

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

费毅琴¹, 孙磊^{2*}, 程显隆², 金红宇² (1. 湖北省食品药品监督检验研究院, 武汉 430064; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: 目的 建立薄层色谱法鉴别乳香中乳香酸类成分。方法 样品经甲醇超声提取, C₁₈ 固相萃取柱净化后, 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(254 nm) 下检视, 再喷以10% 硫酸乙醇溶液, 并于105 °C 加热至条斑清晰, 置紫外灯(365 nm) 下检视。条斑借助 QToFMS 进行成分识别。结果 紫外灯(254 nm) 下, 埃塞俄比亚乳香和索马里乳香的色谱图可见2个明显的暗条斑, 紫外灯(365 nm) 下, 均可见8个荧光条斑, 其特征图谱与其他常见树脂类药材(洋乳香、天然没药、胶质没药、安息香、松香和达玛树脂) 区别明显。结论 该法简便、专属、准确, 适用于乳香的快速鉴别和质量控制。

关键词: 高效薄层色谱; 四级杆飞行时间串联质谱; 乳香属; 乳香; 乳香酸; 指纹图谱

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)20-1601-04

Study on the Identification of Boswellic Acids in Olibanum by High-Performance Thin Layer Chromatography with Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry

FEI Yi-qin¹, SUN Lei^{2*}, CHENG Xian-long², JIN Hong-yu² (1. Hubei Institute for Food and Drug Control, Wuhan 430064, China; 2. National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for identification of boswellic acids in olibanum by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC). **METHODS** The samples were extracted by ultrasonic processing with menthol, and purified with C₁₈ solid-phase extraction cartridge. 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. The ultraviolet detection was first carried out at 254 nm, then at 365 nm after derivatization with 10% sulfuric acid alcoholic solution. The compounds were identified by QToFMS. **RESULTS** Two quenching bands presented in the chromatograms of Ethiopian olibanum and Somalian olibanum under ultraviolet light at 254 nm. Eight bands presented under ultraviolet light at 365 nm. There were notable differences between olibanum and other resins (mastic, myrrh, opopanax, benzoin, colophony and dammar resin) in the HPTLC chromatograms. **CONCLUSION** The method is simple, specific and accurate, and can be used for rapid determination and quality control of olibanum.

KEY WORDS: high-performance thin layer chromatography (HPTLC); quadrupole time of flight mass spectrometry (QToFMS); *Boswellia*; olibanum (frankincense); boswellic acids; fingerprint

乳香为常用进口药材, 我国习用乳香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.], 印度习用乳香的原植物为齿叶乳香树(*B. serrata* Roxb.)^[1]。乳香酸(BAs)是乳香活血定痛、消肿生肌功效的有效成分^[2-3], 主要包括 α -乳香酸(α -BA)、 β -乳香酸(β -BA)、3-乙酰- α -乳香酸(α -ABA)、3-乙酰- β -乳香酸(β -ABA)、11-羧基- β -乳香酸(KBA)和11-羧基- β -乙酰乳香酸(AKBA)。笔者已采用高效液相色谱法对不同基原、产地乳香生品及制品中AKBA的含量进行了测定^[4], 再行建立其中BAs的薄层色谱

鉴别项对乳香及其制剂质量标准的完善具有重要意义。国外已有相关研究, Krohn等^[5]建立的HPTLC法条斑过于集中, 分离度不佳; Pozharitskaya等^[6]报道的经典HPTLC法存在AKBA与BA条斑重合的问题, 改进后的方法能有效分离各成分但需要使用自动梯度展开仪, 不够简便、实用; 现版《欧洲药典》的方法^[7]仅能检视AKBA和KBA 2种成分。国内标准和文献均无针对乳香中BAs的薄层色谱鉴别方法。本实验在参考上述文献^[5-7]的基础上, 建立了新的前处理方法, 优选了展开条件, 更换了显色剂, 借助QToFMS对条斑成分进行识别, 并对12批乳香和其他树

基金项目: 《中国药典》2010年版任务(YZ-215, YZ-216); “十一五”国家科技支撑计划项目(2006038086061-7)

作者简介: 费毅琴, 女, 中药师 研究方向: 中药检验与质量标准研究 * 通讯作者: 孙磊, 男, 助理研究员 研究方向: 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

