

替代对照品法测定龙血竭原料中龙血素 A 和 B 的含量

许佳¹ 金红宇² 孙磊^{2*}

(1. 北京市朝阳区药品检验所, 北京 100028; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 建立替代对照品法同时测定龙血竭原料剑叶龙血树中龙血素 A、B 的含量。方法: 提出了相对斜率的概念, 解释了它与相对校正因子的数学关系, 阐释了相对斜率(相对校正因子)的物理意义, 进而采用相对斜率算法建立剑叶龙血树的含量测定法, 并进行方法学验证。结果: 方法的线性和回收率均良好; 以龙血素 A 为参照, 龙血素 B 的相对斜率和相对保留时间平均值为 1.248 和 1.06, 且在 5 个不同的色谱系统上保持稳定; 相对斜率值与使用紫外分光光度计按吸光系数法测得值一致。结论: 相对斜率算法简便、准确, 以此进行替代对照品法测定剑叶龙血树中龙血素 A、B 是可行的。

关键词: 民族药; 龙血竭; 剑叶龙血树; 龙血素 A; 龙血素 B; 高效液相色谱法; 替代对照品法; 一测多评; 相对斜率

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)11-2058-05

Determination of loureirin A and loureirin B in *Dracaena cochinchinensis* by substitute reference substance

XU Jia¹, JIN Hong-yu², SUN Lei^{2*}

(1. Beijing Chaoyang Institute for Drug Control, Beijing 100028, China;

2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for determination of loureirin A and loureirin B in *Dracaena cochinchinensis* by substitute reference substance. **Method:** To give the definition and physical interpretation of relative slope(RS), explain the relationship between RS and relative correction factor. The determination of loureirin A and loureirin B was established and validated. **Results:** The quantitative analysis was demonstrated with good linear relationship and recoveries. The RS and relative retention time of loureirin B detected by five different HPLC systems showed good repeatabilities. And mean values were 1.248 and 1.06. The values of RS detected by HPLC and ultraviolet spectrophotometry were equal. **Conclusion:** The method is simple and accurate, can be used for determination of loureirin A and loureirin B in *D. cochinchinensis*.

Key words: ethnic drug dragon's blood; *Dracaena cochinchinensis*; loureirin A; loureirin B; HPLC; substitute reference substance(SRS); quantitative analysis of multi-components by single marker(QAMS); relative slope(RS)

龙血竭为我国研制的血竭替代品, 其局颁标准 WS3-082(Z-016)-99(Z) 的含量测定项仅控制龙血素 B 的含量。它的原料为百合科剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen 的含脂木材, 该原料还作为民族药收载于《广西壮族自治区壮药质量标准》^[1], 但标准无含量测定项。已有 HPLC 法测定龙血竭^[2,3] 及其原料^[4] 中龙血素 A、B 含量的报道, 这些方法均为外标法, 需要 2 种对照品。替代对照品法或称“一测多评”法^[5-8] 是解决中药多指标含测面临的对照品缺乏和对照品费用压

力的思路之一。本文进一步提出了相对斜率概念, 并解释了它的物理意义, 建立了使用单一对照品测定龙血竭原料中龙血素 A、B 含量的方法, 为该类药物的质量控制、相关标准的完善和替代对照品法的适用性提供了依据。

1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪(DAD 检测器, Chemstation 工作站); Agilent 1200 高效液相色谱仪(DAD 检测器, Chemstation 工作站); Waters 2695 高效液相色谱仪(2996PDA 检测器, Epower 2 工作

* 通讯作者 Tel: (010) 67095424; E-mail: dasunlei@sina.com

站); Waters e2695 高效液相色谱仪(2998PDA 检测器 Epower 2 工作站); Shimadzu LC-2010A HT 高效液相色谱仪(UV 检测器 LcSolution 工作站); Agilent 8453 紫外-可见分光光度计。

龙血素 A(批号 11660-200301)、B(批号 111558-200202)对照品来自中国食品药品检定研究院,乙腈(色谱纯, J. T. Baker 公司),冰醋酸、甲醇、二氯甲烷、三氯甲烷(分析纯,北京化工厂),实验用水为 Milli-Q 系统制备。药材产自广西、云南和老挝,经中国食品药品检定研究院标本馆徐纪民鉴定为百合科剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen 的含脂木材。

