

芸香浸膏的定性定量方法研究^{*}

吴萌, 饶伟文, 肖聪

(广西壮族自治区桂林食品药品检验所, 桂林 541000)

摘要 目的: 建立芸香浸膏的定性定量方法。方法: 采用薄层色谱法, 以正己烷-石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯-冰醋酸(6:2:3:0.1)为展开剂, 展开, 置紫外光灯(254 nm)下检视, 对枫香脂药材进行鉴别及对掺伪物松香进行检查; 采用高效液相色谱法测定肉桂酸含量, 使用 Synchronis C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-1% 醋酸溶液(50:50)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 285 nm, 柱温为 30℃。结果: 薄层色谱斑点清晰, 分离度好; 高效液相色谱法测定含量, 肉桂酸质量浓度在 1.66~41.52 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$) 范围内呈良好线性关系, 低、中、高浓度加样回收率分别为 97.1% (RSD=1.7%)、101.0% (RSD=0.9%) 和 96.9% (RSD=1.1%)。在对 12 个样品的检验中, 含量在 0.38%~14.09% 之间。结论: 本文所建立的方法可以作为芸香浸膏的质量控制方法。

关键词: 芸香浸膏; 乙醇提取物; 枫香脂; 松香; 松香酸; 肉桂酸; 药材鉴别; 掺伪物检查; 含量测定; 定性定量分析; 高效液相色谱法

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2017)03-0540-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.03.26

Study on qualitative and quantitative methods of Yunxiang extraction^{*}

WU Meng, RAO Wei-wen, XIAO Cong

(Guangxi Guilin Institute for Food and Drug Control, Guilin 541000, China)

Abstract Objective: To establish the qualitative and quantitative methods of Yunxiang extraction. **Methods:** TLC identification method was used. Hexane-petroleum ether (60~90℃)-ethyl acetate-glacial acetic acid (6:2:3:0.1) was employed as the developing agent, and the ultraviolet detection was carried out at 254 nm. TLC was applied to the identification of resina liquidambaris and the examination of rosin. HPLC was applied to the determination of cinnamic acid. The Synchronis C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) chromatographic column was used and the mobile phase consisted of methanol-1% acetic acid (50:50) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 285 nm and the column temperature was set at 30℃. **Results:** The spots of thin layer chromatography were clear with good resolution. The good linear range of cinnamic acid was 1.66~41.52 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$). The recovery of low, medium and high concentrations were 97.1% (RSD=1.7%), 101.0% (RSD=0.9%) and 96.9%

^{*} 广西壮族自治区食品药品监督管理局食品药品安全科研项目(桂食药监科评函[2015]20号3-11)

第一作者 Tel: (0773) 2267165-806; E-mail: glyjswm@foxmail.com

(RSD=1.1%)。The content range of cinnamic acid in 12 samples was 0.38%–14.09%. **Conclusions:** The method can be used as the quality control method of Yunxiang extraction.

Keywords: Yunxiang extraction; ethanol extract; resina liquidamberis; rosin; abietic acid; cinnamic acid; medicinal identification; adulteration detection; content determination; qualitative and quantitative analysis; HPLC

芸香浸膏为枫香脂的乙醇提取物,是伤湿止痛膏、伤湿止痛搽剂等中成药的原料之一。目前,全国约有 30 多家中成药生产企业使用芸香浸膏作为原料。由于枫香脂原料掺假现象严重^[1],导致芸香浸膏的质量参差不齐。至今为止芸香浸膏仍缺乏统一的药用标准,无法对其质量进行控制。本文采用薄层色谱法对芸香浸膏进行鉴别及对掺伪物松香进行检查,采用高效液相色谱法测定肉桂酸含量,为芸香浸膏的质量控制提供可靠的依据。

1 仪器与试剂

Waters 2695 型高效液相色谱仪、Waters 2998 紫外检测器、Waters Empower 色谱管理软件(Waters 公司);Synchronis C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm; 填料:十八烷基硅烷键合硅胶;Thermo 公司);AutoMatic TLC Sampler 4 型全自动薄层色谱点样仪(卡玛公司);高效硅胶 GF₂₅₄ 薄层预制板 HPTLC silica gel 60 F₂₅₄(Merck 公司);EV311 旋转蒸发仪(北京莱伯泰科仪器有限公司);XS205DU 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)、BUT2030-40-60 型超声

