

HILIC-ESI-TOF/MS 测定海龙中的多种成分及其特征指纹图谱研究

赵恒强^{1,2}, 东莎莎¹, 崔清华³, 王小如², 陈军辉², 苑金鹏¹, 耿岩玲¹, 王晓^{1*}, 刘建华¹

1. 山东省科学院 中药过程控制研究中心, 山东省大型精密分析仪器应用技术重点实验室, 山东省分析测试中心, 山东 济南 250014
2. 国家海洋局第一海洋研究所 青岛市现代分析技术与中药标准化重点实验室, 山东 青岛 266061
3. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

摘要: 目的 建立亲水色谱-电喷雾飞行时间质谱 (HILIC-ESI-TOF/MS) 联用技术用于海洋中药海龙多种化学成分快速鉴定及其特征指纹图谱的研究方法。方法 以海龙水提物为研究对象, 采用加速溶剂萃取法 (ASE) 对海龙样品进行提取制备, 采用 HILIC 法对海龙水提物进行快速分离, ESI-TOF/MS 法对海龙水提物中多种化合物进行鉴别, 在对已知活性成分进行定量测定的基础上, 建立海龙的 HILIC 特征指纹图谱。结果 应用 HILIC-ESI-TOF/MS 鉴定出海龙水提物中的 10 种成分, 对其中 7 种核苷类成分进行了定量测定; 在对多批次海龙药材分析的基础上, 建立了其 HILIC 特征指纹图谱, 结合相似度分析实现了海龙的质量评价及其与不同海洋药物的正确区分。结论 本研究为海龙真伪鉴别研究提供了一种新方法。

关键词: 亲水色谱; 电喷雾飞行时间质谱; 加速溶剂萃取法; 尖海龙; 特征指纹图谱

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)13-1836-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.13.026

Identification of active components in *Syngnathus acus* by HILIC-ESI-TOF/MS and study on their specific fingerprint chromatograms

ZHAO Heng-qiang^{1,2}, DONG Sha-sha¹, CUI Qing-hua³, WANG Xiao-ru², CHEN Jun-hui², YUAN Jin-peng¹, GENG Yan-ling¹, WANG Xiao¹, LIU Jian-hua¹

1. Key Laboratory for Applied Technology of Sophisticated Analytical Instruments of Shandong Province, Shandong Analysis and Test Center, Process Control Research Center of Traditional Chinese Medicine of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China
2. Qingdao Key Laboratory of Analytical Technology Development and Standardization of Chinese Medicines, First Institute Oceanography of State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China
3. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Objective To develop a new method based on hydrophilic interaction chromatography-electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry (HILIC-DAD-ESI-TOF/MS) for the rapid identification of the active components in *Syngnathus acus* and the development of their specific fingerprint chromatograms. **Methods** Samples were extracted by accelerated solvent extraction, and the extraction conditions were optimized. The developed HILIC-DAD-ESI-TOF/MS method was used to identify the components in water extract from *S. acus*, and a chromatographic fingerprint based on HILIC analysis was established. **Results** Ten compounds in *S. acus* extract could be primarily identified by HILIC-DAD-ESI-TOF/MS on-line detection, in which seven nucleosides were determined. The HPLC characteristic fingerprint was established on the basis of analysis on the multi batches of *S. acus*, which could be used to evaluate the quality of *S. acus* combined with similarity calculation. **Conclusion** This method is simple and rapid, and is a powerful tool for the identification of *S. acus*.

