

# 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

刘立权\*(杭州市中医院,杭州 310007)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)36-3442-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.36.29

**摘要** 目的:建立同时测定龙血竭片中龙血素A、龙血素B和白藜芦醇含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>柱,流动相为乙腈-0.5%冰醋酸(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为260 nm,柱温为35 ℃,进样量为10 μl。结果:龙血素A、龙血素B和白藜芦醇进样量分别在0.02~0.64、0.02~0.73、0.02~0.70 μg范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系( $r=0.999\ 1$ 、 $0.999\ 1$ 、 $0.999\ 8$ );精密性、稳定性、重复性试验的RSD均≤1.8%;平均加样回收率分别为101.8%、103.2%、104.2%,RSD分别为1.8%、0.6%、0.8%( $n=6$ )。结论:该法操作简便、结果准确、重复性好,适用于龙血竭片的质量控制。

**关键词** 龙血竭片;龙血素A;龙血素B;白藜芦醇;高效液相色谱法;含量测定

## Simultaneous Determination of the Content of Loureirin A, Loureirin B and Resveratrol in Longxuejie Tablet by HPLC

LIU Li-quan(Hangzhou Hospital of TCM, Hangzhou 310007, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of the content of loureirin A, loureirin B and resveratrol in Longxuejie tablet. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.5% glacial acetic acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 260 nm, and the column temperature was 35 ℃. The sample size was 10 μl. RESULTS: The linear ranges were 0.02-0.64 μg for loureirin A ( $r=0.999\ 1$ ), 0.02-0.73 μg for loureirin B ( $r=0.999\ 1$ ) and 0.02-0.70 μg for resveratrol ( $r=0.999\ 8$ ), respectively. The average recoveries were 101.8% for loureirin A (RSD=1.8%,  $n=6$ ), 103.2% for loureirin B (RSD=0.6%,  $n=6$ ) and 104.2% for resveratrol (RSD=0.8%,  $n=6$ ). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible for quality control of Longxuejie tablet.

**KEY WORDS** Longxuejie tablet; Loureirin A; Loureirin B; Resveratrol; HPLC; Content determination

龙血竭为龙舌兰科植物剑叶龙血树 *Dracaena Cochinchinensis* (Lour.) S. H. Chen 的含脂木质部经提取加工制成的树脂,具有活血散瘀、消炎止痛、收敛止血、生肌敛疮、补血益气等功效<sup>[1-3]</sup>,在临床上主要用于治疗外科、妇科、内科、皮肤科等的多种适应证<sup>[5]</sup>,是名贵中药材之一。龙血竭片系龙血竭药材研细后加入适量辅料直接压片而成,主要含黄酮类、萜类、甾醇类和皂苷类化合物等成分<sup>[6]</sup>,其中龙血素A(Loureirin A)、龙血素B(Loureirin B)和白藜芦醇(Resveratrol)等为其主要活性成分,是其活血散瘀、生肌敛疮和补血益气等功效的物质基础;现代药理学研究<sup>[7-10]</sup>也证实上述几种成分均具有多种生物活性。以往龙血竭片的质量控制方法仅针对龙血素A和/或B的含量进行测定,同时测定几种活性成分含量的研究较少,因而不能较为全面地评价和控制该药的质量。本研究采用高效液相色谱(HPLC)法,首次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,以为龙血竭片的质量控制提供参考依据。

### 1 材料

Agilent LC1200型HPLC仪,含四元泵、智能柱温箱、自动进样器、VMD可变波长检测器(美国安捷伦公司);AE-163型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);USC-802型超声波清洗器(上海波龙电子设备有限公司);5702R型高速冷冻离心机(德国艾本德公司)。

\* 中药师。研究方向:中药制剂质量控制与分析。E-mail: lsc19848@aliyun.com

龙血素A、龙血素B和白藜芦醇对照品(均购自中国食品药品检定研究院,批号:111660-200402、111558-200303、111535-200502);龙血竭片(购自云南大唐汉方制药有限公司,批号:20120305、20120401、20120604);乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为超纯水。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.5%冰醋酸(B),梯度洗脱(0~55 min为20%→45%A);流速:1.0 ml/min;检测波长:260 nm;进样量:10 μl;柱温:35 ℃。

#### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取经五氧化二磷减压干燥24 h的龙血素A、龙血素B和白藜芦醇对照品适量,分别置于不同的50 ml量瓶中,加乙腈溶解,并稀释至刻度,摇匀,制得各对照品贮备液。再分别精密量取1.0 ml龙血素A、龙血素B和白藜芦醇对照品贮备液置于同一5 ml量瓶中,用乙腈稀释至刻度,摇匀,配成三者质量浓度分别为21.24、24.24、23.24 μg/ml的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取龙血竭片20片,精密称定,研细,过4号筛,取细粉约0.2 g,精密称定,置于50 ml量瓶中,加硅藻土0.1 g,混匀,加入0.5%冰醋酸-乙腈(1:1, V/V),超声处理(功率:100 W,频率:60 kHz)15 min,放冷,用0.5%冰醋酸-

乙腈(1:1, V/V)定容至刻度, 摇匀, 取 1.5 ml, 置于 EP 管中, 离心半径 8 cm, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按照龙血竭片处方, 取除龙血竭之外的其他辅料, 按照相同工艺制成缺龙血竭的阴性样品, 再取该阴性样品 20 片, 按“2.2.2”项下方法进行处理, 制成阴性对照溶液。

### 2.3 系统适用性试验

在“2.1”项色谱条件下, 白藜芦醇、龙血素 A 和龙血素 B 的保留时间分别是 14.8、50.7、51.9 min; 以白藜芦醇峰计算, 理论板数为 7 800, 分离度均 > 1.5。对照品、供试品、阴性对照色谱见图 1。

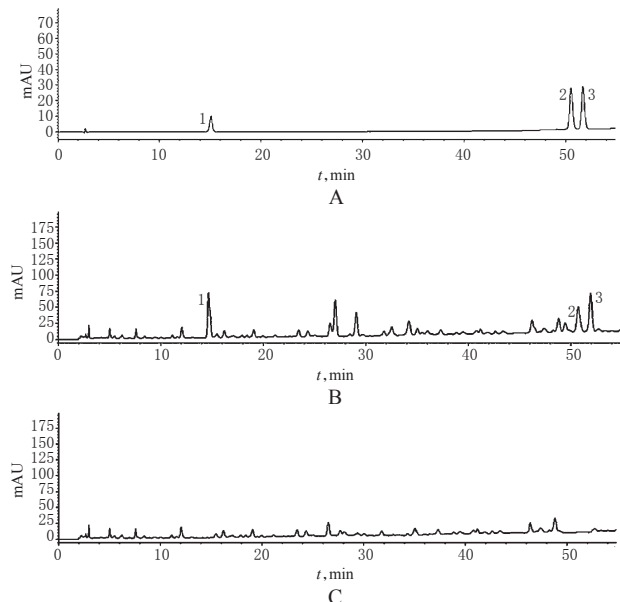


图 1 高效液相色谱图

A: 对照品; B: 供试品; C: 阴性对照; 1. 白藜芦醇; 2. 龙血素 A; 3. 龙血素 B

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. test sample; C. negative control; 1. resveratrol; 2. loureirin A; 3. loureirin B

### 2.4 线性关系考察

取“2.2.1”项下对照品溶液 1、2、5、10、15、20、30  $\mu$ l, 按“2.1”项下色谱条件分别进样测定, 记录峰面积。以各成分峰面积 (y) 为纵坐标, 进样量 (x) 为横坐标, 进行线性回归, 得龙血素 A 的回归方程  $y=2\ 400.5x+17.44$  ( $r=0.999\ 1$ )、龙血素 B 的回归方程  $y=2\ 197.6x+16.50$  ( $r=0.999\ 1$ )、白藜芦醇的回归方程  $y=873.75x+6.45$  ( $r=0.999\ 8$ )。结果表明, 龙血素 A、龙血素 B、白藜芦醇进样量分别在 0.02~0.64、0.02~0.73、0.02~0.70  $\mu$ g 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

### 2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测定龙血素 A、龙血素 B、白藜芦醇的峰面积。结果, 3 种成分的 RSD 分别为 0.26%、0.29%、0.33%, 表明仪器的精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下一份供试品溶液适量, 分别于 0、1、2、4、8、12、24、48 h 按“2.1”项下色谱条件进样, 测定龙血素 A、龙血素 B、白藜芦醇的峰面积。结果, 3 种成分的 RSD 分别为