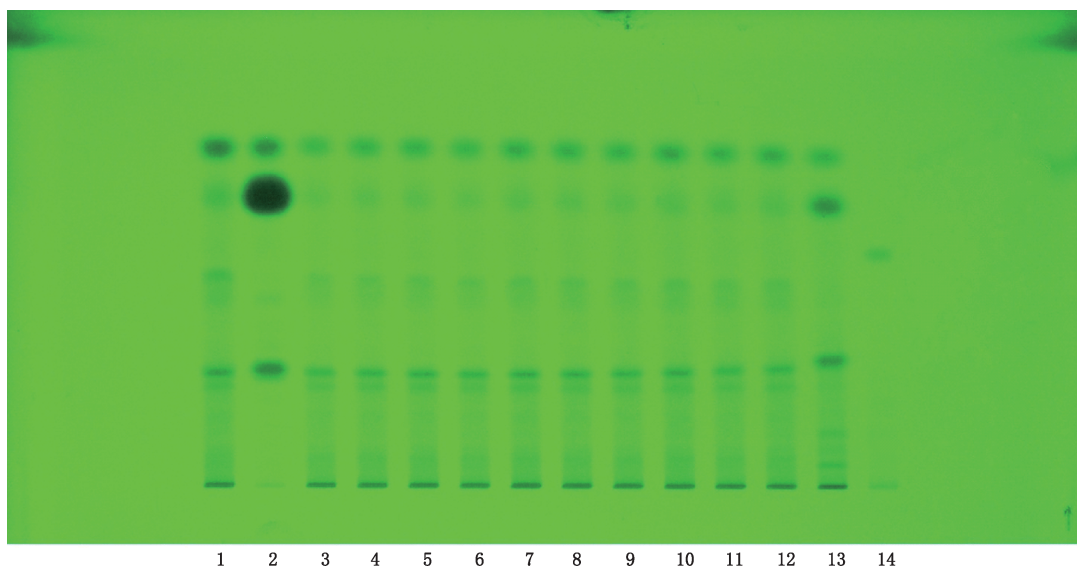
波清洗器(必能信超声上海有限公司)。

12 批芸香浸膏来源于福建、广西等地;枫香脂对照药材(批号 121637-201201)及松香酸对照品(批号 111938-201201)、肉桂酸对照品(批号 110786-200503)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、冰醋酸为色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 鉴别与检查

取样品 0.2 g,加乙醇 10 mL 溶解,即得供试品溶液;另取枫香脂对照药材 0.2 g,同法制成对照药材溶液。再取松香酸对照品适量,加乙醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,即得对照品溶液。照薄层色谱法(通则 0502)试验,吸取上述 3 种溶液各 2 μL,分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,以正己烷-石油醚(60~90 °C)-乙酸乙酯-冰醋酸(6:2:3:0.1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(254 nm)下检视。在样品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;在与对照品色谱相应的位置上,不得显相同颜色的斑点。见图 1。



1~12. 1~12 号芸香浸膏(Yunxiang extract samples 1~12) 13. 枫香脂(Resina Liquidambaris) 14. 松香酸(abietic acid)

图1 芸香浸膏 TLC 图

Fig. 1 TLC chromatogram of Yunxiang extract

2.2 含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备

取肉桂酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 8 μg 的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备

取样品约 0.25 g,精密称定,加新制的乙醇制氢氧化钾试液 ($0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 10 mL,加热回流 1 h,于 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴上减压蒸去乙醇,残渣加热水 20 mL 使均匀分散,放冷,加水 30 mL 与硫酸镁溶液 (1.5 $\rightarrow$ 50) 20 mL,混匀,静置 10 min,滤过,滤渣用水 20 mL 分次洗涤,合并滤液与洗液,加盐酸调 pH 为 1~2,用乙醚振摇提取 4 次 (40、40、20、20 mL),合并乙醚液,挥

干;残渣用甲醇溶解,转移至 50 mL 量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,精密量取 1 mL,置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 色谱条件与系统适用性试验

采用 Synchronis C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),以甲醇-1% 醋酸溶液 (50:50) 为流动相,流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 285 nm,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量 10 μL 。分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL ,在上述色谱条件下进样,色谱图见图 2。肉桂酸与其他成分色谱峰得到较好的分离,分离度大于 1.5,且峰形良好,肉桂酸峰理论塔板数均不低于 7 000。

