

## · 论著 ·

## 国产血竭总黄酮成分的纯化及活性成分的含量测定

张明媛<sup>1,2</sup>, 宓鹤鸣<sup>1</sup>, 范国荣<sup>1</sup>, 陆峰<sup>1</sup>, 齐云鹏<sup>1</sup> (1. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433; 2. 福建医科大学附属南平第一医院药学部, 福建 南平 353000)

**[摘要]** 目的 采用大孔树脂对国产血竭总黄酮进行分离纯化, 并测定其中活性成分的含量。方法 收集大孔树脂 70% 乙醇和 95% 乙醇洗脱液, 采用高效液相色谱 (HPLC) 法测定其中活性成分——龙血素 A、龙血素 B 的含量。以 ODS 柱为分析柱, 乙腈:1% 冰醋酸 (34.5 : 65.5) 为流动相, 检测波长为 280 nm。结果 龙血素 A、龙血素 B 分别在 11.00 ~ 275.00 g/ml、20.00 ~ 500.00 g/ml 范围内线性关系良好, 线性方程分别为  $Y = 35\ 844C + 44\ 725$  ( $r = 0.999\ 9$ ),  $Y = 28\ 533C - 41\ 085$  ( $r = 0.999\ 9$ ); 方法的准确度、精密度、稳定性均符合要求。制得的国产血竭精制总黄酮中龙血素 A、龙血素 B 的含量分别为 26.93、25.53 mg/g。结论 本法可用于国产血竭中相关活性成分的分析及制备, 为进一步研究国产血竭活血化瘀作用提供依据。

**[关键词]** 国产血竭总黄酮; 大孔树脂; 龙血素 A; 龙血素 B; HPLC

**[中图分类号]** R917, R28 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)01-0042-03

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.01.010

## Purification of total flavones by macroporous resin and its determination of the active components from Resina Draconis

ZHANG Mingyuan<sup>1,2</sup>, MI Heming<sup>1</sup>, FAN Guorong<sup>1</sup>, LU Feng<sup>1</sup>, QI Yunpeng<sup>1</sup> (1. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, 325 Guohe Road, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy, the First Hospital of Naping, Fujian Medical University, Nanping 353000, China)

**[Abstract]** **Objective** To purify the total flavones from Resina Draconis using D101 resin, and set up a method of simultaneously determining the contents of loureirin A and B in the extract. **Methods** Fractions in 70% and 95% ethanol were collected. Mixture of acetonitrile and 1% acetic acid (34.5 : 65.5) was used as the mobile phase and ODS column was used as stationary phase to determine loureirin A and B. The detecting wave length was 280 nm. **Results** In the established HPLC method, the linear range of loureirin A was 11.00 - 275.00 g/ml, and that of loureirin B was 20.00 - 500.00 g/ml. Linear equation of loureirin A was  $Y = 35\ 844C + 44\ 725$  ( $r = 0.999\ 9$ ) and that of loureirin B was  $Y = 28\ 533C - 41\ 085$ ,  $r = 0.999\ 9$ . The accuracy, precision and stability of this method were satisfactory. **Conclusion** The proposed method was suitable for preparation of total flavones and determination of its active components from Resina Draconis.

**[Key words]** total flavones in Resina Draconis; macroporous resin; loureirin A; loureirin B; HPLC

国产血竭, 亦称龙血竭, 为百合科植物剑叶龙血树 [*Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen] 的含脂木材经提取得到的树脂, 被《本草纲目》誉为“活血圣药”<sup>[1]</sup>。现代医学中用于与血瘀证相关的冠心病、心绞痛、急性心肌梗死等疾病的治疗<sup>[2-4]</sup>。研究表明, 国产血竭总黄酮是其发挥活血化瘀作用的主要有效部位<sup>[5-7]</sup>, 其中主要包含龙血素 A、龙血素 B、龙血素 C 等活性成分和其他杂质。只有将其进一步分离纯化, 并结合药效学实验的指引, 才有可

能阐明国产血竭发挥活血化瘀作用的机制。大孔树脂已被广泛用于黄酮类成分等的提取和精制<sup>[8-12]</sup>, 本研究采用 D101 型大孔树脂对国产血竭总黄酮进行分离纯化, 并采用高相液相色谱 (HPLC) 法测定国产血竭精制总黄酮中主要活性成分龙血素 A、龙血素 B 的含量, 从而为国产血竭黄酮类成分的分析及制备提供依据, 并为研究国产血竭活血化瘀的作用机制提供基础。

