

不同来源乳香的高效薄层色谱数码轮廓 指纹图谱分析及基原鉴别

许佳^{1,2}, 王玉蓉², 孙磊^{3*}, 金红宇³

(1. 北京市朝阳区药品检验所, 北京 100028; 2. 北京中医药大学, 北京 100102;
3. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

[摘要] 目的: 建立乳香药材的高效薄层色谱指纹图谱, 并对不同来源乳香药材的指纹图谱进行比较分析。方法: 样品经甲醇超声提取, 点样于硅胶 GF₂₅₄ 高效预制薄层板上, 以甲苯-乙酸乙酯-庚烷-无水甲酸(8:2:1:0.3)为展开剂展开, 先置紫外灯(254nm)下检视并成像, 再喷以茴香醛试液, 并于 105 °C 加热至条斑清晰, 日光下再次成像, 图像经 CHROMAP 软件转换成数码轮廓图并生成共有模式后, 进行相似度、聚类 and 主成分分析。结果: 日光下, 埃塞俄比亚乳香的指纹图谱由 12 个特征条斑组成, 薄层色谱图像与数码轮廓图谱结合分析比较, 可分为埃塞俄比亚乳香模式和索马里乳香模式, 不同种的乳香可被鉴别并归类。结论: 该法简便、专属、准确, 适用于乳香的鉴别和质量控制。

[关键词] 高效薄层色谱; 指纹图谱; 化学计量学; 数码轮廓; 乳香属; 乳香; 乳香酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0074-05

Digital Profile Fingerprint Analysis and Identification of Olibanum from Different Sources by High-Performance Thin Layer Chromatography

XU Jia^{1,2}, WANG Yu-rong², SUN Lei^{3*}, JIN Hong-yu³

(1. Beijing Chaoyang Institute for Drug Control, Beijing 100028 China;
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for fingerprint analysis of olibanum from different sources by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC). **Method:** The samples were extracted by ultrasonic with menthol. Chromatography was performed on silica gel 60F₂₅₄ HPTLC plate, using toluene-ethyl acetate-heptanes-anhydrous formic acid (8:2:1:0.3) as mobile phase, examined and recorded in ultraviolet light at 254 nm firstly, then in white light after derivatization with anisaldehyde test solution. The images were converted to grayscale intensity digital profile and then generated common pattern of HPTLC fingerprints with CHROMAP software, and authentication and quality assessment were analyzed by similarity analysis, cluster analysis and principal component analysis. **Result:** Twelve bands present in the chromatogram of Ethiopian olibanum in white light. There was notable difference between Ethiopian pattern and Somalian pattern. Olibanum from different species could readily be distinguished from each other so that commercial samples can easily be classified. **Conclusion:** The method is simple, specific and accurate, can be used for detection and quality control of olibanum.

[Key words] high-performance thin layer chromatography (HPTLC); fingerprint; chemometrics; digital profile; *boswellia*; olibanum (frankincense); boswellic acids

[收稿日期] 20120528(012)

[基金项目] 《中国药典》2010 版任务(YZ-215); 进口药材标准提高任务

[第一作者] 许佳, 药师, 硕士研究生, 从事中药分析研究

[通讯作者] * 孙磊, 助理研究员, 从事中药、民族药、天然药物质量控制及有害残留物分析, Tel:010-67095424, E-mail: dasunlei@sina.com

乳香为常用树脂类药材,由于依赖进口,基原和质量控制研究相对薄弱。据作者前期研究,我国习用品的原植物主要为乳香树(*Boswellia sacra* Flück., 异名 *B. carteri* Birdw.) 和纸乳香树 [*B. papyrifera* (Del.) Hochst.]^[1], 印度习用品(欧洲药典收载品)的原植物为齿叶乳香树 *B. serrata* Roxb.^[1,2], 已有薄层色谱法^[2,4]、高效液相色谱法^[2,5,6] 和实时直接分析-串联质谱法(DART-MS/MS)^[7] 分析乳香中有效成分的报道,但限于乳香酸类成分的检测,未解决不同来源乳香的基原鉴别问题,也没有采用指纹图谱等综合分析方法评价乳香的质量。本研究在已有工作^[4,5] 的基础上,采用文献^[8] 的质量评价模式,建立了乳香的薄层色谱指纹图谱分析方法,对 20 批不同来源的药材进行了相似度、聚类分析和主成分分析,印证了前期原植物研究^[1] 的结论,对乳香及其制剂质量标准的增、修订提供了有益的参考。

