

基于 HILIC-UPLC-MS/MS 测定酸枣仁 核苷及碱基类成分

周翔, 姚鑫, 孙丽红*

(苏州大学附属第一医院, 江苏苏州 215006)

[摘要] 目的:建立 HILIC 模式超高效液相色谱串联三重四级杆质谱法(HILIC-UPLC-MS/MS)同时测定酸枣仁中 11 种核苷及碱基类成分的含量。方法:采用 Acquity UPLC BEH Amide 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),配有 Amide 1.7 μm VanGuard 保护柱,以 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵-0.8% 乙酸水(A)和 0.1% 乙酸-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱(0~5 min, 10% A; 5~7 min, 10%~40% A),流速 0.3 mL·min⁻¹,柱温 35 °C,进样体积 1 μL, Waters Xevo™ TQ 质谱仪以多反应离子监测(MRM)方式,进行正离子检测。结果:所测成分在 7 min 内实现分离,各核苷及碱基类成分在 0.002 32~8.66 mg·L⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系,相关系数均 >0.992 2;加样回收率(n=6)为 92.1%~108.2%,RSD 均 <7%。各批次各核苷及碱基类成分的含量具有一定的差异。10 批样品总核苷及碱基类质量分数在 24.5~48.48 μg·g⁻¹,其中以⑩号样品含量最低,②号样品最高。各种核苷类成分中,尿苷含量最高(平均值 14.84 μg·g⁻¹),胸苷质量分数最低(平均值 0.14 μg·g⁻¹)。结论:该方法具有简便、快速、重复性好,专属性强等特点,适用于酸枣仁中核苷及碱基类成分的快速定量分析。

[关键词] 亲水色谱模式超高效液相色谱串联三重四级杆质谱; 酸枣仁; 核苷类化合物

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)07-0086-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017070086

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170109.1401.062.html>

[网络出版时间] 2017-01-09 14:01

Determination of Nucleosides and Nucleobases in Ziziphi Spinosae Semen by HILIC-UPLC-MS/MS

ZHOU Xiang, YAO Xin, SUN Li-hong*

(The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HILIC-UPLC-MS/MS for determination of 11 nucleosides and nucleobases in Ziziphi Spinosae Semen. **Method:** Acquity UPLC BEH Amide (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) was adopted as chromatographic column, with Amide 1.7 μm VanGuard as the guard column; the mobile phase consisted of acetonitrile (containing 0.1% acetic acid) and water (containing 0.8% acetic acid and 10 mmol·L⁻¹ ammonium acetate) at a flow rate of 0.3 mL·min⁻¹; the temperature was set at 35 °C; sample size was 1 μL. Waters Xevo™ TQ worked in MRM mode. **Result:** The Tested components were separated in 7 min. All calibration curves were linear (r > 0.992 2) within the tested range between 0.002 32-8.66 mg·L⁻¹. The average recoveries ranged from 92.15% to 108.23%, with RSD value below 7%. The contents of these batches of nucleosides and nucleobases were obviously different. The mass fraction of all of the target compounds ranged between 24.5-48.48 μg·g⁻¹. Sample No. 10 had the lowest content, while sample No. 2 had the highest content. Uridine was found to be the highest content in all samples (mean: 14.84 μg·g⁻¹). Furthermore, the content of thymidine was observed to be lower than others in all markers (mean: 0.14 μg·g⁻¹). **Conclusion:** The method was simple

[收稿日期] 20160725(010)

[基金项目] 江苏省卫生厅医学科研项目(Z201304)

[第一作者] 周翔, 副主任中药师, 从事中药药理研究, E-mail: yaobest@163.com

[通讯作者] * 孙丽红, 副主任药师, 从事医院药学研究, E-mail: sunlihongsuzhou@126.com

and fast, with a high precision, sensitivity and repeatability, which can be used for qualitative and quantitative analysis for nucleosides and nucleobases in Semen Ziziphi Spinosae.

