

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240318005

基于超高效液相色谱-串联质谱法的一测多评法 同时测定龙眼肉中8种核苷类成分含量

曾 铮¹, 梁国华², 黄松清¹, 邹芷琪¹, 黄振光¹, 叶有芳², 申伟培^{1*}

(1. 广西医科大学第一附属医院药学部, 南宁 530021; 2. 北海市公共检验检测中心, 北海 536000)

摘要: **目的** 基于超高效液相色谱-串联质谱法, 建立一测多评法同时测定龙眼肉中腺苷、鸟嘌呤、尿嘧啶、鸟苷、尿苷、次黄嘌呤、肌苷、胞苷含量的方法。 **方法** 待测样品经甲醇提取, 由 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.8 μm)分离, 以 0.1%甲酸-甲醇溶液为流动相梯度洗脱, 流速为 0.2 mL/min, 采用电喷雾正电离源模式(electronic spray ion, ESI+)和多反应监测模式(multiple reactions monitoring, MRM)监测, 分别采用外标法和一测多评法进行定量。 **结果** 腺苷在 0.305~6.100 μg/mL、鸟嘌呤在 0.435~8.700 μg/mL、尿嘧啶在 0.340~6.800 μg/mL、鸟苷在 0.325~6.500 μg/mL、尿苷在 0.320~6.400 μg/mL、次黄嘌呤在 0.330~6.600 μg/mL、肌苷在 0.305~6.100 μg/mL、胞苷在 0.360~7.200 μg/mL 范围内具有良好的线性关系, 相关系数大于 0.991, 检出限为 0.1 μg/g, 回收率为 99.5%, 相对标准偏差为 0.46% (n=9)。采用外标法和一测多评法计算鸟嘌呤、腺苷、尿嘧啶、鸟苷、尿苷、胞苷的含量, 两种方法计算结果差异极小。 **结论** 一测多评法稳定可靠, 可用于龙眼肉中核苷类成分的质量控制。

关键词: 龙眼肉; 核苷酸; 高效液相色谱-串联质谱法

Simultaneous determination of 8 kinds of nucleosides in longan meat by multi-components by single-marker method based on ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZENG Zheng¹, LIANG Guo-Hua², HUANG Song-Qing¹, ZOU Zhi-Qi¹,
HUANG Zhen-Guang¹, YE You-Fang², SHEN Wei-Pei¹

(1. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;
2. Beihai Academy of Public Measurement, Beihai 536000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of adenosine, guanine, uracil, guanosine, uridine, hypoxanthine, inosine and cytidine in longan meat by multi-components by single-marker based method on ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The samples were extracted by methanol and separated by Agilent SB-C₁₈ column (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm), then eluted with 0.1% formic acid-methanol solution as mobile phase gradient at a flow rate of 0.2 mL/min. Electronic spray ion (ESI+) and

基金项目: 广西壮族自治区中医药管理局自筹课题项目(GXZYA20220234)

Fund: Supported by the Self-raised Project of Guangxi Zhuang Autonomous Region of Traditional Chinese Medicine (GXZYA20220234)

*通信作者: 申伟培, 硕士, 副主任药师, 主要研究方向为药物分析、医院药学。E-mail: 305000632@qq.com

*Corresponding author: SHEN Wei-Pei, Master, Associate Chief Pharmacist, Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China. E-mail:305000632@qq.com

multiple reactions monitoring (MRM) were used for monitoring. External standard method and multi-components by single-marker method were used for quantitative analysis respectively. **Results** Adenosine in 0.305–6.100 $\mu\text{g/mL}$, guanine in 0.435–8.700 $\mu\text{g/mL}$, uracil in 0.340–6.800 $\mu\text{g/mL}$, guanosine in 0.325–6.500 $\mu\text{g/mL}$, uridine in 0.320–6.400 $\mu\text{g/mL}$, hypoxanthine in 0.330–6.600 $\mu\text{g/mL}$, inosine in 0.305–6.100 $\mu\text{g/mL}$, cytidine in 0.360–7.200 $\mu\text{g/mL}$ had a good linear relationship, the correlation coefficient was greater than 0.991, the limit of detection was 0.1 $\mu\text{g/g}$, and the recovery was 99.5%. The relative standard deviation was 0.46% ($n=9$). The content of guanine, adenosine, uracil, guanosine, uridine and cytidine were calculated by external standard method and multi-components by single-marker method. The difference between the two methods was very small. **Conclusion** Multi-components by single-marker method is stable and reliable, and can be used for the quality control of nucleosides components in longan meat.

KEY WORDS: longan meat; nucleotide; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0 引言

龙眼肉为无患子科植物龙眼(*Dimocarpus longan* Lour)的干燥假种皮, 历版《中华人民共和国药典》均有收载, 本品性甘, 温; 归心、脾经; 功能补益心脾, 养血安神。适应症为气血不足、心悸怔忡、健忘失眠、血虚萎黄。为大宗中药饮片, 常年的药用需求量为 5~10 万 t^[1], 也是药食两用目录品种^[2]。作为食物本身, 龙眼肉富含多种营养成分^[3-5], 其总含糖量高达 20% 左右, 主要是葡萄糖、蔗糖和果糖, 能够为人体提供快速能量; 且富含各种水溶性维生素, 如维生素 C、维生素 B₁、B₂、尼克酸, 以及其他水不溶性维生素如视黄醇、维生素 K 等; 同时含有粗蛋白、粗纤维以及钙、磷、铁等矿物质, 食用价值较高。

已有研究表明, 龙眼肉主要化学成分为糖类、脂类、核苷类、氨基酸、多酚及微量元素^[2,6-12], 其中核苷类有鸟嘌呤、腺苷、尿嘧啶、鸟苷、尿苷、次黄嘌呤、肌苷、胞苷, 是生物细胞维持生命的主要成分, 同时具有免疫调节、改善细胞代谢及调节神经中枢等多种生理活性^[13-15], 与其气血不足、心悸怔忡、健忘失眠功效具有较好的相关性, 表示核苷类成分可作为客观评价药材质量的指标性成分。

