

HPLC-ELSD 法同时测定西黄丸中 6 种乳香酸类成分

周杰¹, 商雪莹¹, 佟玲², 刘晓琳², 张蕾^{1*}

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 天津天士力集团研究院, 天津 300410

摘要: 目的 建立 HPLC-ELSD 法同时测定 10 个批次西黄丸中 11-羧基- β -乳香酸、11-羧基- β -乙酰乳香酸、 α -乳香酸、 β -乳香酸、3-乙酰基- α -乳香酸、3-乙酰基- β -乳香酸 6 种乳香酸类成分的定量方法。方法 采用 HPLC-ELSD 法, Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 甲醇-0.5%醋酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量为 0.8 mL/min, 柱温为 30 $^{\circ}$ C, 漂移管温度 45 $^{\circ}$ C, 载气为高纯 N₂, 载气体积流量为 1.5 L/min。结果 11-羧基- β -乳香酸、11-羧基- β -乙酰乳香酸、 α -乳香酸、 β -乳香酸、3-乙酰基- α -乳香酸、3-乙酰基- β -乳香酸分别在 0.10~3.00 μ g ($r=0.999\ 5$)、1.23~36.9 μ g ($r=0.999\ 5$)、0.16~4.80 μ g ($r=0.999\ 7$)、0.25~7.58 μ g ($r=0.999\ 7$)、0.21~6.18 μ g ($r=0.999\ 5$)、0.30~9.00 μ g ($r=0.999\ 6$) 线性关系良好; 6 种成分的平均回收率 (RSD) 分别为 99.6% (3.70%)、99.1% (3.62%)、99.2% (1.66%)、98.2% (1.89%)、99.1% (3.42%) 和 99.5% (2.32%), 10 批西黄丸中 6 种乳香酸的总量分别为 35.1 mg/g (2.08%)、127.8 mg/g (2.10%)、31.3 mg/g (1.74%)、56.2 mg/g (1.64%)、56.5 mg/g (1.61%)、87.8 mg/g (1.73%)。结论 本方法简便、准确、分离效果好, 为西黄丸的物质基础研究提供依据。

关键词: 西黄丸; HPLC-ELSD; 乳香酸; 定量测定; 11-羧基- β -乳香酸; 11-羧基- β -乙酰乳香酸; α -乳香酸; β -乳香酸; 3-乙酰基- α -乳香酸; 3-乙酰基- β -乳香酸; 物质基础

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)04-0706-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.04.015

Simultaneous determination of six boswellic acids in Xihuang Pill by HPLC-ELSD

ZHOU Jie¹, SHANG Xue-ying¹, TONG Ling², LIU Xiao-lin², ZHANG Lei¹

1. College of Chinese Traditional Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. Institute of Pharmaceutical Analysis, Tianjin Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

Abstract: Objective To establish an HPLC-ELSD method for simultaneous determination of six kinds of boswellic acids including 11-carboxyl- β -boswellic acid, acetyl-11-carboxyl- β -boswellic acid, α -boswellic acid, β -boswellic acid, 3-acetyl- α -boswellic acid, and 3-acetyl- β -boswellic acid in 10 batches of Xihuang Pill (XHP). **Methods** The separation was achieved on a Waters Symmetry C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) with the mobile phase consisting of methanol-0.5% acetic acid to be gradient elution. Flow rate was 0.8 mL/min and column temperature was 30 $^{\circ}$ C. The samples were tested on Evaporative Light-scattering Detector with drift tube temperature of 45 $^{\circ}$ C, carrier gas of purity N₂, and carrier gas flow rate of 1.5 L/min. **Results** 11-Carboxyl- β -boswellic acid, acetyl-11-carboxyl- β -boswellic acid, α -boswellic acid, β -boswellic acid, 3-acetyl- α -boswellic acid, and 3-acetyl- β -boswellic acid had good linearity in the ranges of 0.10—3.00 μ g ($r=0.999\ 5$), 1.23—36.9 μ g ($r=0.999\ 5$), 0.16—4.8 μ g ($r=0.999\ 7$), 0.25—7.5 μ g ($r=0.999\ 7$), 0.21—6.3 μ g ($r=0.999\ 5$), and 0.30—9.0 μ g ($r=0.999\ 6$), respectively. The average recoveries of the six boswellic acids were 99.6% (3.70%), 99.1% (3.62%), 99.2% (1.66%), 98.2% (1.89%), 99.1% (3.42%), and 99.5% (2.32%), respectively. **Conclusion** This method is simple, reliable, and with good effect for the separation, and can provide the reference for study on XHP material basis. **Key words:** Xihuang Pill; HPLC-ELSD; boswellic acid; quantitative determination; 11-carboxyl- β -boswellic acid; acetyl-11-carboxyl- β -boswellic acid; α -boswellic acid; β -boswellic acid; 3-acetyl- α -boswellic acid; 3-acetyl- β -boswellic acid; material basis

