

HPLC-DAD 法和一测多评法同时测定安息香中 4 种成分

胡 攀， 夏厚林*， 文冰杰， 李瑞煜， 杨孟妮， 张 慧
(成都中医药大学药学院， 中药材标准化教育部重点实验室， 四川 成都 611137)

摘要：目的 建立高效液相色谱-二极管阵列检测器（HPLC-DAD）法和一测多评（QAMS）法同时测定安息香 *Styrax tonkinensis* (Pierre) Craib ex Hart. 中香草醛、苯甲酸、苯甲酸松柏酯以及苯甲酸苄酯的含有量。**方法** HPLC-DAD 法同时测定 4 种成分含有量，计算苯甲酸松柏酯与其他 3 种成分的相对校正因子，考察相对保留时间法和线性回归法对色谱峰定位的影响，并比较这两种方法的重复性。**结果** 15 批样品中香草醛、苯甲酸、苯甲酸松柏酯、苯甲酸苄酯的含有量分别为 0.692% ~ 2.621%、2.944% ~ 15.628%、12.649% ~ 62.589%、0.514% ~ 2.034%，线性回归法较相对保留时间法更准确，3 个相对校正因子重复性良好，两种方法无显著差异。**结论** 一测多评法可用于测定安息香中的总香脂酸类成分。

关键词：安息香；香草醛；苯甲酸；苯甲酸松柏酯；苯甲酸苄酯；HPLC-DAD；一测多评

中图分类号：R284.1 文献标志码：A 文章编号：1001-1528(2016)06-1274-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.06.015

Simultaneous determination of four constituents in *Styrax tonkinensis* by HPLC-DAD and QAMS

HU Pan, XIA Hou-lin*, WEN Bing-jie, LI Rui-yu, YANG Meng-ni, ZHANG Hui
(School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; Key Laboratory for Standardization of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT: AIM To establish high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) methods for the simultaneous determination of contents of vanillin, benzoic acid, coniferyl benzoate and benzyl benzoate in *Styrax tonkinensis* (Pierre) Craib ex Hart.. **METHODS** HPLC-DAD was applied to simultaneously determining the contents of these four constituents. The relative correction factors of coniferyl benzoate to another three constituents were calculated. The effects of relative retention time and linear regression methods on positioning chromatographic peaks were investigated. And the reproducibilities were then compared. **RESULTS** In fifteen batches of samples, the contents of vanillin, benzoic acid, coniferyl benzoate and benzyl benzoate were 0.692% – 2.621% , 2.944% – 15.628% , 12.649% – 62.589% and 0.514% – 2.034% , respectively. Linear regression method showed its superiority in accuracy as compared with relative retention time method. The reproducibilities of three relative correction factors were good. And these two methods demonstrated no significant difference. **CONCLUSION** QAMS can be used for determining total balsamic acids in *S. tonkinensis*.

KEY WORDS: *Styrax tonkinensis* (Pierre) Craib ex Hart. ; vanillin; benzoic acid; coniferyl benzoate; benzyl benzoate; HPLC-DAD; QAMS

安息香 *Styrax tonkinensis* (Pierre) Craib ex Hart. 为芳香开窍药，具有开窍醒神、行气活血、止痛之功效，用于治疗中风痰厥、气郁暴厥、中恶昏迷、心腹疼痛、产后血晕、小儿惊风等症^[1]。

收稿日期：2015-10-28

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

作者简介：胡 攀（1989—），男，硕士，从事中药质量标准及物质基础研究。Tel: 18224427340, E-mail: hupanmail@foxmail.com

* 通信作者：夏厚林（1964—），男，教授，从事中药质量标准及物质基础研究。Tel: 13568899011, E-mail: xhl64@163.com

现代药理研究表明, 其有抗炎解热^[2]、脑缺血缺氧保护、促进血脑屏障通透性^[3-5]、抗肿瘤^[6]等作用。

安息香为树脂类药材, 其主要成分为总香脂酸, 如香草醛、苯甲酸、苯甲酸苄酯、苯甲酸松柏酯等^[7-8]。目前, 各国药典对该药材的质量控制均以总香脂酸为主要指标, 如《欧洲药典》(第7版)、《印度药典》(2010版)均采用滴定法测定其含量;《中国药典》2005版采用重量法测定其含量, 而2010版和2015版均测定水解后苯甲酸含量。

