

不同产地龙血竭中5种成分的HPLC法测定

秦建平^{1,2}, 吴建雄^{1,2}, 李家春^{1,2}, 毕宇安^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要:目的 建立龙血竭的5种成分定量分析方法,为科学评价和有效控制龙血竭的质量提供依据。方法 采用Phenomenex Kinetex C₁₈柱(100 mm×4.6 mm, 2.6 μm),以乙腈-水梯度洗脱,体积流量:1.7 mL/min,柱温:40℃,检测波长为280 nm和325 nm。结果 白藜芦醇、7,4'-二羟基黄酮、龙血素A、龙血素B和紫檀芪分别在7.76~248.4 μg/mL ($r=0.999\ 9$)、6.84~219 μg/mL ($r=1.000\ 0$)、5.75~184 μg/mL ($r=1.000\ 0$)、10.08~322.6 μg/mL ($r=1.000\ 0$)和23.71~758.6 μg/mL ($r=0.999\ 8$)呈良好的线性关系,平均回收率分别为97.61%、99.24%、102.72%、101.75%、102.65%,RSD值分别为1.16%、0.87%、0.86%、0.49%、1.10%。结论 本方法快速、简便、准确,其结果可为龙血竭质量标准的制定提供一定的依据。

关键词: 龙血竭; 白藜芦醇; 7,4'-二羟基黄酮; 龙血素A; 龙血素B; 紫檀芪; 高效液相色谱法

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2013)04-0547-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.04.019

Determination of five components in *Draconis Resina* from different habitats by HPLC

QIN Jian-ping^{1,2}, WU Jian-xiong^{1,2}, LI Jia-chun^{1,2}, BI Yu-an^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd, Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Process New-tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To establish a quantitative analysis method for the determination of multi-components in *Draconis Resina*, and to provide a evidence for the scientific evaluation and effective quality control of *Draconis Resina*. **Methods** Phenomenex Kinetex C₁₈ column (100 mm × 4.6 mm, 2.6 μm) was used with a mobile phase of acetonitrile-water gradient elution. The flow rate was 1.7 mL/min, the column temperature was 40℃, and the detection wavelengths were 280 and 325 nm. **Results** The linear ranges of resveratrol, 7,4'-dihydroxy flavone, loureirin A, loureirin B, and pterostilbene were 7.76—248.4 μg/mL ($r = 0.999\ 9$), 6.84—219 μg/mL ($r = 1.000\ 0$), 5.75—184 μg/mL ($r = 1.000\ 0$), 10.08—322.6 μg/mL ($r = 1.000\ 0$), and 23.71—758.6 μg/mL ($r = 0.999\ 8$), respectively. The average recoveries of the five components were 97.61%, 99.24%, 102.72%, 101.75%, and 102.65% with RSD values of 1.16%, 0.87%, 0.86%, 0.49%, and 1.10%. **Conclusion** The method is rapid, simple, and accurate, and could be used for the quality control of *Draconis Resina*.

Key words: *Draconis Resina*; resveratrol; 7,4'-dihydroxy flavone; loureirin A; loureirin B; pterostilbene; HPLC

龙血竭是百合科龙血树属植物剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen 含脂木材的乙醇提取物^[1],为名贵中药材之一。龙血竭的化学成分以酚类化合物为特征,酚类化合物也是其主要的活性成分^[2],包括以7,4'-二羟基黄酮为代表的黄酮类化合物,以龙血素A和龙血素B为代表的

二氢查耳酮类化合物,以白藜芦醇和紫檀芪为代表的二苯乙烯类化合物。现有的方法仅对龙血竭进行定性的指纹图谱检测^[3-4]或仅对一两个已知化合物(如龙血素A和B、紫檀芪)进行测定^[5-7]。本实验采用HPLC法建立了同时测定5个指标成分的方法,并对不同产地的龙血竭进行了比较性研究,为

收稿日期: 2013-04-17

基金项目: 国家科技部重大新药创制项目(2013ZX09402203, 2011ZX09401-097)

作者简介: 秦建平(1979—),女,工程师,研究方向: 中药质量标准研究。Tel: (0518) 85521932 E-mail: jianpingqin@gmail.com

*通信作者 萧伟,男,博士,研究员级高级工程师。研究方向为中药新剂型的研究与开发。Tel: (0518) 85521956 E-mail: wzzh-nj@tom.com

全面控制龙血竭药材的质量提供了依据。

1 仪器和试剂

Agilent 1290 超高压液相色谱仪, DAD 紫外检测器; Mettler AE240 电子分析天平; BP211D 型电子分析天平; Centrifuge 5415D 高速离心机; Milli-Q Academic 纯水机; KQ—250DB 型超声波清洗仪。

