup>1</sup>, CUI Xiao-bing<sup>1</sup>, DAI Zhen-li<sup>1</sup>,  
YU Sheng<sup>1</sup>, SHAN Chen-xiao<sup>1</sup>, WEN Hong-mei<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmacy Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

2. Nanjing Easeheal Pharma ceutical Co. Ltd., Nanjing 211800, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method for content determination of amino acid and nucleoside in Semen Sojae Praeparatum from different origins. **Method:** The contents of 22 amino acids and 16 nucleosides in 8 bathes of Semen Sojae Praeparatum (collected from Anhui, Jiangsu and Henan provinces) were determined by an ultra fast liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometer. Waters XBridge Amide column (2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm) was used with 0.2% formic acid acetonitrile-0.2% formic acid solution as the mobile phase for gradient elution at a flow rate of 0.6 mL·min<sup>-1</sup>. In addition, electrospray ionization and multiple reaction monitoring (MRM) mode were used. The

**[收稿日期]** 20160414(012)

**[基金项目]** 江苏省高校自然科学基金基础研究项目(08KJB360004);南京中医药大学青年自然科学基金项目(12XZR24);江苏高校优势学科建设工程资助项目;江苏高校品牌专业建设工程资助项目(PPZY2015A070)

**[第一作者]** 柴川,博士,实验师,从事中药分析及代谢研究,Tel: 025-85811839,E-mail: echo\_0523@hotmail.com

**[通讯作者]** \*文红梅,教授,博士生导师,从事药物分析及代谢研究,Tel: 025-85811839,E-mail: njwenhm@126.com

results were used for PCA-DA cluster analysis and *t* test. **Result:** The 22 amino acids and 16 nucleosides in Semen Sojae Praeparatum were well separated, and showed good linear relationship between concentration and peak area. The average recovery rate was between 93.74% and 104.32%, RSD 0.6%-3.5%. There were significant differences in the amino acids and nucleosides contents among different batches. The total contents of amino acids were at 7.241-34.21 mg·g<sup>-1</sup>, and the total contents of nucleosides were at 14.21-82.53 mg·g<sup>-1</sup>. The contents of amino acids were in the following order from high level to low level: Anhui > Jiangsu > Henan, and nucleosides were in the following order from high level to low level: Jiangsu, Anhui > Henan. The total contents of amino acids and total contents of nucleosides in samples with shorter storage time were higher than those with longer storage time in the same region. **Conclusion:** This method is applicable for the simultaneous determination of contents of 38 kinds of amino acids and nucleosides. The differences in the study can fill up the blank in Semen Sojae Praeparatum from different origins reflect the quality of samples from different origins, and provide references for the further pharmacodynamic research.

[**Key words**] Semen Sojae Praeparatum; UFLC-MS/MS; amino acids; nucleosides; multiple reaction monitoring (MRM); different origins.

淡豆豉是由豆科植物大豆的成熟种子和青蒿、桑叶经发酵加工而成的制品,具有解表除烦,宣发郁热等功效<sup>[1]</sup>。

大豆富含大豆蛋白、大豆异黄酮、大豆皂苷、氨基酸、脂肪、多糖、酶、维生素和矿物质等营养成分<sup>[2]</sup>。前期研究发现淡豆豉的发酵中存在糖苷型大豆异黄酮向游离型苷元转化的过程<sup>[3]</sup>,使其在抗氧化、抗溶血、抗肿瘤、降血糖、调节血脂、防治心血管疾病等生物活性作用增强<sup>[4-9]</sup>;研究认为与原料熟黑豆相比,淡豆豉中游离氨基酸、B 族维生素、可溶性糖等的含量均有明显提高<sup>[10]</sup>,其大量的 B 族维生素和抗生素的细菌,不仅对治疗骨质疏松症、高血压、糖尿病等老年多发病有效,还具有抗菌性<sup>[11]</sup>;其多糖对化学体系产生的羟自由基和超氧阴离子有清除作用<sup>[12]</sup>;国内外学者证明,大豆发酵制品具有较强活性,是与发酵过程中酚酸类成分间的相互转化紧密联系在一起<sup>[13]</sup>;淡豆豉中的大豆皂苷具有抗氧化、抗肿瘤的作用<sup>[14-15]</sup>,而豆豉纤溶酶具有较强的纤溶活性和良好的体外溶栓效果<sup>[16]</sup>。

现阶段,不同来源、不同批次淡豆豉中,由于生产工艺、贮存条件不同所引起的成分含量及药效差异,并未得到关注;衍生化处理过程繁琐、损耗较大<sup>[17]</sup>,对其游离氨基酸量的测定比较局限,对其核苷的测定尚未见报道。为进一步控制淡豆豉质量,合理开发利用淡豆豉中的活性成分,本研究采用超快速液相与三重四极杆线性离子阱质谱联用技术<sup>[18]</sup>对不同产地、批次淡豆豉中 22 种氨基酸类和 16 种核苷类成分的含量进行同时测定,比较淡豆豉样品的差异性,为淡豆豉的质量评价提供新方法。

