

海螵蛸中游离核苷与氨基酸类成分的同时检测与分析

魏爽^{1,2a,2b}, 郑飞^{2b}, 刘睿^{1,2a,2b}, 韦源青^{1,2a,2b*}, 吴皓^{1,2a,2b*} (1.江苏省海洋药用生物资源研究与开发重点实验室, 南京 210023; 2.南京中医药大学, a.江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, b.药学院, 南京 210023)

摘要: 目的 建立同时测定海螵蛸中 12 种核苷、18 种氨基酸含量的检测方法。方法 使用超快速液相色谱-串联质谱 (UFLC-MS/MS), 采用 Acquity BEH Amide 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 采用乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃; 采用电喷雾离子源正离子多反应监测模式测定。采用主成分分析和二维主成分分析对样品进行综合评价。结果 12 种核苷、18 种氨基酸在一定范围内线性关系良好($r^2>0.999\ 0$), 稳定性、精密度、重复性均良好, RSDs<3.24%, 加样回收率在 95.14%~103.84%, RSDs 在 0.93%~3.82%。18 个批次海螵蛸中核苷总量为 82.38~565.65 μg·g⁻¹, 氨基酸总量为 1 233.12~9 913.49 μg·g⁻¹。通过主成分分析不同产地海螵蛸主成分包含 9 种氨基酸和 7 种核苷, 并且具有地域性特征。结论 该方法准确、快速、高效, 可同时完成对海螵蛸中 12 种核苷、18 种氨基酸的含量测定, 可为海螵蛸的质量评价与鉴定提供相关依据, 为后续研究提供参考。

关键词: 海螵蛸; 氨基酸; 核苷; UFLC-MS/MS; 含量测定

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)11-1450-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.11.009

引用本文: 魏爽, 郑飞, 刘睿, 等. 海螵蛸中游离核苷与氨基酸类成分的同时检测与分析[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(11): 1450-1457.

Simultaneous Determination and Analysis of Free Nucleosides and Amino Acids in Sepiae Endoconcha

WEI Shuang^{1,2a,2b}, ZHENG Fei^{2b}, LIU Rui^{1,2a,2b}, WEI Yuanqing^{1,2a,2b*}, WU Hao^{1,2a,2b*} (1.Jiangsu Key Laboratory of Research and Development in Marine Bio-resource Pharmaceuticals, Nanjing 210023, China; 2.Nanjing University of Chinese Medicine, a.Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, and National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, b.School of Pharmacy, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To construct a method for simultaneous determination of 12 nucleosides and 18 amino acids in Sepiae Endoconcha. **METHODS** The analysis was performed on a Acquity BEH Amide column(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) with elution by mobile phase of acetonitrile-0.1% formic acid at a flow rate of 0.3 mL·min⁻¹ with the column temperature at 30 ℃ by an ultrafast liquid chromatography coupled with mass spectrometer(UFLC-MS/MS). In addition, the positive ion multiple reaction monitoring mode was used. Principal component analysis and two-dimensional principal component analysis were used to comprehensively evaluate the samples. **RESULTS** All 12 nucleosides and 18 amino acids showed good linearity ($r^2>0.999\ 0$), the RSDs of the stability, precision and reproducibility tests were less than 3.24%. The recoveries were in the range of 95.14%~103.84% and RSDs were in the range of 0.93%~3.82%. The total nucleoside content and amino acid content in 18 batches of Sepiae Endoconcha were 82.38~565.65 μg·g⁻¹ and 1 233.12~9 913.49 μg·g⁻¹. PCA analysis showed that the main components of Sepiae Endoconcha from different areas contained 9 amino acids and 7 nucleosides, and showed regional characteristics. **CONCLUSION** This method is accurate, rapid and efficient, and can simultaneously determine 12 nucleosides and 18 amino acids in Sepiae Endoconcha, which can provide relevant basis for quality evaluation and identification of Sepiae Endoconcha, provide reference for subsequent studies.

KEYWORDS: Sepiae Endoconcha; amino acids; nucleosides; UFLC-MS/MS; content determination

海洋中药海螵蛸(Sepiae Endoconcha)来源于乌贼科动物无针乌贼 *Sepiella maindroni* de Rochebrune 或金乌贼 *Sepia esculenta* Hoyle 的干燥内壳, 具有固精止带, 收敛止血, 制酸止痛, 收

湿敛疮等功效。海螵蛸主要成分为碳酸钙, 同时含有甲壳素、蛋白、多肽、氨基酸、多糖、核苷和一些其他微量元素。碳酸钙可制酸止血^[1], 氨基酸可能与止血凝血、促进骨缺损修复有关^[2], 多糖

基金项目: 江苏省自然科学基金青年项目(BK20210695); 江苏省高等学校基础科学(自然科学)重大项目(21KJA360007, 21KJB360017); 南京中医药大学中药学一流学科开放课题(2020YLXK009)

作者简介: 魏爽, 女, 硕士 E-mail: moderate1121@163.com

***通信作者:** 韦源青, 男, 博士, 讲师 E-mail: wei_yuanqing@njucm.edu.cn

吴皓, 女, 博士, 教授, 博导 E-mail: whao5795@vip.sina.com

具有抗溃疡活性^[3],核苷具有调节免疫功能和影响神经系统、心血管系统、抗菌、抗病毒等生理活性^[4],而各种微量元素参与多种体内代谢过程^[5]。因此,海螵蛸成分分析对质量标准的确立、活性物质的筛选有重要意义。

海螵蛸中,常量物质碳酸钙可由配位滴定方法测定^[6],蛋白组可通过液相色谱-质谱联用法分析^[7-8],氨基酸可通过全水解后使用液相色谱分析^[9],多糖可由苯酚-硫酸法测定^[10],核苷成分可通过液相色谱法分析^[11],微量元素可由电感耦合等离子体质谱分析^[10,12]。

目前,海螵蛸现有质量标准及物质基础研究较少,中国药典 2020 年版要求仅为“含碳酸钙不得少于 86.0%”,对其他成分的含量要求未见报道^[13]。海螵蛸的多种药理作用与核苷和氨基酸等成分密切相关,而产地差异往往通过影响成分含量导致药效产生差异^[14],因此本研究使用超快速液相色谱-串联质谱技术(UFLC-MS/MS)建立同时检测海螵蛸中游离核苷与氨基酸的方法,并对不同产地海螵蛸间的差异进行考察。

