

[质 量]

## HPLC 法同时测定麝香保心丸中 4 种成分

李淞明<sup>1,2</sup>, 王 玲<sup>1,2</sup>, 詹常森<sup>1,2</sup>

(1. 上海和黄药业有限公司, 上海 200331; 2. 上海中药固体制剂创新工程技术研究中心, 上海 200331)

**摘要:** 目的 建立 HPLC 法同时测定麝香保心丸(人工麝香、人参提取物、苏合香等)中苯甲酸、苯甲酸苄酯、肉桂酸苄酯和肉桂酸苯乙酯的含有量。方法 分析采用 Waters XBridge BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 2.5 μm); 流动相为乙腈-0.03% 磷酸水溶液, 梯度洗脱; 体积流量 0.2 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温 25 °C。结果 苯甲酸、苯甲酸苄酯、肉桂酸苄酯和肉桂酸苯乙酯分别在 0.018 33 ~ 1.833 mg/mL ( $r=0.999\ 9$ )、0.050 08 ~ 5.008 mg/mL ( $r=0.999\ 9$ )、0.018 17 ~ 1.817 mg/mL ( $r=0.999\ 8$ ) 和 0.001 148 ~ 0.114 8 mg/mL ( $r=0.999\ 9$ ) 范围内呈良好的线性关系, 平均回收率分别为 99.51% (RSD = 1.99%)、99.94% (RSD = 1.55%)、98.52% (RSD = 2.00%) 和 98.98% (RSD = 1.86%)。结论 该方法简便、准确、重复性好, 适用于麝香保心丸中这 4 种成分的测定。

**关键词:** 麝香保心丸; 苯甲酸; 苯甲酸苄酯; 肉桂酸苄酯; 肉桂酸苯乙酯; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)07-1505-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.07.014

## Simultaneous determination of four constituents in Shexiang Baoxin Pills by HPLC

LI Song-ming<sup>1,2</sup>, WANG Ling<sup>1,2</sup>, ZHAN Chang-sen<sup>1,2</sup>

(1. Shanghai Hutchison Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 200331, China; 2. Shanghai Engineering Research Center for Innovation of Solid Preparations of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200331, China)

**ABSTRACT: AIM** To establish an HPLC method for simultaneously determining the contents of benzoic acid, benzyl benzoate, benzyl cinnamate and phenethyl cinnamate in Shexiang Baoxin Pills (*Moschus Artificatus Ginseng, Radix et Rhizoma extract, Styrax, etc.*). **METHODS** The analysis was performed on Waters XBridge BEH C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 100 mm, 2.5 μm), mobile phase was acetonitrile-0.03% phosphoric acid aqueous solution for gradient elution, flow rate was 0.2 mL/min, detection wavelength was set at 254 nm, and column temperature was maintained at 25 °C. **RESULTS** Benzoic acid, benzyl benzoate, benzyl cinnamate and phenethyl cinnamate showed good linear relationships within the ranges of 0.018 33 – 1.833 mg/mL ( $r=0.999\ 9$ ), 0.050 08 – 5.008 mg/mL ( $r=0.999\ 9$ ), 0.018 17 – 1.817 mg/mL ( $r=0.999\ 8$ ) and 0.001 148 – 0.114 8 mg/mL ( $r=0.999\ 9$ ), whose average recoveries were 99.51% (RSD = 1.99%), 99.94% (RSD = 1.55%), 98.52% (RSD = 2.00%) and 98.98% (RSD = 1.86%), respectively. **CONCLUSION** This simple, accurate and reproducible method is suitable for the determination of these four constituents in Shexiang Baoxin Pills.

**KEY WORDS:** Shexiang Baoxin Pills; benzoic acid; benzyl benzoate; benzyl cinnamate; phenethyl cinnamate; HPLC

麝香保心丸<sup>[1]</sup>由人工麝香、人参提取物、苏合香、人工牛黄、肉桂、蟾酥、冰片 7 味中药组成, 具有芳香温通, 益气强心的作用, 临床上用于气滞血瘀所致胸痹(症见心前区疼痛、固定不

移), 心肌缺血所致的心绞痛、心肌梗死及上述症候者。

苏合香为金缕梅科植物苏合香树 *Liquidambar orientalis* Mill 树干渗出的香树脂经加工精制而成的半流

动性浓稠液体,其味辛、性温,归心、脾经,具有开窍、辟秽、止痛的功效,为麝香保心丸的臣药,主要成分包括萜类、黄酮类、酚酸类、苯丙素类、挥发油类等。其中,肉桂酸又称桂皮酸、桂酸、3-苯基丙烯酸、 $\beta$ -苯丙烯酸等,是最常用的指标成分<sup>[2-6]</sup>,《中国药典》<sup>[7]</sup>2015年版也以其为指标进行含有量测定。此外,还有70余种化合物<sup>[8-10]</sup>,如苯甲醇、安息香酸、肉桂烯、苯甲酸苄酯、肉桂酸苄酯、肉桂酸肉桂酯等。郭安等<sup>[11]</sup>以苯甲酸苄酯为指标建立苏合香含有量测定方法,张薇薇等<sup>[12]</sup>建立HPLC法测定苏合香中苯甲酸、肉桂酸、苯甲酸苄酯的含有量,艾则孜·莫合买提等<sup>[13]</sup>以HPLC双波长检测法测定苏合香丸中苯甲酸与肉桂酸的含有量。

