

姜俊, 程春雷, 杨昊. 基于 LC-MS/MS 技术的水蛭配方颗粒中 7 种碱基和核苷成分分析方法的建立[J]. 环境化学, 2024, 43(1): 359-362.
JIANG Jun, CHENG Chunlei, YANG Hao. Establishment of analytical methods for nucleobase and nucleosides of leech formula granule by LC-MS/MS[J]. Environmental Chemistry, 2024, 43 (1): 359-362.

基于 LC-MS/MS 技术的水蛭配方颗粒中 7 种碱基和核苷成分分析方法的建立

姜俊 程春雷 杨昊

(山东省食品药品检验研究院(国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室), 济南, 250000)

摘要 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 Nexera X2 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定水蛭配方颗粒中 7 种碱基和核苷成分的分析方法. 水蛭配方颗粒以 10% 甲醇 50℃ 超声提取 30 min, MRM 正负模式同时检测. 以 Discovery[®]HS F5-3 色谱柱进行分离, 流动相为 0.15% 甲酸水溶液和甲醇, 10 min 内完成梯度洗脱. 本方法采用外标法定量, 7 种化合物在相应的浓度范围内线性关系良好, 判定系数 (R^2) 均大于 0.996, 定量限在 0.42—3.94 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 之间. 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合标准品溶液连续进样 6 次, 待测化合物峰面积 RSD 均小于 6%, 精密度良好. 平行 6 份加标回收试验, 7 种化合物平均回收率在 87.09%—105.81% 之间, RSD% 在 1.35%—4.70% 之间. 残留实验结果为阴性. 该方法准确可靠, 可为水蛭配方颗粒的质量控制提供参考依据.

关键词 LC-MS/MS, 水蛭, 配方颗粒, 碱基, 核苷.

Establishment of analytical methods for nucleobase and nucleosides of leech formula granule by LC-MS/MS

JIANG Jun CHENG Chunlei YANG Hao

(Shandong Food and Drug Inspection and Research Institute(Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs of National Medical Products Administration), Jinan, 250000, China)

Abstract An analytical method was established for simultaneous determination of 7 nucleobase and nucleoside components in leech formula granule by a combination of Shimadzu ultra-high performance liquid chromatography Nexera X2 and triple quadrupole mass spectrometry LCMS-8050. Leech formula granule was extracted by ultrasound at 50 °C with 10% methanol for 30 minutes, and detected with MRM mode by both positive and negative ESI ionization. Discovery[®]HS F5-3 column was used for separation, with a mobile phase consisted of 0.15% formic acid aqueous solution and methanol. Gradient elution was used within 10 minutes. External standard method was used for quantification. The seven compounds had good linear relationships within the corresponding concentration range, all coefficient of determination (R^2) were greater than 0.996, and the quantification limit was between 0.42 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and 3.94 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. The 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ mixed standard solution was injected 6 times, and the peak area RSD of tested compounds was all less than 6%, indicating good precision. The recovery experiments executed for six times, the average recovery of 7 compounds was ranged from 87.09% to 105.81%, with RSD% ranging from 1.35% to 4.70%. The residual test result was negative. This method is accurate and reliable, and can provide a reference for the quality control of leech formula granule.

Keywords LC-MS/MS, leech, formula granule, nucleobase, nucleosides.

水蛭为水蛭科动物蚂蝗 (*Whitmaniapigra* Whitman)、水蛭 (*Hirudonipponica* Whitman) 或柳叶蚂蝗 (*Whitmania*

Acranulata Whitman) 的干燥全体, 具有破血通经、逐瘀消癥等功效, 临床上具有很高的药用价值^[1]. 针对水蛭药材, 采用液相色谱法对其进行黄嘌呤、尿苷、尿嘧啶、次黄嘌呤中 1—4 种碱基及核苷成分的含量测定已有相关文献报道^[2-4]. 碱基是嘌呤和嘧啶的衍生物, 是合成核苷、核苷酸和核酸的基本组成单位. 核苷是核酸合成的前体, 具有保护神经、抗病毒和抗菌等生物活性. 李桃运用多种色谱分离手段从水蛭中提取并分离鉴定出 38 个化合物^[5], 荆文光等从水蛭甲醇提取物中分离鉴定了 18 个化合物^[6], 除上述 4 种成分外, 还包含其他几种成分, 如腺苷、腺嘌呤、次黄嘌呤核苷(肌苷), 但未均建立此类成分的含量测定方法.