1 材料

1.1 仪器

QTRAP 5500 型三重四级杆线性离子阱质谱仪(美国 AB Sciex 公司);SIL-20A XR 型超快速液相色谱仪(日本岛津公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);GL-12B 型冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);BT 125D 型电子天平、Sigma 3-16PK 型台式高速冷冻离心机均来自德国赛多利斯;WiseMix VM-10 型涡旋振荡器(大韩科学有限公司);Elix Essential 5 型纯水系统(默克密理博)。

1.2 试剂

对照品:胸苷(Thymidine,批号:SLBH1121V)、脱氧尿苷(2'-Deoxyuridine,批号:STBB2291V)、腺嘌呤(Adenine,批号:061M140V)、次黄嘌呤(Hypoxanthine,批号:SLBD4750V)、尿苷(Uridine,批号:SLBC2673V)、腺苷(Adenosine,批号:SLBK6069V)、脱氧肌苷(2'-Deoxyinosine,批号:011K1819V)、黄嘌呤(Xanthine,批号:SLBC1750V)、胞苷(Cytidine,批号:BCBD5736V)、鸟苷(Guanosine,批号:041M17521V)均购于 Sigma-Aldrich;肌苷(Inosine,批号:H1901218)、鸟嘌呤(Guanine,批号:I1909102)、脱氧鸟苷(2'-Deoxyguanosine,批号:I1803192)、 γ -氨基丁酸

(GABA,批号:CH1829037)、缬氨酸(Val,批号:B2026002)、脯氨酸(Pro,批号:K1918140)、亮氨酸(Leu,批号:K1928013)、丙氨酸(Ala,批号:C2026096)、异亮氨酸(Ile,批号:B2024047)、苏氨酸(Thr,批号:B2006070)、组氨酸(His,批号:G2010095)、谷氨酸(Glu,批号:D2013078)、谷氨酰胺(Gln,批号:E1910118)、丝氨酸(Ser,批号:H1908018)、瓜氨酸(Cit,批号:C2020148)、精氨酸(Arg,批号:H2014043)、赖氨酸(Lys,批号:G2101025)、色氨酸(Trp,批号:F2118386)、酪氨酸(Tyr,批号:B2104030)、蛋氨酸(Met,批号:C2112283)均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;苯丙氨酸(Phe,批号:C10023848)购于上海麦克林生化科技有限公司;以上对照品纯度均>99%。水为超纯水;甲醇、乙腈、甲酸均为质谱级(德国 Merck 公司)。

1.3 样品

共采集了 18 个批次的乌贼样品,均为乌贼淡干品,经南京中医药大学刘圣金副教授鉴定为金乌贼 *Sepia esculenta* Hoyle。其具体产地见表 1。

表 1 样品的产地信息

Tab. 1 Origin information of the samples

样品编号	样品产地	样品编号	样品产地
WL1	浙江省温岭市	BH1	广西壮族自治区北海市
WL2	浙江省温岭市	BH2	广西壮族自治区北海市
WL3	浙江省温岭市	BH3	广西壮族自治区北海市
ZZ1	福建省漳州市	NB1	浙江省宁波市
ZZ2	福建省漳州市	NB2	浙江省宁波市
ZZ3	福建省漳州市	NB3	浙江省宁波市
XM1	福建省厦门市	YT1	山东省烟台市
XM2	福建省厦门市	YT2	山东省烟台市
XM3	福建省厦门市	YT3	山东省烟台市

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Acquity BEH Amide 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μ m);流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~4 min, 95%A; 4~9 min, 95%→85%A; 9~13 min, 85%→75%A; 13~15 min, 75%A);柱温 30 $^{\circ}$ C,流速 0.3 mL·min⁻¹,进样量 2 μ L。12 种核苷、18 种氨基酸的多反应监测(MRM)色谱图见图 1~2。

2.2 质谱条件

ESI⁺离子化模式下,采取 MRM 模式进行检测,喷雾电压 5.5 kV;离子化温度 550 $^{\circ}$ C;气帘气为 275.8 kPa (40 psi),Gas 1 为 379.2 kPa (55 psi),

Gas 2 为 379.2 kPa (55 psi); 同时对碰撞电压、去簇电压和检测离子对进行优化。12 种核苷、18 种氨基酸的优化质谱检测条件参数见表 2。

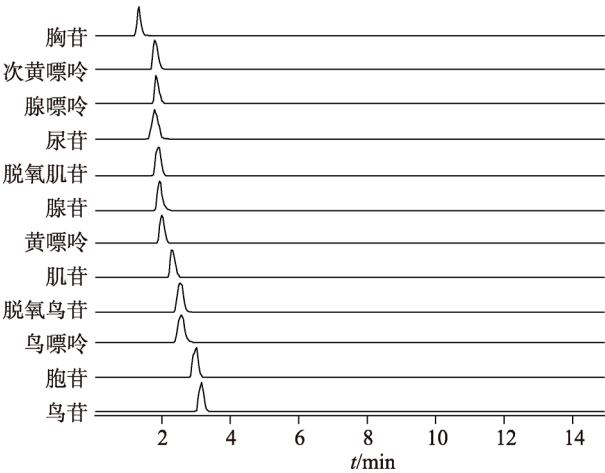


图 1 12 种核苷的 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of 12 nucleosides

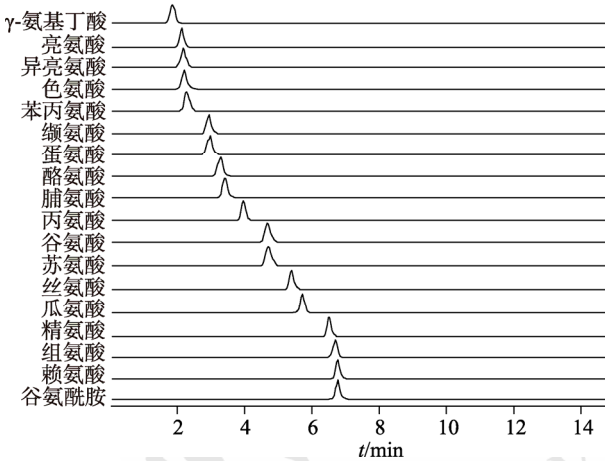


图 2 18 种氨基酸的 MRM 色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of 18 amino acids