龙血素 A (批号 111660-200402, 供含量测定用)、龙血素 B (批号 111558-200303, 供含量测定用)、7,4'-二羟基黄酮 (批号 111787-201002, 供含量测定用) 对照品购自中国食品药品检定研究院, 紫檀芪对照品 (批号 20110723, 质量分数 > 99%, 杭州广林生物医药科技有限公司)、白藜芦醇对照品 (质量分数 > 99%, 陕西永健制药有限公司), 乙腈、三氟乙酸 (色谱纯, 美国天地公司), 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

9 批龙血竭药材来自云南、广西和国外进口, 经江苏康缘药业股份有限公司质量部鉴定为剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen 的含脂木材经提取得到的树脂。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

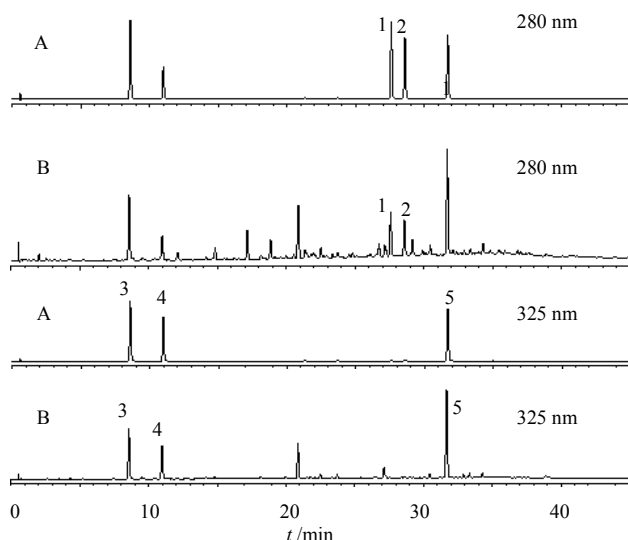
色谱柱: Phenomenex Kinetex C₁₈ 柱 (100 mm × 4.6 mm, 2.6 μm); 流动相为乙腈 (A) - 水溶液 (B) 梯度洗脱, 线性洗脱程序为 0 ~ 12 min 13% → 18%A, 12 ~ 22 min 18% → 28%A, 22 ~ 35 min 28% → 40%A, 35 ~ 45 min 40%A; 体积流量: 1.7 mL/min; 检测波长为 280 nm (龙血素 A 和龙血素 B) 和 325 nm (白藜芦醇、7,4'-二羟基黄酮和紫檀芪); 柱温: 40 °C; 进样量: 5 μL。理论板数按龙血素 B 峰计算应不低于 100 000。见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

取白藜芦醇、7,4'-二羟基黄酮、龙血素 A、龙血素 B 和紫檀芪对照品适量, 精密称定, 加 70% 乙醇制成含白藜芦醇 50 μg/mL、7,4'-二羟基黄酮 40 μg/mL、龙血素 A 30 μg/mL、龙血素 B 50 μg/mL、紫檀芪 140 μg/mL 的混合溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取本品粉末约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 50 mL, 称定质量, 超声 (250 W, 40 kHz) 提取 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 70% 乙醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液过 0.22 μm 滤膜, 即得。



1-龙血素 A 2-龙血素 B 3-白藜芦醇 4-7,4'-二羟基黄酮 5-紫檀芪
1-loureirin A 2-loureirin B 3-resveratrol 4-7,4'-dihydroxy flavone
5-pterostilbene

图 1 混合对照品 (A) 和供试品 (B) 的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and sample (B)

2.4 线性关系考察

取白藜芦醇、7,4'-二羟基黄酮、龙血素 A、龙血素 B 和紫檀芪对照品适量, 精密称定, 加 70% 乙醇制成含白藜芦醇 496.8 μg/mL、7,4'-二羟基黄酮 438 μg/mL、龙血素 A 368 μg/mL、龙血素 B 645.2 μg/mL、紫檀芪 1 517.2 μg/mL 的混合对照品溶液, 将其作为母液用 70% 乙醇逐倍稀释。分别精密吸取 5 μL, 注入液相色谱仪, 测定。以进样质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程, 分别为 $Y=16.906 X-3.701$, $r=0.999 9$; $Y=15.722 X+0.452 2$, $r=1.000 0$; $Y=10.217 X-1.162$, $r=1.000 0$; $Y=8.106 X-2.452$, $r=1.000 0$ 和 $Y=14.575 X-2.681$, $r=0.999 8$ 。结果表明白藜芦醇、7,4'-二羟基黄酮、龙血素 A、龙血素 B 和紫檀芪分别在 7.76 ~ 248.4、6.84 ~ 219、5.75 ~ 184、10.08 ~ 322.6、23.71 ~ 758.6 μg/mL 呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取同一供试品 (1 号样品) 溶液连续进样 6 针, 以峰面积计算白藜芦醇、7,4'-二羟基黄酮、龙血素 A、龙血素 B 和紫檀芪的 RSD 值分别为 1.91%、0.43%、0.18%、0.18%、0.84%。