香草醛又名香兰素, 为安息香中主要的香味成分, 亦为传统经验鉴别的重要气味辨别物; 苯甲酸又名安息香酸, 多国药典均以其为定性鉴别或含量测定指标; 苯甲酸松柏酯及苯甲酸苄酯均为安息香中重要的总香脂酸酯类成分, 水解后均能产生苯甲酸及其他物质, 而且含量相对较高^[9]。以上成分除苯甲酸外^[10], 目前均未见测定的报道, 而且苯甲酸松柏酯和苯甲酸苄酯暂无法定对照品, 而采用一测多评法可以减少对照品的使用量, 节约成本。因此, 本实验先以高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)法开展以上4种成分含量测定方法的研究, 再以主要活性成分苯甲酸松柏酯^[11]为内参物, 采用一测多评法来同步测定安息香中多个总香脂酸成分含量, 并将两种方法进行比较。

1 材料与仪器

1.1 药材 安息香由荷花池专业市场、四川科伦药业(批号141201)以及成都中医药大学标本室提供, 经成都中医药大学卢先明教授鉴定为安息香科植物白花树 *Styrax tonkinensis* (Pierre) Craib ex Hart. 的干燥树脂。

1.2 对照药材及对照品 安息香对照药材、苯甲酸、香草醛对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为121186-201302、100419-201302、110501-201102); 苯甲酸苄酯对照品(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司, 批号20102); 苯甲酸松柏酯(自制, 经¹H-NMR、¹³C-NMR谱鉴定, 含量大于99%)。

1.3 仪器与试剂 Agilent 1200 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、Agilent Chem Station 色谱数据工作站(美国安捷伦公司); SSI Series 1500 高效液相色谱仪(美国SSI公司); SK-5200H 超声波清

洗器(上海科导超声仪器有限公司); XP205 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。甲醇、乙腈为色谱纯(美国Fisher公司); 磷酸为优级纯; 其他试剂均为分析纯; 水为超纯水。

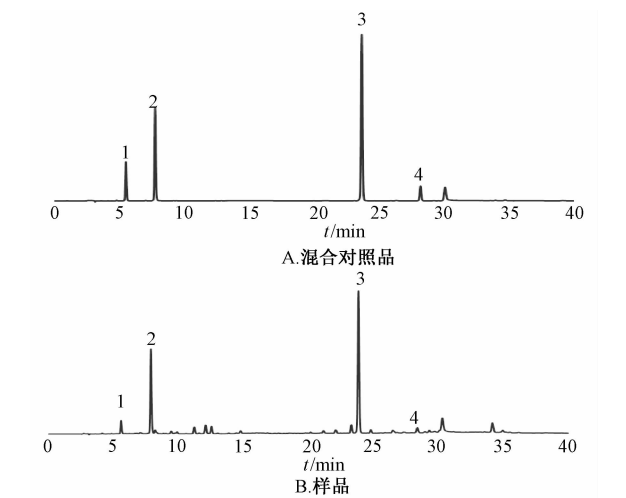
2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters XBridgeTM C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.3%磷酸水溶液(B); 体积流量1.0 mL/min, 梯度洗脱(程序见表1); 柱温30℃; 检测波长230 nm。结果见图1。

表1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution programs

时间/min	A 乙腈/%	B 0.3% 磷酸水溶液/%
0~8	25	75
8~30	35	65
30~40	70	30
40	70	30



1. 香草醛 2. 苯甲酸 3. 苯甲酸松柏酯 4. 苯甲酸苄酯
1. vanillin 2. benzoic acid 3. coniferyl benzoate 4. benzyl benzoate

图1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取香草醛、苯甲酸、苯甲酸松柏酯、苯甲酸苄酯对照品适量, 加甲醇制成含香草醛0.928 mg/mL、苯甲酸0.969 5 mg/mL、苯甲酸松柏酯3.277 mg/mL、苯甲酸苄酯0.415 5 mg/mL的对照品贮备液, 置于冰箱中冷藏保存。再分别吸取适量, 乙腈: 水(50: 50)稀释, 制成含香草醛46.40 μg/mL、苯甲酸96.95 μg/mL、苯甲酸松柏酯327.70 μg/mL、苯甲酸苄酯41.55 μg/mL的混合对照品溶液, 备用。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取安息香粉末(过3号筛)0.1 g, 置于具塞锥形瓶中, 加入甲醇

20 mL，超声提取 30 min，转移至 50 mL 量瓶中，少量甲醇多次洗涤，洗液合并，加甲醇至刻度，摇匀，滤过，精密量取续滤液 5 mL，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性范围考察 精密量取混合对照品溶液 20、15、10、8、5、2、1 μL，在“2.1”项色谱条件下进样分析，每个进样量进样 3 次，记录峰面积，并取平均值。以峰面积为纵坐标（Y），样品进样量为横坐标（X）进行线性回归，绘制标准曲线，结果见表 2，表明在各自范围内线性关系良好。

