

3 讨论

3.1 测定方法的选择 柱前衍生化高效液相色谱法分析氨基酸分析时间较短、方法灵活多样、灵敏度高,据报道目前主要的柱前衍生试剂有邻苯二甲醛(OPA)、异硫氰酸苯酯(PITC)、氯甲酸苄甲酯(FMOC)等^[9-11]。其中用PITC柱前衍生采用常规C₁₈柱、UV检测器就可以检测,且产物稳定。所以本实验采用此试剂进行柱前衍生化进行氨基酸的检测。

3.2 提取方法的考察 分别用回流及超声的提取方法对样品进行处理,但回流后的样品与衍生化试剂反应后有白色浑浊物生成,影响实验结果,所以本实验采用超声的提取方法;提取溶剂分别考察水、50%甲醇、乙醇,考虑到氨基酸易长菌降解^[12],且用50%甲醇提取液衍生化后,分离效果好,出峰数多,故采用50%甲醇溶液作为提取溶液。

3.3 进样量的选择 试验中曾尝试进样量10 μL、8 μL,但对照品溶液及供试品溶液中天冬氨酸和谷氨酸峰都会分叉,其他峰均正常,当进样量改为5 μL时,未出现这种情况,可能是因为色谱柱超载^[13]。

3.4 记录时间的选择 按上述色谱条件进样,参照混合对照图谱及空白图谱,可知在52 min后均为衍生化试剂峰,且峰形杂乱,故确定记录时间为52 min。

参考文献:

- [1] 王凤霞,吉爱国.药用土鳖虫化学成分及药理作用研究进展[J].中国生化药物杂志,2009,30(1):61-63.
- [2] 付英杰,田景振,郭之平.土鳖虫化学成分制取方法及药理作用研究概况[J].食品与药品,2005,7(4A):28-30.
- [3] 杨红莲,刘梅.土鳖虫的化学成分及药理研究[J].陕西中医学院学报,2005,28(2):49-50.
- [4] 刘丽敏,王海敏,虞海霞,等.柱前衍生反相高效液相色谱测定西洋参中游离氨基酸[J].中成药,2009,31(2):275-278.
- [5] 金维维,赵钟兴,刘旭辉,等.蚕蛹蛋白氨基酸含量的高效液相色谱法测定[J].时珍国医国药,2010,21(3):537-539.
- [6] 程显隆,肖新月,邹秦文,等.柱前衍生化HPLC法同时测定阿胶中4种主要氨基酸的含量[J].药物分析杂志,2008,28(12):1997-2000.
- [7] 景晶,曹红.HPLC法测定土鳖虫中尿嘧啶和尿囊素的含量[J].药学实践杂志,2010,28(3):134-136.
- [8] 中药注射剂色谱指纹图谱实验研究的技术要求(试行)[S].2000.
- [9] 丁永胜,牟世芬.氨基酸的分析方法及其应用进展[J].色谱,2004,22(3):210-215.
- [10] 曾念辉.氨基酸的分析方法综述[J].江西化工,2007,3(1):49-51.
- [11] 宋志峰,王丽,纪锋,等.氨基酸分析中的柱前衍生技术[J].吉林农业科学技术,2004,29(6):54-58.
- [12] 何悦,张红飞.含0.1%苯甲酸钠的17种氨基酸对照品水溶液的稳定性考察[J].中国药品标准,2008,9(6):447-450.
- [13] 李惠芬,骆达,张庆伟,等.柱前衍生化RP-HPLC法分析龟板中氨基酸[J].中草药,2005,36(11):1637-1639.

