

基于 UFLC-QTrap-MS/MS 结合多元统计 分析的不同产地、不同部位乌药中 核苷和氨基酸类成分分析

罗益远¹, 顾海燕², 谢叶菲¹, 蒋新苗¹, 王娟¹,
蔡红蝶¹, 马舒伟¹, 陈宏隆¹

(1. 浙江药科职业大学中药学院, 浙江 宁波 315100; 2. 启东市人民医院药剂科, 江苏 南通 226299)

摘要:本研究建立了一种超快速液相色谱-三重四极杆/线性离子阱-串联质谱(UFLC-QTrap-MS/MS)同时测定乌药中 11 种核苷类和 14 种氨基酸类成分的分析方法,并结合多元统计分析比较不同产地、不同部位乌药的质量。采用 Waters XBridge Amide 色谱柱(2.1 mm×100 mm×3.5 μm),以 0.2%甲酸水溶液(A)-0.2%甲酸乙腈溶液(B)为流动相进行梯度洗脱;在电喷雾正离子模式下,以多反应监测(MRM)进行质谱检测;基于各成分的质量浓度,用方差分析(ANOVA)、主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)、层次聚类分析(HCA)、逼近理想解排序法(TOPSIS)以及灰色关联度分析(GRA),对不同产地、不同部位乌药样品进行综合评价。结果表明,所测成分在一定浓度范围内具有良好的线性关系,相关系数均大于 0.992 4;精密度、重复性、稳定性良好,平均加样回收率为 94.86%~106.47%,相对标准偏差(RSD)均小于 4.55%。不同产地、不同部位乌药样品间存在一定的差异,HCA 和 PCA 2 种方法均将样品分为 3 类。OPLS-DA 模型分析通过 VIP 值共筛选得到 6 个差异性化合物,分别为尿苷、丙氨酸、胞嘧啶、黄嘌呤、腺嘌呤、鸟嘌呤。该方法简便、灵敏度高、重现性好,可用于乌药中核苷和氨基酸类成分的同时测定,为药材质量评价和综合利用提供方法参考。

关键词:超快速液相色谱-三重四极杆/线性离子阱-串联质谱(UFLC-QTrap-MS/MS);乌药;氨基酸;核苷;不同产地;不同部位

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2024)02-0269-12

doi:10.7538/zpxb.2023.0049

Analysis of Nucleosides and Amino Acids in Different Parts of *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. from Different Habitats by UFLC-QTrap-MS/MS Combined with Multivariate Statistical Analysis

LUO Yi-yuan¹, GU Hai-yan², XIE Ye-fei¹, JIANG Xin-miao¹,
WANG Juan¹, CAI Hong-die¹, MA Shu-wei¹, CHEN Hong-jiang¹

(1. College of Chinese Medicine, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China;

2. Pharmacy Department, Qidong People's Hospital, Nantong 226299, China)

浙江省公益基础研究项目(LTGN23H280002);浙江省药品监督管理局科技计划项目(2022009、2023014);浙江省医药卫生科技计划项目(2023KY298);宁波市自然科学基金(2023J306);宁波市公益性科技计划项目(2021S144);浙江省教育厅一般项目(Y202250217);浙江药科职业大学校级课题(2022128、2022134)

本文通信作者顾海燕,陈宏隆

Abstract: A method of ultra-fast liquid chromatography-triple quadrupole/linear ion trap tandem mass spectrometry (UFLC-QTrap-MS/MS) was established for simultaneous determination of 11 nucleosides and 14 amino acids in *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm., which combined with multivariate statistical analysis to evaluate the quality of different medication parts of *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. from different habitats. The gradient separation was performed on a Waters XBridge Amide column (2.1 mm×100 mm×3.5 μm) with 0.2% formic acid in water (A) and 0.2% formic acid in acetonitrile (B) as the mobile phase, and the mass spectrometric detection was carried out in electrospray positive ion mode under multiple reaction monitoring (MRM) mode. The samples of different habitats and medication parts were comprehensively evaluated by entropy weight ANOVA, PCA, OPLS-DA, HCA, TOPSIS and GRA according to the contents of 25 target constituents. All of the analytes had good linearity in the range of tested concentration with the correlation coefficient not less than 0.992 4. The average recoveries were between 94.86% and 106.47%, with the relative standard deviation (RSD) less than 4.55%. The analysis results showed that there were significant variations among the different medication parts of *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. samples. The contents of nucleosides and amino acids in tuber were significantly higher than those in taproot and leaf ($p < 0.05$). In terms of nucleoside, tuber had the highest content with an average content of 74.786 μg/g, followed by leaf of 55.401 μg/g and taproot of 36.290 μg/g. The highest content of amino acid was found in tuber with an average content of 50.850 μg/g, followed by the taproot and leaf with an average contents of 43.213 μg/g and 35.676 μg/g, respectively. The samples collected from different parts of *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. in different regions were classified into three clusters by HCA and PCA according to the contents of nucleotides and amino acids detected. The classification results were satisfactory, indicating that there were obvious differences in the content of nucleosides and amino acids in different parts of the samples. Six different chemicals, namely uridine, alanine, cytosine, xanthine, adenine and guanine, were obtained by VIP co-screening in OPLS-DA model analysis. Comparing the maximum difference values of TOPSIS and GRA, it was found that the maximum difference value of r_i in GRA was 12.08%, while C_i in TOPSIS was 53.23%. This method is simple, sensitive and accurate, which provides a reliable and effective technique for the quality control of *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm..

Key words: ultra-fast liquid chromatography-triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometry (UFLC-QTrap-MS/MS); *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm.; amino acid; nucleoside; different habitats; different parts

乌药(*Lindera aggregata* (Sims) Kosterm.)系樟科山胡椒属植物,2020版《中国药典》记载其呈纺锤形的块根入药^[1],主产于我国东南沿海省份,其中以浙江省天台县最为著名,故称之为天台乌药,2018年被遴选为新“浙八味”之一^[2]。乌药性辛、温,归肺、脾、肾、膀胱经,具有行气止痛、温肾散寒之功效,主要用

于治疗寒凝气滞、胸腹胀痛、气逆喘急、膀胱虚冷、遗尿尿频等症^[1]。目前,各版《中国药典》和各省市施行的中药炮制技术规范亦均记载乌药以块根入药,且规定质老、不呈纺锤状的直根不可供药用^[3]。有研究发现^[4],乌药直根的各项指标均符合《中国药典》要求。《中华本草》《中药大辞典》等均记载乌药叶,