## 1 材料

SIL-20A XR 型超快速液相色谱仪(日本岛津公司,包括 LC-20AD 二元输液泵,STL-20A XR 自动进样器和 CTO-20AC 柱温箱),QTRAP 5500 型三重四极杆线性离子阱质谱仪(美国 AB Sciex 公司,配有电喷雾离子源、三重四极杆串联离子阱质量分析器和 Analyst 1.5.2 软件),高速万能粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司),TGL-16B 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂),Vortex Gene 2 型涡旋振荡器(上海医疗设备厂),KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),FA1104N 型分析天平(上海精密科学仪器有限公司)。

8 个批次淡豆豉样品分别从以下厂家购买,B1-河南 120217(安徽海鑫中药饮片有限公司);B2-河南 120313(亳州市永刚饮片厂有限公司);B3-河南 120628(亳州凯利中药饮片有限公司);B4-江苏 101026(安徽协和成药业饮片有限公司);B5-江苏 120131(南京药业股份有限公司中药饮片厂);B6-安徽 101031,B8-安徽 120901(安徽惠隆中药饮片有限公司);B7-安徽 120701(安徽天马中药饮片科技公司);经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为豆科植物大豆 *Glycine max* 的成熟种子发酵加工而成的制品。

对照品甘氨酸(Gly,批号 887-200202),胸腺嘧啶(Thymine,批号 140708-200401),腺嘌呤(Adenine,批号 886-200001),次黄嘌呤(Hypoxanthine,批号 140661-200301),黄嘌呤(Xanthine,批号 140662-200301),腺苷(Adenosine,批号 110879-200202),肌苷(Inosine,批号 140669-200903)购于中国食品药品检定研究院; $\gamma$ -氨基丁酸

(GABA, 批号 91H0762), 色氨酸 (Trp, 批号 LJ0919B807J), 亮氨酸 (Leu, 批号 CF1221B507Y), 异亮氨酸 (Ile, 批号 YY0525B1007Y), 苯丙氨酸 (Phe, 批号 CF1220B507Y), 缬氨酸 (Val, 批号 YY0903B507Y), 脯氨酸 (Pro, 批号 LS0213B507Y), 半胱氨酸 (Cys, 批号 YY0301B508Y), 谷氨酰胺 (Gln, 批号 LJ0612B507Y), 苏氨酸 (Thr, 批号 YY0327B1008Y), 羟脯氨酸 (Hpro, 批号 BCBP1335V), 天冬氨酸 (Asp, 批号 LL0122B058Y), 精氨酸 (Arg, 批号 YY0123B1008Y), 组氨酸 (His, 批号 CH0324B108Y), 赖氨酸 (Lys, 批号 YY0816B507Y), 甲硫氨酸 (Met, 批号 1090559), 丙氨酸 (Ala, 批号 1019S06), 丝氨酸 (Ser, 批号 100418), 天冬酰胺 (Asn, 批号 0522S06), 瓜氨酸 (Cit, 批号 1446225), 胞嘧啶 (Cytosine, 批号 C94998BGF0) 购于南京泽朗医药有限公司; 谷氨酸 (Glu, 批号 1001569133), 胸苷 (Thymidine, 批号 1000735425), 2'-脱氧尿苷 (2'-Deoxyuridine, 批号 1000943453), 2'-脱氧腺苷 (2'-Deoxyadenosine, 批号 1000723530), 尿苷 (Uridine, 批号 1001290893), 2'-脱氧肌苷 (2'-Deoxyinosine, 批号 5287), 2'-脱氧胞苷 (2'-Deoxycytidine, 批号 1000851526), 2'-脱氧鸟苷 (2'-Deoxyguanosine, 批号 1000814345), 胞苷 (Cytidine, 批号 101056874), 鸟苷 (Guanosine, 批号 6752) 购于美国 Sigma-Aldrich 公司, 纯度均 >98%。

甲醇、乙腈、甲酸、超纯水均为质谱级, 德国 Merck 公司。

## 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的制备** 精密称取干燥至恒重的对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 摇匀制成以下质量浓度的混合对照品贮备液, 分别为色氨酸  $1.075 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 亮氨酸  $1.082 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 异亮氨酸  $1.194 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 苯丙氨酸  $0.97 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\gamma$ -氨基丁酸  $1.058 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 甲硫氨酸  $1.35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 缬氨酸  $1.48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 脯氨酸  $1.052 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 丙氨酸  $1.322 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 半胱氨酸  $1.013 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 甘氨酸  $1.036 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 谷氨酰胺  $1.056 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 苏氨酸  $1.084 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 羟脯氨酸  $1.308 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 天冬氨酸  $1.139 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 丝氨酸  $1.03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 天冬酰胺  $1.064 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 瓜氨酸  $1.105 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 精氨酸  $2.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 组氨酸  $1.002 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 谷氨酸  $1.098 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 赖氨酸  $1.032 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 胸腺嘧啶  $1.38 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 胸苷  $1.012 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 2'-脱氧尿苷  $1.016 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 2'-脱氧腺苷  $1.065 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 腺嘌呤  $1.021 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 次黄嘌呤  $1.065 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 尿苷  $1.017 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 腺苷  $1.026 \text{ g} \cdot$