收稿日期: 2016-09-01

基金项目: 广东省科技计划项目 (2016A020226031); 广州市科技计划项目 (201607010334); 青年英才培育项目 (A1-AFD015131Z08)

作者简介: 周杰, 硕士生, 从事中药药效物质基础研究。Tel: 15626250632 E-mail: zhoujie_gz@163.com

*通信作者 张蕾, 博士, 教授, 从事中药药效物质基础与药理学研究。

Tel: (023)89029010 E-mail: zhangleic431@163.com, 174962153@qq.com

西黄丸又名犀黄丸,出自清·王洪绪所著《外科证治全生集·卷四》,收载于《中国药典》2015年版一部和《中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂》(第九册)^[1-2],由牛黄 15 g、人工麝香 15 g、乳香(醋制) 550 g 和没药(醋制) 550 g 4 味中药组成。方中的牛黄清心退热、化痰通窍、散肿结,为主药;辅以麝香芳香辛窜之性,通经络、散结滞、辟恶毒,为辅药;佐以乳香、没药辛开苦降温散行窜之力,活血祛瘀、消肿定痛;全方配合,具有清热解毒、消肿散结之功效,用于热毒壅结所致痈疽疔毒、瘰癧、癌肿等症^[3-6]。据报道,西黄丸的抗肿瘤、抗心肌缺血、抑制肿瘤相关的信号传导通路、诱导分化凋亡、抗溃疡、降糖、改善学习记忆功效与其乳香酸类成分密切相关^[7-14],然而对于西黄丸中乳香酸类成分的定量研究还仅限于 11-羧基- β -乙酰乳香酸和麝香酮的定量测定^[15-17]。

基于西黄丸的良好临床疗效,为了进一步完善其质量控制方法,本实验在同一色谱条件下对西黄丸中 6 种乳香酸类成分 11-羧基- β -乳香酸、11-羧基- β -乙酰乳香酸、 α -乳香酸、 β -乳香酸、3-乙酰基- α -乳香酸、3-乙酰基- β -乳香酸进行了同时定量研究。该方法快速、灵敏,基线平稳且色谱峰分离度好,为完善西黄丸的质量控制标准提供了参考。

1 仪器与试药

LC-20A 型高效液相色谱仪,包括 SPD-M20A 检测器, DGU-20A 四元泵,日本 Shimadzu 公司; AEG-220 型电子天平,万分之一,日本岛津公司; BP211D 型电子天平,十万分之一,德国 Sartorius 公司; KQ-300DE 型超声清洗仪,昆山市超声仪器有限公司。