[Key words] HILIC-UPLC-MS/MS; Ziziphi Spinosae Semen; nucleosides; nucleobases

酸枣仁一般生用或微炒用,多用于虚烦不眠,惊悸多梦,体虚汗,津伤口渴^[1]。现代研究表明酸枣仁主要为皂苷类、黄酮类、生物碱类、氨基酸、核苷等类成分,具有镇静催眠、抗心律失常、抗惊厥、镇痛、增强免疫功能等作用^[2-3]。核苷、碱基及其类似物是生物细胞维持生命活动的基本组成元素,作用广泛,可参与 DNA 的代谢过程^[4],具有一定的抗癌、抗病毒作用^[5-7],近期研究还发现其具有调节免疫^[8]、镇静中枢神经系统^[9]、刺激体内神经细胞生长^[10]等药理活性。

核苷类化合物的分析主要有反相高效液相色谱法(RP-HPLC)^[11-14],MEKC^[15],毛细管电泳法^[16]。然而,由于核苷类化合物的极性较强、性质不稳定且化学结构相似,在反相柱上存在核苷类化合物不保留、分离度低及共流出的问题,给分离分析带来挑战。亲水色谱(HILIC)是针对强极性化合物的色谱分离技术,固定相为强极性材料,流动相一般选择水-水溶性有机相,适用于亲水性化合物的分离^[17]。此外,他能显著改善样品在流动相中的溶解度,并和质谱有良好的兼容性,能够改善质谱检测中的正相柱的柱效,特别是使用需要结合离子对的亲水性流动相时,能改变质谱检测的灵敏度^[18];超高效液相色谱法(UPLC)是利用粒径低于 2 μm 的填料作为固定相,产生高压的效果,具有高速、高分辨率、高灵敏度的特点^[19];三重四级杆强大的多反应离子监测功能(MRM)检测特殊和敏感的碎片离子,能够排除假阳性结果。因此,本文建立 HILIC 模式超高效液相色谱串联三重四级杆质谱法,测定酸枣仁中 11 种核苷及碱基类成分,为其质量控制提供新的方法。

1 材料

ACQUITY 型 UPLC 系统, Xevo TQ 型检测器, MassLynx™ 质谱工作站软件(美国 Waters 公司); KQ-500E 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司), XS205 型电子分析天平(梅特勒-托利多上海仪器有限公司), Milli-Q Synthesis 超纯水纯化系统(美国密理博公司)。

11 个核苷及碱基类对照品分别为胸腺嘧啶(1, 批号 140708-200401), 尿嘧啶(2, 批号 100469-201302), 胸苷(3, 批号 101215-201401), 腺嘌呤(4, 批号 110886-201102), 次黄嘌呤(5, 批号 140661-

200903), 尿苷(6, 批号 110887-200202), 腺苷(7, 批号 110879-200202), 黄嘌呤(8, 批号 140662-200802), 肌苷(9, 批号 140669-201305), 鸟嘌呤(10, 批号 140631-201205)均购于中国食品药品检定研究院, 胞苷(11, 批号 1328014)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;所有对照品经 HPLC 检测纯度均 > 98%。10 批酸枣仁分别购自于亳州永刚饮片厂(批次 20140801①, 20150915②);亳州中药饮片厂(批次 20140825③, 20151104④);常州泰和国药制品有限公司(批号 20130706⑤, 20140917⑥);上海雷允上中药饮片厂(批次 20130312⑦, 20140511⑧);南京海源中药饮片有限公司(批次 20130410⑨, 20130911⑩);经苏州大学附属第一医院陈琳主管中药师鉴定为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujube* var. *spinosa* 的干燥成熟种子。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取 11 种核苷和碱基对照品适量,加水制成每 1 mL 分别含胸腺嘧啶 6.50 μg, 尿嘧啶 6.10 μg, 胸苷 9.50 μg, 腺嘌呤 6.10 μg, 次黄嘌呤 9.15 μg, 尿苷 16.55 μg, 腺苷 11.20 μg, 黄嘌呤 5.0 μg, 肌苷 11.30 μg, 鸟嘌呤 5.10 μg 和胞苷 11.50 μg 的混合对照品贮备液。取上述对照品贮备液加乙腈-水(9:1)稀释,制成系列不同质量浓度的对照品溶液。

2.2 供试品溶液制备 精密称取酸枣仁样品粉末(40 目)1 g,置 100 mL 锥形瓶中,精密加水 20 mL,室温超声提取 30 min 后,静置,称重,加水补足减失的质量,摇匀,离心 10 min,取上清液 0.22 μm 微孔滤膜滤过,4 °C 保存,待测。