Key words: hydrophilic interaction chromatography; electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry; accelerated solvent extraction; *Syngnathus acus* Linnaeus; characteristic fingerprint chromatograms

收稿日期: 2012-10-25

基金项目: 国家重大新药创制项目 (2011ZX09201-201-26); 山东省科技攻关计划项目 (2011GSF11908); 山东省科学院科技发展基金项目 (科基合字[2012]第 15 号); 山东省大型分析仪器升级改造项目 (2012SJJZ01)

作者简介: 赵恒强 (1980—), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事中药分析与质量控制研究, Tel: (0531)82605319 E-mail:hqzhao2007@163.com

*通信作者 王晓 Tel: (0531)82605319 E-mail:wangx@keylab.net

海龙为传统名贵中药材，具有温肾壮阳、散结消肿、镇静安神之功效^[1]。《中国药典》2010 年版中规定海龙是海龙科动物刁海龙 *Solenognathus hardwickii* (Gray)、拟海龙 *S. biaculeatus* (Bloch) 或尖海龙 *Syngnathus acus* Linnaeus 的干燥体^[2]。现代研究表明，海龙所含化学成分主要有甾体、脂肪酸、核酸类、蛋白质、氨基酸、微量元素等^[3-4]，具有性激素样、延缓衰老、抗肿瘤、提高机体免疫力等作用^[5]。海龙药材应用广泛，需求量大，但由于资源有限，价格昂贵，因此市场上伪品、混淆品多见。此外，海龙为动物类中药，易虫蛀、霉变。《中国药典》2010 年版仅从外观性状方面对海龙药材进行描述^[2]，目前，尚无高效、快速、专属性强的真伪鉴别和质量控制方法。因此，开展海龙药材的真伪鉴别和质量控制研究具有重要意义。

有关海龙活性成分分析方法及指纹图谱的研究已有相关报道^[6-9]。但是海龙药材化学成分复杂，单一的分析方法难以全面反映海龙药材的药效、活性成分。近年来，国内外研究表明，海龙水提取物具有抗衰老、抗疲劳作用^[10-12]。而有关海龙水溶性活性成分的快速分析、鉴别并应用于其质量控制的研究未见报道。此外，水溶性成分在反相柱上难以保留，有关水溶性成分的分析是色谱分离的难点。

亲水色谱法采用极性材料作为固定相，特别适合强极性和亲水性化合物的分离^[13]。另外，流动相中有机相比例比反相柱高，与质谱联用离子化效率高。电喷雾飞行时间质谱技术能提供化合物的精确相对分子质量信息，在没有对照品的情况下，可以推断出分子式，用于化学成分的快速鉴别^[14]。因此，亲水色谱-电喷雾飞行时间质谱联用技术在中药复杂体系中强极性活性成分的快速分析、鉴别研究中显示出明显的优势，且能够快速鉴别以往难以实现的痕量极性活性物质。

基于此，本研究发展了亲水色谱-电喷雾飞行时间质谱联用技术快速分析鉴别尖海龙药材水提取物中多种活性成分的方法，在对已知活性成分定量测定的基础上构建海龙药材的亲水色谱特征指纹图谱。对于快速探明海龙药材水溶性活性成分，开展其质量控制和真伪鉴别具有重要意义。

1 仪器与材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪，配有四元泵，DAD 检测器，自动进样器等（美国 Agilent 公司）；G6520 型飞行时间质谱仪，配有电喷雾离子源（美国 Agilent 公司）；ASE100 加速溶剂萃取仪，配带 34 mL 萃取池（美国 DIONEX 公司）；R201 型旋转蒸发仪（上海申生科技有限公司）；FA1104 型电子天平（上海精天电子仪器厂）；Milli-Q（18.2 MΩ）超纯水处理系统（美国 Millipore 公司）。