1 仪器与试剂

Linomat5 半自动点样仪、Digistore2 数码成像系统(瑞士 Camag); CHROMAP 1.5 色谱指纹图谱分析系统解决方案(珠海科曼中药研究有限公司)。AKBA 对照品(批号 111760-200601)和乳香对照药材(埃塞俄比亚乳香,批号 120970-200904)来自中国食品药品检定研究院,11-羧基- β -乳香酸(KBA)、 β -乳香酸(β -BA)和 β -乙酰乳香酸(β -ABA)对照品购自美国 Chromadex 公司;甲醇、甲苯、乙酸乙酯、庚烷、无水甲酸、冰醋酸、硫酸和茴香醛(分析纯,北京化工厂);水(Milli-Q 系统制备);Silica gel 60F₂₅₄(德国 Merck);乳香样品分别来自国家药典委员会、天津市药品检验所进口药材留样、中国食品药品检定研究院中药标本馆馆藏和阿曼实地收集,由中国食品药品检定研究院张南平副主任药师鉴定,见表 1。

2 方法

2.1 对照品溶液 取 AKBA, KBA, β -BA, β -ABA 对照品适量,加甲醇分别制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液,即得。

2.2 供试品溶液 取供试品粉末 0.2 g,加甲醇 20 mL,超声处理 10 min,滤过,即得。

2.3 薄层色谱条件 使用 Linomat5 半自动点样仪以条带状方式(条带宽 8 mm)点样于硅胶 GF₂₅₄ 高效薄层板上,对照品溶液和供试品溶液点样量均为 10 μ L,以甲苯-乙酸乙酯-庚烷-无水甲酸(8:2:1:0.3)为展开剂,展开(展距 7.5 cm),取出,晾干。先置紫外光灯 254 nm 下,用 Digistore2 数码成像系统采集

数码图像;再喷以茴香醛试液,置 105 $^{\circ}$ C 加热至条斑显色清晰,日光下再次采集图像。

表 1 乳香样品信息

No.	批号	来源	原植物
1	20070551	埃塞俄比亚	<i>Boswellia papyrifera</i>
2	20070396	埃塞俄比亚	<i>B. papyrifera</i>
3	对照药材	埃塞俄比亚	<i>B. papyrifera</i>
4	20071530	埃塞俄比亚	<i>B. papyrifera</i>
5	20072176	埃塞俄比亚	<i>B. papyrifera</i>
6	20071374	埃塞俄比亚	<i>B. papyrifera</i>
7	080827	埃塞俄比亚	<i>B. papyrifera</i>
8	080828	埃塞俄比亚	<i>B. papyrifera</i>
9	20071374	埃塞俄比亚	<i>B. papyrifera</i>
10	20100101	埃塞俄比亚	<i>B. papyrifera</i>
11	046	苏丹	<i>B. papyrifera</i>
12	HDHH	苏丹	<i>B. papyrifera</i>
13	1104	苏丹	<i>B. papyrifera</i>
14	031	索马里	<i>B. sacra</i>
15	034	索马里	<i>B. sacra</i>
16	73D83255J	索马里	<i>B. sacra</i>
17	392011	索马里	<i>B. sacra</i>
18	20120216	阿曼	<i>B. sacra</i>
19	392022	新加坡	未知
20	392023	新加坡	未知