2 方法与结果

2.1 原理 高效液相色谱仪的紫外/可见检测器可看作一台紫外/可见分光光度计,其响应值也遵循 Lambert-Beer 定律,而峰面积是响应值对时间的积分,将以上结合校正因子公式($f = W/A$),李聪^[9]推导出紫外/可见检测器上待测物校正因子的表达式:

$$f_i = \frac{W_i}{A_i} = \frac{M_i F}{\varepsilon_i L f} \quad (1)$$

其中, W_i 、 A_i 、 M_i 和 ε_i 分别为待测物的量、峰面积、相对分子质量和摩尔吸光系数, F 为流动相流速, L 为检测器光程长度, f 为检测器输出单位。

将(1)式代入替代对照品法^[5-8]参照物(s)和目标物(m)的相对校正因子公式得:

$$f_{im} = \frac{f_i}{f_m} = \frac{W_i A_m}{W_m A_i} = \frac{M_m \varepsilon_m}{M_i \varepsilon_i} = \frac{E_m}{E_i} \quad (2)$$

(2)式从理论上揭示了固定条件下(波长、温度、溶剂)相对校正因子完全由两物质的特性(吸光系数)决定,为常数。

当 $f = W/A$ 成立时,标准曲线过原点,则有线性方程 $A = kW$, k 为标准曲线的斜率,代入(2)式得相对斜率公式:

$$\frac{1}{f_{im}} = k_{im} = \frac{k_i}{k_m} = \frac{M_m \varepsilon_i}{M_i \varepsilon_m} = \frac{E_i}{E_m} \quad (3)$$

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取龙血素 A 对照品 5.64 mg、龙血素 B 对照品 5.29 mg,分别置 2 个 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,即得对照品储备液。分别精密量取对照品储备液各 5 mL 于同一 100 mL 量瓶中,加甲醇定容,即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品粉末(过 4 号筛) 0.2 g 精密称定,置具塞三角瓶中,精密加入二氯甲烷 25 mL 称重。超声(功率 200 W 频率 50 kHz)处理

30 min,放冷,补重。滤过,精密量取续滤液 1 mL 置蒸发皿,蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度。即得。

2.3 色谱条件 采用 Agilent Zobax SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为 1% 醋酸溶液-乙腈(58:42),流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 280 nm,柱温 25 °C,进样量 10 μL。在上述色谱条件下,对照品及样品色谱图见图 1。

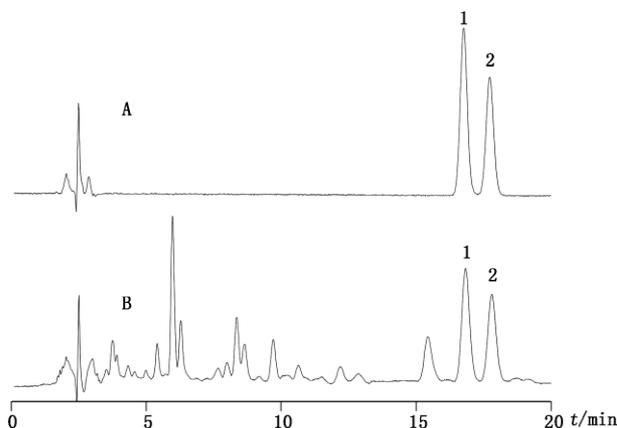


图 1 对照品(A)及 10 号样品(B) HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and sample No. 10 (B)

1. 龙血素 A (loureirin A) 2. 龙血素 B (loureirin B)

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密量取对照品溶液 2.5, 10, 15, 20 μL 进样,以进样量 X (μg) 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,绘制标准曲线,计算龙血素 A、龙血素 B 回归方程分别为:

$$Y = 3.706 \times 10^6 X - 16.22 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 2.984 \times 10^6 X - 56.61 \quad r = 0.9999$$

线性范围分别为 11.28 ~ 112.8 ng 和 10.58 ~ 105.8 ng。

2.4.2 精密度试验 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液 1 份,连续进样 6 次,结果龙血素 A、龙血素 B 峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 0.57% 和 0.47%。

2.4.3 稳定性试验 取供试品溶液,在 0, 6, 12, 18, 24 h 分别测定,结果龙血素 A、龙血素 B 峰面积的 RSD ($n = 5$) 分别为 0.85% 和 0.64%。

2.4.4 重复性试验 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份,进样测得龙血素 A、龙血素 B 平均含量 ($n = 6$) 分别为 0.252% 和 0.263%, RSD 分别为 2.1% 和 2.6%。

