

· 化学与分析 ·

## 安息香中苯甲酸松柏酯的分离鉴定及药效考察

胡攀, 夏厚林\*, 李瑞煜, 文冰杰, 杨孟妮, 张慧

(成都中医药大学 中药材标准化教育部重点实验室, 成都 611137)

[摘要] 目的:从安息香药材中分离香脂酸类成分,并进行鉴定和初步的药效研究。方法:安息香药材采用 95% 乙醇提取,柱色谱方法结合制备型 HPLC 纯化,氢谱、碳谱及文献鉴定分离的化合物,对分离的化合物进行药效学研究。结果:从安息香药材中分离得到的成分鉴定为苯甲酸松柏酯;药效实验表明其与安息香药材有着相似功效,均能显著增加正常小鼠脑内依文思蓝含量及对 *D*-氨基半乳糖敏化小鼠内毒素致死性攻击有一定的保护作用。结论:苯甲酸松柏酯为安息香中重要的总香脂酸酯类成分,与安息香生药药效有着显著相关性。

[关键词] 苯甲酸松柏酯; 安息香; 总香脂酸; 总香脂酸酯; 血脑屏障; 内毒素

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2016)13-0055-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016130055

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160512.1555.004.html>

[网络出版时间] 2016-05-12 15:55

### Isolation, Identification and Efficacy of Coniferyl Benzoate from Benzoin

HU Pan, XIA Hou-lin\*, LI Rui-yu, WEN Bing-jie, YANG Meng-ni, ZHANG Hui

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization for Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To isolate balsamic acid esters from benzoin, identify the structures and preliminarily study their efficacy. **Method:** Benzoin was extracted by 95% ethanol, further separated and purified by column chromatography; the isolated compounds were identified by  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  data. The efficacy of these isolated compounds was studied. **Result:** Isolated compound from benzoin was identified as coniferyl benzoate. Pharmacological experiments showed that the coniferyl benzoate and benzoin group exhibited similar effects, both of which significantly increased Evans blue content in the brains of normal mice and exhibited protective effect on endotoxin fatal attack in *D*-galactosamine-sensitized mice. **Conclusion:** Coniferyl benzoate is an important component in total balsamic acid esters of benzoin and has significant correlation with efficacy of crude benzoin.

[Key words] coniferyl benzoate; benzoin; total balsamic acids; total balsamic acid esters; blood-brain barrier; endotoxin

安息香为芳香开窍药,具有开窍醒神、行气活血、止痛之功,用于中风痰厥、气郁暴厥、中恶昏迷、心腹疼痛、产后血晕、小儿惊风等<sup>[1]</sup>。安息香药用历史悠

久,国内外药典均有收载。以其为君、臣药的历代名方如安息香丸、苏合香丸、至宝丹等均对心脑血管疾病、温病感染引起急危重症有着良好的疗效。现代药

[收稿日期] 20150707(004)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2007CB512606)

[第一作者] 胡攀, 硕士, 从事中药质量标准及物质基础研究工作, Tel:18224427340, E-mail:hupanmail@foxmail.com

[通讯作者] \*夏厚林, 教授, 从事中药质量标准及物质基础研究工作, Tel:13568899011, E-mail:xhl64@163.com

理研究表明,安息香有着抗炎解热<sup>[2]</sup>、脑缺血缺氧保护、促进血脑屏障通透性<sup>[3-4]</sup>、抗肿瘤<sup>[5]</sup>等作用。

安息香主要含有香脂酸类<sup>[6-7]</sup>、萜类<sup>[8]</sup>、黄酮类<sup>[9]</sup>、生物碱类、甾体及油脂<sup>[10-12]</sup>等几大类成分。其中香脂酸类成分主要为苯甲酸、香草醛、苯甲酸苄酯、苯甲酸松柏酯等,该类成分为安息香药材质量控制的主要指标,如 2005 年版《中国药典》采用质量法测定安息香中总香脂酸含量,2010 年版采用 HPLC 法测定药材水解后苯甲酸含量,《欧洲药典》(第 7 版)及 2010 年版《印度药典》采用滴定法测定总香脂酸含量。