具有温中理气、消肿止痛之功效,主治脘腹冷痛、小便频数、风湿痹痛、跌打伤痛、烫伤等病症^[5-6]。乌药的茎、叶等地上部分含有与块根相同的化学成分,有些成分含量甚至高于块根^[7]。氨基酸是蛋白质的基本组成部分,具有较好的营养价值和药用价值^[8],例如,丝氨酸具有降血糖活性^[9],精氨酸具有免疫调节作用^[10]。核苷是生物细胞维持生命活动的基本组成基团,是增强免疫和抗病毒作用的生物活性成分^[11],具有广泛的生理活性^[12-13]。国内外学者已对乌药中萜类、内酯、挥发油、生物碱和黄酮等化学成分进行了大量的质量控制研究,但关于氨基酸、核苷的报道较少^[14-17]。

目前,氨基酸、核苷类成分的分析以高效液相色谱(HPLC)法^[18]和液相色谱-质谱(LC-MS)法^[19]最为广泛,然而 HPLC 一般需要衍生化处理,操作繁琐且精确度比 LC-MS 低^[20]。与 HPLC 相比,超高效液相色谱(UPLC)法可以提高峰容量,对待测物有着较好的保留时间、重现性和信噪比,可以缩短分析时间^[21],具有较高的灵敏度和选择性,能够提取特征离子,且不需要对样品进行衍生化处理,操作简便、快速,现已广泛用于中药复杂体系的定性和定量分析^[22-24]。根据待测物极性大小选择不同的色谱柱,常用的反相色谱 C18 柱适用于分析弱极性或中等极性物质,正相色谱柱适用于分析强极性成分^[25-26]。LC-MS 技术多采用多反应监测模式(MRM)定量分析,对目标分析物进行中性碎片扫描,从而解决 UPLC 分离困难的问题,或通过各目标分析物的色谱图进行定性定量分析^[27]。

本研究将在前期研究的基础^[7,28-30]上,采用超快速液相色谱-三重四极杆/线性离子阱-串联质谱(UFLC-QTrap-MS/MS)法测定乌药中 11 种核苷和 14 种氨基酸类成分的含量,通过方差分析(ANOVA)、主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)、层次聚类分析(HCA)、逼近理想解排序(TOPSIS)法以及灰色关联度分析(GRA),对不同产地、不同部位的乌药样品进行综合评价,以期为乌药的质量控制与资源综合利用提供科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Nexera LC-30AD 超快速液相色谱仪:日本 Shimadzu 公司产品;Triple-Quad-4500 型三重四极杆线性离子阱质谱仪:美国 AB SCIEX 公司产品,配有电喷雾离子源和 Multi Quant 软件;Sartorius BT 125D 型电子天平:德国 Sartorius 公司产品;Merck Milli-Q Direct 超纯水系统:美国 Millipore 公司产品;KQ-250B 型超声波清洗仪:昆山超声仪器有限公司产品。

胸苷(批号:B30633)、尿嘧啶(批号:B20908)、2'-脱氧尿苷(批号:B27361)、2'-脱氧腺苷(批号:B25425)、腺嘌呤(批号:B21357)、肌苷(批号:B20582)、黄嘌呤(批号:B20561)、胸腺嘧啶(批号:B25426)、鸟苷(批号:B20905)、胞苷(批号:B20073);纯度均大于 98%,上海源叶生物科技有限公司产品;氨基酸混标(批号:B2007072):含异亮氨酸、亮氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、脯氨酸、酪氨酸、丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、胱氨酸、甲硫氨酸、盐酸赖氨酸,纯度均大于 99%,坛墨质检科技股份有限公司产品;乙腈、甲醇:均为色谱纯,美国 Thermo Fisher 公司产品;超纯水:由超纯水系统制备;其他试剂均为分析纯。

1.2 样品信息

实地采集不同产地、不同部位的乌药,所有样品经浙江药科职业大学陈宏降副教授鉴定为樟科植物乌药 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. 的干燥块根、直根和叶,留样凭证存放于浙江药科职业大学中药学院科研实验室,具体样品信息列于表 1。

1.3 对照品溶液的制备

精密称取适量的氨基酸、核苷对照品,加水制成含 25.00 mg/L 胸苷、25.00 mg/L 尿嘧啶、25.00 mg/L 2'-脱氧尿苷、25.00 mg/L 尿苷、25.00 mg/L 2'-脱氧腺苷、25.00 mg/L 腺嘌呤、25.00 mg/L 肌苷、25.00 mg/L 黄嘌呤、25.00 mg/L 胸腺嘧啶、25.00 mg/L 鸟苷、25.00 mg/L 胞苷、6.530 mg/L 异亮氨酸、6.496 mg/L 亮氨酸、5.911 mg/L 苏氨酸、8.196 mg/L 苯丙氨酸、5.814 mg/L 缬氨酸、5.725 mg/L 脯氨酸、9.004 mg/L 酪氨酸、4.422 mg/L 丙氨酸、

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号 No.	产地 Origin	部位 Part	编号 No.	产地 Origin	部位 Part	编号 No.	产地 Origin	部位 Part
Tu-1	天台石梁	块根	Ta-1	湖北咸宁	直根	L-1	浙江富阳	叶
Tu-2	江西上饶	块根	Ta-2	江西樟树	直根	L-2	江西上饶	叶
Tu-3	浙江富阳	块根	Ta-3	湖南岳阳	直根	L-3	广东韶关	叶
Tu-4	丽水遂昌	块根	Ta-4	广东韶关	直根	L-4	丽水遂昌	叶
Tu-5	湖南永州	块根	Ta-5	湖南衡山	直根	L-5	江西樟树	叶
Tu-6	天台三洲	块根	Ta-6	天台石梁	直根	L-6	天台三洲	叶
Tu-7	广东韶关	块根	Ta-7	浙江富阳	直根	L-7	湖南永州	叶
Tu-8	江西樟树	块根	Ta-8	丽水遂昌	直根	L-8	湖北咸宁	叶
Tu-9	湖南衡阳	块根	Ta-9	天台三洲	直根	L-9	天台石梁	叶
						L-10	天台坦头	叶

18.535 mg/L 甘氨酸、5.221 mg/L 丝氨酸、8.636 mg/L 精氨酸、7.251 mg/L 赖氨酸、7.715 mg/L 组氨酸、7.173 mg/L 谷氨酸的对照品储备液。分别精密量取适量的上述对照品储备液，混合并逐级稀释成系列不同浓度的混合对照品溶液，4℃冰箱保存，备用。