$\text{L}^{-1}$ , 2'-脱氧肌苷  $1.052 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 黄嘌呤  $1.027 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 2'-脱氧胞苷  $0.186 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 肌苷  $1.052 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 2'-脱氧鸟苷  $1.005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 胞苷  $1.015 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 胞嘧啶  $1.019 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 鸟苷  $1.085 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取不同体积的上述贮备液加水稀释后, 制成不同浓度的系列对照品溶液。对照品溶液在注入液相色谱仪前经  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过。

**2.2 供试品溶液的制备** 将淡豆豉粉碎, 过 80 目筛后, 密闭保存备用; 称取各批次淡豆豉样品 1 g, 精密称定, 置具塞离心管中, 精密加水 20 mL, 室温浸渍 60 min, 再超声提取 (250 W, 50 kHz) 60 min,  $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 滤过, 吸取上清液, 即得供试品溶液, 于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存, 备用。注入液相色谱仪前经  $0.22 \mu\text{m}$  的微孔滤膜滤过。

## 2.3 色谱与质谱条件

**2.3.1 色谱条件** 岛津 SIL-20A XR 型超快速液相色谱系统进行色谱分离, 采用 Waters XBridge Amide 亲水色谱柱 ( $2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ ,  $3.5 \mu\text{m}$ ), 以 0.2% 甲酸水溶液 (A)-0.2% 甲酸乙腈溶液 (B) 为流动相梯度洗脱 (0 ~ 6 min, 20% A; 6 ~ 8 min, 20% ~ 50% A; 8 ~ 11 min 50% ~ 20% A; 11 ~ 14 min, 20% A), 进样  $1 \mu\text{L}$ , 柱温  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 线性洗脱流速  $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

**2.3.2 质谱条件** 使用 AB Sciex QTRAP 5500 三重四极杆线性离子阱串联质谱仪在电喷雾正离子 (ESI<sup>+</sup>) 模式下, 进行多反应监测 (MRM), 气帘气 241.32 kPa, Gas1 为 379.22 kPa, Gas2 为 379.22 kPa, 温度  $550 \text{ }^\circ\text{C}$ , 喷雾电压 5 500 V; 同时对检测离子对、去簇电压 (DP), 碰撞能量 (CE), 碰撞室出口电压 (CXP) 进行了优化。由氨基酸和核苷的选择离子流色谱图可见, 所测成分在此模式下均有较强响应且较稳定的色谱峰; 22 种氨基酸类和 16 种核苷类成分在较短的时间内得到较好的分离。见图 1。

## 2.4 方法学验证

**2.4.1 线性关系与检测限** 取对照品溶液贮备液, 用水分别稀释成系列浓度的对照品溶液, 进行 LC-MS 测定分析, 以峰面积为纵坐标 Y, 对照品浓度为横坐标 X, 进行线性回归, 绘制标准曲线, 计算相关系数; 以信噪比  $S/N \approx 3$ , 计算各成分的最低检测限 (LOD), 以信噪比  $S/N \approx 10$ , 计算各成分的最低定量限 (LOQ)。22 种氨基酸类和 16 种核苷类成分在检测的浓度范围内线性关系良好 ( $r > 0.999$ ), 其 LOD 和 LOQ 分别在  $0.207 \sim 168.8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $0.690 \sim 562.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见表 1。

