

痛安注射液 HPLC 指纹图谱的研究

霍翠翠¹, 徐兰兰¹, 尚强², 胡军华², 王振中², 萧伟^{2*}

(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046; 2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001)

摘要:目的 建立痛安注射液的指纹图谱, 更有效地控制该产品的质量。方法 采用 HPLC 法对痛安注射液指纹图谱进行研究。色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 保护柱: Phenomenex C₁₈ (4 mm × 3 mm, 5 μm); 流动相: 0.02 mol/L 磷酸二氢钾-乙腈, 线性梯度洗脱; 体积流量: 1 mL/min; 进样量: 10 μL; 柱温: 30 °C; 检测波长为 230 nm。采用国家药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范软件 (版本 2004A) 进行评价。结果 制剂中选定的共有峰分离良好。结论 该方法为痛安注射液的质量控制提供了较全面的信息, 利于产品的质量的控制。

关键词: 痛安注射液; 指纹图谱; 高效液相色谱

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)04-0569-03

痛安注射液为江苏康缘药业股份有限公司研制的复方中药注射液新药, 由青风藤、汉桃叶等中药组成, 具有通络止痛之功效, 主要用于治疗放化疗或非放化疗的肺癌、肝癌、胃癌等属血瘀引发的癌性中度疼痛等。为确保该品种的质量稳定、可控, 本实验参照国家食品药品监督管理局颁布的《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求 (暂行)》和国家药典委员会颁布的《中药注射剂指纹图谱实验研究技术指南 (试行)》要求, 建立了痛安注射液的指纹图谱。结果表明, 本实验所建立的指纹图谱方法, 重现性好, 操作简单, 同时也为其他复方中药指纹图谱的研究提供了可行的研究思路。

1 仪器与试剂

Waters 600E 泵, Waters 2996PAD 检测器, Empower 工作站。乙腈 (色谱纯, Tedia Company), 超纯水, 其他试剂为分析纯, 青风藤对照品购自中国药品生物制品检定所 (批号: 0774-9904), 痛安注射液由江苏康缘药业股份有限公司生产。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 保护柱: Phenomenex C₁₈ (4 mm × 3 mm, 5 μm); 流动相: A (0.02 mol/L 磷酸二氢钾)-B (乙腈), 线性梯度洗脱, 0 ~ 10 min, 10% ~ 20%B, 10 ~ 50 min, 20% ~ 30%B; 体积流量: 1 mL/min; 进样量: 10 μL; 柱温: 30 °C; 检测波长为 230 nm。理论板数按青藤碱峰计算应不低于 3 000。

2.2 参照物的选择: 由于痛安注射液中青藤碱为其

主要有效成分, 其色谱峰的积分面积在指纹图谱中所占的比例达 80% 以上, 并且色谱峰稳定, 重现性好, 因此选择青藤碱作为参照物。

2.3 参照物溶液的制备: 精密称取青藤碱对照品适量, 加甲醇制成 0.1 mg/mL 的溶液, 摇匀, 即得。

2.4 供试品溶液的制备: 取痛安注射液 5 支混匀后取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验: 取样品 (批号 031016), 制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 经中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范 (版本 2004A) 计算, 6 张图谱之间的相似度均为 1.000。

2.5.2 稳定性试验: 取样品 (批号 031016), 制备供试品溶液, 分别在 0、5、11、24、41 h 测定, 记录色谱图, 经中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范 (版本 2004A) 计算, 5 张图谱之间的相似度均为 1.000, 说明供试品溶液在 41 h 稳定。

2.5.3 重现性试验: 取样品 (批号 031016) 6 份, 制备供试品溶液, 记录色谱图, 经中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范 (版本 2004A) 计算, 6 张图谱之间的相似度均为 1.000。

2.6 指纹图谱的建立

2.6.1 样品测定: 取 10 批痛安注射液, 制备供试品溶液, 同时取参照物溶液 10 μL, 进样测定, 记录色谱图, 见图 1。把 10 批痛安注射液指纹图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范 (版本

* 收稿日期: 2008-06-20

作者简介: 霍翠翠 (1981—), 女, 河北石家庄人, 硕士在读, 2005 年毕业于河北医科大学, 研究方向: 创新中药的研究与开发。

Tel: (0518) 85521930 E-mail: mythhcc@163.com

* 通讯作者 萧伟 E-mail: xw@kanion.com

2004A) 软件,对保留时间 0~50 min 的色谱峰进行多点校正后,自动匹配,生成注射液对照指纹图谱,见图 1,共标定 8 个共有峰,其中青藤碱为参比峰(S)。各批注射液与对照指纹图谱比较平均相似度为 0.985,RSD 为 0.726%,见表 1。以 2 号峰(青藤碱)作为色谱指纹图谱的参比峰,计算各共有指纹峰相对于参比峰的相对保留时间和相对峰面积的比值。结果见表 2、3。