2.3 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)配有 ACQUITY UPLC BEH Amide 1.7 μm VanGuard 保护柱;以 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵-0.8% 乙酸水(A), 0.1% 乙酸-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱(0~5 min, 10% A; 5~7 min, 10%~40% A);流速 0.3 mL·min⁻¹, 进样体积 1 μL, 柱温 35 °C。

ESI⁺ 离子源,MRM 扫描方式,取样锥孔电压及碰撞能量见表 1, 色谱见图 1。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系、定量限(LOQ)和检测限(LOD)

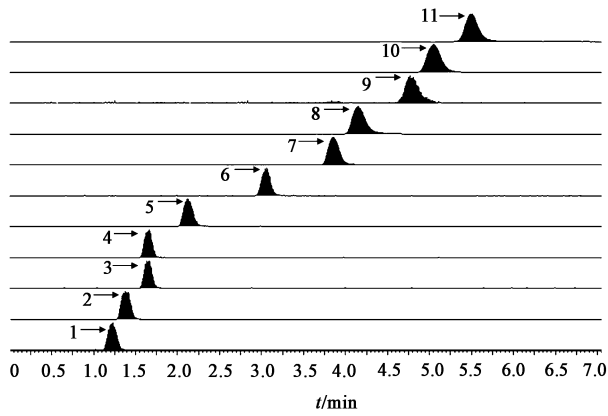


图 1 酸枣仁中 11 种核苷类成分 MRM 色谱

Fig. 1 MRM chromatograms of 11 nucleosides and nucleobases

试验 取混合对照品贮备液, 稀释成系列不同质量浓度的对照品溶液, 以对照品溶液质量浓度对峰面积进行线性回归分析。定量限 (LOQ) 和检测限 (LOD) 分别在信号对噪音比 (S/N) 为 10 和 3 时测定, 结果见表 2。

2.4.2 精密性、重复性和稳定性试验 精密性试验: 取对照品溶液, 在上述色谱-质谱条件下分别在 1 d 内重复进样 6 次和在连续 3 d 内重复进样 6 次,

记录各峰面积, 计算 RSD, 结果见表 3。

重复性试验: 按 2.2 项下方法制备酸枣仁的供试品溶液 6 份, 进样分析。以 11 个核苷类化合物成分含量的 RSD 来评价其稳定性, 见表 3。

稳定性试验: 取上述重复性试验中的 1 份酸枣仁供试品溶液分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样分析, 以 11 个核苷类化合物成分峰面积的 RSD 考察其稳定性, 结果见表 3。

2.4.3 回收率试验 称取已知含量的酸枣仁样品 (0.5 g), 平行 6 份, 分别精密添加与样品中等的对照品, 按上述样品制备方法制备供试品溶液和色谱-质谱条件进行分析, 结果见表 3。

2.5 样品测定 分别取不同批次酸枣仁, 按上述分析方法进行含量测定, 计算酸枣仁中 11 个核苷及碱基类成分的含量, 结果见表 4。由表 4 可见, 各批次各核苷及碱基类的含量具有一定的差异。10 批样品总核苷及碱基类质量分数在 24.5 ~ 48.48 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 其中以⑩号样品含量最低, ②号样品最高。各种核苷类成分中, 尿苷质量分数最高 (平均值 14.84 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), 胸苷质量分数最低 (平均值 0.14 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)。

表 1 11 种核苷类成分的主要质谱参数

Table 1 MS parameters of 11 nucleosides and nucleobases

| 成分 | 相对分子质量 | t_R/min | MRM 监测离子 | 碰撞能量/eV | 锥孔电压/V |
|------|--------|------------------|---------------|---------|--------|
| 胸腺嘧啶 | 127.05 | 1.20 | 127.05/127.05 | 10 | 20 |
| 尿嘧啶 | 113.04 | 1.41 | 113.04/113.04 | 8 | 16 |
| 胸苷 | 243.10 | 1.74 | 243.10/127.05 | 10 | 10 |
| 腺嘌呤 | 136.06 | 1.79 | 136.06/136.06 | 10 | 20 |
| 次黄嘌呤 | 137.05 | 2.18 | 137.05/137.05 | 8 | 16 |
| 尿苷 | 245.08 | 3.09 | 245.08/113.04 | 10 | 10 |
| 腺苷 | 268.10 | 3.85 | 268.10/136.06 | 18 | 22 |
| 黄嘌呤 | 153.04 | 4.13 | 153.04/153.04 | 8 | 16 |
| 肌苷 | 269.09 | 4.75 | 269.09/137.05 | 14 | 10 |
| 鸟嘌呤 | 152.06 | 5.05 | 152.06/152.06 | 8 | 16 |
| 胞苷 | 244.09 | 5.48 | 244.09/112.00 | 10 | 28 |