脂类药材进行了考察,实验结果为乳香及其制剂质量标准的增、修订提供了依据和参考。

1 仪器与试药

Linomat5 半自动点样仪、Digistore2 数码成像系统(瑞士 Camag); Acquity UPLC/Xevo QTofMS(美国 Waters)。AKBA 对照品(111760-200601)、乳香(埃塞俄比亚乳香,120970-200604)、安息香(1186-200101)、天然没药(120967-200903)和胶质没药(121250-200503)对照药材(中国食品药品检定研究院);乙腈为色谱纯,甲醇、二氯甲烷、石油醚(30~60℃、60~90℃)、乙酸乙酯、盐酸、甲苯、无水甲酸、庚烷、氢氧化钾均为分析纯;水(Milli-Q 系统制备);C₁₈ 固相萃取柱(Supeleclean LC-18 SPE Tubes 6mL);Silica gel 60F₂₅₄ 高效薄层板(德国 Merck),Silica gel 60F₂₅₄ 薄层板(青岛海洋化工厂分厂);乳香、洋乳香、松香和达玛树脂样品信息见表 1。

2 方法

2.1 对照品溶液

取 AKBA 对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液,即得。

2.2 薄层色谱供试品溶液

制法 1: 取供试品粉末 0.2 g,加甲醇 20 mL,超声处理 10 min,滤过,即得。

制法 2: 取供试品粉末 0.2 g,加甲醇 20 mL,超声处理 10 min,滤过,取滤液 2 mL 加入已处理好的固相萃取柱上,收集流出液,即得。

制法 3: 取供试品粉末 0.2 g,加甲醇 20 mL,超声处理 10 min,滤过,取滤液 2 mL 蒸干,残渣加 2% 氢氧化钾溶液 5 mL 使溶解,用乙酸乙酯提取 3 次,

每次 5 mL,弃去乙酸乙酯液,用 2% 盐酸溶液调节 pH 值至 3~4,再用乙酸乙酯提取 2 次,每次 5 mL,合并乙酸乙酯液,浓缩至 1 mL,即得。

2.3 薄层色谱条件

吸取对照溶液和供试品溶液各 20 μL,以条带状方式点样于同一硅胶 GF₂₅₄ 高效薄层板或普通薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-庚烷-无水甲酸(8:2:1:0.3)为展开剂,展开,取出,晾干。先置紫外灯(254 nm)下检视;喷以 10% 硫酸乙醇溶液,在 105℃ 加热至条斑显色清晰,再置紫外灯(365 nm)下检视。

2.4 UPLC/QTofMS 供试品溶液

取已展开的高效薄层板,沿展开方向剪开,少部分经 10% 硫酸乙醇显色后置紫外灯(365 nm)下检视对条斑定位,未显色部分按定位结果刮取对应条斑,加 2 mL 甲醇超声提取 5 min,提取液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.5 UPLC/QTofMS 条件

Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱(2.1 mm×50 mm,1.7 μm);流动相为乙腈-水(97:3);流速 0.3 mL·min⁻¹;柱温 30℃;进样量 3 μL。ESI⁻ 模式;毛细管电压 3.0 kV;锥孔电压 30 V;离子源温度 120℃;脱溶剂温度 350℃;脱溶剂气流量 600 L·h⁻¹;锥孔气流量 50 L·h⁻¹;质量范围 *m/z* 100~700。

3 结果

3.1 借助 QTofMS 对 HPTLC 色谱中条斑成分的识别

BAs 属五环三萜类酸性成分,乳香中的三萜酸还包括 tirucallic acids,这类成分没有糖类基团,极性很小,故采用酸碱调 pH 值、低极性溶剂复合萃取法

