

高效液相色谱双波长检测法测定苏合香丸中苯甲酸与肉桂酸的含量

艾则孜·莫合买提 陈冬云 王伟萍 张明 沙丽娜 （新疆维吾尔自治区食品药品检验所 乌鲁木齐 830000）

摘要 **目的：**建立高效液相色谱双波长检测法同时测定苏合香丸中苯甲酸和肉桂酸含量。**方法：**采用 HPLC Waters Sun Fire TM C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm,5 μm)；以0.1% 醋酸水溶液-甲醇(60:40) 为流动相,流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:0~18 min 时 228 nm(苯甲酸),18.1~35 min 时 285 nm(肉桂酸);进样量 10 μL;柱温:室温。**结果：**苯甲酸和肉桂酸的线性范围分别为1.0~50.0 μg·ml⁻¹(*r*=0.999 7), 0.2~10.0 μg·ml⁻¹(*r*=0.999 9)；平均回收率分别为96.88 % (*RSD* = 1.6% ,*n* = 9)和99.35% (*RSD* = 1.7% ,*n* = 9)。**结论：**苯甲酸和肉桂酸的线性范围分别为1.0~50.0 μg·ml⁻¹(*r*=0.999 7),0.2~10.0 μg·ml⁻¹(*r*=0.999 9)；平均回收率分别为96.88% (*RSD* = 1.6% ,*n* = 9)和99.35% (*RSD* = 1.7% ,*n* = 9)。

关键词 高效液相色谱法;苏合香丸;苯甲酸;肉桂酸

中图分类号:R927.2 文献标识码:A 文章编号:1008-049X(2014)04-0692-03

Determination of Benzoic Acid and Cinnamic Acid in Suhexiang Pills by HPLC with Dual Wavelength Detection

Aziz Muhammad,Chen Dongyun, Wang Weiping, Zhang Ming, Sha Lina (Xinjiang Institute for Food and Drug Control , Urumqi 830000, China)

ABSTRACT Objective: To establish an HPLC method with dual wavelength detection for the determination of benzoic acid and cinnamic acid in Suhexiang pills. **Methods:** A Waters Sun Fire TM C₁₈ column(150 mm×4.6 mm,5 μm) was adopted with 0.1% acetic acid-methanol(60:40) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 ml·min⁻¹. The detection wavelength was set at 228nm for benzoic acid(0-18min) and 285nm for cinnamic acid (18.1-35min). The injection volume was 10μl, and the column temperature was room temperature. **Results:** The linear range of benzoic acid and cinnamic acid was 1.0-50.0 μg·ml⁻¹(*r*=0.999 7) and 0.2-10.0 μg·ml⁻¹, respectively(*r*=0.999 9). The average recovery was 96.88% (*RSD* = 1.6% ,*n* = 9) and 99.35% (*RSD* = 1.7% ,*n* = 9), respectively. **Conclusion:** The method is accurate, fast and simple in the determination of benzoic acid and cinnamic acid in Suhexiang pills.

KEY WORDS HPLC;Suhexiang pills;Benzoic acid;Cinnamic acid

苏合香丸^[1]由苏合香、安息香、水牛角浓缩粉、麝香、檀香、沉香、丁香、香附、木香、乳香、苾芨、白术、诃子肉、朱砂、冰片等十五味药材组成,苏合香为金缕梅科植物苏合香树(*Liquidambar orientalis* Mill.)的树干渗出的香树脂经加工精制而成,安息香为安息香科植物白花树[*Styrax tonkinesis* (Pierre) Craib ex Hart.]的干燥树脂。本品具有芳香开窍、行气止痛的功效,可用于痰迷心窍所致的痰厥昏迷、中风偏瘫、肢体不利,以及中暑、心胃气痛。其质量标准收载于《中国药典》2010 年版一部,处方中苏合香和安息香为君药,肉桂酸为苏合香的有效成分,苯甲酸为安息香的有效成分。经检索,对主要成分苏合香药材中肉桂酸的含量测定报道较多^[2~6],但未见对肉桂酸和苯甲酸等有机酸同时进行含量测定的方法。本文建立了 HPLC 法同时测定上述 2 种成分的含量^[7~9],现报道如下。

