

DNA。PVP 可与多酚结合形成复合物,可以有效避免多酚类化合物介导的 DNA 降解^[9,10]。另一方面,多糖的去除也是提取中药材 DNA 的关键。一般在材料粉碎之前,先不加细胞膜裂解液,因而 DNA 尚未溶出,用一些缓冲液清洗,可除去一些多糖^[11]。

本研究结果显示,只有改良的 CTAB 法的处理 B 可以达到 AFLP 分析的要求。笔者根据上述多酚及多糖的物理、化学特性对 CTAB 法作了如下改进:提高 CTAB 的浓度(4×CTAB 缓冲液)以尽可能破碎细胞壁、细胞膜,使核酸与蛋白质完全解离,并有利于 CTAB DNA 复合物形成;对于含多酚类较多的植物,增加 CTAB 提取缓冲液中 β -mercaptoethanol (提高到 4%),以固体形式加入 VC,防止多酚类物质氧化,同时以固体形式加入 PVP 使其与多酚类物质结合形成复合物。

通过对普通 CTAB 法改进以后,笔者从保存一个月的泰山白花丹参成熟干叶片中提取到高质量的 DNA, DNA 的电泳结果表明, DNA 的纯度和产率都比较理想。由于本实验是为了给后续研究利用 AFLP 法分析丹参道地性奠定基础,因此采用 AFLP 分析对分离的 DNA 质量作了进一步的评价,即使用 EcoRI/Mse I 消化 DNA 和随后的限制酶切片经 T_4 DNA 连接酶与接头连接及 PCR 扩增,结果扩增出可重复的 PCR 产物(实验重复 3 次)。结果表明,该技术可有效地从富含多酚和多糖的药用植物组织中分离出高质量 DNA。

使用此方法时应该注意:PVP 和 VC 都以固体形式加入最好,不能事先配成储存液,否则会与空气中的氧发生作用而失去效果,且 VC 和 PVP 配合使用。PVP 与样本共研后,要用预冷的清洗液,并在冰

上放置一段时间,也是防止氧化的手段。加 VC 后溶液的 pH 值会下降到 pH 4~5,这样的条件下,CTAB 的提取效果不佳,必须将提取液的 pH 值调到接近中性 pH 6~6.5。

References:

- [1] Li A L, Ma Z Y. AFLP molecular marker and crop improvement [J]. *J Hebei Agric Univ* (河北农业大学学报), 2001, 24 (1): 89-94.
- [2] Luo Z Y, Zhou G, Zhou S Q, et al. Construction of genomic DNA fingerprinting in *Panax ginseng* and *P. quinquefolium* by AFLP [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, 35 (8): 626-629.
- [3] Li Z T, Yang B J, Ma G E. Study on the chemical constituents of *Salvia miltiorrhiza* Bge. f. *alba*. [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1991, 26 (3): 209.
- [4] Hao G P, Wu Z Y, Cao M Q, et al. Single nucleotide polymorphisms of CBF4 locus region of *Arabidopsis thaliana* correspond to drought tolerance [J]. *Chin J Agric Biotech* (中国农业生物技术), 1 (3): 181-190.
- [5] Shao P Z, Cao H. Authentication of Chinese Medicinal Materials by DNA Technology (中药分子鉴定) [M]. Shanghai: Fudan University Press, 2004.
- [6] Gu H, Gai L, Zhou T S, et al. A preliminary study on the molecular and chemical characteristics of authenticity (Dao-dixing) of a traditional Chinese medicinal plant—*Forsythia suspense* Vahl [J]. *J Fudan Univ; Nat Sci* (复旦学报:自然科学版), 2002, 41 (6): 664-668.
- [7] Luo Z Y, Zhou G, Chen X Y, et al. Isolation of high quality genomic DNA from plants [J]. *Bull Hunan Med Univ* (湖南医科大学学报), 2001, 26: 178-180.
- [8] Green M J, Thompson D A, Mackenzie D J. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction [J]. *Plant Dis*, 1999, 83: 482-485.
- [9] Kim C S, Lee C H, Shin J S, et al. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit tree and conifers using PVP [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 1085-1086.
- [10] Wang Q, Qu X P, Zhang K C, et al. An efficient protocol for preparation of high molecular weight DNA from fruit trees [J]. *High Technol Lett* (高技术通讯), 2000, 10 (4): 1-3.
- [11] Fu R Z, Wang J, Sun Y R, et al. Extraction of genomic DNA suitable for PCR analysis from dried plants rhizomes/roots [J]. *Biotechniques*, 1988, 25: 796-798.

