

HPLC 测定小活络丸(浓缩丸)中 11-羰基- β -乙酰乳香酸

闵春艳*, 付妍, 张亚双, 顾炳仁

(苏州市食品药品检验所, 江苏 苏州 215104)

[摘要] 目的:建立小活络丸(浓缩丸)中 11-羰基- β -乙酰乳香酸的高效液相色谱含量测定方法。方法:Inertsil ODS-3 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m) 色谱柱,流动相乙腈-0.1% 冰醋酸 (80:20),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 249 nm,柱温 30 $^{\circ}$ C,外标法测定小活络丸(浓缩丸)中乳香主成分 11-羰基- β -乙酰乳香酸。结果:11-羰基- β -乙酰乳香酸在 25.95 ~ 207.6 mg·L⁻¹ 线性关系良好 ($R^2 = 0.9999$);平均加样回收率为 99.95%,RSD 3.29% ($n = 6$)。结论:方法操作简便,结果准确,重复性良好,可用于小活络丸(浓缩丸)中乳香的质量控制。

[关键词] 小活络丸; 11-羰基- β -乙酰乳香酸; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0151-03

[doi] 10.11653/syfyj2013220151

Determination of Acetyl-11-keto- β -boswellic Acid in Xiaohuoluowan (Concentrated Pills) by HPLC

MIN Chun-yan*, FU Yan, ZHANG Ya-shuang, GU Bing-ren

(Suzhou Institute for Food and Drug Control, Suzhou 215104, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method to determine acetyl-11-keto- β -boswellic acid in Xiaohuoluowan (concentrated pills). **Method:** The determination was carried out with Inertsil ODS-3 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m) column. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% acetic acid (80:20). The flow rate was 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 249 nm. The column temperature was set at 30 $^{\circ}$ C. The external standard method was used to quantify acetyl-11-keto- β -boswellic acid, the main chemical constituent of olibanum in Xiaohuoluowan (concentrated pills). **Result:** There was a good linear relationship between the absorption peak area and the concentration in the range of 25.95-207.6 mg·L⁻¹ ($R^2 = 0.9999$) for acetyl-11-keto- β -boswellic acid. The average recovery was 99.95% ($n = 6$). **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible. It can be used for quality control of olibanum in Xiaohuoluowan (concentrated pills).

[Key words] Xiaohuoluowan; acetyl-11-keto- β -boswellic acid; HPLC

小活络丸来源于宋代《太平惠民和剂局方》卷一“活络丹”方,由胆南星、制川乌、制草乌、地龙、乳香(制)、没药(制)等 6 味中药组方,其中制川乌、制草乌、地龙等 3 味混合提取稠膏,与乳香(制)、没药(制)、胆南星等 3 味粉碎成的细粉混匀,制得浓缩丸,具有祛风散寒、化痰除湿、活血止痛的功效,用于

治疗风寒湿邪闭阻、痰瘀阻络所致的痹病,症见肢体关节疼痛,或冷痛,或刺痛,或疼痛夜甚、关节屈伸不利、麻木拘挛等疾病,是临床常用的祛风除湿中成药之一^[1]。方中制川乌、制草乌温经活络、祛风除湿、散寒止痛,为君药。胆南星燥湿活络,以祛经络之痰,并能祛风,为臣药。乳香、没药活血化痰止痛,为佐药。地龙通经活络,引诸药直达病所,为本方使药。诸药合用,共奏温经活络、搜风除湿、祛痰逐瘀之功。

乳香在本方中占全处方量的 7.7%,起到活血化瘀、行气止痛的重要作用^[2]。作为一种进口药

[收稿日期] 20130108(013)

[通讯作者] * 闵春艳, 硕士, 副主任中药师, 从事中药质量控制与分析研究, Tel: 0512-67079940, E-mail: minchunyan0609@hotmail.com

材,乳香在流通领域存在用松香、淀粉掺伪等现象^[3]。我们在小活络丸中检出松香酸,发现有松香掺假乳香在小活络丸中作为原料药投料使用^[4]。乳香中的乳香酸是其抗炎、抗肿瘤的有効成分,其中 11-羰基- β -乙酰乳香酸的抗炎活性最为显著^[5]。我们采用薄层色谱法对小活络丸中的乳香药材进行定性鉴别,发现 11-羰基- β -乙酰乳香酸为乳香药材的主斑点^[6]。因此,本文采用高效液相色谱法对小活络丸中乳香的主要成分 11-羰基- β -乙酰乳香酸进行含量测定。

1 材料

SHIMADZU LC 10-AD 型高效液相色谱系统, LC-Solution 色谱工作站(日本岛津公司), XS105Dual 型电子天平(瑞典梅特勒公司), KQ-300DA 型数控超声波清洗器(昆山舒美), Heraeus Biofuge Primo R 型台式离心机(美国热电公司)。