表 2 4 种成分的标准曲线

Tab. 2 Standard curves of four constituents

成分	回归方程	r	线性范围/μg
香草醛	$Y = 5\,110.6X - 2.1$	0.999 8	0.046 4 ~ 0.928 0
苯甲酸	$Y = 5\,108.5X + 46.4$	0.999 9	0.097 0 ~ 1.939 0
苯甲酸松柏酯	$Y = 4\,692.3X - 20.2$	0.999 7	0.327 7 ~ 6.554 0
苯甲酸苄酯	$Y = 4\,899.1X - 2.0$	0.999 8	0.041 5 ~ 0.831 0

2.4.2 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL，进样 6 次，测定峰面积。结果，香草醛、苯甲酸、苯甲酸松柏酯和苯甲酸苄酯 RSD 分别为 0.94%、1.11%、1.06%、0.96%，表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液，分别在 0、2、6、12、24、48 h 进样分析。结果，香草醛、苯甲酸、苯甲酸松柏酯和苯甲酸苄酯 RSD 分别为 1.81%、2.04%、1.91%、2.79%，表明样品在 48 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 精密称取安息香 0.1 g，共 6 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定。结果，香草醛、苯甲酸、苯甲酸松柏酯和苯甲酸苄酯含有量 RSD 分别为 1.56%、2.64%、1.75%、2.38%，表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率 精密称取药材 0.05 g，共 6 份，分别精密加入香草醛 1.5 mL、苯甲酸苄酯 1 mL。再精密称取同一批安息香 0.01 g，共 6 份，分别精密加入苯甲酸 1.5 mL、苯甲酸松柏酯 0.5 mL，按“2.3”项下方法制备供试品溶液（溶剂加入量为原加入量的 1/5）进行测定，结果见表 3。

2.5 “一测多评”耐用性和专属性考察

2.5.1 相对校正因子计算 参照文献 [12] 的方法，以公式 $f_{k/s} = (W_s \times A_k) / (W_k \times A_s)$ 计算相对校正因子，待测成分的量以公式 $W'_k = (W_s \times$

$A'_k) / (f_{k/s} \times A_s)$ 计算。其中， $f_{k/s}$ 为相对校正因子， W_s 为内标物含有量， A_s 为内标物峰面积， W_k 为其他对照组分含有量， A_k 为对照组分的峰面积， W'_k 为待测组分含有量， A'_k 为待测组分的峰面积。以苯甲酸松柏酯为内标，分别计算对香草醛、苯甲酸、苯甲酸苄酯的校正因子，结果见表 4。

表 3 加样回收率试验结果

Tab. 3 Results of recovery tests

成分	取样量/原有量/加入量		测得量/回收率		平均回收		RSD/
	mg	mg	mg	mg	%	率/%	
香草醛	51.32	1.345	1.392	2.759	101.61	100.39	2.62
	49.73	1.303	1.392	2.723	102.01		
	52.22	1.368	1.392	2.726	97.53		
	48.71	1.276	1.392	2.722	103.90		
	52.12	1.366	1.392	2.719	97.23		
	50.46	1.322	1.392	2.715	100.06		
苯甲酸	10.24	1.335	1.454	2.794	100.33	102.62	2.33
	10.31	1.344	1.454	2.856	103.91		
	10.35	1.350	1.454	2.807	100.22		
	9.98	1.301	1.454	2.847	106.28		
	10.51	1.371	1.454	2.845	101.36		
	10.09	1.316	1.454	2.822	103.60		
苯甲酸 松柏酯	10.24	1.374	1.639	2.934	95.22	97.25	2.81
	10.31	1.384	1.639	3.038	100.97		
	10.35	1.389	1.639	2.938	94.53		
	9.98	1.339	1.639	2.975	99.82		
	10.51	1.410	1.639	2.968	95.05		
	10.09	1.354	1.639	2.958	97.88		
苯甲酸 苄酯	51.32	0.515	0.416	0.919	97.38	99.27	2.72
	49.73	0.499	0.416	0.906	97.97		
	52.22	0.524	0.416	0.924	96.39		
	48.71	0.489	0.416	0.906	100.57		
	52.12	0.523	0.416	0.936	99.45		
	50.46	0.506	0.416	0.938	103.87		

表 4 相对校正因子

Tab. 4 Relative correction factors

进样量/μL	相对校正因子		
	苯甲酸松柏酯/ 香草醛	苯甲酸 苯甲酸	苯甲酸松柏酯/ 苯甲酸苄酯
20	1.088	1.087	1.041
15	1.093	1.097	1.050
10	1.087	1.075	1.048
8	1.087	1.078	1.030
5	1.083	1.104	1.036
2	1.097	1.093	1.055
1	1.088	1.087	1.041
平均值	1.089	1.089	1.043
RSD/%	0.42	0.94	0.843

