

# HPLC 法同时测定不同产地龙血竭中 3 种黄酮类成分

李 竣<sup>1</sup> 朱功俊<sup>1</sup> 陈 素<sup>2</sup> 刘向明<sup>2</sup> 李芸芳<sup>1</sup> 杨光忠<sup>1</sup>

(1 中南民族大学 药学院, 武汉 430074; 2 中南民族大学 生物医学工程学院, 武汉 430074)

**摘要** 为建立 HPLC 测定不同产地龙血竭中 3 种黄酮类成分的方法, 选择了广西、云南产 9 个批次的龙血竭, 测定了其中龙血素 A、龙血素 B、剑叶龙血素 B 的含量。采用 Thermo BDS Hypersil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-1% 冰醋酸, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 40℃, 检测波长 278 nm。3 个药效成分在 45 min 内达到基线分离, 线性关系良好。9 个批次龙血竭中龙血素 A、龙血素 B、剑叶龙血素 B 的平均含量分别为: 0.47%、0.96%、0.44%; 平均加样回收率分别为: 99.6%、103.2%、100.5%; RSD 分别为: 1.20%、0.65%、1.30%。该实验方法操作简便, 结果准确, 重复性和稳定性良好, 可为龙血竭的质量控制提供参考。

**关键词** 龙血竭; 龙血素 A; 龙血素 B; 剑叶龙血素 B; HPLC 法

中图分类号 TQ460.7<sup>+</sup>2; R927.2 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2017)02-0045-04

## Simultaneous Determination of Three kinds of Flavonoids in *Resina Draconis* from Different regions by HPLC

Li Jun<sup>1</sup>, Zhu Gongjun<sup>1</sup>, Chen Su<sup>2</sup>, Liu Xiangming<sup>2</sup>, Li Yunfang<sup>1</sup>, Yang Guangzhong<sup>1</sup>

(1 College of Pharmaceutical Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China;

2 College of Biomedical Engineering, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

**Abstract** To establish a method for the determination of loureirin A, loureirin B and cochinchinenin B in *Resina Draconis* from Guangxi and Yunnan Province in China, HPLC testing was performed on a Thermo BDS Hypersil C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm) with mobile phases of acetonitrile-1% acetic acid solution in a gradient mode, with a flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, column temperature of 40℃, and detection wavelength of 278 nm. The three components were baseline separated in 45 mins and showed good linear relationship. The average content of loureirin A, loureirin B and cochinchinenin B in the nine batches of *Resina Draconis* were 0.47%, 0.96%, 0.44%, and the average recover rates were 99.6% (RSD = 1.20%), 103.2% (RSD = 0.65%), 100.5% (RSD = 1.30%), respectively. This method was convenient, accurate and reliable, which could provide reference for the quality control of *Resina Draconis*.

**Keywords** *Resina Draconis*; loureirin A; loureirin B; cochinchinenin B; HPLC

龙血竭是百合科龙血树属剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen 的含脂的木材经提取得到的树脂<sup>[1]</sup>, 主要产于东南亚和我国西南地区包括云南、广西等地。其富含查尔酮、黄酮、高异黄酮和二苯乙烯类等成分<sup>[2]</sup>, 具有活血化瘀、止血、止痛、生肌等功效, 临床上用于治疗外伤出血、疮疡不敛、跌打损伤、淤滞作痛等症<sup>[3]</sup>。在对龙血竭研究的过程中, 发现龙血素 A、B 和剑叶龙血素 B 的配伍组合

是其产生镇痛作用药效物质<sup>[4]</sup>。

为了确定其 3 种药效物质在龙血竭中的比例关系, 使用 HPLC 法测定其含量。目前, 采用 HPLC 法对龙血竭进行含量测定方法有单一化合物的含量测定<sup>[5-6]</sup>, 也有多个化合物的含量测定<sup>[7-8]</sup>。本实验采用 HPLC 同时测定龙血竭中 3 种药效成分龙血素 A、龙血素 B 和剑叶龙血素 B 的含量, 对 3 个厂家和 9 个批次的龙血竭中 3 种药效成分进行了分析比较, 为龙血

收稿日期 2016-11-02

作者简介 李 竣(1975-) 男 副教授 博士 研究方向: 天然药物化学成分及质量标准研究 E-mail: lijun-pharm@hotmail.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81403186) 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划资助项目(T201220), 中央高校基本科研业务费专项(3212015CZW15029, 3212015YCZW15095) 中南民族大学实验室开放与技改资助项目(KF2016005, JG2016004)