据文献报道苯甲酸松柏酯在安息香中含量较高<sup>[13]</sup>,课题组前期试验表明其可达 10% 以上,且主要位于具有芳香开窍作用的乙醚部位<sup>[14]</sup>中。目前有关安息香中苯甲酸松柏酯的提取、纯化及其药理研究国内外文献均未见详细报道,为了深入开展安息香药材药效物质基础研究及提高质量控制方法,本文开展了以苯甲酸松柏酯为目标化合物的提取纯化及相关药效研究。

## 1 材料

**1.1 试剂** 薄层柱色谱硅胶(青岛海洋化工厂)。甲醇、乙腈色谱纯,磷酸优级纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

**1.2 试药** 依文思蓝(EB,批号 E2129),*D*-氨基半乳糖(*D*-GalN,批号 D0500)及内毒素(Lipopoly saccharide,LPS,批号 L2880)均购于 Sigma 公司。

安息香药材购于四川科伦药业(批号 141201),经成都中医药大学卢先明教授鉴定为安息香科白花树 *Styrax tonkinensis* 的干燥树脂,参照 2010 年版《中国药典》检查,各项指标合格。

苯甲酸松柏酯及安息香药材给药液:取苯甲酸松柏酯及安息香药材粉末(药材粉末过 5 号筛),适量,加入 0.2% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na),充分混匀,缓慢加入 5% 聚山梨酯 80,研磨均匀,分次加入适量温水,充分研磨,使其均匀分散后转移至干燥洁净的棕色广口瓶中,4 ℃ 保存待用。以相应溶剂作为空白对照组。苯甲酸松柏酯给药剂量以安息香药材中苯甲酸松柏酯含量进行对应折算。

**1.3 动物** 昆明种雄性小鼠,体重 18 ~ 22 g,由成都达硕生物科技有限公司提供,合格证号 SCXK(川)2013-0024。

**1.4 仪器** SSI Series 1500 型制备高效液相色谱(SSI 色谱数据工作站,美国 SSI 公司),1200 系列分析用高效液相色谱仪(包括在线脱气机、四元泵、自

动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器,Chem Station 色谱数据工作站,美国安捷伦公司),TGL-18c 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂),SK-5200H 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司),XP205 型电子分析天平(梅特勒-托利多上海仪器公司),2F-20C 型暗箱式自动紫外分析仪(上海宝山顾村光电仪器厂)。

## 2 方法与结果

**2.1 目标化合物的定位** 采用 UPLC-TOF-MS-MS 进行主要成分归类及定位,采用 HPLC-DAD 进行洗脱条件筛选,以制备柱进行放大分离,得少量含目标成分溶液,低温回收后加甲醇复溶作为含目标成分液备用。

**2.2 目标成分的分离** 安息香药材 50 g,粉碎,过 3 号筛,超声提取,过滤,回收得乙醇部位浸膏 48 g,取浸膏 25 g,采用硅胶柱色谱法,取 2.1 项下所得含样液,跟踪点样,反复分离,得目标化合物 3.04 g(HPLC 面积归一化法含量 94.3%)。增加药材量,分离得到苯甲酸松柏酯 35 g(纯度 93.1%),用于药效学研究。

**2.2.1 样品前处理** 取目标化合物初提物 0.6 g,加甲醇制成 30 g·L<sup>-1</sup> 的样品溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后备用。

**2.2.2 色谱条件** 制备型 HPLC, Cosmosil Cosmogel 5C<sub>18</sub>-MS-II 色谱柱(10.0 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(85:15),检测波长 218 nm,体积流量 3 mL·min<sup>-1</sup>,进样体积 0.2 mL。

**2.2.3 目标化合物的制备** 取粗提物,利用制备型 HPLC 分离制备,按上述制备色谱条件洗脱,经多次进样,收集对应时间段组分,低温减压结合氮吹收干溶剂后用乙酸乙酯复溶,过滤,低温收干上清液,得到目标化合物 0.35 g,经 HPLC 面积归一化法计算,纯度 >99%。