心脉隆注射液 HPLC 指纹图谱建立方法的研究

焦春香, 张成桂*, 刘光明, 李树楠
(大理学院药学院, 云南 大理 671000)

摘要:目的 研究心脉隆注射液(美洲大蠊)HPLC指纹图谱的测定方法。方法 心脉隆注射液中有效成分利用强碱性阴离子交换树脂纯化,再利用反相高效液相色谱法分析,以尿嘧啶为参照物。色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm × 150 mm 5 μm);柱温30℃;检测波长254 nm;分析时间15 min;体积流量0.8 mL/min。结果 建立了心脉隆注射液指纹图谱,确定了12个共有峰,测定了10批心脉隆注射液,与共有模式间具有良好的相似性。结论 建立的HPLC指纹图谱可以作为心脉隆注射液质量控制的重要依据之一。

关键词:核苷碱基;指纹图谱;心脉隆注射液;美洲大蠊

中图分类号:R286

文献标志码:A

文章编号:1001-528(2011)10-1648-05

收稿日期:2010-08-09

基金项目:云南省教育厅(06Y287C);云南省重点产业创新工程项目(2008IF012);大理学院博士启动基金(KYBS200912)

作者简介:焦春香(1981—),女,硕士,讲师。研究方向:昆虫药物化学成分研究。Tel:13087419321, E-mail: jiaocx_123@163.com

* 通信作者:张成桂,男,博士,讲师。研究方向:昆虫药物化学成分研究。Tel:(0872)6685623, E-mail: chenggui_zcg@163.com

Establishment of HPLC fingerprint of Xinmailong Injection

JIAO Chun-xiang, ZHANG Cheng-gui, LIU Guang-ming, LI Shu-nan

(School of Pharmaceutical Science, Dali College, Dali 671000, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the determination of HPLC fingerprint of Xinmailong Injection (*Periplanta americana* linneus). **METHODS** The active components of Xinmailong Injection were purified by the use of strong base type anion exchange resin, and RP-HPLC method with uracil trails. Used with Agilent Venusil XBP-C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), the detection wavelength was set at 254 nm, column temperature maintained at 30 °C, the flow rate was 0.8 mL/min in the gradient elution mode. **RESULTS** Twelve copossessing peaks were selected as the fingerprints of Xinmailong Injection. There existed good similarities between the standard fingerprint and each liquid map of the ten different batches. **CONCLUSION** The proposed fingerprint can be used as the important evidences for the quality control of Xinmailong Injection.

KEY WORDS: nucleobase; fingerprint; Xinmailong Injection; *Periplanta americana* linneus

心脉隆注射液是一种从美洲大蠊 *Periplanta americana* linneus 提取物中精制而成的中药静脉注射制剂,对充血性心力衰竭、肺心病、右心衰临床疗效良好,有着起效快、疗效确切、安全可靠等优点。心脉隆注射液中含有复合核苷类和结合氨基酸等多种化合物,其中复合核苷类是主要有效成分,结合氨基酸可使复合核苷类的药效作用增强^[1-2]。本实验采用离子色谱去除结合氨基酸部分及其他杂质,尽量纯化复合核苷类,再通过 RP-HPLC 建立心脉隆注射液指纹图谱。

1 仪器与试剂

中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004,国家药典委员会); Agilent 1100 液相色谱仪, DVD-二极阵列检测器, Agilent LC 色谱工作站; 甲醇(色谱纯), 重蒸水(实验室自制), 冰乙酸、乙酸钠均为分析纯, 强碱性阴离子交换树脂 717(粒度 0.3-1.2 mm) 购自安徽三星树脂科技有限公司。

美洲大蠊药材 5 批(1 昆明养殖场 2008; 2 昆明养殖场 2008; 3 宾川养殖场 2007; 4 弥渡养殖场, 2007; 5 弥渡养殖场 2006) 购于各养殖基地。心脉隆注射剂 10 批(李树楠教授提供, 批号 20050412、20050610、20050401、20050405、20050404、20050607、200703、200606、20050603、20060604。依次编号为 1~10。); 尿嘧啶对照品购自 sigma 公司(货号 U0750, 纯度大于 99%)。

2 试验方法与系统适应性

2.1 供试品制备 注射液供试品的制备: 强碱性阴离子交换树脂 717 经过处理, 以其水悬液装柱, 层析柱内径 1.5 cm, 树脂床高 2.0 cm, 表面覆盖一滤纸