1.4 供试品溶液的制备

精密称定 1.0 g 各样品粉末，置于 100 mL 具塞锥形瓶中，加入 25 mL 水，称定质量，超声 45 min，加水补足失量，摇匀，过滤，取续滤液过 0.22 μm 滤膜，即得供试品溶液。

1.5 实验条件

1.5.1 色谱条件 色谱柱：Waters XBridge Amide 柱(2.1 mm×100 mm×3.5 μm)；流动相：0.2%甲酸水溶液(A相)-0.2%甲酸乙腈溶液(B相)；梯度洗脱：0~2.5 min(15%A)，2.5~5 min(15%~50%A)，5~7 min(50%A)，7~8 min(50%~15%A)，8~11 min(15%A)；柱温 30℃；流速 0.6 mL/min；进样量 1 μL。

1.5.2 质谱条件 电喷雾离子源正离子(ESI⁺)模式，多反应监测(MRM)模式，毛细管电压 4.5 kV，离子源温度 150℃，脱溶剂气流速和温度分别为 1 000 L/h 和 550℃，锥孔气流速 50 L/h。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件优化

为了获取最佳的色谱条件，比较了 Waters XBridge Amide 柱(2.1 mm×100 mm×3.5 μm)和 Waters Acquity BEH Shield RP C18 柱

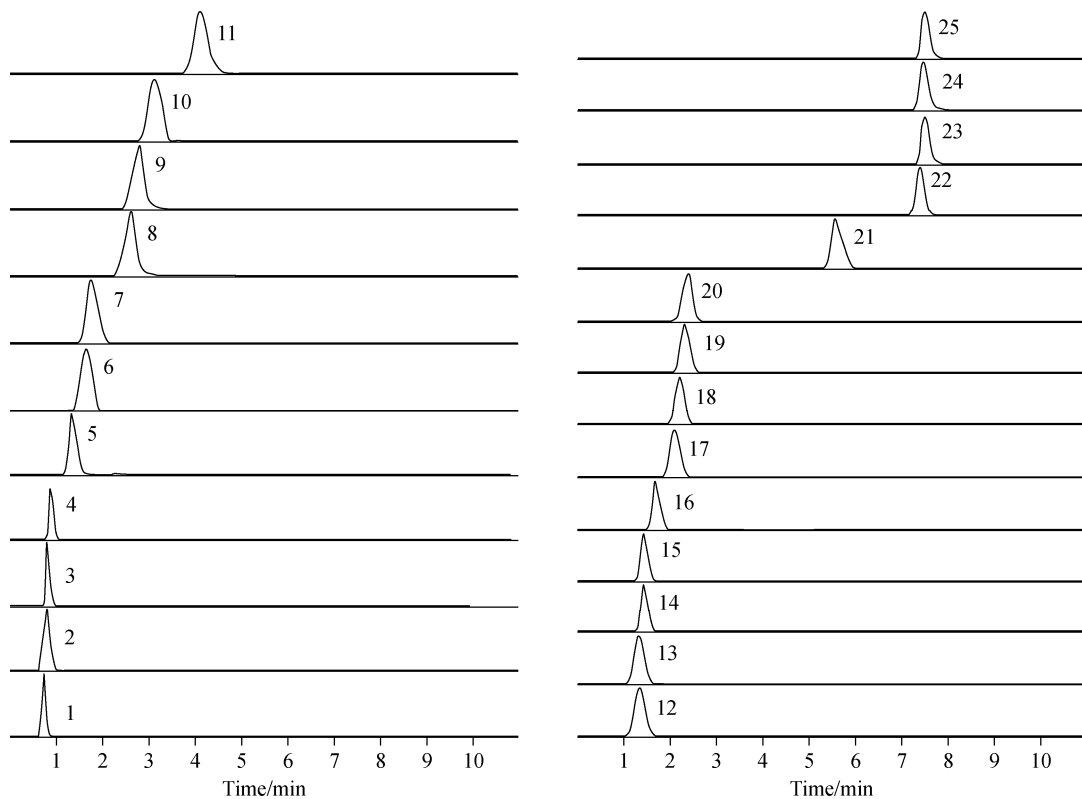
(100 mm×2.1 mm×1.7 μm)的分离效果。结果发现，核苷和氨基酸类成分在 C18 柱上难保留，分离效果较差，因此选择 Waters XBridge Amide 柱。本实验还考察了乙腈(A)-0.2%甲酸水溶液(B)、0.2%甲酸水溶液(A)-0.2%甲酸乙腈溶液(B)、0.2%甲酸水溶液(A)(含 5 mmol/L 甲酸铵和 5 mmol/L 乙酸铵)-0.2%甲酸乙腈溶液(B)(含 1 mmol/L 甲酸铵和 1 mmol/L 乙酸铵)作为流动相的色谱分离效果，同时对梯度洗脱程序进行系统优化。结果表明，当选择 0.2%甲酸水溶液-0.2%甲酸乙腈溶液作为流动相时，各目标成分的峰形稳定、响应值较高，示于图 1。优化的洗脱程序见 1.5.1 节。

2.2 质谱条件优化

本实验分别在正、负离子模式下对 25 种目标成分进行全扫描。结果表明，正离子模式下有较好的响应。因此，选择正离子模式进行测定，各化合物的质谱参数列于表 2。

2.3 方法学考察

2.3.1 标准曲线、检出限和定量限 取 1.3 节的系列不同浓度混合对照品溶液(至少 6 个)，按照 1.5 节条件进样分析，以对照品浓度(*x*)为横坐标，峰面积(*y*)为纵坐标，绘制标准曲线并进行线性回归。分别以 3 倍和 10 倍信噪比确定检出限(LOD)和定量限(LOQ)，11 种核苷和 14 种氨基酸在相应的线性范围内呈现良好的线性关系，相关系数(*r*)≥0.999 4，且具有较高的灵敏度，详细数据列于表 3。



注:1. 胸苷;2. 尿嘧啶;3. 2'-脱氧尿苷;4. 尿苷;5. 2'-脱氧腺苷;6. 腺嘌呤;7. 肌苷;8. 黄嘌呤;9. 胸腺嘧啶;
10. 鸟苷;11. 胞苷;12. 异亮氨酸;13. 亮氨酸;14. 苏氨酸;15. 苯丙氨酸;16. 缬氨酸;17. 脯氨酸;18. 酪氨酸;
19. 丙氨酸;20. 甘氨酸;21. 丝氨酸;22. 精氨酸;23. 赖氨酸;24. 组氨酸;25. 谷氨酸

图 1 11 种核苷和 14 种氨基酸类化合物的 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of 11 nucleosides and 14 amino acids in reference substances

表 2 乌药中 11 种核苷和 14 种氨基酸的质谱参数

Table 2 MS/MS parameters of 11 nucleosides and 14 amino acids in *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm.

