

引用:豆小卫,田彩虹,耿娜,等.高效液相色谱法测定乳香药材中乳香酸多组分含量的方法研究[J].陕西中医药大学学报,2024,47(1):72-75.

高效液相色谱法测定乳香药材中 乳香酸多组分含量的方法研究

豆小卫¹ 田彩虹^{2*} 耿娜² 梁晓莉² 李惠²

(1.陕西冯武臣大药堂有限公司,陕西 咸阳 712000;2.陕西步长制药有限公司,陕西 咸阳 712000)

摘要:目的 建立一种高效液相色谱法测定乳香药材中乳香酸多组分的含量测定方法。方法 采用 Agilent1260-C8(150 mm×4.6 mm,4 μm)色谱柱,检测波长 210 nm。乙腈-0.1%磷酸为流动相,80:20(测定 α-乳香酸,β-乳香酸),70:30(测定 11-羧基-β-乙酰乳香酸),流速 1 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。结果 α-乳香酸、β-乳香酸、11-羧基-β-乙酰乳香酸的线性范围分别为 46.7~583.5 μg·mL⁻¹($r=1.0000$)、51.5~643.5 μg·mL⁻¹($r=1.0000$)、52.1~651.5 μg·mL⁻¹($r=1.0000$)。平均加样回收率($n=6$)分别为 94.76%(RSD=1.61%)、99.40%(RSD=0.84%)、100.55%(RSD=1.30%)。结论 研究方法简便、灵敏、准确、重现性好。实现了乳香药材的专属性含量测定,为其质量控制提供依据。

关键词:高效液相色谱法;乳香;含量测定;α-乳香酸;β-乳香酸

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:2096-1340(2024)01-0072-04

DOI:10.13424/j.cnki.jsctcm.2024.01.014

乳香为橄榄科植物乳香树及同属植物的树干切口中渗出的坚硬胶状树脂。分为索马里乳香和埃塞俄比亚乳香^[1]。辛、苦、温,归心、肝、脾经,具有活血行气止痛,消肿生肌之功效。主要用于痛经、经闭、胃痛、心腹诸痛、风湿痹痛;跌打伤痛、痈疽肿痛、肠痈;疮疡肿痛或溃久不收口等^[2-7]。在院方和成方制剂中应用广泛^[8-10],而且为进口名贵药材。近年来,特别是进口名贵药材的掺假比较普遍^[11-15],质量控制尤为重要。在 2020 年版《中国药典》一部中乳香药材的含量测定为挥发油测定。此方法专属性不强,可能给企业带来经济损失和失信风险。而且现有含量测定文献不多,大多基于挥发油研究,个别仅针对一种成分,不够科学^[16-20]。因此,为了解决这一问题,对乳香药材的代表性成分^[21-27]进行分析研究,建立代表性成分乳香酸多组分含量测定的高效液相色谱法,为乳香药材质量控制和用药安全提供依据。

1 材料与仪器

1.1 仪器 安捷伦 1260 高效液相色谱仪(UV 检

测器),UV 2600 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),MSA6.6S-OCE 百万分之一电子天平(德国赛多利斯公司),KQ-500VDE 超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司),数显电子恒温水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试剂与试药 对照品 α-乳香酸(批号 M14GB14667,纯度 99.3%)、β-乳香酸(批号 M14GB14668,纯度 98.4746%)、11-羧基-β-乙酰乳香酸(批号 111760-201502,纯度 99.3%)均购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈为色谱纯(赛默飞世尔科技公司),其余试剂为分析纯(国药集团化学试剂有限公司),3 批乳香药材(批号 0216321002、0216321003、0216321004)均购自陕西地道药材有限公司。

2 方法

2.1 系统色谱条件 采用 Agilent1260-C8(150 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱,柱温 35 ℃,乙腈-0.1%磷酸为流动相,80:20(测定 α-乳香酸,β-乳香酸;检测波长 210 nm),70:30(测定 11-羧基-β-乙酰乳香

酸;检测波长 250 nm),流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液制备 分别取 α-乳香酸、β-乳香酸、11-羧基-β-乙酰乳香酸对照品适量,精密称定,分别加甲醇溶液制成 42.34 μg·mL⁻¹、50.81 μg·mL⁻¹、41.15 μg·mL⁻¹的对照溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 取各批乳香药材适量,分别研细混匀的粉末过 4 号筛,取 0.2 g 精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,超声处理 30 min,过滤,即得。