1.8%、1.3%、1.4%, 表明供试品溶液在 48 h 内质量较稳定。

### 2.7 重复性试验

取同一批号 (20120305) 的龙血竭片细粉 6 份, 分别按“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液, 并按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算龙血素 A、龙血素 B、白藜芦醇的含量。结果, 3 种成分的平均含量分别为 3.60、5.41、5.84 mg/g, RSD 分别为 0.5%、0.9%、0.6%, 表明本方法的重复性良好。

### 2.8 加样回收率试验

精密称取已知龙血素 A、龙血素 B、白藜芦醇含量的样品 6 份, 每份约 0.05 g, 置于具塞锥形瓶中, 分别精密加入适量龙血素 A、龙血素 B、白藜芦醇的对照品溶液, 混合均匀后按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果 (n=6)

Tab 1 Results of recovery tests (n=6)

成分	No	称样量, mg	所含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
龙血素 A	1	58.12	0.209 2	0.198 6	0.411 5	101.9	101.8	1.8
	2	56.33	0.202 8	0.210 2	0.421 6	104.1		
	3	60.13	0.216 5	0.192 3	0.414 2	102.8		
	4	59.26	0.213 3	0.199 4	0.412 3	99.8		
	5	59.37	0.213 7	0.192 3	0.405 0	99.5		
	6	59.59	0.214 5	0.197 7	0.417 1	102.5		
龙血素 B	1	58.12	0.310 4	0.352 5	0.675 3	103.5	103.2	0.6
	2	56.33	0.300 8	0.358 6	0.669 3	102.8		
	3	60.13	0.322 1	0.338 5	0.666 7	101.8		
	4	59.26	0.316 4	0.344 7	0.671 9	103.1		
	5	59.37	0.317 0	0.339 7	0.670 0	103.9		
	6	59.59	0.318 2	0.353 2	0.683 7	103.5		
白藜芦醇	1	58.12	0.337 7	0.380 2	0.735 2	104.6	104.2	0.8
	2	56.33	0.327 3	0.383 5	0.725 0	103.7		
	3	60.13	0.349 4	0.362 1	0.721 9	102.9		
	4	59.26	0.344 3	0.368 3	0.728 2	104.2		
	5	59.37	0.344 9	0.368 5	0.729 3	104.3		
	6	59.59	0.346 2	0.378 9	0.745 3	105.3		

### 2.9 样品含量测定

取 3 批样品粉末各适量, 分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.1”项下色谱条件进样测定峰面积, 按外标法计算含量, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 (n=3)

Tab 2 Results of content determination of samples (n=3)

批号	龙血素 A, mg/g	龙血素 B, mg/g	白藜芦醇, mg/g
20120305	3.60	5.41	5.84
20120401	3.46	5.21	5.55
20120604	3.53	5.26	5.61

### 3 讨论

本研究首次建立了以 HPLC 法同时测定龙血竭片中龙血素 A、龙血素 B 和白藜芦醇含量的方法, 本方法操作简便、准确性好, 能为龙血竭片的质量控制提供依据。

试验中笔者比较了不同柱温 (20、35、40  $^{\circ}$ C) 对这 3 种组分的分离效果的影响。结果表明, 随着柱温的升高, 各组分保留时间缩短, 分离度基本保持一致, 但为了保护色谱柱, 延长其使用寿命, 最终确定柱温为 35  $^{\circ}$ C。

试验中比较了以回流提取和超声提取两种方法来制备供试品溶液, 所得结果无显著性差异, 但由于超声提取法具有效

# 对《中国药典》中硫酸阿米卡星注射液含量测定方法的探讨

王立萍<sup>1\*</sup>, 刘辉<sup>2</sup>, 李少杰<sup>1</sup>, 姚永青<sup>1</sup>(1.河南省食品药品检验所, 郑州 450003; 2.郑州师范学院化学系, 郑州 450044)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)36-3444-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.36.30

**摘要** 目的:为《中国药典》中硫酸阿米卡星注射液含量测定方法的改进提供参考。方法:对比《中国药典》2005年版中的微生物管碟法和2010年版中的高效液相色谱(HPLC)衍生化法的测定结果。结果:采用HPLC衍生化法测定26个厂家54个批次的硫酸阿米卡星注射液样品,其含量结果较微生物管碟法测定的含量结果偏高。结论:在控制硫酸阿米卡星注射液的含量时,微生物管碟法优于HPLC衍生化法,HPLC衍生化法在测定硫酸阿米卡星注射液的含量时存在缺陷。