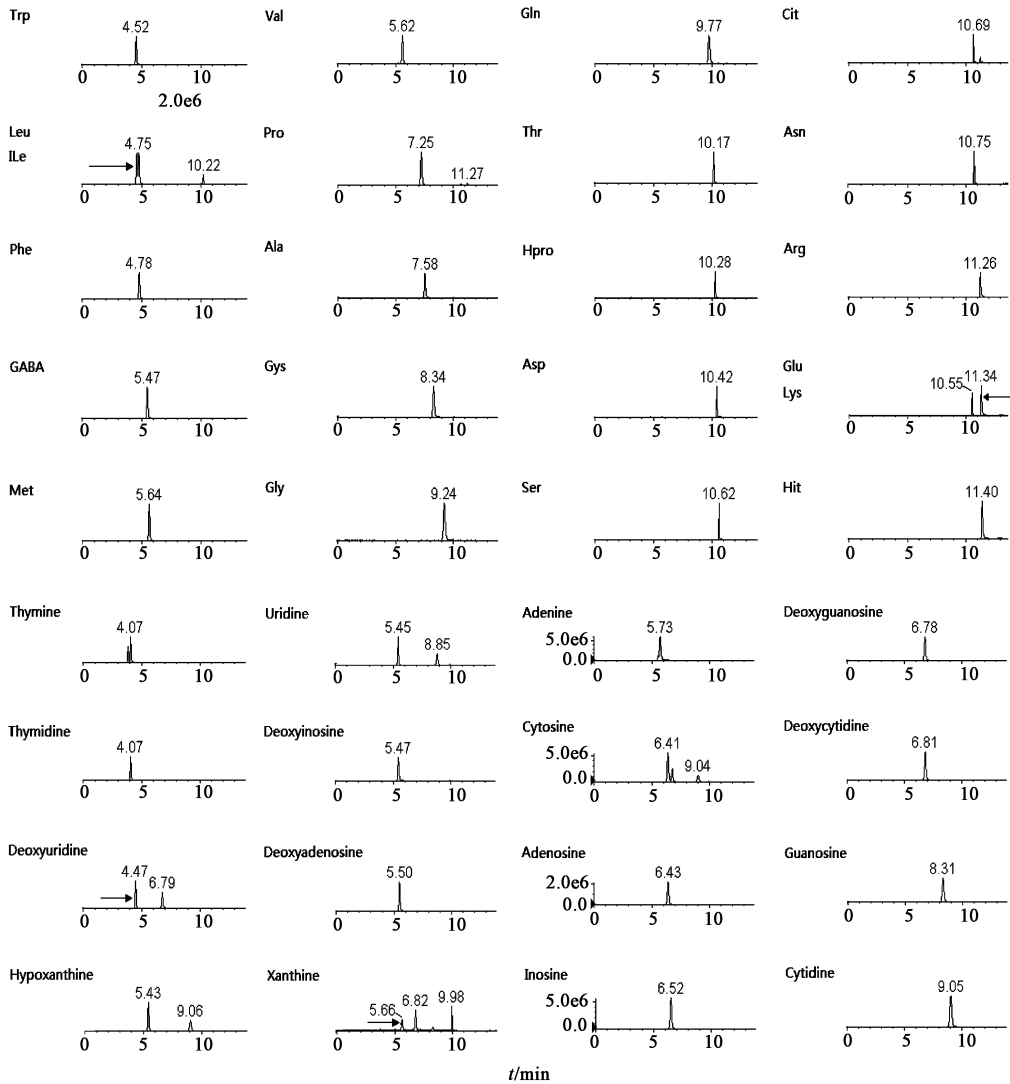


图 1 22 种氨基酸类和 16 种核苷类成分的 MRM 提取离子流色谱

Fig. 1 Representative extract ions chromatograms (XIC) of multiple-reaction monitoring (MRM) chromatograms of thirty-eight ingredients

**2.4.2 精密度考察** 取混合对照品溶液,连续进样 6 次,以色谱峰面积计算精密度。结果显示,38 种成分的 RSD 在 0.8% ~ 2.8%,表明仪器精密度良好。

**2.4.3 重复性考察** 精密称取同一批供试品,平行制备供试品溶液 6 份,分别测定 22 种氨基酸类和 16 种核苷类成分的含量。结果各成分的平均质量分数在 0.55 ~ 7 664.90  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,重复性 RSD 在 0.5% ~ 4.1%,表明测定方法的重复性良好。

**2.4.4 稳定性考察** 取重复性试验中的一份供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 测定其中氨基酸和核苷的含量,以供试品中各对照品成分含量的 RSD 来评价其稳定性。结果 38 种成分的 RSD 在 0.6% ~ 4.0%,表明供试品溶液在室温条件下放置 24 h 稳定性良好。

**2.4.5 加样回收试验考察** 精密称取 6 份已知含

量的淡豆豉供试品 0.5 g,分别加入等量混合对照品进行制备,测定并计算各氨基酸、核苷的加样回收率和 RSD。结果各成分的加样回收率在 93.74% ~ 104.3%,其 RSD 在 0.6% ~ 3.5%。以上结果显示本实验所建立的 LC-MS/MS 方法可以用于供试品中的 38 种氨基酸类和核苷成分的同时测定。见表 1。

**2.5 含量测定** 取不同产地淡豆豉样品,按上述方法制备供试品溶液并分别测定 22 种氨基酸类和 16 种核苷类成分的含量,结果见表 2,3。除 2'-脱氧肌苷和腺嘌呤在部分批次供试品中未检测到,羟脯氨酸只存在于河南产供试品中,2'-脱氧鸟苷和 2'-脱氧胞苷成分只存在于江苏和安徽产供试品中,其余 33 种成分在所有供试品中均被检测到;各批次间氨基酸与核苷类成分的含量都有明显差异,总氨基

表 1 38 种氨基酸类和核苷成分的母子离子对参数、回归方程、线性范围和加样回收率试验 ( $n = 6$ )

Table 1 MS/MS parameters and methodological study of thirty-eight ingredients ( $n = 6$ )