2.6 稳定性试验

取同一混合对照品溶液, 精密吸取 5 μL, 分别

于 0、3、6、10、16、20、24 h 注入高效液相色谱仪,以峰面积计算各指标成分 RSD 值,分别为白藜芦醇 0.32%、7,4'-二羟基黄酮 0.75%、龙血素 A 0.26%、龙血素 B 0.24%和紫檀芪 1.19%。取同一样品(1 号样品)粉末约 0.5 g,精密称定,制备供试品溶液,精密吸取 5 μ L,分别于 0、3、6、10、16、20、24 h 注入高效液相色谱仪,以峰面积计算各指标成分 RSD 值,分别为白藜芦醇 1.93%、7,4'-二羟基黄酮 0.58%、龙血素 A 1.11%、龙血素 B 0.78%和紫檀芪 1.22%。结果表明对照品溶液和供试品溶液放置 24 h 稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一样品(1 号样品)粉末约 0.5 g,精密称定,制备供试品溶液,平行制备 6 份,测定,计算,结果白藜芦醇、7,4'-二羟基黄酮、龙血素 A、龙血素 B 和紫檀芪的平均质量分数分别为 0.64%、0.53%、0.44%、0.76%、1.89%,RSD 值分别为 2.03%、0.79%、1.74%、1.15%、1.24%。

2.8 回收率试验

取 1 号样品粉末 6 份,每份约 0.25 g,精密称定,分别精密加入混合对照品溶液(含白藜芦醇 496.8 μ g/mL、7,4'-二羟基黄酮 438 μ g/mL、龙血素 A 368 μ g/mL、龙血素 B 645.2 μ g/mL、紫檀芪 1 517.2 μ g/mL) 3 mL,制备供试品溶液,注入高效液相色谱仪,测定,计算回收率,分别为 97.61%、99.24%、102.72%、101.75%、102.65%,RSD 值分别为 1.16%、0.87%、0.86%、0.49%、1.10%。

2.9 测定结果

取收集的 9 批龙血竭药材,制备供试品溶液,进样分析,分别计算 5 种成分,结果见表 1。可见不同产地的龙血竭药材化学成分差异较小,整体质量无较大差异。

3 讨论

通过 DAD 检测器在 190~400 nm 全扫描,根据白藜芦醇、7,4'-二羟基黄酮、龙血素 A、龙血素 B 和紫檀芪的最大吸收波长及吸收曲线,选择 280 nm 测定龙血素 A 和龙血素 B,325 nm 测定白藜芦醇、7,4'-二羟基黄酮和紫檀芪,并且对 5 个指标成分进行了峰纯度验证,结果表明所确定的检测条件下

样品中所测定的 5 个成分不含其他干扰成分。

表 1 龙血竭药材中有效成分的测定结果(n=2)

Table 1 Determination of active components in *Draconis Resina* (n=2)

样品	产地	质量分数/%				
		白藜芦醇	7,4'-二羟基黄酮	龙血素 A	龙血素 B	紫檀芪
1	进口	0.64	0.53	0.44	0.76	1.89
2	进口	0.52	0.50	0.43	0.69	1.76
3	云南	0.96	0.67	0.56	0.58	1.87
4	广西	0.54	0.49	0.31	0.71	1.75
5	进口	0.47	0.46	0.70	0.66	1.06
6	云南	0.46	0.44	0.36	0.65	1.05
7	云南	0.53	0.53	0.51	0.60	1.75
8	广西	0.68	0.41	0.67	0.52	1.10
9	进口	0.59	0.50	0.46	0.71	1.28

通过考察不同品牌色谱柱,结果表明 Phenomenex Kinetex C₁₈ 色谱柱(100 mm×4.6 mm, 2.6 μ m)能使各色谱峰分离较好,且缩短了分析时间。对供试品溶液的制备方法、不同流动相系统、柱温、流速及不同仪器均进行了考察,结果表明本文所采用的检测方法耐用性良好。

参考文献

- [1] 国家药品监督管理局标准 [S]. WS3-082(Z-016)-99(Z). 1999.
- [2] 刘芳,戴荣继,邓玉林,等. 龙血竭化学成分研究进展 [J]. 中国药房, 2010, 21(15): 1437-1439.
- [3] 周艳林,蒋受军,文建文,等. 龙血竭特征成分对照指纹图谱研究 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(12): 3080.
- [4] 颜月园,萧伟,吴云,等. 散结镇痛胶囊中黄酮类成分的指纹图谱研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 58-61.
- [5] 胡迎庆,韩慧文,宋月英,等. 不同工艺提取龙血竭中紫檀芪的含量测定 [J]. 中成药, 2002, 24(8): 616-618.
- [6] 张晓燕,杨晓明,闫广利,等. 龙血竭缓释滴丸的质量标准研究 [J]. 中医药信息, 2011, 28(2): 37-39.
- [7] 李云,萧伟,秦建平,等. HPLC 测定龙血竭提取物中龙血素 A、B 和 7,4'-二羟基黄酮的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 45-47.