表 1 乳香、洋乳香、松香及达玛树脂样品

Tab. 1 Information of olibanum, mastic, colophony and dammar resin

No.	Sample	Source	Lot No.	Original plant
1	Olibanum	Ethiopia	20070396	<i>B. papyrifera</i> (Del.) Hochst.
2	Olibanum	Ethiopia	20071530	<i>B. papyrifera</i> (Del.) Hochst.
3	Olibanum	Ethiopia	20072176	<i>B. papyrifera</i> (Del.) Hochst.
4	Olibanum	Ethiopia	20071374	<i>B. papyrifera</i> (Del.) Hochst.
5	Olibanum	Ethiopia	080829	<i>B. papyrifera</i> (Del.) Hochst.
6	Olibanum / processed	Ethiopia	080829 / processed	<i>B. papyrifera</i> (Del.) Hochst.
7	Olibanum	Sudan	046	<i>B. papyrifera</i> (Del.) Hochst.
8	Olibanum	Sudan	HDHH	<i>B. papyrifera</i> (Del.) Hochst.
9	Olibanum	Sudan	1104	<i>B. papyrifera</i> (Del.) Hochst.
10	Olibanum	Somalia	030	<i>B. sacra</i> Flück.
11	Olibanum	Somalia	032	<i>B. sacra</i> Flück.
12	Mastic	Turkey		<i>Pistacia lentiscus</i> L.
13	Colophony	China		<i>Pinus massoniana</i> Lamb.
14	Dammar resin	Indonesia		<i>Canarium strictum</i> Roxb.

可以有效富集和纯化。富集后的三萜酸经 HPTLC 分离,借助对照品或质谱进行识别。考虑到萃取法步骤(制法 3)繁琐,又优化了固相萃取方式(制法 2)对比实验表明两法效果(斑点数量、分布和颜色)基本一致,因此最终采用制法 2 制备供试品溶液。

紫外灯(254 nm)下供试品色谱中可见与 AKBA 对照品一致的暗条斑(band4, R_f 0.42); QToFMS 给出 $[M-H]^-$ 的精确质量数为 511.342 3,再综合同位素匹配(i-FT)等因素,最可能分子式为 $C_{32}H_{47}O_5$,对应 AKBA($C_{32}H_{48}O_5$)。AKBA 下方另有一暗条斑(band7, R_f 0.30),其 $[M-H]^-$ 的精确质量数为 469.325 2,最可能的分子式为 $C_{30}H_{45}O_4$,对应 KBA($C_{30}H_{46}O_4$),见图 1。

显色后置紫外灯(365 nm)下检视,供试品色谱中呈现 8 个主要的荧光条斑,此时 AKBA 和 KBA 均显黄绿色。band5(砖红色至紫红色, R_f 0.38)的供试液经 UPLC 分离为两个色谱峰,两者 $[M-H]^-$ 的精确质量数均为 455.360 4,最可能的分子式为 $C_{30}H_{47}O_3$,对应 α -BA 和 β -BA($C_{30}H_{48}O_3$)。band2(蓝白色, R_f 0.54)和 band1(淡黄棕色至淡棕色, R_f 0.59)的 $[M-H]^-$ 的精确质量数分别为 497.363 5 和 497.361 4,最可能分子式均为 $C_{32}H_{49}O_4$ 。其中 band2 的供试液经 UPLC 分离为两个色谱峰,band1 为 1 个色谱峰,则 band2 对应 α -ABA 和 β -ABA,band1 推测可能为 3-Acetyl-8,24-diene-tirucallic acid(ATA),见图 2。

3.2 专属性

各树脂类药材照制法 2 制备供试品溶液,用高效薄层板展开。结果表明,不同树脂在两种检视条件下均显示了特征的 HPTLC 指纹图谱,见图 3:紫外灯(254 nm)下,松香和安息香色谱中均有 6 个以

上明显暗条斑,乳香有 AKBA 和 KBA 两个明显暗条斑,其余药材暗条斑少且不明显;显色后置紫外灯(365 nm)下检视,各供试品色谱差异更明显。此外,使用普通薄层板也能将各类树脂区分,但分离度稍差。

3.3 重复性

供试品溶液采用制法 2 制备。在温度为 18 ~ 19 °C,相对湿度为 28% ~ 32% 的条件下,使用高效薄层板展开 5 次,以确定该条件下各条斑 R_f 值和颜色,结果见表 2。通过积累的数据,借助乳香对照药材即可进行全面、专属的定性鉴别,减少了价格昂贵的多个 BAs 对照品的使用。

3.4 不同产地、基原的乳香及制乳香的 BAs 特征图谱

取 11 批乳香样品及对照药材,照制法 2 制备供试品溶液,使用高效薄层板展开,结果见图 4,图中 1 ~ 11 的序号与表 1 序号一一对应,12 为 AKBA 对