1 仪器与试药

Waters 1525 高效液相色谱仪,2487 紫外检测器,Breeze 色谱工作站,Mettler Toledo AG135 型(十万分之一)电子分析天平(Mettler Toledo 仪器有限公司),KLZ-UP 超纯水仪(台湾

艾柯成都康宁实验专用纯水设备厂)。
肉桂酸对照品(批号:110786-200503)、苯甲酸对照品(批号:100419-200301)均购自中国食品药品检定研究院。苏合香丸样品分别由北京同仁堂制药厂(批号:9010562、9010464、9010171、9010170、9010341)和雷允上药业有限公司(批号:8010079)提供;甲醇(色谱纯,Fisher Scientific U.S.A),冰醋酸(分析纯,西安化学试剂厂),氢氧化钾(分析纯,上海三浦化工有限公司),水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Waters Sun Fire TM C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱;以0.1% 醋酸水溶液-甲醇(60:40) 为流动相;流速为1.0 mL·min⁻¹;检测波长:0~18 min 时 228 nm(苯甲酸),18.1~35 min 时 285 nm(肉桂酸);进样量 10 μL;柱温为室温。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密称取苯甲酸对照品 10 mg,肉桂酸对照品 2 mg 置 100 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液。

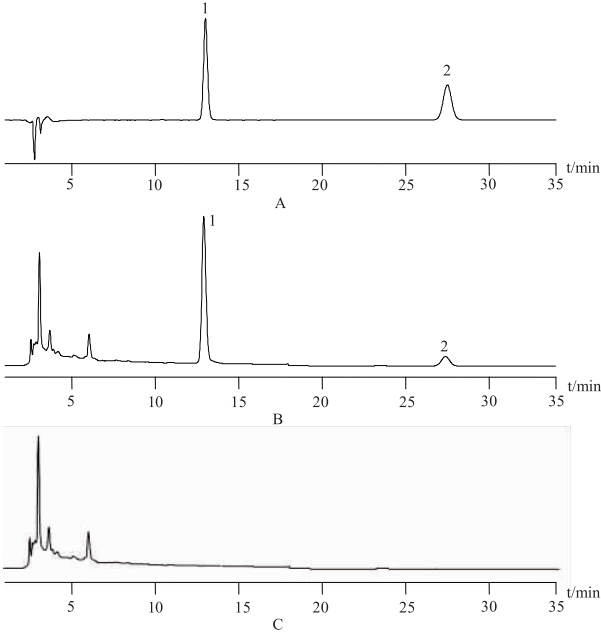
通讯作者:艾则孜·莫合买提 Tel:13899906596 E-mail:Qabdas@163.com

2.2.2 供试品溶液 取本品剪碎,精密称取2.0 g,置具塞锥形瓶中,加氢氧化钾 0.8 g,甲醇 20 ml,加热回流 1 h,取出,放冷,加醋酸 5 ml,摇匀,转移至 50 ml 量瓶中,用少量 50% 甲醇分次洗涤容器,洗涤液并入同一量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,摇匀,滤过,精密量取续滤液 5 ml,置 100 ml 量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,摇匀,经微孔滤膜(0.45 μm)过滤,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液 按《中国药典》2010 年版一部处方及工艺制备不含苏合香、安息香药材的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备阴性样品溶液。

2.3 系统适用性试验

取对照品、供试品和阴性样品溶液在上述色谱条件下进样,苯甲酸和肉桂酸色谱峰与相邻峰分离度均大于1.5;理论塔板数分别以苯甲酸和肉桂酸色谱峰计均不低于 3 000;阴性样品无干扰。色谱图见图 1。