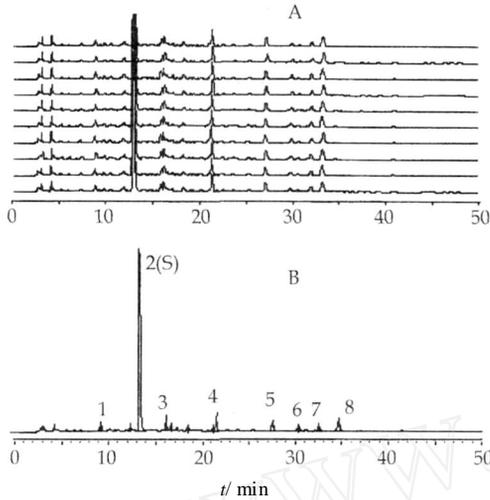


图 1 痛安注射液 HPLC 指纹图谱测定色谱图(A)和对照指纹图谱(B)

Fig.1 Fingerprints (A) and reference fingerprint (B) of Tong'an Injection

表 1 痛安注射液相似度的测定结果

Table 1 Similarity of Tong'an Injections

批号	相似度	批号	相似度
031016	0.981	031119	0.975
031022	0.992	031125	0.994
031101	0.977	040307	0.991
031107	0.990	040312	0.978
031113	0.980	040317	0.989

表 2 痛安注射液指纹图谱中共有峰的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks in fingerprint of Tong'an Injections

峰号	共有峰相对保留时间							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0.687	1.000	1.251	1.653	2.101	2.311	2.482	2.579
2	0.684	1.000	1.258	1.653	2.103	2.319	2.487	2.582
3	0.692	1.000	1.249	1.647	2.100	2.310	2.475	2.573
4	0.686	1.000	1.255	1.654	2.110	2.335	2.505	2.606
5	0.686	1.000	1.253	1.659	2.100	2.315	2.481	2.576
6	0.684	1.000	1.250	1.645	2.096	2.311	2.477	2.572
7	0.689	1.000	1.252	1.652	2.100	2.317	2.482	2.577
8	0.688	1.000	1.253	1.659	2.111	2.328	2.496	2.591
9	0.686	1.000	1.256	1.652	2.111	2.325	2.489	2.584
10	0.684	1.000	1.251	1.649	2.105	2.319	2.487	2.580

表 3 痛安注射液指纹图谱中共有峰的相对峰面积

Table 3 Relative retention area of common peaks in fingerprint of Tong'an Injections

峰号	共有峰相对峰面积							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0.032	1.000	0.062	0.081	0.054	0.019	0.031	0.078
2	0.031	1.000	0.060	0.079	0.053	0.019	0.027	0.076
3	0.033	1.000	0.062	0.081	0.054	0.020	0.027	0.078
4	0.031	1.000	0.062	0.080	0.054	0.019	0.030	0.080
5	0.032	1.000	0.061	0.081	0.054	0.019	0.028	0.078
6	0.032	1.000	0.062	0.080	0.054	0.019	0.028	0.078
7	0.033	1.000	0.061	0.080	0.055	0.019	0.028	0.081
8	0.031	1.000	0.062	0.080	0.054	0.019	0.028	0.078
9	0.031	1.000	0.064	0.080	0.055	0.019	0.030	0.078
10	0.031	1.000	0.061	0.081	0.055	0.019	0.031	0.079

2.6.2 指纹图谱中主要色谱峰的组成药味归属:在相同色谱条件下,测定了各单味药材及全方各供试品的指纹图谱,见图 2。通过对全方及各组成药味的指纹图谱中各色谱峰相对保留时间的比较分析,结果表明 1 号峰来源于汉桃叶,2~4 号峰来源于青风藤,5~8 来源于白屈菜。

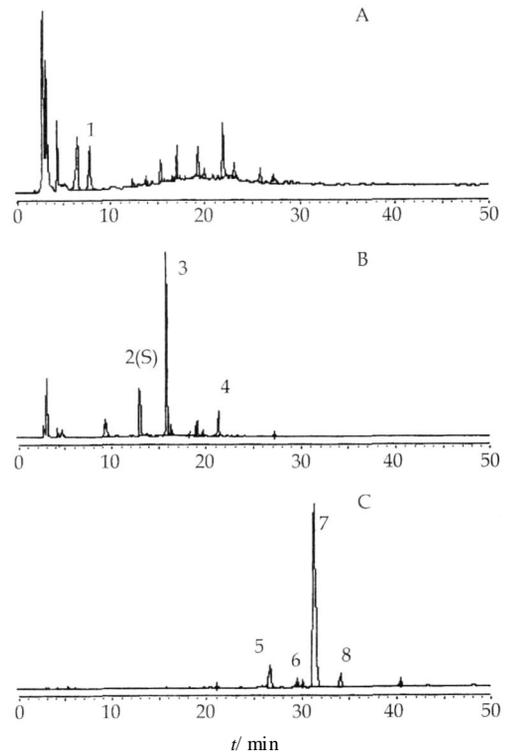


图 2 汉桃叶(A)、青风藤(B)和白屈菜(C)的指纹图谱

Fig.2 Fingerprint of Caulis et Folium Schef flerae Kwangsiensis (A), Caulis Sinomenii (B), and Herba Chelidonii (C)