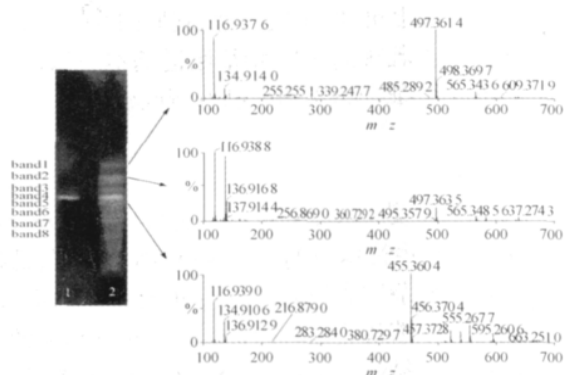


图 2 乳香中乳香酸类成分的 HPTLC 色谱图(365 nm)及对应条斑的 QToFMS 质谱图

1-11-羧基- β -乙酰乳香酸; 2-乳香

Fig. 2 HPTLC Chromatogram (365 nm) and QToFMS spectra of boswellic acids in olibanum

1 - AKBA; 2 - olibanum

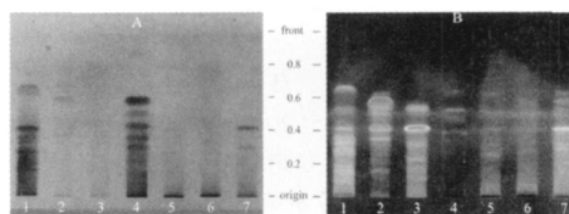


图 3 常见树脂类中药的 HPTLC 色谱图

A-紫外灯 254 nm; B-紫外灯 365 nm; 1-松香; 2-洋乳香; 3-达玛树脂; 4-安息香; 5-胶质没药; 6-天然没药; 7-乳香

Fig. 3 HPTLC Chromatograms of different resins

A-254 nm; B-365 nm; 1 - colophony; 2 - mastic; 3 - dammar resin; 4 - benzoin; 5 - opopanax; 6 - myrrh; 7 - olibanum

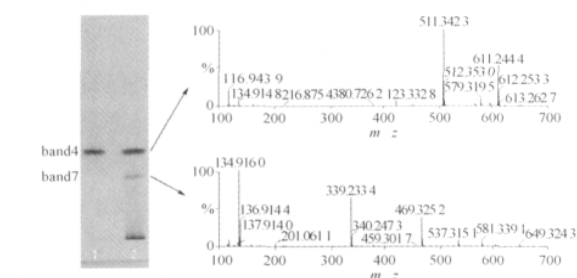


图 1 乳香中乳香酸类成分的 HPTLC 色谱图(254 nm)及对应条斑的 QToFMS 质谱图

1-11-羧基- β -乙酰乳香酸; 2-乳香

Fig. 1 HPTLC Chromatogram (254 nm) and QToFMS spectra of boswellic acids in olibanum

1 - AKBA; 2 - olibanum

表2 条斑颜色和 Rf 值

Tab. 2 Colors and Rf values of the bands in HPTLC chromatograms

Band No.	Compound	Color	Range Rf value	Mean Rf value	RSD/% (n=5)
1	ATA	Light brown	0.57-0.62	0.59	4.05
2	α -ABA and β -ABA	Bluish white	0.50-0.57	0.54	6.13
3	uncertain	Light brown	0.45-0.51	0.47	5.06
4	AKBA	Yellow green	0.40-0.44	0.42	3.55
5	α -BA and β -BA	Purple red	0.36-0.40	0.38	3.95
6	Uncertain	Purple red	0.31-0.34	0.32	4.05
7	KBA	Yellow green	0.28-0.31	0.30	4.38
8	uncertain	Light blue	0.19-0.21	0.20	3.54

照品,13 为乳香对照药材。由图 4 可见,紫外灯(254 nm)下,12 批乳香均可见 AKBA 和 KBA 的暗条斑;显色后置紫外灯(365 nm)下检视,均可见表 2 中所列 8 个条斑,其中有些样品的个别条斑不甚明显。再对比样品 5、6 的色谱图可知,乳香炮制后 BAs 有较大变化:条斑 2 明显增强,条斑 4 轻微减弱,其余 6 个条斑均明显暗淡,提示多数 BAs 可能受热降解。综上可知,不同产地、基原的埃塞俄比亚乳香和索马里乳香的 BAs 特征图谱基本一致,而制乳香的 BAs 特征图谱则与生品有所区别。

