

一测多评法测定龙血竭中5种有效成分

万青^{1,2}, 王文清¹, 方建国¹, 熊慧², 梅之南^{2*}

1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 药学部, 湖北 武汉 430030

2. 中南民族大学药学院, 湖北 武汉 430074

摘要: 目的 建立龙血竭中5种有效成分的一测多评法, 探讨一测多评法在龙血竭质量控制中的应用。方法 采用高效液相色谱法, 使用 Fortis Xi C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈(A)-1.0%冰醋酸水溶液(B), 梯度洗脱, 0~10 min, 25%~30% A; 10~60 min, 30%~50% A, 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 278 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。以紫檀芪为内参, 分别建立7,4'-二羟基黄酮、白藜芦醇、龙血素A和龙血素B相对于紫檀芪的相对校正因子, 分别采用外标法和一测多评法测定5种成分的量, 并比较二者结果的相对误差。结果 7,4'-二羟基黄酮质量浓度在 10.23~102.27 μg/mL、白藜芦醇质量浓度在 11.01~110.14 μg/mL、龙血素A质量浓度在 9.47~94.72 μg/mL、龙血素B质量浓度在 11.59~115.90 μg/mL、紫檀芪质量浓度在 24.35~243.52 μg/mL 线性关系良好; 4种化学成分相对于紫檀芪的相对校正因子分别为 0.626、1.064、1.154、0.837; 且在不同实验条件下耐用性良好 (RSD<3.0%); 一测多评法的计算结果与外标法测得结果无显著差异。结论 建立的一测多评法可作为龙血竭中5种有效成分的测定方法, 一测多评法为龙血竭质量控制提供了新的模式与方法。

关键词: 一测多评; 龙血竭; 7,4'-二羟基黄酮; 白藜芦醇; 龙血素A; 龙血素B; 紫檀芪

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)21-4541-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.21.028

Determination of five active components in *Draconis Resina* by QAMS method

WAN Qing^{1,2}, WANG Wen-qing¹, FANG Jian-guo¹, XIONG Hui², MEI Zhi-nan²

1. Department of Pharmacy, Tongji, Hospital Affiliated to the Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

2. College of Pharmacy, South Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

Abstract: Objective To establish a quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) for determination of five active components in *Draconis Resina* and discuss application of QAMS in quality control of ethnic medicines. **Methods** Using the method of HPLC, the Fortis Xi C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was composed of acetonitrile (A)-1.0% acetic acid (B) with gradient elution (0—10 min, A: 25%→30%; 10—60 min, A: 30%→50%) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 278 nm, the column temperature was 30 °C and the sample size was 10 μL. Pterostilbene was selected as an internal standard to establish the relative correction factors (RCFs) of 7,4'-dihydroxyflavone, resveratrol, loureirin A, and loureirin B with reference to pterostilbene so as to achieve simultaneous determination of multi-indexed components. The contents of five active components were determined by both external standard method (ESM) and QAMS. Meanwhile, relative error (RE) between QAMS and ESM was analyzed to evaluate QAMS method. **Results** There were good linearities in the range of 10.23—102.27 μg/mL for 7,4'-dihydroxyflavone, 11.01—110.14 μg/mL for resveratrol, 9.47—94.72 μg/mL for loureirin A, 11.59—115.90 μg/mL for loureirin B and 24.35—243.52 μg/mL for pterostilbene, RCFs of 7,4'-dihydroxyflavone, resveratrol, loureirin A and loureirin B with reference to pterostilbene were 0.626, 1.064, 1.154, and 0.837 respectively, and repeatability was good in different experimental conditions (RSD < 3.0%). There were no significant difference between the quantitative results of the two methods. **Conclusion** QAMS method is feasible, credible, and can be used to determine multiple components in *Draconis Resina*. QAMS can be adopted as a novel strategy for quality control of ethnic medicines.