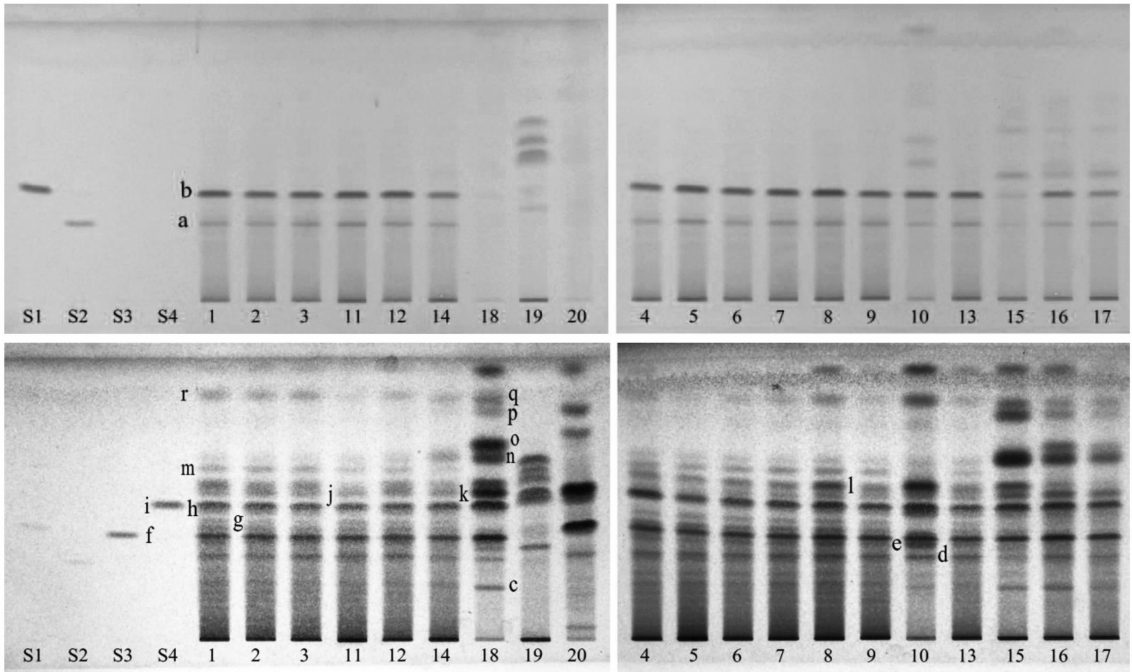
2.4 数码轮廓指纹图谱的生成 将显色前后采集的数码图像导入 CHROMAP 软件,将彩色信号转换成灰度信号,生成类似薄层扫描的色谱图并积分。

3 结果

3.1 乳香 HPTLC 指纹图谱的直观分析 供试品溶液及对照品溶液按上述条件展开,薄层色谱图见图 1,在 254 nm 图中,AKBA ($R_f \approx 0.41$) 和 KBA ($R_f \approx 0.29$) 为暗斑, β -BA 和 β -ABA 无法检视,显色后的日光图中,AKBA 和 KBA 为不明显的黄褐色斑点,而 β -BA ($R_f \approx 0.39$) 和 β -ABA ($R_f \approx 0.51$) 则为清晰的紫色条斑,另据作者前期乳香薄层研究结果^[4], α -BA 和 α -ABA 的 R_f 值与 β 异构体是相同的, R_f 约 0.56 的蓝色条斑为 tirucallic acid 类的 ATA,各主要特征条斑的信息见表 2。通过样品色谱图的对比可知,254 nm 和日光的图的结论大致相同:13 批埃塞俄比亚乳香(resin of *B. pap.*) 的特征图谱比较类似;5 批索马里乳香(resin of *B. sac.*) 的特征图谱另成一类;进口自新加坡的乳香特征图谱更为特别,提示与我国习用乳香的原植物不一致。但也有些偏离的样品:如 10 号有些接近索马里乳香;14 号则些许类似埃塞俄比亚乳香;18 号从日光图来看符合索马里乳香的模式,但 254 nm 下无任何明显暗斑,可能是由于地域不同造成的。进一步对比分析可见,埃塞俄比亚乳香和索马里乳香的指纹图谱在 R_f 值

0.20 ~ 0.56 的区域(暂称为“质量区”)内较接近,主要呈现乳香酸等三萜酸类有效成分的条斑,或可用来评价质量的优劣;两者在 Rf 值 0.56 ~ 0.91 的区域则明显不同(暂称为“鉴别区”),特别是埃塞俄