序号 No.	化合物 Component	分子式 Formula	保留时间 t_R /min	母离子 Precursor ion (m/z)	子离子 Product ion (m/z)	去簇电压 DP/V	碰撞电压 CE/eV
1	胸苷	$C_9H_{13}N_3O_5$	0.74	243.2	127.0	64	17
2	尿嘧啶	$C_4H_4N_2O_2$	0.79	113.2	96.0	82	25
3	2'-脱氧尿苷	$C_9H_{12}N_2O_5$	0.81	229.2	113.1	64	24
4	尿苷	$C_9H_{12}N_2O_6$	0.95	244.3	226.3	60	14
5	异亮氨酸	$C_6H_{13}NO_2$	1.31	132.1	86.1	60	15
6	亮氨酸	$C_6H_{13}NO_2$	1.31	132.0	86.1	56	15
7	2'-脱氧腺苷	$C_{10}H_{13}N_5O_3$	1.40	252.2	136.1	173	19
8	苏氨酸	$C_4H_9NO_3$	1.41	120.3	77.1	129	36
9	苯丙氨酸	$C_9H_{11}NO_2$	1.41	166.0	120.2	63	20
10	缬氨酸	$C_5H_{11}NO_2$	1.67	118.1	72.0	52	16
11	腺嘌呤	$C_5H_5N_5$	1.75	136.0	119.0	137	30
12	肌苷	$C_{10}H_{12}N_4O_5$	1.75	269.1	137.1	54	24
13	脯氨酸	$C_5H_9NO_2$	2.05	116.1	70.0	62	22
14	酪氨酸	$C_9H_{11}NO_3$	2.18	182.0	136.1	64	20

续表 2

序号 No.	化合物 Component	分子式 Formula	保留时间 t_R/min	母离子 Precursor ion (m/z)	子离子 Product ion (m/z)	去簇电压 DP/V	碰撞电压 CE/eV
15	丙氨酸	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$	2.27	90.0	44.1	50	20
16	甘氨酸	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NO}_2$	2.47	75.9	30.1	50	21
17	黄嘌呤	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$	2.60	151.9	134.9	116	28
18	胸腺嘧啶	$\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$	2.89	126.0	79.0	72	18
19	鸟苷	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_5$	3.08	283.8	152.0	54	24
20	胞苷	$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_5$	4.10	244.1	112.1	60	24
21	丝氨酸	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_3$	5.55	105.8	60.0	53	18
22	精氨酸	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$	7.38	175.0	69.9	94	33
23	赖氨酸	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$	7.43	147.0	84.0	60	23
24	组氨酸	$\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	7.44	156.1	110.1	76	20
25	谷氨酸	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	7.47	147.1	84.1	67	23

表 3 乌药中 11 种核苷和 14 种氨基酸的线性关系

Table 3 Linear relationships of 11 nucleosides and 14 amino acids in *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm.

化合物 Component	回归方程 Regressive equation	相关系数 Correlation coefficient (r)	线性范围 Linear range/($\mu\text{g/L}$)	检出限 LOD/ ($\mu\text{g/L}$)	定量限 LOQ/ ($\mu\text{g/L}$)
胸苷	$y=6.38731 \times 10^4 x + 4.83063 \times 10^6$	0.9994	10~5000	1.66	5.02
尿嘧啶	$y=2805.04915x - 5208.39062$	0.9999	10~5000	1.30	3.92
2'-脱氧尿苷	$y=804.86412x + 4.94687 \times 10^4$	0.9996	10~5000	2.38	7.19
尿苷	$y=121.17335x + 8.04379 \times 10^5$	0.9999	10~5000	1.56	4.72
异亮氨酸	$y=6.40792 \times 10^5 x + 1.92816 \times 10^7$	0.9993	2.61~1306	0.48	1.51
亮氨酸	$y=5.88015 \times 10^5 x + 2.87217 \times 10^7$	0.9978	2.60~1299	0.51	1.50
2'-脱氧腺苷	$y=470.70721x + 7.76828 \times 10^4$	0.9986	10~5000	2.22	6.71
苏氨酸	$y=1.44291 \times 10^5 x + 4.40495 \times 10^6$	0.9989	2.36~1182	0.45	1.36
苯丙氨酸	$y=44.01794x + 1617.73183$	0.9924	3.28~1639	0.63	1.89
缬氨酸	$y=2.95680 \times 10^5 x + 1.52944 \times 10^7$	0.9963	2.33~1163	0.45	1.34
腺嘌呤	$y=6.95464 \times 10^4 x + 1.58616 \times 10^7$	0.9963	10~5000	0.96	2.90
肌苷	$y=3.07577 \times 10^4 x + 2.11759 \times 10^6$	0.9998	10~5000	1.15	3.47
脯氨酸	$y=2.77422 \times 10^5 x + 6.90485 \times 10^6$	0.9994	2.29~1145	0.44	1.32
酪氨酸	$y=2.07174 \times 10^5 x + 1.16889 \times 10^6$	0.9984	3.60~1801	0.69	2.08
丙氨酸	$y=1.11395 \times 10^5 x + 3.47355 \times 10^5$	0.9997	1.77~884	0.34	1.02
甘氨酸	$y=376.85253x - 4.88270 \times 10^4$	0.9937	7.41~3707	1.43	4.28
黄嘌呤	$y=15059.89951x + 4388.42114$	0.9918	10~5000	2.04	6.16
胸腺嘧啶	$y=3.66962x + 1152.40346$	0.9990	10~5000	1.20	3.64
鸟苷	$y=3.70031 \times 10^4 x + 2.08500 \times 10^6$	0.9997	10~5000	1.06	3.21
胞苷	$y=6.38731 \times 10^4 x + 4.83063 \times 10^6$	0.9994	10~5000	2.86	8.63
丝氨酸	$y=4.89514 \times 10^4 x + 4.79574 \times 10^5$	0.9998	2.09~1044	0.40	1.21
精氨酸	$y=5.03508 \times 10^4 x + 1.35745 \times 10^6$	0.9996	3.45~1727	0.66	1.99
赖氨酸	$y=5.88650 \times 10^4 x + 1.19598 \times 10^6$	0.9993	2.90~1450	0.56	1.67
组氨酸	$y=1.85702 \times 10^5 x + 5.14372 \times 10^6$	0.9991	3.09~1543	0.59	1.78
谷氨酸	$y=7.36229 \times 10^4 x + 1.42159 \times 10^6$	0.9994	2.87~1435	0.55	1.66