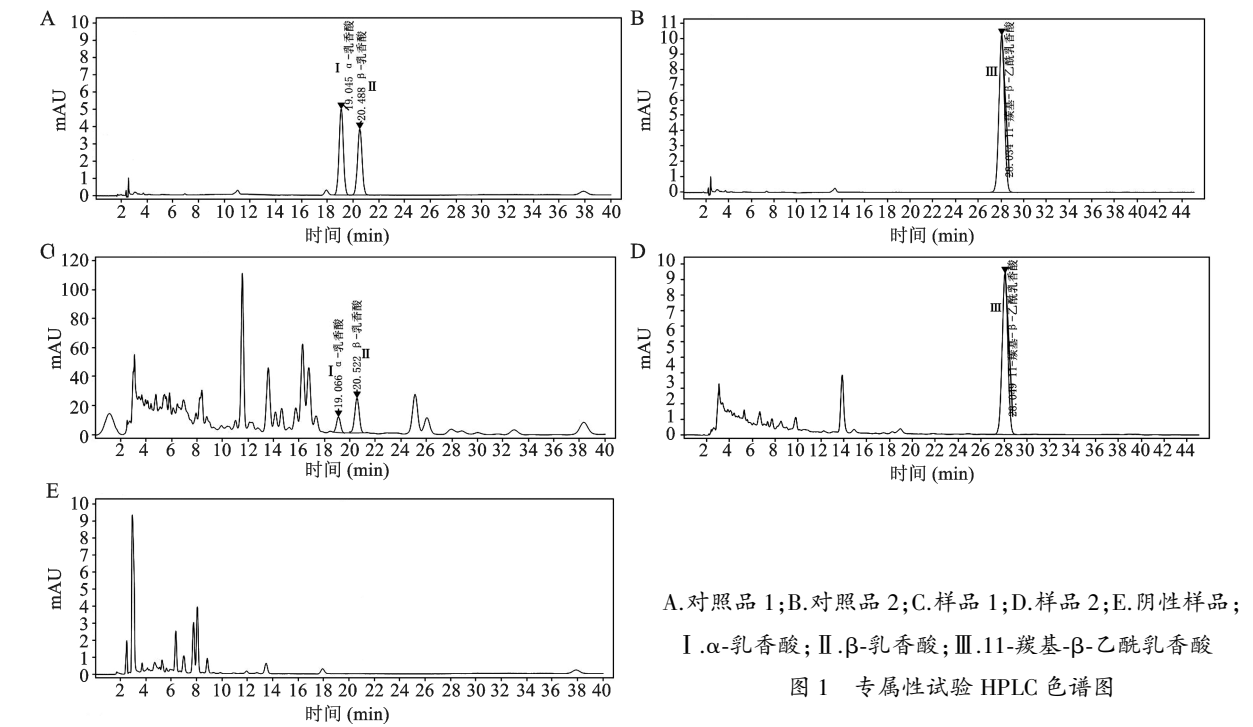
2.2.3 阴性样品溶液制备 取桃胶适量,按供试

品溶液制备方法制备阴性样品溶液。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 专属性试验 分别取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液,按系统色谱条件分别进样 10 μL,结果见图 1。α-乳香酸、β-乳香酸、11-羧基-β-乙酰乳香酸对照品与样品相同保留时间峰重合,阴性样品在对照品峰和样品峰相同保留时间无干扰峰。检测峰与相邻色谱峰的分离度大于 1.5,理论塔板数大于 10000。说明该方法专属性强,系统适用性好。



A.对照品 1;B.对照品 2;C.样品 1;D.样品 2;E.阴性样品;
I.α-乳香酸;II.β-乳香酸;III.11-羧基-β-乙酰乳香酸

图 1 专属性试验 HPLC 色谱图

3.1.2 线性关系考察 分别精密吸取 α-乳香酸、β-乳香酸、11-羧基-β-乙酰乳香酸对照品溶液各 2、5、10、15、20、25 μL,分别注入高效液相色谱仪中,按确定的色谱条件测定各对照品的峰面积。以对照品进样量为横坐标 X,色谱峰面积为纵坐标 Y,绘制标准曲线,计算回归方程。结果见表 1,可知各成分在各自质量浓度范围内线性关系良好。

表 1 各成分线性关系

成分	回归方程	r	线性范围 (μg·mL ⁻¹)
α-乳香酸	y=9.5619x-0.00378	1.0000	46.7~583.5
β-乳香酸	y=6.9393x+0.00021	1.0000	51.5~643.5
11-羧基-β-乙酰乳香酸	y=24.689x-0.01193	1.0000	52.1~651.5

3.1.3 精密度试验 取对照品溶液分别按对应的色谱条件连续进样 6 次,结果 α-乳香酸、β-乳香酸、11-羧基-β-乙酰乳香酸的峰面积 RSD(n=6)分别为 0.31%、0.29%、0.35%,表明仪器具有良好的精密度。