3 讨论

3.1 流动相的选定:曾以甲醇-0.02 mol/L 磷酸二

氢钾、乙腈-1%磷酸、乙腈-0.02 mol/L 磷酸二氢钾作为流动相进行试验,结果表明以乙腈-0.02 mol/L 磷酸二氢钾线性梯度洗脱为最佳,谱图上各色谱峰(230 nm)分离度较好,保留时间适中,峰形好。因此选此洗脱系统作为痛安注射液的 HPLC 指纹图谱检测的流动相。

3.2 检测波长的选择:按照前述色谱条件,精密吸取供试品溶液进样,得 200~400 nm 波长 DAD 扫描图谱,结果在 230 nm 测定的信息量多,特征最为明显,图谱中的各指纹峰信号强,分离效果较好。因此选用该波长作为检测波长。

3.3 色谱柱的选择:选用大连依利特 Hypersil ODS2 色谱柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm)、兰州化物所 ODS 色谱柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm)、Dikma 公司 Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm)进行试验筛选,比较分离度和柱效,结果 Dikma 公司 Diamonsil C₁₈ 较为合适。

本实验采用 HPLC 法所建立的痛安注射液指纹图谱可以在一个色谱条件下,同时实现整体定性、多指标成分定量的功能,为复方中药的质量控制及稳定性评价提供了新的方法模式。

改良 SDS 法快速提取赤芍干叶片 DNA 的研究

徐芳^{1,2},王丽萍³,陈波^{1*},姚守拙¹

(1. 湖南师范大学 化学生物学及中药分析省部共建教育部重点实验室,湖南长沙 410081; 2. 长沙医学院,湖南长沙 410219; 3. 湖南省分析测试中心,湖南长沙 410007)

摘要:目的 从富含多糖和小分子杂质的赤芍干叶片中快速分离出适用于各生物技术分析的高质量基因组 DNA,为赤芍的鉴定研究提供实验基础。方法 以常规的 SDS 法为基础,进一步优化 DNA 提取各步骤,获得了一种快速可行的提取高质量赤芍干叶片 DNA 的方法。结果 使用该方法从 4 个不同产地的赤芍干叶片中分离的 DNA A₂₆₀/A₂₈₀ 分别为 1.90、1.88、1.91、1.93,所需时间均小于 2.5 h,所得 DNA 分别直接用于 PCR 分析,结果满意。结论 该方法用于提取赤芍干叶片 DNA 快速可行,可有效地从富含多糖和小分子杂质的组织中分离出高质量 DNA,方法简便、快速、成本低。

关键词:赤芍;DNA 提取;改良 SDS 法;PCR

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)04-0571-03

中药现代化生产的基本要求是中药材来源纯正、地道,快速、准确地鉴别中药原植物及药材是中药生产标准化的关键。随着分子生物学技术运用于中药材鉴定研究的发展,DNA 分子标记技术已成为中药材鉴定中极其重要的鉴定方法之一^[1,2]。袁菊红等^[3]采用 RAPD 分析法分别对不同采集地的 37 份石蒜属植物的基因组 DNA 的遗传多样性进行检测;张杰等^[4]对半夏栽培品遗传差异进行 AFLP 分析;陈大霞等^[5]对黄连药材 DNA 进行提取并对 RAPD 反应体系的优化。高质量植物组织 DNA 的提取是整个鉴定实验成功的基本保证。植物 DNA 的提取研究中,多采用新鲜或冷冻的材料,但对于野外,特别是远距离采样时受条件限制,植物材料只能以干燥方式保存,其 DNA 提取方法虽然与新鲜材

料相近,但提取的条件差别较大,因此本实验寻找一种从干燥植物药材中快速提取完整、高质量 DNA 的方法具有重要意义。

赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根,具有清热凉血,活血散瘀的功能,还具有镇静、镇痛、解痉、抗炎等作用^[6]。赤芍为野生,但不同产地野生赤芍的成分存在很大差异,因此有必要对赤芍野生资源品种进行分类、鉴定和良种选择。本实验通过对 DNA 提取各步骤的优化,获得了一种快速的赤芍干叶片完整、高质量 DNA 的提取方法,并应用于 4 个产地赤芍 DNA 的比较,为毛茛科植物 DNA 分子标记技术研究提供参考。

1 材料

赤芍干叶片分别采自内蒙古自治区额尔古纳

* 收稿日期:2008-06-11

基金项目:国家 973 课题(2006CB504701)

作者简介:徐芳(1981—),女,湖南常宁人,硕士研究生,研究方向:现代色谱分离分析。E-mail: xufang6789@163.com

* 通讯作者 陈波 Tel:(0731)8865515 E-mail: dr-chenpo@vip.sina.com