### 1 材料和仪器

**1.1 药材与试剂** 国产血竭原料药 (产地: 广西) 由第二军医大学药学院宓鹤鸣教授提供并鉴定, 龙血素 A (批号 111660-200402)、龙血素 B (批号 111558-200405)。对照品购自中国食品药品检定研究院, D101 大孔树脂由天津南开大学化工厂生产。

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (30901981); 第二军医大学药学院“时珍学者培养计划”资助。

**[作者简介]** 张明媛, 女, 硕士研究生。Tel: 15959927593, E-mail: zhang\_mingyuan@hotmail.com。

**[作者简介]** 齐云鹏, E-mail: qiyunpeng@hotmail.com。

其他试剂:乙腈(色谱纯,上海强顺化学试剂有限公司),乙醇,乙酸乙酯,冰醋酸(分析纯,上海试剂一厂),去离子水(自制)。

**1.2 仪器** 岛津 LC-10AT VP 高效液相色谱仪, SPD-10A VP 紫外检测器, N2000 色谱数据工作站(浙江大学智达公司), 电子天平(HA-202AM), SENCO R 系列旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司)。

## 2 方法与结果

**2.1 国产血竭样品溶液的制备** 精确称取国产血竭原料药药材 40 g, 加 8 倍量乙酸乙酯回流提取两次, 每次 1 h, 滤过, 合并两次产生的滤液, 减压浓缩成浸膏, 60 °C 下减压干燥, 得 31.03 g 粗粉。称取适量粗粉, 加入 95% 乙醇至溶解, 即得国产血竭样品溶液。

**2.2 国产血竭总黄酮成分的纯化** 将预处理好的湿树脂装入玻璃层析柱, 将 2.1 项中得到的国产血竭样品溶液上柱, 控制流速为 1 ml/min。上样完毕, 静态吸附 1 h, 之后依次用去离子水以及 10%、30%、50%、70% 和 95% 乙醇的顺序洗脱, 并采用 HPLC 法对收集得到的洗脱液进行检测。结果表明, 龙血素 A、龙血素 B 集中在 70% 和 95% 的乙醇

洗脱液中, 将该部分洗脱液合并, 并于 60 °C 下挥干溶剂, 即得国产血竭精制总黄酮。

**2.3 色谱条件及溶液制备** 色谱柱: Shim-Pack VP-ODS (150 mm × 4.6 mm, 5 μm, 江苏汉邦科技有限公司), 流动相为乙腈-1% 冰醋酸 = (34.5 : 65.5), 柱温为 30 °C, 检测波长为 280 nm, 流速为 1 ml/min, 进样量为 20 μl。

**2.3.1 对照品储备液** 分别精密称取龙血素 A、龙血素 B 对照品适量, 置于 10 ml 量瓶中, 用乙腈溶解并定容, 配制成浓度分别为 550 g/ml 和 1000 g/ml 的龙血素 A、龙血素 B 对照品储备液。

**2.3.2 供试品储备液** 称取“2.2 项”下制备得到的国产血竭精制总黄酮 5.09 g 置于 10 ml 量瓶中, 用乙腈溶解并定容, 得到浓度为 509 mg/ml 的供试品储备液。

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 专属性考察** 在“2.3 项”色谱条件下, 龙血素 A、龙血素 B 对照品色谱峰的保留时间分别为 32.040、34.773 min, 理论塔板数均 > 6 000, 两者峰形良好且分离完全(分离度 > 1.5), 见图 1。