2020 版《中华人民共和国药典》中龙眼肉药材标准中仅有显微鉴别和薄层色谱鉴别, 无定量检测指标, 不能全面地反映龙眼肉的内在质量。为提升龙眼肉的质量控制水平, 有研究开发了高效液相色谱法测定鲜龙眼肉中的 9 种核苷类成分(尿嘧啶、胞苷、尿苷、胸腺嘧啶、次黄嘌呤核苷、鸟苷、胸苷、腺嘌呤和腺苷)含量并建立了指纹图谱, 并指出尿苷、鸟苷和腺苷为含量较稳定且较高的成分^[15-18]。饶伟文等^[19]建立了高效液相色谱法测定龙眼肉腺苷含量的方法。孔德平等^[20]对龙眼肉药材的核苷类成分进行分析发现只检测到 6 种(尿嘧啶、胞苷、尿苷、鸟苷、腺嘌呤和腺苷), 总核苷类成分含量为 476 $\mu\text{g/g}$ 。上述

文献报道定量方法均采用外标法, 对照品的种类和数量需求均较大。王智民等^[21]提出的一测多评法中药质量评价模式, 可实现仅用一个对照品, 进行多个成分的同时定量检测。它可以在中药对照品紧缺、成本高的条件下实现多指标同步质量控制, 降低了检测成本并解决了对照品不足的问题。一测多评法在中药的多成分含量测定中得到了广泛的认可和应用^[22-24]。但一测多评法用于龙眼肉中核苷类成分含量的测定鲜有文献报道。

本研究采用基于超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS)^[25-28]的一测多评法对龙眼肉中 8 种核苷成分(腺苷、鸟嘌呤、尿嘧啶、鸟苷、尿苷、次黄嘌呤、肌苷和胞苷)含量进行测定, 为龙眼肉质量评价技术的提升提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

LC-40B XR 超高效液相色谱仪(配置 LCMS-8050 三重四级杆质谱联用仪, 日本岛津公司); Agilent 1260 型液相色谱仪(配置 Agilent G6460 三重串联质谱仪, 美国安捷伦科技有限公司); MS3002S 万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); BCE55i-10CN 十万分之一电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 试剂与材料

腺苷(批号: J08HB173656)、鸟嘌呤(批号: M23HB178418)、尿嘧啶(批号: T14A8X33880)、鸟苷(批号: J09GB154303)、尿苷(批号: M11W109430)、次黄嘌呤(批号: T1311X107944)、肌苷(批号: YBJ12C137495)、胞苷(批号: T16JTX9000)(以上标准品含量均为 $\geq 99\%$, 为便于计算, 在本实验中均按 100% 计算, 上海伯奥生物科技有限公司); 甲醇(色谱纯, 赛默飞世尔科技中国有限公司); 纯净水(屈臣氏公司)。

12 批次来源于不同单位的龙眼肉样品信息见表 1。

表 1 不同单位的龙眼肉样品信息表

Table 1 Information table of Longan Arillus samples from different unit

单位	批号/采样日期	编号
广西南宁博爱药店	20230805	T1
北海能信中药有限公司	20230102	T2
广西南宁荟康药店	20220701	T3
广西博白特产	20220105	T4
广西南宁市景昌中药饮片有限公司	20221101	T5
广西南宁仁心药店	20230805	T6
广西仙茶中药科技有限公司	20220301	T7
北京同仁堂四川健康药业有限公司	210218	T8
湖南圣药堂中药科技有限公司	20230206	T9
广东康美药业股份有限公司	2020716	T10
广西南宁路路通药店	20230805	T11
广西北海老药店	20230805	T12

1.3 实验方法

1.3.1 供试品的制备

精密称取均质试样 1.0 g, 加入 10 mL 水研磨后置 50 mL 量瓶中, 加入甲醇稀释至刻度摇匀, 涡旋混合 5 min, 超声提取 30 min, 5000 r/min 离心 5 min, 取上清液过 0.22 μm 滤膜于进样小瓶中, 上 LC-40B XR 超高效液相色谱仪检测。

1.3.2 对照品的制备

精密称取对照品鸟嘌呤 0.0087 g、腺苷 0.0061 g、尿嘧啶 0.0068 g、鸟苷 0.0065 g、尿苷 0.0064 g、次黄嘌呤 0.0066 g、肌苷 0.0061 g、胞苷 0.0072 g 置 50 mL 量瓶, 用 80% 甲醇水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 5 mL 置 20 mL 容量瓶中, 用 80% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液(鸟嘌呤含量为 43.5 μg/mL、腺苷含量为 30.5 μg/mL、尿嘧啶含量为 34.0 μg/mL、鸟苷含量为 32.5 μg/mL、尿苷含量为 32.0 μg/mL、次黄嘌呤含量为 33.0 μg/mL、肌苷含量为 30.5 μg/mL、胞苷含量为 36.0 μg/mL)。

1.3.3 仪器条件

(1) 色谱条件

Agilent SB-C₁₈ 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-甲醇(25:75, V:V), 流速为 0.20 mL/min, 柱温为 35°C, 进样体积 1 μL。

(2) 质谱条件

LC-40B XR 超高效液相色谱仪采用电喷雾正电离源模式(electrospray ionization, ESI+), 多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM)采集, 雾化器流量 3 L/min, 加热器流量 10 L/min, 接口温度 300°C, 脱溶剂气温度 526°C, DL 温度 250°C, 加热模块温度 250°C, 干燥气器流量 10 L/min。Agilent 1260 型液相色谱仪, 雾化气压力: 30 PSI; 干燥器温度: 300°C; 干燥气流动速度: 8 L/min; 毛细管总电压: 4000 V, 碰撞气为高纯氮气, 主要用于一测多评

