

## 反相高效液相色谱法同时测定罗氏海盘车中的7种核苷化合物

张道来<sup>1</sup>, 陈军辉<sup>1\*</sup>, 周明<sup>1</sup>, 史倩<sup>1</sup>, 赵恒强<sup>1</sup>,  
程红艳<sup>1</sup>, 杨黄浩<sup>1</sup>, 王小如<sup>1,2</sup>

(1. 国家海洋局第一海洋研究所, 海洋生态研究中心, 山东 青岛 266061;

2. 厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 建立了罗氏海盘车中7种核苷化合物的反相高效液相色谱分析测定方法。采用超声波辅助提取, 选用两根不同的C<sub>18</sub>色谱柱串联, 以甲醇和0.2% (体积分数) 乙酸/水溶液为流动相梯度洗脱分离。优化的色谱条件为: 柱温为室温, 检测波长为260 nm, 流速为0.8 mL/min, 进样量为20 μL。结果表明, 7种核苷化合物在一定的浓度范围内线性关系良好, 次黄嘌呤和胸苷的线性范围为0.65~40 mg/L, 尿苷、黄嘌呤和肌苷的线性范围为0.80~40 mg/L, 胸腺嘧啶的线性范围为1.15~40 mg/L, 鸟苷的线性范围为0.50~40 mg/L。样品中7种核苷化合物的加标回收率为90.00%~105.00%, 相对标准偏差为0.72%~3.23%。该方法操作简便、灵敏度高、重复性好, 回收率高, 适用于罗氏海盘车中7种核苷类成分的同时分析, 也可用于罗氏海盘车的质量控制和综合评价。

**关键词:** 反相高效液相色谱; 核苷; 罗氏海盘车

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2010)08-0795-05

### Simultaneous determination of 7 nucleosides in *Asterias rollestoni* using reversed-phase high performance liquid chromatography

ZHANG Daolai<sup>1</sup>, CHEN Junhui<sup>1\*</sup>, ZHOU Ming<sup>1</sup>, SHI Qian<sup>1</sup>, ZHAO Hengqiang<sup>1</sup>,  
CHENG Hongyan<sup>1</sup>, YANG Huanghao<sup>1</sup>, WANG Xiaoru<sup>1,2</sup>

(1. Research Center for Marine Ecology, The First Institute of Oceanography,

State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** A method for the simultaneous determination of 7 nucleosides in *Asterias rollestoni* was developed using reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Analytes were extracted by ultrasonic-assisted extraction and separated on two different C<sub>18</sub> columns, which were connected in series, under the gradient elution with the mobile phases of methanol and 0.2% (v/v) acetic acid/water at room temperature. The chromatographic conditions were as follows: flow rate, 0.8 mL/min; detection wavelength, 260 nm; injection volume, 20 μL. Under the optimized conditions, good linear relationships between the values of mass concentrations and the peak areas of hypoxanthine, uridine, xanthine, thymine, inosine, guanosine and thymidine were observed in the ranges of 0.65–40, 0.80–40, 0.80–40, 1.15–40, 0.80–40, 0.50–40, and 0.65–40 mg/L, respectively. The relative standard deviations were around 0.72%–3.23% and the recoveries were around 90.00%–105.00%. The results showed that the developed method is sensitive, accurate and reproducible. It is suitable for the analysis of nucleosides in *Asterias rollestoni* with high recoveries and it is expected to be used for the quality control and evaluation of *Asterias rollestoni*.

\* 通讯联系人: 陈军辉, 博士. Tel: (0532) 88966705, E-mail: jhchen@fio.org.cn.