甲醇（色谱纯）购于美国 Tedia 公司，乙腈（色谱纯）购于德国 Merck 公司，甲酸（色谱纯）购于德国 Riedel 公司，醋酸铵（优级纯）购于美国 Sigma 公司，其余试剂均为分析纯，实验用水为 Milli-Q 超纯水（18.2 MΩ）；胸腺嘧啶、尿嘧啶、尿苷、腺苷、次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟嘌呤对照品均购于美国 Sigma 公司。本实验所采用的 13 批海龙药材（表 1）购于山东青岛、济南的不同药店，经中国海洋大学水产学院曾晓起教授鉴定为尖海龙 *Syngnathus acus* Linnaeus。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别准确称取 5.0 mg 胸腺嘧啶、尿嘧啶、尿苷、腺苷、次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟嘌呤对照品，置 50 mL 量瓶中，用 20% 甲醇定容至刻度，配成各对照品为 100 mg/L 的对照品储存液。分别准确称取 2.5 mg 黄嘌呤和鸟嘌呤对照品，置 50 mL 量瓶中，用 2% 乙酸水溶液溶解并定容至刻度，配成质量浓度为 50

表 1 海龙样品来源

Table 1 Resources of samples

编号	样品	来源	采样时间	编号	样品	来源	采样时间
1	尖海龙	山东青岛	2011-04-10	8	尖海龙	山东济南	2011-09-23
2	尖海龙	山东青岛	2011-04-10	9	尖海龙	山东济南	2011-09-24
3	尖海龙	山东青岛	2011-04-25	10	尖海龙	山东济南	2011-09-24
4	尖海龙	山东青岛	2011-08-06	11	小海马	山东青岛	2011-04-10
5	尖海龙	山东青岛	2011-08-21	12	小海狗	山东青岛	2011-04-25
6	尖海龙	山东青岛	2011-08-21	13	海燕	山东青岛	2011-04-25
7	尖海龙	山东济南	2011-09-04				

mg/L 的黄嘌呤和鸟嘌呤对照品储存液。分别吸取适量的上述对照品储存溶液,置于同一量瓶中,用 90% 乙腈稀释至需求的浓度。

2.2 样品溶液的制备

精密称取粉碎并过 20~40 目筛的海龙样品 0.5 g,置于萃取池中,萃取池底部提前加入过滤膜,将萃取池放在萃取池固定装置上,关闭萃取池门。以纯水为提取溶剂,设定加速溶剂萃取法 (ASE) 参数 (包括提取时间、温度、循环次数等),启动加速溶剂萃取仪,提取完成后自动停止,提取液浓缩至干,加入 90% 乙腈溶液 20 mL,超声 2 min,过 0.22 μm 微孔滤膜后作为供试品溶液。

2.3 亲水色谱-电喷雾飞行时间质谱条件

Waters Xbridge Amide 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 3.5 μm),流动相为 20 mmol/L 醋酸铵-0.2% 甲酸水溶液 (A) 和乙腈 (B),体积流量 0.8 mL/min,室温 (20~25 °C),检测波长为 260 nm,进样量为 10 μL,梯度洗脱程序为 0~15 min, 95% B; 15~20 min, 90% B; 20~30 min, 80% B; 30~50 min, 60% B; 50~65 min, 50% B。进入高分辨飞行时间质谱的流动相采用三通分流至 0.4 mL/min。电喷雾正离子模式;全扫描范围 *m/z* 100~500;毛细管电压: 5.0 kV;喷雾气压: 45 psi;干燥气体积流量: 11.0 L/min;干燥气温度: 350 °C;裂解电压: 100 V;锥孔电压: 60 V。在优化的色谱、质谱条件下,尖海龙水溶性成分的 HILIC 图及总离子流图 (TIC) 如图 1 所示。

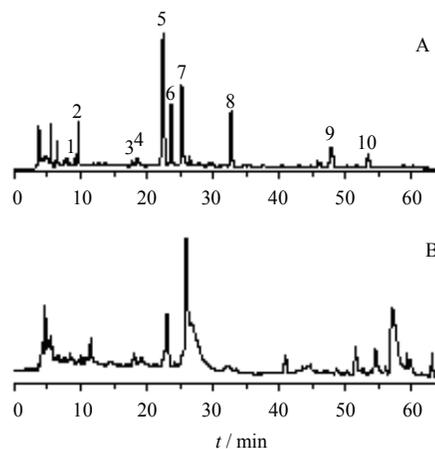


图 1 尖海龙 HILIC 图 (A) 和 TIC 图 (B)