耐用性考察。

1.3.4 标准曲线考察

取 1.3.2 项下的各混合对照品溶液各 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL, 分别置于 10 mL 容量瓶, 加入 80% 甲醇水稀释到刻度, 摇匀, 分别得到相应对照品待测液。对照品待测液鸟嘌呤含量为 0.435、0.870、2.175、4.350、8.700 μg/mL、腺苷含量为 0.305、0.610、1.525、3.050、6.100 μg/mL、尿嘧啶含量为 0.340、0.680、1.700、3.400、6.800 μg/mL、鸟苷含量为 0.325、0.650、1.625、3.250、6.500 μg/mL、尿苷含量为 0.320、0.640、1.600、3.200、6.400 μg/mL、次黄嘌呤含量为 0.330、0.660、1.650、3.300、6.600 μg/mL、肌苷含量为 0.305、0.610、1.525、3.050、6.100 μg/mL、胞苷含量为 0.360、0.720、1.800、3.600、7.200 μg/mL 按照 1.3.3 项色谱条件进行进样分析, 绘制各标准品以峰面积(Y)为纵坐标, 质量浓度(X, μg/mL)为横坐标的标准曲线。

1.3.5 方法学考察

(1) 仪器精密度考察

取 1.3.2 项下的各混合对照品溶液各 0.5 mL 置于 10 mL 容量瓶, 加入 80% 甲醇水稀释到刻度, 摇匀, 分别得到相应对照品待测液。精密吸取对照品待测液各 1 μL, 在相同色谱条件下重复进样 6 次, 计算得腺苷、鸟嘌呤、尿嘧啶、鸟苷、尿苷、次黄嘌呤、肌苷、胞苷对照品峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

(2) 重复性考察

取同一批次龙眼肉样品(编号: T1, 腺苷 7.3741 μg/mL、鸟嘌呤 2.8344 μg/mL、尿嘧啶 0 μg/mL、鸟苷 3.9563 μg/mL、尿苷 1.0985 μg/mL、次黄嘌呤 0 μg/mL、肌苷 2.1291 μg/mL、胞苷 1.2566 μg/mL) 平行制备 6 份供试品, 按照 1.3.3 项下方法进行处理与测定, 计算供试品中测得腺苷、鸟嘌呤、尿嘧啶、鸟苷、尿苷、次黄嘌呤、肌苷、胞苷含量 RSD 值。

(3) 回收率考察

精密称取已知含量的样品 9 份, 分别精密加入对照品工作溶液(鸟嘌呤含量为 43.5 μg/mL、腺苷含量为 30.5 μg/mL、尿嘧啶含量为 34.0 μg/mL、鸟苷含量为 32.5 μg/mL、尿苷含量为 32.0 μg/mL、次黄嘌呤含量为 33.0 μg/mL、肌苷含量为 30.5 μg/mL、胞苷含量为 36.0 μg/mL) 1 mL 3 份、5 mL 3 份、10 mL 3 份, 按照按 1.3.1 项下方法前处理, 按 1.3.3 项下方法进行检测, 计算后得到平均回收率及 RSDs。

1.3.6 相对校正因子的建立

(1) 相对校正因子的计算

以腺苷为内参物, 相对校正因子^[29]计算公式为: $f_{s/i} = f_s/f_i = (W_s \times A_i)/(W_i \times A_s)$, 式中: $f_{s/i}$ 为内参物与其他组分之间的相对校正因子; A_s 为内参物的峰面积; W_s 为腺苷内参物的浓度; A_i 为其他组分的峰面积; W_i 为其他组分的浓度。供试品中各组分含量计算公式为: $W_i' = f_{s/i}' \times W_s' \times A_i'/A_s'$, 式

中 A_i' 为待测成分的峰面积, W_i' 为待测成分的浓度, A_s' 为内参物的峰面积, W_s' 为内参物的浓度, $f_{s,i}'$ 为内参物对待测成分的相对校正因子。

(2) 相对校正因子的耐用性考察以及色谱峰的定位

为了考察相对校正因子对于不同厂家仪器以及色谱柱的耐用性, 实验选择 3 种不同规格色谱柱和 2 种不同型号仪器进行校正因子的耐用性考察^[30]。精密吸取混合对照品溶液 1 μ L 进行测定, 分别考察 3 种色谱柱[Waters AT3 色谱柱(100 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)、CNW -lacq-2110ua-C₁₈ 色谱柱(100 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)、ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 100 mm, 5 μ m)], 2 种液相色谱质谱仪器(LC-40B XR 超高效液相色谱仪, 配置 LCMS-8050 三重四极杆质谱联用仪和 Agilent 1260 型液相色谱仪, 配置 Agilent G6460 三重串联质谱仪)的耐用性。

(3) 相对保留时间的测定

相对保留值法计算公式为 $R_{(i/s)}=t_{R(i)}/t_{R(s)}$, 其中 $t_{R(i)}$ 为待测组分保留时间, $t_{R(s)}$ 为参照物的保留时间。本研究考察了不同厂家仪器及色谱柱条件下各成分与腺苷的相对保留时间。

(4) 样品的含量测定

精密称取购买自不同单位的的龙眼肉样品(总共 12 批次, 批号以及购买地信息详见表 1)各 1.0 g, 按照前述 1.3.2 项下所示方法制备不同产地龙眼肉供试品, 各平行 3 份, 按照 1.3.3 项色谱分析方法进行进样分析, 采用质谱软件外标法及 1.3.6 项下一测多评法分别计算含量。

1.4 数据处理

安捷伦质谱数据、方法学考察数据处理采用 Mass

Hunter 工作站。岛津质谱数据方法学考察数据处理采用 LabSolution 工作站、样品的含量采用 Excel 2021 软件计算。

2 结果与分析

2.1 前处理条件的优化

本研究考察过不同方法提纯 8 种核苷, 如用甲醇回流、OasisHLB 固相萃取柱等, 也有研究表明提取溶剂选择纯水、10%甲醇-水、20%甲醇-水、30%甲醇-水、40%甲醇-水、50%甲醇-水、80%甲醇-水等^[20], 结果以纯水提取核苷类成分的溶出率最高, 但杂质成分多, 质谱测定基质干扰大, 而 80%甲醇超声 30 min 提取样品过 0.22 μ m 滤膜后用于 HPLC-MS 检测, 溶液颜色澄清, 8 种核苷的分离度良好, 故本研究采用 80%甲醇提取样品后用于检测。