基金项目: 国家自然科学基金项目(20905017)、海洋公益性行业科研专项(200705011, 200805039)、海洋局青年基金项目(2010140)、海洋一所基本科研业务专项(GY-022008T32, 2010G25)和中国科学院实验海洋生物学重点实验室开放基金课题。

收稿日期: 2010-03-24

**Key words:** reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC); nucleosides; *Asterias rollestoni*

核苷化合物是生物细胞维持生命活动的基本组成成分,在几种陆源菌类、个别植物及低等海洋生物中分布比例较高<sup>[1-3]</sup>。核苷化合物具有广泛的生理活性,在医药、生物、化工、保健、养殖等行业应用较广,特别是近年来其在艾滋病、癌症及肝炎等多发性疾病中的大量应用,引起了研究者的广泛关注。人们已对多种天然药用生物体内的核苷化合物进行了研究,尤其是核苷含量高、物质结构特殊的海洋药用生物。在罗氏海盘车、黄海葵、海绵等多种广栖海洋药用生物中分离鉴定出多种核苷成分后,更激起了研究者的兴趣<sup>[4-8]</sup>。

目前,核苷化合物的分析测定方法主要有毛细管电泳法、高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱联用分析法等<sup>[9-12]</sup>,其中 HPLC 具有方便、快捷、高效、普及度高等优点,是目前常用的方法之一。在我国 2010 版药典中,也采用了 HPLC 对冬虫夏草中的核苷化合物进行了测定<sup>[13]</sup>。这些方法在陆源药用生物中应用较多,而快速分离测定海洋药用生物中的核苷类化合物的方法报道较少。同时已有的方法一般同时测定核苷化合物数目较少。本文采用超声波辅助提取,建立了反相高效液相色谱法(RP-HPLC)同时分离测定传统海洋药物罗氏海盘车中所发现的全部 7 种核苷类化合物的方法。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),配有二极管阵列检测器(DAD)、四元泵、柱温箱、自动进样器等;KQ-400KDE 型高功率数控超声波仪(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q 超纯水处理系统(美国 Millipore 公司);Z383K 型离心机(德国 HERMLE 公司)。

7 种核苷标准品,包括次黄嘌呤(hypoxanthine)、尿苷(uridine)、黄嘌呤(xanthine)、胸腺嘧啶(thymine)、肌苷(inosine)、鸟苷(guanosine)和胸苷(thymidine),均购自美国 Sigma 公司;甲醇、乙腈、乙酸、甲酸和磷酸为色谱纯(德国 Merck 公司);超纯水(电阻率为 18.2 MΩ·cm)为自制;其他试剂均为国产分析纯。10 批罗氏海盘车样品均采自青岛近岸海域。

### 1.2 色谱条件

色谱柱: Zorbax Bonus-RP C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6

mm, 5 μm), Diamonsil C<sub>18</sub> 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相: 0.2% (v/v) 乙酸水溶液为流动相 A, 甲醇为流动相 B;梯度洗脱程序: 0 ~ 20 ~ 40 ~ 45 min, 98% A ~ 98% A ~ 90% A ~ 60% A;进样量为 20 μL;流速为 0.8 mL/min;测定波长为 260 nm。

### 1.3 样品制备

在贮藏的样品中抽取罗氏海盘车干燥躯体数个,切片、粉碎、过 40 目筛,混合均匀,制备成干粉,封装于样品瓶中,备用。准确称取 0.40 g 干粉样品,置于 25 mL 的磨口具塞玻璃离心管中,加入 10 mL 20% 甲醇水溶液,称重;超声提取 30 min,再进行称重,并用 20% 甲醇水溶液补足至原重;在 6 000 r/min 速率下离心 8 min,取上清液,过 0.45 μm 滤膜后作为供试品溶液。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的优化