2.3 溶液制备

2.3.1 对照品溶液的制备 分别配制胸苷(203.6 ng·mL⁻¹)、脱氧尿苷(80.48 ng·mL⁻¹)、腺嘌呤(49.40 ng·mL⁻¹)、次黄嘌呤(608.4 ng·mL⁻¹)、尿苷(100.8 ng·mL⁻¹)、腺苷(40.80 ng·mL⁻¹)、脱氧肌苷(153.0 ng·mL⁻¹)、黄嘌呤(235.2 ng·mL⁻¹)、肌苷(40.32 ng·mL⁻¹)、鸟嘌呤(39.84 ng·mL⁻¹)、脱氧鸟苷(39.36 ng·mL⁻¹)、胞苷(80.00 ng·mL⁻¹)、鸟苷(40.80 ng·mL⁻¹)、γ-氨基丁酸(40.00 ng·mL⁻¹)、苯丙氨酸(612.0 ng·mL⁻¹)、色氨酸(79.84 ng·mL⁻¹)、缬氨酸(1 022 ng·mL⁻¹)、蛋氨酸(252.5 ng·mL⁻¹)、脯氨酸(2 455 ng·mL⁻¹)、酪氨酸(990.0 ng·mL⁻¹)、亮氨酸(798.4 ng·mL⁻¹)、丙氨酸(2 505 ng·mL⁻¹)、异

亮氨酸(800.0 ng·mL⁻¹)、苏氨酸(984.0 ng·mL⁻¹)、组氨酸(100.8 ng·mL⁻¹)、谷氨酸(3 072 ng·mL⁻¹)、谷氨酰胺(2 988 ng·mL⁻¹)、丝氨酸(1 500 ng·mL⁻¹)、瓜氨酸(801.6 ng·mL⁻¹)、精氨酸(1 557 ng·mL⁻¹)、赖氨酸(2 530 ng·mL⁻¹)的对照品储备液, 取各对照品储备液适量, 并加超纯水稀释, 配置成一系列梯度浓度混合对照品溶液, 过 0.22 μm 滤膜后 4 °C 保存备用。

表 2 12 种核苷和 18 种氨基酸的优化质谱条件参数

Tab. 2 Optimized MS/MS spectrometry condition parameters of 12 nucleosides and 18 amino acids

化合物	<i>t_R</i> /min	MRM 参数		
		MRM 离子对	去簇电压/V	碰撞能/V
胸苷	1.33	242.90/127.00	11	15
次黄嘌呤	1.81	136.90/119.05	111	27
腺嘌呤	1.82	136.10/119.00	48	29
尿苷	1.83	245.00/113.00	47	13
脱氧肌苷	1.89	252.80/137.10	46	11
腺苷	1.93	267.90/136.10	61	25
黄嘌呤	2.00	153.05/110.00	111	25
肌苷	2.34	268.90/137.00	46	15
脱氧鸟苷	2.54	268.00/152.10	56	13
鸟嘌呤	2.56	152.00/135.00	51	25
胞苷	3.02	244.00/112.00	21	17
鸟苷	3.13	284.00/152.00	46	39
γ-氨基丁酸	1.86	104.00/87.00	46	13
亮氨酸	2.17	132.01/86.10	47	13
异亮氨酸	2.20	132.00/86.10	48	13
色氨酸	2.23	205.05/188.10	56	13
苯丙氨酸	2.29	166.00/120.00	56	17
缬氨酸	2.92	118.00/72.10	46	15
蛋氨酸	2.93	150.05/56.00	41	21
酪氨酸	3.28	182.00/136.10	46	17
脯氨酸	3.42	115.90/70.05	76	21
丙氨酸	3.94	90.09/44.03	71	13
谷氨酸	4.68	148.10/83.90	50	12
苏氨酸	4.71	120.00/74.10	27	12.8
丝氨酸	5.39	106.00/60.00	36	15
瓜氨酸	5.72	176.00/159.10	46	13
精氨酸	6.51	175.04/70.05	56	27
组氨酸	6.70	156.10/110.00	48	15
赖氨酸	6.76	147.00/83.90	56	20
谷氨酰胺	6.77	147.10/83.90	46	16

2.3.2 供试品溶液的制备 将海螵蛸从乌贼体内取出, 烘干后粉碎, 过 100 目筛。取干燥至恒重的各批次海螵蛸粉 0.3 g, 精密称定, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 加入 15 mL 15% 甲醇水室温下超声 1 h, 于 13 201 × g 离心 10 min, 取上清液过 0.22 μm 滤膜, 即得供试品母液。将所有母液分别稀释 5 倍以测定胸苷、脱氧肌苷、腺苷、肌苷、脱氧鸟苷、鸟嘌呤、胞苷、鸟苷等成分的含量; 将 YT1~YT3 的母液稀释 50 倍, 其余母液稀释 25 倍以测定次

黄嘌呤、腺嘌呤、尿苷、黄嘌呤、 γ -氨基丁酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、酪氨酸、脯氨酸、丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸、丝氨酸、瓜氨酸、精氨酸、组氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺等成分的含量。

2.4 方法学验证

2.4.1 线性关系、检测限和定量限的考察 精密量取“2.3.1”项下不同浓度混合对照品溶液和对照品储备液各 2 μ L, 按照“2.1”和“2.2”项下条件进样测定, 以对照品的峰面积积分值作为纵坐标, 对照品的浓度为横坐标, 得出回归方程、线性范围、相关系数(r^2)。分别以信噪比(S/N)为 3 和 10 计算各成分的检测限和定量限, 结果见表 3。

2.4.2 仪器精密度试验 精密吸取一定浓度的混合对照品溶液 2 μ L, 按照“2.1”和“2.2”项下条件连续进样 6 次, 通过 12 种核苷、18 种氨基酸的峰面积计算 RSD, 分别在 0.63%~3.06%, 结果见

表 4。

2.4.3 重复性试验 取 ZZ1 样品 6 份, 每份 0.3 g, 精密称定, 按“2.3.2”项下供试品处理方法处理样品, 制得供试品溶液, 按照“2.1”和“2.2”项下条件进样测定, 计算供试品中 12 种核苷、18 种氨基酸的质量分数的 RSD 均在 0.93%~3.24%, 结果见表 4。