比亚乳香具有 Rf 约 0.64,0.91 的棕黄色特征条斑,索马里乳香则是 Rf 约 0.70,0.83,0.86 的特征条斑,可用来分辨两种乳香。



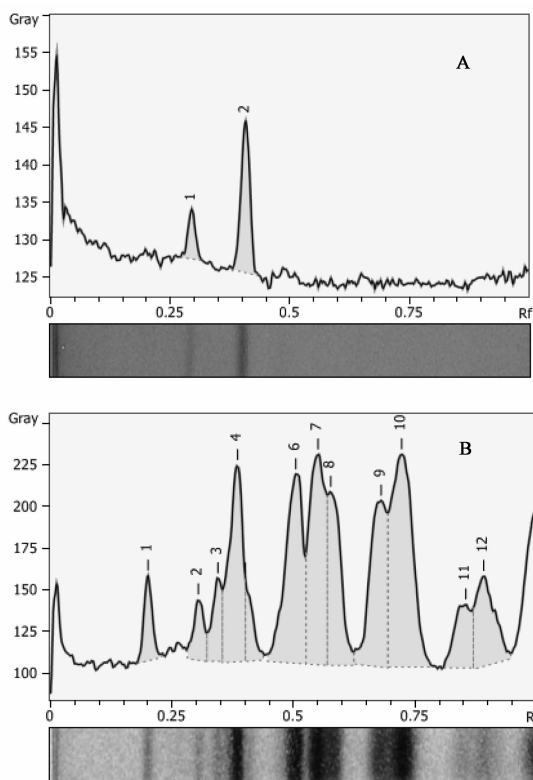
S1. 11-羧基-β-乙酰乳香酸;S2. 11-羧基-β-乳香酸;S3. β-乳香酸;S4. β-乙酰乳香酸;1 ~ 20. 样品

图 1 乳香的 HPTLC 色谱(254 nm 及日光)

表 2 特征条斑的属性

No.	对应成分	条斑颜色	Rf 值	检视条件	对应原植物
a	KBA	暗斑	0.29	254 nm	<i>B. papyrifera</i> , <i>Boswellia sacra</i>
b	AKBA	暗斑	0.41	254 nm	<i>B. papyrifera</i> , <i>B. sacra</i>
c	未知	紫色	0.20	日光	<i>B. sacra</i>
d	未知	紫色	0.32	日光	<i>B. papyrifera</i> , <i>B. sacra</i>
e	未知	紫色	0.37	日光	<i>B. papyrifera</i>
f	α-BA, β-BA	紫色	0.39	日光	<i>B. papyrifera</i> , <i>B. sacra</i>
g	未知	紫色	0.44	日光	<i>B. papyrifera</i>
h	未知	蓝色	0.48	日光	<i>B. papyrifera</i>
i	α-ABA, β-ABA	紫色	0.51	日光	<i>B. papyrifera</i> , <i>B. sacra</i>
j	未知	棕黄色	0.55	日光	<i>B. papyrifera</i>
k	未知	蓝色	0.55	日光	<i>B. sacra</i>
l	ATA	蓝色	0.56	日光	<i>B. papyrifera</i>
m	未知	棕黄色	0.64	日光	<i>B. papyrifera</i>
n	未知	蓝黑色	0.67	日光	<i>B. papyrifera</i> , <i>B. sacra</i>
o	未知	红色/棕色	0.70	日光	<i>B. sacra</i>
p	未知	蓝黑色	0.83	日光	<i>B. sacra</i>
q	未知	蓝黑色	0.86	日光	<i>B. sacra</i>
r	未知	棕黄色	0.91	日光	<i>B. papyrifera</i>