Fig. 1 HILIC (A) and TIC (B) chromatograms of *S. acus*

2.4 方法学考察

2.4.1 标准曲线及检测限 按“2.3”项色谱条件进样分析,测定各不同质量浓度的混合对照品溶液中各核苷类化合物的峰面积,以各核苷类化合物质量浓度 (μg/mL) 为横坐标 (X),以峰面积为纵坐标 (Y),绘制标准曲线,并求得回归方程 (表 2)。将对照品溶液稀释至最低浓度进样,以 3 倍信噪比计算各核苷成分的检测限,以 10 倍信噪比计算定量限,结果见表 2。

2.4.2 精密度、重复性、稳定性和加样回收率 在优化的色谱条件下,以各核苷类化合物色谱峰面积为考察指标,对 HILIC-DAD 方法的精密度、重复性、

表 2 7 种核苷 HPLC 的回归方程、线性范围及检测限、定量限

Table 2 HPLC analysis on regression equation, linear range, detectability, and limit of quantitation of seven kinds of nucleoside

编号	化合物	回归方程	线性范围 / (μg·mL ⁻¹)	相关系数 (r ²)	检测限 / (μg·mL ⁻¹)	定量限 / (μg·mL ⁻¹)
1	胸腺嘧啶	Y=75.153X+11.333 0	0.05~50	0.999 6	0.010	0.033
2	尿嘧啶	Y=86.212X+27.396 0	0.05~50	0.999 1	0.010	0.033
3	尿苷	Y=122.19X-6.718 4	0.10~50	0.999 9	0.016	0.053
4	腺苷	Y=62.041X+5.662 7	0.10~50	0.999 7	0.024	0.079
5	次黄嘌呤	Y=68.821X+2.477 7	0.10~50	0.999 9	0.023	0.077
6	黄嘌呤	Y=71.781X+0.893 6	0.10~25	0.999 9	0.013	0.043
7	鸟嘌呤	Y=72.766X+5.443 6	0.10~25	0.999 9	0.021	0.070

稳定性和加标回收率分别进行了考察。结果表明,精密度实验各核苷峰面积的 RSD 值均低于 3.20%;重复性实验各核苷峰面积的 RSD 值在 4.57% 以下;24 h 内稳定性实验各核苷峰面积的 RSD 值均低于 4.83%;加样回收率试验各核苷回收率的 RSD 值在

92.1%~103.5%,该方法具有较好的精密度、重现性和稳定性,能满足定量测定及指纹图谱的分析要求。

2.5 样品测定

采用“2.2”项供试品溶液制备方法制备样品溶液,采用“2.3”项色谱条件分别进样分析,获得 10

批尖海龙样品中 7 种核苷类化合物色谱峰面积, 将测得结果带入线性回归方程, 计算海龙样品中各核苷类化合物的量 (表 3)。

从表 3 可以看出, 海龙中嘌呤和嘧啶类化合物量相对较高, 核苷类化合物量相对较低。10 批尖海龙样品中 7 种核苷类化合物总量在 791.12~1 580.74 $\mu\text{g/g}$, 7 种核苷类化合物平均值为 1 238.05 $\mu\text{g/g}$ 。

2.6 ESI-TOF/MS 鉴别

在优化的亲水色谱条件下, 采用 HILIC-ESI-TOF/MS 技术对色谱图中的主要组分进行鉴别, 根据获得的化合物的精确相对分子质量信息, DAD 检测器获得的紫外吸收信息, 并参考相关文献数据^[15]及中国科学院上海有机化学研究所化学专业数据库, 对各化合物进行鉴别, 结果见表 4。

表 3 尖海龙中 7 种核苷类化合物的量 ($n = 3$)

Table 3 Determination of seven nucleosides and nucleobases in *S. acus* ($n = 3$)

