

· 化学与分析 ·

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

李云^{1,2}, 萧伟^{2,3*}, 秦建平^{2,3}, 林夏^{2,3}, 王振中^{2,3}

(1. 南京中医药大学, 南京 210000; 2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222001; 3. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏连云港 222001)

[摘要] 目的: 建立龙血竭提取物中龙血素 A, B 和 7,4'-二羟基黄酮的含量测定方法。方法: 采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱流动相乙腈-1% 冰醋酸梯度洗脱, 体积流量 1 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 进样量 10 μL, 检测波长龙血素 A, B 为 278 nm, 7,4'-二羟基黄酮为 330 nm。结果: 龙血素 A, B 和 7,4'-二羟基黄酮分别在 10.05 ~ 60.36 μg, 10.08 ~ 60.48 μg, 3.26 ~ 19.56 μg 呈良好的线性关系; 平均加样回收率分别为 108.6% (RSD 0.99%), 109.6% (RSD 1.03%), 102.7% (RSD 1.24%)。结论: 方法简便易行, 结果准确, 可用于龙血竭提取物的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱; 龙血竭; 龙血素 A; 龙血素 B; 7,4'-二羟基黄酮

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0045-03

Determination of Loureirin A, B and 7,4'-dihydroxy Flavone in Extract of Resina Draconis by HPLC

LI Yun^{1,2}, XIAO Wei^{2,3*}, QIN Jian-ping^{2,3}, LIN Xia^{2,3}, WANG Zhen-zhong^{2,3}

(1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210000, China; 2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungan 222001, China; 3. Jangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd, Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for content determination of loureirin A, B and 7,4'-dihydroxy flavone in extract of resina draconis. **Method:** Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with a step gradient of acetonitrile-1% glacial acetic acid at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The sample amount was 10 μL and the column temperature was maintained at 40 °C. The detection wave length of loureirin A, B was 278 nm and 7,4'-dihydroxy flavone was 330 nm. **Result:** There was good linear relationship in the range of 10.05-60.36 μg for loureirin A ($r = 0.9998$), 10.08-60.48 μg for loureirin B ($r = 0.9998$) and 3.26-19.56 μg for 7,4'-dihydroxy flavone ($r = 0.9998$). The average recovery of loureirin A was 108.6% with relative standard deviation (RSD) of 0.99%, loureirin B was 109.6% with RSD of 1.03%, and 7,4'-dihydroxy flavone was 102.5% with RSD of 1.24%. **Conclusion:** This method is simple, accurate and can be used for quality control of extract of resina draconis.

[Key words] HPLC; resina draconis; loureirin A; loureirin B; 7,4'-dihydroxy flavone

龙血竭是百合科龙血树属植物剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis*(Lour.) S. C. Chen 的含脂

[收稿日期] 20111011(013)

[基金项目] 重大新药创制项目(2011ZX09401-097)

[第一作者] 李云, 研究生, 从事创新中药的研究与开发, Tel: 15062981673, E-mail: liyun3648@163.com

[通讯作者] * 萧伟, 研究员级高级工程师, 博士, 从事中药新剂型的研究与开发, E-mail: wzhzh-nj@tom.com

木材经提取得到的树脂,具有活血散瘀、止痛、止血、生肌敛疮等功效。内服主治瘀血肿痛、经闭、痛经,外用主治外伤出血、溃疡不敛、痔漏肿痛^[1]。龙血竭含有黄酮类、皂苷类、萜类、酚类、有机酸、酯类和挥发油等成分,其中以龙血素 A、B 为代表的二氢查耳酮类成分是其活血化瘀的主要有效成分^[2-3]。

龙血竭提取物是用于治疗血瘀证引起的缺血性中风恢复期制剂的原料,其主要成分为黄酮类化合物,前期是以龙血素 B、7,4'-二羟基黄酮为质量控制指标^[4]。但笔者在实验中发现,龙血竭提取物中龙血素 A 的含量接近 7,4'-二羟基黄酮,且其结构与龙血素 B 类似,对龙血素 B 的含量测定带来一定干扰。因此在对龙血竭提取物物质基础研究的过程中,笔者将龙血素 A 加入到龙血竭提取物的质量控制指标中,并建立 HPLC 法同时测定龙血素 A、B 和 7,4'-二羟基黄酮的含量,进一步完善了龙血竭提取物的质量标准。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(二元泵,智能柱温箱,自动进样器,MWD 可变波长检测器,美国安捷伦公司);BP211D 型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