表 2 11 种核苷类化合物线性关系考察

Table 2 Linearities of calibration curves of 11 compounds

| 成分 | 线性方程 | r | 线性范围/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | 检测限/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | 定量限/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ |
|------|-----------------------------------|---------|---------------------------------------|--|--|
| 胸腺嘧啶 | $Y = 24\ 619.1X + 1\ 425.4$ | 0.995 6 | 0.065 0 ~ 1.60 | 22.70 | 65.66 |
| 尿嘧啶 | $Y = 2\ 452.4X + 145.1$ | 0.994 4 | 0.144 ~ 1.50 | 53.00 | 155.00 |
| 胸苷 | $Y = 173\ 528.7X + 3\ 284.5$ | 0.995 5 | 0.002 32 ~ 0.893 | 0.30 | 0.94 |
| 腺嘌呤 | $Y = 1\ 738\ 264.4X + 149\ 037.2$ | 0.997 1 | 0.023 1 ~ 2.12 | 1.33 | 4.55 |
| 次黄嘌呤 | $Y = 1\ 421\ 874.7X + 34\ 531.4$ | 0.996 1 | 0.007 88 ~ 0.802 | 3.10 | 9.30 |
| 尿苷 | $Y = 17\ 873.5X + 8\ 321.7$ | 0.994 2 | 0.042 1 ~ 8.66 | 8.01 | 25.11 |
| 腺苷 | $Y = 1\ 678\ 321.3X + 24\ 563.7$ | 0.997 5 | 0.006 54 ~ 1.20 | 0.31 | 1.02 |
| 黄嘌呤 | $Y = 30\ 432.4X + 533.4$ | 0.998 0 | 0.033 0 ~ 3.10 | 8.02 | 25.29 |
| 肌苷 | $Y = 383\ 621.7X + 1\ 653.3$ | 0.990 1 | 0.006 73 ~ 1.20 | 0.60 | 1.70 |
| 鸟嘌呤 | $Y = 546\ 284.1X - 21\ 039.5$ | 0.992 2 | 0.014 4 ~ 2.70 | 2.50 | 8.20 |
| 胞苷 | $Y = 469\ 032.1X - 13\ 245.4$ | 0.995 5 | 0.007 84 ~ 1.22 | 0.61 | 1.73 |

表 3 11 种核苷类化合物精密度的、重复性、稳定性和回收率试验考察 (n=6)

Table 3 Precision, repeatability, stability and recovery of 11 compounds analytes (n=6)

| 成分 | 精密度 RSD | | 重复性 RSD | 稳定性 RSD | 回收率 | 回收率 RSD |
|------|---------|-----|---------|---------|-------|---------|
| | 日间 | 日内 | | | | |
| 胸腺嘧啶 | 2.6 | 3.2 | 1.8 | 2.7 | 107.1 | 5.1 |
| 尿嘧啶 | 1.5 | 3.0 | 2.2 | 2.3 | 96.9 | 6.4 |
| 胸苷 | 0.9 | 1.3 | 2.9 | 2.2 | 104.5 | 6.4 |
| 腺嘌呤 | 1.3 | 3.4 | 3.1 | 2.8 | 92.1 | 5.6 |
| 次黄嘌呤 | 0.8 | 2.7 | 5.3 | 7.0 | 108.2 | 4.9 |
| 尿苷 | 1.0 | 2.6 | 5.4 | 5.0 | 105.1 | 5.3 |
| 腺苷 | 2.2 | 3.1 | 2.5 | 2.3 | 94.3 | 4.5 |
| 黄嘌呤 | 1.7 | 1.7 | 2.5 | 3.1 | 101.0 | 3.1 |
| 肌苷 | 0.5 | 1.7 | 3.4 | 3.6 | 92.6 | 1.8 |
| 鸟嘌呤 | 1.8 | 2.7 | 1.1 | 1.0 | 97.4 | 4.3 |
| 胞苷 | 2.1 | 2.3 | 1.6 | 5.1 | 96.6 | 3.9 |