2.3.2 精密度、重复性、稳定性和加样回收率实验 取同一混合对照品溶液,按 1.5 节条件连续进样 6 次,记录峰面积,25 种成分的峰面积 RSD 值在 0.81%~4.51%之间,表明仪器的精密度良好。取 1.0 g 同一批乌药样品(Tu-7),按 1.4 节条件平行制备 6 份供试品溶液,按 1.5 节条件进样分析,25 种成分含量的 RSD 值均小于 4.84%($n=6$),表明方法的重复性较好。取同一样品制备供试品溶液,在 0、2、4、8、12、24 h 测定的供试品溶液中 25 种成分的峰面积 RSD 值均小于 4.95%($n=6$),表明 24 h 内的稳定性良好。取 6 份已知含量

的同一批乌药样品(Tu-7),每份 0.5 g,精密称定,根据样品中待测成分含量加入适量的混合对照品溶液,25 种测定成分的平均回收率在 94.86%~106.47%之间,RSD 值为 1.65%~4.55%,表明方法的回收率较好,具体结果列于表 4。

2.4 样品含量测定及分析

2.4.1 样品含量测定 取 1.2 节样品,按照 1.4 节条件制备供试品溶液,1.5 节条件测定,根据线性关系计算,含量测定结果列于附表 1 (请登录《质谱学报》网站 <https://zpxb.xml-journal.net> 下载)。

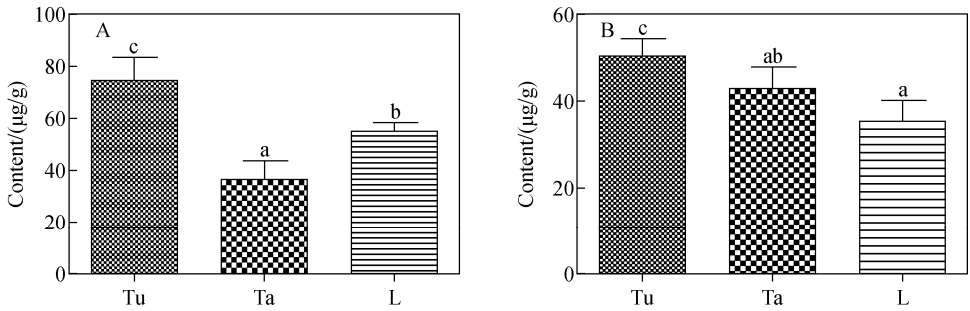
表 4 精密度、重复性、稳定性和加样回收率实验结果

Table 4 Results of precision, repeatability, stability and recovery

化合物 Component	精密度 Precision RSD/%	重复性 Repeatability RSD/%	稳定性 Stability RSD/%	平均加样回收率 Mean recovery/%	相对标准偏差 RSD/%
胸苷	1.38	2.95	1.74	99.20	3.40
尿嘧啶	2.07	3.80	2.99	104.89	3.05
2'-脱氧尿苷	3.41	3.62	1.88	94.86	1.65
尿苷	1.57	2.52	2.91	103.44	3.79
异亮氨酸	2.92	1.64	4.55	98.08	2.95
亮氨酸	3.01	3.23	3.18	95.52	3.57
2'-脱氧腺苷	1.25	2.96	2.80	97.85	3.09
苏氨酸	0.81	1.43	1.86	99.42	2.48
苯丙氨酸	3.10	3.95	2.38	95.28	1.77
缬氨酸	3.50	4.35	4.95	96.51	2.40
腺嘌呤	3.89	4.02	3.47	104.36	2.73
肌苷	4.51	2.73	1.98	98.76	2.03
脯氨酸	2.87	2.43	2.31	106.47	3.06
酪氨酸	3.02	3.45	4.17	95.02	1.80
丙氨酸	2.99	3.07	3.43	100.91	1.68
甘氨酸	1.42	2.96	4.05	95.24	4.16
黄嘌呤	1.28	2.89	3.33	106.22	3.99
胸腺嘧啶	3.03	3.16	2.81	99.46	4.55
鸟苷	3.80	4.84	3.33	98.15	2.13
胞苷	3.34	3.07	3.07	104.54	3.05
丝氨酸	2.25	3.44	2.82	96.65	2.47
精氨酸	4.08	3.17	1.85	98.04	3.52
赖氨酸	2.47	3.08	3.71	103.33	3.51
组氨酸	1.58	2.78	3.93	102.42	2.31
谷氨酸	1.61	3.96	2.18	97.30	3.67

2.4.2 多元活性成分含量的比较分析 为了更好地比较不同产地、不同部位乌药中核苷和氨基酸类成分的差异,使用 SPSS 软件对乌药进行基于方差分析(ANOVA)的邓肯检验(Duncan),示于图 2。结果表明,不同部位乌药中核苷和氨基酸类成分的含量差异明显。块根中核苷和氨基

酸含量与直根和叶均有显著差异($p < 0.05$);块根中的核苷含量最高,平均含量为 $74.786 \mu\text{g/g}$,其次是叶($55.401 \mu\text{g/g}$)和直根($36.290 \mu\text{g/g}$);乌药块根的氨基酸含量最高,平均含量为 $50.850 \mu\text{g/g}$,其次是乌药的直根和叶,平均含量分别为 43.213 、 $35.676 \mu\text{g/g}$ 。



