

doi:10.3969/j.issn.1672-3678.2016.04.013

# 高聚物高效液相色谱柱分离分析嘧啶和核苷

夏明<sup>1</sup>, 黄艳<sup>1</sup>, 刘晓宁<sup>1</sup>, 魏荣卿<sup>1</sup>, 郑涛<sup>2</sup>

(1. 南京工业大学 生物与制药工程学院, 江苏 南京 211800;

2. 中国科学院 广州能源研究所, 广东 广州 510640)

**摘要:**建立了使用高聚物型色谱柱,反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定 5 种嘧啶和核苷的方法,样品经甲醇溶解,以 pH 为 4.4 的 0.01 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  缓冲盐溶液和甲醇为流动相进行梯度洗脱,流速 1.0 mL/min,温度 20 °C,紫外检测波长 251 nm。考察了流动相中不同因素对分离分析的影响,实现了 5 种嘧啶和核苷混合物的有效分离。柱效可达 37 400 N/m,优于常规的 C18-硅胶色谱柱(柱效为 21 400 N/m),为该高聚物填料在嘧啶和核苷化合物检测方面的广泛应用提供了有关依据。

**关键词:**反相高效液相色谱法;嘧啶;核苷;高聚物型色谱柱

中图分类号:TQ25; O626

文献标志码:A

文章编号:1672-3678(2016)04-0065-05

## Determination of pyrimidine and nucleosides using polymer column by HPLC

XIA Ming<sup>1</sup>, HUANG Yan<sup>1</sup>, LIU Xiaoning<sup>1</sup>, WEI Rongqing<sup>1</sup>, ZHENG Tao<sup>2</sup>

(1. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211800, China;

2. Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Using polymer column we established reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method to determine five pyrimidine and nucleosides. The influences of different factors in mobile phase on separation and analysis were studied, and the pyrimidine and nucleoside compounds were effectively separated with potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) buffer (pH 4.4) and methanol as mobile phase, flow rate at 1.0 mL/min, detection wavelength at 251 nm and column temperature at 20 °C. With column efficiency over 37 400 N/m, which is higher than common C18-silica column (plates: 21 400 N/m), our results provides basis for wide range applications for the polymer filler in nucleoside compounds detection.

**Keywords:** RP-HPLC; pyrimidine; nucleosides; polymer column

嘧啶和核苷主要存在于生物体的遗传物质核苷酸中,在生物代谢中有着重要的作用<sup>[1]</sup>。在生命科学、临床医学<sup>[2]</sup>、药物机理和食品科学<sup>[3]</sup>等领域的研究中,核苷酸是一重要的研究对象。目前,测定嘧啶和核苷的方法主要有毛细管电泳法<sup>[4-5]</sup>、荧光法<sup>[6]</sup>、反相高效液相色谱法<sup>[7]</sup>等。高效液相

色谱法是利用被分离物质在色谱柱中固定相与流动相之间的分配系数差异而实现有效分离的。目前,文献中报道较多的固定相是采用硅胶基质为填料分离、分析嘧啶和核苷<sup>[7-9]</sup>,但该基质填料不耐酸碱,易对样品造成不可逆吸附<sup>[10]</sup>、易拖尾,且嘧啶化合物(尿嘧啶、胸腺嘧啶)和核苷化合物(胸

收稿日期:2016-02-16

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2013CB733504);国家高技术研究发展计划(863 计划)(2012AA021203)

作者简介:夏明(1991—),女,安徽合肥人,研究方向:仪器分析;刘晓宁(联系人),教授,E-mail:xiaoningliu@163.com

昔、鸟苷和腺苷)均具有较强的极性,在常规反相色谱柱上保留较弱,因此嘧啶和核苷化合物在使用常规的C18-硅胶基质的分离柱分离与分析时,存在分辨率低、损伤柱效等负面因素<sup>[10]</sup>。而高聚物型色谱填料化学性质稳定,耐水、耐酸碱性好,无不可逆吸附<sup>[11-13]</sup>,且因其含有苯环结构,可对含有 $\pi$ 电子的环状结构的嘧啶和核苷化合物有望获得较强的相互作用力,而提高其保留时间,改善其分离效果。