2.2 色谱条件的优化

8 种核苷成分均为酸碱两性化学物质, 其流动相体系的 pH 对各物质分离有较大影响。本研究比较 0.1%甲酸水、0.2%甲酸水、5 mmol 乙酸铵水溶液、10 mmol 乙酸铵水溶液分别与甲醇、0.1%甲酸乙腈组成的流动相体系, 综合考虑和兼顾 8 种核苷成分经 SB-C₁₈ 分离的保留时间、分离度、峰形和响应值, 结果用 0.1%甲酸水溶液-甲醇(25:75, V:V) 时, 8 种核苷成分在低浓度加标试样中都有较合适的出峰时间、较好的峰形和较高的响应值, 如图 1 所示。故选择 0.1%甲酸水溶液-甲醇体系作为流动相。优化 8 种核苷离子各参数, 最后确认实验中的参数如下: 干燥气温度为 350 $^{\circ}$ C; 碎裂电压为 160 V, 碰撞能量为 25 V, 雾化气 N₂ 压力为 35 psi; 干燥气体 N₂ 流速为 8 L/min。

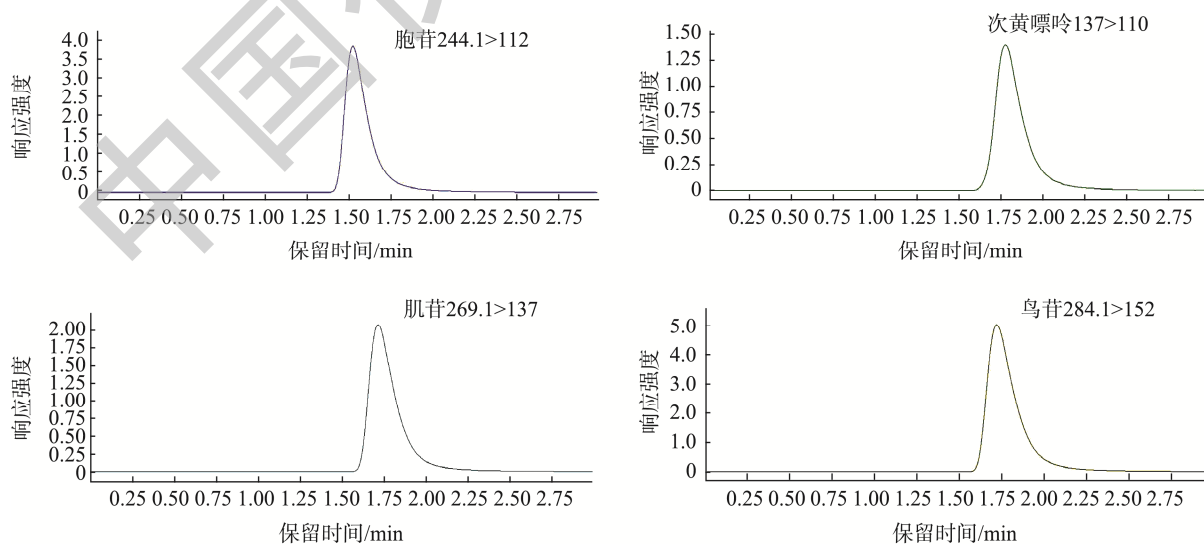


图1 8种核苷的MRM色谱图

Fig.1 MRM chromatograms of 8 kinds of nucleosides

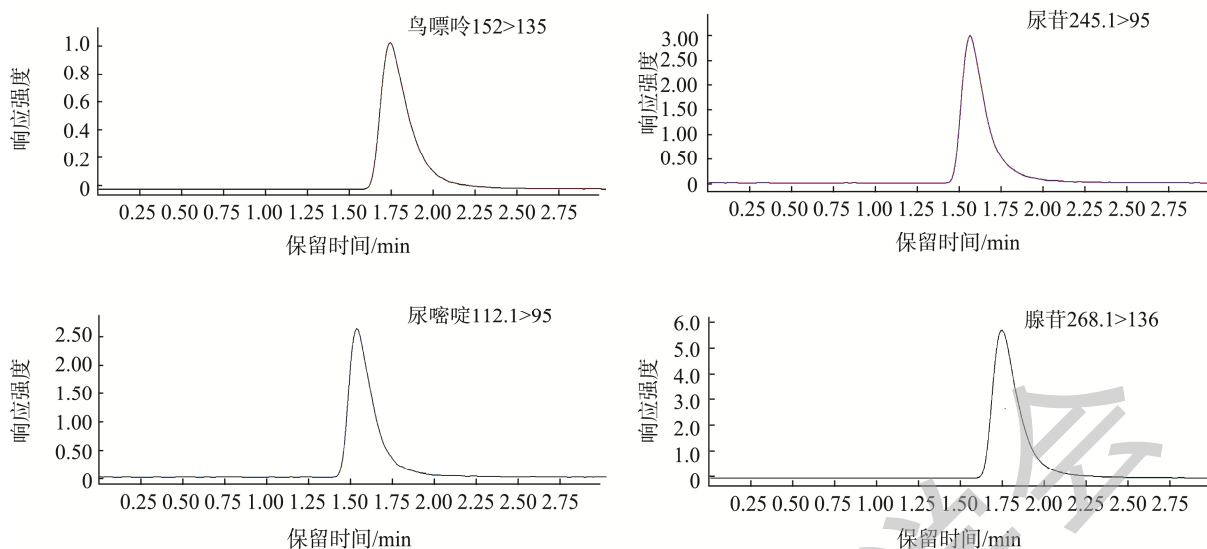


图1(续) 8种核苷的MRM色谱图

Fig.1 MRM chromatograms of 8 kinds of nucleosides

2.3 线性关系

各标准品外标法的线性回归方程、相关系数以及对照品的线性范围如表 2 所示。从表 2 中数据可知,腺苷、鸟嘌呤、尿嘧啶、鸟苷、尿苷、次黄嘌呤、肌苷、胞苷 8 种核苷成分进样量与峰面积之间具有良好的线性关系,其相关系数 r 均大于 0.995。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度