圆片^[3]。用蒸馏水洗脱后, 再加 0.5 mol/L NaOH 溶液约 5 mL, 待流出后用蒸馏水 10 mL 洗脱, 备用。精密量取供试样品 1.0 mL, 加 0.5 mol/L NaOH 溶液 0.25 mL, 调节 pH 至 9 加于柱上, 待流出后用蒸馏水 10 mL 洗脱。加 0.2 mol/L 乙酸溶液; 待浅色洗脱前缘向下移动到树脂柱下端约 0.4 cm 处时开始收集洗脱液, 至其体积为 22 mL 时停止, 加入 1 mol/L NaOH 溶液, 定容至 25 mL, 混匀, 即为供试品检测液。用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过。

美洲大蠊药材供试品溶液的制备: 称取 25 g 美洲大蠊干粉, 200 mL 95% 乙醇 80 °C 回流 1 h, 过滤; 取滤液 100 mL, 60 °C 减压浓缩至干, 所得浸膏加 50 mL 蒸馏水温溶, 过滤。滤液应澄明清亮。精密量取 5.0 mL 过滤液经强碱性阴离子交换树脂 717 处理, 方法同上。

对照品溶液的制备: 精密称取预置于干燥器中的标准品适量, 用 50% 甲醇水溶液配成 0.25 mg/mL 溶液, 使用时将其用水准确稀释为 0.05 mg/mL 溶液。

2.2 色谱条件 流动相 A: 0.02% 乙酸缓冲溶液 (pH=5.0), 流动相 B: 100% 甲醇; Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 检测波长 254 nm; 柱温 30 °C; 体积流量 0.8 mL/min; 运行时间 15 min; 进样量 10 μL。梯度程序: 0 min 95% A + 5% B; 3 min 90% A + 10% B; 6 min 85% A + 15% B; 9 min 80% A + 20% B; 14 min 85% A + 15% B; 15 min 95% A + 5% B。在上述色谱条件下, 理论板数不低于 10 000。

2.3 精密度试验 取供试品溶液(批号 20050412),

在所建立的测定条件下,连续进样5次采用夹角余弦法对全图谱进行计算,5次进样的色谱图其相似度均为0.99以上,同时以尿嘧啶色谱峰保留时间及峰面积为参照,5次共有峰的相对保留时间和相对峰面积比值基本一致,相对保留时间RSD低于1%;峰面积占总峰面积1%以上的各共有峰相对峰面积RSD低于3%,显示进样的精密度良好。符合指纹图谱研究技术的要求^[4-5]。

2.4 稳定性试验 取供试品溶液(批号20050412),分别在48h内不同时间段进样9次,按所建立的测定条件进行检测,采用上述方法对所得结果进行计算,其相似度均为0.95以上,同时以尿嘧啶色谱峰保留时间及峰面积为参照,共有峰的相对保留时间和相对峰面积比值基本一致。结果表明在48h内,心脉隆注射液的色谱指纹图谱基本稳定,其RSD均低于3%,符合指纹图谱研究技术的要求^[4-5]。

2.5 重现性试验^[6] 取同一批注射液(批号

20050412)10份,精密量取,按2.1项下制备,按2.2项下条件检测,记录5份样品色谱峰的保留时间及峰面积值。采用夹角余弦法对10次测定结果的全图谱进行相似度计算,其相似度均为0.94以上,同时以尿嘧啶色谱峰保留时间及峰面积为参照,共有峰的相对保留时间的RSD低于1.8%;相对峰面积的RSD值为4.3%,结果表明方法重现性良好。

3 结果与分析^[5-7]

3.1 共有峰确定 测定10批心脉隆注射液,指纹图谱见图1。比较其色谱图,确定共有峰为12个,峰面积占总峰面积0.5%以上的共有峰有8个。以尿嘧啶为参照物,尿嘧啶色谱峰(S峰)的保留时间和峰面积为1,分别计算其余共有峰的相对保留时间和峰面积积分值比值(见表1、2)。测定各峰相对保留时间RSD < 3.0%,共有指纹峰的峰面积之和占总峰面积的比值大于95%。