2.5.2 待测色谱峰的定位 以苯甲酸松柏酯为内参峰，分别测得香草醛、苯甲酸、苯甲酸苄酯的平均相对保留时间为 0.269、0.369、1.202。

线性回归色谱峰定位法^[13-14] 以 Agilent 1200 仪器使用的 Waters 柱为标准柱，选择苯甲酸和苯甲

酸松柏酯的保留时间作为横坐标（*A*），对应其他
仪器及色谱柱苯甲酸和苯甲酸松柏酯的保留时间为
纵坐标（*B*）绘制回归方程，进行相应色谱峰定
位。结果见表 5。

表 5 色谱峰定位结果

Tab. 5 Results of chromatographic peak positioning

仪器	色谱柱	方法	香草醛/min	苯甲酸/min	苯甲酸松柏酯/min	苯甲酸苄酯/min
Agilent 1200	Waters	实际保留时间	5. 467	7. 497	20. 360	24. 469
		相对保留时间	5. 477	7. 513	—	24. 473
		两点校正	—	—	—	—
	GL	实际保留时间	7. 936	10. 715	28. 022	33. 108
		相对保留时间	7. 970	—	29. 115	34. 751
		两点校正 $B = 1. 345\ 5A + 0. 627\ 9$	7. 986	—	—	33. 553
	依利特	实际保留时间	4. 999	6. 771	19. 375	22. 930
		相对保留时间	5. 036	—	18. 398	21. 960
		两点校正 $B = 0. 979\ 9A - 0. 575\ 0$	4. 782	—	—	23. 402
	Gemini	实际保留时间	6. 937	8. 940	23. 902	28. 305
		相对保留时间	6. 650	—	24. 292	28. 995
		两点校正 $B = 1. 163\ 2A + 0. 219\ 6$	6. 579	—	—	28. 682
SSI Series 1500	Waters	实际保留时间	6. 543	8. 902	24. 213	29. 465
		相对保留时间	6. 622	—	24. 188	28. 871
		两点校正 $B = 1. 190\ 3A - 0. 021\ 8$	6. 486	—	—	29. 104

2. 6 HPLC-DAD 法与一测多评法比较 吸取对照
品及供试品溶液各 10 μL（个别批次稀释后测定），
注入 HPLC 色谱仪测定。HPLC-DAD 法和一测多评
法计算药材中香草醛、苯甲酸、苯甲酸松柏酯及苯
甲酸苄酯含量，结果见表 6。

表 6 测定结果比较（%）

Tab. 6 Comparison of determination results（%）

批号	年份	HPLC-DAD 法					一测多评法				
		香草醛	苯甲酸	苯甲酸松 柏酯	苯甲酸 苄酯	总量	香草醛	苯甲酸	苯甲酸 松柏酯	苯甲酸 苄酯	总量
T1	2008	0. 761	12. 31	14. 72	0. 814	28. 61	0. 759	12. 43	14. 72	0. 813	28. 72
T2	2009	0. 604	12. 32	16. 95	0. 474	30. 35	0. 602	12. 44	16. 95	0. 471	30. 46
T3	2009	2. 59	12. 91	13. 60	0. 624	29. 72	2. 60	13. 03	13. 60	0. 622	29. 85
T4	2013	2. 62	13. 04	13. 42	1. 00	30. 08	2. 62	13. 39	13. 37	1. 00	30. 38
T5	2014	0. 734	13. 13	16. 05	0. 674	30. 59	0. 732	13. 25	16. 05	0. 672	30. 70
T6	2014	1. 61	3. 60	48. 06	1. 38	54. 65	1. 601	3. 691	48. 06	1. 38	54. 73
T7	2014	1. 51	13. 29	14. 05	0. 514	29. 36	1. 51	13. 42	14. 05	0. 512	29. 49
T8	2014	0. 692	3. 90	62. 59	1. 24	68. 42	0. 688	3. 99	62. 59	1. 24	68. 51
T9	2014	1. 44	2. 94	60. 07	1. 43	65. 88	1. 437	3. 04	60. 07	1. 42	65. 97
T10	2014	0. 997	4. 00	44. 63	0. 784	50. 41	0. 994	4. 09	44. 63	0. 781	50. 50
T11	2014	1. 22	9. 15	22. 05	0. 994	33. 41	1. 214	9. 26	22. 05	0. 993	33. 52
T12	2014	0. 726	6. 37	46. 57	1. 58	55. 25	0. 723	6. 46	46. 57	1. 57	55. 32
T13	2014	0. 714	4. 23	51. 03	1. 04	57. 01	0. 71	4. 32	51. 03	1. 04	57. 10
T14	2014	0. 844	15. 63	12. 65	0. 734	29. 86	0. 843	15. 77	12. 65	0. 733	30. 00
T15	2014	1. 02	10. 13	21. 75	2. 03	34. 93	1. 01	10. 24	21. 75	2. 04	35. 04

