

HPLC 比较乳香炮制前后 11-羰基- β -乙酰乳香酸含量

张振凌*, 郑玉丽

(河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的:比较乳香炮制前后 11-羰基- β -乙酰乳香酸含量变化。方法:高效液相色谱法。结果:不同批次乳香炮制前后 11-羰基- β -乙酰乳香酸含量不同,090325 批次中生品 3.79%、清炒品 4.07%、醋炙品 4.08%,090917 批次中生品 3.24%、清炒品 3.32%、醋炙品 3.71%,100413 批次中生品 4.02%、清炒品 4.07%、醋炙品 4.08%。结论:炮制后乳香中 11-羰基- β -乙酰乳香酸含量有升高的趋势。

[关键词] 乳香;炮制;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]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0051-03

Comparison of Acetyl-11-keto- β -boswellic Acid Contents in Olibanum before and after Processed by HPLC

ZHANG Zhen-ling*, ZHENG Yu-li

(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the changes of contents of acetyl-11-keto- β -boswellic acid in Olibanum before and after processed. **Method:** HPLC was used for the comparison. **Result:** Acetyl-11-keto- β -boswellic acid contents in the different batch of Olibanum before and after processed were as follows raw 3.79%, stir-fried 4.07%, vinegar processed 4.08% (batch 090325); raw 3.24%, stir-fried 3.32%, vinegar processed 3.71% (batch 090917); raw 4.02%, stir-fried 4.07%, vinegar processed 4.08% (batch 100413). **Conclusion:** Acetyl-11-keto- β -boswellic acid content in Olibanum was increased after processing.

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

乳香为常用中药,为橄榄科植物卡氏乳香树及其同属植物皮部渗出的或经刀割渗出的树脂。乳香辛散温通,具有调气活血、定痛、追毒之功效,主治气血凝滞、心腹疼痛、痈疮肿毒、跌打损伤、痛经、产后瘀血等症^[1]。历代对乳香炮制方法记载较多,有盐、姜汁制、蒸、煮、黄连制、炒制、酒炙、麸炒、醋炙、灯心制等方法,目前主要有清炒法和醋炙法。乳香中总三萜类有机酸是其抗炎、镇痛、抗免疫的主要有效部位,乳香酸中 11-羰基- β -乙酰乳香酸可通过抑制肿瘤血管新生来抑制肿瘤的生长^[2],已有研究报道了这种成分的含量测定方法^[3],但对其炮制前后的变

化尚未报道。本研究首次采用 HPLC 法比较不同炮制方法对 11-羰基- β -乙酰乳香酸含量的影响,探讨炮制原理和作用。

1 材料

1.1 仪器 高效液相色谱分析仪(岛津 LC-2010AHT, PDA 检测器), CLASS-VP 数据处理系统, KQ-500DV 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), METTLER AE 240 型 1/万电子天平, Sartorius 1/万电子天平, FW-100 高速万能粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司), SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 试剂 11-羰基- β -乙酰乳香酸对照品(中国药品生物制品检定所提供,纯度 > 98%,供含量测定用,批号 111760-200601), 甲醇(天津四友精细化学有限公司出品,批号 283009-03962 色谱纯), 其他试剂均为分析纯,水为双蒸水,米醋(清徐县进财醋

[收稿日期] 20100520006

[第一作者] 张振凌,教授,大学本科,从事中药炮制学教学与研究, Tel: 0371-65680970, E-mail: zhangz16758@163.com

业有限公司,批号 20080602)。

1.3 药材 3 批乳香药材购自河南中原正信药行、郑州市裕鑫药材行、郑州市贸源药材行,批号分别为 090325,090917,100413,乳香清炒品购自张仲景大药房,经河南中医学院鉴定教研室陈随清教授鉴定均为橄榄科植物卡氏乳香树 *Boswellia carterii* Birdw 渗出的树脂。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 生品 取原药材,除去杂质,粉碎,过 20 目筛,备用。见表 1。

2.1.2 清炒品 取乳香生品,置热锅内,用文火加热,炒至冒烟,表面熔化显油亮光泽时,迅速取出,摊开放凉粉碎,过 20 目筛,备用。见表 1。

2.1.3 醋炙品 取乳香生品,置热锅内,用文火加热,炒至冒烟,表面微熔,喷淋一定量的米醋(每 100 g 乳香用米醋 5 g),再炒至表面显油亮光泽,迅速取出,摊开放凉,粉碎,过 20 目筛,备用。见表 1。