4 讨论

比较了甲醇、二氯甲烷、石油醚(30~60℃、60~90℃)超声提取液的薄层色谱,结果表明,低极性溶剂提取的杂质有所减少但效果改善不明显,因此需对供试品溶液进行净化,以分辨不同 BAs 的条斑;据文献^[4-6]结论,甲醇对 BAs 的提取效率最高,因此选择甲醇为提取溶剂。制法 2(固相萃取法)比制法 3(酸碱萃取法)除杂明显且效果相当,因制法 3 操作繁琐,未予采用。考察固相萃取参数时,曾用体积分数 70% 甲醇作为提取溶剂并直接上样,先以 70% 甲醇洗脱杂质,再用甲醇洗脱,甲醇洗脱液作供试品溶液,该法除杂效果与法 2 基本一致,因操作相对复杂也未采用。

对 3 种展开系统^[5-7]环己烷-丙酮(7:3)、正己烷-乙酸乙酯-冰醋酸(85:20:5)、甲苯-乙酸乙酯-庚烷-无水甲酸(8:2:1:0.3)进行了比较,结果表明,正文选择的展开系统下各条斑的分离度更好,条斑分布更均匀,Rf 值也适中。薄层板未经显色置紫外灯(254 nm)下,仅有 AKBA 和 KBA 暗条斑可见,在紫外灯(365 nm)和可见光下均无斑点;经 10% 硫酸乙醇显色后在紫外灯(365 nm)下检视,可见数个色彩分明的条斑,优于可见光下的检视效果。还曾用

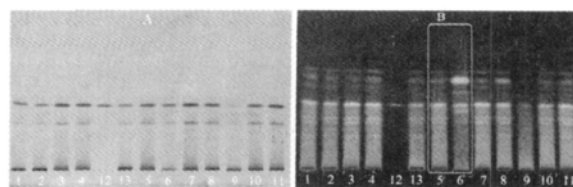


图4 埃塞俄比亚乳香和索马里乳香的 HPTLC 色谱图

A - 紫外灯 254 nm; B - 紫外灯 365 nm

Fig. 4 HPTLC Chromatograms of Ethiopian olibanum and Somali olibanum

A - 254 nm; B - 365 nm

5% 香草醛硫酸显色,结果表明,仅在可见光下有明显条斑,且条斑数目偏少,仅 2、5 明显可见。

BAs 为酸性成分,不容易结合质子,还易产生钠、钾加合离子,导致在 ESI⁺ 模式下 $[M+H]^+$ 峰的信号强度偏低,故采用了正文的 ESI⁻ 模式,提高了灵敏度并简化了质谱图。

当进行快速鉴别时,采用制法 1 处理样品,使用普通薄层板分离并在紫外灯(254 nm)下检视即可;若需对乳香有效成分进行全面地表征,则应采用制法 2 制备供试品溶液,使用高效薄层板分离经显色后在紫外灯(365 nm)下检视。

薄层色谱鉴别用参照物有对照品和对照药材,其中对照品成分明确和易于判定,但难以表征样品的整体化学组成,还存在价格昂贵和有时难以获得的问题;对照药材的特点则与之相反。本实验把质谱技术运用到薄层色谱鉴别中,将对照品和对照药材优势有机结合,拓展了薄层色谱鉴别的研究思路。

REFERENCES

- [1] SUN L, XU J M, JIN H Y, et al. Herbalism, botany and components analysis study on original plants of frankincense [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志) 2011, 36(2): 112-116.
- [2] CUI R, ZHOU J Y. Research advances on chemical constituents and pharmacological action of olibanum [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志) 2003, 38(6): 407-410.
- [3] MOUSSAIEFF A, MECHOULAM R. Boswellia resin: from religious ceremonies to medical uses; a review of *in-vitro*, *in-vivo* and clinical trials [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2009, 61(10): 1281-1293.
- [4] SUN L, LIU L N, JIN H Y, et al. Determination of frankincense and processed frankincense [J]. *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2010, 24(10): 972-974.
- [5] KROHN K, RAO M S, RAMAN N V, et al. High-performance thin layer chromatographic analysis of anti-inflammatory triterpenoids from *Boswellia serrata* Roxb [J]. *Phytochem Anal*, 2001, 12(6): 374-376.
- [6] 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): 2245-2250.
- [7] EP7. 0[S]. 2010: 1152-1153. (收稿日期: 2010-10-17)