注:a~c代表各组在 $p < 0.05$ 水平上具有显著性差异

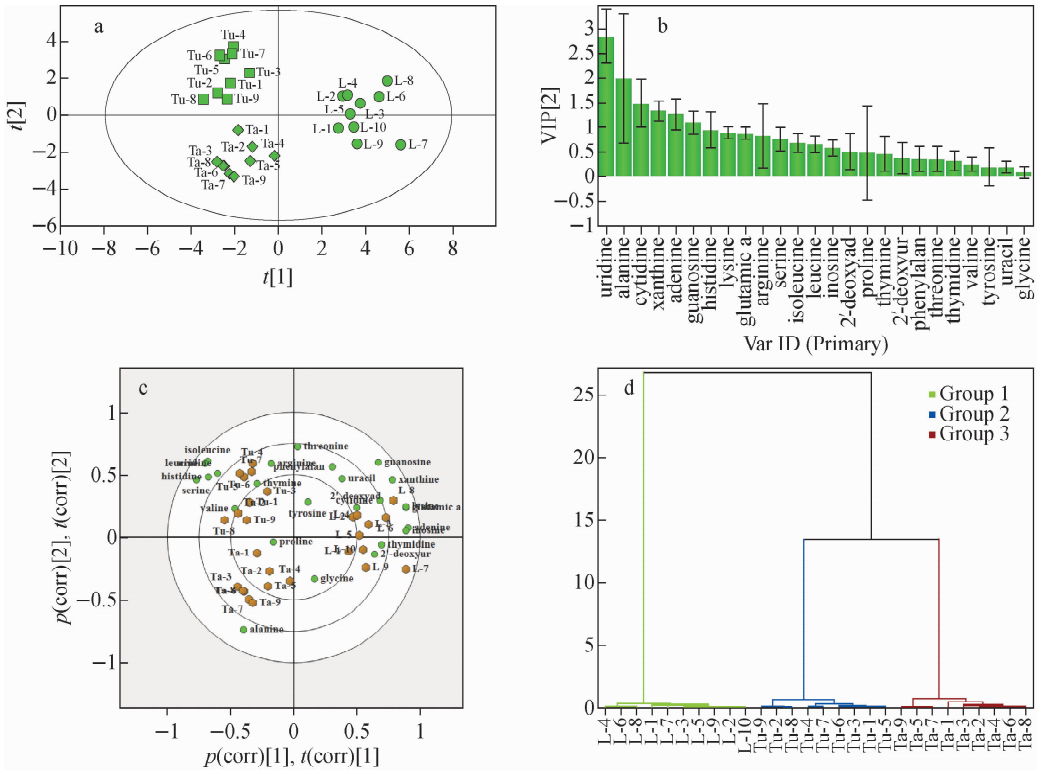
图 2 不同乌药样品中核苷(A)和氨基酸(B)类成分的方差分析

Fig. 2 ANOVA for nucleosides (A) and amino acids (B) in different *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. samples

为了进一步直观地比较不同产地、不同部位乌药中核苷和氨基酸类成分的差异,使用 Simca-p13.1 软件对乌药中 25 种成分进行主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)和层次聚类分析(HCA),示于图 3。由图 3a 可知,通过 PCA 前 2 个主成分的累计贡献率为 90.06%,不同部位乌药样品分布在不同区域,分类结果较理想,表明不同部位乌药样品中的核苷和氨基酸类成分存在明显差异。结合 PCA 得分图和载荷图得到 Biplot 分析图,示于图 3c。可以看出,导致乌药块根聚集的主要是异亮氨酸、亮氨酸、尿苷、丝氨酸、组氨酸、胸腺嘧啶、缬氨酸和精氨酸;导致乌药直根聚集的主要是丙氨酸和脯氨酸;导致乌药叶聚集的是 2-脱氧腺苷、胞苷、2-脱氧尿苷、胸苷、肌苷、腺嘌呤、赖氨酸和谷氨酸。从 HCA 图(图 3d)可以看出,其分析结果与 PCA 一致。通过 OPLS-DA 模型对乌药不同部位进行差异分析,模型的 $R^2 X = 0.891$, $R^2 Y = 0.918$, $Q^2 = 0.851$,表明该模型的拟合和预测能力较好;通过 VIP 值(图 3b)对差异化学成分进行筛选,以变量 $VIP > 1$ 为显著影响,共筛选得到 6 个差异性化合物,分别

为尿苷(2.849 85)、丙氨酸(1.990 17)、胞嘧啶(1.483 65)、黄嘌呤(1.331 23)、腺嘌呤(1.255 46)、鸟嘌呤(1.089 93),可用于区分不同部位乌药样品。

2.4.3 基于 TOPSIS 和 GRA 分析 采用 TOPSIS 和 GRA 分析法对不同产地、不同部位乌药样品进行质量分析,质量等级排序结果列于表 5。可见,在 TOPSIS 模型中,相对接近程度值(C_i)越大,表示样本的质量越高;在 GRA 模型中,相对关联度(r_i)表示组分含量与样品之间的相对关联关系, r_i 值越高表示样本的质量越好。由表 5 可知, TOPSIS 和 GRA 的分析结果基本一致,表示不同产地、不同部位乌药样品间的差异较大。乌药块根中,广东韶关样品(Tu-7)的 C_i 值最大,而天台三洲(Tu-6)的 r_i 值最大;乌药直根中,湖北咸宁(Ta-1)的 C_i 值和 r_i 值均为较高水平;乌药叶中,丽水遂昌(L-4)的 C_i 值最大,而天台三洲(L-6)的 r_i 值最大。另外,通过比较 2 种分析方法的差异值,发现 GRA 的 r_i 最大差异值为 12.08%,而 TOPSIS 的 C_i 最大差异值高达 53.23%,表明 TOPSIS 比 GRA 更适合区分乌药样品质量的优劣。



注: a. PCA 分析; b. VIP 得分图; c. Biplot 图; d. 聚类分析树状图;

图 c 中绿色圆点代表样品中 25 种核苷和氨基酸类成分, 橙色六边形代表 18 批不同产地、不同部位乌药样品

图 3 不同乌药样品的多元统计分析

Fig. 3 Multivariate statistical analysis of different *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. samples

表 5 不同乌药样品的质量等级排序

Table 5 Quality ranking of different *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. samples

样品 Sample	逼近理想解排序法 TOPSIS			灰色关联度分析 GRA		
	相对接近程度值 Comparative closeness (C_i)	排序 Rank	最大差异值 Difference of C_i / %	相对关联度 Relative degree (r_i)	排序 Rank	最大差异值 Difference of r_i / %
Tu-1	0.2969	9	50.20	0.4957	6	6.02
Tu-2	0.3498	8	41.31	0.4655	9	11.76
Tu-3	0.4636	4	22.23	0.4899	7	7.12
Tu-4	0.4620	5	22.49	0.5005	5	5.12
Tu-5	0.4727	3	20.71	0.5179	3	1.83
Tu-6	0.4795	2	19.56	0.5275	1	0.00
Tu-7	0.5961	1	0.00	0.5244	2	0.58
Tu-8	0.3910	7	34.40	0.4852	8	8.02
Tu-9	0.3944	6	33.83	0.5085	4	3.60
Ta-1	0.4917	1	0.00	0.5337	1	0.00
Ta-2	0.4015	4	18.35	0.5316	2	0.38
Ta-3	0.4319	3	12.18	0.5281	3	1.05
Ta-4	0.4649	2	5.46	0.5164	4	3.24
Ta-5	0.3582	5	27.17	0.5087	6	4.68
Ta-6	0.2684	8	45.41	0.4975	8	6.77
Ta-7	0.3334	6	32.20	0.5103	5	4.37