2.4.5 回收率试验 取 4 号样品粉末 0.1 g 共 6

份精密称定,置具塞三角瓶中,精密加入二氯甲烷 20 mL,再分别精密加入 $0.1134 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 龙血素 A 对照品溶液、 $0.1048 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 龙血素 B 对照品溶液各 2.5 mL,按“2.2.2”项下方法制备供试溶液,进样测定并计算得龙血素 A、龙血素 B 平均回收率($n=6$)分别为 99.70% 和 97.67%,RSD 均为 1.3%。

表 1 龙血素 A、龙血素 B 的相对斜率

Tab 1 Relative slope values of loureirin A and loureirin B

色谱系统(HPLC system)	仪器(HPLC instrument)	色谱柱(C ₁₈ column)	k_{AB}	k_{BA}
1	Agilent 1100	Shim-Pak VP-ODS C ₁₈ (250 mm×4.6 mm 5 μm)	1.2476	0.8015
2	Agilent 1200	Dikma Diamonsil C ₁₈ (250 mm×4.6 mm 5 μm)	1.2511	0.7992
3	Waters 2695	Agilent Zobax SB-C ₁₈ (250 mm×4.6 mm 5 μm)	1.2420	0.8052
4	Waters e2695	AKZO NOBEL Kromasil C ₁₈ (250 mm×4.6 mm 5 μm)	1.2481	0.8012
5	Shimadzu LC-2010A HT	Agilent HC-C ₁₈ (250 mm×4.6 mm 5 μm)	1.2532	0.7980

2.4.6.2 吸光系数法测定相对斜率 精密称取龙血素 A 对照品 5.37 mg、龙血素 B 对照品 5.79 mg,用流动相分别配制成 $10.74 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $11.58 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。使用紫外分光光度计测得两溶液的吸光度平均值(室温,测定 3 次)分别为 0.65014 和 0.56295,照公式(3)计算相对斜率为 1.245。该结果与高效液相色谱法测得的平均值高度一致,证实了理论推导的正确性以及高效液相色谱系统上进行替代对照品法进行含量测定的可行性和准确性。

2.4.6 相对斜率

2.4.6.1 相对斜率耐用性考察试验 按“2.4.1”项下方法在 5 个不同色谱系统下建立龙血素 A、龙血素 B 的标准曲线,计算相对斜率,结果见表 1。其中,以龙血素 A 为参照物,相对斜率 k_{AB} 的均值为 1.248(RSD=0.34%);以龙血素 B 为参照物,相对斜率 k_{BA} 的均值为 0.801(RSD=0.34%)。

2.4.7 色谱峰的定位 使用对照品获得参照物保留时间,再利用相对保留时间可预测目标物的保留时间。表 2 为 5 个色谱系统上龙血素 A、龙血素 B 的保留时间及相对保留时间结果,其中龙血素 A 相对保留时间(以龙血素 B 为参照物)均值为 0.94,RSD 为 0.91%,龙血素 B 相对保留时间(以龙血素 A 为参照物)均值为 1.06,RSD 为 0.91%,表明以相对保留时间来进行色谱峰定位准确性良好。此外,尚可根椐色谱峰的紫外吸收光谱(图 2)以及样品的峰形(图 3)来进一步参照和佐证。

表 2 龙血素 A、龙血素 B 保留时间及相对保留时间

Tab 2 Retention time and relative retention time of loureirin A and loureirin B

色谱系统 (HPLC system)	龙血素 A(loureirin A)		龙血素 B(loureirin B)	
	保留时间(retention time) /min	相对保留时间(relative retention time)	保留时间(retention time) /min	相对保留时间(relative retention time)
1	26.755	0.927	28.862	1.079
2	24.331	0.941	25.843	1.062
3	16.598	0.945	17.557	1.058
4	26.976	0.950	28.403	1.053
5	26.438	0.940	28.125	1.064

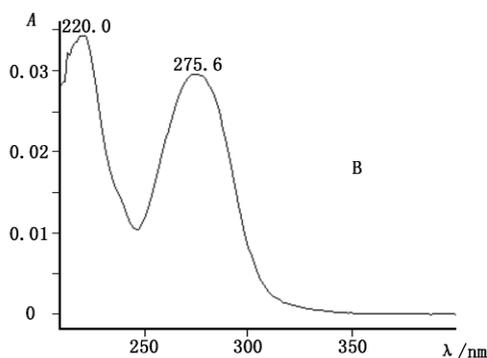
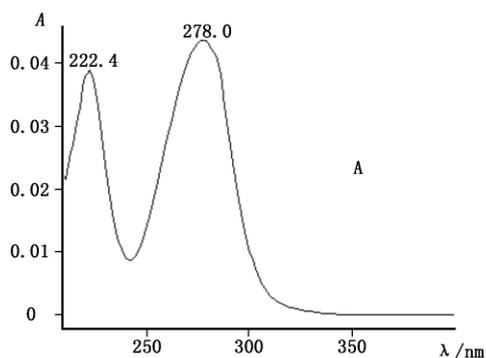