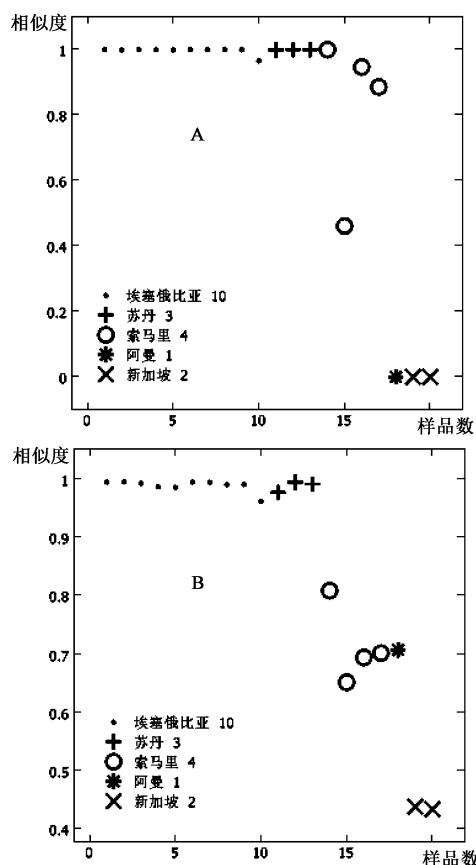
3.2 乳香 HPTLC 指纹图谱的相似度分析 先使用 CHROMAP 软件将薄层色谱图转换数码轮廓图(图 2)并积分,再将 13 批埃塞俄比亚乳香的数码轮廓图作为代表性图谱,选择样品中均检出的峰作为共有峰(254 nm 下 2 个,日光下 12 个),以均数法计算特征值,分别得到埃塞俄比亚乳香 254 nm 及日光下的数码轮廓指纹图谱共有模式,将 20 批样品的数码轮廓数据与共有模式相比,计算夹角余弦相似度,结果见图 3。相似度结果显示,无论 254 nm 下还是日光下,13 批埃塞俄比亚乳香的相似度均很高(0.963 ~ 1.00),表明不同产地、批次的埃塞俄比亚乳香所含主要成分比例稳定。索马里乳香的相似度差异加大(254 nm:0.886 ~ 1.00,除 15、18 号样品外;日光:0.652 ~ 0.809),因为两者在乳香酸类成分上比例较为接近。新加坡乳香相似度均很低,可与上两类明显区分。总体来看,254 nm 相似度与日光下的趋势基本一致,但由于指标峰过少,区分度偏低,仅适于快速简单分析。



A. 紫外光灯 254 nm; B. 日光

图 2 乳香 HPTLC 薄层色谱图及对应数码轮廓图

3.3 乳香 HPTLC 指纹图谱的聚类分析和主成分分析 为进一步评价样品间的亲疏程度,将数据中心化后进行聚类分析(欧氏距离),与相似度评价类似,由于 254 nm 的信息较少,日光分析的结果更全



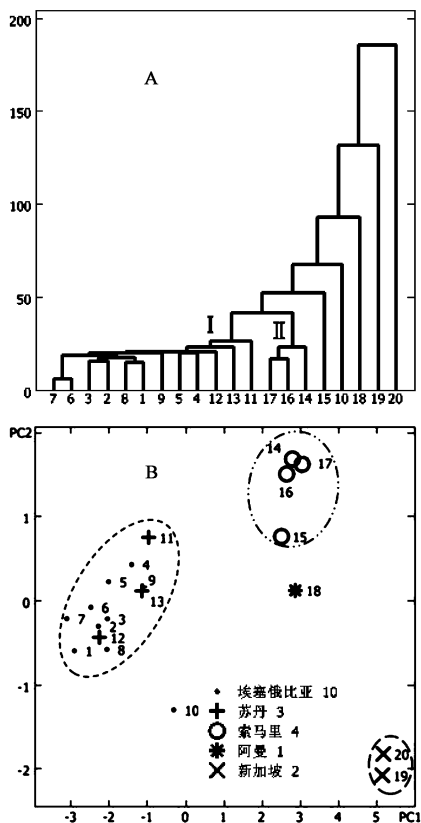
A. 紫外光灯 254 nm; B. 日光

图 3 乳香 HPTLC 指纹图谱相似度分析

面准确,因此仅分析日光聚类结果。图 4A 中,除 10 号外,12 个批次的埃塞俄比亚乳香全部聚为 I 类,显示了较高的共性,除 15,18 号外,14,16 和 17 号索马里乳香聚为 II 类,两批新加坡乳香与其他乳香距离最远。参照图 1 可见,10 号偏离的原因主要是“质量区”有数个条斑颜色较其他埃塞俄比亚乳香更深,15 号和 18 号未聚于索马里乳香是由于“鉴别区”的条斑颜色更深。聚类分析的结果与相似度分析在个别样品的判别上有一定差异,主要是由于算法不同造成的,两种分析互为参照,评价结果更全面。