对照品 11-羧基- β -乙酰乳香酸(批号 111760-201502,质量分数 $\geq 98\%$),均购自中国食品药品检定研究院;对照品 11-羧基- β -乳香酸(批号 ASB-00002575-010,质量分数 $\geq 98\%$)、 α -乳香酸(批号 ASB-00002550-002,质量分数 $\geq 98\%$)、 β -乳香酸(批号 ASB-00002555-010,质量分数 $\geq 98\%$)、3-乙酰基- α -乳香酸(批号 ASB-00002560-010,质量分数 $\geq 98\%$)、3-乙酰基- β -乳香酸(批号 ASB-00002565-101,质量分数 $\geq 98\%$),均购自美国 Chromadex 公司。甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯,天津市致远化学试剂有限公司。西黄丸(10 个批次)均由天津天士力(辽宁)制药有限责任公司提供。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 分别取 11-羧基- β -乳香酸(R1) 1.0 mg、11-羧基- β -乙酰乳香酸(R2) 2.5 mg、 α -乳香酸(R3) 1.0 mg、 β -乳香酸(R4) 1.0 mg、3-乙酰基- α -乳香酸(R5) 1.0 mg、3-乙酰基- β -乳香酸(R6) 1.0 mg,精密称定,分别置于 1 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品储备液。分别精密量取上述 6 个对照品储备液适量,混匀,加甲醇制成质量浓度分别为 100.0、1 225、80.0、252.5、206.0、300.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 依据文献报道^[18],取西黄丸粉末约 1.0 g,精密称定,置于 50 mL 锥形瓶中,精密移取 20 mL 甲醇,具塞冰浴超声 20 min,提取 2 次,收集提取液至 50 mL 量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,混匀,即得供试品溶液。

2.1.3 阴性对照溶液的制备 按照西黄丸的处方比例和制备工艺,制备缺乳香的阴性样品,依照“2.1.2”项下方法制成不含乳香药材的阴性对照溶液。

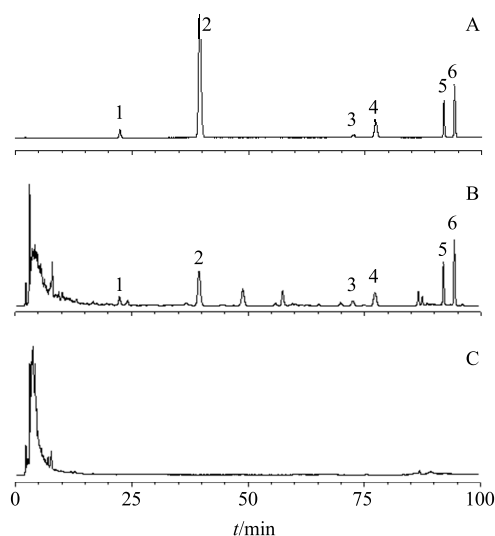
2.2 色谱条件

岛津 LC-20A 高效液相色谱仪, Waters Symmetry C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);进样量 20 μL ;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;体积流量 0.8 mL/min;流动相为甲醇-0.5%冰醋酸水溶液,程序洗脱,洗脱程序为 0~30 min, 84%甲醇;30~45 min, 84%~87%甲醇;45~55 min, 87%~90%甲醇;55~75 min, 90%甲醇;75~80 min, 90%~98%甲醇;80~100 min, 98%甲醇;记录时间 100 min;检测器为蒸发光散射检测器;漂移管温度 45 $^{\circ}\text{C}$,氮气体积流量 1.5 L/min,增益为 2。

在此条件下样品中 6 种乳香酸类成分的理论板数均不低于 5 000,分离度均大于 1.5,色谱峰对称因子均在 0.95~1.05。典型色谱图见图 1。

2.3 线性关系考察

精密吸取质量浓度分别为 11-羧基- β -乳香酸 100.0 $\mu\text{g/mL}$ 、11-羧基- β -乙酰乳香酸 1 225 $\mu\text{g/mL}$ 、 α -乳香酸 80.00 $\mu\text{g/mL}$ 、 β -乳香酸 252.5 $\mu\text{g/mL}$ 、3-乙酰基- α -乳香酸 206.0 $\mu\text{g/mL}$ 、3-乙酰基- β -乳香酸 300.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件分别进样 1、2、4、8、16、30 μL ,测定各对照品的峰面积,以峰面积的自然对数为纵坐标(Y),以进样量的自然对数为横坐标(X),绘制标准曲线,进行线性回归,得到回归方程结果分别为