编号	质量分数 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)							总计
	胸腺嘧啶	尿嘧啶	尿苷	腺苷	次黄嘌呤	黄嘌呤	鸟嘌呤	
1	38.55	111.25	9.99	4.73	626.28	312.96	253.76	1 357.52
2	45.62	96.81	14.17	17.26	498.14	282.33	459.14	1 413.47
3	57.54	127.87	14.63	16.43	405.79	348.66	273.33	1 244.25
4	54.31	199.23	8.39	11.95	371.01	433.64	432.59	1 511.12
5	45.92	155.56	14.00	5.89	185.58	247.63	235.00	889.58
6	145.37	186.25	12.37	10.24	387.35	295.53	246.18	1 283.29
7	53.81	152.51	7.38	4.59	172.75	168.62	231.46	791.12
8	162.63	205.14	4.29	2.37	428.69	368.25	409.37	1 580.74
9	52.59	107.38	15.72	15.33	365.23	315.26	340.27	1 211.78
10	57.22	115.79	14.61	14.21	384.73	193.58	317.48	1 097.62

表 4 尖海龙提取物中 10 个化合物的 HILIC-ESI-TOF/MS 测量结果

Table 4 HILIC-ESI-TOF/MS results of 10 compounds in extract of *S. acus*

峰号	保留时间 / min	化合物	选择离子	化学式	理论值 m/z	实验值 m/z	误差 $\times 10^{-6}$	最大吸收波长 / nm
1	9.13	胸腺嘧啶	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_5\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_2$	127.050 2	127.050 0	1.57	260
2	9.66	尿嘧啶	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{O}_2$	113.034 6	113.034 8	1.77	260
3	17.82	尿苷	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_6$	245.076 8	245.076 5	-1.22	260
			$[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4+\text{H}]^+$	$\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{O}_2$	113.034 6	113.034 9	2.65	
4	18.63	腺苷	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_4$	268.104 0	268.103 6	-1.49	260
				$\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_5$	136.061 8	136.061 6	-1.47	
5	22.44	次黄嘌呤	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_4\text{O}$	137.045 8	137.046 1	2.19	255
			$[2\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_8\text{O}_2$	273.084 3	273.084 6	1.10	
6	23.68	黄嘌呤	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_4\text{O}_2$	153.040 7	153.040 9	1.31	270
7	25.25	未知	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_2\text{O}$	114.078 8	114.078 5	-2.63	
8	32.72	鸟嘌呤	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_5\text{O}$	152.056 7	152.056 9	1.32	265
			$[2\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_{10}\text{O}_2$	303.106 1	303.106 4	0.99	
9	47.85	异亮氨酸或亮氨酸	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{NO}_2$	132.101 9	132.101 6	-2.27	
10	53.40	脯氨酸	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}_2$	116.070 6	116.070 3	-2.58	
			$[\text{M}+\text{Na}]^+$		138.052 6	138.052 2	-2.90	

2.7 指纹图谱的建立

采用“2.2”项供试品处理方法对 10 批尖海龙样品进行处理,按“2.3”项色谱条件进样分析,建立尖海龙药材的亲水色谱特征指纹图谱(图 2)。在建立的分析系统下,尖海龙水提物亲水色谱图主要有 10 个色谱峰(图 1),这 10 个色谱峰即构成尖海龙的特征图谱,也是鉴别真伪、评价尖海龙质量的主要指标。从图 2 可以看出,不同海龙样品指纹图谱的各特征峰量存在明显差别,但其整体轮廓特征一致。

为了探讨尖海龙指纹图谱辨别海龙真伪的可行性,采用本文建立的 HILIC 方法对不同海洋药物样品进行分析,得到各样品的 HILIC 指纹图谱,结果见图 3。

2.8 相似度评价

通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(《中国药典》2004 A 版)对 10 批尖海龙药材及不同的海洋药物指纹图谱进行相似度分析。首先将色谱工作站数据导入中药指纹图谱相似度计算软件,选定上述 10 个共有峰进行谱峰匹配,采用共有模式作为对照指纹图谱,用于 10 批海龙药材相似度评价,见表 5。