龙血竭提取物(批次 091101,100101,100303,江苏康缘药业股份有限公司);龙血素 A、龙血素 B 对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 111660-200301,111558-200303);7,4'-二羟基黄酮对照品(自制,纯度 $\geq 98\%$);乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取龙血素 A、B 和 7,4'-二羟基黄酮对照品 10.05,10.08,3.26 mg,置于 100 mL 棕色量瓶中,加甲醇适量超声使溶解,定容至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取龙血竭提取物约 50 mg,精密称定,置 50 mL 的具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密封,称定质量,室温下超声(功率 250 W,频率 40 kHz)提取 30 min,取出,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,即得。

2.3 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-1%冰醋酸(B)梯度洗脱(0~10 min,25%~44% A;10~35 min,44% A);体积流量 1 mL \cdot min⁻¹,进样量 10 μL ,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$,检测波

长龙血素 A、B 为 278 nm,7,4'-二羟基黄酮为 330 nm。
2.4 系统适用性试验 分别取对照品溶液、供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件检测,记录色谱图(图 1),理论塔板数按龙血素 A、B 计不低于 1×10^4 ,二者的分离度 > 1.5 ,龙血素 A、B 与 7,4'-二羟基黄酮的保留时间分别约为 22.202,22.877,7.769 min。

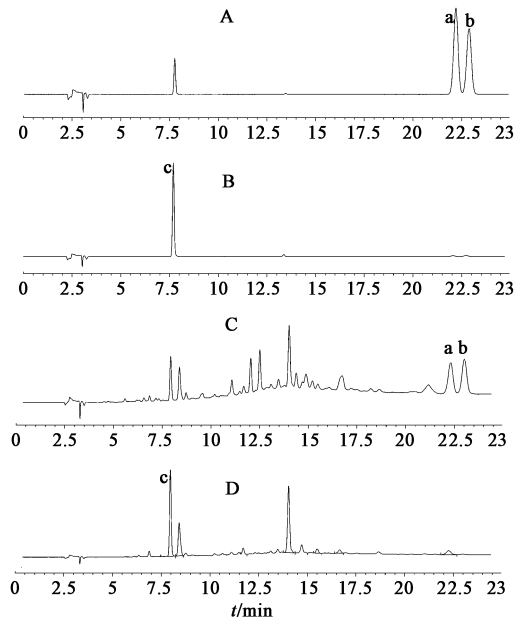


图 1 龙血素 A(a)、龙血素 B(b)、7,4'-二羟基黄酮(c)混合标准品(A,B)和龙血竭提取物(C,D)HPLC

2.5 线性关系的考察 精密量取 2.1 项下混合对照品溶液 1,2,3,4,5,6 mL,分别置于 10 mL 的棕色量瓶中,用甲醇定容,摇匀,按 2.3 项下色谱条件测定,计算峰面积,由峰面积对浓度进行线性回归,得回归方程分别为 $Y_{\text{龙血素A}} = 36.504 X - 7.8932$ ($r = 0.9998$); $Y_{\text{龙血素B}} = 29.600 X - 10.133$ ($r = 0.9999$); $Y_{7,4'} = 64.259 X - 8.8667$ ($r = 0.9998$)。表明龙血素 A、B 和 7,4'-二羟基黄酮分别在 10.05~60.36,10.08~60.48,3.26~19.56 μg 呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验 取 2.1 项下混合对照品溶液,按 2.3 项下色谱条件,连续进样 5 次,记录龙血素 A、B 和 7,4'-二羟基黄酮的峰面积积分值,并计算它们的 RSD 依次为 0.346%,0.292%,0.348%。表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一批号样品 5 份,分别按 2.2 项下方法处理,并按 2.3 项下色谱条件进行测定,结果测得龙血素 A、B 和 7,4'-二羟基黄酮的 RSD 分别为 1.83%,1.83%,0.59%。表明该方法的重复性良好。

2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液,按**2.3**项下色谱条件分别于0,1,2,4,8,12 h测定,按峰面积积分计,龙血素A、B和7,4'-二羟基黄酮的RSD分别为1.54%,1.68%,1.25%。表明室温条件下,供试品溶液在12 h内稳定。