A. 对照品 B. 供试品 C. 阴性样品

1. 苯甲酸 2. 肉桂酸

图 1 HPLC 色谱图

2.4 线性关系与最低检测限

精密吸取上述混合对照品溶液0.1,0.3,0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 ml分别到10 ml 量瓶中,取 10 μl 注入液相色谱仪,记录色谱图,以对照品的浓度($X, \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)横坐标,色谱峰面积积分值(Y)为纵坐标进行线性回归,得苯甲酸与肉桂酸回归方程分别为:苯甲酸: $Y = 5.8 \times 10^6 X - 5.28 \times 10^4, r = 0.999\ 7$;肉桂酸: $Y = 8.7 \times 10^6 X - 2.46 \times 10^4, r = 0.999\ 9$ 。结果表明,苯甲酸与肉桂酸浓度分别在1.0 ~ 50.0 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,0.2 ~ 10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的范围内线性关系良好。

取对照品溶液逐级稀释后,按照上述色谱条件进样测定。以苯甲酸和肉桂酸信噪比为 3:1 计,肉桂酸的最低检测限度为6.276 ng,苯甲酸的最低检测限度为3.072 ng。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 10 μl,连续进样 5 次,记录峰

面积。结果苯甲酸和肉桂酸峰面积的 RSD 分别为0.9%,0.3% ($n = 5$)。

2.6 稳定性考察

取同一供试品(批号:9010171)溶液,分别于 0,4,8,12,24 h 各进样 10 μl,测得苯甲酸和肉桂酸峰面积的 RSD 分别为 1.8%和2.2% ($n = 5$)。

2.7 重复性试验

取同一批号(批号:9010171)样品,共 6 份,按照“2.2.2”项下方法制成供试品溶液,在上述色谱条件下分别进样测定。结果样品中苯甲酸和肉桂酸平均含量分别为14.57 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,1.47 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD 分别为1.3%,1.5% ($n = 6$)。

2.8 加样回收率试验

取同一批号(批号:9010171)样品约1.0 g,精密称定,分别添加一定量的苯甲酸(称取苯甲酸对照品0.1 g置 100 ml 量瓶中,取 12 ml,15 ml,18 ml 各 3 份加入样品中)与肉桂酸(称取肉桂酸对照品0.01 g置 10 ml 量瓶中,取 1.2,1.5,1.8 ml 各 3 份加入样品中)对照品,按供试品溶液项下的方法制备,上述色谱条件下测定,计算回收率。结果表明,苯甲酸和肉桂酸平均回收率分别为96.88%,99.35%; RSD 分别为1.6%,1.7% ($n = 9$)。

2.9 样品测定

取不同批号样品各 3 份,按照“2.2.2”项下方法制成供试品溶液,依法测定,计算样品中苯甲酸和肉桂酸的含量,结果见表 1。

表 1 样品测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}, n = 3$)

批号	苯甲酸	肉桂酸
9010562	15.64	1.64
9010464	14.90	1.24
8010079	16.79	1.46
9010171	14.57	1.47
9010170	13.09	1.47
9010341	16.05	1.35

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的确定

曾用四种方法提取:取本品剪碎,精密称取2.0 g,置具塞锥形瓶中:①加氢氧化钾0.8 g,甲醇 20 ml,加热回流 1 h,取出,放冷,加醋酸 5 ml,摇匀,转移至 50 ml 量瓶中,用少量 50% 甲醇分次洗涤容器,洗涤液并入同一量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,摇匀,滤过,精密量取续滤液 5 ml,置 100 ml 量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,摇匀,即得;②加 5% 盐酸溶液 1 ml,搅拌均匀,加入氯仿-甲醇(2:1) 20 ml,采取超声处理 30 min,离心,取上清液用乙醚 20 ml 提取 3 次,合并醚层,室温挥干,残渣用甲醇溶解并定容至 5 ml,作为供试品溶液;③加 5% 氨水 50 ml 室温浸泡 30 min,超声处理 5 min,离心,取上清液用盐酸调节 pH 为 2 ~ 3,用乙醚 20 mL 提取 3 次,合并醚层,室温挥干,残渣用甲醇溶解并定容至 5 ml,摇匀,即得;④加乙醇制氢氧化钾(0.5 mol · L⁻¹) 10 ml,加热回流 1 h,残渣加热水 50 ml,使分散均匀,冷却,加水 80 ml 与硫酸镁溶液(1.5→50)50 ml,混匀,静置 10 min,过滤,滤渣用 20 ml