水蛭配方颗粒是由水蛭饮片经水加热提取、浓缩、干燥、制粒而成的一种颗粒. 目前, 水蛭配方颗粒暂未出台相应的国家药品标准, 广东、山东、湖南等地公布了水蛭配方颗粒的省级质量标准, 这些标准中含量测定项主要涉及抗凝血活性、水蛭胺 C、次黄嘌呤的测定. 除此之外, 未见水蛭配方颗粒中多种碱基和核苷成分同时测定的相关报道. 碱基和核苷化合物绝大部分是强极性的小分子, 仅依靠传统的疏水作用机制难以进行较好的色谱保留, 该类化合物也一直是分析技术的难点. 本试验通过多重保留机制的液相色谱-质谱联用技术, 建立同时快速测定水蛭配方颗粒中 7 种碱基和核苷类成分的含量方法, 该方法具有分析快速、准确、灵敏度高的特点, 可为水蛭配方颗粒甚至水蛭药材的质量评价提供依据.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

试剂: 尿嘧啶、次黄嘌呤、腺苷、腺嘌呤、肌苷对照品(上海源叶生物科技有限公司), 黄嘌呤对照品(中国食品药品检定研究院), 尿苷对照品(上海安谱实验科技有限公司), 纯度均大于 98%. 水蛭配方颗粒来源于广东一方制药有限公司, 每袋 1.5 g, 每 1 g 配方颗粒相当于 2 g 药材.

仪器: 超高效液相色谱仪 Nexera X2 与三重四极杆质谱 LCMS-8050 联用系统(岛津, 日本).

1.2 样品的制备

混合标准溶液的制备: 精密称取 7 种碱基和核苷对照品各适量, 除黄嘌呤用 20 mmol·L⁻¹ 氢氧化钠溶解外, 其余均采用 10% 甲醇溶液溶解, 最终用 10% 甲醇溶液配制系列浓度的混合标准溶液, 待上机分析.

样品前处理: 取水蛭配方颗粒 5 袋, 研细, 称取约 0.1g(精确到 0.0001g), 加入 10% 的甲醇溶液 100 mL, 涡旋混匀 1 min, 50 °C 超声 30 min, 4000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 上清液用 0.22 μm 的尼龙滤膜滤过, 取续滤液即得. 样品的稀释: 精密量取制备好的样品续滤液 1 mL, 用 10% 甲醇溶液定量稀释至 10 mL.

1.3 实验条件

液相色谱条件: 色谱柱为 Discovery[®]HS F5-3(150 mm×2.1 mm, 3 μm), 流动相: A 为 0.15% 甲酸水溶液, B 为甲醇; 流速 0.35 mL·min⁻¹, 梯度洗脱, 0—1 min, 2%—5%B, 1—5 min, 5%B—50%B, 5—5.5 min, 50%B—90%B, 5.5—7 min, 90%B, 7.01—10 min, 2%B; 柱温 40 °C, 进样体积: 1 μL.

质谱条件: ESI 负离子模式同时监测; 接口电压: +0.5 kV(正离子), -0.5 KV(负离子); 雾化气流速: 氮气 3.0 L·min⁻¹; 加热气流速: 空气 15 L·min⁻¹; 干燥气流速: 氮气 5 L·min⁻¹; 脱溶剂管温度: 150 °C; 加热模块温度: 300 °C; 离子源接口温度: 350 °C; 扫描模式: 多反应监测(MRM); 驻留时间: 25 ms; MRM 参数见表 1.

表 1 7 种碱基和核苷的 MRM 参数列表

Table 1 MRM parameters for 7 nucleobases and nucleosides

化合物	前体离子	产物离子	Q1预杆偏差/V	碰撞电压/V	Q3预杆偏差/V	极性
尿苷	245.1	113.1*	-27.0	-10.0	-19.0	正
		70.0	-17.0	-33.0	-13.0	
肌苷	269.1	110.0*	-29.0	-42.0	-17.0	正
		137.1	-30.0	-12.0	-28.0	
腺苷	268.1	136.1*	-19.0	-22.0	-29.0	正
		119.1	-30.0	-45.0	-11.0	
次黄嘌呤	136.9	110.1*	-30.0	-23.0	-18.0	正
		55.0	-30.0	-31.0	-21.0	
腺嘌呤	136.1	64.9*	-30.0	-39.0	-26.0	正
		92.0	-14.0	-30.0	-14.0	
尿嘧啶	113.0	70.0*	-27.0	-17.0	-24.0	正
		96.1	-26.0	-21.0	-19.0	
黄嘌呤	151.1	107.9*	16.0	19.0	10.0	负
		79.9	30.0	23.0	29.0	

注: * 代表定量离子对.