按照 1.3.5(1)方法进行分析,计算得腺苷、鸟嘌呤、尿嘧啶、鸟苷、尿苷、次黄嘌呤、肌苷、胞苷对照品峰面积的 RSDs 分别为 2.87%、0.99%、1.11%、0.65%、2.61%、

2.35%、1.48%、1.78%,表明仪器具有良好的精密度。

2.4.2 重复性

按照 1.3.5(2)方法进行分析,结果供试品中测得腺苷、鸟嘌呤、尿嘧啶、鸟苷、尿苷、次黄嘌呤、肌苷、胞苷含量 RSDs 值分别为 1.77%、1.84%、1.78%、1.28%、0%、0%、1.76%、1.97%,表明该方法的重复性较好。

2.4.3 回收率

按照 1.3.5(3)方法进行分析,按照按 1.3.1 项下方法前处理,按 1.3.3 项下方法进行检测,结果见表 3。经计算后得到平均回收率为 99.5%,RSD 为 0.46%。结果表明该方法可靠,具有较好的准确性。

表 2 龙眼肉 8 种核苷类成分的线性关系和范围

Table 2 Linear relationship and range of 8 kinds of nucleosides in Longan Arillus

成分	标准曲线回归方程	相关系数 r	线性范围/($\mu\text{g}/\text{mL}$)
腺苷	$Y=3575480X-6616666$	0.999	0.305~6.100
尿嘧啶	$Y=115096X+119856$	1.000	0.340~6.800
鸟苷	$Y=2633721X+120154$	0.999	0.325~6.500
尿苷	$Y=409116X+58325$	0.995	0.320~6.400
次黄嘌呤	$Y=391026X+295282$	1.000	0.330~6.600
肌苷	$Y=1227820X+616882$	0.999	0.305~6.100
胞苷	$Y=1786260X+765386$	0.997	0.360~7.200
鸟嘌呤	$Y=277393X+124484$	0.999	0.435~8.700

表 3 平均回收率与 RSDs($n=9$)Table 3 Average recoveries and RSDs ($n=9$)

成分	鸟嘌呤	腺苷	尿嘧啶	鸟苷	尿苷	次黄嘌呤	肌苷	胞苷
平均回收率/%	95.2	96.78	99.27	95.20	95.70	98.20	97.22	94.98
RSDs/%	2.59	2.51	2.84	2.05	1.74	2.16	2.38	2.46

2.5 相对校正因子的建立

2.5.1 相对校正因子计算

以腺苷(1.525 $\mu\text{g/mL}$)为内参物, 分别计算腺苷对尿嘧啶(1.700 $\mu\text{g/mL}$)、鸟苷(1.625 $\mu\text{g/mL}$)、尿苷(1.600 $\mu\text{g/mL}$)、次黄嘌呤(1.650 $\mu\text{g/mL}$)、肌苷(1.525 $\mu\text{g/mL}$)、胞苷(1.800 $\mu\text{g/mL}$)和鸟嘌呤(2.175 $\mu\text{g/mL}$) 7 个成分的相对校正因子, 结果表明该校正因子满足检测要求, RSDs 均小于 2%(见表 4)。

2.5.2 相对校正因子的耐用性考察以及色谱峰的定位

相对校正因子耐用性系指在含量测定条件有小的变动时所能承受程度。为使所建立的各待测成分相对校正因子的能用于常规检验, 应对待测成分 RCF 耐用性进行全面的考察^[30]。为了考察 RCF 对于不同产家仪器以及色谱柱的耐用性, 实验选择 3 种不同色谱柱和 2 种不同型号仪器进行校正因子的耐用性考察。精密吸取混合对照品溶液 1 μL 进

行测定, 分别考察 3 种色谱柱[Waters AT3 色谱柱(100 mm \times 4.6 mm, 5 μm)、CNW-laeq-2110ua-C₁₈ 色谱柱(100 mm \times 4.6 mm, 5 μm)、ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(100 mm \times 4.6 mm, 5 μm)], LC-40B XR 超高效液相色谱仪, 配置 LCMS-8050 三重四极杆质谱联用仪和 Agilent 1260 型液相色谱仪, 配置 Agilent G6460 三重串联质谱仪的耐用性, 结果表明在不同色谱柱及仪器条件下, 相对校正因子(f)均比较稳定, RSDs 均小于 4%(见表 5), 具有良好的适应性。

2.5.3 相对保留时间的测定

相对保留值法计算公式为 $R_{(i/s)}=t_{R(i)}/t_{R(s)}$, 其中 $t_{R(i)}$ 为待测组分保留时间, $t_{R(s)}$ 为参照物的保留时间。本研究考察了不同产家仪器及色谱柱条件下各成分与腺苷的相对保留时间, 结果表明相对保留值可用于定位目标色谱峰, RSDs 均小于 3%(见表 6)。

表 4 以腺苷为内参物的相对校正因子

Table 4 Relative correction factor with adenosine as the reference substance

编号	$f_{\text{腺苷/鸟苷}}$	$f_{\text{腺苷/肌苷}}$	$f_{\text{腺苷/尿苷}}$	$f_{\text{腺苷/次黄嘌呤}}$	$f_{\text{腺苷/尿嘧啶}}$	$f_{\text{腺苷/胞苷}}$	$f_{\text{腺苷/鸟嘌呤}}$
1	1.1231	2.7162	73.5638	7.2422	22.4908	1.4110	4.7113
2	1.1641	2.6884	74.1808	7.2315	22.6713	1.4525	4.6810
3	1.1777	2.6311	75.6221	7.2346	22.2274	1.4729	4.7304
4	1.1630	2.7274	74.6492	7.2715	22.9864	1.4219	4.7522
5	1.1497	2.7556	72.3499	7.2266	22.6034	1.4191	4.6653
平均值	1.1555	2.7037	74.0732	7.2418	22.5959	1.4355	4.7080
RSDs/%	1.79	1.75	1.65	0.25	1.22	1.82	0.75

表 5 不同色谱柱和不同仪器条件下 7 种指标成分与腺苷的相对校正因子比较

Table 5 Comparison of relative correction factors of 7 kinds of index components to adenosine under different chromatographic columns and instruments condition