11-羰基- β -乙酰乳香酸对照品(批号 111760-200601),购自中国药品生物制品检定所,小活络丸(来自 4 个厂家的 19 个批号)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Inertsil ODS-3 C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),流动相乙腈-0.1%冰醋酸(80:20),流速 1 mL \cdot min⁻¹,检测波长 249 nm,柱温 30 $^{\circ}$ C,进样量 10 μ L。

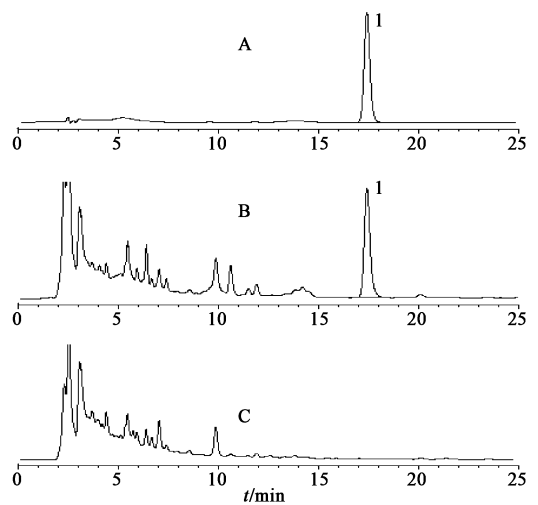
2.2 对照品溶液的制备 精密称取 11-羰基- β -乙酰乳香酸对照品 20.76 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液储备液(质量浓度为 207.6 mg \cdot L⁻¹),备用。

2.3 供试品溶液的制备 取小活络丸浓缩丸(B 厂家,批号 10K33)约 30 粒,研细,精密称取 0.2 g,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 33 kHz)20 min,放冷,用甲醇补足减失质量,摇匀,离心(10 000 r \cdot min⁻¹ \times 5 min),取上清液作为供试品溶液。

2.4 阴性供试品溶液的制备 按小活络丸浓缩丸处方组成和生产工艺,制备不含乳香的阴性模拟制剂,按 2.3 项下提取供试品,作为阴性供试品溶液。

2.5 系统适用性试验 取对照品溶液、供试品溶液和阴性供试品溶液按 2.1 项下色谱条件进样各 10 μ L,记录色谱图。结果表明,11-羰基- β -乙酰乳香酸出峰时间为 17.44 min,理论板数按 11-羰基- β -乙酰乳香酸峰计不低于 15 000,阴性无干扰,结果见图 1。

2.6 线性范围 将 2.2 项下 11-羰基- β -乙酰乳香



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 11-羰基- β -乙酰乳香酸

图 1 小活络丸高效液相色谱

酸对照品储备液分别稀释为 25.95, 51.9, 77.85, 103.8, 155.7, 207.6 mg \cdot L⁻¹ 的系列标准溶液。精密吸取上述 6 份对照品溶液各 10 μ L 进样,记录色谱峰峰面积。以色谱峰峰面积为纵坐标,对照品质量浓度(mg \cdot L⁻¹)为横坐标进行线性回归,得到回归曲线 $Y = 14\,043X - 29\,609$ ($R^2 = 0.999\,9$),表明 11-羰基- β -乙酰乳香酸在 25.95 ~ 207.6 mg \cdot L⁻¹ 线性关系良好。

2.7 精密度试验 精密吸取 11-羰基- β -乙酰乳香酸对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件,重复进样 6 次,每次进样 10 μ L,测定 11-羰基- β -乙酰乳香酸峰面积, RSD 0.89%,表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验 取小活络丸浓缩丸(B 厂家,批号 10K33)供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8 h,各精密吸取 10 μ L,注入液相色谱仪。按 2.1 项下色谱条件测定 11-羰基- β -乙酰乳香酸峰面积,结果 RSD 1.02%,表明供试品溶液在 8 h 内具有良好的稳定性。

2.9 重复性试验 精密称取小活络丸浓缩丸(B 厂家,批号 10K33)同一批样品 6 份,按 2.3 项下制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定。结果测得该批次小活络丸中 11-羰基- β -乙酰乳香酸平均含量为 4.598 8 mg \cdot g⁻¹, RSD 3.21%,表明方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验 取已知含量的小活络丸浓缩丸(B 厂家,批号 10K33),11-羰基- β -乙酰乳香酸平均含量为 4.598 8 mg \cdot g⁻¹,取约 0.1 g,精密称定,共 6 份,分别精密加入 17.1 mg \cdot L⁻¹ 的 11-羰基- β -乙酰乳香酸对照品溶液 25 mL,按 2.3 项下制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定。外标法计算回