2 结果与讨论

2.1 样品前处理条件的选择

依据待测化合物的溶解性及参考相关文献^[4,7], 本实验尝试了使用水、10% 甲醇、70% 甲醇、0.1% 甲酸及 10 mmol·L⁻¹ 氢氧化钠在 50 ℃ 下进行超声提取 30 min, 考察不同溶剂的提取效率。结果显示: 70% 甲醇、0.1% 甲酸及 10 mmol·L⁻¹ 氢氧化钠提取条件下, 肌苷的峰面积偏低, 且 70% 甲醇提取条件下色谱峰会展宽。水和 10% 甲醇对大部分化合物的提取效率相当, 但 10% 甲醇对腺苷的提取效率要优于水。综合考虑, 确定样品溶液的制备方式为 10% 甲醇 50 ℃ 条件下超声 30 min。

2.2 分析条件的优化

本实验曾比较了不同流动相系统对色谱峰及质谱响应的影响, 如乙腈—0.02% 甲酸和 1 mmol·L⁻¹ 乙酸铵水溶液、乙腈—0.1% 甲酸水溶液、甲醇—0.1% 甲酸水溶液、甲醇—0.15% 甲酸水溶液。最后确定采用甲醇—0.15% 甲酸水溶液的流动相体系, 该体系下各化合物色谱保留较好且质谱信号较强。

7 种待测碱基和核苷化合物的属于极性较强的化合物, 传统反相色谱保留效果欠佳。董萌等尝试用亲水色谱对食品中的碱基、核苷和核苷酸类物质进行色谱保留^[8]。亲水色谱对强极性化合物保留较好, 但要得到较好的峰形和重复性, 方法开发的难度往往比普通反相色谱的难度要大。本实验对比了 Discovery[®]HS F5-3、Shim-pack GIST C18 和 ShimNex UP C18 色谱柱对分析测试的影响。结果显示 Discovery[®]HS F5-3 色谱柱对待测化合物的保留最好, 且质谱响应信号相对更高。Discovery[®]HS F5-3 是一款在硅胶基质上键合了五氟苯基的色谱柱, 提供了疏水作用、氢键作用、离子作用等多重保留机制, 对强极性化合物的保留和异构体的分离优于常规 C18 柱。

2.3 精密度的试验

将 10 ng·mL⁻¹ 的混合对照品溶液连续进样 6 次, 尿苷、肌苷、腺苷、次黄嘌呤、腺嘌呤、尿嘧啶和黄嘌呤 7 种化合物测得峰面积的 RSD 分别为 4.50%、5.83%、1.84%、3.35%、4.27%、2.08%、3.54%, 表明精密度良好。

2.4 线性范围和灵敏度

取系列浓度的混合标准溶液上机测定, 以对照品浓度为横坐标 (X)、峰面积为纵坐标 (Y) 绘制校准曲线, 得到 7 种碱基和核苷的线性方程、判定系数。以各化合物信噪比 (S/N) 约为 3 时计算对应的浓度为检出限 (LOD), 各对照品信噪比 (S/N) 约为 10 时对应的浓度为定量限 (LOQ), 结果如表 2 所示。由表 2 可知, 7 种碱基和核苷在相应的浓度范围内具有良好的线性关系, 判定系数 (R^2) ≥ 0.996 , 检出限在 0.13—1.18 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 范围内, 定量限在 0.43—3.94 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 范围内, 该方法灵敏度较高。