RP-HPLC 法测定健儿糖浆中 6'-羟基-爵床定 B

于肖辉¹, 杨美华^{2*}, 金 钺², 陈建民²

(1. 江西天施康中药股份有限公司, 江西 鹰潭 335000; 2. 中国医学科学院
中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

健儿糖浆由萝藦和爵床两味药材组成, 具有消痞化积、行气活血、消肿解毒的功效, 用于小儿疳积。

制剂原标准中只有爵床药材的薄层色谱鉴别, 无定量测定项。为了更好地控制本品的质量, 笔者参考文

收稿日期: 2005-11-14

作者简介: 于肖辉(1965—), 男, 江西余江人, 高级工程师, 主要从事新药研发, 科研管理工作。Tel: (0701) 6215005

* 通讯作者 杨美华 Tel: (010) 62899730 E-mail: yangmeihua15@hotmail.com

献报道^[1~4],对制剂以及方中爵床和萝藦两味药材的化学成分进行了较为系统的分析,结果从制剂原料中分离得到了爵床药材中所含有一个新的木脂素化合物,即 6'-羟基-爵床定 B(另文报道)。本实验采用高效液相色谱方法测定了制剂中 6'-羟基-爵床定 B,结果显示,该方法准确、操作简便,可用于该制剂的质量控制。

1 仪器与试药

WatersTM 600 泵系统, WatersTM 996 二极管阵列紫外检测器, Empower 数据处理软件。实验用水为重蒸水,乙腈为色谱纯试剂(Fisher Scientific 公司),其余试剂均为分析纯。

健儿糖浆以及阴性对照由江西天施康中药股份有限公司提供,制剂规格为 10 mL/支。爵床药材购于江西省医药公司,经北京大学药学院陈虎彪教授鉴定为爵床科植物爵床 *Justicia procumbens* L. 的干燥全草。

6'-羟基-爵床定 B 对照品为自制,采用《中国药典》2005 年版一部附录 VI E (4)不加校正因子的主成分自身对照法,测得其质量分数为 98% 以上,符合定量测定用对照品的要求。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱:Agilent Zorbax SB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(31:69);柱温:室温;体积流量:1 mL/min;检测波长:256 nm。在此条件下样品中 6'-羟基-爵床定 B 与其他相关峰均能达到基线分离,见图 1。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取经五氧化二磷减压干燥至恒重的 6'-羟基-爵床定 B 对照品适量,加乙腈制成含 6'-羟基-爵床定 B 0.05 mg/mL 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备:精密量取本品 10 mL,置分液漏斗中,用醋酸乙酯萃取 3 次,每次 20 mL,合并醋酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇适量使溶解,并移至 2 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察:精密称取经五氧化二磷减压干燥至恒重 6'-羟基-爵床定 B 对照品 6.05 mg,置 100 mL 量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀。分别精密吸取对照品溶液 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、14.0 μL,注入液相色谱仪,测定峰面积。以 6'-羟基-爵床定 B 对照品的进样量为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,绘制标准曲线,计算得回归方程为: $Y = 6469193.0X - 37678.14$, $r = 0.9999$ 。表明

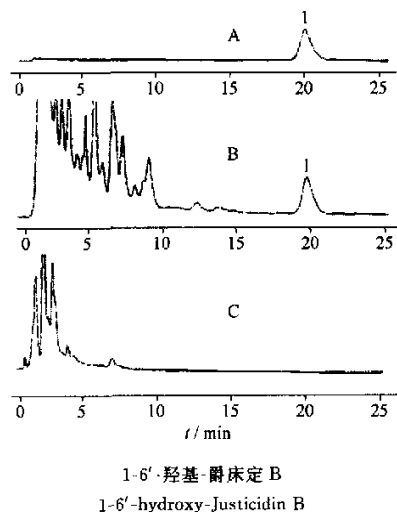


图 1 6'-羟基-爵床定 B 对照品(A)、健儿糖浆(B)和阴性对照(C)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of 6'-hydroxy-justicidin B reference substance (A), Jian'er Syrup (B), and negative sample (C)

6'-羟基-爵床定 B 进样量在 0.121~0.847 μg 与峰面积具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验:取对照品溶液,重复进样 6 次,测定,结果 6'-羟基-爵床定 B 峰面积的 RSD 为 1.07%。

2.6 稳定性试验:取供试品溶液分别于 0、1、2、3、5、7、9 h 测定,结果 6'-羟基-爵床定 B 峰面积的 RSD 为 0.98%。

2.7 重现性试验:精密称取同批样品(批号 030919) 6 份,制备供试品溶液,测定,结果 6'-羟基-爵床定 B 的平均质量浓度为 10.32 μg/mL, RSD 为 1.45%。

2.8 回收率试验:采用加样回收试验法。精密量取健儿糖浆(批号 030919) 6 份,各约 5.0 mL,分别精密加入 6'-羟基-爵床定 B 对照品溶液 0.05 mL (质量浓度为 1.0516 mg/mL),混匀,制备供试品溶液,测定,计算回收率。结果平均回收率为 98.68%, RSD 为 0.69%。