表1 心脉隆注射液共有指纹峰相对保留时间(n=10)

Tab. 1 Relative t_R of common fingerprint peaks of Xinmailong Injection (n=10)

峰号	注射液样品									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81
2	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85
3	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
4	1.39	1.39	1.39	1.39	1.39	1.39	1.39	1.39	1.39	1.39
5	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51
6	1.86	1.87	1.86	1.86	1.86	1.86	1.86	1.86	1.86	1.86
7	2.15	2.16	2.16	2.16	2.16	2.16	2.16	2.16	2.16	2.16
8	2.28	2.29	2.29	2.29	2.29	2.29	2.29	2.29	2.29	2.29
9	2.35	2.35	2.34	2.35	2.35	2.35	2.35	2.35	2.35	2.35
10	2.66	2.67	2.67	2.67	2.67	2.66	2.67	2.67	2.66	2.68
11	2.85	2.87	2.87	2.86	2.87	2.86	2.87	2.86	2.86	2.67
12	3.46	3.47	3.46	3.46	3.47	3.46	3.47	3.47	3.46	3.48

表2 心脉隆注射液的指纹图谱共有峰相对峰面积(n=10)

Tab. 2 Relative of copossessing fingerprint peak area of Xinmailong Injection (n=10)

峰号	注射液样品										RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	0.005	0.004	0.004	0.008	0.006	0.006	0.013	0.013	0.007	0.006	-
2	0.013	0.012	0.009	0.027	0.018	0.023	0.056	0.039	0.036	0.018	-
3	1.00	1.00	1.000	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	5.4
4	0.244	0.198	0.197	0.270	0.229	0.236	0.284	0.275	0.279	0.222	14
5	0.094	0.095	0.094	0.081	0.086	0.107	0.135	0.099	0.107	0.108	15
6	0.192	0.201	0.200	0.187	0.193	0.190	0.257	0.183	0.191	0.179	12
7	0.085	0.076	0.080	0.070	0.071	0.098	0.163	0.093	0.099	0.104	22
8	0.012	0.013	0.013	0.017	0.014	0.015	0.019	0.016	0.016	0.016	-
9	0.020	0.016	0.08	0.023	0.020	0.022	0.032	0.024	0.023	0.020	-
10	0.026	0.031	0.033	0.033	0.030	0.032	0.042	0.031	0.034	0.037	-
11	0.056	0.058	0.060	0.051	0.054	0.049	0.065	0.045	0.049	0.042	-
12	0.014	0.011	0.011	0.020	0.016	0.010	0.029	0.021	0.020	0.042	-
总峰数	15	25	24	21	22	19	18	22	23	19	-
共有峰面积/%	99.7	97.0	95.6	95.4	96.5	97.5	95.7	94.9	95.1	95.2	-

根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》^[4]中要求,单峰面积占总峰面积大于或等于20%的共有峰峰3(S峰),相对峰面积RSD小于±20%;单峰面积占总峰面积大于或等于10%,而

小于20%的共有峰峰4、峰6,RSD分别为14%,12%,均小于±25%;单峰面积占总峰面积小于10%,而大于等于5%的共有峰峰5、峰7,RSD分别为15%,22%,均小于±30%;峰面积比值小于5%的共有峰不作要求。

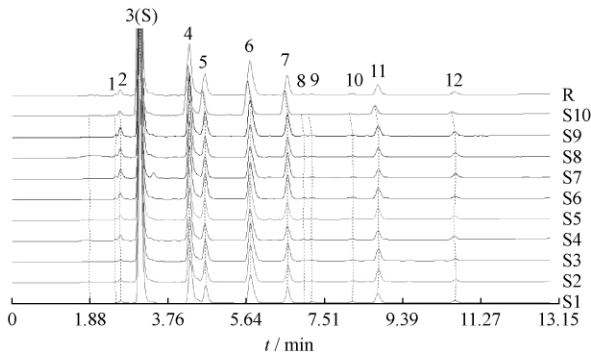


图1 10批心脉隆注射液的指纹图谱和共有模式(R)