收率,结果见表1。

表1 11-羰基-β-乙酰乳香酸加样回收率试验(n=6)

No.	称样量 /g	已知 含量 /mg	实测 含量 /mg	加样 回收率 /%	平均加样 回收率 /%	RSD /%
1	0.099 4	0.457 1	0.902 4	104.17		
2	0.105 4	0.484 7	0.926 8	103.41		
3	0.106 2	0.488 4	0.903 7	97.14		
4	0.101 3	0.465 9	0.895 6	100.51	99.95	3.29
5	0.106 7	0.490 7	0.909 6	97.99		
6	0.099 9	0.459 4	0.871 7	96.45		

注:加入量均为0.427 5 mg。

2.11 样品含量测定 取A,B,C,D,个厂家的18批次小活络丸浓缩丸按上述方法进行测定,以外标法计算11-羰基-β-乙酰乳香酸含量,结果见表2。

表2 小活络丸中乳香酸含量测定 mg·g⁻¹

No.	批号	乳香酸	No.	批号	乳香酸
1	A-110101	4.398	10	B-10F24	4.389
2	A-100203	4.126	11	B-10J29	4.010
3	A-101001	4.729	12	B-10E19	4.357
4	A-110102	4.705	13	B-10E22	3.798
5	B-10B3	4.500	14	B-10K32	3.463
6	B-10C10	4.634	15	C-62101204	1.027
7	B-10C11	4.567	16	D-090301	1.152
8	B-10D16	4.120	17	D-100914	3.367
9	B-10E21	4.328	18	D-110318	0.801

3 讨论

乳香中的总三萜类有机酸是其抗炎、镇痛、抗免疫、抗肿瘤的有效成分,其中以11-羰基-β-乙酰乳香酸的抗炎活性最为显著,且其易于检测,含量也较其他乳香酸类成分稳定。因此,本研究将11-羰基-β-乙酰乳香酸作为小活络丸中乳香的定量检测的指标成分^[7-10]。

考察了提取溶剂(95%乙醇、甲醇、无水乙醇)、溶剂量(25,50 mL)、提取方法(超声、热回流)和提取时间(超声20,40 min、回流1 h)对11-羰基-β-乙酰乳香酸提取率的影响,最终采用甲醇25 mL超声20 min提取小活络丸中的11-羰基-β-乙酰乳香酸。

4个厂家19批次的小活络丸浓缩丸中11-羰基-β-乙酰乳香酸含量测定结果表明,11-羰基-β-乙酰乳香酸平均含量为3.741 mg·g⁻¹,最高含量达

4.729 mg·g⁻¹,最低含量为0.801 mg·g⁻¹,厂家间的差异较大。加之乳香的炮制方法和炮制程度对乳香酸类成分的含量有较大影响^[11-12],且流通领域也发现有乳香掺伪现象,有必要对小活络丸中的乳香进行有效质量控制。建议将11-羰基-β-乙酰乳香酸的含测纳入小活络丸的质量标准。

[参考文献]

[1] 陈建真,陈建明. 小活络丸的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 1999, 5(4):57.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:509.

[3] 钟名诚,饶伟文,肖聪. 乳香的商品调查与质量检测方法研究[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(5):410.

[4] 张亚双,闵春艳. 小活络丸中非法添加松香酸的检查方法研究[J]. 中成药, 2013, 35(4):867.

[5] Safayhi H, Mack T, Sabieraj J, et al. Boswellia acids: novel, specific, non-redox inhibitors of 5-lipoxygenase [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1992, 261(3):1143.

[6] 付妍,张亚双,闵春艳. 小活络丸中乳香的定性鉴别方法研究[J]. 中国药事, 2013, 27(2):183.

[7] 周金云,崔锐. 乳香的化学成分[J]. 药学学报, 2002, 37(8):633.

[8] Li Fu-Shuang, YAN Dong-Lan, TAN Gui-Shan, et al. Chemical constituents of boswellia carterii (Frankincense) [J]. Chin J Nat Med Jan, 2010, 8(1):25.

[9] 常允平,夏广萍,韩英梅,等. HPLC法测定乳香中乙酰乳香酸类成分的含量[J]. 中医药学报, 2012, 40(5):15.

[10] 佟昕,刘汶,梁晓旭,等. 乳香中三萜类成分的薄层色谱鉴别和含量测定[J]. 中国现代中药, 2012, 14(7):11.

[11] 孙磊,刘丽娜,金红宇,等. 乳香、制乳香含量测定研究[J]. 中国药事, 2010, 24(10):972.

[12] 夏磊,宋志前,李青,等. 不同炮制工艺对乳香中5种乳香酸类成分的影响[J]. 中草药, 2012, 43(6):1087.

[责任编辑 顾雪竹]