Key words: quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS); *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen; 7,4'-dihydroxyflavone; resveratrol; loureirin A; loureirin B; pterostilbene

收稿日期: 2017-05-26

基金项目: 湖北省自然科学基金创新群体项目 (2013CFA013)

作者简介: 万青 (1990—), 女, 硕士, 研究方向为中药质量分析。Tel: 13554442811 E-mail: wanqingyc1990@163.com

*通信作者 梅之南 (1970—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为创新民族药物的研究与开发。Tel: (027)67843713 E-mail: meizhinan@163.com

龙血竭系百合科龙血树属植物剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen 的含脂木材经提取得到的树脂。其具有活血散瘀、定痛止血，敛疮生肌等功效^[1]，习称“国产血竭”，主产于云南南部和广西南部，常见于石缝间，山势险峻，坡度较陡的环境。云南金平、勐腊、景洪、思茅、普洱、景谷、孟连、沧源、镇康、耿马等地通称为“岩棕”，基诺族称“雅波德”，傣族称“埋嘎筛”，爱伲族称“来筛”，广西称为“山海带”^[2-3]。在傣药中广泛用于跌打损伤、瘀血作痛、妇女气血凝滞、外伤出血，瘰疬久不收口^[4]。现代药理学研究表明，龙血竭具有抗炎、镇痛、抗血小板聚集、改变血液流变学、降低 NOS 活性等多种作用^[5-10]，黄酮类化合物是其主要的活性成分^[11-13]。

目前，《广西壮族自治区壮药质量标准》对龙血竭的规定无定量测定项^[14]，局颁标准 WS3-082 (Z-016) -99 (Z) 中的测定项仅控制了龙血素 B 的量^[11]，不能有效地控制其质量。现已有 HPLC 法测定龙血竭中龙血素 A、龙血素 B、白藜芦醇、紫檀芪和 7,4'-二羟基黄酮量的报道^[15-21]，但多为外标法，使得龙血竭多指标测定的检验成本较高。因此，本实验拟采用一测多评模式，建立同时测定龙血竭中 5 种有效成分量的方法，为该类药材及其制剂的质量控制和相关标准的完善提供理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

戴安 UltiMate 3000 戴安液相色谱仪 (DAD 检测器，自动进样器，四元梯度泵，柱温箱，Chromelone 色谱工作站); AB265-S 型电子天平(瑞士 MettlerToledo 公司); KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); ASWO-0005-U 超纯水系统(重庆颐洋企业发展有限公司); 乙腈为色谱纯(美国 Tedia 公司)，水为超纯水，其他试剂均为分析纯。

龙血素 A (批号 111660-200402)、龙血素 B (批号 111558-201407)、白藜芦醇 (批号 111535-200502)、7,4'-二羟基黄酮 (批号 111787-201002) 均购于中国食品药品检定研究院，质量分数大于 98%。紫檀芪 (批号 140625) 购于四川省维克奇生物科技有限公司，经 HPLC 测定其质量分数大于 98%。

1.2 药材

3 批龙血竭分别购于厂家 A (批号 150621)、厂家 B (批号 140516)、厂家 C (批号 150705)，经中南民族大学药学院刘新桥副教授鉴定为百合科龙血树属植物剑叶龙血树 *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 对照品溶液的制备

精密称取 7,4'-二羟基黄酮 15.98 mg、白藜芦醇 17.21 mg、龙血素 A 14.80 mg、龙血素 B 18.11 mg、紫檀芪 38.05 mg，分别置 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，作为储备液。

精密量取上述各储备液 8.0 mL，置于 50 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得含有 7,4'-二羟基黄酮 0.255 7 mg/mL、白藜芦醇 0.275 4 mg/mL、龙血素 A 0.236 8 mg/mL、龙血素 B 0.289 8 mg/mL、紫檀芪 0.608 8 mg/mL 混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取龙血竭药材粉末 0.25 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 50 mL，密塞，称定质量，超声 (功率 250 W，频率 40 kHz) 处理 30 min，放冷，再次称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱：Fortis Xi C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈 (A)-1.0%冰醋酸水溶液 (B)，梯度洗脱，0~10 min, 25%~30% A; 10~60 min, 30%~50% A；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 278 nm；柱温 30 °C；进样量 10 μL。