**关键词** 硫酸阿米卡星注射液;微生物管碟法;高效液相色谱衍生化法;含量测定

## Methods for Content Determination of Amikacin Sulfate Injection in Chinese Pharmacopoeia

WANG Li-ping<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>2</sup>, LI Shao-jie<sup>1</sup>, YAO Yong-qing<sup>1</sup>(1.Henan Provincial Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China; 2.Dept. of Chemistry, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou 450044, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To provide reference for the improvement of the method for content determination of Amikacin sulfate injection in Chinese Pharmacopoeia. METHODS: The microbial plate method stated in Chinese Pharmacopoeia (2005 edition) was compared with HPLC derivatization stated in Chinese Pharmacopoeia (2010 edition). RESULTS: The contents of 54 batches of Amikacin sulfate injection from 26 manufacturers determined by HPLC derivatization were higher than that determined by microbial plate method. CONCLUSIONS: For controlling the content of Amikacin sulfate injection, the microbial plate method is better than HPLC derivatization. The defects of HPLC derivatization exists in the determination of Amikacin sulfate injection.

**KEY WORDS** Amikacin sulfate injection; Microbial plate method; HPLC derivatization; Content determination

硫酸阿米卡星(Amikacin sulfate)为半合成氨基糖苷类抗菌药物,我国于1981年开始生产其原料及制剂。其有一定的肾毒性和耳毒性,并有较高的致过敏性休克的风险,严重者甚

至可能导致患者死亡<sup>[1-2]</sup>。硫酸阿米卡星注射液为硫酸阿米卡星原料加抗氧化剂、稳定剂、pH调节剂和水配制后,经终端灭菌制得的注射剂。该药法定检验标准为《中国药典》2005年版

率高、操作简便等优点,所以最终采用超声提取法。在提取溶剂的选择上,分别比较了甲醇与0.5%冰醋酸-乙腈(1:1, V/V),结果发现在相同条件下用后者提取所得的峰面积稍大,说明该溶剂提取效率稍好,故最终选定后者。同时,在用0.5%冰醋酸-乙腈(1:1, V/V)提取时,对不同超声时间(10、15、25、30 min)进行了比较,结合所得指标成分的含量,最终确定用0.5%冰醋酸-乙腈(1:1, V/V)在室温下超声提取15 min作为样品的处理方法。

考虑到不同色谱柱吸附性能等的差异,在耐受性试验中笔者比较了Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Kromasil 100-5C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和Extend-C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)3种色谱柱的分离效果。最后,根据图谱的分离效果,选择了Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>柱进行深入的方法学考察研究。

### 参考文献

- [1] 向金莲,程睿,张路晗.血竭的活血和止血作用研究[J].华西药学杂志,2000,15(6):430.
- [2] 向金莲,张路晗,程睿,等.血竭消炎止痛作用研究[J].时

- 珍国医国药,2001,12(2):110.
- [3] 农兴旭.广西血竭的止血作用[J].中国中药杂志,1997,22(4):240.
- [4] 陈德利,高青云,施伟民,等.中药中活血化瘀药对皮肤创伤愈合的影响[J].上海医学,2000,23(3):145.
- [5] 文东旭.龙血竭的研究进展[J].中草药,2001,11(32):1053.
- [6] 陈军霞,邱碧茵,潘林梅,等.血竭的现代研究[J].现代中药研究与实践,2011,25(3):81.
- [7] 张天宝,吕敬慈,雍克岚,等.广西龙血竭中几种化学成分对血小板聚集影响的初步研究[J].天然产物研究与开发,2008,20(4):695.
- [8] Wang ST, Chen S, Guo M, et al. Inhibitory effect of co-chinchinenin B on capsaicin-activated responses in rat dorsal root ganglion neurons[J]. Brain Res, 2008(1201):34.
- [9] 胡迎庆,屠鹏飞,李若瑜.剑叶龙血树中芪类化合物及其抗真菌活性的研究[J].中草药,2001,32(2):104.
- [10] 刘兆平,于波,李文仙,等.白藜芦醇的雌激素样作用研究[J].卫生研究,2002,31(3):188.

(收稿日期:2013-03-18 修回日期:2013-06-17)

\* 主管药师, 硕士。研究方向: 药物分析。电话: 0371-63388205。E-mail: wlp1980@126.com