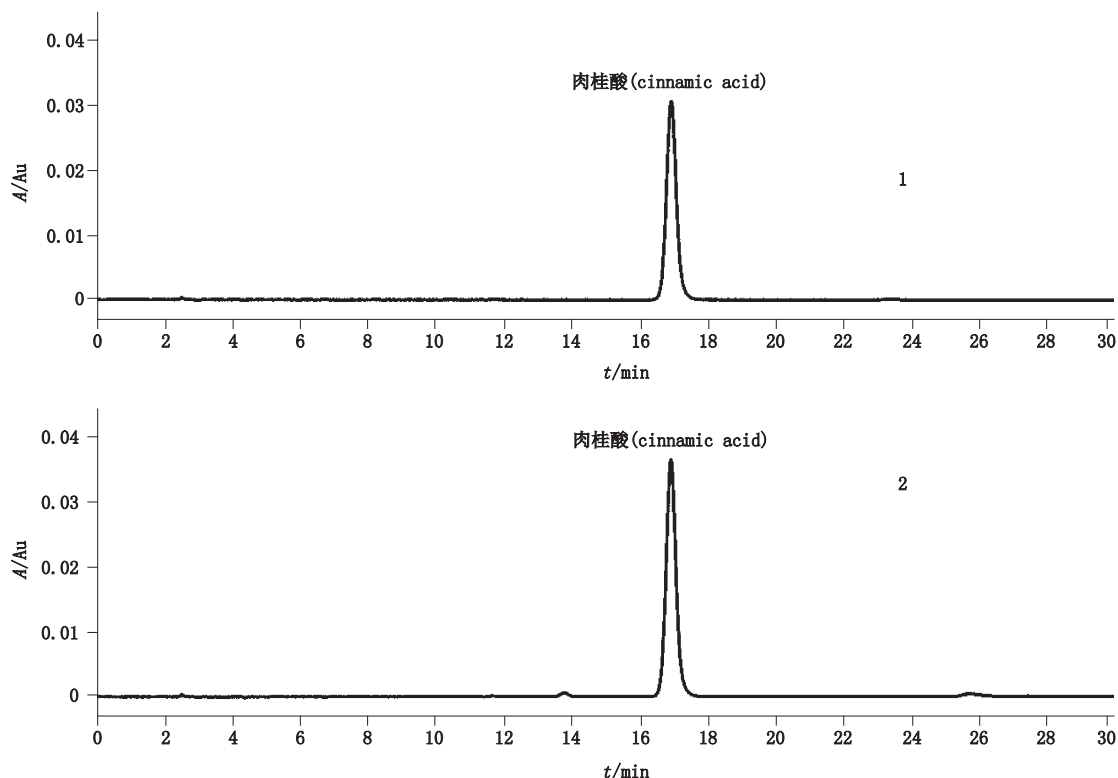


图 2 肉桂酸对照品 (1) 和样品 (2) HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of reference substance (1) and sample (2)

2.2.4 方法学验证

2.2.4.1 线性关系考察 取肉桂酸对照品适量,以甲醇制成质量浓度分别为 1.66、4.15、8.30、16.61、24.91、41.52 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液;精密吸取上述系列浓度对照品溶液各 10 μL ,分别按“2.2.3”项下色谱条件进样测定;以肉桂酸对照品浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程:

$$Y = 83\,120X - 48\,022 \quad r = 0.999\,9$$

结果表明肉桂酸质量浓度在 1.66~41.52 $\mu\text{g} \cdot$

mL^{-1} 范围内与峰面积呈良好线性关系。

2.2.4.2 检出限与定量限测定 取对照品溶液逐级稀释,按照“2.2.3”项下色谱条件进样测定;以肉桂酸计,信噪比 $S/N=3$ 时相应的浓度确定检测限 (LOD),以信噪比 $S/N=10$ 时相应的浓度确定定量限 (LOQ)。在本色谱条件下,LOD 为 16.61 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,LOQ 为 49.82 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.4.3 精密度试验 取“2.2.1”项下对照品溶液 10 μL ,连续进样 6 次,肉桂酸峰面积的 RSD 为 0.2%。

表明仪器精密度良好。

2.2.4.4 稳定性试验 取同一批供试品溶液(样品批号 2011410001), 分别于 0、1、4、8、12、20 h 各取 10 μL 进样, 测定峰面积。肉桂酸峰面积的 RSD 为 0.1%。结果表明, 供试品溶液在 20 h 内稳定性良好。

2.2.4.5 重复性试验 取同一批号样品(批号 2011410001) 6 份, 分别按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液, 进样测定, 结果样品中肉桂酸平均含量($n=6$) 为 14.90%, RSD 为 2.6%, 表明方法的重复性良好。