蒸馏水洗滌,合并洗液和滤液,加 HCl 成酸性($\text{pH}=4$),乙醚萃取 2 次,分取并合并醚层,回收乙醚,残渣甲醇溶解,定容至 5 ml,摇匀,即得。结果表明用第一种方法,样品中苯甲酸与肉桂酸分离度均大于 1.5,重复性较好,故本文选择此法。

3.2 流动相的选择

先后选择了 0.5% 醋酸水溶液: 甲醇(60:40)、0.5% 醋酸水溶液: 甲醇(50:50)、1.0% 醋酸水溶液: 甲醇(60:40)、0.1% 醋酸水溶液: 甲醇(60:40) 等流动相,从分离情况和出峰时间以及对色谱柱的消耗情况等综合分析,选择 0.1% 醋酸水溶液: 甲醇(60:40) 为流动相较为合适。

3.3 检测波长的选择

本试验采用紫外检测器,在 228 nm 检测苯甲酸,在 285 nm 检测肉桂酸,检测波长设定为各成分的最大吸收处,使上述两种成分均有最大的响应,便于对各组分的含量进行测定。

3.4 色谱柱的选择

本试验对不同型号的色谱柱进行筛选,分别选取 Waters Sun Fire TM C_{18} (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 迪马-Diamondsil C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), Agilent SB-Aq C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 等色谱柱进行含量测定。结果显示,色谱柱 Waters Sun Fire TM C_{18} (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 的出峰时间在 30 min 之内,分离效果较好,基线平稳,因此最终选择 Waters Sun Fire TM C_{18} (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)。

3.5 小结

本文建立的 HPLC 法同时测定苏合香丸中苯甲酸和肉桂酸含量的方法具有较高的精密度和准确度,在较宽的线性范围内表现出了良好的稳定性和耐用性,并且方法简单。从不同来源苏合香丸样品分析,其苯甲酸和肉桂酸含量较稳定地出现于各个样品,据此本文认为可以将其作为苏合香丸中苯甲酸和肉桂酸含量的测定方法。

参 考 文 献

- 1 中国药典[S]. 2010 年版. 一部. 742
- 2 张洪霞, 宋金玉, 赵荣淑, 等. RP-HPLC 法同时测定玄参中肉桂酸、哈巴酯苷的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(8): 507-509
- 3 周宏兵, 徐淑峰, 姚海燕, 等. 苏合香的鉴别及其肉桂酸的含量测定[J]. 广东药学院学报, 2003, 19(3): 201-202
- 4 李静, 朱日然, 李启艳, 等. HPLC 法测定养心定悸口服液中药肉桂酸的含量[J]. 实用医技杂志, 2005, 12(22): 3251-3252
- 5 吴海燕, 李春香, 由会玲, 等. RP-HPLC 法测定新冠心苏合滴丸中肉桂酸含量的实验研究[J]. 河北医科大学学报, 2008, 29(2): 239-241
- 6 莫连峰, 陈荣, 蒋静如, 等. 反相高效液相色谱法同时测定酚氨咖颗粒中四组分的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(11): 1934-1936
- 7 蔡少青, 谢丽华, 王建华, 等. 中药玄参中哈巴俄苷和肉桂酸的高效液相色谱法测定[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(3): 191-194
- 8 黄劲梅, 郑清, 梁惠珍. 胡黄连中香草酸、阿魏酸和肉桂酸的含量测定[J]. 中药材, 2002, 25(12): 881-882
- 9 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

(2013-10-27 收稿 2014-01-19 修回)