

文章编号: 1672 - 058X(2009)03 - 0394 - 05

龙血竭散中龙血竭的高效液相色谱特征研究

蒋 蓥¹, 张 敏¹, 王鹏娇¹, 高秀丽^{2*}, 史俊鹏³

(1. 贵阳医学院 药学院, 贵阳 550004; 2 重庆科瑞制药有限责任公司 研发中心, 重庆 400060;

3 重庆医学工业研究院有限责任公司, 重庆 400063)

摘 要:用 HPLC 法对中药制剂龙血竭散中主要成分龙血竭的指纹图谱进行了研究, 初步建立了龙血竭的 HPLC 指纹图谱, 并进行相似度评价, 表明该方法简单可行, 能够有效地控制龙血竭散中龙血竭的质量。

关键词:龙血竭; 指纹图谱; HPLC; 相似度

中国分类号: O656

文献标志码: A

龙血竭是名贵的中药材, 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, 其药理作用为抗细菌、真菌和其他微生物, 抗氧化、止血、活血、降血糖等^[1,2]。目前, 市场上已有多个厂家以龙血竭作为原料生产出各种剂型的成药, 比如: 龙血竭散、龙血竭胶囊、龙血竭滴丸等, 龙血竭是其中主要的药用活性成分, 因此, 对其质量的控制, 各个厂家基本上采用的是控制龙血竭的质量, 而对龙血竭质量的控制手段主要是采用薄层色谱法^[3]和高效液相色谱法对已知化合物 (如龙血素 B、龙血素 A 和 B 等) 进行含量测定^[4-7]。但是由于受天气、气候、产地等各种因素的影响, 龙血竭中有效生物活性成分的含量会有较显著的差异, 从而影响其质量。采用 HPLC 法建立了龙血竭的指纹图谱, 通过对十批龙血竭散样品的测定, 为龙血竭散中龙血竭的质量控制提供了依据。

1 仪器与试剂

美国安捷伦 1100 高效液相色谱仪, Eclipse XDB-C18 色谱柱 (150mm ×4.6 mm, 5μm)、Phenomenex-C18 保护柱 (3mm ×4.6 mm, 5μm)。龙血素 A 对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 111660-200301), 龙血素 B 对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 111558-200303)。乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。龙血竭散样品来源于海南博大制药厂 (批号: 20050901、20050109、06080401、06080402、06101302、20060110、06110303、070519、20051204)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Eclipse XDB-C18 色谱柱 (150 mm ×4.6 mm)、Phenomenex-C18 保护柱 (3 mm ×4.6 mm, 5μm);

收稿日期: 2009 - 03 - 01; 修回日期: 2009 - 06 - 18。

作者简介: 蒋 蓥 (1982 -), 女, 重庆南岸人, 硕士研究生, 从事药物分析研究。

* 通讯作者: 高秀丽 (1965 -), 女, 副教授, 硕士, 从事药物质量及新药开发研究。

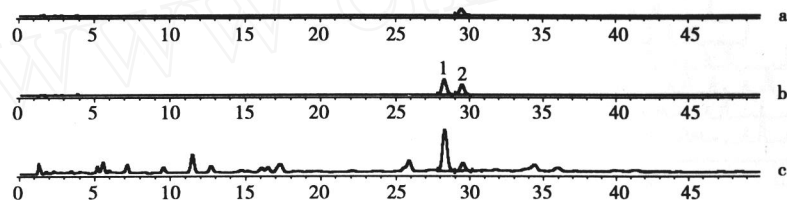
检测波长: 275 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 进样体积: 10 μ L; 柱温: 40 ; 流动相: 乙腈-水, 梯度洗脱见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

t/min	乙腈	H ₂ O
0	25	75
30	40	60
55	45	55

2.2 对照品溶液的制备

取龙血素 B 对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 制成每 1 mL 含 12.01 μ g 的龙血素 B 对照品溶液。取龙血素 A 和 B 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 26.06 μ g 龙血素 A 和 18.01 μ g 龙血素 B 的对照品溶液。色谱图见图 1。



1 龙血素 A; 2 龙血素 B

a 龙血素 B 对照品溶液; b 龙血素 A 和龙血素 B 对照品溶液; c 供试品溶液

图 1 龙血竭对照品及样品高效液相色谱图

2.3 供试品溶液的制备

取供试品约 0.1 g, 精密称定, 至 25 mL 量瓶中, 加甲醇 20 mL, 溶解, 定容至刻度, 摇匀, 滤过即得。色谱图见图 1。

2.4 重现性试验

取同一批号的龙血竭散, 分别精密称取 6 份, 制备供试品溶液, 分别进样, 测得结果表明, 各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明样品重现性良好。

