

不同采收期玄参中核苷类成分的含量分析

王胜男¹, 华愉教¹, 邹立思¹, 罗益远¹, 刘训红^{1*}, 刘娟秀¹, 严颖¹, 徐力²

¹南京中医药大学, 南京 210023; ²扬州市药品检验所, 扬州 225000

摘要: 建立 UPLC-QTRAP-MS/MS 同时测定玄参中 10 种核苷类成分含量的方法, 分析不同采收期玄参中核苷类成分动态积累变化。采用 UPLC-QTRAP-MS/MS 技术同时测定玄参样品中 10 种核苷类成分的含量。玄参核苷类成分中, 以鸟苷、尿苷、腺苷、尿嘧啶含量较高; 不同采收期玄参核苷类成分含量有所差异, 11 月份核苷含量相对较高。为探究玄参药材的品质形成机制及确定药材适宜采收期提供基础资料。

关键词: 玄参; UPLC-QTRAP-MS/MS; 核苷类成分; 动态积累; 不同采收期

中图分类号: R917

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.12.016

Determination of Nucleosides and Nucleobases in Different Harvesting Periods of *Scrophulariae Radix*

WANG Sheng-nan¹, HUA Yu-jiao¹, ZOU Li-si¹, LUO Yi-yuan¹,

LIU Xun-hong^{1*}, LIU Juan-xiu¹, YAN Ying¹, XU Li²

¹Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; ²Yangzhou Institute for Drug Control, Yangzhou 225000, China

Abstract: The goal of this research was to establish an UPLC-QTRAP-MS/MS method for the determination of 10 kinds of nucleosides and nucleobases in *Scrophulariae Radix* and to investigate the dynamic accumulation of nucleosides and nucleobases in different harvesting periods of *Scrophulariae Radix*. UPLC-QTRAP-MS/MS was applied for the analysis of 10 kinds of nucleosides and nucleobases in *Scrophulariae Radix*. Compared with other nucleosides and nucleobases in *Scrophulariae Radix*, the contents of guanosine, uridine, adenosine and uracil were relatively higher. There were differences in the contents of nucleosides and nucleobases in *Scrophulariae Radix* at different harvesting periods; the contents were relatively higher in those grown in November. This study provided a scientific basis for the investigation of the influence of the quality formation mechanism of *Scrophulariae Radix* as well as the determination of the appropriate harvesting time.

Key words: *Scrophulariae Radix*; UPLC-QTRAP-MS/MS; nucleosides and nucleobases; dynamic accumulation; different harvest periods

玄参为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根, 是一味大宗常用中药材。具有清热凉血、滋阴降火、解毒散结的功效^[1]。现代研究表明, 玄参具有保护心脑血管系统、抗炎、增强免疫等药理活性^[2-4], 其药效成分除了环烯醚萜类、苯丙素苷类及有机酸类成分之外, 核苷类成分对药效发挥的协同作用也不能忽视^[2-5]。近年来研究证实核苷类成分具有广泛的生理活性, 如改善心脑血管循环、防止心律失常、免疫调节、抗病毒、抑制神经递质释放等作用^[5-9]。玄参滋阴药效的物质基础尚不明

确, 但阴虚患者常表现为免疫功能低下^[5], 因此, 鉴于核苷免疫调节作用, 可以推断其为玄参滋阴的功物质基础之一。

目前, 关于玄参药材的质量评价及采收期考察, 多以环烯醚萜类、苯丙素苷类及有机酸类成分为主要指标^[10,11], 未见核苷类成分的研究报道。本实验以道地产区浙江磐安玄参为研究对象, 基于超高效液相色谱-串联四级杆/线性离子阱质谱(UPLC-QTRAP-MS/MS)技术, 建立同时测定玄参中 10 种核苷类成分含量的方法, 分析不同采收期玄参中核苷类成分积累的动态变化, 为深入探讨玄参药材的品质形成机制及确定其药材适宜采收期提供基础资料, 同时为玄参药材质量的综合评价提供新的方法参考。

收稿日期: 2015-08-11 接受日期: 2015-11-04

基金项目: 江苏省高校优势学科建设工程资助项目(ysxk-2014)

* 通讯作者 Tel: 86-25-85811511; E-mail: liuxunh1959@163.com

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津液相 UPLC-20ADXR 系列(日本 Shimadzu 公司),配有溶剂脱气装置、自动进样器;API 4000 四极杆-线性离子阱质谱仪(美国 AB SCIEX 公司),配有离子喷雾接口;KQ-500B 超声波清洗机(昆山超声仪器有限公司,超声功率 500 W,40 kHz);BSA2245 型电子分析天平(十万分之一,德国赛多利斯公司);ME36S 型电子分析天平(百万分之一,德国赛多利斯公司);湘仪 H1650-W 高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.2 试剂

