

气相色谱法测定龙血竭中剑叶龙血素 C 的含量^{*}张海防 陈国彪 常艳波^{**}

(海南省药品检验所 海口 570216)

摘要 目的:建立测定龙血竭中剑叶龙血素 C 含量的方法。方法:采用气相色谱法,HP-5 弹性石英毛细管色谱柱(30 m × 0.32 mm × 0.25 μm),载气为 N₂,流速 1 mL · min⁻¹,进样口温度 250℃,μECD 检测器温度 300℃,程序升温,外标法计算含量。结果:剑叶龙血素 C 在 0.1 ~ 2 μg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好($r = 0.9998$);平均加样回收率为 100.3%,RSD($n = 6$) 为 0.5%。结论:本方法简单、灵敏、重复性好,可用于龙血竭中剑叶龙血素 C 的含量测定。

关键词:龙血竭;剑叶龙血素 C;气相色谱法;电子捕获检测器

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:0254-1793(2010)07-1407-03

GC Studies on quantitative determination of
cochinchinenin C in Dragon's Blood^{*}ZHANG Hai-fang, CHEN Guo-biao, CHANG Yan-bo^{**}

(Hainan Provincial Institute for Drug Control, Haikou 570216, China)

Abstract Objective: To establish a method for the separation and quantitative determination of Cochinchinenin C in Dragon's Blood. **Methods:** The Gas chromatographic analysis was performed using HP-5 capillary column (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm); highly pure N₂ was used as carrier gas at the flow rate of 1 mL · min⁻¹; the inlet port and the μECD detector temperature was 250℃ and 300℃ respectively; the column temperature was 120℃ - 210℃ and rose by program. The content was calculated with external standard. **Results:** Cochinchinenin C has good liner relationship in the concentration range of 0.11 - 2.14 μg · mL⁻¹ ($r = 0.9998$); the average recovery was 100.3%, RSD($n = 6$) was 0.5%. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible. It can be applied for the quantitative determination of Cochinchinenin C in Dragon's Blood.

Key words: Dragon's Blood; cochinchinenin C; GC; ECD

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、瘀血止痛、妇女气血凝滞、外伤出血、疮久不收口^[1]。龙血竭主要含黄酮类、芪类、甾醇类、皂苷类等化学成分^[2-4],剑叶龙血素 C (Cochinchinenin C, 2,3,5,6-四氯-1,4-二甲氧基苯) 为其含氯特征成分^[5]。龙血竭药材国家标准 WS₃₋₀₈₂(Z-016)-99(Z) 中仅收载剑叶龙血素 C 的薄层色谱鉴别方法,本文首次应用气相色谱法(电子捕获检测器)建立了龙血竭中剑叶龙血素 C 的含量测定方法,为进一步完善龙血竭质量标准提供了可行的方法。

1 仪器与试剂

Agilent 6890N 气相色谱仪,μECD 检测器,Agilent 6890N 色谱工作站(美国安捷伦科技公司),电子分析天平(德国 Sartorius 公司)等。

龙血竭为云南产(昆明大观制药有限公司),剑叶龙血素 C 对照品(中国药品生物制品检定所 111559-200302);高纯 N₂(99.999%);甲醇为分析纯。

2 色谱条件

HP-5 色谱柱(5% phenyl methyl siloxane 30 m × 0.32 mm × 0.25 μm);载气为高纯 N₂,流速 1 mL · min⁻¹;程序升温:柱温初始为 120℃,以 5℃ · min⁻¹ 升

* 国家科技支撑计划(2007BA127B06)

** 通讯作者 Tel: (0898) 66832971; E-mail: chang.y.b@163.com

温至 210℃,保持 4 min;进样量 1 μL ;分流比(50:1);进样口温度 250℃;微电子捕获检测器(μECD);检测器温度 300℃。剑叶龙血素 C 对照液与龙血竭供试液色谱图见图 1。