类别	化合物	离子对 (Q1/Q3)	回归方程	线性范围 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$r$	加样回收率/%		
						平均回收率	RSD	
氨基酸	色氨酸	205.10/146.03	$Y = 2\ 706.6X - 24\ 146$	0.69 ~ 28 289.47	0.999 7	95.12	0.6	
	苯丙氨酸	166.10/120.05	$Y = 11\ 246X + 15\ 253$	0.62 ~ 25 526.32	0.999 9	96.44	1.3	
	亮氨酸	132.10/86.05	$Y = 7\ 937.8X + 42\ 379$	0.70 ~ 28 473.68	0.999 9	94.78	3.0	
	异亮氨酸	132.10/120.05	$Y = 8\ 676.6X - 14\ 182$	0.77 ~ 31 421.05	0.999 9	100.72	3.1	
	$\gamma$ -氨基丁酸	104.07/87.00	$Y = 2\ 241.7X + 1\ 692.6$	0.68 ~ 27 842.11	0.999 8	101.51	1.8	
	甲硫氨酸	150.06/104.03	$Y = 1\ 868.3X - 17\ 527$	0.87 ~ 35 526.32	0.999 6	98.85	3.3	
	缬氨酸	118.09/72.06	$Y = 3\ 765.9X + 120\ 265$	0.95 ~ 38 947.37	0.999 0	95.63	1.3	
	脯氨酸	116.07/70.02	$Y = 4\ 953X - 34\ 448$	0.68 ~ 27 684.21	0.999 7	100.90	1.8	
	丙氨酸	90.06/44.02	$Y = 1\ 230.5X + 196\ 201$	0.85 ~ 34 789.47	0.999 3	94.67	1.5	
	半胱氨酸	122.03/75.93	$Y = 700.67X - 40\ 070$	0.65 ~ 26 657.89	0.999 7	97.15	0.7	
	甘氨酸	76.04/30.00	$Y = 76.533X + 6\ 669.4$	0.67 ~ 27 263.16	0.999 7	96.53	0.9	
	谷氨酰胺	148.06/83.91	$Y = 1\ 962.7X + 323\ 060$	0.68 ~ 27 789.47	0.998 6	101.22	3.0	
	苏氨酸	120.07/74.00	$Y = 781.16X + 163\ 735$	0.70 ~ 28 526.32	0.998 4	98.37	1.9	
	羟脯氨酸	132.07/67.87	$Y = 642.91X + 283\ 510$	0.84 ~ 34 421.05	0.998 1	95.03	2.3	
	天冬氨酸	134.05/87.96	$Y = 574.51X + 105\ 599$	0.73 ~ 29 973.68	0.998 6	94.25	3.5	
	丝氨酸	106.05/59.99	$Y = 530.85X + 25\ 577$	0.66 ~ 27 105.26	0.999 3	100.39	0.6	
	瓜氨酸	176.10/69.89	$Y = 843.17X + 741.97$	0.71 ~ 29 078.95	0.999 5	96.73	1.5	
	天冬酰胺	133.06/73.87	$Y = 534.42X + 1\ 854.7$	0.68 ~ 28 000.00	0.999 8	101.12	1.7	
	精氨酸	175.12/70.02	$Y = 2\ 587.4X - 3\ 585.3$	1.32 ~ 53 947.37	0.999 4	97.47	1.1	
	谷氨酸	147.08/83.92	$Y = 2\ 102.8X + 97\ 917$	0.71 ~ 28 894.74	0.999 6	99.26	1.0	
	赖氨酸	147.11/83.91	$Y = 1\ 230X + 219\ 646$	0.66 ~ 27 157.89	0.999 1	94.74	0.6	
	组氨酸	156.08/110.03	$Y = 8\ 400.6X + 704\ 905$	0.64 ~ 26 368.42	0.997 4	100.79	3.1	
	核苷	胸腺嘧啶	127.94/110.02	$Y = 496.65X + 7\ 942.1$	0.67 ~ 27 315.79	0.999 7	98.34	1.6
		胸苷	243.10/127.07	$Y = 2\ 325.7X - 18\ 709$	0.65 ~ 26 631.58	0.999 8	101.29	1.1
2'-脱氧尿苷		229.20/113.03	$Y = 832.96X + 2\ 871.2$	0.65 ~ 26 736.84	0.999 8	93.74	3.0	
次黄嘌呤		137.05/137.05	$Y = 6\ 261.5X + 16\ 947$	0.68 ~ 28 026.32	0.999 8	100.90	2.2	
尿苷		244.90/113.00	$Y = 1\ 390.3X - 503$	0.66 ~ 26 868.42	0.999 6	98.62	2.5	
2'-脱氧肌苷		253.10/137.07	$Y = 6\ 742.8X + 10\ 109$	0.68 ~ 28 026.32	0.999 8	94.54	1.5	
2'-脱氧腺苷		252.00/135.90	$Y = 16\ 414X - 52\ 495$	0.65 ~ 26 763.16	0.998 9	95.19	2.0	
黄嘌呤		153.09/110.00	$Y = 15.826X + 16\ 256$	0.66 ~ 27 000.00	0.996 9	101.65	1.0	
腺嘌呤		136.06/136.00	$Y = 15\ 673X + 578\ 870$	0.68 ~ 27 684.21	0.996 4	96.88	1.2	
胞嘧啶		112.00/95.10	$Y = 10\ 787X + 1\ 278$	0.66 ~ 27 026.32	0.999 8	95.53	2.2	
腺苷		268.10/136.07	$Y = 19\ 586X - 43\ 853$	0.12 ~ 4 894.74	0.999 4	104.32	2.8	
肌苷		269.00/137.07	$Y = 11\ 573X + 54\ 783$	0.68 ~ 27 684.21	0.999 8	103.86	2.1	
2'-脱氧鸟苷		268.10/152.10	$Y = 12\ 403X + 29\ 184$	0.65 ~ 26 447.37	0.999 8	97.66	2.5	
2'-脱氧胞苷		228.20/112.05	$Y = 11\ 002X + 15\ 610$	0.65 ~ 26 710.53	0.999 8	96.59	2.9	
鸟苷	284.30/152.00	$Y = 11\ 492X - 33\ 646$	0.65 ~ 26 815.79	0.998 1	94.72	3.4		
胞苷	244.09/112.00	$Y = 2\ 500X - 431\ 275$	0.70 ~ 28 552.63	0.999 9	100.21	2.4		