2.1.4 市售清炒品 粉碎,过 20 目筛,备用。

表 1 乳香不同炮制品的收率

批号	炮制方法	来源	收率/%
090325S	净制	河南中原正信药行	98.9
090325Q	清炒	河南中原正信药行	97.0
090325C	醋炙	河南中原正信药行	98.0
090917S	净制	郑州市裕鑫药材行	98.3
090917Q	清炒	郑州市裕鑫药材行	96.7
090917C	醋炙	郑州市裕鑫药材行	97.8
100413S	净制	郑州市贸源药材行	98.1
100413Q	清炒	郑州市贸源药材行	97.2
100413C	醋炙	郑州市贸源药材行	98.5

2.2 乳香不同炮制品水分含量比较 按 2005 年版《药典》附录水分含量测定项下规定的操作法中的甲苯法^[4],对各乳香样品中的水分含量进行了测定,计算供试品中含水量(%),具体结果见表 2。

2.3 乳香炮制前后 11-羧基-β-乙酰乳香酸含量比较

2.3.1 色谱条件 色谱柱 phenomenex, Synergi 4u Hydro-RP 80A(4.60 × 250 mm, 4 μm); 二极管阵列检测器;流动相甲醇-0.01% 冰乙酸水(82:18);流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长 249 nm;柱温 35 ℃。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取 11-羧基-β-乙酰乳香酸对照品 1.40 mg 于 5 mL 量瓶中,用色谱

表 2 乳香不同炮制品 11-羧基-β-乙酰乳香酸含量测定(n=2) %

样品名称	含量	水分含量	干燥品含量
090325S 生品	3.62	4.40	3.79
090325Q 清炒品	3.90	4.20	4.07
090325C 醋炙品	3.91	4.00	4.08
090917S 生品	3.09	4.85	3.24
090917Q 清炒品	3.18	4.30	3.32
090917C 醋炙品	3.54	4.50	3.71
100413S 生品	3.82	5.00	4.02
100413Q 清炒品	3.90	4.30	4.07
100413C 醋炙品	3.89	4.60	4.08
市售清炒品	3.97	4.20	4.15

甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得 0.28 g·L⁻¹ 11-羧基-β-乙酰乳香酸对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备^[3] 取乳香样品粉末 0.2 g,精密称定,至 50 mL 量瓶中,加 40 mL 甲醇,超声提取 30 min,放冷,加甲醇定容至刻度,摇匀,过滤,取续滤液,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.3.4 线性关系的考察 取上述对照品溶液适量过 0.45 μm 微孔滤膜,分别进样 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 μL 按上述条件进行检测,以进样量为横坐标,峰面积分值为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程为 Y = 1.51X - 8.92, 相关系数 R = 1.000, 结果表明在 0.56 ~ 3.92 μg 性关系良好。

2.3.5 精密度试验 取对照品溶液,按色谱条件重复进样 6 次,进样量为 5 μL, 计算得 RSD = 1.82%, 表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取批号 090325S 乳香生品样品,按照供试品溶液的制备方法制得供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样,每次进样量 10 μL, 计算得 RSD 2.27%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.7 重复性试验 取批号 090325S 乳香生品 0.2 g,精密称取 6 份,按照供试品溶液的制备方法制备,分别按色谱条件进样,进样量为 10 μL, 计算得 RSD 2.87%, 表明本方法的重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验 取批号 090325S 乳香生品样品 6 份,各 0.1 g,精密称定,分别加 11-羧基-β-乙酰乳香酸对照品 3.5 mg,按供试品溶液的制备方法制备,按含量测定方法测定含量,计算回收率 100.02%, RSD 2.96%, 结果见表 3。

2.3.9 样品含量测定 分别吸取不同批次乳香生品、清炒品、醋炙品和市售清炒品的供试品溶液,过

表 3 乳香中加样回收率试验 (n = 6)

No.	样品重量 /g	样品含量 /mg	加入对照品 /mg	实测值 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.100 2	3.617	3.500	6.954	95.336		
2	0.100 5	3.628	3.500	7.265	103.91		
3	0.100 4	3.624	3.500	7.095	99.159		
4	0.100 5	3.628	3.500	7.104	99.313	100.02	2.96
5	0.100 2	3.617	3.500	7.117	99.994		
6	0.100 3	3.621	3.500	7.204	102.38		