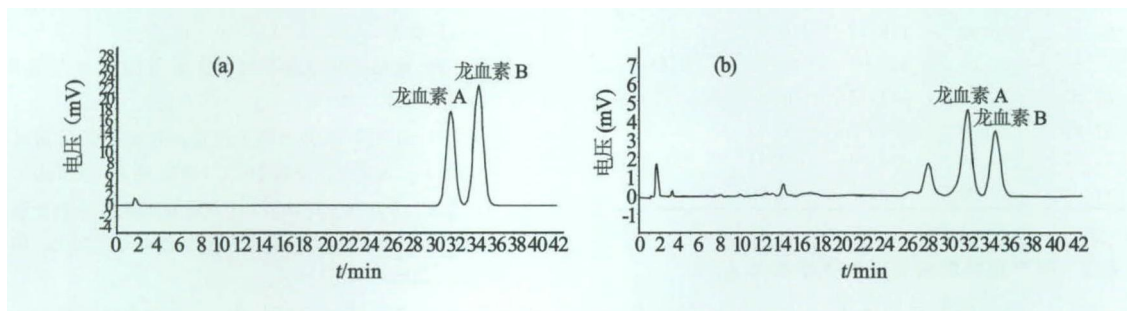


图 1 龙血素 A、龙血素 B 对照品(a)及国产血竭总黄酮(b)的 HPLC 图

**2.4.2 线性关系考察** 精密量取龙血素 A 储备液适量, 分别配制成浓度为 11.00、13.75、27.50、55.00、110.00、275.00 g/ml 的溶液; 精密量取龙血素 B 储备液适量, 分别配制成浓度为 20.00、25.00、50.00、100.00、200.00、500.00 g/ml 的溶液, 在上述色谱条件下, 分别测定待测组分的峰面积(Y), 并对浓度(C)进行回归分析, 回归方程为: 龙血素 A:  $Y = 35\ 844C + 44\ 726$ ,  $r = 0.9999$ ; 龙血素 B:  $Y = 28\ 533C - 41085$ ,  $r = 0.9999$ 。结果表明龙血素 A 在 11.00 ~ 275.00 g/ml, 龙血素 B 在 20.00 ~ 500.00 g/ml 浓度范围内线性关系良好。

**2.4.3 精密度实验** 取上述龙血素 A 对照品溶液(110.00 g/ml)、龙血素 B 对照品溶液(200.00 g/ml), 连续重复进样 5 次, 在上述色谱条件下测定峰面积, 龙血素 A、龙血素 B 色谱峰峰面积的日内 RSD 分别为 1.64%、1.40%; 连续 5 d 重复以上实验测定其峰

面积, 计算日间精密度(RSD), 龙血素 A、龙血素 B 峰面积的日间 RSD 分别为 1.47%、2.67%, 说明本法精密度良好。

**2.4.4 加样回收率实验** 取已测得含量的国产血竭精制总黄酮供试品溶液适量, 分别精密加入龙血素 A、龙血素 B 对照品溶液适量, 在上述色谱条件下进行测定, 计算回收率。结果表明, 龙血素 A、龙血素 B 的平均回收率分别为 100.59%、98.90%, RSD 分别为 2.04%、2.88% (表 1)。

**2.4.5 稳定性实验** 称取国产血竭精制总黄酮干燥粉末适量, 精密称定。加入少量乙腈超声溶解, 定容, 摇匀, 配制成浓度为 5.10 mg/ml 的溶液。分别于 0、1.5、3.0、4.5、6.0、7.5 h 测定, 龙血素 A、龙血素 B 峰面积 RSD 分别为 2.40%、2.61%, 说明样品溶液在 7.5 h 内稳定性良好。

**2.4.6 国产血竭精制总黄酮中龙血素 A、龙血素 B**

的含量测定 精确称取 5 份国产血竭精制总黄酮粉末,配制成浓度约为 5.10 mg/ml 的溶液,按“2.3 项”下的色谱条件测定上述溶液,分别记录龙血素 A、龙血素 B 的峰面积,并计算国产血竭精制总黄酮中龙血素 A、龙血素 B 的含量。结果表明,龙血素 A、龙血素 B 在国产血竭精制总黄酮中的平均含量分别为 26.93 和 25.53 mg/g (表 2)。

表 1 加样回收率实验结果 (n=9)

样品含量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	RSD (%)
龙血素 A				
90.63	27.50	105.01	98.92	2.04
90.63	27.50	118.22	100.10	
90.63	27.50	117.08	98.84	
90.63	55.00	145.70	100.07	
90.63	55.00	134.31	98.07	
90.63	55.00	149.99	104.81	
90.63	82.25	173.24	100.40	
90.63	82.25	173.57	100.76	
90.63	82.25	175.89	103.32	
龙血素 B				
87.62	25.00	95.03	95.10	2.88
87.62	25.00	113.88	101.44	
87.62	25.00	109.03	95.90	
87.62	50.00	138.47	100.97	
87.62	50.00	123.97	96.23	
87.62	50.00	137.77	100.17	
87.62	75.00	159.75	96.72	
87.62	75.00	154.84	103.86	
87.62	75.00	162.35	99.69	