对照品尿嘧啶(批号 100469-200401)、鸟嘌呤(批号 140631-200904)、次黄嘌呤(批号 140661-200301)、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)(中国食品药品检定研究院,纯度均 > 98%);鸟苷(批号 1001103046)、2'-脱氧鸟苷(批号 1000943454)、2'-脱氧腺苷(批号 2513C105)(美国 Sigma 公司,纯度均 > 98%)。水为超纯水,甲醇为色谱纯(德国默克公司),其余试剂为分析纯。

玄参样品采集自道地产区浙江省磐安县,采收时间分别为:S1—2014 年 10 月 3 日,S2—2014 年 10 月 10 日,S3—2014 年 10 月 18 日,S4—2014 年 10 月 24 日,S5—2014 年 11 月 2 日,S6—2014 年 11 月

8 日,S7—2014 年 11 月 15 日,S8—2014 年 11 月 22 日,S9—2014 年 12 月 5 日,均经南京中医药大学刘训红教授鉴定为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根,留样凭证存放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

色谱柱:Waters Atlantis T₃(2.1 mm × 150 mm,3 μm);流动相:甲醇(A)-5 mmol/L 醋酸铵水溶液(含 0.1% 冰醋酸,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,检测波长 254 nm,进样量 2 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:5500 V;雾化气(GS1):65 L/min;辅助气(GS2):65 L/min;气帘气(CUR):30 L/min,优化的质谱条件参数见表 1。

2.3 对照品溶液制备

精密称取尿嘧啶、鸟嘌呤、次黄嘌呤、尿苷、腺嘌呤、肌苷、鸟苷、2'-脱氧鸟苷、腺苷、2'-脱氧腺苷对照品适量,加纯水配制成质量浓度分别为 213.00、168.00、160.00、1011.00、190.00、156.00、1042.00、66.00、414.00、91.50 μg/mL 的对照品储备液。取

表 1 优化的质谱条件参数
Table 1 Optimized MS/MS parameters

化合物 Compounds	保留时间 t _R (min)	MRM 参数 MRM parameters		
		MRM 离子对 MRM transitions (m/z)	去簇电压 DP (V)	碰撞电压 CE (eV)
尿嘧啶 Uracil	1.75	113.0/70.0	68	24
鸟嘌呤 Guanine	2.56	151.8/135.0	54	27
次黄嘌呤 Hypoxanthine	2.57	137.0/118.9	88	33
尿苷 Uridine	3.07	244.7/113.1	40	12
腺嘌呤 Adenine	3.91	136.0/119.1	66	29
肌苷 Inosine	5.84	269.0/137.0	39	15
鸟苷 Guanosine	6.48	284.3/152.1	42	16
2'-脱氧鸟苷 2'-Deoxyguanosin	7.48	268.0/152.3	39	13
腺苷 Adenosine	9.15	268.1/136.1	73	24
2'-脱氧腺苷 2'-Deoxyadenosine	9.52	252.4/136.1	50	18

各对照品储备液适量,置 10 mL 量瓶中,加水定容,配制成尿嘧啶、鸟嘌呤、次黄嘌呤、尿苷、腺嘌呤、肌苷、鸟苷、2'-脱氧鸟苷、腺苷、2'-脱氧腺苷质量浓度分别为 21.30、16.80、16.00、101.10、19.00、15.60、104.20、6.60、41.40、9.15 $\mu\text{g/mL}$ 的混合溶液,并按 2、5、10、50、100、200 倍逐级稀释,得到一系列不同浓度的 10 种核苷混合对照品溶液,供分析用。

2.4 供试品溶液制备

取玄参粉末 1.0 g (过 80 目),精密称定,置于 25 mL 具塞锥形瓶中,加入 10 mL 超纯水,室温下超声 (500 W、40 kHz) 提取 45 min,提取液 12000 rpm

离心取上清液,过 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 标准曲线、检测限和定量限

精密吸取“2.3”项下不同浓度系列对照品溶液及混合对照品储备液各 2 μL ,在“2.1”、“2.2”色谱-质谱条件下测定,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、相关系数和线性范围;逐步稀释各对照品溶液,按信噪比 (S/N) 约为 3 计算检测限 (LOD),以 S/N 约为 10 计算定量限 (LOQ),见表 2。