0.45 μm 微孔滤膜,每次进样量 10 μL,按上述色谱条件检测,以干燥品计算含量,11-羧基-β-乙酰乳香酸含量结果见图 1 和表 2。

本试验研究结果表明,乳香炮制后 11-羧基-β-乙酰乳香酸含量有升高的趋势。同批乳香炮制前后 11-羧基-β-乙酰乳香酸含量:醋炙品 4.08% > 清炒品 4.07% > 生品 3.79%,醋炙品 3.71% > 清炒品 3.32% > 生品 3.24%,醋炙品 4.08% > 清炒品 4.07% > 生品 4.02%。市售清炒品含量则高于本实验室炮制样品的含量,可能与样品来源有关。

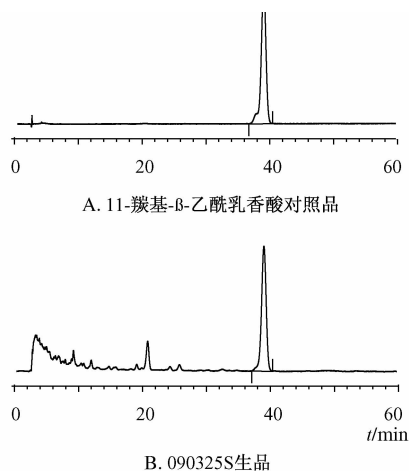


图 1 乳香 HPLC 图谱

3 讨论

3.1 孔静等^[3]用 HPLC 测定了乳香药材中 11-羧基-β-乙酰乳香酸的含量,以乙腈-水-冰乙酸(79:21:0.1)为流动相。通过色谱条件的摸索,在甲醇-0.01%冰乙酸水(82:18)为流动相时,分离效果良好,峰形较好且甲醇比乙腈毒性小,因此决定选用甲醇-0.01%冰乙酸水(82:18)为流动相。结果表明建立的条件稳定,本实验采用 HPLC 法测定 11-羧基-β-

乙酰乳香酸的含量,为其质量控制和炮制工艺研究开发提供研究基础。

3.2 乳香不同炮制品中 11-羧基-β-乙酰乳香酸含量均以干燥品计,排除了不同炮制品由于含水量不同而造成含量上的差异,三批乳香炮制后 11-羧基-β-乙酰乳香酸含量均有升高的趋势,可能是因为加热使乳香挥发性成分含量降低,11-羧基-β-乙酰乳香酸的相对含量有所升高,具体原因还需进一步研究。

3.3 已有研究表明,活血化痰药有干扰血管生成因子的释放或阻断血管生成因子^[5];抑制内皮细胞的增殖^[6]等作用,从而达到抗肿瘤新血管生成的目的。刘明耀教授^[2]课题组发现 11-羧基-β-乙酰乳香酸可通过抑制肿瘤血管新生来抑制肿瘤的生长。传统医学认为气血瘀滞是肿瘤发病的基本病因,而乳香经醋炙后能够增强其活血化痰、行气的作用^[7],本研究证明炮制使 11-羧基-β-乙酰乳香酸含量升高,揭示乳香炮制增效的作用机制。

3.4 实验中各批样品的高效液相色谱图有一定差异,出峰数量多少不一,可能是因其产地和品种不同所致,因此,建立乳香高效液相指纹图谱区别不同产地和品种的乳香值得进一步研究。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:人民出版社, 1977:1379.

[2] Xiufeng Pang, Zhengfang Yi, Xiaoli Zhang, et al. Acetyl-11-keto-β-boswellic acid inhibits prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis [J]. Cancer Research, 2009, 69 (14):6484.

[3] 孔静,于海云,耿桂霞,等. HPLC 法测定乳香药材中 11-羧基-β-乙酰乳香酸的含量[J]. 齐鲁药事,2007,26 (7):403.

[4] 中国药典[S]. I 部,2005:附录 48.

[5] 乔丽娟,田艳伟. 苏木抗癌有效成分作用荷瘤小鼠 TS-GF 的观察[J]. 山西职工医学院学报,2001,11(2):5.

[6] 丁怡,赵庆亮,李勇刚,等. 雷公藤甲素对血管内皮细胞迁移活性的作用[J]. 四川大学学报:医学版,2005,36 (3):347.

[7] 叶定江. 中药炮制学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2004:156.

[责任编辑 顾雪竹]