样品 Sample	逼近理想解排序法 TOPSIS			灰色关联度分析 GRA		
	相对接近程度值 Comparative closeness (C_i)	排序 Rank	最大差异值 Difference of $C_i/\%$	相对关联度 Relative degree (r_i)	排序 Rank	最大差异值 Difference of $r_i/\%$
Ta-8	0.2893	7	41.18	0.4989	7	6.51
Ta-9	0.2300	9	53.23	0.4881	9	8.54
L-1	0.2982	10	44.29	0.4942	7	9.17
L-2	0.3711	4	30.65	0.5258	3	3.38
L-3	0.3392	7	36.61	0.4849	8	10.89
L-4	0.5352	1	0.00	0.5281	2	2.96
L-5	0.3332	8	37.74	0.4982	6	8.44
L-6	0.4385	3	18.07	0.5441	1	0.00
L-7	0.3708	5	30.72	0.4833	9	11.18
L-8	0.4413	2	17.54	0.5168	4	5.02
L-9	0.3453	6	35.48	0.4784	10	12.08
L-10	0.3254	9	39.20	0.4989	5	8.31

3 结论

本实验建立了超快速液相色谱-三重四极杆/线性离子阱质谱法测定不同产地、不同部位乌药中 25 种氨基酸和核苷类成分的含量,并结合方差分析、聚类热图分析对乌药进行综合评价。结果表明,不同产地、不同部位乌药中核苷和氨基酸类成分具有一定的差异。本方法快速灵敏、准确可靠,可为乌药不同部位的质量控制提供方法参考,同时为乌药资源的充分利用提供基础资料。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 版(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:79.
- [2] 李平. 新“浙八味”将为相关中药材产业带来什么[N]. 台州日报,2018-03-09.
- [3] 杜伟锋,岳显可,吴瑶,葛卫红,陆兔林,王智民. 基于 HPLC 与 NIRS 指纹图谱分析不同形态的乌药根[J]. 中国中药杂志,2016,41(19):3 551-3 556.
DU Weifeng, YUE Xianke, WU Yao, GE Weihong, LU Tulin, WANG Zhimin. Analysis of different forms *Linderae Radix* based on HPLC and NIRS fingerprints[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2016, 41(19): 3 551-3 556(in Chinese).
- [4] 黄开颜,舒佳妮,欧阳荣,周新蓓. 不同形态乌药根的质量比较研究[J]. 中国现代药物应用, 2010,4(19):1-3.
HUANG Kaiyan, SHU Jiani, OUYANG Rong, ZHOU Xinbei. Quality comparison of different form *linderae radix*[J]. Chinese Journal of Modern Drug Application, 2010, 4(19): 1-3(in Chinese).
- [5] LIU Z L, CHU S S, JIANG C H, HOU J, LIU Q Z, JIANG G H. Composition and insecticidal activity of the essential oil of *Lindera aggregata* root tubers against *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum*[J]. J Essential Oil Bear Plants, 2016, 19(3): 727-733.
- [6] 程慧洁,蔡夏琴,项家席,厉志莲. 乌药块根与叶药用价值探析[J]. 浙江中西医结合杂志,2014,24(6):563-565.
CHENG Huijie, CAI Xiaqin, XIANG Jiaxi, LI Zhilian. Study on the medicinal value of root tuber and leaf of *Lindera aggregata*[J]. Zhejiang Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2014, 24(6): 563-565 (in Chinese).
- [7] 罗益远,陈宏降,杨颖欣,蔡红蝶,包佳敏,周根,明梓扬,陶文涛,彭昕. 基于 QTRAP UPLC-MS/MS 的乌药不同部位中生物碱、内酯类和黄酮类成分分析[J]. 中国药理学杂志,2021,56(11):891-896.
LUO Yiyuan, CHEN Hongjiang, YANG Yingxin,

- CAI Hongdie, BAO Jiamin, ZHOU Gen, MING Ziyang, TAO Wentao, PENG Xin. Simultaneous determination and comparative analysis of alkaloids, lactones and flavonoids of different parts by QTRAP UPLC-MS/MS[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2021, 56(11): 891-896(in Chinese).
- [8] 连莹,杜明萃,乔冲,仲平. 复方氨基酸注射液营养学评价[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(5): 584-588.
- LIAN Ying, DU Mingluo, QIAO Chong, ZHONG Ping. Nutritional value evaluation of amino acid compound injection[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2019, 28(5): 584-588(in Chinese).
- [9] HOLM J, BUSCHARD K. *L*-serine: a neglected amino acid with a potential therapeutic role in diabetes[J]. APMIS, 2019, 127(10): 655-659.
- [10] ALBAUGH V L, PINZON-GUZMAN C, BARBUL A. Arginine-dual roles as an onconutrient and immunonutrient[J]. Journal of Surgical Oncology, 2017, 115(3): 273-280.
- [11] EYER L, NENCKA R, de CLERCQ E, SELEY-RADTKE K, RUŽEK D. Nucleoside analogs as a rich source of antiviral agents active against arthropod-borne flaviviruses[J]. Antivir Chem Chemother, 2018, doi: 10.1177/2040206618761299.
- [12] CUI L L, LIU Y H, LIU M, REN M J, AHMED A F, KANG W Y. Identification of phytochemicals from *Lentinus edodes* and *Auricularia auricula* with UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS[J]. Journal of Future Foods, 2022, 2(3): 253-260.
- [13] LI Y, QIN L A, XIANG Y Z, YING X. A practical method for determination of nine nucleosides in by UPLC/MS and quantitative analysis of multicomponents using single marker method[J]. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2021, 2021: 1-10.
- [14] 陈芳有,刘洋,谢丹,罗永明. 乌药化学成分及生物活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022, doi: 10.19540/j.cnki.cjmm.20221114.203.
- CHEN Fangyou, LIU Yang, XIE Dan, LUO Yongming. Research progress on chemical constituents and their bioactivities of *Lindera aggregata*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, doi: 10.19540/j.cnki.cjmm.20221114.203(in Chinese).
- [15] 洪浩,杜伟锋,康显杰,朱伟豪,洪智慧,葛卫红,李昌煜. 基于 UPLC-Triple-TOF/MS 定性比较乌药块根、直根化学成分[J]. 中药材, 2020, 43(3): 615-620.
- HONG Hao, DU Weifeng, KANG Xianjie, ZHU Weihao, HONG Zhihui, GE Weihong, LI Changyu. Qualitative comparison of chemical constituents from root and taproot of *Lindera aggregata* based on UPLC-Triple-TOF/MS[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2020, 43(3): 615-620(in Chinese).
- [16] LIU X, FU J, SHEN R S, WU X J, YANG J, BAI L P, JIANG Z H, ZHU G Y. Linderanoids A-O, dimeric sesquiterpenoids from the roots of *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm[J]. Phytochemistry, 2021, 191: 1-9.
- [17] WU Y J, ZHENG Y L, LIU X S, HAN Z, REN Y P, GAN L S, ZHOU C X, LUAN L J. Separation and quantitative determination of sesquiterpene lactones in *Lindera aggregata* (Wu-yao) by ultra-performance LC-MS/MS[J]. Journal of Separation Science, 2015, 33(8): 1 072-1 078.
- [18] 齐晓丹,刘海滨,牛伟霞,高登锋,王延涛,王春艳,李丽,张淹. 不同化皮、浓缩工艺对阿胶中核苷、氨基酸的影响[J]. 中成药, 2022, 44(4): 1 257-1 260.
- QI Xiaodan, LIU Haibin, NIU Weixia, GAO Dengfeng, WANG Yantao, WANG Chunyan, LI Li, ZHANG Yan. Effect of unassimilated skin and concentration process on nucleoside and amino acid in ejiao[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2022, 44(4): 1 257-1 260 (in Chinese).
- [19] CHANG X W, WEI D D, SU S L, GUO S, QIAN S E, YAN H, ZHAO M, SHANG E X, QIAN D W, SUN X D, DUAN J A. An integrated strategy for rapid discovery and prediction of nucleobases, nucleosides and amino acids as quality markers in different flowering stages of *Flos chrysanthemi* using UPLC-MS/MS and FT-NIR coupled with multivariate statistical analysis[J]. Microchemical Journal, 2020, 153: 1-11.
- [20] 于永辉,籍国霞,臧恒昌. 中药中氨基酸分析测定技术研究进展[J]. 食品与药品, 2014, 16(5): 371-373.