表 4 不同批次酸枣仁中 11 种核苷类化合物分析

Table 4 Determination results of 11 compounds

| 批次 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 总核苷 |
|----|------|------|------|-------|------|-------|------|------|------|------|------|-------|
| ① | 1.10 | 2.83 | 0.20 | 11.21 | 0.75 | 18.88 | 0.21 | 2.31 | 0.33 | 6.16 | 3.60 | 47.58 |
| ② | 1.30 | 2.91 | 0.21 | 11.31 | 0.70 | 18.93 | 0.19 | 2.43 | 0.34 | 6.33 | 3.83 | 48.48 |
| ③ | 0.78 | 1.85 | 0.14 | 9.92 | 0.58 | 15.80 | 0.15 | 1.80 | 0.29 | 5.80 | 2.83 | 39.94 |
| ④ | 0.67 | 1.78 | 0.13 | 9.80 | 0.55 | 15.13 | 0.16 | 1.75 | 0.26 | 5.65 | 2.86 | 38.74 |
| ⑤ | 0.45 | 1.45 | 0.10 | 7.98 | 0.51 | 14.54 | 0.14 | 1.73 | 0.21 | 4.55 | 2.54 | 34.2 |
| ⑥ | 0.32 | 1.35 | 0.11 | 7.91 | 0.48 | 14.90 | 0.13 | 1.71 | 0.20 | 4.30 | 2.71 | 34.12 |
| ⑦ | 1.13 | 2.79 | 0.21 | 10.73 | 0.71 | 15.45 | 0.19 | 2.33 | 0.30 | 5.86 | 3.44 | 43.14 |
| ⑧ | 1.09 | 2.96 | 0.22 | 11.44 | 0.74 | 15.93 | 0.25 | 2.39 | 0.31 | 6.50 | 3.70 | 45.53 |
| ⑨ | 0.13 | 1.05 | 0.09 | 7.41 | 0.31 | 9.14 | 0.09 | 1.06 | 0.14 | 3.75 | 1.87 | 25.04 |
| ⑩ | 0.19 | 1.19 | 0.08 | 6.70 | 0.33 | 9.70 | 0.08 | 1.00 | 0.11 | 3.20 | 1.92 | 24.50 |

3 讨论

3.1 提取方法优化 分别对提取方法(索式提取、超声提取),提取溶剂(水和 25%、50%、75% 甲醇溶液),提取溶剂用量(60,40,20 mL)和提取时间(15,30,60 min)进行了考察。结果显示,超声提取与索式提取的提取效率相近;所有核苷类化合物在纯水中溶解度最高;提取 30 min 时提取效率达到最高;固液比为 1:20 时提取效率可达最大。综上,最优提取条件为,水 20 mL 超声提取 30 min。

3.2 色谱分析条件的优化 首先对 Acquity UPLC BEH C₁₈(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)和 Acquity HSS T3(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)色谱柱进行了考察,尝试更换不同流动相和缓冲盐,所得的色谱峰均不理想。进而进一步考察 Acquity UPLC BEH HILIC(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)和 Acquity UPLC BEH Amide(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)色谱柱,发现前

者保留能力较差,在后者色谱柱上目标化合物得到很好的分离,因此本实验中选择 Acquity UPLC BEH Amide 色谱柱。流动相考察结果显示乙酸胺缓冲盐系统优于甲酸胺。进一步对乙酸胺缓冲盐浓度进行优化,最终确认流动相 A 为 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵-0.8% 乙酸水;流动相 B 为 0.1% 乙酸-乙腈可获得较好的色谱峰形。通过不同流速和柱温的考察发现流速为 0.3 mL·min⁻¹,柱温为 35 °C 时分离度较好。

3.3 质谱分析条件的优化 首先比较不同离子模式下所测定目标化合物的响应强度,结果发现,正离子模式下的响应强度要高于负离子模式,且可呈现稳定的准分子离子。进一步应用 IntelliStart 功能自动采集用于 MRM 测试的离子碎片及最佳锥孔电压和碰撞能量,相关的质谱参数见表 1。

各批次各核苷及碱基类的含量具有一定的差异。10 批样品总核苷及碱基类质量分数在 24.5 ~

48.48 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,其中以⑩号样品含量最低,②号样品最高。各种核苷类成分中,尿苷含量最高,胸苷含量最低。本实验基于UPLC-MS/MS技术所建立的含量测定方法具有快速、专属性高等特点,可作为酸枣仁核苷及碱基类成分的评价方法。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 366-367.