3 讨论

3.1 提取条件优化

ASE 是 1995 年提出的一种从固体和半固体基

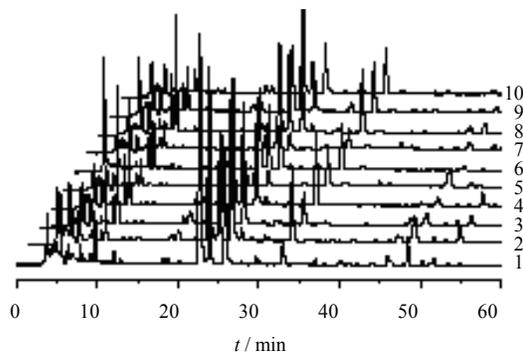


图 2 尖海龙 HILIC 指纹图谱

Fig. 2 HILIC fingerprints of *S. acus*

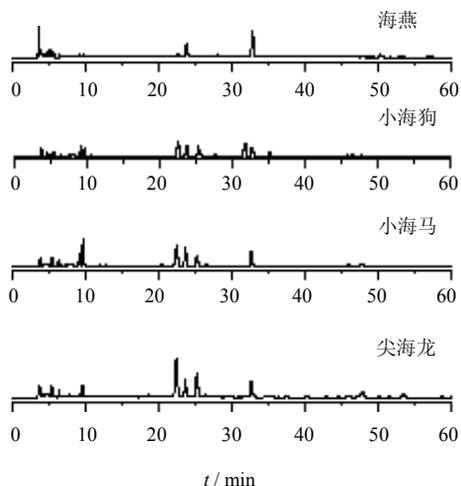


图 3 不同海洋药物 HILIC 指纹图谱

Fig. 3 HILIC fingerprints of different marine drugs

表 5 相似度评价结果

Table 5 Similarity evaluation

编号	样品	相似度	编号	样品	相似度
1	尖海龙	0.992	8	尖海龙	0.964
2	尖海龙	0.993	9	尖海龙	0.982
3	尖海龙	0.992	10	尖海龙	0.993
4	尖海龙	0.991	11	小海马	0.824
5	尖海龙	0.975	12	小海狗	0.671
6	尖海龙	0.985	13	海燕	0.551
7	尖海龙	0.965			

质中提取分析物的新的样品萃取技术^[16]。其原理是在密闭容器内,在提高温度(50~200 °C)和压力(6.89~20.7 MPa)的条件下,用溶剂萃取固体或半固体样品的新颖样品前处理方法。具有耗时少、消耗溶剂少、提取效率高、操作模式多样化以及操作过程自动化等优点。目前,已广泛应用于中药材有效成分的提取、制备。本研究采用 ASE 法用于尖海

龙水溶性成分的提取制备研究。采用本实验优化所得最佳色谱-质谱条件进样分析表明,尖海龙水提物中特征性显著的化合物较多,所得到的特征图谱即有明显的指纹特征,又能反映尖海龙的多种活性成分。因此,采用纯水作为尖海龙药材的提取溶剂。进一步考察了不同提取温度(70、90、110、130、150 °C),提取时间(5、7、10、12 min)和循环次

