

反相高效液相色谱法测定龙血竭中剑叶龙血素 C 的含量

RP-HPLC Determination of Cochinchinenin C in Dragon's Blood

文东旭 刘伟林 陈 骞* 唐人九
Wen Dongxu Liu Weilin Chen Qian Tang Renjiu

(广西药品检验所 南宁市新民路 1-1 号 530021)

(Guangxi Institute for Drug Control, 1-1 Xinminlu, Nanning, Guangxi, 530021, China)

摘要 建立反相高效液相色谱法测定龙血竭中剑叶龙血素 C 含量的方法, 以 Phenomenex C18 反相键合硅胶色谱柱为固定相, 水-乙腈 (33:67) 为流动相, 流速 1 ml/min, 检测波长为 211 nm; 柱温 35°C; 用外标法定量。结果表明, 剑叶龙血素 C 在 42.85~342.8 μg 进样范围内有良好线性关系 ($r = 0.9996$), 方法回收率为 97.87%。本方法简便、准确, 重复性好, 可作为龙血竭中剑叶龙血素 C 的含量测定方法。

关键词 龙血竭 剑叶龙血素 C 反相高效液相色谱法

中图分类号 R284.1

Abstract To establish a HPLC method for the determination of Cochinchinenin C in Dragon's Blood, using Phenomenex C18 reverse phase column as fixed phase and water-acetonitrile (33:67) as mobile phase, flow rate of 1 ml/min, detecting at 211 nm, the temperature of column was 35°C and quantitating with external standard method. It is founded that the standard curve of Cochinchinenin C was linear in the concentration rang of 42.85~342.8 μg ($r = 0.9996$). The average recovery was 97.4%. It is suggested that the method was accurate, simple and reliable for determination of Cochinchinenin C in Dragon's Blood.

Key words Dragon's Blood, cochinchinenin C, RP-HPLC

龙血竭是广西区医药公司等单位联合开发的中药一类新药, 1996年以“广西血竭”获卫生部批准试生产, 1995年转正式生产, 1999年国家药品监督管理局批准其试行标准转为正式标准^[1], 品名定为“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, 具有活血散瘀、定痛止血、敛疮生肌等功效, 用于跌打损伤、瘀血作痛、妇女气血凝滞、外伤出血、疔疮久不收口。龙血竭与进口血竭^[2]在药理和临床疗效上基本一致^[3], 可作为进口血竭的代用品。龙血竭主要含黄酮类、芳香类、皂感苷类等化学成分^[3,4], 剑叶龙血素 C (Cochinchinenin C, 2, 3, 5, 6-四氯-对二甲氧基苯) 为其含量极低的含氯特征成分^[5], 龙血竭质量标准中已记载剑叶龙血素 C 的薄层色谱鉴别, 至今未见文献报道龙血竭中剑叶龙血素 C

的含量测定方法。为了更好地控制龙血竭的质量, 我们建立了反相高效液相色谱法测定龙血竭中剑叶龙血素 C 含量的方法。

1 仪器与药品

Waters 高效液相色谱仪 (515泵×2996二极管阵列检测器, 717自动进样器, TCM 柱温箱), Millennium 32 色谱工作站。

芒果牌龙血竭 (广西中医学院制药厂生产, 批号 20010515); 剑叶龙血素 C 对照品 (自制, 高效液相色谱法归一化含量为 99.65%); 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 试剂均为 AR 级。

2 色谱条件

色谱柱: Phenomenex C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 水-乙腈 (33:67); 流速为 1 ml/min; 检测波长: 211 nm; 柱温: 35°C; 进样量: 20 μl。

2003-06-16 收稿。

* 桂林医学院 200 届实习生

3 对照品溶液及供试品溶液的制备

3.1 对照品溶液的制备

精密称取经五氧化二磷干燥至恒重的剑叶龙血素 C 对照品 8.57 mg, 置于 100 ml 容量瓶中, 加甲醇约 60 ml, 超声使之溶解, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1 ml, 置 10 ml 容量瓶, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液

3.2 供试品溶液的制备

取经五氧化二磷干燥至恒重的龙血竭细粉约 2.5 g, 精密称定, 置于 50 ml 容量瓶中, 加石油醚 (60~90°C) 适量, 超声 20 min 使之溶解, 放冷, 加石油醚 (60~90°C) 稀释至刻度, 滤过, 精密量取续滤液 25 ml, 置于 50 ml 具塞锥形瓶中, 用氮气吹干, 精密加入甲醇 10 ml, 振摇使残渣溶解, 经微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 取续滤液作为供试品溶液

分别取对照品溶液和供试品溶液, 在上述色谱条件下进样 20 μl, 记录色谱图 (图 1 图 2), 供试品中剑叶龙血素 C 分离良好; 理论塔板数以剑叶龙血素 C 计为 6700

