

· 化学与分析 ·

HPLC 同时测定安息香中 3 种化学成分的含量

刘瑶, 李碧君, 王峰*

(广东药科大学 中药学院, 国家中医药管理局 中药数字化质量评价技术重点研究室,
广东高校中药质量工程技术研究中心, 广州 510006)

[摘要] 目的:建立 HPLC 同时测定安息香中香草醛、松柏醛和 *trans*-[四氢-2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-5-氧代呋喃-3-基] 甲基苯甲酸酯含量的方法。方法:采用 Phenomenex Luna C₁₈(2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-水为流动相, 在 1.0 mL·min⁻¹ 的流速下, 对样品进行梯度洗脱, 并在 280 nm 波长处测定这 3 种化学成分的含量。结果:3 种成分均能达到基线分离, 且线性关系良好, 加样回收率分别为 99.51%, 101.25%, 100.71%。结论:该方法灵敏、准确、具有良好的稳定性和重复性, 可用于同时测定安息香中这 3 种化学成分的含量, 为安息香的质量控制研究提供一定参考。

[关键词] 安息香; 香草醛; 松柏醛; *trans*-[四氢-2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-5-氧代呋喃-3-基] 甲基苯甲酸酯

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2016)16-0037-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016160037

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160628.1130.004.html>

[网络出版时间] 2016-06-28 11:30

Simultaneous Determination of Three Components in Benzoinum by HPLC

LIU Yao, LI Bi-jun, WANG Feng*

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Key Laboratory of Digital Quality Evaluation of Chinese Materia Medica Under State Administration of Traditional Chinese Medicine, Engineering Technology Research Center for Chinese Materia Medica Quality of Universities in Guangdong Province, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To simultaneously determine the content of three components vanillin, coniferyl aldehyde, *trans*-[tetrahydro-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-oxofuran-3-yl] methyl benzoate in the Benzoinum by HPLC. **Method:** HPLC was performed on a Phenomenex Luna C₁₈(2) (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column, with methanol and water as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 280 nm. **Result:** All of the three components achieved baseline separation, with a good linear relationship. The average recovery rate was 99.51%, 101.25%, 100.71% respectively. **Conclusion:** This method is sensitive, accurate, reproducible and stable, and so can be used for the determination of the three components in Benzoinum, and provide reference for the quality control over the Benzoinum.

[Key words] Benzoinum; vanillin; coniferyl aldehyde; *trans*-[tetrahydro-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-oxofuran-3-yl] methyl benzoate

安息香具有开窍醒神、行气活血、止痛的功效, 用于中风痰厥、心腹疼痛、气郁暴厥、产后血晕、中恶

[收稿日期] 20160128(005)

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81202884)

[第一作者] 刘瑶, 在读硕士, 从事天然活性产物的发现及中药血清药物化学研究, Tel:18825179282, E-mail:liuyao52600ok@126.com

[通讯作者] *王峰, 副教授, 硕士生导师, 从事天然活性产物的发现及中药血清药物化学研究, Tel:020-39352181, E-mail:liuyao52600ok@126.com

昏迷、小儿惊风等^[1]。现代药理学研究表明安息香具有抗炎解热^[2]、促进血脑屏障通透性^[3-5]、保护脑缺血缺氧^[6-7]、抗肿瘤^[8]、促雌激素^[9-11]、抗动脉粥样硬化^[12]等作用。经文献检索,目前仅黄立华等对安息香中苯甲酸^[13]和肉桂酸^[14]的含量测定方法进行了研究,而对于安息香中其他化学成分的含量测定方法尚无人报道。鉴于此,在笔者获得较多单体化合物的基础上,本实验建立了 HPLC 同时测定安息香中香草醛、松柏醛和 *trans*-[四氢-2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-5-氧代咪喃-3-基]甲基苯甲酸酯 3 种化学成分含量的测定方法,为安息香的质量控制研究提供了一定参考。

1 材料

LC20 型高效液相色谱仪(包括 CBM-20Alite 系统控制器,LC-20AT 泵,SIL-20A 自动进样器,CTO-20AC 柱温箱,SPD-M20A 检测器,日本岛津公司),Phenomenex Luna C₁₈(2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),S125D 型 1/万天平(Sartorius),PS-100 型超声波清洗机(洁康),甲醇色谱级,屈臣氏蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

安息香药材(产地广西,批号分别为 20091123,20100402,20100818,购自采芝林,由广东药科大学中药学院崔红花副教授鉴定为安息香科植物白花树 *Styrax tonkinensis* 的干燥树脂;对照品香草醛,松柏醛和 *trans*-[四氢-2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-5-氧代咪喃-3-基]甲基苯甲酸酯为本课题组从安息香中分离鉴定得到,经过质谱和 HPLC 法测定,纯度分别为 98.7%,99.5%,93.8%。