**2.3 结构鉴定** 化合物为白色粉末状结晶(石油醚-乙酸乙酯),mp 71 ~ 73 ℃,高分辨双聚焦磁质谱联用仪(HRMS)给出其相对分子质量为 284.294 6,分子式 C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>。<sup>1</sup>H-NMR(600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ: 6.88 ~ 6.98(1H, m, H-2, 5, 6), 6.69(1H, d, *J* = 15.8 Hz, H-7), 6.29(1H, dt, *J* = 15.8, 6.6 Hz, H-8), 4.99(2H, d, *J* = 6.6 Hz, H-9), 8.11(1H, d, *J* = 7.3 Hz, H-12, 16), 7.47(1H, t, *J* = 7.7 Hz, H-13, 15), 7.59(1H, t, *J* = 7.4 Hz, H-14), 3.92(3H, s, H-17)。

<sup>13</sup>C-NMR(600 MHz, DMSO) δ: 128.0(C-1),

110.4 (C-2), 148.2 (C-3), 147.4 (C-4), 115.9 (C-5), 120.7 (C-6), 134.8 (C-7), 120.7 (C-8), 66.0 (C-9), 166.0 (C-10), 130.2 (C-11), 129.7 (C-12,16), 129.3 (C-13,15), 133.8 (C-14), 56.1 (C-17)。经文献检索,其谱图数据与文献[15]报道基本一致,故鉴定化合物为苯甲酸松柏酯(conferyl benzoate)。

**2.4 苯甲酸松柏酯与安息香药材药效关联初步研究** 目前芳香开窍药物现代药理研究主要集中在中枢神经系统、心血管系统以及抗炎解热、抗病原体等方面<sup>[15]</sup>,本文参照课题组对安息香药材芳香开窍作用系统评价的方案,开展苯甲酸松柏酯药效的初步研究。

**2.4.1 小鼠血脑屏障通透性实验分组及给药** 昆明种雄性小鼠 72 只,按体重随机分为 6 组:空白组(5% 聚山梨酯 + 0.2% CMC-Na),阳性药冰片组(200 mg·kg<sup>-1</sup>),安息香组(1 000 mg·kg<sup>-1</sup>),苯甲酸松柏酯高(420 mg·kg<sup>-1</sup>),中(210 mg·kg<sup>-1</sup>),低(105 mg·kg<sup>-1</sup>)剂量组。各组小鼠预防性给药 3 d,每天 1 次。第 4 天进行实验,于实验前 0.5 h 灌胃给药 1 次。

伊文思蓝标准曲线制备 用甲酰胺配制伊文思蓝母液,按倍比稀释法<sup>[16]</sup>依次配成 8,4,2,1,0.5,0.25,0.125,0.062 5 mg·L<sup>-1</sup>的对照溶液,45 °C 避光水浴 72 h 后,以甲酰胺作空白对照,置酶标仪上(波长 624 nm)进行比色,记录其吸光度。以伊文思蓝浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘图制作标准曲线,并求得回归方程  $Y = 0.083X + 0.004$  ( $r = 0.9999$ )。

小鼠脑组织中伊文思蓝含量测定 血脑屏障(BBB)通透性实验参照文献[16]:小鼠末次给药 30 min 后,按 0.01 mL·g<sup>-1</sup>尾静脉注射 2% 伊文思蓝溶液(以注射后小鼠眼球结膜,四肢等迅速显示蓝色,表示造模成功),2 h 后用 5% 水合氯醛麻醉,开胸通过左心室灌注生理盐水,直至右心房流出清亮液体

后,在冰台上快速取下脑组织,剥离脑膜后,称其湿重,放入甲酰胺 3 mL 中浸泡,45 °C 避光水浴 72 h,离心(5 000 r·min<sup>-1</sup>,10 min),取上清液于酶标仪上在 624 nm 处测定吸光度,根据标准曲线计算出伊文思蓝含量,结果以伊文思蓝含量/脑湿重(μg·g<sup>-1</sup>)表示。见表 1。

表 1 苯甲酸松柏酯对小鼠血脑屏障通透性的影响( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 Effect of conferylbenzoate on permeability of blood brain barrier in mice( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	脑内伊文 思蓝 /μg·g <sup>-1</sup>
空白	12	-	0.97 ± 0.31
冰片	12	200	1.55 ± 0.35 <sup>1)</sup>
安息香药材	11	1 000	1.44 ± 0.29 <sup>1)</sup>
苯甲酸松柏酯	12	420	1.66 ± 0.37 <sup>1)</sup>
	10	210	1.28 ± 0.39
	12	105	1.17 ± 0.39