表 2 国产血竭精制总黄酮中龙血素 A、龙血素 B 的含量

样品编号	龙血素 A (g/ml)	龙血素 B (g/ml)
1	133.46	128.30
2	139.65	130.14
3	139.99	129.10
4	140.76	129.00
5	133.35	127.78
平均值	137.36	130.20
样品含量 (mg/g)	26.93	25.53

### 3 讨论

3.1 国产血竭样品溶液的处理方法 由于大孔树脂洗脱液从水相开始洗脱至有机相,故上样溶液一般用水溶解。我们曾选用去离子水溶解国产血竭总黄酮粗粉,但溶解效果不佳,制备产率低,在洗脱过程中还会发生晶体析出堵塞阀门。根据乐薇<sup>[8]</sup>的文献,笔者在 pH = 11.2 的条件下调节上柱总黄酮浓度至  $3.64 \times 10^{-3}$  g/ml,溶解效果良好,但此条件需大量总黄酮样品溶液,不适用于实际操作。本实验最终采用 95% 乙醇溶解国产血竭总黄酮粗粉,虽

然在首次洗脱时会损失部分产物,但其产率仍较用水溶解总黄酮粗粉的产率高,操作也更为简便。

3.2 色谱条件的选择 文献<sup>[13,14]</sup>选用 270 nm 或 280 nm 作为龙血素 A、龙血素 B 含量测定的检测波长,笔者发现国产血竭总黄酮在 280 nm 处有较强吸收,故确定 280 nm 作为本实验的检测波长。有的文献采用 35% 乙腈作为流动相,但笔者发现在该条件下龙血素 A、龙血素 B 峰不能很好分离,且存在拖尾现象;经过摸索,笔者采用乙腈-1% 冰醋酸 (34.5 : 65.5) 为流动相,可使龙血素 A、B 两峰得到较好分离,也抑制了拖尾峰的出现。

### 4 结语

大孔树脂分离纯化国产血竭中的黄酮类成分,操作简便,产率较高;同时建立了国产血竭精制总黄酮中龙血素 A、B 的 HPLC 测定方法。通过对传统名贵药材国产血竭的深入研究,同时为进一步阐明国产血竭活血化瘀的作用机制提供重要依据。

### 【参考文献】

- [1] (明)李时珍.本草纲目[M].北京:北京出版社,2007:430.
- [2] 陈可冀.血瘀证与活血化瘀治疗的研究[J].中国中医药现代远程教育,2005,3(11):10-12.
- [3] 曹 峰.血竭的化学成分与临床应用[J].中国实用医药,2009,4(2):220.
- [4] 蔡 辉,胡婉英.复方血竭治疗冠心病血瘀证的实验与临床研究[J].南京中医学院学报,1982,8(4):216-220.
- [5] 方伟蓉,李运曼,邓嘉元.龙血竭总黄酮对动物心肌缺血的保护作用[J].中国临床药理学与治疗学,2005,10(9):1020-1024.
- [6] 黄树莲,陈学芬,陈晓军,等.广西血竭总黄酮活血化瘀作用的研究[J].广西医学,1996,18(1):1-2.
- [7] 马建建,宋 艳,贾 敏,等.血竭总黄酮对血小板聚集、血栓形成及心肌缺血的影响[J].中草药,2002,33(11):1008-1010.
- [8] 乐 薇.大孔树脂精制血竭总黄酮[J].中南民族大学学报:自然科学版,2008,25(4):35-38.
- [9] 屠鹏飞,王钰芳,邵 杰,等.血竭中黄酮类成分提取工艺研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(6):30-32.
- [10] 朱欣婷,刘 云.大孔树脂纯化无花果叶总黄酮[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(6):13-16.
- [11] 覃金玲,宋爱华,黄付伟,等.大孔树脂分离纯化青皮中总黄酮的工艺研究[J].中国药师,2012,15(8):1108-1110.
- [12] 吴海霞.大孔树脂精制杭白菊总黄酮的上样条件研究[J].中国药业,2012,21(14):67-69.
- [13] 胡迎庆,李灵芝,韩慧文.RP-HPLC 测定龙血竭-龙血素 A 和 B 的含量[J].生命科学仪器,2003,12(6):24-25.
- [14] 孙胜利,宓鹤鸣,姜子洋.反相高效液相色谱法测定国产血竭中龙血素 A 和 B 的含量[J].第二军医大学学报,2002,23(12):1366-1368.