2.9 加样回收率试验 取重复性实验用的同一批号的龙血竭提取物6份,每份约0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入一定量的龙血素A、B和7,4'-二羟基黄酮的混合对照品溶液(质量浓度依次为51,93.4,50.4 mg·L⁻¹),按**2.2**项下制备并测定供试品溶液,计算加样回收率。结果龙血素A、B和7,4'-二羟基黄酮的平均加样回收率分别为108.6% (RSD 0.99%), 109.6% (RSD 1.03%), 102.7% (RSD 1.24%),见表1。

表1 龙血素A、B和7,4'-二羟基黄酮平均加样回收率试验

成分	No.	样品中 量/ μg	加入量 / μg	测得量 / μg	平均回 收率/%	RSD /%
龙血素 A	1	103.0	102.0	213.6	108.6	0.99
	2	102.9	102.0	212.1		
	3	103.0	102.0	215.0		
	4	103.0	102.0	213.0		
	5	103.0	102.0	214.6		
	6	102.9	102.0	214.4		
龙血素 B	1	140.4	186.8	342.9	109.6	1.03
	2	140.0	186.8	342.2		
	3	140.4	186.8	347.6		
	4	140.4	186.8	344.7		
	5	140.4	186.8	346.7		
	6	140.3	186.8	346.4		
7,4'-二羟基黄酮	1	103.8	100.8	208.0	102.7	1.24
	2	103.7	100.8	205.7		
	3	103.8	100.8	208.6		
	4	103.8	100.8	205.5		
	5	103.8	100.8	208.0		
	6	103.7	100.8	207.4		

2.10 样品的含量测定 取不同批号的龙血竭提取物,按**2.2**项下方法制备供试品溶液,并按**2.3**项下色谱条件测定峰面积,用外标法测定供试品溶液中指标成分的含量。测定结果见表2。

表2 龙血竭提取物中各成分含量测定

批次	龙血素 A	龙血素 B	7,4'-二羟基黄酮	%
091101	0.642	0.875	0.647	
100101	0.547	0.757	0.596	
100303	0.622	0.867	0.673	

3 讨论

3.1 流动相梯度洗脱程序的选择 前期研究^[4]中HPLC检测7,4'-二羟基黄酮的流动相为乙腈-1%冰醋酸(24:76),检测龙血素B的流动相为乙腈-1%冰醋酸(40:60)。为节省检测时间,笔者摸索了梯度洗脱程序。在实验中发现乙腈的比例对7,4'-二羟基黄酮的出峰时间有一定影响,对它的峰形影响不大,但直接影响龙血素A、B出峰时间和分离效果,降低乙腈的比例,3者出峰时间延长,龙血素A、B得到较好的分离;增加乙腈比例,3者出峰时间缩短,龙血素A、B分离效果差。实验中考察了乙腈-1%冰醋酸20:80,24:76,25:75,26:74,27:73,35:65,40:60,42:48,44:56,46:54,48:52,50:50多个比例,综合三者出峰时间和龙血素A、B的分离效果,最终确定**2.3**项中流动相梯度洗脱程序。

3.2 供试品溶液制备方法的选择 鉴于超声提取法温度低、节省溶剂、操作简便等特点,笔者在实验中着重考查了超声提取法,分别对不同浓度甲醇(50%甲醇、甲醇)、甲醇用量(0.5,1,2倍量)、超声时间(5,15,30 min)、超声温度(25,30,40℃)进行考察,结合指标成分的含量,最终确定用0.5倍龙血竭提取物量的甲醇在室温下超声提取30 min作为样品的处理方法。

[参考文献]

[1] 文东旭. 龙血竭的研究进展[J]. 中草药,2001,11(32):1053.
 [2] 张庆云,朱辉,陈红英,等. 龙血竭研究进展[J]. 武警医学院学报,2004,13(1):69.
 [3] 张静泽,胡迎庆,郭鹏. 紫外分光光度法测定龙血竭中二氢查耳酮的含量[J]. 中成药,2004,6(26):505.
 [4] 萧伟,屠鹏飞,王振中,等. 一种龙血竭药材提取物的质量控制方法. 中国:CN200910009645.0[P],2010-07-21.

[责任编辑 蔡仲德]