2.2.4.6 加样回收试验 精密称取已知含量的样品(批号 2011410001, 含量为 14.90%) 适量, 共 9 份, 分别精密加入对照品适量, 按“2.2.2”项下方法制成供试溶液, 进样测定, 计算回收率。结果见表 1。

表 1 回收率结果

Tab. 1 The results of recovery test

序号 (No.)	样品中含 量 (sample content) / mg	测得总量 (detected amount) / mg	对照品加入 量 (added amount) / mg	回收率 (recovery) /%	平均回 收率 (average recovery) /%	RSD/ %
1	18.504 2	34.451 4	16.24	98.2	97.1	1.7
2	18.519 2	34.271 4	16.53	95.3		
3	18.653 2	34.742 0	16.45	97.8		
4	18.712 8	39.389 8	20.61	100.3	101.0	0.9
5	18.742 6	39.934 7	20.77	102.0		
6	18.832 0	39.465 3	20.50	100.7		
7	18.638 3	41.907 9	24.30	95.8	96.9	1.1
8	18.742 6	42.546 2	24.36	97.7		
9	18.623 4	42.297 2	24.34	97.4		

2.2.5 样品测定

取不同来源的 12 批样品的供试品溶液, 按照“2.2.3”项下色谱条件进样测定, 以外标法计算含量, 结果见表 2。

3 讨论

伤湿止痛膏、伤湿止痛搽剂为常用中成药已收载于中国药典 2015 年版, 其中芸香浸膏为主要原料之一。但至今为止, 芸香浸膏仍无专用药用标准。只有轻工部推荐标准^[2]及按摩软膏(按摩乳)附芸香浸膏

表 2 含量测定结果

Tab. 2 Results of determination

样品号 (sample No.)	产地 (collection habitat)	批号 (lot No.)	肉桂酸含量 (content of cinnamic acid) /%
1	福建 (Fujian)	2011501001	1.47
2	广西 (Guangxi)	2011410001	14.90
3	福建 (Fujian)	2011403001	0.38
4	福建 (Fujian)	2011403002	0.76
5	福建 (Fujian)	2011404001	0.65
6	福建 (Fujian)	2011405002	0.71
7	福建 (Fujian)	2011406001	0.68
8	福建 (Fujian)	2011408001	0.71
9	福建 (Fujian)	2011408002	0.68
10	福建 (Fujian)	2011409001	0.63
11	福建 (Fujian)	2011410002	0.68
12	福建 (Fujian)	2011411002	0.67

质量标准^{[3]1168}, 其质控项目有色状、溶解度、含膏量、折光率几个物理性指标, 对其内在质量无法控制。因此, 制定鉴别、含量测定方法很有必要。

因枫香脂来源较紧缺, 市场上常出现用松脂、松香掺假。为了防止假劣枫香脂被用于生产芸香浸膏, 故增加松香酸的 TLC 检查。为了简化操作, 采用 TLC 鉴别相同的层析条件, 经方法学考察, 效果良好。试验结果表明, 在薄层色谱中, 对照药材与正品枫香脂均无松香酸的对应斑点, 而掺伪品呈现与松香酸对照品相同的斑点。并曾进行过松香酸检出限试验: 取样品(批号 2011410001) 0.2 g, 分别加入质量浓度分别为 10、20、40、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 松香酸对照品溶液各 10 mL 使溶解, 按“2.1”展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (254 nm) 下检视。当加入的对照品质量浓度小于 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, TLC 未检出, 松香酸的检出限为 100 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

枫香脂与苏合香^{[3]164}来源于金缕梅科同属植物的树脂, 含有肉桂酸及其脂类、挥发油等成分, 药理作用类似^[4-12], 参考中国药典 2015 年版苏合香的检测方法, 建立含量测定方法。经方法学验证, 表明本文方法灵敏, 精密度高, 重现性好, 结果准确, 可作为芸香浸膏的质量控制方法。

采用传统采集法得到的枫香脂是固态树脂, 而目前多采用割采法得到液态树脂^[13-15]。用液态枫香脂直接生产的芸香浸膏肉桂酸含量特别高(见表 2 中的 2 号样品)。因此, 对芸香浸膏的原料质量控制、肉