竭质量控制方法提供参考依据。

## 1 材料

### 1.1 试药

龙血素 A 对照品(批号 111660-200402)、龙血素 B 对照品(批号 111558-201407) 购于中国食品药品检定研究院, 剑叶龙血素 B 对照品(自制, 纯度  $\geq 98\%$ )。乙腈为色谱纯(Tedia company), 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

9 批龙血竭分别购自于西双版纳版纳药业有限责任公司(批号 120127、111015、150702、100420)、广西中医药大学制药厂(批号 20131002、20131003、20140707) 和云南普洱丹州制药股份有限公司(批号 20150303、20140801)。

### 1.2 仪器

高效液相色谱仪(Ultimate 3000 型, 美国戴安), 粉碎机(YB-2000A 型, 浙江永康市速峰工贸), 电子天平(AUW120D 型, 岛津), 超声波清洗器(KQ-500E 型, 昆山市超声仪器), 分光光度计(UEC1312028 型, 上海美谱达仪器)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Thermo BDS Hypersil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm 5  $\mu$ m), 流动相乙腈(A) - 1% 冰醋酸水溶液(B) 梯度洗脱, 0 ~ 10 min 20% ~ 35% A; 10 ~ 35 min 35% ~ 36% A; 35 ~ 45 min 36% ~ 37% A; 流速 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>; 柱温 40°C; 检测波长 278 nm。按照上述色谱条件进行测定, 3 个检测指标与其他峰分离良好, 分离度均大于 1.5, 理论塔板数均不低于 1 万。依据对 3 个对照品在供试品溶液的色谱图中找到 3 个对照品相应的色谱峰(见图 1)。

表 1 对照品的线性范围、回归方程和相关系数

Tab. 1 Linear range, regression equation and correlation index of reference substances

化合物	质量线性范围 $m/\text{ng}$	回归方程	$r$
龙血素 A	74.2 ~ 742.0	$y = 0.0601x + 0.0536$	0.9997
龙血素 B	61.0 ~ 610.0	$y = 0.0420x + 0.0611$	0.9996
剑叶龙血素 B	77.2 ~ 772.0	$y = 0.0141x + 0.0804$	0.9997

### 2.5 精密度考察

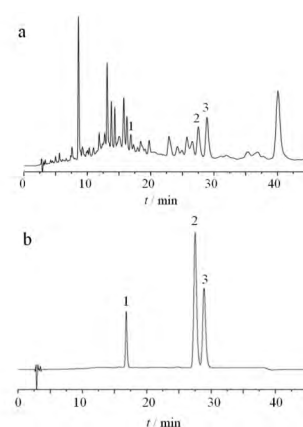
精密吸取 2.3 项下同一浓度的供试品溶液 20  $\mu$ L 按照 2.1 项下的色谱条件, 重复进样 6 次, 测定龙血素 A、龙血素 B、剑叶龙血素 B 的色谱峰峰面积, 计算其 RSD 分别为 0.65%、0.27%、0.58% 表明仪器精密度良好, 结果见表 2。

### 2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取龙血素 A、龙血素 B、剑叶龙血素 B 对照品 3.71、3.05、3.86 mg, 置于 100 mL 棕色容量瓶中, 加适量无水乙醇超声使其溶解, 并定容至刻度线, 摇匀, 即得到混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

取龙血竭粉末(过 60 目筛) 约 0.5 g 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 50 mL 密封, 称定质量, 室温下超声(250 W, 40 kHz) 提取 30 min, 取出放冷, 再称定质量, 用 70% 乙醇补足失重, 摇匀, 用 0.45  $\mu$ m 的微孔滤膜滤过, 即得龙血竭供试品溶液。



1) 剑叶龙血素 B; 2) 龙血素 A; 3) 龙血素 B

图 1 龙血竭供试品(a) 和对照品(b) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Resina Draconis* and reference substances

### 2.4 线性关系的考察

精密量取 2.2 项下的混合标准品溶液 1、2、3、5、7、9、10 mL 分别置于 10 mL 棕色容量瓶中, 用无水乙醇定容, 摇匀, 按照 2.1 项下的色谱条件测定, 记录峰面积。以对照品进样量(ng) 为横坐标, 色谱峰峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算标准曲线回归方程, 结果见表 1。

### 2.6 稳定性考察

取龙血竭供试品溶液, 分别于 0、1、2、4、8、12、24 h 进样 20  $\mu$ L 按照 2.1 项下的色谱条件测定, 并记录峰面积。龙血竭供试品溶液中的龙血素 A、龙血素 B 和剑叶龙血素 B 峰面积的 RSD 分别为 0.62%、0.37%、1.85%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定, 结

果见表 3.