2 方法与结果

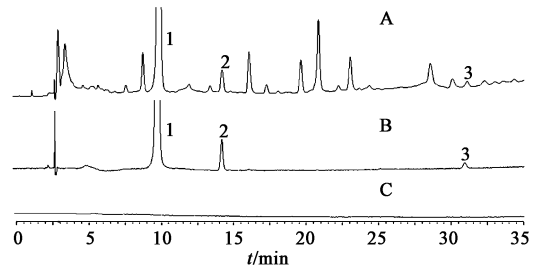
2.1 色谱条件 Phenomenex Luna C₁₈(2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),柱温 40 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 5 μL,检测波长 280 nm,流动相水(A)-甲醇(B)梯度洗脱(0~9 min,30%~40% B;9~17 min,40%~47% B;17~25 min,47%~50% B;25~35 min,50%~60% B)。

2.2 供试品溶液制备 精密称取安息香粉末(过 6 号筛)0.05 g 于 10 mL 量瓶中,加入甲醇 1 mL,超声提取 30 min 后加甲醇定容至刻度线,储存于 -20 °C 备用。

2.3 对照品溶液制备 精密称取香草醛 15.8 mg,松柏醛 1.02 mg,*trans*-[四氢-2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-5-氧代咪喃-3-基]甲基苯甲酸酯 1.59 mg,分别定容至 5 mL,摇匀,得到质量浓度分别为 3 160,204,318 mg·L⁻¹ 的对照品溶液,于 -20 °C 储存

备用。

2.4 系统适应性试验 按 2.1 项下色谱条件分别测定供试品溶液、混合对照品溶液和空白对照溶液(空白溶剂),结果显示 3 种组分分离度均 > 1.5,理论塔板数均 > 15 000,空白对照无干扰,HPLC 色谱见图 1。



A. 供试品; B. 对照品; C. 空白对照; 1. 香草醛; 2. 松柏醛; 3. *trans*-[四氢-2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-5-氧代咪喃-3-基]甲基苯甲酸酯
图 1 安息香中 3 种成分的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatography of three components in Benzoinum

2.5 线性关系考察 分别取 2.3 项下 3 个对照品溶液各 10,30,40,50,70,80,100 μL,相同体积的对照品溶液混合并定容至 1 mL,混匀后过 0.45 μm 微孔滤膜,按 2.1 项下色谱条件进样,测定峰面积,以进样浓度(X)对峰面积(Y)线性回归,回归方程见表 1。

表 1 3 种成分的回归方程及线性范围

Table 1 Regression equation and linear range of three components

成分	回归方程	r	线性范围 /mg·L ⁻¹
香草醛	$Y = 19\ 794X - 212\ 863$	0.999 6	6.32 ~ 63.2
松柏醛	$Y = 5\ 135.9X - 1\ 180.2$	0.999 5	0.636 ~ 6.36
化合物 3	$Y = 2\ 112.9X - 2\ 023.1$	0.999 6	0.408 ~ 4.08

注:化合物 3 是指 *trans*-[四氢-2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-5-氧代咪喃-3-基]甲基苯甲酸酯(表 3 同)。

2.6 精密度试验 取 2.3 项下 3 种对照品溶液各 400 μL 于 10 mL 量瓶中甲醇定容,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,得到 3 种待测成分峰面积的 RSD 分别为 1.4%,0.8%,1.4%,说明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取 2.2 项下供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件分别于 0,2,4,8,12,24 h 进样,得到 3 种待测成分峰面积 RSD 分别为 2.4%,0.8%,2.4%,说明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验 按 2.2 项下方法制成供试品溶液 6 份,按 2.1 项下色谱条件进样,3 种化合物的平均质量分数分别为 23.174 1,1.775 7,1.627 6 mg·

g^{-1} , RSD 分别为 2.6%, 1.0%, 2.4%, 表明方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验 精密称取已知含量的安息香粉末各约 0.05 g 6 份, 分别精密添加一定体积 3 种对照品溶液, 按 2.2 项下方法制成供试品

溶液(加甲醇时扣除对照品溶液体积), 测定并计算各成分的加样回收率以及 RSD。结果 3 种成分的平均回收率分别为 99.51%, 101.25%, 100.71%, RSD 分别为 2.2%, 1.5%, 2.1%。见表 2。

表 2 安息香中 3 种成分的加样回收率

Table 2 Recoveries of three components of Benzoinum

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
香草醛	0.051 03	1.182 6	1.178 8	2.365 6	100.35	99.51	2.2
	0.052 04	1.206 0	1.207 1	2.433 1	101.66		
	0.052 14	1.208 3	1.207 1	2.438 8	101.93		
	0.052 01	1.205 3	1.204 0	2.365 6	96.37		
	0.051 80	1.200 4	1.200 8	2.372 0	97.56		
	0.051 68	1.197 6	1.197 6	2.385 3	99.17		
松柏醛	0.051 03	0.090 6	0.090 4	0.180 4	99.34	101.25	1.5
	0.052 04	0.092 4	0.090 4	0.182 4	99.56		
	0.052 14	0.092 6	0.090 4	0.184 2	101.33		
	0.052 01	0.092 4	0.090 4	0.184 3	101.66		
	0.051 80	0.092 0	0.090 4	0.184 9	102.77		
	0.051 68	0.091 8	0.090 4	0.184 8	102.88		
<i>trans</i> -[四氢-2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-5-氧代咪喃-3-基]甲基苯甲酸酯	0.051 03	0.083 1	0.081 6	0.164 3	99.51	100.71	2.1
	0.052 04	0.084 7	0.084 7	0.171 0	101.89		
	0.052 14	0.084 9	0.084 9	0.169 7	99.88		
	0.052 01	0.084 7	0.084 7	0.169 2	99.76		
	0.051 80	0.084 3	0.084 3	0.167 6	98.81		
	0.051 68	0.084 1	0.084 0	0.171 8	104.40		