2.4.4 稳定性试验 取 ZZ1 样品的供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 时, 按照“2.1”和“2.2”项下条件进样测定, 通过 12 种核苷、18 种氨基酸的峰面积计算 RSD 在 0.88%~3.14%, 结果见表 4。

2.4.5 加样回收率试验 取 ZZ1 样品 6 份, 每份 0.3 g, 精密称定, 分别加入与 0.3 g 样品中各待测成分含量相当的对照品, 按“2.3.2”项下供试品处理方法制得供试品溶液, 按“2.1”和“2.2”项下条件进样测定, 计算 12 种核苷、18 种氨基酸

表 3 12 种核苷和 18 种氨基酸的线性关系考察

Tab. 3 Investigation of liner relationship of 12 nucleosides and 18 amino acids

类别	化合物	回归方程	线性范围/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	r	检测限/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	定量限/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
核苷	胸苷	$y=12\,311x+4\,093.4$	1.02~203.6	0.999 7	0.08	0.27
	次黄嘌呤	$y=27\,001x-93\,028$	5.07~304.2	0.999 1	0.31	1.03
	腺嘌呤	$y=202\,114x-43\,660$	0.49~39.52	0.999 5	0.10	0.35
	尿苷	$y=7\,124.5x+6\,283.8$	1.01~100.8	0.999 0	0.25	0.82
	脱氧肌苷	$y=70\,611x-12\,685$	1.02~153.0	0.999 6	0.03	0.09
	腺苷	$y=250\,762x-30\,744$	0.10~30.60	0.999 0	0.01	0.04
	黄嘌呤	$y=5\,329.9x+15\,077$	0.78~156.8	0.999 4	1.75	5.83
	肌苷	$y=91\,657x+7\,096.5$	0.10~25.20	0.999 8	0.08	0.28
	脱氧鸟苷	$y=110\,352x-5\,356.9$	0.10~24.60	0.999 9	0.01	0.03
	鸟嘌呤	$y=83\,342x+12\,601$	0.10~39.84	0.999 4	0.25	0.83
	胞苷	$y=124\,851x-37\,185$	0.10~80.00	0.999 4	0.02	0.07
	鸟苷	$y=51\,231x+25\,922$	0.10~40.80	0.999 5	0.01	0.04
氨基酸	γ -氨基丁酸	$y=80\,212x+27\,286$	1.00~40.00	0.999 9	0.07	0.22
	亮氨酸	$y=415\,884x+4\times 10^6$	19.96~199.6	0.999 3	0.05	0.17
	异亮氨酸	$y=413\,798x+3\times 10^6$	20.00~200.0	0.999 3	0.07	0.23
	色氨酸	$y=200\,404x-102\,989$	0.50~34.93	0.999 1	0.05	0.16
	苯丙氨酸	$y=206\,928x+354\,300$	2.04~204.0	0.999 1	0.05	0.16
	缬氨酸	$y=150\,137x-26\,0062$	20.44~408.8	0.999 4	0.07	0.25
	蛋氨酸	$y=49\,924x+7\,358.9$	5.05~252.5	0.999 3	0.13	0.45
	酪氨酸	$y=64\,409x+261\,142$	9.90~396.0	0.999 0	0.44	1.46
	脯氨酸	$y=86\,583x+2\times 10^7$	98.20~785.6	0.999 5	0.44	1.46
	丙氨酸	$y=28\,156x-187\,284$	50.10~1002	0.999 2	2.08	6.92
	谷氨酸	$y=16\,981x-158\,424$	51.20~1536	0.999 8	0.42	1.40
	苏氨酸	$y=43\,962x+88\,316$	19.68~393.6	0.999 2	1.02	3.40
	丝氨酸	$y=36\,571x+225\,587$	10.00~600.0	0.999 7	0.51	1.70
	瓜氨酸	$y=65\,900x+437\,161$	1.00~801.6	0.999 0	0.06	0.19
	精氨酸	$y=59\,328x+89\,300$	10.38~622.8	0.999 8	0.26	0.86
	组氨酸	$y=114\,396x+99\,431$	1.01~100.8	0.999 5	0.34	1.13
	赖氨酸	$y=105\,705x-5\times 10^6$	50.60~506.0	0.999 0	0.10	0.33
	谷氨酰胺	$y=30\,250x+841\,486$	49.80~1494	0.999 4	0.04	0.13