表 2 10 种核苷标准曲线、检测限和定量限

Table 2 Calibration curves, LODs, and LOQs of 10 nucleosides

化合物 Compounds	标准曲线 Standard curve	线性范围 Linear range ($\mu\text{g/mL}$)	r^2	检测限 LOD (ng/mL)	定量限 LOQ (ng/mL)
尿嘧啶 Uracil	$Y = 132.30X + 3.17 \times 10^4$	0.053 ~ 10.640	0.9969	1.12	11.77
鸟嘌呤 Guanine	$Y = 533.64X + 5.03 \times 10^4$	0.042 ~ 8.400	0.9982	2.07	7.17
次黄嘌呤 Hypoxanthine	$Y = 206.61X + 2.36 \times 10^4$	0.040 ~ 8.000	0.9997	1.23	17.73
尿苷 Uridine	$Y = 295.09X + 1.76 \times 10^5$	0.253 ~ 50.550	0.9992	1.36	4.53
腺嘌呤 Adenine	$Y = 904.04X + 2.60 \times 10^5$	0.048 ~ 9.500	0.9984	1.56	8.17
肌苷 Inosine	$Y = 922.41X + 7.56 \times 10^4$	0.039 ~ 7.800	0.9988	1.62	8.93
鸟苷 Guanosine	$Y = 731.94X + 2.00 \times 10^6$	0.261 ~ 52.100	0.9947	1.37	4.57
2'-脱氧鸟苷 2'-Deoxyguanosin	$Y = 1168.40X + 1.35 \times 10^4$	0.017 ~ 3.300	0.9987	0.54	1.80
腺苷 Adenosine	$Y = 1201.8X + 5.00 \times 10^6$	0.104 ~ 20.700	0.9992	1.64	5.47
2'-脱氧腺苷 2'-Deoxyadenosine	$Y = 3596.60X + 6.93 \times 10^4$	0.023 ~ 4.575	0.9977	1.23	4.10

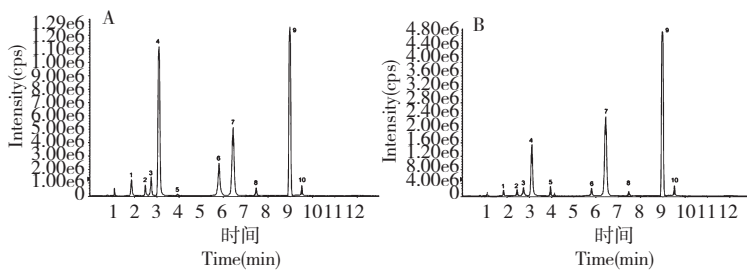


图 1 对照品 (A) 及样品 (B) 提取离子流图

Fig. 1 Extracted ion chromatograms (EIC) of reference substances (A) and sample (B)

注:1. 尿嘧啶;2. 鸟嘌呤;3. 次黄嘌呤;4. 尿苷;5. 腺嘌呤;6. 肌苷;7. 鸟苷;8. 2'-脱氧鸟苷;9. 腺苷;10. 2'-脱氧腺苷

Note: 1: uracil, 2: guanine, 3: hypoxanthine, 4: uridine, 5: adenine, 6: inosine, 7: guanosine, 8: 2'-deoxyguanosin, 9: adenosine, 10: 2'-deoxyadenosine

2.5.2 精密度试验

精密吸取稀释后的混合对照品溶液,连续进样 6 次,测定各对照品峰面积,所得峰面积的 RSD 分别为:尿嘧啶 1.9%、鸟嘌呤 1.9%、次黄嘌呤 1.2%、尿苷 2.0%、腺嘌呤 1.5%、肌苷 2.3%、鸟苷 5.7%、

2'-脱氧鸟苷 4.8%、腺苷 2.8%、2'-脱氧腺苷 3.8%,表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验

取 S4 号样品的供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样分析,测定尿嘧啶、鸟嘌呤、次黄嘌呤、

尿苷、腺嘌呤、肌苷、鸟苷、2'-脱氧鸟苷、腺苷和 2'-脱氧腺苷的峰面积,所得峰面积的 RSD 值分别为 1.6%、1.3%、0.8%、2.3%、3.9%、2.8%、2.3%、1.0%、1.8%、2.4%。

2.5.4 重复性试验

取 S4 号样品粉末各 6 份,分别按“2.4”项下供试品溶液制备方法制备供试品溶液,进样测定各成分含量,计算相应的 RSD。尿嘧啶、鸟嘌呤、次黄嘌呤、尿苷、腺嘌呤、肌苷、鸟苷、2'-脱氧鸟苷、腺苷和 2'-脱氧腺苷的 RSD 分别为 2.4%、1.9%、1.4%、1.4%、2.7%、0.5%、3.6%、1.8%、0.7%、1.1%。