核苷类化合物偏碱性,易溶于水,具有较强的极性,采用反相 C<sub>18</sub> 柱进行分离时,即使选用高比例(95%~100%)的水作流动相,核苷类化合物在反相 C<sub>18</sub> 柱上的保留仍很弱。当样品基质复杂且含多种核苷类化合物时,各核苷类化合物与基质干扰成分容易共流出,难以得到良好的分离。特别是海洋药用生物机体较中草药更为复杂,含盐量更高,给多种核苷类化合物的快速分离提出了极大的挑战。我们将一根适合碱性化合物分离的 Zorbax Bonus-RP C<sub>18</sub> 柱和一根 Diamonsil C<sub>18</sub> 柱串联,对罗氏海盘车粗提物中的核苷类化合物进行分离。提取物在以高比例水为流动相的冲洗下,先进入 Zorbax Bonus-RP C<sub>18</sub> 柱中进行首次分离;然后再进入 Diamonsil C<sub>18</sub> 柱中进行进一步的分离。该双 C<sub>18</sub> 柱分离系统使核苷类化合物进行了两次保留和分离,改善了分离效果,可成功实现复杂样品基质中多种核苷类化合物的同步快速分离。本研究采用甲醇-0.2% 乙酸水体系作为流动相,考察了在不同梯度条件下 7 种核苷化合物的保留时间和分离情况,在本文优化所得的最佳梯度条件下,提取液中所有目标化合物分离良好,完全能满足罗氏海盘车提取液中 7 种核苷类化合物定量测定的要求(见图 1)。

将 7 种核苷物质标准溶液分别采用 DAD 进行全波段扫描,以确定其最佳吸收波长。从三维色谱图中可观察到在 260 nm 处各物质的信号响应值最

大, 色谱峰最高, 且基线平稳, 与文献 [14] 的报道相符。因此选择 260 nm 为检测波长, 以提高检测灵敏度。

本文主要根据标准品的保留时间对罗氏海盘车中的核苷类成分色谱峰进行定性。实验中以适量的单个标准储备液加入罗氏海盘车 10# 样品提取液中同步分析, 通过对比各峰的吸光度, 确认吸光度明显增大的峰则为加入标准物质对应的峰, 并将样品测定色谱图与相应的已知 7 种核苷物质混合标准品色谱图进行比较印证, 以此确定 7 种核苷的色谱峰位置。

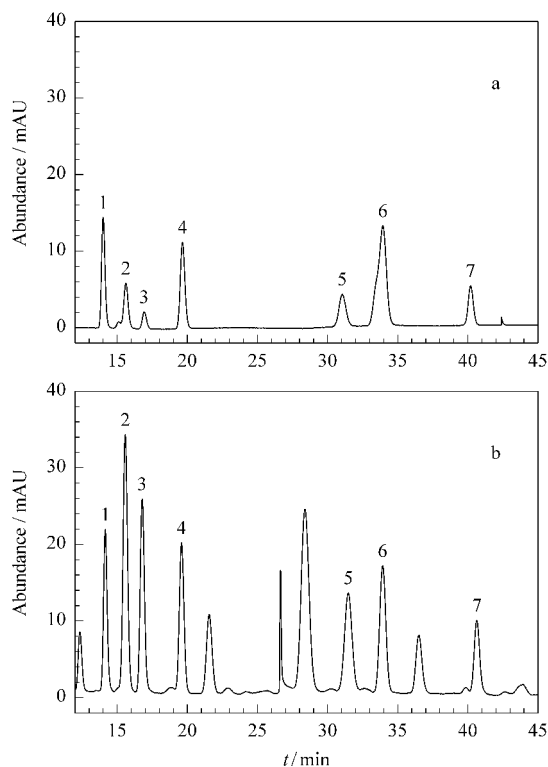


图 1 (a) 5 mg/L 混合标准溶液和 (b) 罗氏海盘车 10# 样品的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of (a) a mixed solution of 7 standards at the concentration of 5 mg/L for each standard and (b) Sample 10# of *Asterias rollestoni*

Peaks: 1. hypoxanthine; 2. uridine; 3. xanthine; 4. thymine; 5. inosine; 6. guanosine; 7. thymidine.