的加样回收率和 RSD, 平均回收率在 95.14%~103.84%, RSD 在 0.93%~3.82%, 结果见表 4。

2.5 样品含量的测定

将 18 批海螵蛸样品按“2.3.2”项下供试品

处理方法制得供试品溶液, 按“2.1”和“2.2”项下条件进样测定, 依据对应标准曲线计算出样品中 12 种核苷、18 种氨基酸的含量, 结果见表 5~6。

表 4 12 种核苷和 18 种氨基酸的方法学考察

Tab. 4 Methodological study of 12 nucleosides and 18 amino acids

类别	化合物	重复性 RSD/%	稳定性 RSD/%	仪器精密 度 RSD/%	样品含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	平均 回收率/%	回收率 RSD/%
核苷	胸苷	2.75	2.64	1.88	2.84±0.00	3.02	5.80±0.06	98.13	2.07
	次黄嘌呤	2.01	1.33	2.20	45.02±0.01	44.88	89.1±0.5	98.31	1.15
	腺嘌呤	3.03	2.81	2.83	0.73±0.00	0.71	1.41±0.01	96.11	1.73
	尿苷	3.03	2.99	2.80	4.02±0.00	4.16	8.34±0.16	103.84	3.82
	脱氧肌苷	1.70	1.40	1.65	4.02±0.00	4.21	8.16±0.04	98.37	1.00
	腺苷	2.16	2.16	2.09	1.22±0.00	1.23	2.39±0.02	95.14	1.96
	黄嘌呤	3.24	3.07	2.60	22.21±0.01	22.44	44.8±0.5	100.4	2.40
	肌苷	3.10	2.75	2.05	0.40±0.00	0.41	0.81±0.01	99.68	1.90
	脱氧鸟苷	2.25	2.52	0.90	0.74±0.00	0.74	1.45±0.01	96.05	1.14
	鸟嘌呤	1.83	1.72	1.10	0.74±0.00	0.74	1.47±0.02	97.90	2.25
	胞苷	3.23	2.53	2.97	0.52±0.00	0.52	1.03±0.01	99.88	2.90
	鸟苷	2.45	2.32	3.06	0.33±0.00	0.33	0.66±0.01	101.6	3.48
氨基酸	γ-氨基丁酸	3.22	1.51	2.27	0.85±0.00	0.85	1.69±0.02	98.08	2.48
	亮氨酸	2.34	2.84	0.81	85.59±0.02	85.50	172.3±1.3	101.4	1.50
	异亮氨酸	2.95	2.97	0.97	85.21±0.02	85.28	170.1±0.9	99.58	3.38
	色氨酸	1.46	2.13	2.13	6.03±0.00	5.89	11.76±0.05	97.35	0.93
	苯丙氨酸	0.93	1.20	2.18	58.01±0.02	56.97	116.1±1.0	102.0	1.75
	缬氨酸	1.69	1.62	1.85	57.95±0.02	57.06	114.3±1.8	98.84	3.17
	蛋氨酸	1.74	1.98	2.11	10.02±0.00	9.95	19.98±0.20	100.1	2.06
	酪氨酸	1.82	0.88	1.57	41.13±0.01	39.42	79.7±1.2	97.82	3.08
	脯氨酸	2.47	2.82	1.14	188.03±0.05	101.33	292.3±1.4	102.9	3.47
	丙氨酸	2.44	1.56	1.73	119.49±0.03	122.48	241±4	99.60	2.94
	谷氨酸	2.84	3.14	2.42	141.58±0.04	141.08	279±3	97.38	2.52
	苏氨酸	2.16	1.53	0.63	46.83±0.01	47.67	94.7±1.3	100.4	2.81
	丝氨酸	2.55	1.76	1.40	55.92±0.02	57.18	110.8±0.9	95.92	1.70
	瓜氨酸	2.92	0.92	1.11	29.20±0.01	29.16	57.2±0.6	96.05	1.97
	精氨酸	2.76	2.00	2.23	50.30±0.01	49.95	99.7±1.5	98.95	3.08
	组氨酸	2.86	2.95	2.79	9.99±0.00	10.14	20.46±0.11	103.2	1.06
	赖氨酸	2.96	1.27	1.48	70.12±0.02	34.49	104.0±0.5	98.32	2.57
	谷氨酰胺	3.06	2.69	1.15	123.56±0.03	125.03	248±4	99.39	3.32

表 5 样品中 12 种核苷的含量测定

Tab. 5 Determination of 12 nucleosides in samples

样品编号	胸苷	次黄嘌呤	腺嘌呤	尿苷	脱氧肌苷	腺苷	黄嘌呤	肌苷	脱氧鸟苷	鸟嘌呤	胞苷	鸟苷	核苷总量 μg·g ⁻¹
WL1	2.83	173.77	1.93	8.34	5.73	3.08	69.88	1.57	0.84	0.57	1.54	0.77	270.85
WL2	2.71	189.36	1.26	3.52	4.39	1.72	74.89	0.74	0.81	0.72	0.80	0.25	281.16
WL3	5.91	226.76	1.81	9.09	10.22	3.36	125.35	1.32	1.75	1.15	1.97	0.97	389.66
ZZ1	9.47	150.08	2.44	13.40	13.41	4.07	74.04	1.34	2.47	2.48	1.73	1.08	276.00
ZZ2	5.27	153.96	1.25	9.01	13.47	1.60	106.00	1.21	1.95	2.01	0.58	1.33	297.64
ZZ3	2.90	133.04	1.42	4.43	10.12	2.29	112.98	1.99	0.72	1.15	0.73	0.55	272.32
XM1	5.16	238.80	3.96	15.52	8.95	2.11	136.11	0.53	1.54	0.03	1.35	1.10	415.16
XM2	3.68	178.85	6.11	16.71	6.28	1.94	121.79	0.96	0.86	1.36	1.54	0.67	340.74
XM3	2.37	108.88	2.69	5.99	7.78	0.55	54.66	0.48	0.65	0.45	0.67	0.17	185.35
BH1	19.01	191.20	2.33	34.70	24.57	1.63	154.49	5.00	4.39	2.11	9.64	5.02	454.10
BH2	9.97	82.36	1.74	19.22	12.05	0.23	63.89	0.91	1.97	2.52	3.50	1.22	199.57
BH3	19.81	68.04	0.99	6.74	18.34	0.10	70.04	0.37	4.34	3.09	3.56	0.21	195.63
NB1	2.05	128.26	2.14	43.41	10.22	0.98	128.70	1.99	0.50	0.50	0.53	0.44	319.71
NB2	1.16	61.90	1.03	6.91	3.99	1.50	60.80	2.28	0.32	0.59	1.08	0.98	142.56
NB3	0.16	44.33	0.76	4.29	2.56	1.31	26.62	1.28	0.14	0.15	0.45	0.34	82.38
YT1	22.91	312.96	2.59	32.20	31.53	0.38	135.81	3.07	5.25	7.96	8.71	2.28	565.65
YT2	23.83	270.64	2.71	21.41	26.67	0.52	113.81	1.04	4.41	4.49	4.96	0.88	475.37
YT3	15.38	188.58	1.71	12.85	19.25	0.38	96.31	1.74	2.79	3.97	4.90	0.82	348.67