表 2 仪器精密度考察

Tab.2 Precision inspection of the instrument

化合物	不同进样次数下的峰面积						RSD/%
	1	2	3	4	5	6	
龙血素 A	47.230	47.325	47.008	46.944	46.600	46.608	0.65
龙血素 B	72.396	72.532	72.123	72.166	72.005	72.190	0.27
剑叶龙血素 B	12.146	12.252	12.128	12.280	12.120	12.139	0.58

表 3 供试品稳定性考察

Tab.3 Stability inspection of test samples

化合物	不同时间的峰面积							RSD/%
	0	1	2	4	6	12	24	
龙血素 A	11.8076	11.8313	11.7521	11.7260	11.6501	11.7948	11.8691	0.62
龙血素 B	18.0991	18.1331	18.0308	18.0213	18.0013	18.1463	17.9734	0.37
剑叶龙血素 B	3.0364	3.0631	3.0319	3.0644	3.0299	2.9082	2.9751	1.85

2.7 重复性考察

取同一批龙血竭样品 按照 2.3 项下的方法平行 制备 6 份供试品溶液 进样 20  $\mu\text{L}$  按照 2.1 项下的色

谱条件测定龙血素 A、龙血素 B 和剑叶龙血素 B 的含 量 RSD 分别为 1.84% ,1.61% ,1.65% 表明该方法 重复性良好 见表 4.

表 4 供试品重复性考察

Tab.4 Reproducibility inspection of samples

化合物	不同供试品中化合物质量比 $w / \%$						RSD/%
	1	2	3	4	5	6	
龙血素 A	0.36	0.36	0.37	0.37	0.36	0.36	1.84
龙血素 B	0.85	0.87	0.84	0.87	0.87	0.87	1.61
剑叶龙血素 B	0.41	0.40	0.41	0.41	0.42	0.40	1.65

2.8 加样回收率实验

分别精密称取已知含量的龙血竭样品 6 份 每份 约 12.5 mg 精密称定 置于具塞锥形瓶中. 取 2.2 项 下的混合对照品溶液 15 mL 于 50 mL 容量瓶中 并用 无水乙醇定容至刻度线 取该溶液 6 份 每份 5 mL 溶

解上述 6 份龙血竭样品. 室温下超声 30 min 后 放冷 , 再称定质量 用无水乙醇补足失重 取该液体用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤 进样量 10  $\mu\text{L}$  记录对应各峰峰面 积 计算 3 个药效成分的回收率 结果见表 5.

表 5 龙血竭中 3 个药效成分的加样回收率

Tab.5 Recoveries of three effective components in *Resina Draconis*

化合物	样品量 $m/\text{ng}$	加入量 $m/\text{ng}$	测得量 $m/\text{ng}$	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
龙血素 A	95.152	111.300	204.178	98.0	99.6	1.20
	94.316	111.300	205.905	100.3		
	98.952	111.300	209.834	99.6		
	94.468	111.300	205.246	99.5		
	95.608	111.300	208.594	101.5		
龙血素 B	93.708	111.300	203.892	99.0	103.2	0.65
	217.848	91.500	311.207	102.0		
	215.934	91.500	310.212	103.0		
	226.548	91.500	321.407	103.7		
	216.282	91.500	311.167	103.7		
剑叶龙血素 B	218.892	91.500	313.864	103.8	100.5	1.30
	214.542	91.500	308.805	103.0		
	90.144	115.800	206.766	100.7		
	89.352	115.800	208.227	102.7		
	93.744	115.800	208.050	98.7		
剑叶龙血素 B	89.496	115.800	206.298	100.9	100.1	
	90.576	115.800	206.213	99.9		
	88.776	115.800	204.702	100.1		

## 2.9 样品含量测定

取不同厂家和批次的龙血竭按2.3项下的方法制备供试品溶液,并按2.1项下的色谱条件进样分

析,进样量20  $\mu\text{L}$ 、平行测3次,龙血竭中龙血素A、龙血素B和剑叶龙血素B的含量测定结果见表6。

表6 不同厂家和批次龙血竭中3个药效成分的测定

Tab.6 Determination of 3 effective components in *Resina Draconis* from different companies and batches