2.10 样品测定 取 3 批安息香粉末按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样, 计算各被测定成分的量。结果见表 3。

表 3 安息香中 3 种成分质量分数测定

Table 3 Contents of three components in samples $mg \cdot L^{-1}$

No.	香草醛	松柏醛	化合物 3
1	117.1	8.843	7.779
2	116.1	9.007	7.704
3	117.0	9.083	7.964

3 讨论

3.1 流动相系统的选择 在该试验方法建立过程中, 选择了甲醇-水, 乙腈-水, 甲醇-甲酸水, 乙腈-甲酸水等多个流动相系统, 结果表明甲醇-水系统可以使被测物的柱效和与相邻杂质之间的分离度达到测定要求, 且基线平稳, 峰形较好。

3.2 供试品提取方法的选择 该过程中对提取溶剂(甲醇, 乙醇, 70% 乙醇), 提取时间(30, 60, 90 min), 提取方式(超声提取和加热回流提取)等进行了考察, 以被测物提取率为评价指标, 最后选择了甲醇超声提取 30 min 作为供试品溶液制备方法。

3.3 检测波长的选择 根据紫外全波长扫描, 香草醛在 240, 279, 309 nm 处有较大吸收, 松柏醛在 340 nm 处有最大吸收, *trans*-[四氢-2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-5-氧代咪喃-3-基]甲基苯甲酸酯在 277 nm 处有最大吸收, 综合考虑这 3 个化合物的紫外吸收特点及其在安息香中的含量, 最后选定检测波长为 280 nm。

本实验建立了安息香中香草醛, 松柏醛和 *trans*-[四氢-2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-5-氧代咪喃-3-基]甲基苯甲酸酯 3 种化学成分同时进行测定的 HPLC 方法, 结果显示这 3 种成分分别在 6.32 ~ 63.2 mg·

L^{-1} ($r = 0.9996$), $0.636 \sim 6.36 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ ($r = 0.9995$), $0.408 \sim 4.08$ ($r = 0.9996$) $\text{mg} \cdot L^{-1}$ 呈良好的线性关系, 这几种成分均为安息香中首次测定, 该方法简单快速、灵敏、具有良好的重复性和稳定性, 可用于安息香中这 3 种成分含量的同时测定, 为安息香的质量控制研究提供理论依据和方法参考。

[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, 2015: 148.

[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] 倪彩霞, 曾南, 汤奇, 等. 芳香开窍药对正常小鼠血脑屏障通透性的影响[J]. 江苏中医药, 2011, 43(2): 88-89.

[4] 杨洋, 王世祥, 房敏峰, 等. 安息香醛、香草醛和 β -细辛醚对 P-糖蛋白功能的影响[J]. 中成药, 2012, 34(7): 1364-1366.

[5] 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.

[6] 许福会. 四味芳香开窍药抗急性心肌缺血作用的实验研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2011.

[7] 黄萍, 夏厚林, 贾芳, 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.

[8] Wang F, Hua H, Pei Y, et al. Triterpenoids from the resin of *Styrax tonkinensis* and their antiproliferative and differentiation effects in human leukemia HL-60 cells [J]. J Nat Prod, 2006, 69(5): 807-810.

[9] 鲁丹枫, 杨利娟, 李麒麟, 等. 瓦山安息香促雌激素生物合成活性化合物的分离和作用机制研究[C]. 北京: 中国化学会第 9 届天然有机化学学术会议, 2012: 245.

[10] 李麒麟. 瓦山安息香和细锥香茶菜的活性成分研究[D]. 成都: 中国科学院研究生院(成都生物研究所), 2005.

[11] 张璐, 王建, 黄立华, 等. 安息香对孕妊大鼠血清性激素、在体子宫平滑肌的影响[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(5): 92-97.

[12] 谢予朋, 李阳, 孙晓迪. 安息香提取物对损伤内皮细胞中乳酸脱氢酶、肿瘤坏死因子及白细胞介素-8 活性的影响[J]. 中医药导报, 2014, 20(1): 6-7.

[13] 黄立华, 夏厚林, 程军, 等. 不同产地安息香苯甲酸含量比较[J]. 山东中医药大学学报, 2011, 35(4): 358-360.

[14] 黄立华, 夏厚林, 王建, 等. 不同产地安息香中肉桂酸的含量比较[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 596-597.

[责任编辑 顾雪竹]