表 6 样品中 18 种氨基酸的含量测定

Tab. 6 Determination of 18 amino acids in samples

样品 编号	γ -氨基 丁酸	亮氨 酸	异亮 氨酸	色氨 酸	苯丙 氨酸	缬氨 酸	蛋氨 酸	酪氨 酸	脯氨 酸	丙氨 酸	谷氨 酸	苏氨 酸	丝氨 酸	瓜氨 酸	精氨 酸	组氨 酸	赖氨 酸	谷氨 酰胺	氨基酸 总量
WL1	4.00	214.8	210.8	22.40	123.8	125.4	23.58	114.6	909.4	276.8	303.6	127.2	199.8	61.58	312.2	47.09	203.0	330.2	3 610.32
WL2	2.28	188.4	186.9	14.36	85.79	113.2	31.19	52.06	846.7	356.7	256.8	132.8	89.33	116.2	149.1	45.64	175.6	265.3	3 108.43
WL3	3.33	278.8	269.0	24.84	164.1	182.3	38.89	106.2	499.2	479.6	499.5	195.8	177.0	122.6	345.5	66.13	232.1	402.9	4 087.72
ZZ1	2.84	285.3	284.1	20.09	193.4	193.2	33.39	137.1	626.8	398.3	472.0	156.1	186.4	97.34	167.7	33.31	233.7	411.9	3 932.91
ZZ2	2.85	280.9	278.6	27.06	178.5	193.8	28.86	189.3	625.9	455.4	447.7	168.1	147.0	173.7	64.39	32.89	196.9	316.6	3 808.51
ZZ3	2.08	280.6	274.1	23.73	183.6	220.5	31.23	166.1	326.4	358.3	525.2	180.2	215.5	44.68	112.8	29.83	226.6	392.5	3 594.06
XM1	3.08	219.3	215.0	14.22	102.5	132.0	18.72	65.48	926.0	438.4	318.2	127.6	135.3	95.80	174.3	34.10	162.7	228.4	3 411.06
XM2	2.43	125.1	128.1	7.23	52.46	69.30	5.68	55.76	624.6	242.2	179.6	68.77	106.0	25.64	138.4	15.62	126.2	136.2	2 109.33
XM3	1.19	114.8	116.1	6.14	43.57	70.27	9.44	42.69	30.91	182.4	156.7	58.18	83.07	5.14	72.13	14.00	115.8	110.6	1 233.12
BH1	10.55	236.2	238.4	37.77	317.8	314.3	19.14	329.0	772.7	592.2	803.9	285.2	359.2	4.57	72.17	25.00	324.9	641.7	5 384.66
BH2	1.96	85.11	85.94	12.66	55.66	85.36	4.93	48.20	239.6	103.9	339.4	101.2	132.4	0.46	29.21	16.79	153.0	194.9	1 690.56
BH3	11.21	266.3	263.4	13.12	106.1	215.4	5.22	82.77	140.6	342.0	454.1	140.6	167.5	87.11	55.01	23.73	205.5	361.1	2 940.71
NB1	3.62	232.2	233.5	24.20	131.0	192.7	9.27	132.0	202.2	234.9	563.6	198.9	254.0	4.62	49.01	27.27	257.8	491.3	3 242.01
NB2	5.39	229.6	229.1	12.69	105.9	178.8	16.45	93.46	210.8	257.1	382.9	120.6	162.5	2.66	94.62	18.65	167.5	231.6	2 520.26
NB3	2.01	175.8	174.1	8.03	66.5	118.3	11.71	34.29	57.03	177.0	269.2	84.25	103.9	26.78	77.06	15.21	133.3	154.1	1 688.60
YT1	193.19	617.1	611.2	32.47	305.7	470.0	17.18	236.0	1 401	941.3	1 541	449.8	560.2	121.5	540.6	12.88	631.4	1 231.1	9 913.49
YT2	84.53	436.2	431.2	15.07	163.5	288.3	0.86	140.1	1 022	487.4	817.4	263.3	363.6	15.40	320.7	12.37	374.8	615.2	5 851.95
YT3	59.43	375.3	379.9	21.40	164.8	290.6	1.96	126.2	654.9	535.4	758.2	252.7	353.2	37.98	318.4	18.57	333.8	473.8	5 156.66

2.6 数据处理

各样本中成分在数量级上有差异, 对数据进行 Z-score 标准化处理, 再利用 SPSS 23.0 进行主成分分析(principal component analysis, PCA)。

2.6.1 核苷组 对样本的 12 种核苷进行 PCA, 根据特征值>1, 累积贡献率>80%为提取标准提取了 3 个主成分(F1、F2、F3), 其中主成分 F1 的方差贡献率最大。12 种核苷前 3 个主成分(F1、F2、F3)的特征值均>1, 累积贡献率>80%。F1 主要反映了脱氧鸟苷、脱氧肌苷、胞苷 3 种核苷的信息; F2 主要反映了腺苷、黄嘌呤的信息; F3 主要反映了次黄嘌呤的信息, 主成分矩阵中, 数值大小代表该因子对某个主成分的方差贡献率大小。结果见表 7~8。

表 7 核苷、氨基酸及所有目标成分的主要成分特征值及方差贡献率

Tab. 7 Eigenvalue and variance of extracted principal components of nucleosides, amino acids and all target components

组别	主成分	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%
综合组	F1''	17.508	58.361	58.361
	F2''	4.042	13.473	71.834
	F3''	2.947	9.824	81.658
	F4''	2.003	6.676	88.334
	F5''	1.080	3.600	91.934
核苷组	F1	6.440	53.664	53.664
	F2	1.997	16.642	70.306
	F3	1.434	11.948	82.254
氨基酸组	F1'	12.163	67.570	67.570
	F2'	2.777	15.430	83.000
	F3'	1.543	8.570	91.571

表 8 核苷成分矩阵

Tab. 8 Matrix of extracted components of nucleosides

核苷	主成分		
	F1	F2	F3
脱氧肌苷	0.952	-0.223	0.084
胞苷	0.944	-0.094	-0.176
脱氧鸟苷	0.905	-0.294	0.099
胸苷	0.889	-0.364	0.135
鸟嘌呤	0.813	-0.384	0.227
鸟苷	0.729	0.332	-0.503
尿苷	0.680	0.320	-0.101
黄嘌呤	0.662	0.604	0.161
次黄嘌呤	0.651	0.366	0.475
腺苷	0.309	0.648	-0.053
肌苷	-0.620	0.319	-0.669
腺嘌呤	0.185	0.582	-0.592

2.6.2 氨基酸组 对样本的 18 种氨基酸进行 PCA, 提取了 3 个主成分(F1'、F2'、F3'), 特征值>1, 累积贡献率达到 91.571%, F1 方差贡献率最大。F1' 主要反映了苏氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、缬氨酸、丝氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸 9 种氨基酸的信息; F2' 主要反映了蛋氨酸和组氨酸的信息; F3' 主要反映了精氨酸的信息。结果见表 7、表 9。