1-11-羧基-β-乳香酸 2-11-羧基-β-乙酰乳香酸 3-α-乳香酸 4-β-乳香酸 5-3-乙酰基-α-乳香酸 6-3-乙酰基-β-乳香酸
1-11-keto-β-boswellic acid 2-acetyl-11-keto-β-boswellic acid
3-α-boswellic acid 4-β-boswellic acid 5-3-acetyl-α-boswellic acid
6-3-acetyl-β-boswellic acid

图1 混合对照品(A)、样品(B)和阴性对照溶液(C)的HPLC

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), sample (B), and negative control (C)

11-羧基-β-乳香酸 $Y=1.399X+12.90$, $r=0.9995$, 线性范围 $0.10\sim3.00\text{ }\mu\text{g}$; 11-羧基-β-乙酰乳香酸 $Y=1.474X+12.28$, $r=0.9995$, 线性范围 $1.23\sim36.90\text{ }\mu\text{g}$; α-乳香酸 $Y=1.468X+12.53$, $r=0.9997$, 线性范围 $0.16\sim4.80\text{ }\mu\text{g}$; β-乳香酸 $Y=1.527X+12.68$, $r=0.9997$, 线性范围 $0.25\sim7.50\text{ }\mu\text{g}$; 3-乙酰基-α-乳香酸 $Y=1.447X+13.03$, $r=0.9995$, 线性范围 $0.21\sim6.30\text{ }\mu\text{g}$; 3-乙酰基-β-乳香酸 $Y=1.472X+12.90$, $r=0.9996$, 线性范围 $0.30\sim9.00\text{ }\mu\text{g}$ 。

2.4 精密度试验

精密吸取同一供试品溶液(批号 20140726) 20 μL, 连续进样 6 次, 记录 11-羧基-β-乳香酸、11-羧基-β-乙酰乳香酸、α-乳香酸、β-乳香酸、3-乙酰基-α-乳香酸和 3-乙酰基-β-乳香酸色谱峰的保留时间和峰面积积分值, 计算两者的 RSD, 分别为 1.14%、1.00%、0.83%、0.78%、0.25%、0.28%和 1.16%、2.28%、0.80%、0.87%、3.62%、2.47%, 表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验

精密称取同一西黄丸粉末(批号 20140726) 6 份, 每份约 1.0 g, 按“2.1.2”项下方法平行制备供试品溶液, 进样 20 μL, 记录 11-羧基-β-乳香酸、11-羧基-β-

乙酰乳香酸、α-乳香酸、β-乳香酸、3-乙酰基-α-乳香酸和 3-乙酰基-β-乳香酸色谱峰的峰面积, 计算各待测成分量的 RSD 值, 分别为 0.69%、5.53%、0.72%、3.48%、2.62%和 4.21%, 表明方法重复性良好。

2.6 稳定性试验

取西黄丸粉末(批号 20140726) 约 1.0 g, 精密称定, 按“2.1.2”项下方法平行制备供试品溶液, 在制备后于 0、2、4、6、12 h 进样 20 μL 并测定各成分的峰面积, 6 种乳香酸类成分峰面积的 RSD 值依次为 2.16%、2.20%、0.77%、0.87%、3.61%和 2.54%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 加样回收率试验