表 2 7 种碱基和核苷的线性范围及灵敏度

Table 2 Linear range and sensitivity of 7 nucleobases and nucleosides

化合物	浓度范围/(ng·mL ⁻¹)	线性方程	判定系数 R^2	定量限/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	检出限/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
尿苷	2—500	$Y = (4638.13)X + (-1899.49)$	0.997	1.59	0.48
肌苷	1—100	$Y = (3051.64)X + (2020.53)$	0.998	0.42	0.13
腺苷	1—100	$Y = (223740)X + (11509.4)$	0.996	0.70	0.21
次黄嘌呤	1—100	$Y = (14727.4)X + (2659.38)$	0.996	0.43	0.13
腺嘌呤	1—100	$Y = (14903.4)X + (479.220)$	0.998	0.87	0.26
尿嘧啶	5—1000	$Y = (1000.35)X + (-1777.53)$	0.997	3.94	1.18
黄嘌呤	2—1000	$Y = (1267.59)X + (-308.937)$	0.998	1.42	0.43

2.5 加样回收率试验

取“1.3”项下样品溶液上机测定, 以外标法计算 7 种碱基和核苷的含量。尿苷、肌苷、腺苷、次黄嘌呤、腺嘌呤、尿嘧啶和黄嘌呤的含量分别为 41.42、7.11、1.24、314.87、4.89、55.83、53.95 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。本品中尿苷、次黄嘌呤、尿嘧啶和黄嘌呤的含量相对较高, 肌苷、腺苷和腺嘌呤有检出, 但含量较低。另精密称取已测知含量的水蛭配方颗粒约 0.1 g, 精密加入适量的对照品储备液, 按“1.3”项方法制成加样回收样品溶液, 平行制备 6 份。进行次黄嘌呤回收率测试时, 将以上加样回收样品溶液稀释 10 倍上机进行测定, 外标法计算平均回收率, 结果见表 3。7 种碱基和核苷的平均回收率在 87.09%—105.81% 之间, RSD% 在 1.35%—4.70% 之间, 表明方法的准确性高。

表 3 7 种碱基和核苷的加样回收率 ($n=6$)

Table 3 The recovery data of 7 nucleobases and nucleosides

化合物	加标量/ μg	平均回收率/%	相对标准偏差/%
尿苷	5.0	88.38	3.72
肌苷	3.0	105.81	4.70
腺苷	3.0	87.09	3.72
次黄嘌呤	40	99.11	1.77

续表 3

化合物	加标量/ μg	平均回收率/%	相对标准偏差/%
腺嘌呤	3.0	85.46	1.35
尿嘧啶	5.0	91.06	4.64
黄嘌呤	5.0	92.80	4.36

2.6 残留实验

高浓度混合标准溶液($1000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)分析完成后,进样 10% 甲醇试剂空白,考察残留情况.结果表明,7 种碱基和核苷化合物检测通道中均无明显目标化合物干扰.

3 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 Nexera X2 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定水蛭配方颗粒中 7 种碱基和核苷成分的分析方法.该方法分析速度快,重复性好,灵敏度和准确度较高,适合水蛭配方颗粒中碱基和核苷类化合物的快速定量检测,可为水蛭配方颗粒的质量评价提供参考.

参考文献 (References)

- [1] 邵译莹,张功,于莹,等. 毒性中药水蛭增效减毒的临床配伍探究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2022, 28(12): 2023-2025,2049.
- [2] 张永太. 水蛭饮片次黄嘌呤含量测定 [J]. *中成药*, 2008, 30(8): 1175-1177.
- [3] 王艳,杨培民,代龙,等. HPLC 测定水蛭仿生酶解有效部位中次黄嘌呤及尿苷 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(13): 74-76.
- [4] 刘武占,范建伟,李艳芳,等. HPLC 法同时测定水蛭(蚂蟥)中 7 个成分的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(8): 1417-1421.
- [5] 李桃. 宽体金钱蛭的化学成分研究 [D]. 广州:暨南大学, 2013.
- [6] 荆文光,符江,刘玉梅,等. 水蛭的化学成分 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(19): 120-123.
- [7] 广东省药品检验所. 炒僵蚕配方颗粒:粤 FKL20220048[S], 2022.
- [8] 董萌,张玉莹,徐献兵,等. 亲水色谱-串联质谱法监测多宝鱼肉贮藏过程中碱基、核苷和核苷酸类物质含量变化 [C]//中国食品科学技术学会第十五届年会论文摘要集. 青岛, 2018: 668-669.