2.6.3 综合组 对 18 个样本的氨基酸与核苷酸含量同时进行 PCA, 提取得到 5 个主成分, F1'' 方差贡献率最大, 其中苏氨酸、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、缬氨酸、丙氨酸、脱氧肌苷在 F1'' 上具有较高的载荷率; 蛋氨酸、组氨酸、腺苷在 F2'' 上具有较高的载荷率; 肌苷和鸟苷在 F3''

上具有较高的载荷率;腺嘌呤在 F4''上具有较高的载荷率;脱氧鸟苷、胸苷在 F5''上具有较高的载荷率。结果见表 7、表 10。

表 9 氨基酸成分矩阵

Tab. 9 Matrix of extracted components of amino acids

氨基酸	主成分		
	F1''	F2''	F3''
苏氨酸	0.985	-0.047	-0.082
赖氨酸	0.979	-0.153	0.042
谷氨酰胺	0.975	-0.071	-0.043
谷氨酸	0.973	-0.173	-0.049
缬氨酸	0.964	-0.116	-0.136
丝氨酸	0.951	-0.246	-0.104
丙氨酸	0.945	0.158	0.084
异亮氨酸	0.939	-0.075	0.212
亮氨酸	0.937	-0.059	0.220
苯丙氨酸	0.881	0.220	-0.392
γ-氨基丁酸	0.865	-0.336	0.322
酪氨酸	0.763	0.166	-0.586
色氨酸	0.751	0.401	-0.478
精氨酸	0.743	0.078	0.541
脯氨酸	0.723	0.209	0.329
蛋氨酸	0.078	0.930	-0.045
组氨酸	-0.082	0.910	0.103
瓜氨酸	0.304	0.719	0.397

2.6.4 二维主成分分析 依据表 5~6 中核苷与氨基酸的含量测定结果进行二维主成分分析(2D-PCA)并作图,以进一步分析核苷与氨基酸成分含量的产地差异,并依据结果在核苷组、氨基酸组、综合组中筛选出最能扩大产地差异的 PCA 方法,结果见图 3。

通过比较核苷组、氨基酸组、综合组的 2D-PCA 分析结果,发现综合组的 2D-PCA 分析更能体现海螵蛸成分的地域性差异。在核苷组与氨基酸组的 2D-PCA 分析中,选择 PCA 综合分析得

表 10 成分矩阵

Tab. 10 Matrix of extracted components

氨基酸及核苷	主成分				
	F1''	F2''	F3''	F4''	F5''
苏氨酸	0.981	0.036	-0.006	-0.085	-0.123
谷氨酸	0.972	-0.091	-0.044	-0.114	-0.143
赖氨酸	0.971	-0.063	-0.125	-0.056	-0.161
谷氨酰胺	0.967	0.013	-0.043	-0.076	-0.148
丝氨酸	0.961	-0.136	0.031	-0.029	-0.197
缬氨酸	0.959	-0.042	0.008	-0.217	-0.074
丙氨酸	0.929	0.225	-0.149	0.010	0.071
脱氧肌苷	0.916	-0.249	0.022	-0.012	0.254
异亮氨酸	0.893	0.010	-0.348	-0.153	-0.143
亮氨酸	0.889	0.025	-0.357	-0.157	-0.142
苯丙氨酸	0.883	0.302	0.290	-0.150	0.021
鸟嘌呤	0.853	-0.304	-0.287	-0.080	0.126
胞苷	0.851	-0.236	0.263	0.045	0.243
γ-氨基丁酸	0.851	-0.256	-0.370	0.013	-0.178
脱氧鸟苷	0.835	-0.218	-0.030	-0.037	0.478
胸苷	0.806	-0.352	-0.054	-0.019	0.420
酪氨酸	0.791	0.238	0.493	-0.112	0.043
色氨酸	0.743	0.457	0.386	-0.165	-0.039
次黄嘌呤	0.720	0.302	-0.293	0.497	0.011
脯氨酸	0.713	0.300	-0.273	0.389	0.072
精氨酸	0.683	0.191	-0.539	0.152	-0.206
黄嘌呤	0.628	0.291	0.263	0.507	-0.002
尿苷	0.586	-0.195	0.458	0.347	-0.234
蛋氨酸	-0.021	0.941	-0.012	-0.210	0.014
组氨酸	-0.154	0.875	-0.098	-0.040	0.106
腺苷	-0.197	0.848	0.040	0.135	-0.048
瓜氨酸	0.220	0.636	-0.488	-0.147	0.333
肌苷	0.622	0.126	0.681	-0.111	-0.219
鸟苷	0.615	0.135	0.666	0.089	0.229
腺嘌呤	0.048	-0.066	-0.018	0.949	0.018

到的特征氨基酸和核苷,通过配对 t 检验可得 $P<0.01$,证明烟台组与其他组相比均有显著差异;在综合组的 2D-PCA 分析中,通过 PCA 散点分布情况判断烟台组、北海组及温岭组差异性提升,虽然厦门组较难与宁波、漳州、温岭组区分,但

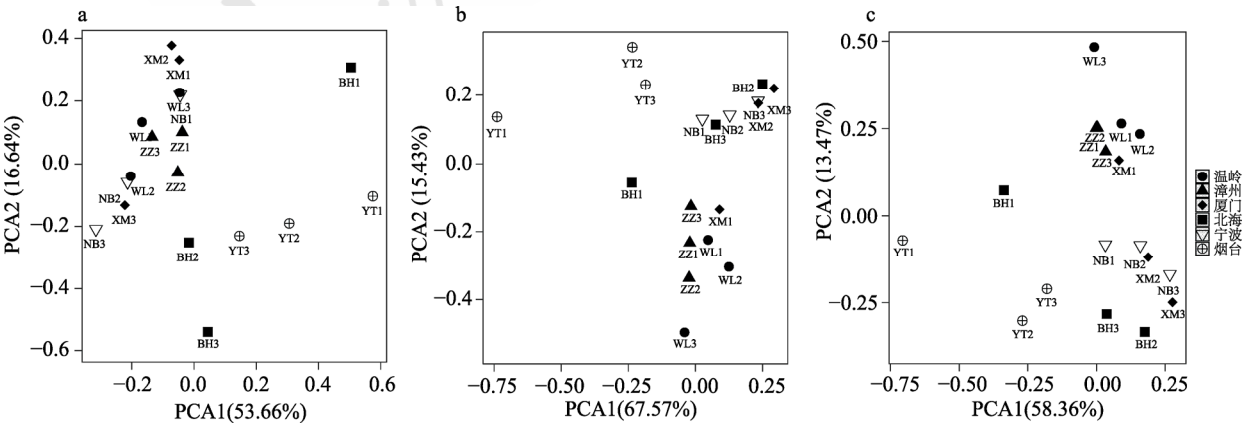


图 3 二维主成分分析散点图
a-核苷组主成分; b-氨基酸组主成分; c-综合组主成分。

Fig. 3 Scatter plots obtained by 2D-PCA

a-extracted principal components of nucleosides; b-extracted principal components of amino acids; c-extracted principal components of nucleosides and amino acids.