称取 6 份已测定的西黄丸粉末(批号 20140726) 约 0.50 g, 精密称定, 分别精密加入 11-羧基-β-乳香酸、11-羧基-β-乙酰乳香酸、α-乳香酸、β-乳香酸、3-乙酰基-α-乳香酸和 3-乙酰基-β-乳香酸对照品适量, 按“2.1.2”项下方法制备成供试品溶液, 进样 20 μL, 测定, 计算回收率。结果平均回收率分别为 98.6%、99.1%、99.2%、98.2%、99.1%、99.5%, RSD 分别为 3.70%、3.62%、1.66%、1.89%、3.42%、2.32%。

2.8 样品测定

取西黄丸 10 批样品, 按“2.1.2”项下方法平行制备供试品溶液, 以“2.2”项下色谱条件进样 20 μL, 并记录峰面积, 测定 6 种乳香酸成分的量, 结果见表 1。11-羧基-β-乳香酸、11-羧基-β-乙酰乳香酸、α-乳香酸、β-乳香酸、3-乙酰基-α-乳香酸和 3-乙酰基-β-乳香酸的量差异均比较小, 分别为 $2.09\sim4.44\text{ mg/g}$ 、 $9.67\sim18.2\text{ mg/g}$ 、 $2.34\sim4.02\text{ mg/g}$ 、 $4.23\sim7.45\text{ mg/g}$ 、 $4.15\sim7.16\text{ mg/g}$ 、 $6.49\sim11.5\text{ mg/g}$ 。10 批西黄丸中 6 种乳香酸的总量分别为 35.1 mg/g (2.08%)、 127.8 mg/g (2.10%)、 31.3 mg/g (1.74%)、 56.2 mg/g (1.64%)、 56.5 mg/g (1.61%)、 87.8 mg/g (1.73%)。各批次西黄丸中 6 种乳香酸的总量为 $29.0\sim52.1\text{ mg/g}$, 差异较小, 显示出整体质量良好的一致性。

3 讨论

本实验考察了甲醇-0.05%醋酸水溶液、甲醇-0.1%醋酸水溶液以及甲醇-0.5%醋酸水溶液 3 种流动相洗脱系统, 色谱分析显示, 使用甲醇-0.5%醋酸水溶液的流动相时, 色谱基线平稳, 分离度好。

为了考察其他药材组分对于西黄丸中乳香酸类成分测定的影响, 本研究按照西黄丸的工艺流程制备了缺乳香阴性对照溶液, 如图 1-C 所示, 乳香酸类成分不受其他组分的干扰。

表 1 西黄丸中 6 种乳香酸类成分定量测定

Table 1 Determination results of six boswellic acids in 10 batches of XHP

样品批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)						总量
	11-羧基-β-乳香酸	11-羧基-β-乙酰乳香酸	α-乳香酸	β-乳香酸	3-乙酰基-α-乳香酸	3-乙酰基-β-乳香酸	
20141142	3.78	18.20	4.02	7.45	7.16	11.50	52.01
20141143	4.44	11.00	3.42	5.20	4.93	8.11	37.10
20140712	3.60	12.50	3.14	5.51	5.56	8.51	38.92
20140507	3.91	11.90	3.34	5.49	5.60	8.46	38.70
20140508	3.67	11.10	2.71	5.08	5.20	7.95	35.80
20140509	3.84	11.80	2.63	5.55	5.66	8.60	38.08
20140950	2.09	9.67	2.34	4.23	4.15	6.49	28.97
20140873	2.30	13.00	3.03	5.64	5.81	8.78	38.56
20140625	3.71	11.70	2.78	5.14	5.35	8.11	36.79
20140726	3.72	16.90	3.88	6.89	7.08	11.30	49.77