- YU Yonghui, JI Guoxia, ZANG Hengchang. Progress on determination of amino acids in traditional Chinese medicine[J]. Food Drug, 2014, 16(5): 371-373(in Chinese).
- [21] NORDSTROM A, O' MAILLE G, QIN C, SIUZDAK G. Nonlinear data alignment for UPLC-MS and HPLC-MS based metabolomics: quantitative analysis of endogenous and exogenous metabolites in human serum[J]. Analytical Chemistry, 2006, 78(10): 3 289-3 295.
- [22] WANG Y, YANG L, ZHANG X W, SUN Y, SUN H, YAN G L, ZHAO Q Q, HAN Y, WANG X J. Quality marker discovery of Dang-gui Jianzhong decoction for treating primary dysmenorrhoea based on chinmedomics strategy[J]. Phytomedicine, 2023, 115: 1-14.
- [23] RAMADWA T E, SELEPE M A, SONOPO M S, MCGAW L J, ELOFF J N. Quantitative UPLC-MS/MS analysis of obliquinol from *Ptaeroxylon obliquum* (Thunb.) Radlk. extracts and biological activities of its semi-synthesised derivative ptaeroxylinol[J]. South African Journal of Botany, 2023, 156: 35-42.
- [24] LUO J Y, YUAN H W, LIANG L, XIE Q L, JIANG S, FU Y F, CHEN S H, WANG W. An integrated strategy for quality control of the multi-origins herb medicine of *Gentiana macrophyllae* Radix based on UPLC-Orbitrap-MS/MS and HPLC-DAD[J]. RSC Advances, 2023, 13: 8 847-8 862.
- [25] CHEN S, LIU J Q, XIAO H, ZHANG J, AN L, ZHOU H. Simultaneous qualitative assessment and quantitative analysis of metabolites (phenolics, nucleosides, and amino acids) from the roots of fresh *Gastrodia elata* using UPLC-ESI-Triple quadrupole ion MS and ESI-linear ion trap high-resolution MS[J]. PLoS One, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0150647.
- [26] 梁梅丽. 基于 LC-MS 代谢组学技术的柴胡石油醚部位抗抑郁的量-效/毒关系研究[D]. 太原: 山西大学, 2018.
- [27] 罗益远, 刘娟秀, 刘廷, 刘训红, 兰才武, 王胜男, 华愉教. UPLC-MS/MS 法同时测定何首乌中二苯乙烯、蒽醌、黄酮及酚酸类成分[J]. 质谱学报, 2016, 37(4): 327-335.
- LUO Yiyuan, LIU Juanxiu, LIU Ting, LIU Xunhong, LAN Caiwu, WANG Shengnan, HUA Yujiao. Simultaneous determination of stilbenes, anthraquinones, flavonoids and phenolic acids in *Polygoni multiflori* Radix by UPLC-MS/MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2016, 37(4): 327-335(in Chinese).
- [28] 李翱翔, 岳颀宇, 阮翔天, 崔文艳, 毛乐斌, 喻晓雁, 吴玲玲, 陈宏降, 罗益远. 基于指纹图谱和网络药理学的乌药质量标志物预测分析[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(11): 1 499-1 505.
- LI Aoxiang, YUE Qiyu, RUAN Xiangtian, CUI Wenyan, MAO Lebin, YU Xiaoyan, WU Lingling, CHEN Hongjiang, LUO Yiyuan. Predictive analysis of quality markers of *Lindera aggregate* based on fingerprint and network pharmacology [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2023, 40(11): 1 499-1 505(in Chinese).
- [29] 罗益远, 蔡红蝶, 沙秀秀, 陈宏降, 沈旭立, 周根, 彭昕. 天台乌药不同部位挥发性成分的 GC-MS 分析[J]. 中药材, 2019, 42(6): 1 319-1 322.
- LUO Yiyuan, CAI Hongdie, SHA Xiuxiu, CHEN Hongjiang, SHEN Xuli, ZHOU Gen, PENG Xin. Analysis of volatile components in different parts of TAIWUYAO by GC-MS[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2019, 42(6): 1 319-1 322(in Chinese).
- [30] 罗益远, 王娟, 陈宏降, 沙秀秀, 陈梦婷, 杨欣谕, 明梓杨, 薛平. 不同产地、不同部位乌药中 31 种无机元素测定及初步风险评估[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(3): 424-432.
- LUO Yiyuan, WANG Juan, CHEN Hongjiang, SHA Xiuxiu, CHEN Mengting, YANG Xinyu, MING Ziyang, XUE Ping. Determination and primary risk evaluation of 31 inorganic elements in *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. from different habitat and medication part[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2022, 42(3): 424-432(in Chinese).

(收稿日期: 2023-05-04; 修回日期: 2023-07-24)