为此,笔者欲以该高聚物型色谱填料为分离色谱柱介质对5种嘧啶和核苷(尿嘧啶、胸腺嘧啶、胸苷、鸟苷和腺苷)进行分离条件的优化,确定最佳色谱条件,以达到用较为简单的流动相洗脱条件实现较高的柱效和较好的分离效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

配备P680 HPLC泵、UVD-170U型可变波长紫外检测器,AT-330型柱温箱、8125型进样装置的高效液相色谱仪,美国Dionex公司;以聚苯乙烯二乙烯基苯(PS-DVB)为基质的高聚物色谱柱MKF-RP-HH,南京麦科菲高效分离载体有限公司;5种嘧啶和核苷标准品:尿嘧啶(uracil)、胸腺嘧啶(thymine)、胸腺嘧啶核苷(thymidine)、鸟嘌呤核苷(guanosine)、腺嘌呤核苷(adenosine),Sigma-Aldrich公司;分析纯 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,国药集团化学试剂有限公司;色谱纯甲醇,美国TEDIA公司;超纯水(自制)。

### 1.2 液相色谱检测条件

色谱柱:MKF-RP-HH(300 mm×7.8 mm, 8  $\mu\text{m}$ );流动相:A为0.01 mol/L的 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 水溶液(pH 4.4),B为甲醇;检测波长:251 nm;流速:1.0 mL/min;进样量:20  $\mu\text{L}$ ;柱温:20  $^\circ\text{C}$ 。样品用甲醇溶解后用0.45  $\mu\text{m}$ 的尼龙膜过滤。

### 1.3 标准溶液的配制

#### 1.3.1 嘧啶和核苷高效液相色谱标准品溶液

精密称取5种嘧啶和核苷标准品各5.0 mg分别置于5个10 mL的容量瓶中,以甲醇溶解并定容,得到5个浓度均为0.50 mg/mL的嘧啶和核苷的标准品溶液。

#### 1.3.2 核苷紫外全波长扫描标准品溶液

精密量取嘧啶和核苷高效液相色谱标准品溶液1 mL,用甲醇稀释为原浓度的1/5,得到质量浓度为0.10 mg/mL的嘧啶和核苷的标准品溶液。

#### 1.3.3 流动相A的配制

精密称取0.68 g的 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,用水溶解并定容至500 mL,配制成浓度为0.01 mol/L缓冲盐溶液,测得其pH为4.4。

## 2 结果与讨论

### 2.1 5种嘧啶和核苷标准品紫外全波长扫描结果及波长的优化

取质量浓度均为0.10 mg/mL的5种嘧啶和核苷标准品溶液进行紫外全波长扫描,结果见图1。

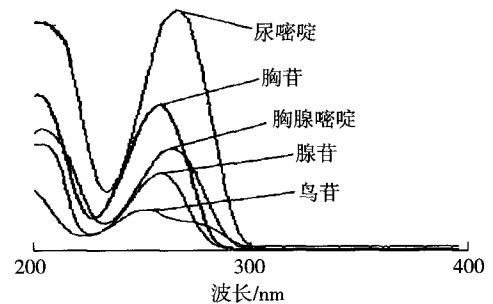


图1 5种嘧啶和核苷标准品的全波长扫描图谱  
Fig. 1 Five standards of pyrimidine and nucleosides and the sample full spectrum wavelength

由图1可知:在相同检测浓度(0.10 mg/mL)下,5种嘧啶和核苷标准品的最大紫外吸收波长在251~267 nm范围内,与文献[14]报道的各嘧啶和核苷的最大波长一致;但在该范围内,5种嘧啶和核苷的灵敏度相差较大,即由高到低依次为尿嘧啶、胸苷、胸腺嘧啶、腺苷和鸟苷。此说明,鸟苷相较于其他嘧啶和核苷其灵敏度较差,而不易被检测到。为了兼顾鸟苷的检测灵敏度,本实验采用鸟苷的最大紫外吸收251 nm为混合样品的分析检测波长。虽然在文献[1-3,14-15]中采用较多的2个波长为254 nm和260 nm,但在这两个波长条件下,鸟苷的灵敏度都偏低,都不利于含有鸟苷的混合物的分离检测。在文献[9]中,鸟苷的浓度为尿嘧啶浓度的10倍。虽然通过增大鸟苷浓度可弥补鸟苷吸光度弱的劣势,但在许多含嘧啶和核苷的天然化合物中,鸟苷的含量并不大,甚至于是微量的,且由图1可知,鸟苷的最大检测波长为251 nm,故本文采用251 nm作为检测波长取代文献的254 nm,使其不因检测波长不适而影响鸟苷的灵敏度。下文首先改变流动相为甲醇,并优化流动相中甲醇含量对5种嘧啶和核苷分离的影响。