3.1.4 重复性试验 精密称取供试品 0.2 g,平行制备 6 份,按供试品溶液制备方法制备,分别测定含量。结果 α-乳香酸平均含量为 2.15%,RSD 为 1.81%;β-乳香酸平均含量为 3.94%,RSD 为 2.47%;11-羧基-β-乙酰乳香酸平均含量为 3.33%,RSD 为 2.26%。表明该方法重复性良好。

3.1.5 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号:

20210102) 分别于室温下放置 0、2、8、16、24 h 按系统色谱条件进样测定、记录峰面积,结果 α -乳香酸含量为 2.21%,RSD 为 1.32%, β -乳香酸含量为 3.94%,RSD 为 0.73%,11-羰基- β -乙酰乳香酸含量为 3.36%,RSD 为 1.83%,表明该方法重复性良好。

3.1.6 加样回收率试验 取重复性试验项下已知平均含量(α -乳香酸:10.24 mg·g⁻¹、 β -乳香酸:35.24 mg·g⁻¹、11-羰基- β -乙酰乳香酸 31.32 mg·g⁻¹)的样

品 0.1 g 精密称定,按对照品含量 1:1,精密加入称定的对照品,按供试品溶液方法制备 6 份,测定含量。计算各成分的平均回收率和 RSD。结果 α -乳香酸、 β -乳香酸、11-羰基- β -乙酰乳香酸的平均回收率($n=6$) 分别为 94.76%,RSD 为 1.61%;99.40%,RSD 为 0.84%;100.55%,RSD 为 1.30%。见表 2。

表 2 加样回收率测定结果($n=6$)

编号	取样量(g)	样品含量(mg)	对照品加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
α -乳香酸 (样 10.24 mg·g ⁻¹)	0.1129	1.1561	1.0340	2.1265	93.85	94.76	1.61
	0.1139	1.1663	1.0295	2.1162	92.27		
	0.1034	1.0588	1.0308	2.0396	95.15		
	0.0976	0.9994	1.0326	1.9933	96.25		
	0.1022	1.0465	1.0299	2.0228	94.80		
	0.1164	1.1919	1.0284	2.1816	96.24		
β -乳香酸 (样 35.24 mg·g ⁻¹)	0.1050	3.7002	3.6500	7.2815	98.12	99.40	0.84
	0.1058	3.7284	3.6428	7.3267	98.78		
	0.1085	3.8235	3.6537	7.4798	100.07		
	0.1049	3.6967	3.6389	7.3464	100.30		
	0.1072	3.7777	3.6476	7.4193	99.84		
	0.1075	3.7883	3.6502	7.4116	99.26		
11-羰基- β -乙酰乳香酸(样 31.32 mg·g ⁻¹)	0.1045	3.2729	3.0975	6.3643	99.80	100.55	1.30
	0.1050	3.2886	3.0953	6.3949	100.36		
	0.1044	3.2698	3.0918	6.4482	102.80		
	0.1074	3.3638	3.0895	6.4838	100.99		
	0.1057	3.3105	3.1046	6.4278	100.41		
	0.1045	3.2729	3.0791	6.3184	98.91		

3.2 样品测定 取 3 批乳香药材样品,按供试品溶液方法制品,在系统色谱条件下测定,依据线性方程计算样品中 α -乳香酸、 β -乳香酸、11-羰基- β -乙酰乳香酸的含量。结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果(mg·g⁻¹)

药材批号	0216321002	0216321003	0216321004
α -乳香酸	21.5	22.1	21.8
β -乳香酸	39.4	40.2	39.8
11-羰基- β -乙酰乳香酸	33.3	34.1	33.6

4 讨论

4.1 检测波长的选择 将对照品溶液及供试品溶液分别置于紫外-可见分光光度计中,从 200 ~

450 nm 波段进行全波段扫描,考虑到末端吸收和排除其他干扰,为获得理想的色谱效果,最终确定 α -乳香酸和 β -乳香酸的检测波长 210 nm;11-羰基- β -乙酰乳香酸的检测波长 250 nm。

4.2 色谱条件的选择 通过参考文献^[28],流动相选择酚酸类成分常用比较理想的相系乙腈:0.1%磷酸溶液。为了简化试验流动相比例选择了 20:80 和 30:70 两个比例分别测定。此法虽然简便一些,但也可以进一步完善成梯度洗脱。经考察 0~15 min(20:80),16~35 min(30:70)较为理想。

4.3 供试品溶液制备方法 采用加热回流和超声

提取方式,设计 0.5 h、1 h、2 h 分别考察,结果两种方式没有统计学差异。为了简便安全,最终确定供试品溶液的制备方法。

通过试验本文确立了高效液相法对乳香药材中乳香酸多组分的含量测定方法,弥补了现行药典的不足,能客观地评价药材质量。说明该方法简便、可行、专属性强。为乳香药材优劣判定提供科学的依据。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:223.