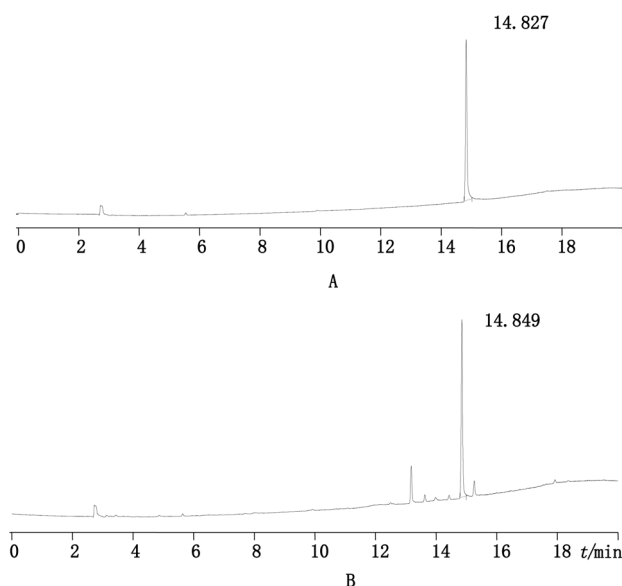


图 1 剑叶龙血素 C 对照液 (A) 和龙血竭供试液 (B) 气相色谱图
Fig 1 GC Chromatograms of reference substance of Cochinchinenin C (A) and sample of Dragon's Blood (B)

3 溶液制备

3.1 对照品储备液 取剑叶龙血素 C 对照品 10 mg 精密称定,置 100 mL 量瓶中,用甲稀释至刻度,摇匀。精密量取上述溶液 1 mL 到 50 mL 量瓶中,用甲醇释至刻度,摇匀,作为对照品储备液。

3.2 供试品溶液 取干燥龙血竭粉碎后使其过四号药筛,称取药粉 0.05 g 至 25 mL 容量瓶中,精密称定,加甲醇 20 mL 超声(功率 250 W,频率 40 Hz)约 5 min 使其溶解,放至室温,加甲醇稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液作为供试液。

4 方法学考察

4.1 线性关系考察 分别精密量取对照品储备液(2.14 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀。得系列浓度(0.11, 0.21, 0.43, 0.64, 1.07, 1.50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的对照品溶液。取以上对照品溶液及储备液分别进样 1 μL , 记录其峰面积。以峰面积 Y 对浓度 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行回归分析。得回归方程:

$$Y = 3206.4 X + 69.378 \quad r = 0.9998$$

说明剑叶龙血素 C 在 0.11 ~ 2.14 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好。

4.2 定量限及检测限 取对照品溶液逐级稀释后,

照“2”项下的色谱条件进样测定,以 $S/N = 10$ 为定量限,结果为 4×10^{-12} g; 以 $S/N = 3$ 为检测限,结果为 10^{-12} g。

4.3 精密度试验 取同一供试品溶液连续进样 6 次,测得剑叶龙血素 C 峰面积的 RSD ($n = 6$) 为 0.7%。

4.4 重复性试验 取同一批样品 6 份,按“3.2”项下方法制备供试品溶液,计算剑叶龙血素 C 含量,平均含量为 337.1 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD ($n = 6$) 为 0.5%。

4.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别在室温下放置 0, 1, 3, 5, 7, 18 h, 同法测定,测得剑叶龙血素 C 峰面积的 RSD ($n = 6$) 为 1.7%, 表明供试品溶液在 18 h 内稳定。

4.6 回收率试验 取已知含量(337.1 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) 的样品 0.025 g 置 25 mL 量瓶中,精密称定,共 6 份,分别加入对照品溶液(2.14 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 4 mL。按“3.2”项下方法制成供试液,分别进样,测得剑叶龙血素 C 平均回收率为 100.7%, RSD ($n = 6$) 为 0.4%。

表 1 剑叶龙血素 C 回收率

Tab 1 The results of recovery of Cochinchinenin C

样品量 (sample) /g	样品含量 (content) / μg	加入量 (added) / μg	测得量 (detected) / μg	回收率 (recovery) /%	平均回收率 (average recovery) /%	RSD /%
0.0250	8.428	8.544	8.516	99.7	100.3	0.5
0.0252	8.495	8.544	8.580	100.4		
0.0255	8.596	8.544	8.622	100.9		
0.0254	8.562	8.544	8.584	100.5		
0.0257	8.663	8.544	8.562	100.2		
0.0256	8.630	8.544	8.528	99.8		