分别取空白溶剂、混合对照品和供试品溶液，进样 10 μL，按照上述色谱条件进行测定，7,4'-二羟基黄酮、白藜芦醇、龙血素 A、龙血素 B、紫檀芪与相邻色谱峰的分离度均大于 1.5，色谱图见图 1。

2.4 方法学验证

2.4.1 线性关系考察 分别精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液 0.4、0.8、1.0、2.0、4.0 mL 置 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，各进样 10 μL，按照上述色谱条件测定峰面积。以对照品的质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，计算回归方程，各成分回归方程、线性范围见表 1。

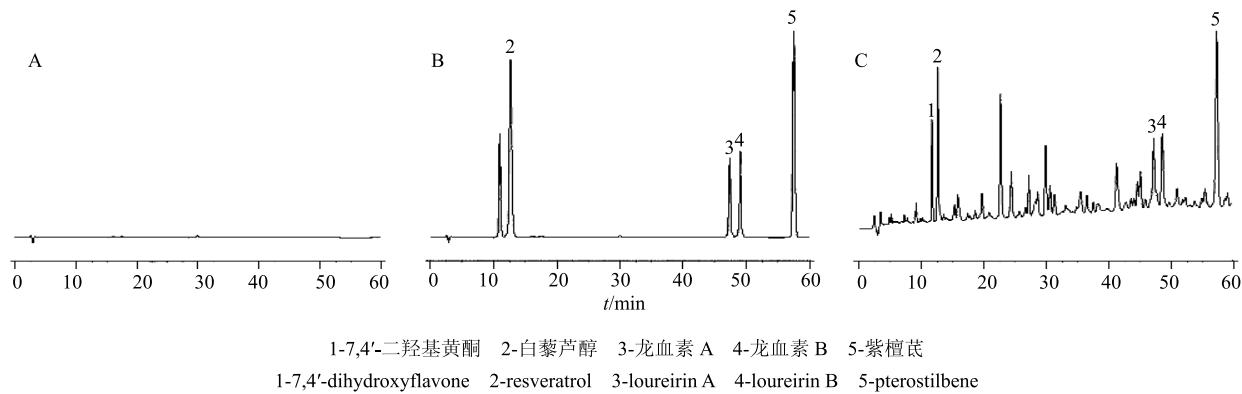


图1 阴性对照(A)、混合对照品(B)、样品(C)色谱图

Fig. 1 HPLC of negative samples (A), mixed reference substances (B), and samples (C)

表1 线性关系考察结果

Table 1 Result of linear relationship determination

成分	回归方程	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	<i>r</i>
7,4'-二羟基黄酮	$Y=295.82 X+0.199\bar{8}$	10.23~102.27	0.999 4
白藜芦醇	$Y=503.05 X+0.367\bar{1}$	11.01~110.14	0.999 2
龙血素 A	$Y=540.36 X+0.111\bar{0}$	9.47~94.72	0.999 7
龙血素 B	$Y=392.37 X+0.291\bar{5}$	11.59~115.90	0.999 6
紫檀芪	$Y=471.46 X+0.429\bar{0}$	24.35~243.52	0.999 1