仪器	色谱柱	相对校正因子						
		$f_{\text{腺苷/鸟苷}}$	$f_{\text{腺苷/肌苷}}$	$f_{\text{腺苷/尿苷}}$	$f_{\text{腺苷/次黄嘌呤}}$	$f_{\text{腺苷/尿嘧啶}}$	$f_{\text{腺苷/胞苷}}$	$f_{\text{腺苷/鸟嘌呤}}$
岛津	AT3	1.1913	2.7244	72.9168	7.8161	21.4837	1.3717	4.6321
	CNW	1.1223	2.5901	70.5029	7.2445	19.8466	1.2817	4.5212
	SB	1.1301	2.7879	71.2346	7.1629	21.0114	1.3729	4.3166
安捷伦	AT3	1.1232	2.7651	70.2365	7.0235	21.3354	1.3562	4.3589
	CNW	1.1536	2.6457	71.2578	7.3245	20.9875	1.3548	4.3365
	SB	1.1422	2.7123	72.0125	7.2546	21.0289	1.3025	4.3978
	平均值	1.1438	2.7042	71.3601	7.3044	20.9489	1.3400	4.4272
	RSDs/%	2.29	2.75	1.38	3.71	2.75	2.87	2.99

表 6 不同仪器和不同色谱柱条件下目标成分的相对保留时间值

Table 6 Relative retention time values of target components under different instruments and column conditions

仪器	色谱柱	相对保留时间值						
		鸟嘌呤	尿嘧啶	鸟苷	尿苷	次黄嘌呤	肌苷	胞苷
岛津	AT3	0.992	0.853	0.999	0.853	1.032	1.005	0.851
	CNW	0.988	0.855	0.995	0.860	1.029	1.001	0.857
	SB	0.993	0.856	0.986	0.879	1.014	1.002	0.861
安捷伦	AT3	0.968	0.891	1.021	0.875	1.022	1.008	0.875
	CNW	0.975	0.875	1.002	0.897	1.035	1.005	0.897
	SB	0.995	0.895	1.007	0.902	1.025	1.002	0.842
	平均值	0.985	0.871	1.002	0.878	1.026	1.004	0.864
	RSDs/%	1.12	2.18	1.18	2.22	0.748	0.262	2.27

2.6 样品的含量测定

外标法采用 2.3 所示线性回归方程计算含量,一测多评相对校正因子采用表 5 的平均值计算含量。结果如表 7 所示,采用一测多评法与外标法分别检测 12 批次龙眼肉中 8 种核苷类的含量计算结果之间并无明显差异(RSDs 均小于 3%),并且 2 种检测方法的检测灵敏度均一致,均未在 12 批次龙眼肉中检测出尿嘧啶和次黄嘌呤,显示采用

外标法以及本研究所建立的一测多评法检测结果无明显差异,表明本研究建立的 RCF 可用于龙眼肉中 8 种核苷类成分含量的同时测定。与已有文献报道相比^[16,18],本研究所建立的一测多评方法在后续检测中仅需一个对照品,而外标法则需要准备 8 个成分的对照品,相较于后者一方面减少样品制备,大大提高了检测效率;同时因所需的标准品数量和试剂消耗较少,有效降低检测成本。

表 7 一测多评法和外标法检测 8 种指标成分含量的结果比较($n=3$)

Table 7 Comparison of determination results of 8 kinds of index components contents by external standard method and quantitative analysis of multi-components by single marker method ($n=3$)

编号	测定方法	含量/($\mu\text{g/g}$)							
		腺苷	鸟嘌呤	尿嘧啶	鸟苷	尿苷	次黄嘌呤	肌苷	胞苷
T1	外标法		141.7202	-	197.8156	54.9249	-	106.4541	62.8297
	一测多评法	368.7067	140.4587	-	197.7857	54.02368	-	105.9874	62.7845
	RSDs/%		0.632	-	0.011	1.170	-	0.311	0.542
T2	外标法		33.1363	-	112.8035	124.8258	-	96.2395	71.4123
	一测多评法	18.7092	33.0257	-	112.0130	125.0368	-	96.4203	71.3258
	RSDs/%		0.236	-	0.454	0.325	-	0.275	0.478
T3	外标法		87.5421	-	14.3304	56.8956	-	-	59.2595
	一测多评法	18.8837	86.9715	-	14.1257	56.7547	-	-	59.7865
	RSDs/%		0.462	-	1.017	0.279	-	-	0.589
T4	外标法		75.8752	-	29.5203	64.2135	-	-	67.6036
	一测多评法	39.6803	74.6847	-	29.4768	64.0257	-	-	67.5842
	RSDs/%		1.118	-	0.104	0.357	-	-	0.457
T5	外标法		87.6534	-	43.7272	117.5306	-	99.7301	81.0395
	一测多评法	104.2897	88.02356	-	44.6987	117.4587	-	99.5478	80.7854
	RSDs/%		0.298	-	1.554	0.127	-	0.354	0.574
T6	外标法		26.7894	-	274.8058	125.6772	-	150.3087	108.2105
	一测多评法	647.0175	26.0128	-	271.7925	126.0237	-	150.0278	108.1378
	RSDs/%		2.080	-	0.779	0.195	-	0.452	0.354
T7	外标法		35.4123	-	128.2719	79.2332	-	158.9044	94.9875
	一测多评法	693.7337	35.0235	-	129.0365	79.9215	-	158.8753	94.8512
	RSDs/%		0.781	-	0.420	0.612	-	0.235	0.125
T8	外标法		56.1579	-	120.9316	90.8595	-	-	67.7305
	一测多评法	23.9985	56.5789	-	121.0367	92.7843	-	-	67.5421
	RSDs/%		0.528	-	0.061	1.482	-	-	0.374
T9	外标法		34.5876	-	562.0134	57.4258	-	186.8777	59.8783
	一测多评法	787.6601	34.0687	-	51.6784	57.3754	-	186.9025	59.7625
	RSDs/%		1.069	-	1.312	0.061	-	0.215	0.312
T10	外标法		21.3587	-	355.6778	89.3839	-	156.7535	80.7929
	一测多评法	697.1679	21.1589	-	344.8716	89.3795	-	156.4528	80.5743
	RSDs/%		0.665	-	2.182	0.254	-	0.417	0.125
T11	外标法		68.4587	-	668.3164	90.0813	-	168.9209	88.3621
	一测多评法	745.7778	67.9856	-	667.9235	90.2357	-	168.7254	88.0125
	RSDs/%		0.491	-	0.042	0.456	-	0.203	0.108
T12	外标法		97.2358	-	518.9618	66.8519	-	154.7058	86.1212
	一测多评法	657.8768	96.4568	-	507.7865	66.7956	-	154.8706	86.0157
	RSDs/%		0.569	-	1.539	0.257	-	0.247	0.325