酸含量在  $7.241 \sim 34.21 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，总核苷含量在  $14.21 \sim 82.53 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.6 不同产地淡豆豉的聚类分析 得到原始色谱图谱后,观测样本间保留时间、色谱峰离子响应情况

表 2 8 个批次淡豆豉供试品中 22 种氨基酸类成分质量分数

Table 2 Contents of amino acid in Semen Sojae praeparatum

$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

批次	色氨酸	苯丙氨酸	亮氨酸	异亮氨酸	$\gamma$ -氨基丁酸	甲硫氨酸	缬氨酸	脯氨酸	丙氨酸	半胱氨酸	甘氨酸
B1	185.83	482.97	175.31	285.44	214.62	89.32	324.77	652.81	444.9	11.69	81.44
B2	31.39	172.84	140.60	219.68	381.79	23.42	405.85	243.62	709.84	12.77	109.77
B3	464.27	401.14	212.60	280.35	418.32	119.02	476.45	153.89	641.04	11.85	142.18
B4	96.54	396.94	239.93	428.35	1 005.25	59.59	776.05	441.49	1 241.57	13.01	215.10
B5	110.14	428.14	333.27	553.02	810.59	60.39	936.05	472.16	1 433.57	12.48	253.09
B6	88.27	335.74	233.27	406.35	547.65	37.02	656.05	470.82	1 061.84	12.02	217.19
B7	135.47	664.54	300.60	597.02	104.19	138.36	646.05	524.16	754.10	11.81	814.99
B8	381.61	1 007.74	1 384.60	761.02	2125.25	106.36	3858.05	2772.16	6 379.70	11.82	1 192.45

批次	谷氨酰胺	苏氨酸	羧脯氨酸	天冬氨酸	丝氨酸	瓜氨酸	天冬酰胺	精氨酸	谷氨酸	赖氨酸	组氨酸
B1	1 281.62	187.75	-	347.39	160.82	164.84	120.28	2584.65	634.51	674.36	285.65
B2	1 935.28	332.61	23.61	542.84	140.67	164.59	66.50	700.35	418.47	407.40	56.80
B3	1 368.61	204.86	38.76	1 168.44	189.69	10.70	267.27	4 368.62	737.80	742.86	370.07
B4	2 965.28	447.01	-	414.77	137.25	347.87	93.61	672.89	1 044.13	1 062.86	181.60
B5	3 311.95	531.94	-	763.84	234.41	627.07	115.90	219.02	1 134.13	1 162.60	225.40
B6	2 685.28	233.81	-	567.77	92.29	303.87	72.45	586.49	955.47	991.40	218.74
B7	3 315.28	435.74	-	1 322.57	406.04	719.07	46.99	2 709.95	1 614.13	1 698.60	468.07
B8	4 208.61	458.27	-	3 029.37	461.77	175.55	219.51	687.55	2 274.13	2 418.60	294.07

注：“-”表示未检测到；表 3 同。

表 3 8 个批次淡豆豉供试品中 16 种核苷类成分质量分数

Table 3 Contents of nucleoside in Semen Sojae praeparatum

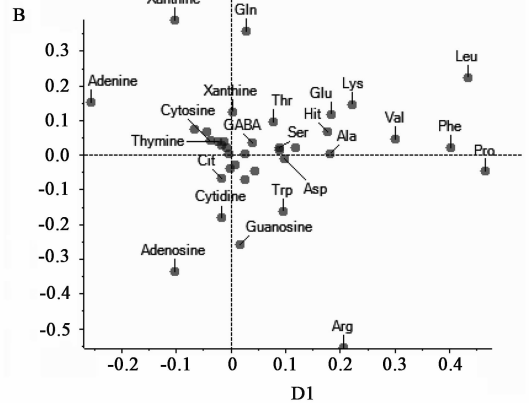
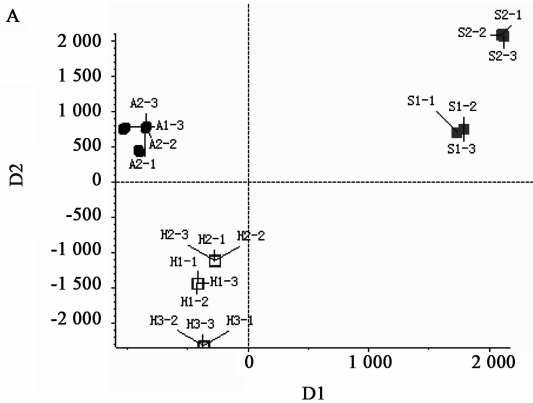
$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