5 含量测定

按“3.2”项下方法对 3 个不同批次龙血竭进行处理,每批平行制备 3 个供试品溶液 ($n = 3$),分别进样,测得 3 批龙血竭中剑叶龙血素 C 的含量分别为: 310.6 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、337.1 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、249.3 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

6 讨论

6.1 本文根据剑叶龙血素 C 可挥发的化学性质^[5],首次建立了气相色谱法(电子捕获检测器)测定龙血竭中剑叶龙血素 C 的含量,与文献报道的反相高效液相色谱法^[6]比较,方法更简便、灵敏、快速。该法也可应用于龙血竭中剑叶龙血素 C 的鉴别,与国家标准中收载的薄层色谱鉴别方法比较干扰较小,并且避免了繁琐的前处理过程。

6.2 电子捕获检测器(ECD)只对具有电负性的物质,如含卤素、硫、磷、氮的物质响应,而对电中性的物质则无信号,最小检测量可达 10^{-13} 克。龙血竭所含化学成分复杂,如果采用FID作为检测器,杂峰多,对分离过程要求很高。本文利用了ECD高灵敏度、高选择性的优势,获得的色谱图中仅有剑叶龙血素C等少数对ECD响应的化合物色谱峰,使检测时间缩短,干扰大为减少。

6.3 龙血竭是剑叶龙血树含树脂木材的乙醇提取物,因此用适当的溶剂,如甲醇即可使样品全部溶解用于测定,无需耗时而复杂的提取步骤,同时也保证了剑叶龙血素C无损失的溶出,方法简便而经济。

6.4 本试验分别尝试了不同极性的毛细管色谱柱HP-5、DB-1701、HP-INNOWAX对剑叶龙血素C进行分离,并对分离效果进行了比较。HP-INNOWAX保留时间短,分离度较差,不适合分离此化合物;在弱极性的HP-5和中等极性的DB-1701色谱柱上,HP-5对样品中各色谱峰的分离度好,分析时间较短,而DB-1701要得到相同的分离效果需要更长分析时间,因此选择了HP-5。

试验中发现进样口温度对剑叶龙血素C的含量测定有影响。进样口温度为200℃时,待测峰拖尾、峰面积重复性差,表明样品可能未完全气化而残留在进样口中,导致测定不准确,升高进样口温度到250℃,待测峰的拖尾现象和峰面积的重复性都得到

明显改善。

参考文献

- 1 State Specification Promulgated by SFDA (国家药品监督管理局国家标准). WS₃-082(Z-016)-099(Z).
- 2 HU Ying-qing(胡迎庆), GONG Biao(宫飏), TU Peng-fei(屠鹏飞). Advances in study on chemical constituents and biological activities in plants of *Dracaena* Vand. ex L. (龙血树属植物化学成分及生物活性研究进展). *World Phytomed* (国外医药植物药分册), 2000, 15(1): 5
- 3 HU Ying-qing(胡迎庆), LI Ling-zhi(李灵芝), HAN Hui-wen(韩慧文). HPLC determination of Loureirin A and B in Dragon's blood (RP-HPLC测定龙血竭中龙血素A和B的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2003, 23(1): 7
- 4 HU Ying-qing(胡迎庆), ZONG Ning(宗宁), LIU Dai-lin(刘岱琳). RP-HPLC studies on quantitative determination of Pterostilbene in Dragon's blood (反相高效液相色谱法测定龙血竭中紫檀芪的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2002, 22(6): 428
- 5 TANG Ren-jiu(唐人九), WEN Dong-xu(文东旭), WEI Hong(韦宏) *et al.* Constituents of the petroleum ether and ethyl acetate extract fractions from *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen (广西血竭石油醚和醋酸乙酯部位中的化学成分). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1995, 20(7): 421
- 6 WEN Dong-xu(文东旭), LIU Wei-lin(刘伟林), CHEN Qian(陈骞) *et al.* RP-HPLC determination of Cochinchinenin C in Dragon's Blood (反相高效液相色谱法测定龙血竭中剑叶龙血素C的含量). *Guangxi Sci* (广西科学) 2003, 10(4): 279

(本文于2010年7月20日收到)