2.5 精密度试验

取重现性试验中同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 测得结果表明: 各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一批号的龙血竭散, 精密称量, 制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、16、24 h 进样, 测得结果表明, 各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 指纹图谱的建立

2.7.1 指纹图谱的测定

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L, 注入高效液相色谱仪, 记录 55 min 的色谱图。色谱图见图 2、图 3。

2.7.2 共有峰的确定

测定 10 批龙血竭散中龙血竭的指纹图谱, 其中 14 个峰为龙血竭的共有指纹峰, 样品中 11 号峰为龙血素 A 的色谱峰, 样品中 12 号峰为龙血素 B 的色谱峰, 其响应值较高, 色谱峰较窄, 峰形好。因此以 12 号峰

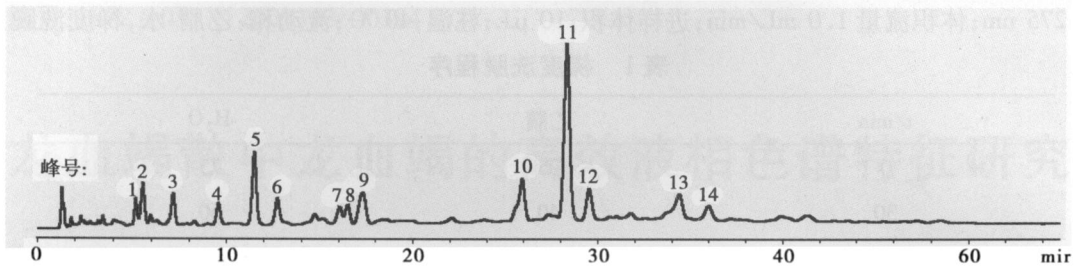


图 2 样 S1 龙血竭散的高效液相色谱图

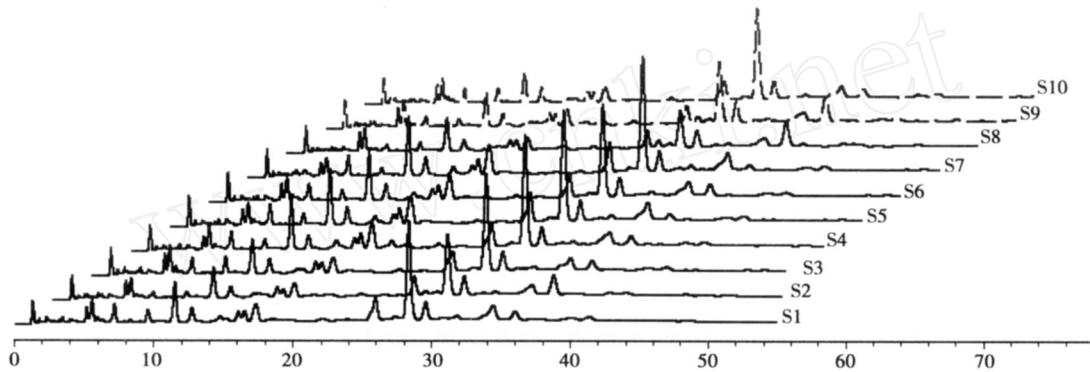


图 3 1~10 龙血竭散中龙血竭的高效液相色谱图

(龙血素 B)作为色谱指纹图谱的参比峰,计算各共有指纹峰相对于参比峰的相对保留时间和相对峰面积的比值。结果见表 2、表 3。

表 2 10批龙血竭散的龙血竭指纹图谱中共有峰的相对保留时间

共有峰	共有峰的相对保留时间										平均值	RSD%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
1	0.174 8	0.175 0	0.174 9	0.174 8	0.174 8	0.174 5	0.174 8	0.174 9	0.174 8	0.175 0	0.174 8	0.081 1
2	0.187 8	0.187 8	0.187 6	0.188 1	0.188 2	0.187 5	0.188 7	0.187 9	0.187 6	0.187 9	0.187 9	0.188 5
3	0.242 1	0.242 0	0.241 9	0.241 9	0.241 8	0.241 4	0.241 8	0.242 0	0.241 9	0.242 4	0.241 9	0.104 6
4	0.323 5	0.323 2	0.322 9	0.323 1	0.323 0	0.322 5	0.322 8	0.322 9	0.322 9	0.323 5	0.323 0	0.095 7
5	0.388 5	0.388 1	0.387 8	0.388 0	0.388 0	0.387 4	0.388 0	0.388 2	0.388 3	0.388 6	0.388 1	0.088 8
6	0.430 4	0.430 0	0.429 7	0.429 9	0.429 8	0.429 2	0.429 9	0.430 0	0.430 2	0.430 4	0.430 0	0.082 2
7	0.543 7	0.543 0	0.542 7	0.543 0	0.543 2	0.542 4	0.543 2	0.543 0	0.543 1	0.543 7	0.577 0	0.073 1
8	0.558 1	0.557 7	0.557 4	0.557 5	0.557 5	0.556 8	0.557 5	0.557 8	0.558 0	0.558 5	0.557 7	0.082 7
9	0.585 8	0.585 3	0.585 1	0.584 9	0.584 9	0.584 2	0.584 9	0.585 9	0.585 5	0.586 2	0.585 3	0.101 6
10	0.877 4	0.877 8	0.877 3	0.877 4	0.877 4	0.877 4	0.878 1	0.877 9	0.878 9	0.877 7	0.877 7	0.055 8
11	0.958 8	0.959 1	0.958 8	0.958 7	0.958 8	0.958 5	0.958 7	0.959 0	0.959 2	0.958 8	0.958 8	0.021 5