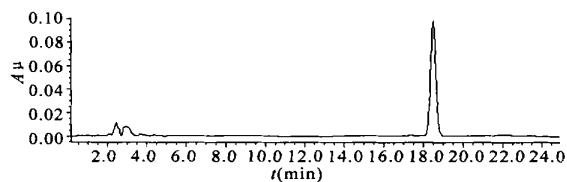


图 1 剑叶龙血素 C 对照品 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatogram of Cochininenin C CRS

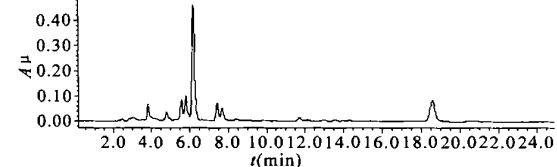


图 2 龙血竭样品 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatogram of sample in Dragon's Blood

4 检测波长的选择

采取上述的液相色谱条件, 取剑叶龙血素 C 对照品适量, 用甲醇制成每 1 ml 含 0.857 μg 的剑叶龙血素 C 对照品溶液, 进行二极管阵列检测器光谱扫描 (图 3), 其在 211 nm 波长处有最大吸收, 故选取 211 nm 作为测定波长

5 方法与结果

5.1 线性关系考察

在上述色谱条件下, 精密吸取对照品溶液 5 μl,

10 μl, 20 μl, 30 μl, 40 μl, 分别注入液相色谱仪, 测定以进样量 X (μg) 为横坐标, 峰面积 Y (A) 为纵坐标, 得回归方程为: $Y = 12825840.43X - 52179.701, r = 0.9996$ 说明剑叶龙血素 C 在 42.85 ~ 342.8 μg 进样范围内线性关系良好。

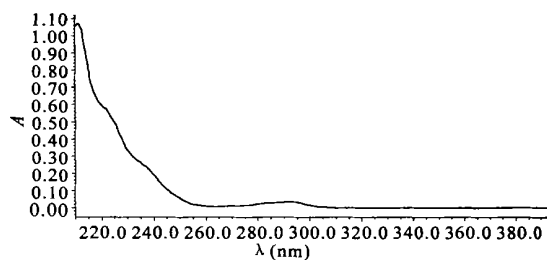


图 3 剑叶龙血素 C 对照品紫外光谱扫描图

Fig. 3 UV absorption spectrum of Cochininenin C CRS

5.2 精密度试验

精密吸取对照品溶液, 重复进样 5 次, 每次 20 μl, 以剑叶龙血素 C 的峰面积计算, RSD 为 0.1% ($n = 5$), 表明精密度良好。

5.3 重复性试验

取龙血竭样品 5 份, 按“3.2”项的方法平行操作, 吸取供试品溶液 20 μl, 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 测定结果的 RSD 为 1.4%, 重复性良好。

5.4 稳定性试验

取对照品溶液, 放置 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h 后, 分别再次测定, 记录峰面积, 测定结果的 RSD 为 1.2%。说明在 48 h 内稳定性良好。

5.5 回收率试验

分别取 3 份龙血竭样品 (含量 52.44 μg/g) 约 1.5 g, 精密称定, 分别精密加入剑叶龙血素 C 对照品溶液 (20.84 μg/ml) (精密称取经五氧化二磷干燥至恒重的剑叶龙血素 C 对照品 10.46 mg, 置于 500 ml 容量瓶中, 加石油醚 (60~90°C) 适量, 超声使之溶解, 放冷, 用石油醚 (60~90°C) 稀释至刻度, 摇匀, 即得) 4 ml, 按“3.2”项的方法操作, 测得剑叶龙血素 C 平均回收率为 97.87% ($n = 5$), RSD 为 1.7%, 结果见表 1

表 1 龙血竭中剑叶龙血素 C 的加样回收率试验结果

Table 1 Recovery of of Cochininenin C in Dragon's Blood

样品含量 Back ground	加样量 Sample	测出量 Observation	回收率 Recovery	平均回收率 Averate Recovery	RSD (%)
(μg)	(μg)	(μg)	(%)	(%)	(%)
78.50	83.36	158.55	96.03		
78.67	83.36	162.43	100.48		
78.54	83.36	158.78	96.26	97.87	1.7
78.66	83.36	159.86	97.41		
78.79	83.36	161.44	99.15		

5.6 样品测定

取芒果牌龙血竭,按对照品溶液及供试品溶液的制备项操作,将对照品溶液及供试品溶液 20 μ l 分别注入液相色谱仪,以外标法计算,结果龙血竭中剑叶龙血素 C 的含量为 52.44 μ g/g