### 2.2 流动相中甲醇含量对嘧啶和核苷分离的影响

考察甲醇含量(梯度洗脱系列I)对5种嘧啶和核苷分离的影响,结果见图2。由图2中条件1和2结果可知:这两个条件下的分离度都很差,如果降低甲醇浓度,出峰时间略有后移。降低起始甲醇浓

度(条件3),即在5~6 min前,降低甲醇浓度,与条件1和2相比,出峰时间推迟了5~6 min,且分离度有所改善,这说明降低洗脱液中有机相的浓度,则出峰时间推迟,且低于40%的有机相浓度能改善分离度,而有机相浓度高于40%则影响不大。

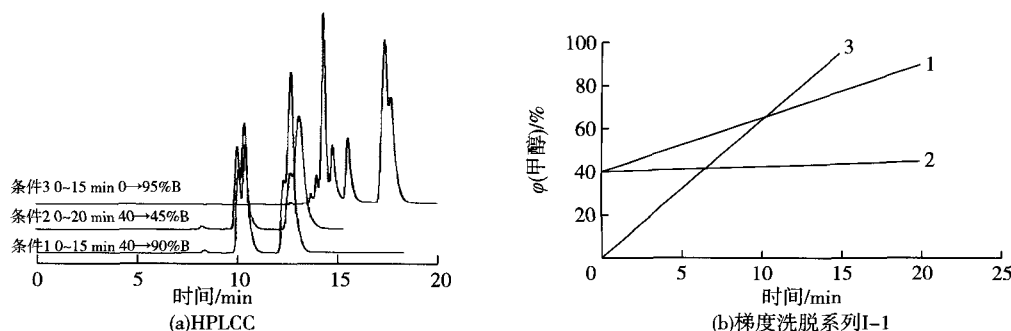


图2 5种嘧啶和核苷混合样品的高效液相色谱图

Fig. 2 Five mixed sample of pyrimidine and nucleosides by HPLC and gradient elution conditions I-1

进一步细化研究低浓度有机相的影响,结果见图3和表2。综合图3和表2分析可知:进一步降低甲醇浓度,分离度、柱效显著提高(条件3与条件4);再降低甲醇浓度(条件5),峰1、2、3出峰时间相差不多,但峰4、5出峰时间有所延迟,峰1柱效变化不大,但其他各峰柱效下降(特别是峰2下降明

显)。由条件6的分离结果可知:继续降低甲醇浓度,除峰1柱效有所提高,但其他各峰柱效仍继续降低。如此,继续降低甲醇浓度无益,条件4较好。接着,在条件4的基础上提高甲醇起点浓度(条件7)此时发现,出峰时间比条件4的情况有所提前,但分离度和柱效仍不及条件4。

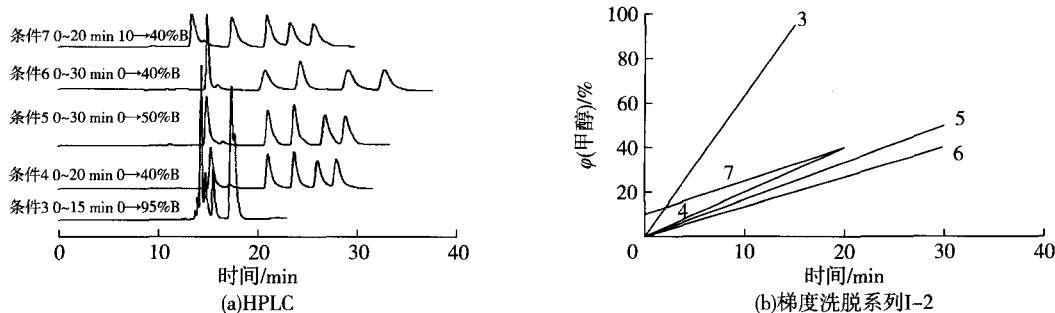


图3 嘧啶和核苷混合样品的高效液相色谱图

Fig. 3 Chromatographic of HPLC and gradient elution conditions of pyrimidine and nucleosides