2.4.2 精密度试验 精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摆匀, 进样 10 μL , 按照上述色谱条件, 连续测定 6 次, 记录峰面积, RSD 分别为 0.32%、0.51%、0.67%、0.33%、0.72%, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 精密吸取“2.2”项下的供试品溶液 10 μL , 分别于配制后的 0、2、4、6、8、12 h 后注入高效液相色谱仪, 测定峰面积, RSD 分别为 1.04%、1.15%、0.94%、1.19、1.01%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 取同一批龙血竭药材(批号 150621)粉末 6 份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 测定峰面积, 按外标法计算 7,4'-二羟基黄酮、白藜芦醇、龙血素 A、龙血素 B 和紫檀芪的平均质量分数分别为 0.642%、0.688%、0.597%、0.687%、1.565%, RSD 分别为 1.56%、1.72%、1.25%、1.68%、0.98%, 结果表明重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 取已测定各成分量的同一批龙血竭药材(批号 150621)粉末 0.125 g, 共 9 份, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 平均分为 3 组, 分别加入混合对照品溶液 2.0、3.0、4.0 mL, 加甲醇至 50 mL, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液,

按上述色谱条件测定峰面积, 计算加样回收率。7,4'-二羟基黄酮的平均加样回收率为 99.05%, RSD 为 1.54%; 白藜芦醇的平均加样回收率为 99.49%, RSD 为 1.84%; 龙血素 A 的平均加样回收率为 97.25%, RSD 为 1.50%; 龙血素 B 的平均加样回收率为 97.11%, RSD 为 1.57%; 紫檀芪的平均加样回收率为 99.93%, RSD 为 1.44%。表明该方法的准确度良好。

2.5 相对校正因子的测定

2.5.1 待测成分相对校正因子的测定 精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摆匀, 分别进样 1、2、4、6、8、10、12 μL , 平行测定 2 次, 根据相对校正因子计算公式^[20]分别计算各待评价成分与紫檀芪间的相对校正因子。结果 7,4'-二羟基黄酮、白藜芦醇、龙血素 A 和龙血素 B 的相对校正因子分别为 0.626、1.064、1.154、0.837。

2.5.2 不同色谱柱对相对校正因子的影响 采用 UltiMate 3000 HPLC 系统, 考察不同色谱柱 [A 柱: Fortis Xi C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); B 柱: YMC-Pack ODS-A 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); C 柱: Kromasil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)]

对各组分相对校正因子的影响。结果采用 A 柱的 7,4'-二羟基黄酮、白藜芦醇、龙血素 A 和龙血素 B 相对校正因子分别为 0.626、1.064、1.154、0.837；采用 B 柱的 7,4'-二羟基黄酮、白藜芦醇、龙血素 A 和龙血素 B 相对校正因子分别为 0.608、1.015、1.193、0.805；采用 C 柱的 7,4'-二羟基黄酮，白藜芦醇，龙血素 A 和龙血素 B 相对校正因子分别为 0.641、1.038、1.172、0.815。3 种色谱柱求得各成分间相对校正因子的 RSD<3%。

2.5.3 不同体积流量对相对校正因子的影响 采用 Fortis Xi C₁₈ 柱，考察体积流量为 0.8、1.0、1.2 mL/min 时的相对校正因子。结果体积流量为 0.8 mL/min 时 7,4'-二羟基黄酮、白藜芦醇、龙血素 A 和龙血素 B 的相对校正因子分别为 0.639、1.089、1.132、0.801；体积流量为 1.0 mL/min 时 7,4'-二羟基黄酮、白藜芦醇、龙血素 A 和龙血素 B 相对校正因子分别为 0.626、1.064、1.154、0.837；体积流量为 1.2 mL/min 时 7,4'-二羟基黄酮、白藜芦醇、龙血素 A 和龙血素 B 相对校正因子分别为 0.616、1.029、1.176、0.812。3 种体积流量下求得各成分相对校正因子的 RSD<3%。

2.5.4 不同柱温对相对校正因子的影响 采用 Fortis Xi C₁₈ 柱，考察柱温为 25、30、35 °C 时的相对校正因子。结果柱温为 25 °C 时 7,4'-二羟基黄酮、白藜芦醇、龙血素 A 和龙血素 B 相对校正因子分别