批次	胸腺嘧啶	胸苷	2'-脱氧尿苷	次黄嘌呤	尿苷	2'-脱氧肌苷	2'-脱氧腺苷	黄嘌呤
B1	14.21	8.73	3.14	47.07	470.25	1.66	8.62	14 664.64
B2	52.88	29.42	10.88	648.34	304.43	2.85	17.14	16 085.13
B3	19.40	10.06	0.57	1 596.14	220.29	1.05	13.54	1 720.68
B4	46.75	17.98	15.83	290.87	611.49	5.19	24.70	25 672.60
B5	60.22	20.17	14.59	161.14	740.83	3.05	18.10	80 224.87
B6	29.11	7.74	2.38	90.48	487.49	1.07	7.07	29 775.53
B7	13.83	6.79	1.02	265.20	432.83	1.79	5.82	58 789.13
B8	35.94	2.67	0.38	14.55	539.49	-	2.77	52 467.27

批次	腺嘌呤	胞嘧啶	腺苷	肌苷	2'-脱氧鸟苷	2'-脱氧胞苷	鸟苷	胞苷
B1	67.38	8.63	316.71	38.71	2.84	-	370.11	79.88
B2	155.68	9.28	327.15	116.69	10.74	2.77	2 002.83	168.29
B3	634.08	3.43	670.48	84.95	3.73	2.26	7 965.50	1 267.79
B4	402.48	21.58	54.88	22.25	11.71	2.18	403.63	108.59
B5	294.48	8.72	101.11	34.73	7.26	0.58	808.16	29.93
B6	191.28	6.23	146.15	19.40	-	-	978.83	62.03
B7	454.88	15.21	53.31	6.26	-	-	355.90	93.77
B8	-	4.54	7.63	4.19	-	-	57.23	9.61

及二级质谱图采集情况;将各组数据的多反应监测色谱图导入 Markerview 1.2.1 软件,并设置原始图谱参数,如进行峰识别、匹配、峰对齐、滤噪等:最小保留时间为 0.5 min,最大保留时间为 13.5 min;最小质荷比宽度为  $10 \times 10^{-6}$ ,最小保留时间宽度为 6 scans,噪波阈值为 100;保留时间容差为 14 min,质荷比容差为 10 ppm;去除少于 3 个样本中出现的峰,最大峰数目 8 000,去除同位素峰后,对数据进行分组并设置组标志,完成对数据的标准化处理;利用

PCA 数据分析,得到 PCA-DA 模型的载荷图和得分图;进一步进行分组  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义,除去不具有统计学意义的变量。结果见图 2,从得分图(图 2A)观察供试品的聚集、离散程度,可看出本实验所建立的 PCA 模型聚类良好,不同产区的淡豆豉药材经分析后可以很好地被区分开,而来源于相同产区不同批次的药材均相近聚类;从聚类分析所得到的载荷图(图 2B)可见,大多数化合物聚集在一起,四周分布着一些“离群”的差异点。



A. 安徽产淡豆豉;H. 河南产淡豆豉;S. 江苏产淡豆豉

图 2 不同产地淡豆豉药材的 PCA 得分图(A)及载荷图(B)

Fig. 2 Score(A) and loading (B) plots of metabolites determined in Semen Sojae praeparatum products

### 3 讨论

本研究采用液质联用多反应监测技术(MRM)及多元统计分析法,建立了快速同时测定 22 种核苷类及 16 种氨基酸类成分的检测方法,并成功对不同产地的淡豆豉样品进行了差异研究。

由于氨基酸成分多具有较大的亲水性,在紫外下吸收较弱,核苷成分极性也较大,一般的检测方法很难对其进行分离,而亲水性色谱柱对极性大的成分具有较强的保留,分离效果较好,研究选用亲水色谱柱对氨基酸和核苷成分进行同时分离检测,并在流动相中加入甲酸使之 pH 降低,达到改善色谱峰峰形的目的。

含量测定结果显示,除 2'-脱氧肌苷、腺嘌呤、羟脯氨酸、2'-脱氧鸟苷和 2'-脱氧胞苷成分只存在于部分供试品中,其余 33 种成分在所有供试品中均被检测到,其中  $\gamma$ -氨基丁酸、缬氨酸、丙氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、精氨酸、谷氨酸、赖氨酸为其中主要氨基酸类成分,次黄嘌呤、尿苷、黄嘌呤、腺嘌呤、腺苷、鸟苷、胞苷为其中主要核苷类成分,谷氨酰胺和黄嘌呤的含量远远高于其他成分;各批次间氨基酸与核苷类成分的含量都有明显差异,总氨基酸含量在