Fig. 1 The mathed chromatogram and fingerprint common pattern(R) of 10 batches of Xinmaitong Injection

3.2 指纹图谱相似度分析 指纹图谱相似度测试的方法有很多,这里选用了相关系数法和夹角余弦法对色谱峰峰高、峰面积和全图谱的相似度进行了评价^[7],以1号注射液样品指纹图谱为参照,结果见表3。无论是峰面积、峰高、全图谱相似度都达到0.98以上,说明不同批次心脉隆注射液的色谱图相关性良好。

3.3 药材与注射液的相关性 分别取美洲大蠊药材、心脉隆注射液各5批,按上法操作后进样测定。以1批药材指纹图谱为参照,结果见表4。不同养殖场的美洲大蠊药材不是很稳定,与注射剂的相关

表3 10批心脉隆注射液相似度分析
Tab. 3 The correlation of 10 batches of Xinmaitong Injection

样品	相关系数法 (峰面积)	夹角余弦法 (峰面积)	相关系数法 (峰高)	夹角余弦法 (峰高)	相关系数法 (全图谱)	夹角余弦法 (全图谱)
2	0.999	0.999	0.999	0.999	0.998	0.998
3	0.999	0.999	0.999	0.999	0.998	0.998
4	0.999	0.999	0.999	0.999	0.997	0.997
5	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
6	0.999	0.999	0.999	0.999	0.998	0.998
7	0.989	0.987	0.993	0.991	0.988	0.986
8	0.998	0.998	0.999	0.999	0.999	0.999
9	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
10	0.999	0.999	0.999	0.999	0.994	0.993

表4 5批药材与5批注射液相似度分析
Tab. 4 The correlation of 5 batches of between Xinmailong Injection and medicinal materials

样品	相关系数法 (峰面积)	夹角余弦法 (峰面积)	相关系数法 (峰高)	夹角余弦法 (峰高)	相关系数法 (全图谱)	夹角余弦法 (全图谱)
药材2	0.998	0.998	0.998	0.998	0.990	0.973
药材3	0.937	0.941	0.949	0.950	0.922	0.831
药材4	0.935	0.939	0.948	0.949	0.926	0.854
药材5	0.933	0.937	0.949	0.949	0.923	0.854
注射液1	0.944	0.938	0.961	0.951	0.920	0.830
注射液2	0.928	0.932	0.944	0.945	0.917	0.824
注射液3	0.928	0.932	0.944	0.945	0.915	0.825
注射液4	0.933	0.935	0.949	0.947	0.920	0.841
注射液5	0.929	0.933	0.946	0.946	0.918	0.832

性不是很好。如表4相似度分析,虽然峰面积和峰高相似达到0.90以上,但是夹角余弦法分析全图谱的相似度不是很高,一方面不同批次的美洲大蠊药材之间相似度低于0.90,另一方面药材与注射剂

之间相似度也低于0.90。

4 讨论

心脉隆注射液成分复杂,从药材和制剂制备供试品液,应尽可能保留核苷类成分,去除制剂的添加

成分和污染反相色谱柱的部分。根据核苷碱基的性质,拟采用离子交换色谱法制备供试品溶液。王利春等采用阳离子交换树脂纯化美洲大蠊药材中核苷类物质^[8]。因核苷碱基具有离解基团如NH-CO或咪唑基中的-NH-,具有弱碱性;在pH值约9.0时,核苷碱基可交换吸附在强碱性阴离子交换柱上,用乙酸洗脱核苷碱基,从而达到纯化目的。故本实验选用强碱性阴离子交换树脂。该样品纯化方法可靠,连续10次纯化的样品图谱相似度可达到0.94以上,共有峰的相对保留时间的RSD低于1.8;相对峰面积的RSD值为4.3%。色谱条件采用甲醇-磷酸盐溶液为流动相,分离效果较好、各峰分离度较大、基线平稳、保留时间适中。