数(1、2、3次)的影响,研究表明,当提取温度为110℃,提取时间为10min,提取1次时,尖海龙水提物中活性成分已基本提取完全,各化合物色谱峰强度较高。

3.2 色谱条件优化

反相柱常用于天然药物化学成分分离研究,本研究首先考察了不同类型反相柱对海龙水提物的分离效果。结果表明,海龙水提物在反相柱上的保留效果较差,虽然采用高比例的水可以提高其保留时间,但会影响柱子寿命。进一步考察了3种不同类型亲水柱(Waters Xbridge Amide、Waters Xbridge HILIC、Merck ZIC-HILIC)对海龙水提物的分离效果,结果表明,采用Waters HILIC Amide色谱柱,海龙水提物各化学成分分离较好,因此用于进一步研究。海龙水提物化学成分复杂,采用等度洗脱难以实现其分离,因此本研究选择梯度洗脱用于其分离研究。考察了流动相pH值和缓冲盐浓度等对亲水色谱分离效果的影响,结果表明,选择20mmol/L醋酸铵-0.2%甲酸作为流动相时海龙水提取物中各化合物分离度较好,峰型尖锐。采用二极管阵列检测器考察海龙样品在不同波长(190~400nm)下的亲水色谱图,在260nm处色谱峰较多,各峰分离度较好,基线平稳,因此,选择260nm用于海龙亲水色谱指纹图谱研究。

3.3 不同样品的辨别

由图3可知,尖海龙指纹图谱与海燕和小海狗样品指纹图谱差异显著,与小海马指纹图谱有一定的相似性,但各共有峰分布特征存在明显差别。相似度分析表明,10批海龙药材相似度评价结果均在0.964以上,说明10批尖海龙药材的质量差别不明显。尖海龙与小海狗、海燕的相似度较低,在0.671以下,与小海马的相似度为0.824,说明建立的尖海龙HILIC特征指纹图谱结合相似度计算可用于尖海龙的真伪鉴别及质量评价。

参考文献

[1] 刘冬玲,卢振.药用海洋动物海龙的研究概述[J].时珍国医国药,2005,16(9):918-919.

- [2] 中国药典[S].一部.2010.
- [3] 黄建设,李庆欣,吴军,等.粗吻海龙化学成分的研究[J].中草药,2004,35(5):485-487.
- [4] 陶莉,王有为.三种海龙中甾醇类成分的GC-MS分析[J].中草药,2009,40(7):1048-1049.
- [5] 许东晖,谢江海,梅雪婷,等.我国海龙的研究进展[J].中国海洋药物,2005,24(2):51-56.
- [6] 王梦月,韦静斐,史海明,等.海龙药材及其伪品的HPLC指纹图谱研究[J].中国药学杂志,2009,44(24):1847-1851.
- [7] 陶莉,王有为.三种海龙中甾醇类成分的GC-MS分析[J].中草药,2009,40(7):1048-1049.
- [8] 吴筱丹,李士敏,曾苏.三种海龙中脂肪酸的分析研究[J].中草药,2000,31(6):414-415.
- [9] 文震,党志,朱志鑫.GC-MS测定海龙与海星中甾醇类化合物的研究[J].海洋通报,2003,22(6):92-95.
- [10] 许东晖,谢江海,梅雪婷,等.我国海龙的研究进展[J].中国海洋药物,2005,24(2):51-56.
- [11] 胡建英,李八方.海洋生药尖海龙的抗疲劳作用研究[J].中国海洋药物,2002,4(6):48-53.
- [12] 李八方,胡建英,李志军,等.尖海龙复方制剂对小白鼠的抗运动性疲劳试验[J].中国海洋药物,2004,1(3):57-59.
- [13] Alpert A J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds[J].*J Chromatogr A*, 1990, 499: 177-196.
- [14] Cai Z W, Lee F S C, Wang X R. A capsule review of recent studies on the application of mass spectrometry in the analysis of Chinese medicinal herbs[J].*J Mass Spectrom*, 2002, 37(10): 1013-1024.
- [15] Richter B E, Jones B A, Ezzell J L, et al. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation[J].*Anal Chem*, 1996, 68(6): 1033-1039.
- [16] Fan H, Li S P, Xiang J J, et al. Qualitative and quantitative determination of nucleosides, bases and their analogues in natural and cultured *Cordyceps* by pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS)[J].*Anal Chim Acta*, 2006, 567(2): 218-228.