12	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 1	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.003 2
13	1.165 3	1.165 7	1.166 0	1.165 5	1.165 7	1.169 3	1.167 5	1.166 6	1.166 0	1.166 0	1.166 4	0.103 5
14	1.219 0	1.219 3	1.219 5	1.219 2	1.220 0	1.221 9	1.220 8	1.219 3	1.219 1	1.219 3	1.219 7	0.076 0

表 3 10批龙血竭散的龙血竭指纹图谱中共有峰的相对峰面积

共有峰	共有峰的相对峰面积										平均值	RSD%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
1	313.157	346.155	401.909	276.26	292.283	337.86	288.643	397.145	449.632	363.948	346.699	16.3679
2	610.834	524.921	714.811	642.065	559.03	612.856	528.314	596.026	693.124	612.578	609.456	10.3254
3	583.865	315.39	590.789	607.345	612.303	585.838	674.964	358.566	451.07	525.134	530.526	22.2303
4	459.626	273.312	591.311	408.589	355.285	400.833	371.75	412.067	436.763	529.715	423.925	21.0512
5	1301.8	1070.38	1241.36	1685.45	1628.33	1604.23	1887.07	1211.51	1289.76	1147.19	1406.71	19.3550
6	743.725	663.876	899.877	658.139	733.65	947.876	1036.45	899.211	960.909	871.022	841.474	15.7236
7	439.294	464.785	575.835	550.294	375.911	544.214	475.082	507.806	608.317	576.133	511.767	14.1783
8	425.685	347.584	497.292	629.228	522.683	596.098	656.888	496.537	543.379	450.57	516.594	18.4103
9	946.188	751.879	952.193	1380.23	1225.21	1275.00	1634.73	806.433	1029.79	934.606	1093.63	25.4194
10	1543.80	1008.07	2006.68	1577.08	1403.32	2045.05	1788.23	1333.73	1426.57	1577.74	1571.03	19.9571
11	3912.38	2667.60	4120.09	4730.98	4258.82	4077.23	4974.64	2171.06	3082.84	4012.85	3800.85	23.4412
12	1014.48	1091.94	1382.02	1385.53	1010.65	1416.30	1563.60	1527.59	1673.56	1455.74	1352.14	17.3269
13	1717.51	1542.10	2457.01	2788.92	1896.93	2857.87	2860.83	2525.27	2834.56	2808.20	2428.92	21.2346
14	778.433	1286.77	1353.80	1423.57	691.326	1608.86	1487.38	2223.50	2306.28	1538.6	1469.85	35.3169

2.7.3 指纹图谱的相似度计算

指纹图谱相似度可以评定各批次或各生产厂家产品指纹图谱间的整体相似性,定量描述其各自化学组成的差异与波动。实验采用药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统(A版),对10批龙血竭散中龙血竭的相似度进行了评价。将龙血竭指纹图谱导入相似度评价软件,设定匹配模版,进行谱峰自动匹配,生成对照指纹图谱,进行相似度评价,结果见图4和表4。