为 0.636、1.077、1.187、0.845；柱温为 30 °C 时 7,4'-二羟基黄酮、白藜芦醇、龙血素 A 和龙血素 B 的相对校正因子分别为 0.626、1.064、1.154、0.837；柱温为 35 °C 时 7,4'-二羟基黄酮、白藜芦醇、龙血素 A 和龙血素 B 的相对校正因子分别为 0.651、1.033、1.208、0.805。3 种柱温中求得各成分相对校正因子的 RSD<3%。

2.6 一测多评法待测色谱峰的定位

本研究利用相对保留值法 [$R_{m/k} = t_{R(m)}/t_{R(k)}$] 以及各峰的紫外吸收特征来准确定位各成分，供试品溶液中各成分峰的紫外吸收特征与各对照品峰的紫外吸收特征一致。测得 7,4'-二羟基黄酮，白藜芦醇，龙血素 A 和龙血素 B 的相对保留时间分别为 0.204、0.220、0.824、0.848，RSD 分别为 1.37%、0.92%、0.85%、1.06%。

2.7 一测多评法与外标法测定结果的比较

分别精密称定 3 个不同厂家龙血竭药材粉末，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，测定峰面积，采用外标法计算龙血竭中 7,4'-二羟基黄酮，白藜芦醇，龙血素 A，龙血素 B 和紫檀芪的量，并将测定的结果与一测多评法计算的结果比较，验证一测多评法用于龙血竭中 5 种有效成分测定的准确性。结果 2 种方法测定的结果的相对误差 (RE) 均小于 3.0%，表明一测多评法用于龙血竭中 5 种有效成分的量测定是可行的。结果见表 2。

表 2 一测多评法与外标法测得龙血竭中 5 种化学成分的质量分数 (n=3)

Table 2 Contents of five flavones determined by external standard method and QAMS (n=3)

来源	紫檀芪/% (外标法)	7,4'-二羟基黄酮/%				白藜芦醇/%				龙血素 A/%				龙血素 B/%			
		外标法	一测多评法	RE	外标法	一测多评法	RE	外标法	一测多评法	RE	外标法	一测多评法	RE	外标法	一测多评法	RE	
厂家 A	1.565	0.642	0.651	1.40	0.688	0.679	-1.31	0.597	0.612	2.51	0.687	0.679	-1.16				
厂家 B	0.736	1.065	1.072	0.66	0.621	0.625	0.64	0.177	0.182	2.82	0.789	0.794	0.63				
厂家 C	1.265	0.309	0.313	1.29	1.343	1.351	0.60	0.455	0.453	-0.44	1.241	1.255	1.13				

3 讨论

本实验采用二极管阵列检测器，在 190~400 nm 波长下对供试品溶液中的待测成分和混合对照品溶液进行了全波长扫描，结果龙血素 A 和龙血素 B 的最大吸收波长均为 278 nm，7,4'-二羟基黄酮的最大吸收波长为 328 nm，白藜芦醇和紫檀芪则在 307 nm 和 319 nm 处有最大吸收。鉴于 7,4'-二羟基黄酮、白藜芦醇和紫檀芪的量较高，且在 300 nm 以上时，龙血素 A 和龙血素 B 的吸收较差，兼顾 5 个化学成分的灵敏度，选择 278 nm 作为检测波长，

各待测成分色谱峰分离度良好。

紫檀芪是龙血竭中的主成分之一，也是龙血竭抗癌、抗氧化作用的主要活性成分^[22-23]，且对照品相对价廉易得，稳定性较好，在供试品溶液中量较高，故选择紫檀芪为内参物，建立与其他待测成分间的相对校正因子，能更好的体现一测多评法简便、易操作、低成本特点。