6 讨论

本文首次建立了反相高效液相色谱法测定龙血竭中剑叶龙血素 C 的含量,为进一步完善龙血竭的质量标准提供了准确、简单、可行的测定方法。

6.1 流动相的选择

比较了甲醇-水、乙腈-10%冰醋酸、乙腈-水三种流动相系统,结果表明,乙腈-水具有最佳的分离效果。

6.2 样品提取溶剂的选择

分别用甲醇、醋酸乙酯、石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)提取剑叶龙血素 C,比较样品 HPLC 图,结果用甲醇、醋酸乙酯提取出的杂质偏多,基线极不平稳;而用石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)提取完全,基线平稳,分离良好,故选择石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)提取剑叶龙血素 C。

6.3 剑叶龙血素 C 具有升华性

笔者在分离鉴定剑叶龙血素 C 时发现,剑叶龙

血素 C 具有升华性,因此在选择石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)提取液挥干条件时,分别试验了低温水浴蒸干、低温水浴蒸干至约 5 ml 后用氮气吹干、自然挥干和氮气吹干 4 种方法,并测定龙血竭中剑叶龙血素 C 含量,结果分别为 0.01 μ g/g, 20.34 μ g/g, 52.44 μ g/g, 52.42 μ g/g。由于石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)自然挥干需要的时间较长,故选择用氮气吹干的方法。同时提示应严格控制生产工艺条件,防止剑叶龙血素 C 升华,含量降低。

参考文献

- 1 国家药品监督管理局.国家标准.WS₃-082(Z-016)-99(Z).
- 2 中华人民共和国药典(一部).2000.110.
- 3 文东旭.龙血竭的研究进展.中草药,2001,32(11):1053~1054.
- 4 胡迎庆,宫 颢,屠鹏飞.龙血树属植物化学成分及生物活性研究进展.国外医学·植物药分册,2000,15(1):5~8.
- 5 唐人九,文东旭,韦 宏等.广西西竭石油醚和醋酸乙酯部位中的化学成分.中国中药杂志,1995,20(7):421~423.

(责任编辑:邓大玉)

(上接第 275 页 Continue from page 275)

止内层氧化。我们认为,在涂层表面形成一层玻璃状壳层是硼氮共渗膏剂具有自保护作用的原因。这层玻璃状壳层主要由 SiO₂ 组成,尚有部分 B₂O₃、Na₂O、K₂O,在高温下呈粘状,空气介质中的氧很难扩散进入,从而起到保护试样的作用。

SiO₂ 是粘状玻璃层的主要成分,同时含有 B₂O₃,具有高的化学稳定性、热稳定性和机械强度。由硼氮组成的玻璃体的化学稳定性及耐热稳定性则更高,还可降低玻璃体的熔点,即可扩大保护温度范围^[5]。

总之,以 SiO₂ 为主组成的玻璃状壳层,结构致密,化学稳定性好,能很好地保护试样在空气介质中加热处理而不致氧化。

3 结束语

(1) 自保护硼氮共渗剂,能直接在空气加热炉中进行共渗,不需保护气氛或装箱保护,既省能耗又省渗剂,降低了生产成本,还可实现局部共渗。

(2) 自保护硼氮共渗剂由供硼剂、供氮剂、催渗剂、填充剂、粘结剂与微量添加剂所组成,这种膏剂表层可形成一层很薄的玻璃状釉壳,具有保护作用,釉壳下的涂料仍能保持疏松状态。经这种膏剂处理的零

件,具有表面易清理的优点。

(3) 硼氮共渗膏剂涂层厚度以 4 mm 为宜,45 钢经 890 $^{\circ}$ C \times 5 h 处理后,可得 100~150 μ m 厚的硼氮化物层。

(4) 经自保护硼氮共渗膏剂处理的试样(45 钢)其耐磨性与固体硼氮共渗相当,而优于固体渗硼。其耐腐蚀性与固体硼氮共渗的相当。

(5) 经 X 射线仪相结构分析表明:经自保护硼氮共渗膏剂处理的试样(Q235 钢),表层以 Fe₂B 相为主,过渡层富集 Fe₃N,从而提高了渗硼层机械性能。

参考文献

- 1 王国佐.钢的化学热处理,北京:中国铁道出版社,1980.
- 2 楼南金.提高 3Cr2W8V 热挤压模具寿命的研究,金属热处理,1985.11.
- 3 楼南金.硼氮复合渗提高工件的耐盐酸腐蚀性,金属热处理,1983.4.
- 4 楼南金.钢铁耐酸腐蚀研究.化工机械,1983.4.
- 5 C C 索采夫.金属加热用保护涂层,北京:机械工业出版社,1979.

(责任编辑:黎贞崇)