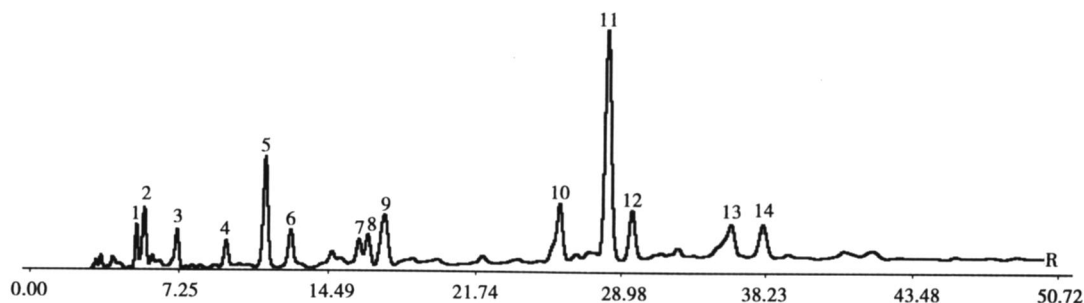


图 4 龙血竭对照指纹图谱

表 4 10批龙血竭中龙血竭指纹图谱相似度结果

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
相似度	0.951	0.934	0.954	0.955	0.938	0.947	0.970	0.879	0.924	0.908

3 讨论

(1) 在龙血竭散的质量标准中,龙血竭含量测定方法的样品前处理的方法较复杂,操作步骤多,不易准确掌握,对三氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇 3 种不同提取溶剂进行了比较选择,三氯甲烷和乙酸乙酯提取的样品,色谱峰和峰面积均少于甲醇提取的样品,因此,最终采用甲醇直接溶解的方法提取样品,该方法更简便易行。

(2) 为考察分析方法的可靠性,以龙血竭散 S1(样品 1)为代表,对方法的稳定性、精密度、重现性进行了考察。结果显示,该 HPLC 法具有较好的稳定性、精密度、重现性。为龙血竭质量控制提供了一定的科学依据,也为龙血竭质量标准的提升进行了有益的探索。

(3) 从实验中相同生产厂家的不同批次龙血竭散指纹图谱中可以看出,10 批龙血竭散指纹图谱中主要色谱峰的整体图貌基本一致。同时相似度评价结果表明:10 批样品基本相似,个别批次仍然存在一定的差异(如样品 8)。因此,为保证龙血竭中药原料药质量的稳定性和一致性,应固定药材原料的来源,以保证龙血竭提取工艺的稳定。

参考文献:

- [1] 陈定芳,宋启生. 血竭资源开发的研究进展 [J]. 广州中医药大学学报, 2004, 21(6): 489-492
- [2] 蓝鸣生. 龙血竭研究进展 [J]. 医学文选, 2005, 24(6): 1053-1055
- [3] 王玉华,穆生媛,王伟,等. 薄层扫描法测定不同来源血竭中血竭素含量 [J]. 时珍国医国药, 2000, 11(12): 1073-1074
- [4] 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
- [5] 胡迎庆,张静泽,刘岱琳,等. 两种“柬龙牌”血竭的鉴别 [J]. 中草药, 2002, 33(4): 358-360
- [6] 孙胜利,宓鹤鸣,娄子洋,等. 影响国产血竭中龙血素 B 含量测定的干扰成分的分离鉴定 [J]. 解放军药学报, 2002, 18(2): 74-76
- [7] 胡迎庆,宗宁,刘岱琳. 反相高效液相色谱法测定龙血竭中紫檀的含量 [J]. 药物分析杂志, 2002, 22(6): 428-430

RP-HPLC Characteristics of Dragon 's Blood in Dragon 's Blood Power

JIANG Qian¹, ZHANG Min, WANG Peng-jiao,
GAO Xiu-li², SHI Jun-peng³

(School of Pharmacy, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China;

2 Chongqing Kerui Pharmaceutical Company, Chongqing 400060;

3. Chongqing Medical and Pharmaceutical Research Academy, Chongqing 400063, China)

Abstract: To study the fingerprint of dragon 's blood by high performance liquid chromatography, HPLC fingerprint of dragon 's blood was established and the similarity of the fingerprint was compared, which demonstrates that the method is simple, accurate, and can be used to control the quality of dragon 's blood in dragon 's blood power

Key words: dragon 's blood; fingerprint; HPLC; similarity

责任编辑:田 静