实验结果表明，不同厂家生产的龙血竭中同一指标成分量差异显著，厂家 A 生产的龙血竭中紫檀芪量最高；厂家 B 所产的龙血竭中龙血素 A 的量较

低；厂家C提供的龙血竭中则主要含有龙血素B、紫檀芪和白藜芦醇。本研究以紫檀芪为内参，分别建立7,4'-二羟基黄酮、白藜芦醇、龙血素A和龙血素B相对于紫檀芪的相对校正因子，建立一测多评法同时测定龙血竭中5种有效成分的量，与传统外标法所得实测值间无显著差异，不同实验条件下耐用性良好($RSD < 3.0\%$)。表明在对照品缺乏的情况下，一测多评法用于龙血竭中5种有效成分的含量测定是可行的，可以更准确、方便、全面地控制药材及制剂的质量，保证药效稳定、可靠。

参考文献

- [1] 石 聪, 于浩飞, 胡炜彦, 等. 进口血竭与国内血竭的研究对比 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(S1): 4790-4792.
- [2] 罗文扬, 罗 萍, 雷新涛. 珍稀濒危龙血竭基源植物—龙血树 [J]. 中国种业, 2008(3): 57-59.
- [3] 文东旭. 龙血竭的研究进展 [J]. 中草药, 2001, 32(11): 96-97.
- [4] 钟月平. 中药龙血竭的临床应用及研究进展 [J]. 现代中西医结合志, 2010, 19(19): 2469-2470.
- [5] 陈 素, 吴水才, 曾 穗, 等. 龙血竭总黄酮抗炎镇痛作用及其镇痛机制探讨 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(5): 1030-1032.
- [6] 方伟蓉, 李运曼, 邓嘉元. 龙血竭总黄酮对动物心肌缺血的保护作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(9): 1020-1024.
- [7] 陈福锋, 郑亚男, 杜文杰, 等. 龙血竭胶囊抗慢性血瘀证作用的研究 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(3): 274-278.
- [8] 陶鑫焱, 李小毛, 龚再玉. 龙血竭胶囊对早孕绒毛组织中一氧化氮合酶的影响 [J]. 现代预防医学, 2007, 34(12): 2222-2223.
- [9] 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.
- [10] 陈福锋, 郑亚男, 杜文杰, 等. 龙血竭胶囊抗慢性血瘀证作用的研究 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(3): 274-278.
- [11] 屠鹏飞, 王钰芳, 邵 杰, 等. 龙血竭中黄酮类成分提取工艺研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 30-32.
- [12] 王建壮, 吕华冲. 比色法测定龙血竭总黄酮含量 [J]. 中国实验方剂学志, 2013, 19(16): 55-58.
- [13] 广西壮族自治区壮药质量标准 (第一卷) [S]. 2008.
- [14] 许 佳, 金红宇, 孙 磊. 替代对照品法测定龙血竭原料中龙血素A和B的含量 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(11): 2058-2062.
- [15] 李忠琼, 向 东. HPLC 测定龙血竭中龙血素A和龙血素B的含量 [J]. 华西药学杂志, 2005, 20(4): 348-349.
- [16] 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): 48-50.
- [17] 刘立权. HPLC 法同时测定龙血竭片中龙血素A、龙血素B 和白藜芦醇的含量 [J]. 中国药房, 2013, 24(36): 3442-3444.
- [18] 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.
- [19] 李 云, 萧 伟, 秦建平, 等. HPLC 同时测定龙血竭及其提取物中5个有效成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(7): 929-933.
- [20] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925-1928.
- [21] 秦建平, 吴建雄, 李家春, 等. 不同产地龙血竭中5种成分的HPLC 法测定 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 547-549.
- [22] 周艳林, 闵建国, 邹 准, 等. HPLC-DPPH 评价剑叶龙血树中抗氧化活性成分及构效关系 [J]. 中草药, 2015, 46(12): 1797-1799.
- [23] 苏小琴, 李曼曼, 顾宇凡, 等. 龙血竭酚类成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(11): 1511-1514.