$7.241 \sim 34.21 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,总核苷含量在  $14.21 \sim 82.53 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,其中 B8 批次的核苷含量远远 > 其他批次, B5, B7 和 B8 批次的氨基酸含量远远 > 其他批次;不同产地供试品的氨基酸含量高低排序为安徽产 > 江苏产 > 河南产,核苷含量高低排序为江苏产 > 安徽产 > 河南产,同一产地贮存时间短的总氨基酸和总核苷含量均高于贮存时间长的。

由于 PCA 模型上的供试品点相离越远离差异越大<sup>[19]</sup>,聚类分析的得分图在一定程度上体现了淡豆豉在地域间的差异性和地域内的相似性;而载荷图能体现变量对于各主成分贡献的大小,在某一主成分方向上距原点越远的变量对此主成分贡献越大<sup>[20]</sup>,可判断所得到的载荷图上“离群”的差异点,正是导致不同产地淡豆豉质量差异的原因,为淡豆豉质量控制提供了科学依据。

#### [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,2015:308.  
[2] 柴川,崔小兵,单晨啸,等. 基于 UFLC/Q-TOF-MS 对不同产区淡豆豉药材的差异研究[J]. 中华中医药杂志,2015,30(2):590-593.  
[3] 柴川,崔小兵,戴贞丽,等. 淡豆豉炮制前后异黄酮成

- 分的测定及炮制工艺的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12):72-76.
- [4] 张海军, 王英. 大豆异黄酮检测方法研究概述[J]. 粮食与油脂, 2011, 11(3):39-42.
- [5] 李娜, 黄庆柏. 淡豆豉中的异黄酮成分及药理作用与临床应用[J]. 中国现代中药, 2008, 10(7):18-19.
- [6] 白霞, 牛丽颖, 刘娇, 等. 淡豆豉防治早期动脉粥样硬化大鼠血管损伤的机制研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(1):170-171.
- [7] 葛喜珍, 王鑫国, 徐华州, 等. 中药淡豆豉有效成分大豆异黄酮调节血脂的研究进展[J]. 河北中医药学报, 2002, 17(3):41-43.
- [8] 王爱梅, 周建辉, 欧阳静萍. 大豆异黄酮对更年期大鼠抗氧化作用及提高学习记忆能力的研究[J]. 现代医药卫生, 2008, 24(7):954-956.
- [9] 牛丽颖, 王鑫国, 葛喜珍, 等. 淡豆豉提取物降糖有效部位研究[J]. 中药药理与临床, 2004, 20(5):21-22.
- [10] 宋永生, 张炳文, 郝征红, 等. 发酵处理对豆豉抗氧化活性影响的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(8):263-267.
- [11] 吴周和, 周丽明, 张勇, 等. 反相高效液相色谱法测定豆制品中两种异黄酮苷元的含量[J]. 分析科学学报, 2006, 22(3):303-305.
- [12] 劳凤云, 刘正猛, 王洪波. 淡豆豉多糖的提取及其清除自由基的活性研究[J]. 现代预防医学, 2008, 35(10):1909-1910.
- [13] Chuan C, Hyun K J, Sang C K, et al. Determination of bioactive compounds in fermented soybean products using GC/MS and further investigation of correlation of their bioactivities[J]. J Chromatography B, 2012, 880(1):42-49.
- [14] 汪海波. 大豆异黄酮及大豆皂甙的抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(3):9-12.
- [15] 黄国清, 肖军霞, 杜德红, 等. 大豆皂苷对 H22 荷瘤小鼠抗肿瘤研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(7):52-54.
- [16] 侯静, 赵敏, 杨福明, 等. 豆豉纤溶酶的研究现状及发展前景[J]. 中国调味品, 2009, 34(1):22-26.
- [17] 李萍萍, 崔元璐, 蒋庆峰. 柱前衍生 RP-HPLC 法分析淡豆豉和大豆中氨基酸[J]. 中草药, 2013, 44(9):1199-1202.
- [18] Szeitz A, Manji J, Riggs K W, et al. Validated assay for the simultaneous determination of cortisol and budesonide in human plasma using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Pharmaceut Biomed, 2014, 90(1):198-206.
- [19] 张德龙, 李淑林, 陆瑞利, 等. 培养时间对蛹拟青霉 (*Paecilomyces militaris*) 菌丝体中代谢产物的影响[J]. 微生物学报, 2012, 52(12):1477-1488.
- [20] 胡晓炜, 徐爱仁. 羚羊角及其混伪品脂类成分气相色谱-质谱分析和聚类分析[J]. 中华中医药杂志, 2013(11):3441-3444.

[责任编辑 顾雪竹]