2.9 样品测定:对 3 批健儿糖浆进行了 6'-羟基-爵床定 B 的测定,结果见表 1。

表 1 健儿糖浆中 6'-羟基-爵床定 B 的测定结果 (n=3)

批号	6'-羟基-爵床定 B/(μg·mL ⁻¹)	RSD/%
020711	5.54	1.36
030803	11.04	1.65
030919	10.26	1.61

3 讨论

3.1 对照品的确定:考虑到制剂的制备工艺,取健

儿糖浆原料浓缩药液约 1.5 kg, 加醋酸乙酯萃取 6 次, 每次 2 000 mL, 合并醋酸乙酯萃取液, 蒸干, 拌样 40 g, 上硅胶柱, 氯仿-甲醇梯度洗脱, 收集馏份。采用高效液相制备的方法, 从上述馏份中得到了 6'-羟基-爵床定 B 对照品, 并对其结构进行了解析。通过物理、化学、色谱及光谱数据, 确定 6'-羟基-爵床定 B 为一新木脂素化合物。采用《中国药典》2005 年版一部附录 V E (4) 不加校正因子的主成分自身对照法, 测得其质量分数为 98% 以上, 符合要求。

3.2 测定波长的选择: 将 6'-羟基-爵床定 B 对照品溶液注入液相色谱仪, 采用 Waters™ 996 二极管阵列紫外检测器对 6'-羟基-爵床定 B 色谱峰进行紫外扫描, 结果分别在 256.0 nm 及 305.7 nm 波长处有最大吸收, 但 256.0 nm 波长处的响应值比 305.7 nm 波长处的响应值大, 故选择检测波长为 256 nm, 结果灵敏准确。

3.3 流动相的选择: 采用乙腈-水为流动相, 当其比例达 31:69 时, 6'-羟基-爵床定 B 对照品的保留时

间约为 19 min 左右, 且在此条件下样品中 6'-羟基-爵床定 B 与其他相关峰均能达到基线分离, 阴性对照无干扰。

3.4 提取萃取次数的选择: 根据制剂以及 6'-羟基-爵床定 B 对照品的提取方法, 对制剂醋酸乙酯提取的萃取次数进行了考察, 结果萃取次数为 2、3、4、5 时, 6'-羟基-爵床定 B 的质量浓度分别为 10.41、10.58、10.54、10.55 $\mu\text{g/mL}$ 。表明醋酸乙酯萃取提取 3 次, 基本将 6'-羟基-爵床定 B 提取完全。为了节省溶剂和时间, 故将萃取次数定为 3 次。

References:

- [1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1977.
- [2] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 1977.
- [3] Warashina T, Noro T. Steroidal glycosides from the roots of *Metaplexis japonica* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49 (7): 2103-2108.
- [4] Asano J, Chiba K, Tada M, et al. Antiviral activity of lignans and their glycoside from *Justicia procumbens* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 42 (3): 713-717.

HPLC 法测定红花七厘散中血竭素高氯酸盐

王 杰, 吴贵华, 吕曙华

(天津市药品检验所, 天津 300070)

红花七厘散为天津中新药业集团股份有限公司天津宏仁堂制药厂生产的中药成方制剂, 其处方以乳香、血竭、当归、三七等 11 味中药材组成, 具有散瘀、活血、消肿、止痛作用, 用于跌打损伤、血瘀疼痛、外伤出血。质量标准已收入《国家食品药品监督管理局国家中成药标准汇编骨科分册》。处方中血竭具有祛瘀定痛、止血生肌作用, 与成品的功效相吻合。因此, 在原标准和相关文献报道^[1-3]基础上, 本实验采用高效液相色谱法以血竭素高氯酸盐为定量指标进行了测定, 为该制剂的质量控制提供了保证。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-2010A 高效液相色谱仪。血竭素高氯酸盐对照品购自中国药品生物制品检定所 (批号 0811-9302)。红花七厘散由中新药业集团股份有限公司天津宏仁堂制药厂提供。乙腈为色谱纯, 甲醇、磷酸二氢钠、磷酸为分析纯, 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Phenomenex C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钠 (35:65); 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量: 1 mL/min; 检测波长: 440 nm。理论板数按血竭素高氯酸盐峰计不低于 5 000。色谱图见图 1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备: 取血竭素高氯酸盐对照品适量, 精密称定, 加 7% 磷酸甲醇制成 18 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 摇匀, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备: 取装量差异项下的本品, 研细, 取 0.3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 7% 磷酸甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 33 kHz) 20 min, 放冷, 再称定质量, 用 7% 磷酸甲醇补足减失的质量, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备: 按处方配比取除血竭的各药, 制成阴性对照, 按供试品溶液制备方法处理。