由于 α-乳香酸、β-乳香酸、3-乙酰-α-乳香酸和 3-乙酰-β-乳香酸最大吸收波长在 210 nm^[19], 处于紫外末端吸收, 受基线漂移影响较大; 而 11-羧基-β-乳香酸和 11-羧基-β-乙酰乳香酸最大吸收波长在 250 nm^[19], 若采用紫外检测, 则需要多波长检测才能同时兼顾 6 种乳香酸类成分。本研究采用蒸发光散射检测器 (ELSD) 在同一色谱条件下对 10 个批次的西黄丸中 6 种乳香酸类成分的量进行了测定, 基线平稳且色谱峰分离度良好, 具有简单、直接和灵敏的优点。以 ELSD 检测器自带的参数设置向导为基础, 对漂移管温度和增益进行优化, 确定了最佳的检测器条件。与之前对乳香的研究相比^[20], 西黄丸采用的乳香质量比较均一且乳香酸类成分总量较高, 侧面反映了西黄丸制备工艺的稳定性。本研究采用 HPLC-ELSD 在同一色谱条件下对西黄丸中 6 种乳香酸类成分进行同时定量, 具有简单、直接的特点, 有助于西黄丸质量控制方法的进一步研究。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
 [2] 卫生部颁药品标准 (中药成方制剂第九册) [S]. 2012.
 [3] 陈清梅, 李纪强. 西黄丸联合同步放化疗治疗局部宫颈癌的临床研究 [J]. 世界中医药, 2016, 11(7): 1215-1217.
 [4] 马杰, 王一尧, 杨伟, 等. 西黄丸抗肿瘤作用及其免疫清除功能的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(8): 1499-1501.
 [5] 戴一. 西黄丸的药理作用及临床应用概况 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(6): 473-476.
 [6] 朱晓静, 李峰, 欧阳兵. 西黄丸抗肿瘤作用研究进展 [J]. 山东中医药大学学报, 2012, 36(1): 83-85.
 [7] 杨伟, 关硕, 胡俊霞, 等. 西黄丸对荷瘤大鼠的抗肿瘤及其对炎性因子的调节作用 [J]. 现代药物与临

床, 2013, 28(6): 847-850.

[8] 万维海. 西黄丸对荷瘤小鼠生存质量影响及抑瘤机理的实验研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2015.
 [9] 陈信义, 王婧, 张雅月, 等. 西黄丸药效学研究及治疗肿瘤特点分析 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(3): 409-412.
 [10] 陈锡强, 侯海荣, 王思锋, 等. 西黄丸及其拆方药味对斑马鱼胚胎血管生成的影响 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(1): 50-53.
 [11] 金沈锐, 张新胜, 祝彼得, 等. 西黄丸对肝癌细胞 SMMC7721 分泌的血管内皮生长因子及基质金属蛋白酶 2、9 的影响 [J]. 中成药, 2008, 30(7): 1079-1081.
 [12] 陈敏纯. 羟基红花黄色素 A 和 11-羧基-β-乙酰乳香酸抗心肌氧化损伤的作用机制研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2015.
 [13] 孙妍, 商庆辉. 乳香中三萜类化合物和药理活性的研究进展 [J]. 环球中医药, 2016, 9(5): 616-620.
 [14] 蔡红蝶, 宿树兰, 周卫, 等. 乳香属药用植物中乳香酸类化学成分、生物活性及其作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2175-2181.
 [15] 吴超. 西黄丸抗肿瘤活性组分筛选及与西黄滴丸药效学和化学成分的比较研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2014.
 [16] 王瑞忠, 何轶, 张聿梅, 等. 西黄丸中 11-羧基-β-乙酰乳香酸含量测定及松香酸检查方法研究 [J]. 中国药事, 2013, 27(4): 389-393.
 [17] 何轶, 张聿梅, 鲁静, 等. 西黄丸中指标成分含量测定及挥发性成分指纹图谱的建立 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(3): 480-485.
 [18] 徐亚. 西黄丸的质量标准研究 [D]. 武汉: 武汉轻工业大学, 2014.
 [19] 刘元艳, 王超, 夏磊, 等. 活络效灵颗粒中乳香酸类成分含量分析 [J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2011, 13(5): 860-863.
 [20] 王淳, 夏磊, 宋志前, 等. 乳香中 5 种乳香酸成分含量分析 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10): 1330-1332.