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P < 0.05(表 2 同)。

结果空白组与苯甲酸松柏酯低、中剂量组比较无显著性差异;阳性药冰片,安息香药材,苯甲酸松柏酯高剂量组均能显著增加正常小鼠脑内伊文思蓝含量(P < 0.05)。

**2.4.2 D-GalN 敏化小鼠 LPS 致死性攻击的保护实验** 昆明种雄性小鼠 90 只,按体重随机分为 5 组:空白组(5% 聚山梨酯 + 0.2% CMC-Na),安息香组(1 000 mg·kg<sup>-1</sup>),苯甲酸松柏酯高(420 mg·kg<sup>-1</sup>),中(210 mg·kg<sup>-1</sup>),低(105 mg·kg<sup>-1</sup>)剂量组。实验流程参照文献[14],各组小鼠预防性给药 3 d,每天 1 次(给药体积 0.02 mL·g<sup>-1</sup>)。第 4 天进行实验,实验前小鼠禁食 12 h,末次给药后 1 h 腹腔注射 D-GalN 600 mg·kg<sup>-1</sup>(0.01 mL·g<sup>-1</sup>);2 h 后尾静脉注射 LPS 1 mg·kg<sup>-1</sup>(0.01 mL·g<sup>-1</sup>),观察各组小鼠注射 LPS 后 1,3,5,7,9,11,24,48,72 h 时间点的死亡情况,计算其累计死亡率结果。见表 2。

表 2 苯甲酸松柏酯对 D-GalN 敏化小鼠 LPS 致死性攻击的影响

组别	n	剂量 /mL·g <sup>-1</sup>	死亡率							
			3 h	5 h	7 h	9 h	11 h	24 h	48 h	72 h
空白	17	-	11.8	41.2	58.8	76.5	82.4	82.4	82.4	82.4
安息香药材	18	1 000	0.0	5.6 <sup>1)</sup>	22.2 <sup>1)</sup>	38.9 <sup>1)</sup>	50.0 <sup>1)</sup>	50.0 <sup>1)</sup>	50.0 <sup>1)</sup>	50.0 <sup>1)</sup>
苯甲酸松柏酯	18	420	0.0	11.1 <sup>1)</sup>	22.2 <sup>1)</sup>	44.4 <sup>1)</sup>	55.6	61.1	61.1	61.1
	18	210	0.0	22.2	38.9	55.6	66.7	66.7	72.2	72.2
	17	105	5.9	23.5	52.9	76.5	82.4	88.2	88.2	88.2

注:1 h 死亡率均为 0。

与空白组比较,安息香、苯甲酸松柏酯高剂量组均能在 *D*-GalN 敏化小鼠 LPS 致死性攻击后 5~9 h 内表现出显著的对抗作用,安息香药材组能显著降低小鼠整体死亡率。综合比较各时间点累计死亡率,安息香及其主要成分苯甲酸松柏酯各剂量组对降低小鼠死亡率均有效,且死亡率与剂量呈负相关。

### 3 讨论

提取分离中曾采用硅胶柱色谱法进行纯化,但纯化物质纯度较低,因此本文采用制备型 HPLC 进行苯甲酸松柏酯的制备研究。试验中发现苯甲酸松柏酯热稳定性较差,回收溶剂过程中温度不超过 40℃,最终采用氮气吹干剩余溶剂所得苯甲酸松柏酯纯度较高。本文所建提取纯化方法能够快速从安息香中制备苯甲酸松柏酯。

此外,课题组以苯甲酸松柏酯为对照品进行安息香含量测定,初步试验表明安息香中苯甲酸松柏酯含量达 10% 以上,个别批次可达 60%。初步稳定性试验表明,苯甲酸松柏酯在 60℃,光照强度约 2 500 LX,相对湿度 50% 环境下 72 h 后颜色开始变化,由白色逐渐变为黄棕色,苯甲酸松柏酯含量降低,与 2010 年版《中国药典》记载安息香药材断面为白色,放置后逐渐变为淡黄色至红棕色<sup>[1]</sup>基本一致,初步揭示了安息香药材传统鉴别以断面呈“象牙白”的科学意义。