图 2 龙血素 A(A)、龙血素 B(B) 对照品紫外吸收光谱图

Fig 2 Ultraviolet spectrograms of loureirin A and loureirin B

2.5 样品测定

当对照品溶液和供试品溶液进样量相同时, 相对斜率 - 替代对照品法的计算公式为:

$$C_{m-sam} = \frac{C_{i-std} A_{m-sam}}{A_{i-std}} k_{im} \quad (4)$$

其中, C_{m-sam} 为供试品溶液中目标物的浓度, A_{m-sam} 为供试品溶液目标物的峰面积, C_{i-std} 为参照物对照品溶液的浓度, A_{i-std} 为参照物对照品溶液的峰面积, k_{im} 为相对斜率。

取表 3 所列 10 批样品各 2 份, 照“2.2.2”项下

表 3 剑叶龙血树含量测定结果(%)

Tab 3 Content of loureirin A and loureirin B in *Dracaena cochinchinensis*

序号 (No.)	产地(origin)	龙血素 A(loureirin A)		龙血素 B(loureirin B)	
		外标法(external standard method)	替代对照品法 (SRS)	外标法(external standard method)	替代对照品法 (SRS)
1	老挝(Laos) 1	1.522	1.525	0.174	0.174
2	老挝(Laos) 2	1.451	1.454	0.173	0.173
3	老挝(Laos) 3	1.608	1.611	0.228	0.227
4	云南(Yunnan) 1	2.330	2.330	0.398	0.397
5	云南(Yunnan) 2	0.823	0.823	0.241	0.241
6	广西大新(Daxin, Guangxi) 1	0.099	0.099	0.071	0.071
7	广西大新(Daxin, Guangxi) 2	0.061	0.061	0.068	0.068
8	广西龙州(Longzhou, Guangxi)	0.109	0.109	0.436	0.436
9	广西南明(Ningming, Guangxi)	0.136	0.136	0.154	0.154
10	广西崇左(Chongzuo, Guangxi)	0.253	0.253	0.256	0.256

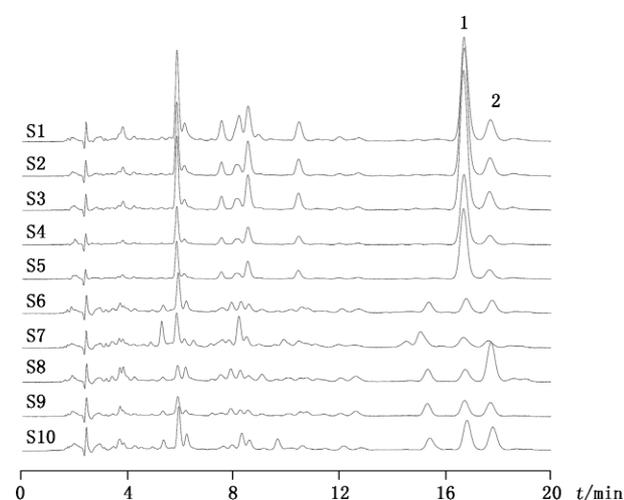


图 3 1~10 号样品 HPLC 图

Fig 3 HPLC chromatograms of samples No. 1-10

1. 龙血素 A(loureirin A) 2. 龙血素 B(loureirin B)

3 讨论

3.1 比较了索氏提取和超声提取 2 种方法, 结果表明指标成分含量一致, 故选择简便的超声法; 比较了甲醇、二氯甲烷和三氯甲烷 3 种溶剂, 测得含量无显著性差异, 由于甲醇提取杂质更多、三氯甲烷毒性

方法制备供试品溶液, 测定, 分别采用外标法和替代对照品法计算龙血素 A、B 的含量, 结果见表 3、图 3。由测定结果可见, 不同产地的供试品中龙血素 A 含量差异较大, 龙血素 B 差异相对不明显, 广西产两者含量比例约 1:1; 云南、老挝产龙血素 A 含量更高, 两者含量比例约为 (3~9):1, 两类易于辨识。此外, 从其余色谱峰来看, 两类在整体上比较类似但细节区别明显。外标法测定结果与替代对照品法结果无显著性差异。