测定结果用 Pearson 相关系数进行比较，测得
香草醛的相对误差为 -0. 98% ~ 0%，Pearson 相关
系数值为 0. 999 982；苯甲酸相对误差为 0. 90% ~
3. 49%，Pearson 相关系数值为 0. 999 920；苯甲酸
苄酯相对误差为 -0. 70% ~ 0%，Pearson 相关系数
值为 0. 999 946；总量相对误差为 0. 15% ~
1. 00%，Pearson 相关系数值为 0. 999 982，表明两
种方法无显著差异。

3 讨论

苯甲酸松柏酯为安息香中重要的活性成分^[9]，
据文献报道其含量可达 15% 以上，经初步试验
表明，其颜色在一定条件下由白色逐渐变深，与
《中国药典》2015 版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^[1]基本一致，因
此，以苯甲酸松柏酯为指标来控制安息香药材质量
具有重要意义。

本实验首次采用 HPLC-DAD 法同时测定了安息香中 4 个总香脂酸类成分的含有量,发现香草醛在 0.714% ~ 2.62% 之间,苯甲酸在 2.94% ~ 15.63% 之间,苯甲酸松柏酯在 12.65% ~ 62.59% 之间,苯甲酸苄酯在 0.474% ~ 2.03% 之间。随着存放年限的增加,15 批样品中苯甲酸含有量逐渐升高,而苯甲酸松柏酯降低。因此,控制安息香质量采用多指标时更能反应该药材的真实情况。

在一测多评法研究中,本实验考察了相对校正因子法和斜率校正法^[10-11],发现前者计算结果与 HPLC-DAD 法基本一致,而后者误差较大,故采用相对校正因子法进行实验。

另外,还考察了 Agilent 1200 和 SSI Series 1500 两种 HPLC 系统,以及 4 根色谱柱,同时在不同实验室进行了复核实验。结果,苯甲酸松柏酯对香草醛、苯甲酸和苯甲酸苄酯的平均相对校正因子分别为 1.09、1.10 和 1.05, RSD 分别为 3.41%、3.63% 和 2.32%,表明以苯甲酸松柏酯为内参物所测定的相对校正因子较为稳定,一测多评法具有可行性。

经 Pearson 检验,一测多评法与 HPLC-DAD 法测定结果无显著差异,表明一测多评法可用于安息香中总香脂酸的质量控制。另外,该方法可降低检测成本和时间,而且苯甲酸松柏酯作为内参物具有专属性,能够实现一个对照品在同一波长下对多个成分进行同时测定,能够满足基层药检的需求。在实际应用中,可视具体情况选择 HPLC-DAD 法或一测多评法。

同时,本实验研究了保留时间差法、相对保留时间法以及线性回归色谱峰定位法来对待测色谱峰进行定位。结果表明,保留时间差法在不同色谱柱重复性较差;相对保留时间法能够进行色谱峰定位;线性回归色谱峰定位法最为准确,但需使用 2 种对照品,与一测多评的初衷不符,而且相对保留时间法结合色谱图及紫外吸收特征,也能准确进行

色谱峰定位。因此,可优先采用相对保留时间法,若该方法不能准确定位色谱峰,则可进一步考虑线性回归色谱峰定位法。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部[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): 109-110.

[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] 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.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 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.

[9] Leffemberg C, Gautier A, Ohleyer E. Enzymatic preparation of coniferaldehyde from *Coniferyl Benzoate* ex. *Siam Benzoin*[J]. *Appl Biochem Biotech*, 1992, 37(1): 43-52.

[10] 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.

[11] Jakubas W J, Gullion G W. Coniferyl benzoate in quaking aspen A ruffed grouse feeding deterrent[J]. *J Chem Ecol*, 1990, 16(4): 1077-1087.

[12] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925-1928.

[13] 许 佳, 金红宇, 孙 磊. 替代对照品法测定龙血竭原料中龙血素 A 和 B 的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(11): 2058-2062.

[14] 何 兵, 杨世艳, 张 燕. 一测多评中待测成分校正和定位的新方法研究[J]. 药学学报, 2012, 47(12): 1653-1659.