2.5.5 加样回收率试验

取已知含量的样品粉末(S4 号样品)各 6 份,每份 0.5 g,精密称定,分别加入一定量的尿嘧啶、鸟嘌

呤、次黄嘌呤、尿苷、腺嘌呤、肌苷、鸟苷、2'-脱氧鸟苷、腺苷和 2'-脱氧腺苷对照品,按照供试品溶液制备方法制备加样回收率供试品溶液,在“2.1”、“2.2”项下的色谱—质谱条件下进行测定,计算回收率。计算得出尿嘧啶、鸟嘌呤、次黄嘌呤、尿苷、腺嘌呤、肌苷、鸟苷、2'-脱氧鸟苷、腺苷和 2'-脱氧腺苷的平均回收率分别为 3.44%、2.72%、3.36%、3.49%、2.78%、2.84%、4.63%、3.40%、2.67%、1.76%。

2.6 样品测定

将供试品溶液注入液相色谱/质谱联用仪,依法测定,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 3。

表 3 不同采收期玄参样品中 10 种核苷的含量($\mu\text{g/g}$, $n=2$)

Table 3 Contents of 10 nucleosides in Scrophulariae Radix samples with different harvesting periods ($\mu\text{g/g}$, $n=2$)

化学成分 Compounds	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
尿嘧啶 Uracil	21.870	23.718	11.831	19.580	20.249	18.152	17.432	16.371	14.073
鸟嘌呤 Guanine	1.183	4.727	2.823	1.493	3.950	0.832	1.089	1.534	0.953
次黄嘌呤 Hypoxanthine	-	2.455	6.135	0.669	1.553	2.415	3.550	3.308	1.555
尿苷 Uridine	114.137	101.364	67.667	118.482	118.703	105.179	121.599	124.826	119.589
腺嘌呤 Adenine	7.644	10.455	1.172	11.608	11.112	7.757	6.724	8.510	8.928
肌苷 Inosine	4.244	7.088	4.148	5.831	7.608	5.516	4.624	10.259	5.181
鸟苷 Guanosine	167.215	118.590	80.325	155.644	105.935	119.649	118.310	134.696	126.471
2'-脱氧鸟苷 2'-Deoxyguanosin	0.927	1.373	1.926	0.895	0.712	0.354	0.279	0.785	0.535
腺苷 Adenosine	97.775	83.979	56.185	104.795	95.721	86.778	87.541	93.031	86.475
2'-脱氧腺苷 2'-Deoxyadenosine	1.174	1.253	2.108	1.187	0.998	0.591	0.458	0.900	0.843
总量 Total	416.171	355.001	234.319	264.540	366.542	347.223	361.606	394.221	364.603

注:“-”未检测出。

Note:“-” not detected.

3 讨论

研究发现,核苷类化学成分对人体免疫、代谢以及肝脏、心血管及神经系统等发挥着重要的生理作用,且具有抗菌和抗病毒等生理活性,尤以腺苷的药理作用最为明显,如腺苷具有改善心脑血管循环、防止心律失常、抑制神经递质释放和免疫调节等^[6]。玄参的滋阴功效在现代药理学上体现为免疫调节作用。因此,核苷类成分作为玄参药材质量控制或考察采收期的一项指标具有一定的科学性。

实验结果表明,玄参药材中 10 种核苷类成分含量差异较大,以鸟苷、尿苷、腺苷、尿嘧啶的含量较

高,鸟嘌呤、次黄嘌呤、2'-脱氧鸟苷和 2'-脱氧腺苷的含量较低。鸟苷含量的波动较大,主要表现为在 10 月初其含量较高,随之呈现递减趋势;从 10 月下旬开始,鸟苷含量又呈现递增趋势;在 11 月份鸟苷含量保持平稳。尿苷和腺苷含量在 10 月初呈现下降趋势,从 10 月中旬开始又呈现上升趋势,在 10 月下旬基本保持平稳。尿嘧啶的含量保持平稳状态。通过不同采收期核苷总量变化折线图可以得出核苷含量自 10 月初呈现下降趋势,从 10 月中旬呈现上升趋势,在 11 月份核苷含量基本保持平稳,在 12 月初核苷含量稍有下降。不同采收期玄参中核苷类成分含量呈现动态变化,以 11 月份采收的玄参药材中