注: -为未检测出该成分。

3 结 论

本研究曾考察不同方法提纯 8 种核苷, 如用甲醇回流、OasisHLB 固相萃取柱等, 也有研究表明提取溶剂选择纯水、10%甲醇-水、20%甲醇-水、30%甲醇-水、40%甲醇-水、50%甲醇-水等, 结果以纯水提取核苷类成分的溶出率最高^[20], 但质谱测定基质干扰大, 杂质成分较多。而本研究发现采用 80%甲醇超声 30 min 提取后, 以 0.1%甲酸水溶液-甲醇作为流动相检测结果分离度良好, 基线稳定。本研究以腺苷为参照物, 通过腺苷与其他 7 种成分间的相对校正因子, 计算 12 批龙眼肉样品中 8 中核苷成分, 并与外标法检测结果进行对比分析, RSDs 均小于 3%, 显示采用外标法以及本研究所建立的一测多评法计算结果无明显差异, 且本研究检测方法更便捷。

本研究成功建立基于超高效液相色谱-串联质谱法的一测多评法同时测定龙眼肉中腺苷、鸟嘌呤、尿嘧啶、鸟苷、尿苷、次黄嘌呤、肌苷、胞苷 8 种核苷类成分含量的检测方法, 该方法快速、简便, 既实现了龙眼肉多指标成分控制的目的, 又可减少对照品的使用, 节省成本, 提高检测效率, 为中药制剂综合质量控制的发展提供了新思路。

参考文献

- [1] 国家林业和草原局办公室. 林草中药材产业发展指南[EB/OL]. [2022-02-24]. <https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2022-02/27/5675919/files/76308287180d462299b6cdc0ffdfecaa.pdf> [2024-05-21]. Office of the National Forestry and Grassland Administration. Development guidelines for the forestry and grassland Chinese medicinal materials industry [EB/OL]. [2022-02-24]. <https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2022-02/27/5675919/files/76308287180d462299b6cdc0ffdfecaa.pdf> [2024-05-21].
- [2] 黄建蓉, 李琳, 李冰. 龙眼肉生理功效和活性成分的研究进展[J]. 食品工业科技, 2007, (3): 221–224. HUANG JR, LI L, LI B. Research progress on physiological functions and active components of longan pulp [J]. Sci Technol Food Ind, 2007, (3): 221–224.
- [3] 王莲. 龙眼在食品加工中的应用研究进展[J]. 现代食品, 2023, 29(6): 23–25. WANG L. Research progress on the application of longan in food processing [J]. Mod Food, 2023, 29(6): 23–25.
- [4] 张宏康, 李嵩琪, 林小可, 等. 龙眼加工研究现状及展望[J]. 轻工科技, 2017, 33(1): 1–4. ZHANG HK, LI AQ, LIN XK, *et al.* Current status and prospects of longan processing research [J]. Light Ind Sci Technol, 2017, 33(1): 1–4.
- [5] 吴光亮. 龙眼干加工过程功效营养成分的变化[D]. 福州: 福建农林大学, 2013. WU GL. Influence of efficacy and nutrients in longan (*Dimocarpus longan* Lour.) aril during drying processing [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2013.
- [6] 肖更生, 黄儒强, 曾庆孝, 等. 龙眼核的营养成分[J]. 食品科技, 2004, (1): 93–94. XIAO GS, HUANG RQ, ZENG QX, *et al.* Nutritional components of longan seed [J]. Food Sci Technol, 2004, (1): 93–94.
- [7] 郑公铭. 龙眼果肉化学成分的研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2010, 18(1): 82–86. ZHENG GM. Research on chemical components of longan pulp [J]. J Trop Subtrop Bot, 2010, 18(1): 82–86.
- [8] 王寅, 文秋, 张坤, 等. 泸州桂圆果肉中微量元素含量分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(14): 4741–4746. WANG Y, WEN Q, ZHANG K, *et al.* Analysis of trace element content in Luzhou longan pulp [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(14): 4741–4746.
- [9] YAJUAN B, YUE Z, XIANG L, *et al.* Longan pulp polysaccharides regulate gut microbiota and metabolites to protect intestinal epithelial barrier [J]. Food Chem, 2023, 422: 136225–136225.
- [10] TENGGEN H, WEILIN Z, YUANSHAN Y, *et al.* The variation on structure and immunomodulatory activity of polysaccharide during the longan pulp fermentation [J]. Int J Biol Macromol, 2022, 222: 599–609.
- [11] LAN H, NUNES C, LOPES GR, *et al.* *In vitro* immunomodulatory activity of water-soluble glucans from fresh and dried Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) [J]. Carbohydr Polym, 2021, 266: 118106.
- [12] LAN HB, CHEN YX, MU JJ, *et al.* Glucose-rich polysaccharide from dried ‘Shixia’ longan activates macrophages through Ca²⁺ and CR3-mediated MAPKs and PI3K-AKT pathways [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 167: 845–853.
- [13] 陈冠敏, 陈润, 张荣标. 龙眼多糖口服液增强免疫功能的研究[J]. 毒理学杂志, 2005, (S1): 283. CHEN GM, CHEN R, ZHANG RB. Study on the immune function enhancement of longan polysaccharide oral liquid [J]. J Toxicol, 2005, (S1): 283.
- [14] LEE J, CHUANG TH, REDECKE V, *et al.* Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: Activation of toll-like receptor7 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(11): 6646–6651.
- [15] 肖维强, 黄炳雄, 王晓容, 等. HPLC 法测定龙眼肉中的几种核苷类物质[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 234–237. XIAO WQ, HUANG BX, WANG XR, *et al.* Determination of several nucleoside compounds in longan pulp by HPLC [J]. Food Sci, 2007, 28(1): 234–237.
- [16] 肖维强, 赖志勇, 戴宏芬, 等. 龙眼肉中 9 种核苷类成分的高效液相色谱分析[J]. 华中农业大学学报, 2007, (5): 722–726. XIAO WQ, LAI ZY, DAI HF, *et al.* High-performance liquid chromatography analysis of 9 nucleoside components in longan pulp [J]. J Huazhong Agric Univ, 2007, (5): 722–726.
- [17] 肖维强, 戴宏芬, 黄炳雄, 等. 石硖龙眼 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(4): 154–157. XIAO WQ, DAI HF, HUANG BX, *et al.* Study on HPLC fingerprint of Shixia longan [J]. Food Sci, 2009, 30(4): 154–157.
- [18] 黄炳雄, 李建光, 王晓容, 等. 18 个龙眼品种果肉中核苷物质的 HPLC 定量测定[J]. 广东农业科学, 2008, (3): 67–69. HUANG BX, LI JG, WANG XR, *et al.* HPLC quantitative determination of nucleoside substances in pulp of 18 longan varieties [J]. Guangdong