[2] 王茜, 张艳强, 杨艳婷, 等. 酸枣仁的化学成分及应用研究进展[J]. 黑龙江医药, 2015, 28(2): 259-261.

[3] 王慧, 罗坤, 武静. 酸枣仁汤对失眠大鼠中脑中缝背核神经胶质细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21): 235-239.

[4] 吕爱娟, 吴浩. 中药中核苷类成分的研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(7): 94-97.

[5] Loewen S K, YAO S Y, Slugoski M D, et al. Transport of physiological nucleosides and anti-viral and anti-neoplastic nucleoside drugs by recombinant *Escherichia coli* nucleoside-H(+) cotransporter (NupC) produced in *Xenopus laevis* oocytes[J]. Mol Membr Biol, 2004, 21(1): 1-10.

[6] LIU R, JI J, WANG L C, et al. Characterisation of nucleosides and nucleobases in *Mactra veneriformis* by high performance liquid chromatography coupled with diode array detector-mass spectrometry (HPLC-DAD-MS) [J]. Food Chem, 2012, 135(2): 548-554.

[7] Papatheodoridis G V, Dimou E, Papadimitropoulos V. Nucleoside analogues for chronic hepatitis B: antiviral efficacy and viral resistance [J]. Am J Gastroentero, 2002, 97(7): 1618-1628.

[8] Morimoto C, Steinberg A D, Schlossman S F, et al. *In vitro* nucleoside specific immune response by lymphocytes from systemic lupus erythematosus [J]. J Clin Invest, 1983, 71(5): 1402-1409.

[9] FAN H, LI P S, XIANG J J, et al. Qualitative and quantitative determination of nucleosides, bases and their analogues in natural and cultured *Cordyceps* by pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) [J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 567(2): 218-228.

[10] Benowitz L I, Goldberg D E, Irwin N. Inosine stimulates axon growth *in vitro* and in the adult CNS [J]. Prog Brain Res, 2002, 137(2): 389-399.

[11] Ikeda R, Nishimura M, SUN Y, et al. Simple HPLC-UV determination of nucleosides and its application to the authentication of *Cordyceps* and its allies [J]. Biomed Chromatogr, 2008, 22(6): 630-636.

[12] Kammerer B, Frickenschmidt A, Muller C E, et al. Mass spectrometric identification of modified urinary nucleosides used as potential biomedical markers by LC-ITMS coupling [J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 382(4): 1017-1026.

[13] LI S P, LI P, LAI C M, et al. Simultaneous determination of ergosterol, nucleosides and their bases from natural and cultured *Cordyceps* by pressurised liquid extraction and high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2004, 1036(2): 239-243.

[14] YAN S K, LUO G A, WANG Y M, et al. Simultaneous determination of nine components in Qingkailing injection by HPLC/ELSD/DAD and its application to the quality control [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 40(4): 889-895.

[15] LI S P, LI P, DONG T T, et al. Determination of nucleosides in natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps mycelia* by capillary electrophoresis [J]. Electrophoresis, 2001, 22(1): 144-150.

[16] Cheung H Y, Ng C W, Hood D J. Identification and quantification of base and nucleoside markers in extracts of *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma japonicum* and *Ganoderma capsules* by micellar electrokinetic chromatography [J]. J Chromatogr A, 2001, 911(1): 119-126.

[17] 毛叶勤, 姚鑫, 陈琳. HILIC-HPLC-MS/MS法测定酸枣仁内氨基酸类成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(21): 76-81.

[18] LIU X G, XU J, DONG F S, et al. Residue analysis of four diacylhydrazine insecticides in fruits and vegetables by Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) method using ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 401(3): 1051-1058.

[19] Bourgogne E, Mathy F X, Boucaut D, et al. Simultaneous quantitation of histamine and its major metabolite 1-methylhistamine in brain dialysates by using precolumn derivatization prior to HILIC-MS/MS analysis [J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 402(1): 449-459.

[责任编辑 顾雪竹]