更大, 故选二氯甲烷; 试验发现超声 30 min 可提取完全。

3.2 流动相和检测波长等色谱条件在参考文献^[2-4]的基础上作了微调。参照物选择龙血素 A 或 B 均可, 本文也提供了 2 个相对斜率及对应相对保留时间。

3.3 在理想状态下, 相对斜率和相对校正因子是倒数关系。实际情况下, 校正因子是通过不同质量(浓度)对照品求得的算术平均值, 斜率是通过不同质量(浓度)对照品用最小二乘法优化的最佳值, 由于算法的不同两者数学关系的和谐程度会随测定误差的增大而减小。无论使用相对校正因子还是相对斜率进行替代对照品法, 与外标法在数学形式上没有本质差异, 替代对照品法和外标法的差异同样来自于测定误差。综上, 替代对照品法上升为法定标准的关键是相对斜率(相对校正因子)赋值的准确性, 需要遵循类似对照品标定的严格程序和数据要求, 并采取不同实验室间的协作标定。

3.4 含量测定文献均提供线性方程但极少提供校正因子, 使用相对斜率法可以直接借鉴其他作者的

多指标含量测定研究成果(非替代对照品法)进行类似条件的替代对照品法,降低了分析成本并提高了科技文献的应用价值。

参考文献

1 Guangxi Food and Drug Administration(广西壮族自治区食品药品监督管理局). Zhuang Medicine Quality Standard of Guangxi Zhuang Autonomous Region(广西壮族自治区壮药质量标准). Vol I(第一卷). Nanning(南宁): Guangxi Science and Technology Publishing House(广西科学技术出版社) 2008. 151

2 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

3 LI Zhong-qiong(李忠琼), XIANG Dong(向东). Determination of loureirin A and B in resina draconis by HPLC(HPLC 测定龙血竭中龙血素 A 和龙血素 B 的含量). *West Chin J Pharm Sci(华西药科学杂志)* 2005 20(4): 348

4 CHEN Ding-fang(陈定芳), SONG Qi-shi(宋启示). Analysis of loureirins in roots, stems, and leaves of *Dracaena cochinchinensis*(剑叶龙血树根、茎、叶中血竭成分分析). *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)* 2005 36(10): 1545

5 XIE Yuan-chao(谢元超), JIN Shao-hong(金少鸿). Determination of Radix Salviae Miltiorrhiza and compound Danshen tablets by

substitute reference substance(替代对照品法用于丹参和复方丹参片含量测定的研究). *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)* 2007, 27(4): 497

6 HE Huan(何欢), MA Shuang-cheng(马双成), ZHANG Qi-ming(张启明), *et al.* Simultaneous determination by HPLC of 6 components in zedoary turmeric oil and its related injections with replacement method of chemical reference substance(HPLC 替代对照品法同时测定莪术油及其注射液中 6 种成分的含量). *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)* 2009 29(11): 1892

7 WEI Feng(魏锋), LI Qi-yan(李启艳), MA Ling-yun(马玲云), *et al.* Simultaneous determination of 6 isoflavones in traditional Chinese medicine and functional foods with replacement method of chemical reference substance(对照品替代法同时测定中药和保健食品中 6 种大豆异黄酮类成分的含量). *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)* 2009 29(5): 725

8 WANG Zhi-min(王智民), GAO Hui-min(高慧敏), FU Xue-tao(付雪涛), *et al.* Multi-components quantitation by one marker new method for quality evaluation of Chinese herbal medicine(“一测多评”法中药质量评价模式方法学研究). *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)* 2006 31(23): 1925

9 LI Cong(李聪). The calculation and application of correction factors of UV detector(紫外检测器定量校正因子的性质与实用性探讨). *Chin J Chromatogr(色谱)* 1990 8(4): 254

(本文于 2011 年 3 月 31 日收到)

《药物分析杂志》编辑部电话变更通知

尊敬的作者/读者:

您好!

因《药物分析杂志》编辑部业务发展需要,本编辑部将联络电话和传真进行了调整,编辑部电话总机为 010-67058427/010-67012819。如您需要与负责稿件的编辑联系,请拨打分机号:

办公室拨 1 粟晓黎副主任拨 2,于宝珠拨 3 陈唯真拨 5 赵慧芳拨 6 陈立亚拨 7 刘小帅拨 8。

广告业务拨 3; 传真拨 4

如需咨询缴费等财务事宜,请拨打 8 咨询刘小帅。

查询稿件进度请登录 <http://www.ywfxzz.cn> 自行查询。

特此通告,感谢您对我们工作一如既往的支持。

《药物分析杂志》编辑部