参照物首选有标准品提供的君药中主要有效成分,其次是其它有效成分,再次是大量存在的指标成分,最后才选一定的内标作为参照物。选择有效成分的优点是可以方便地通过峰值比,控制相对的量比,为以后成分和药效相关性提供一定依据^[5]。故本实验选取了心脉隆注射液中含有量比较高的尿嘧啶为参照物。

中药现代化要求中药注射剂都必须有指纹图谱作为质量标准。心脉隆注射液于2006年取得新药

证书,必须建立指纹图谱。根据其有效成分,本实验做了一定的探索,初步建立的指纹图谱符合《中药注射剂指纹图谱的技术要求(暂行)》,但也发现美洲大蠊药材的质量存在一定问题。

参考文献:

- [1] 李树楠,胡忠. 治疗心血管疾病的药用制剂:中国,94118839.6[P]. 1996-06-12.
- [2] 张利,王梅. 心脉隆注射液质量标准中若干问题的研究[J]. 大理医学院学报,2000,9(3):7-8.
- [3] 罗诚,苏诚,刘彬,等. 康复新凝胶剂的制备与质量控制[J]. 时珍国医国药,2007,18(4):899-901.
- [4] 国家药品监督管理局. 国药管注[2000]348号:关于印发《中药注射剂指纹图谱的技术要求(暂行)》的通知[S]. 2000.
- [5] 曹进,饶毅,沈群,等. 中药注射剂指纹图谱分析[J]. 世界科学技术—中药现代化,2001,3(4):20-25.
- [6] 屠鹏飞. 高效液相色谱法制定中药材和中药注射剂特征指纹图谱的探讨[J]. 中成药,2000,22(7):516.
- [7] 程翼宇,陈闯军,吴永江. 化学指纹图谱的相似性测度及其评价方法[J]. 化学学报,2002,60(11):2017-2021.
- [8] 王利春,孔繁贵,廖军,等. 一种美洲大蠊药材及其提取物指纹图谱质量测定方法:中国,2008101167730[P]. 2008-12-10.

磁石的X射线衍射 Fourier 指纹图谱研究

傅兴圣¹, 刘训红^{1*}, 林瑞超², 王伯涛³, 许虎¹, 吴德康¹, 刘圣金¹

(1. 南京中医药大学,江苏南京210046; 2. 中国药品生物制品检定所,北京1000503; 3. 南京工业大学,江苏南京211816)

摘要:目的 建立磁石的X射线衍射(XRD) Fourier 指纹图谱分析方法。方法 采用粉末X射线衍射(XRD)技术对矿物药磁石进行分析,测定其XRD Fourier 指纹图谱,并作模糊聚类法分析和相似度评价。结果 初步建立了以11个共有峰为特征指纹信息的12批磁石的XRD Fourier 指纹图谱分析方法,其中4号峰和7号峰分别为石英和四氧化三铁的特征峰;所分析样品XRD Fourier 指纹图谱的相似度为0.849~0.998;少数样品XRD Fourier 图谱的峰数目和峰强有一定差异;生品与煨制品的XRD Fourier 图谱有明显差异。结论 XRD Fourier 指纹谱分析法可用于磁石药材的鉴定与分析。

关键词:磁石; X射线衍射; 指纹图谱

中图分类号:R284.1

文献标志码:A

文章编号:1001-4528(2011)10-1652-06

X-ray diffraction Fourier fingerprint of Magnetitum

收稿日期:2010-08-31

基金项目:国家十一五科技支撑计划项目(2006BAI55B02)

作者简介:傅兴圣(1986—)男,硕士生,研究方向:中药品质评价研究。E-mail:hlhfxs@163.com。

* 通信作者:刘训红,教授。Tel:(025)85811511 E-mail:liuxunh1959@sohu.com。