[2] 常章富. 中药学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:111.

[3] 蒙凤萍,陈维武,李巧云,等. 十味乳香丸对变应性接触性皮炎小鼠的抗炎止痒作用[J]. 中成药,2022,44(5):1441-1447.

[4] 周宜,刘晓琴,吴学敏,等. 乳香及其炮制品对葡聚糖硫酸钠诱导小鼠炎症性肠病的保护作用[J]. 现代药物与临床,2022,37(7):1432-1438.

[5] 谢梦蝶,王衬衬,李冰涛,等. 基于体外细胞实验和网络药理学研究乳香挥发油抗心脏肥大的作用机制[J]. 中国临床药理学与治疗学,2022,27(3):241-252.

[6] 张琳琳,刘振丽,王淳,等. 乳香醋炙前后对血瘀模型大鼠改善作用的对比研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2022,28(4):545-549,581.

[7] 宋志前,刘振丽,彭诗涛,等. 乳香与醋乳香对 2 型糖尿病大鼠改善作用的对比研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2022,28(1):98-102.

[8] 陆渊雷. 金匱要略今译[M]. 北京:人民文学出版社,1956.

[9] 孙绍良. 梔乳散[J]. 陕西中医学院学报,1989,12(1):9.

[10] 雷经纬,周小海,卢敏,等. 基于网络药理学与分子对接探讨“乳香-没药”治疗膝关节炎的作用机制[J]. 亚太传统医药,2022,18(3):143-151.

[11] 夏小中,张昌权. 掺伪乳香没药的鉴别[J]. 现代中药研究与实践,2007(1):28-29.

[12] 王佳芬,闫海霞. 进口中药乳香、没药和血竭真伪鉴别方法探讨[J]. 中国医药指南,2013,11(9):455-457.

[13] 钱明明,刘益庆,杨颖. 参三七伤药片(胶囊)中 11-羧基- β -乙酰乳香酸含量测定及掺假物松香酸的检查

[J]. 中国处方药,2021,19(12):22-25.

[14] 程介虹,陈争光. 基于高光谱数据的乳香产地快速鉴别[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2021,33(4):93-98.

[15] 翟欣,庞克坚,唐辉,等. 5 个不同地区市售乳香质量评价及易掺伪品松香的检查[J]. 时珍国医国药,2017,28(8):1866-1869.

[16] 段雨晴,黄菊,孙婉瑾,等. 醋乳香挥发油 GC 指纹图谱研究[J]. 亚太传统医药,2022,18(6):61-66.

[17] 汪莹,张玉珊,孙丽平,等. 乳香炮制后挥发性成分的变化及含量测定[J]. 中国药房,2022,33(10):1172-1176.

[18] 沈紧治,许逊福,吕海波,等. 乳香、没药差示扫描量热法与傅里叶红外光谱法分析[J]. 国际中医中药杂志,2022,44(3):314-318.

[19] 刘世军,宋中兴,郭浩,等. 乳香的薄层色谱研究[J]. 西部中医药,2021,34(4):35-39.

[20] 黄运茁,张戈,刘振丽,等. 乳香醋炙前后 13 种乳香酸成分含量变化及活性比较研究[J]. 中草药,2021,52(23):7128-7137.

[21] 张佳琪,郭春杨,张璞,等. 乳香中萜类化合物的研究进展[J]. 华西药学杂志,2022,37(4):463-467.

[22] 崔锐,周金云. 乳香化学和药理的研究进展[J]. 中国药学杂志,2003(6):407-410.

[23] 冯亚美,张强,尹立敏,等. 乳香中一个新的甘遂烷型三萜[J]. 药学学报,2022,57(5):1444-1447.

[24] 哈瑞雯,周海燕,詹志来,等. 乳香化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中华中医药学刊,2021,39(11):94-107.

[25] 刘迪,张冰洋,姚铁,等. 乳香化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药,2020,51(22):5900-5914.

[26] 肖斌欢,刘炎,林健贤,等. α -乳香酸对肺动脉高压大鼠模型的在体干预作用[J]. 吉林医学,2022,43(2):301-303.

[27] 王明明,王磊,窦芳,等. β -乳香酸对海马神经元细胞氧糖剥夺损伤的改善作用[J]. 中国药房,2021,32(11):1319-1324.

[28] 薛静,刘薇,段树卿. 腰痛宁胶囊中 11-羧基- β -乙酰乳香酸的含量测定方法研究[J]. 海峡药学,2020,32(3):81-83.

(修回日期:2023-03-12 编辑:宋蓓)