表2 嘧啶和核苷混合样品的色谱峰数据

Table 2 Chromatographic peak data of pyrimidine and nucleosides

峰号	出峰时间/min					分离度					柱效/m				
	条件3	条件4	条件5	条件6	条件7	条件3	条件4	条件5	条件6	条件7	条件3	条件4	条件5	条件6	条件7
1	14.0	15.4	14.9	15.0	13.5	1.2	7.4	4.7	4.0	4.2	-	26 420	27 477	63 630	13 650
2	14.3	21.1	21.1	21.0	17.5	1.5	3.1	3.0	2.6	3.3	-	31 563	14 667	10 423	13 867
3	14.8	23.8	23.7	24.3	21.1	1.6	2.6	3.1	3.3	2.0	-	44 933	40 723	22 550	24 583
4	15.6	26.1	26.9	29.1	23.4	1.9	1.8	1.7	2.2	1.7	-	34 300	28 567	17 043	20 010
5	17.4	28.0	28.9	32.8	26.7	-	-	-	-	-	-	35 010	27 210	20 253	19 803

综上所述,条件4的分离结果较好,分离度高、柱效高,各物质的分离度均大于1.8,且平均柱效可达35 000 N/m,比文献[9]报道的效果更优。但从峰型上看,峰型均有一定程度的拖尾,且1号峰的峰

旁有个小包杂质(记为“1'”)尚未达到有效分离(分离度达到1.5及以上称为有效分离)。因此,需进一步对分离条件进行优化(梯度洗脱系列II),其优化条件及结果见图4和表3。

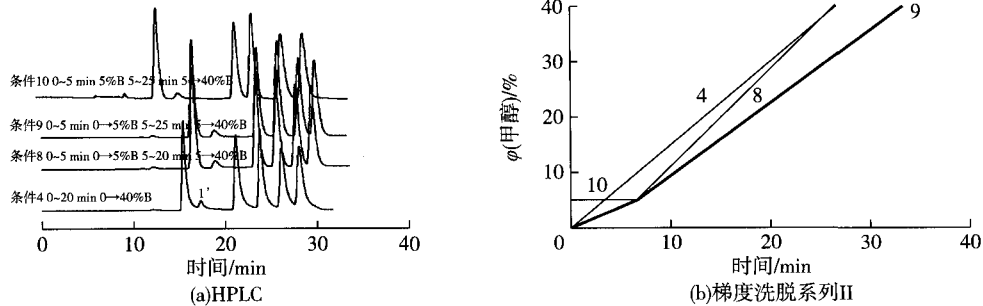


图4 嘧啶和核苷混合样品的高效液相色谱图

Fig. 4 The Chromatographic of HPLC and gradient elution conditions of pyrimidine and nucleosides

由图4和表3可知:在条件4的基础上,降低甲醇浓度且改进洗脱方式(条件8),分离度相当,但柱效进一步上升。与条件8相比,降低5 min以后的甲醇浓度(条件9),虽峰1、2和3的出峰时间相差不大,且峰4和5略有延迟,但分离度及柱效皆升高。提高0~5 min时的甲醇浓度(条件10),峰1出峰时间提前,且峰2、3、4和5略有延迟,但柱效降低(4、5号峰分别降低32%、24%)。综合图3(表2)和图4(表3)结果可知,经条件9分段洗脱后,5种核苷混合

物分离度的平均值大于2.78,即均已超过基线分离所要求的1.5;平均柱效大于37 400 N/m,比使用常规硅胶色谱柱的柱效(21 400 N/m)<sup>[9]</sup>约高出58%。与文献[9]方法比较可知,本文流动相组成中不含盐类物质、洗脱梯度简单、且灵敏度高,可用于今后嘧啶和核苷等碱性化合物的分离与分析。此外,本实验采用的高聚物型色谱柱材料具有耐酸碱等结构及性能稳定的特点<sup>[11-13]</sup>,有益于检测结果的可重复性,分离嘧啶和核苷等碱性物质优于硅胶型色谱填料。