化合物	不同厂家和批次龙血竭中3个药效成分质量比 w/%									均值
	广西中医药大学制药厂			云南普洱丹州制药股份有限公司		西双版纳版纳药业股份有限公司				
	20131002	20131003	20140707	20150303	20140801	120127	111015	150702	100420	
龙血素 A	0.99	0.57	0.65	0.21	0.14	0.48	0.50	0.30	0.38	0.47
龙血素 B	0.54	0.63	0.70	1.02	1.99	0.66	0.80	1.44	0.87	0.96
剑叶龙血素 B	0.84	0.57	0.61	0.12	0.18	0.51	0.59	0.15	0.36	0.44

## 3 讨论

本文建立了用 HPLC 法同时测定龙血竭中3种药效成分的含量,该方法能使3个成分获得基线分离(分离度大于1.5),具有快速、准确的特点。实验使用紫外-可见分光光度计分别对3个对照品溶液在190~700 nm进行了全波长扫描,结果显示:龙血素A、龙血素B和剑叶龙血素B的最大吸收波长分别为278, 278, 287 nm;龙血素A、龙血素B最大吸收波长一致,且剑叶龙血素B的最大吸收波长和278 nm相近,选择278 nm作为检测器的波长。

龙血素A、龙血素B具有较强的抗血栓、抗凝血等活血化瘀药理作用<sup>[9,10]</sup>,是龙血竭中重要的药效组成分。龙血素B有良好的镇痛效应,且龙血素A、龙血素B和剑叶龙血素B有协同效应<sup>[11,12]</sup>。因此本实验选择以龙血素A、龙血素B和剑叶龙血素B为考察指标。

龙血素A、B和剑叶龙血素B的联合使用与龙血竭有相同的药效作用<sup>[13]</sup>,明确这3种有效成分的含量对龙血竭质量控制十分重要。文中HPLC法测定龙血竭中3种药效成分,可为龙血竭的质量控制提供参考,保证龙血竭的临床治疗效。不同厂家和批次的龙血竭中龙血素A、B和剑叶龙血素B含量存在差异,9批龙血竭药材龙血素A、B和剑叶龙血素B的平均含量分别为0.47%、0.96%、0.44%,3种成分协同作用下治疗疼痛的比例关系,为龙血竭在药物的二次开发提供一定思路。

## 参 考 文 献

- [1] 屠鹏飞,陶晶,胡迎庆,等. 龙血竭黄酮类成分研究[J]. 中国天然药物, 2003, 1(1): 27-29.  
[2] 唐人九,文东旭,韦宏,等. 广西血竭石油醚和醋酸乙

酯部位中的化学成分[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(7): 421-423, 448.

- [3] 王锦亮,李兴从,江东福,等. 云南血竭的化学成分及抗真菌活性[J]. 云南植物研究, 1995, 17(3): 336-340.  
[4] Liu X M, Su C, Zhang Y, et al. Modulation of dragon's blood on tetrodotoxin-resistant sodium currents in dorsal root ganglion neurons and identification of its material basis for efficacy [J]. Sci China Life Sci, 2006, 49(3): 274-285.  
[5] 刘子修,刘梅,刘静,等. 龙血竭胶囊中龙血素B含量的高效液相色谱法测定[J]. 海军医学杂志, 2013, 34(4): 249-251.  
[6] 冀伟业,王东升. HPLC法测定龙血竭滴丸中龙血素B的含量[J]. 现代医药卫生, 2010, 26(7): 986-988.  
[7] 王佳媛,戴好富,王辉,等. 海南龙血竭 HPLC 分析方法及三种黄酮成分含量的测定[J]. 时珍国医国药, 2014, 12: 2828-2830.  
[8] 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.  
[9] 杨波,郭建恩,韩俊婷,等. 龙血素A对大鼠局灶性脑缺血再灌注引起的脑损伤及机制探讨[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(2): 103-107.  
[10] 闫冬. 龙血素B对纤溶酶原激活物抑制剂的抑制作用[J]. 生物化工, 2016, 2(2): 49-50.  
[11] 郭敏,陈素,刘向明. 一种新的评估龙血竭3种化学成分相互作用特性的分析方法[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2008, 27(2): 56-59.  
[12] Wei L S, Chen S, Huang X J, et al. Material basis for inhibition of dragon's blood on capsaicin-induced TRPV1 receptor currents in rat dorsal root ganglion neurons [J]. Eur J Pharmacol, 2013, 702(1/3): 275-284.  
[13] Chen S, Liu XM. Effect of *Salvia miltiorrhiza* injection on hyperpolarization-activated current channels in dorsal root ganglion neurons of rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 41(11): 1038-1043.