## 2.2 样品制备方法的优化

根据核苷类化合物极性较强, 易溶于水、醇等大极性溶剂的特性, 以水、甲醇、乙醇为提取溶剂, 采用超声波辅助提取法比较以上 3 种溶剂及其混合液的提取效果。通过考察 7 种核苷化合物的提取效率, 发现甲醇水溶液的提取效率最高。分别添加相同体积但比例不同的甲醇水提取液进行提取进行进一步的优化实验, 结果发现以 20% (v/v) 甲醇水溶液作为罗氏海盘车样品提取溶剂时, 所得到的提取物中 7 种核苷化合物的含量最高, 这与以往文献 [14] 报道吻合, 于是以此为提取溶剂。再分别向样品中添加 5、8、10、20、30 mL 的 20% (v/v) 甲醇水溶液进行实验, 发现提取溶剂从 5 mL 到 10 mL 时提取率随体积增大而增大, 但当提取溶剂从 10 mL 到 30 mL 时提取率并不随提取溶剂体积增大而变化, 可见以 10 mL 20% (v/v) 甲醇水溶液进行提取即可。此外还对超声波辅助提取时间和提取次数进行了优化。在 30 min 内, 随着超声提取时间的增加, 待测物提取率明显增加, 但超声时间超过 30 min 后, 提取率基本无变化, 因此本实验超声时间为 30 min。同时取两份样品, 分别提取一次和两次, 蒸干、定容、进样, 发现提取率没有显著差别, 因此本文采用提取一次。

## 2.3 方法的线性范围、相关系数及仪器的检出限

精确量取标准储备液配制成各核苷成分质量浓度均为 0.01、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.50、1.0、5.0、10、20、40 mg/L 的混合标准溶液, 依次进样, 以峰面积 (Y) 为纵坐标, 标准溶液的质量浓度 (X, mg/L) 为横坐标建立标准工作曲线, 其线性方程、线性范围及相关系数如表 1 所示。7 种核苷化合物在一定质量浓度范围 (次黄嘌呤、胸苷为 0.65 ~ 40 mg/L, 尿苷、黄嘌呤、肌苷为 0.80 ~ 40 mg/L, 胸腺嘧啶为 1.15 ~ 40 mg/L, 鸟苷为 0.50 ~ 40 mg/L) 内线性关系良好, 线性相关系数为 0.9992 ~ 0.9999, 完全可以满足实验要求。在 1.2 节所述的实验条件下, 将信噪比为 3 对应的质量浓度作为仪器的检出限, 7 种核苷的仪器检出限结果

表 1 7 种核苷的线性方程、线性范围、相关系数和仪器的检出限

Table 1 Regression equations, linear ranges, correlation coefficients and instrument detection limits of 7 nucleosides

Compound	Regression equation	Linear range/(mg/L)	r	Detection limit/(mg/L)
Hypoxanthine	$Y = 1682X + 1.9057$	0.65 - 40	0.9997	0.20
Uridine	$Y = 741.8X + 1.6496$	0.80 - 40	0.9993	0.25
Xanthine	$Y = 297.38X + 1.9579$	0.80 - 40	0.9992	0.25
Thymine	$Y = 1740.8X + 0.67056$	1.15 - 40	0.9998	0.35
Inosine	$Y = 928.6X - 0.8135$	0.80 - 40	0.9992	0.25
Guanosine	$Y = 847.2X + 1.1645$	0.50 - 40	0.9999	0.15
Thymidine	$Y = 1901.7X + 4.1075$	0.65 - 40	0.9999	0.20

Y: peak area; X: mass concentration, mg/L.

如表 1 所示,完全能满足实际样品检测需要。吸取 7 种核苷质量浓度均为 5 mg/L 的混合标准溶液,重复进样 7 次,记录色谱图,测定各化合物的峰面积,各化合物的相对标准偏差 (RSD) 为 0.95% ~ 2.11%,可见仪器的精密密度良好。

2.4 回收率

为进一步检验该方法的准确性,选用提取过的罗氏海盘车样品,用 20% 甲醇水溶液超声提取 30

min 并进行检测,确定检测不到核苷类化合物后将提取液滤干,再将样品残渣烘干,作为空白样品。在空白样品中分别添加高、中、低 3 个浓度级别的标准溶液进行加标回收实验,平行测定 3 次,结果见表 2。7 种核苷化合物的加标回收率为 90.00% ~ 105.00%,RSD 为 0.72% ~ 3.23%,表明本方法的准确性良好,可以满足罗氏海盘车中 7 种核苷化合物含量测定的要求。