表3 嘧啶和核苷混合样品的色谱峰数据

Table 3 Chromatographic peak data of pyrimidine and nucleosides

峰号	出峰时间/min				分离度				柱效/m				对称性			
	条件4	条件8	条件9	条件10	条件4	条件8	条件9	条件10	条件4	条件8	条件9	条件10	条件4	条件8	条件9	条件10
1	15.4	16.45	16.45	14.50	2.6	2.45	2.54	2.36	26 420	19 890	20 930	13 243	2.09	1.79	1.75	1.76
1'	17.3	18.91	18.60	17.13	4.8	4.39	4.69	5.79	8 447	14 180	15 680	8 930	1.61	2.32	1.57	1.52
2	21.1	23.36	23.52	24.00	3.1	2.49	2.55	1.98	31 563	38 280	38 577	27 563	2.51	1.91	1.90	1.89
3	23.8	25.55	25.77	26.09	2.6	2.25	2.42	3.03	44 933	43 320	43 640	32 653	2.21	1.88	1.73	1.90
4	26.1	27.72	28.08	29.64	1.8	1.61	1.72	2.02	34 300	38 363	41 363	27 797	1.90	1.82	1.67	1.76
5	28.0	29.42	29.85	32.26	—	—	—	—	35 010	40 273	42 867	32 513	1.99	1.76	1.81	1.78

### 2.3 5种嘧啶和核苷的定性分析

采用条件9对5种嘧啶和核苷标准品的混合样和质量浓度均为0.05 mg/mL的5种嘧啶和核苷高效液相色谱标准品进行梯度洗脱,定性分析5种嘧啶和核苷混合物,结果见图5。

由图5可知,在相同的色谱条件下,可推断出混合样品中1至5号峰物质依次为尿嘧啶、鸟苷、胸腺嘧啶、胸苷和腺苷。此外,1号峰旁的小包(1')

与腺苷标准品中第一个小峰的出峰时间一致,说明混合样中的1'小峰实为腺苷标准品的杂质。

### 3 结论

采用化学结构稳定、耐酸碱的高聚物型色谱柱MKF-RP-HH(300 mm×7.8 mm,8 μm)对5种混合嘧啶和核苷进行了分离条件的探索。经优化后得到最佳的色谱条件:流动相为KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>水溶液(A)和甲

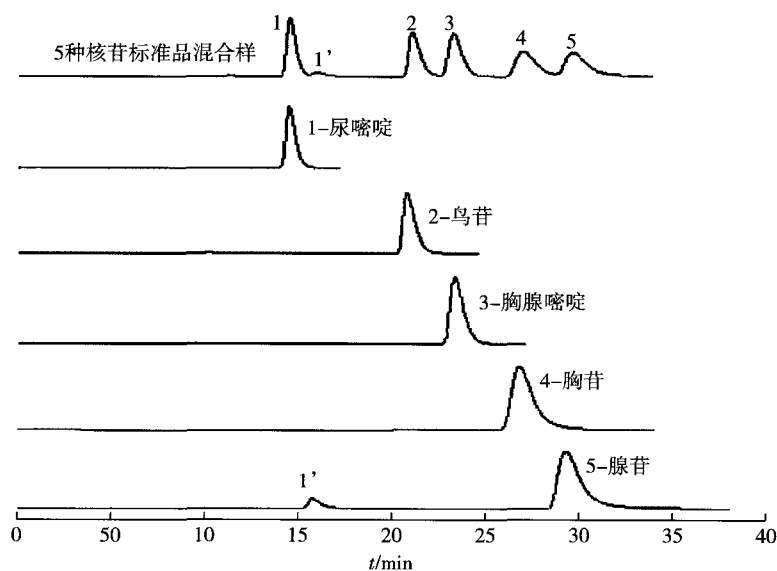


图5 5种嘧啶和核苷标准品与其混合样的高效液相色谱对比图

Fig. 5 Comparison of five pyrimidine and nucleoside samples and their mixed sample of HPLC