- Agric Sci, 2008, (3): 67–69.
- [19] 饶伟文, 肖聪, 钟名诚. 龙眼肉药材质量标准研究[J]. 中国药事, 2010, 24(8): 792–794.
RAO WW, XIAO C, ZHONG MC. Study on the quality standard of longan pulp [J]. Chin J Pharm, 2010, 24(8): 792–794.
- [20] 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.
KONG DP, QIAN DY, GUO S, *et al.* Analysis of nucleoside components in 9 kinds of fruits and seeds with tonic effects [J]. Chin J Exp Tradit Med Formul, 2011, 17(4): 98–101.
- [21] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, (23): 1925–1928.
WANG ZM, GAO HM, FU XT, *et al.* Methodological study on the quality evaluation model of traditional Chinese medicine with “one test and multi-evaluation” method [J]. China J Chin Mater Med, 2006, (23): 1925–1928.
- [22] 蓝天梅, 蔡庆群, 苏志强, 等. 一测多评法测定不同产地桑叶中 5 种黄酮类成分的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(13): 5229–5236.
LAN TM, CAI QQ, SU ZQ, *et al.* Determination of five flavonoid components in mulberry leaves from different producing areas by “one test and multi-evaluation” method [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(13): 5229–5236.
- [23] 欧燕香, 冯时茵, 黄思文, 等. 一测多评法测定马齿苋中 4 种黄酮类成分[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(3): 990–996.
OU YX, FENG SY, HUANG SW, *et al.* Determination of four flavonoid components in *Portulaca oleracea* L. by “one test and multi-evaluation” method [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(3): 990–996.
- [24] 杨洋, 黄良永, 朱美玲, 等. 一测多评法在中国药典 2015 年版中的应用[J]. 中南药学, 2017, 15(12): 1738–1741.
YANG Y, HUANG LY, ZHU ML, *et al.* Application of the quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) method in the 2015 edition of Chinese pharmacopoeia [J]. Central South Pharm, 2017, 15(12): 1738–1741.
- [25] 蒋志涛, 戴国梁, 潘金火, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定强肾排毒胶囊 5 种成分含量[J]. 医药导报, 2016, 35(7): 772–775.
JIANG ZT, DAI GL, PAN JH, *et al.* Determination of five components in Qiangshen paidu capsules by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) [J]. Herald Med, 2016, 35(7): 772–775.
- [26] 王广政, 巩晴晴, 俞年军, 等. 液相色谱-串联质谱法检测药食两用杂交天麻及其亲本品种中的氨基酸、核苷类成分[J]. 食品工业科技, 2023, 44(3): 269–278.
WANG GZ, GONG QQ, YU NJ, *et al.* Detection of amino acids and nucleosides in edible and medicinal *Gastrodia elata* hybrids and their parent species by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [J]. Sci Technol Food Ind, 2023, 44(3): 269–278.
- [27] 黄莹涓, 曾军, 白卫东, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时检测食品中的烟酰胺单核苷酸 α 、 β 异构体和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(15): 206–213.
HUANG YJ, ZENG J, BAI WD, *et al.* Simultaneous determination of nicotinamide mononucleotide α , β isomers and nicotinamide adenine dinucleotide in foods by solid-phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-UPLC-MS/MS) [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(15): 206–213.
- [28] 黄小兰, 何旭峰, 周浓, 等. LC-MS/MS 法测定桑枝中的核苷类成分[J]. 华西药理学, 2024, 39(2): 179–184.
HUANG XL, HE XF, ZHOU N, *et al.* Determination of nucleosides in mulberry branches by LC-MS/MS [J]. West China J Pharma Sci, 2024, 39(2): 179–184.
- [29] 叶诚, 王东鹏, 黄岭岭. HPLC-MS/MS 法同时测定藤茶中 5 个黄酮类成分含量[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(12): 2195–2201.
YE C, WANG DP, HUANG LL. Simultaneous determination of five flavonoid components in *Ampelopsis grossedentata* by HPLC-MS/MS [J]. Chin J Pharm Anal, 2022, 42(12): 2195–2201.
- [30] 王智民, 钱忠直, 张启伟, 等. 一测多评法建立的技术指南[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 657–658.
WANG ZM, QIAN ZZ, ZHANG QW, *et al.* Technical guidelines for establishing the quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) method [J]. China J Chin Mater Med, 2011, 36(6): 657–658.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)

作者简介



曾 铮, 副主任药师, 主要研究方向为药物分析、医院药学。
E-mail: 173682197@qq.com



申伟培, 硕士, 副主任药师, 主要研究方向为药物分析、医院药学。
E-mail: 305000632@qq.com