表 2 空白样品中 7 种核苷的加标回收率 (n=3)  
Table 2 Recoveries of 7 nucleosides spiked in a blank sample (n=3)

Compound	Spiked/ (mg/g)	Found/ (mg/g)	Recovery/ %	RSD/ %	Compound	Spiked/ (mg/g)	Found/ (mg/g)	Recovery/ %	RSD/ %
Hypoxanthine	0.20	0.19	95.00	2.67	Inosine	0.20	0.21	105.00	1.29
	2.00	2.03	101.50	3.23		2.00	1.95	97.50	2.82
	30.00	30.56	101.87	0.97		30.00	28.88	96.27	2.13
Uridine	0.20	0.18	90.00	0.98	Guanosine	0.20	0.20	100.00	3.06
	2.00	1.92	96.00	1.61		2.00	1.93	96.50	1.08
	30.00	30.96	103.20	2.03		30.00	30.06	100.20	2.11
Xanthine	0.20	0.19	95.00	1.93	Thymidine	0.20	0.20	100.00	0.72
	2.00	1.87	93.50	1.88		2.00	2.09	104.50	2.07
	30.00	28.78	95.93	2.81		30.00	30.11	100.37	2.07
Thymine	0.20	0.21	105.00	2.12					
	2.00	2.02	101.00	2.84					
	30.00	29.69	98.97	0.76					

2.5 供试液的稳定性

将罗氏海盘车提取液在室温工作条件下分别放置 0、4、8、12、24、36、48 h 后进样测定。结果表明,48 h 内供试品溶液中 7 种核苷化合物的色谱峰峰面积的 RSD 为 2.42% ~ 4.23%,说明供试品溶液在 48 h 内化学性质稳定。

2.6 样品分析

在选定的最佳实验条件下分别测定了 10 批罗氏海盘车样品中 7 种核苷成分,每个样品平行测定 3 次,结果见表 3。从表 3 中可看到,在 1 号样品中

除胸腺嘧啶外其他 6 种核苷化合物均被检出;在 2 号样品中仅有尿苷、肌苷 2 个化合物被检出;在 6 号样品中有次黄嘌呤、尿苷、鸟苷 3 种化合物被检出;剩余 7 批样品中 7 种核苷目标化合物均被检出。分析发现,不同样品中核苷化合物的种类及含量存在一定的差别,这可能与罗氏海盘车的品种、产地等有关,也可能与采集的时间有关。同时发现个别样品中部分核苷较冬虫夏草中含量<sup>[5]</sup>都高数倍,值得关注,需要加强对海洋药用生物罗氏海盘车的进一步研究、开发。

表 3 不同罗氏海盘车样品中 7 种核苷的含量  
Table 3 Contents of 7 nucleosides in different *Asterias rollestoni* samples

Sample	Hypoxanthine		Uridine		Xanthine		Thymine		Inosine		Guanosine		Thymidine	
	Content/ (mg/g)	RSD/ %	Content/ (mg/g)	RSD/ %	Content/ (mg/g)	RSD/ %	Content/ (mg/g)	RSD/ %	Content/ (mg/g)	RSD/ %	Content/ (mg/g)	RSD/ %	Content/ (mg/g)	RSD/ %
1	0.07	2.18	0.97	0.79	0.17	1.88	ND	-	0.65	1.59	0.09	1.38	0.25	2.12
2	ND	-	0.20	0.99	ND	-	ND	-	0.63	1.07	ND	-	ND	-
3	0.43	1.35	1.63	1.23	4.81	0.73	0.49	1.61	0.77	0.83	0.11	2.81	0.31	2.21
4	0.24	1.65	1.19	0.89	2.73	1.41	0.35	2.81	0.58	1.06	0.23	2.74	0.25	1.80
5	0.35	0.96	1.30	0.59	3.71	0.92	0.33	1.25	0.78	0.65	0.20	1.26	0.38	1.31
6	0.01	1.17	0.10	1.31	ND	-	ND	-	ND	-	0.39	1.11	ND	-
7	0.51	2.11	3.18	1.51	3.46	1.22	0.43	0.75	2.17	0.92	0.43	1.83	1.10	0.69
8	0.36	1.55	1.40	0.56	3.67	0.68	0.44	1.03	0.76	2.09	0.28	1.54	0.37	1.91
9	0.11	1.49	0.34	1.05	0.78	1.05	0.13	1.99	0.24	1.57	0.04	1.99	0.13	2.04
10	0.29	2.23	0.87	1.00	2.27	0.74	0.33	1.94	0.64	1.09	0.32	1.82	0.38	2.17