“973 课题”中对安息香药材及其有效部位的芳香开窍作用进行了评价,其结果表明安息香对血脑屏障通透性<sup>[4,17]</sup>、抗急性感染性疾病<sup>[14]</sup>以及炎症等<sup>[18]</sup>方面有着较好疗效。因此本文开展了以血脑屏障通透性实验及内毒素所致的类“热闭”模型为代表的苯甲酸松柏酯药效初步研究,结果表明苯甲酸松柏酯高剂量组能促进正常小鼠血脑屏障的开放,显著增加正常小鼠脑内伊文思蓝含量,对 *D*-GalN 敏化小鼠内毒素致死性攻击有保护作用,说明苯甲酸松柏酯为安息香的有效成分之一。本研究中苯甲酸松柏酯给药剂量,以药材中实际含量进行折算,为准确评价苯甲酸松柏酯与安息香药效联系提供了依据。

### [参考文献]

[1] 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,2010:138.  
[2] 雷玲,王强,白筱璐,等. 安息香的抗炎解热作用研究[J]. 中药药理与临床,2012,28(2):110-111.

[3] 黄萍,贾芳,黄小燕,等. 安息香配伍合成冰片对小鼠脑缺血缺氧及血脑屏障通透性的影响[J]. 中药药理与临床,2013,29(5):75-78.  
[4] 倪彩霞,曾南,汤奇,等. 芳香开窍药对脑缺血再灌注损伤小鼠血脑屏障通透性的影响[J]. 时珍国医国药,2011,22(11):2639-2640.  
[5] 王峰. 安息香和乳香化学成分及抗肿瘤活性研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2007.  
[6] 黄小燕,夏厚林,宁梓君,等. 阴离子交换树脂纯化安息香总香脂酸的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(4):5-7.  
[7] 于黎明,薛恒跃,王玉兰,等. HPLC 法测定安息香总香脂酸中苯甲酸的含量[J]. 中药材,2002,25(11):798-799.  
[8] 蔡伟杰,王一波,朱海琪,等. 安息香中总三萜成分的含量测定[J]. 中国药业,2014,23(15):13-15.  
[9] 董重. 安息香有效部位化学成分及药材指纹图谱研究[D]. 成都:成都中医药大学,2010.  
[10] Filippi J, Castel C, Fernandez X, et al. An unusual acenaphthylene-type sesquiterpene hydrocarbon from Siam and Sumatra benzoin gum [J]. Phytochemistry Let,2009,2(4):216-219.  
[11] Hovaneissian M, Archier P, Mathe C, et al. Analytical investigation of styrax and benzoin balsams by HPLC-PAD-fluorimetry and GC-MS [J]. Phytochem Anal, 2008,19(4):301-310.  
[12] 娄方明,李群芳,邱维维. 气质联用分析安息香的挥发性成分[J]. 中成药,2010,32(10):1829-1831.  
[13] Leffemberg C, Gautier A, Ohleyer E. Enzymatic preparation of coniferaldehyde from coniferyl benzoate ex. siam benzoin [J]. Appl Biochem Micro,1992,37(1):43-52.  
[14] 梁珂,曾南,唐永鑫,等. 芳香开窍药对 *D*-氨基半乳糖敏化小鼠内毒素致死性攻击的影响[J]. 中药药理与临床,2010,26(1):58-60.  
[15] 曾南,王建,夏厚林,等. 芳香开窍药药理作用研究进展[J]. 中药药理与临床,2008,24(1):76-79.  
[16] 姚洪武,王建,刘岩,等. 麝香与冰片不同配比对急性脑缺血模型小鼠血脑屏障通透性的影响[J]. 成都中医药大学学报,2011;34(4):62-64.  
[17] 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):279-282.  
[18] 王一波,陈欢,王淑美,等. 中药安息香药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药,2015,11(3):48-49.

[责任编辑 顾雪竹]