宁波、漳州与温岭组间差异性提升。因此,相比于单独分析核苷或者氨基酸,通过同时分析海螵蛸中游离核苷与氨基酸的主成分,比较单独分析与综合分析的特征值(即方差贡献情况)以及散点分布情况,发现综合分析能够扩大产地间差异。因此选定“2.6.3”项下提取出的7种核苷与9种氨基酸作为地域性差异的主要评价指标。从产地海域来看,烟台属黄海,北海属南海,宁波、温岭、漳州、厦门属东海,海螵蛸在海域间的成分差异性更高,同海域间的成分差异性较小。

3 讨论

UFLC-MS/MS 灵敏度高、选择性强、定量准确、分析迅速,适合于复杂药物成分的定性、定量分析。高艳云等^[15]对不同浓度的甲醇水提取鸡枞样品中嘌呤碱基及核苷的效果进行了考察,结果证明15%甲醇水的提取效果较好,目标成分的提取含量较高。另外,甲醇浓度过高或过低都不利于目标成分的提取,过低会使提取液中含有较高含量的多糖和蛋白质等,易堵塞仪器管道;过高则会使目标成分提取不完全且杂峰多^[16]。综合各方面因素确定了15%甲醇水超声1h的提取条件。实验中优化了碰撞能及碰撞电压等条件(表2)。重复性、稳定性、精密度相对标准偏差RSD<5%,平均回收率95.14%~103.84%,RSD 0.93%~3.82%,说明核苷及氨基酸的检测方法可靠。

海螵蛸来源之一的金乌贼主要分布于我国渤海、黄海、东海、南海,不同产地间的部分核苷及氨基酸含量具有差异,并且相同产地间的个体具有一定差异,因此,本实验对检测结果进行PCA,通过PCA各因子和主成分的主成分贡献率大小确定苏氨酸、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、缬氨酸、丙氨酸、脱氧肌苷、蛋氨酸、组氨酸、腺苷、肌苷、鸟苷、腺嘌呤、脱氧鸟苷、胸苷共7种核苷和9种氨基酸为海螵蛸地域性差异的主要评价指标。

海洋中药海螵蛸的功效成分尚未完全揭示,质量标准目前仍以碳酸钙含量为依据,本研究通过UFLC-MS/MS快速检测12种核苷、18种氨基酸含量,分析海螵蛸成分的地域性差异,为海螵蛸质量评价和鉴定提供了数据支持。

REFERENCES

- [1] 赵中杰,江佩芬,李昂.海螵蛸中碳酸钙、微量元素和氨基酸的测定[J].中国中药杂志,1990,15(1):41-43,64.
- [2] WANG L, ZHANG L, HE Y Q, et al. Study on the pharmacological activity and content of amino acids in animal drugs[J]. Asia-Pac Trad Med(亚太传统医药), 2021, 17(2): 165-169.
- [3] 唐丽娟,刘玮炜,王丽,等.不同方法提取海螵蛸多糖及结构表征[J].中成药,2011,33(9):1625-1628.
- [4] DING X J, XIONG L, ZHOU Q M, et al. Advances in studies on chemical structure and pharmacological activities of natural nucleosides[J]. J Chengdu Univ Tradit Chin Med(成都中医药大学学报), 2018, 41(2): 102-108.
- [5] 赵涛涛,李琨,黄燕,等.海螵蛸入药部分和废弃部分8种无机元素分析[J].微量元素与健康研究,2003,20(2):26-27.
- [6] 中国药典.二部[S].2020:1629.
- [7] LE PABIC C, MARIE A, MARIE B, et al. First proteomic analyses of the dorsal and ventral parts of the *Sepia officinalis* cuttlebone[J]. J Proteomics, 2017(150): 63-73.
- [8] LIU R, WEI S, WANG X Z, et al. Proteomics and peptidomics analysis of *Sepia Endoconcha*[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45(16): 3883-3889.
- [9] GB/T 5009.124—2003,食品中氨基酸的测定[S].2004:115-119.
- [10] JIANG M W, JIANG X M, LIANG J J, et al. Comparative analysis: Nutritional component contents in cuttlebone of *Sepia pharaonis* at different growth stages[J]. Chin J Animal Nutr(动物营养学报), 2016, 28(7): 2300-2308.
- [11] GU Q Q, AN R, ZHANG Y Z, et al. Determination of nucleotides of cuttlebone from different regions[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2015, 37(5): 1016-1021.
- [12] CHUNG M T, HUANG K F, YOU C F, et al. Elemental ratios in cuttlebone indicate growth rates in the cuttlefish *Sepia pharaonis*[J]. Front Mar Sci, 2020(6): 796.
- [13] 中国药典.一部[S].2020:307.
- [14] CHAI C, ZHOU L M, CUI X B, et al. Determination of amino acids and nucleosides in semen sojae praeparatum from different regions by using UFLC-MS/MS[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2016, 22(23): 60-67.
- [15] GAO Y Y, ZHANG Y J, ZHANG Q, et al. Determination of nucleoside and purine bases in three kinds of fruiting body of *termitomyces*[J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2017, 19(1): 68-72.
- [16] LI J P, ZENG W B. An extraction method of nucleosides in *Cordyceps s.l.*[J]. Edib Fung China(中国食用菌), 2017, 36(1): 41-47, 51.

收稿日期:2021-08-16

(本文责编:蔡珊珊)