ND: not detected.

### 3 结论

本文建立了一种采用高效液相色谱同时分离测定海洋药用生物罗氏海盘车中次黄嘌呤、尿苷、黄嘌呤、胸腺嘧啶、肌苷、鸟苷及胸苷 7 种核苷成分的方法。该方法操作简便, 具有分离度好、灵敏度高、重复性好、回收率高等优点, 适合同时定量分析罗氏海盘车中核苷类成分, 也可用于罗氏海盘车的质量控制和综合评价。

#### 参考文献:

- [1] Wang Y, Yu R M, Yang G Z, et al. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics (汪宇, 于荣敏, 杨光照, 等. 中国生化药物杂志), 2004, 25(5): 306
- [2] Xiao W Q, Lai Z Y, Dai H F, et al. Journal of Huazhong Agricultural University (肖维强, 赖志勇, 戴宏芬, 等. 华中农业大学学报), 2007, 26(5): 722
- [3] Zhang Z H, Cai B C. Marine Medicine Research and Development. Beijing: People's Medical Publishing House (张朝晖, 蔡宝昌. 海洋药物研究与开发. 北京: 人民卫生出版社), 2003: 197
- [4] Zhang D L, Chen J H, Wang H, et al. World Science and Technology: Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica (张道来, 陈军辉, 王虹, 等. 世界科学技术: 中医药现代化), 2009, 11(1): 173
- [5] Li G Q, Deng Z W, Li J, et al. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences (李国强, 邓志威, 李军, 等. 中国药学), 2004, 13(2): 81
- [6] Zhang L X, Fan X, Han L J. Natural Product Research and Development (张立新, 范晓, 韩丽君. 天然产物研究与开发), 2005, 17(1): 35
- [7] Tang H F, Yi Y H, Yao X S, et al. Pharmaceutical Care and Research (汤海峰, 易杨华, 姚新生, 等. 药学服务与研究), 2002, 2(1): 7
- [8] Xu X L, Song F X, Fan X, et al. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences (徐秀丽, 宋福行, 范晓, 等. 时珍国医国药), 2008, 19(11): 2632
- [9] Xu L L, Li L S, Yang H R, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (许丽丽, 李来生, 杨汉荣, 等. 分析实验室), 2008, 27(6): 47
- [10] Jiang W. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics (姜雯. 中国生化药物杂志), 2009, 30(3): 187
- [11] Qian Z M, Wan J B, Zhang Q W, et al. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48: 1361
- [12] Fan H, Li S P, Xiang J J, et al. Anal Chim Acta, 2006, 567: 218
- [13] Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China. Part 1. Beijing: China Medical Science and Technology Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部. 北京: 中国医药科技出版社), 2010: 106
- [14] Peng R H, Xie M Y, Wang Y X, et al. Food & Machinery (彭日煌, 谢明勇, 王远兴, 等. 食品与机械), 2005, 21(1): 61
- [15] Chen S W, Yu R P, Zhu S, et al. Food & Machinery (陈尚卫, 虞锐鹏, 朱松, 等. 食品与机械), 2006, 22(1): 107