主含核苷及核苷总量较为平稳且处在较高水平。综上所述,从核苷这一指标成分动态变化的角度,支持了玄参药材产地传统采收期的合理性,与2015年版《中国药典》规定的冬季茎叶枯萎时采挖基本一致。至于玄参药材适宜采收期的确定还需对玄参中的环烯醚萜类、苯丙素苷类、有机酸类成分等多元指标成分以及药材产量进行综合考察,仍有待于进一步深入研究。

本实验建立了UPLC-QTRAP-MS/MS同时测定玄参中10种核苷类成分含量的方法,分析了不同采收期玄参中核苷积累的动态变化,从而为深入探讨玄参药材的品质形成机制及确定其药材适宜采收期提供基础资料,同时为玄参药材内在质量的综合评价和全面控制提供了新的方法参考。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015, Vol I, 117.
- Li Y (李媛), Song BA (宋宝安), Yang S (杨松), et al. Chemical constituents of *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 47-51.
- Ji JY (季金玉), Zhang Y (张云), Cong XD (丛晓东), et al. Advances in research of chemical constituents and quality control of *Scrophularia ningpoensis*. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2010, 28: 2507-2510.
- Zhang ZQ (张召强), Li M (李明). Advances in research of chemical constituents and quality control of *Scrophularia ningpoensis*. *Guide Chin Med* (中国医药指南), 2013, 11 (26): 49-51.
- Yu JJ (俞静静), Chen SH (陈素红), Lv GY (吕圭源). Progress in related pharmacodynamics research on cooling blood and nourishing yin of *Radix Scrophulariae*. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2007, 13 (9): 63-65.
- Ma BJ (麻兵继), Ruan Y (阮元), Liu JK (刘吉开). Chemical study of nucleosides on *Cordyceps militaris*. *J Chin Med Mat* (中药材), 2007, 30: 957-958.
- Wang R (王锐). Advances in pyrimidine. *Lett Biotech* (生物技术通讯), 2007, 3: 539-542.
- Cao Y (曹琰), Yan H (严辉), Duan JA (段金殿), et al. Analysis of nucleosides in the dried roots of *Angelica sinensis* from different regions. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2010, 30: 2026-2030.
- Zhang FS (张奉苏), Chen F (陈菲), Fu XS (傅兴圣), et al. Simultaneous determination of five nucleosides in *Antrodia camphorata* by HPLC. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2013, 48: 1018-1021.
- Liu HY (刘洪宇), Niu ZR (钮正睿), Cai TQ (蔡铁全), et al. Contents variety of harpagoside and cinnamic acid in *Radix Scrophulariae* collected from Zhejiang province in different seasons. *Chin Pharm* (中国药师), 2012, 15: 613-616.
- Chen SH (陈仕恒), Xie ZM (谢昭明), Li SX (李顺祥), et al. Research on the best harvest time of *Scrophulariae Radix*. *J South Med Univ* (南方医科大学学报), 2010, 30: 651-652.
- Zhou ZW (周祖文). 糖尿病肾病的中医研究概况. *J Guangxi Tradit Chin Med Univ*, 2002, 5 (2): 52-53.
- Li XH (李晓辉), Tang RY (唐汝愚). Relationship between inhibitory action of tanshinone on neutrophil function and its prophylactic effects on myocardial infarction. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1991, 12: 269-272.
- Peng C (彭成). Animal Experimental Methodology of TCM (中医药动物实验方法学). Beijing: People's Medical Publishing House, 2008. 920.
- Lu YQ (陆亚琴), Liu SY (刘顺英), Chen H (陈洪), et al. The study of earthworm II in preventing rat hepatic fibrosis induced by CCl₄. *Chin J Gastro Hepa* (胃肠病学和肝病学杂志), 2004, 13: 225-227.
- Chen JM (陈建明), Qiang SP (强世平), Zhao D (赵冬), et al. Research on the anti-hepatic fibrosis by hirudin and *Prunus persica* in mice with *Schistosoma japonicum* infection. *J Wuhan Yejin Univ Sci Technol* (武汉冶金科技大学学报), 1998, 21: 356-359.
- Pan H (潘浩), Hu XH (胡秀慧). Experimental study of antithrombotic effects of hirudo on microvascular anastomosis. *Chin J Tradit Med Traumatol Orthoped* (中国中医骨伤科杂志), 1999, 7 (3): 1-3.
- Hao XY (郝晓云), Peng YJ (彭延吉), Xiao CJ (肖长江). The influence of scorpion extract fluid on blood coagulation. *Chin J Thrombosis Hemostasis* (血栓与止血学), 2001, 7: 158-159.

(上接第 2137 页)