醇(B),梯度洗脱(0~5 min 0~5%B;5~25 min 5%~40%B);流速为1.0 mL/min;柱温为20℃;检测波长为251 nm。经最佳梯度条件洗脱后,5种嘧啶和核苷实现了有效分离,峰型良好且柱效均达到37 400 N/m,较文献中柱效高出约58%,灵敏度高,且流动相洗脱条件也较为简单,说明高聚物型色谱填料分离效能高,更有利于嘧啶和核苷的分离与分析。

#### 参考文献:

- [ 1 ] GANDHI V, SAMUELS D C. Correlated tissue expression of genes of cytoplasmic and mitochondrial nucleotide metabolisms in normal tissues is disrupted in transformed tissue [ J ]. *Nucleos Nucleot Nucl Acid*, 2012, 31(1/2/3): 112-119.
- [ 2 ] WU H C, CHANG C H, TSAI R Y. Significant association of methylenetetrahydrofolate reductase single nucleotide polymorphisms with prostate cancer susceptibility in Taiwan [ J ]. *Anticancer Res*, 2010, 30(9): 3573-3577.
- [ 3 ] LIU R, JI J, WANG L. Characterisation of nucleosides and nucleobases in *Mactra veneriformis* by high performance liquid chromatography coupled with diode array detector-mass spectrometry (HPLC-DAD-MS) [ J ]. *Food Chem*, 2012, 135(2): 548-554.
- [ 4 ] SIAHANIDOU T, MANDYLA H, PAPANOTIRIOU I, et al. Serum lipids in preterm infants fed a formula supplemented with nucleotides [ J ]. *J Pediatric Gastroenterol Nutr*, 2004, 38(1): 56-60.
- [ 5 ] CARVER J D. Dietary nucleotides; effects on the immune and gastrointestinal systems [ J ]. *Acta Paediatr*, 1999, 88(430): 83-88.
- [ 6 ] 郭秋平,羊小海,王柯敏,等.基于聚合酶反应和发夹型核酸适体的蛋白质荧光检测新方法 [ J ]. *高等学校化学学报*, 2008, 29(1): 37-40.
- [ 7 ] KOCHANOWSKI N, BLANCHARD F, CACAN R. Intracellular nucleotide and nucleotide sugar contents of cultured CHO cells determined by a fast, sensitive, and high-resolution ion-pair RP-HPLC [ J ]. *Anal Biochem*, 2006, 348(2): 243-251.
- [ 8 ] 索菲亚,黄罗冬,虞泓,等.新疆细虫草菌核的膨大弯颈霉菌株 SFYT002 核苷类成分分析 [ J ]. *药物分析杂志*, 2014, 34(8): 1407-1411.
- [ 9 ] 肖新月,李远科,张萍,等.宁心宝胶囊中5种核苷类成分的RP-HPLC定量分析 [ J ]. *药物分析杂志*, 2007, 27(10): 1592-1597.
- [ 10 ] 张婷婷,曾明飞,金燕,等.反相高效液相色谱-串联质谱法测定母乳及奶粉中核苷和核苷酸的含量 [ J ]. *分析化学研究报告*, 2014(4): 585-591.
- [ 11 ] YANG Y B, VERZELE M. New water-compatible modified polystyrene as a stationary phase for high-performance liquid chromatography: characterization and application [ J ]. *J Chromatogr A*, 1987, 387: 197-205.
- [ 12 ] 魏荣卿,杨洋,张婷婷,等.国产氢型阳离子交换(磺酸型)HPLC色谱柱在利巴韦林注射液分析中的应用-I [ J ]. *离子交换与吸附*, 2007, 23(2): 119-128.
- [ 13 ] 魏荣卿,张婷婷,邵勇军,等.聚合物基质高效液相色谱填料在白细胞介素<sub>2</sub>分离中的应用 [ J ]. *分析化学*, 2007(4): 505-510.
- [ 14 ] 张科卫,吴皓. HPLC - PDA 测定小半夏汤中的核苷类成分 [ J ]. *中国药学杂志*, 2008, 43(23): 1826-1828.
- [ 15 ] 顾宇翔,王尊生,李素霞,等. HPLC 分析虫草发酵制品中多种核苷及碱基 [ J ]. *药物分析杂志*, 2006, 26(7): 953-957.

(责任编辑 荀志金)