此外,将样品日光检视数据标准化后还进行了主成分分析,其中,第一主成分(PC1)得分较高的是条斑 i(-0.458 4,即 α -ABA 和 β -ABA)、条斑 f(-0.452 1,即 α -BA 和 β -BA)和条斑 h(-0.332 8),第二主成分(PC2)得分较高的是条斑 e(-0.452 5)、条斑 i(0.443 2)和条斑 f(0.420 5)。图 4B 所示的样品分布情况清晰地表明,13 埃塞俄比亚乳香聚为一类,5 批索马里乳香聚为一类,2 批新加坡的聚为一类,其中埃塞俄比亚类与索马里类

距离相对更近,此外,10,15,18 号样品较为离群,以上结果与聚类分析结果一致。



A. 聚类分析图; B. 主成分分析

图 4 乳香 HPTLC 指纹图谱聚类分析和主成分分析

4 讨论

据作者前期研究结论^[1]和欧洲药典论述^[2],正品药用乳香的原植物为乳香树、纸乳香树和齿叶乳香树,照欧洲药典薄层方法^[2](即本文 254 nm 鉴别法),或能分辨药用乳香与其他乳香,但无法对上述 3 种乳香进行区分,本文提供了可鉴别索马里乳香和埃塞俄比亚乳香的方法,由于未收集到印度乳香样品,能否加以区分,尚待研究。

参考文献[2,5]采用甲醇超声法提取,既简便也兼顾了乳香酸类成分的提取率。展开剂沿用文献[2,4]的体系,加入少量的酸可使三萜酸类成分和二萜、倍半萜类成分均能较好的分离。不显色在 254 nm 检视虽简便但信息量少,前文^[4]报道的硫酸乙醇显色剂需 SPE 净化后才有较好效果,因此本文最终选择了茴香醛试液。

法定标准的 HPLC 指纹图谱检查项中,会提供标准谱图供相似度计算,但在薄层色谱法中较难执行,因为该法的影响因素较多(如温度、湿度,薄层板的品牌、型号与个体差异,展开剂的配制和显色过程等),若能制备特征成分含量稳定的对照提取物,每次随行点样,或是有效的解决方法,若提取物能够标定有效成分的含量,数码轮廓图还能用于样品中相应成分含量的快速估算。

薄层色谱法广泛应用于定性,定量需使用薄层扫描仪,由于精密度较 HPLC 差,在科研和质量标准中已很少采用。文献[8]和本研究显示,借助软件可将薄层图像中被忽略的定量信息加以利用,即将转换后的薄层数码轮廓图积分后用于指纹图谱分析或快速含量估算,虽然该法灵敏度较薄层扫描法逊色,但信息量更大(非单一波长),且成本低廉,具有良好的实用价值和应用前景。

[参考文献]

- [1] 孙磊,徐纪民,金红宇,等. 乳香基原的本草学、植物学和成分分析研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(2):112.
- [2] EP7. 0[S]. 2010:1152.
- [3] Pozharitskaya O N, Ivanova S A, Shikov A N, et al. Separation and quantification of terpenoids of *Boswellia serrata* Roxb. extract by planar chromatography techniques (TLC and AMD) [J]. J Sep Sci, 2006, 29(14):2245.
- [4] 费毅琴,孙磊,程显隆,等. 四级杆飞行时间串联质谱(QToFMS)辅助高效薄层色谱(HPTLC)鉴别乳香中乳香酸[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(20):1601.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 孙磊,胡晓茹,金红宇,等. 实时直接分析-串联质谱法快速分析乳香中多种乳香酸[J]. 中草药, 2012, 43(7):1320.
- [8] 刘和平,谢培山,田润涛. 柴胡属药材皂苷高效薄层色谱指纹图谱的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(1):38.

[责任编辑 顾雪竹]