桂酸的含量指标准确以及稳定性还有必要做进一步研究。

参考文献

- [1] 杨兵云, 杨天冲. 掺伪枫香脂的鉴别[J]. 中药材, 1994, 17(5): 23
YANG BY, YANG CT. Identification of adulterated buple balsam [J]. J Chin Med Mater, 1994, 17(5): 23
- [2] QB/T4427-2012 芸香浸膏(枫香树脂提取物)[S]. 2012
QB/T4427-2012 Beautiful Sweet gum Concrete[S]. 2012
- [3] 中国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 1168, 164
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 1168, 164
- [4] 李蓓, 郭济贤. 枫香脂和苏合香的心血管药理学研究[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 11(5): 72
LIBEI, GUO JX. Pharmacological effects of resina liquidambaris and styrax on cardiovascular system [J]. Nat Prod Res Dev, 1999, 11(5): 72
- [5] 李蓓, 郭济贤. 枫香树脂二种香树脂类生药——苏合香与枫香脂的研究概况[J]. 天然产物研究与开发, 1995, 7(3): 53
LI B, GUO JX. Research progress on two pharmaceutical resins from the genus Liquidambar—Storax and Resina Liquidambaris [J]. Nat Prod Res Dev, 1995, 7(3): 53
- [6] 刘虹, 沈美英, 何正洪. 枫香树脂化学成分的研究[J]. 林产化学与工业, 1995, 15(3): 61
LIU H, SHEN MY, HE ZH. Study on the chemical constituents in liquidambar balsam [J]. Chem Ind Forest Prod, 1995, 15(3): 61
- [7] 程再兴, 陈卫林, 陈锡铨, 等. 枫香脂挥发油及乙酸乙酯部位对小鼠血管活性因子的影响[J]. 中国医药导报, 2011, 8(34): 37
CHENG ZX, CHEN WL, CHEN XC, *et al.* Effect of essential oil and ethyl acetate extract of resina liquidambaris on vascular active factor of normal mice [J]. China Med Her, 2011, 8(34): 37
- [8] 朱亮, 郭济贤. 枫香脂及其挥发油的抗血栓作用[J]. 中草药, 1991, 22(9): 404
ZHU L, GUO JX. The volatile oil of Liquidambar and its anti-thrombotic effect [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 1991, 22(9): 404
- [9] 宋晓, 曾韬. 枫香精油的化学组成[J]. 林产化学与工业, 2010, 30(5): 40
SONG X, ZENG T. Analysis on chemical components of essential oil of Chinese sweet gum Resin [J]. Chem Ind Forest Prod, 2010, 30(5): 40
- [10] 李建明, 王政, 陈川, 等. 枫香脂挥发油对大鼠离体胸主动脉的舒张作用[J]. 中成药, 2015, 37(8): 1659
LI JM, WANG Z, CHEN C, *et al.* Vasodilatory effect of liquidambaris resina volatile oil on rats aorta *in vitro* [J]. Chin Tradit Pat Med, 2015, 37(8): 1659
- [11] 丁洁, 张莹, 巫悦, 等. 麝香、安息香和苏合香对血脑屏障脑区特异性开放作用及其机制[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(4): 279
DING J, ZHANG Y, WU Y, *et al.* Study on specific opening effects and mechanism of musk, benzoin and styrax on blood-brain barrier brain [J]. Chin Hosp Pharm J, 2015, 35(4): 279
- [12] 赵培, 岳少乾, 马妍, 等. 苏合香对脑微血管内皮细胞氧糖剥夺/复氧损伤的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(9): 847
ZHAO P, YUE SQ, MA Y, *et al.* Effects of storax on the injury of brain microvascular endothelial cells induced by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2016, 32(9): 847
- [13] 李建明, 宋清宏, 耿洪亚等. 阴干对枫香脂中挥发油成分的影响[J]. 中成药, 2014, 36(4): 813
LI JM, SONG QH, GENG HY, *et al.* Effects of dry-in-the-shade on volatile oil contents of Liquidambaris Resina [J]. Chin Tradit Pat Med, 2014, 36(4): 813
- [14] 曾韬, 宋晓, 曾诚. 枫香采脂试验研究[J]. 林业科技开发, 2010, 24(1): 84
ZENG T, SONG X, ZENG C. Study on the methods of the tapping from Chinese Sweet Gum [J]. Chin Forest Sci Technol, 2010, 24(1): 84
- [15] 周根大, 陈友地. 枫香脂提取芸香浸膏的工艺[J]. 林产化工通讯, 1994, 28(1): 14
ZHOU GD, CHEN YD. Extraction process of Yunxiang extracting from Liquidambar [J]. J Chem Ind Forest Prod, 1994, 28(1): 14

(本文于 2016 年 4 月 8 日收到)