前期,本课题组从中检测到肉桂酸、苯甲酸、苯甲酸苄酯、肉桂酸苄酯、桂酸苯乙酯、肉桂酸乙酯和肉桂酸肉桂酯7种成分。由于麝香保心丸中的苏合香和肉桂均含有肉桂酸成分,故未将肉桂酸作为指标成分;肉桂酸乙酯和肉桂酸肉桂酯因在麝香保心丸中含有量极低,几乎检测不到,故未作为指标成分。为满足复杂中成药的质量控制要求,最终选取了苯甲酸、苯甲酸苄酯、肉桂酸苄酯和桂酸苯乙酯作为检测指标,首次建立HPLC法同时测定这4个成分的方法,为麝香保心丸的质量控制提供依据。

## 1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1260 Infinity 型高效液相色谱仪,配备四元梯度泵、二极管阵列检测器、控温柱温箱、自动进样器、Chemstation 工作站(美国 Agilent 公司);XS205 DU 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);SB-5200 DTD 超声波仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试剂 苯甲酸(批号 100419-201302)对照品购自中国食品药品检定研究院;苯甲酸苄酯(批号 MKBL3192V)对照品购自美国 Sigma-Aldrich 公司;肉桂酸苄酯(批号 BJ140122)对照品购自安耐倍化学公司;肉桂酸苯乙酯(批号 A1329037)对照品购自阿拉丁公司。麝香保心丸(上海和黄药业有限公司,批号分别为 20140214、20140318、20140627)。乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司);超纯水(自制,美国 Millipore 超纯水仪制备);其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters XBridge BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 2.5  $\mu$ m);以 0.03% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱(0 ~

9 min, 25% B; 9 ~ 14 min, 25% ~ 68% B; 25 ~ 40 min, 68% ~ 100% B; 40 ~ 45 min, 100% B);体积流量 0.2 mL/min;柱温 25  $^{\circ}$ C;检测波长 254 nm;进样量 4  $\mu$ L。

### 2.2 溶液制备

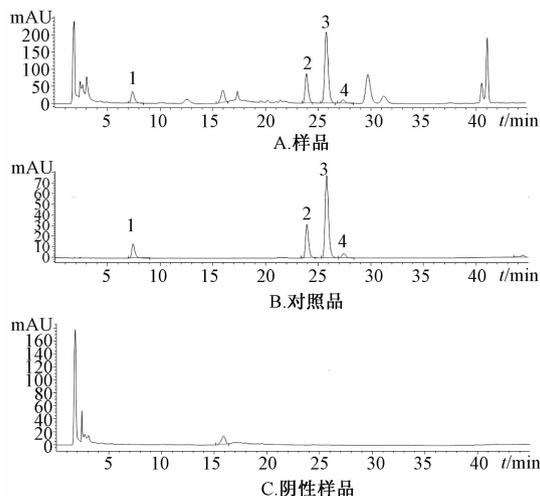
2.2.1 供试品溶液 取麝香保心丸适量,研细,精密称取 0.5 g,置于具塞三角烧瓶中,加入 20 mL 无水乙醇,密塞,超声 30 min,摇匀,放冷,取上清液,0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.2.2 混合对照品贮备液 精密称取苯甲酸、苯甲酸苄酯、肉桂酸苄酯、肉桂酸苯乙酯适量,置于同一 50 mL 量瓶中,甲醇溶解定容,制成含苯甲酸 1.833 mg/mL、苯甲酸苄酯 5.008 mg/mL、肉桂酸苄酯 1.817 mg/mL 和肉桂酸苯乙酯 0.114 8 mg/mL 的混合对照品贮备液。

2.2.3 阴性样品溶液 除苏合香油外,取人工麝香等 6 味原料药细粉,按“2.2”项下方法制备阴性样品溶液。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性 取阴性对照品、混合对照品和供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下测定,发现各对照品色谱峰与其左右干扰峰分离度良好(大于 1.5),阴性无干扰,见图 1。



1. 苯甲酸 2. 苯甲酸苄酯 3. 肉桂酸苄酯 4. 肉桂酸苯乙酯  
1. benzoic acid 2. benzyl benzoate 3. benzyl cinnamate  
4. phenethyl cinnamate

图 1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.3.2 线性关系考察 精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液,甲醇稀释 1、5、10、25、50、100 倍,制成一系列质量浓度的混合标准品溶液,在

“2.1”项色谱条件下分析，记录色谱图及峰面积。苯乙酯在各自范围呈良好的线性关系，具体见表1。结果，苯甲酸、苯甲酸苄酯、肉桂酸苄酯和肉桂酸

表1 4种成分的线性关系

Tab.1 Linear relationships of four constituents

成分	回归方程	r	线性范围/(mg·mL <sup>-1</sup> )
苯甲酸	y = 6 932. 936 70x + 45. 469 68	0. 999 9	0. 018 33 ~ 1. 833
苯甲酸苄酯	y = 5 322. 143 33x + 161. 313 62	0. 999 9	0. 050 08 ~ 5. 008
肉桂酸苄酯	y = 42 684. 467 15x + 489. 394 97	0. 999 8	0. 018 17 ~ 1. 817
肉桂酸苯乙酯	y = 44 298. 297 99x - 6. 439 50	0. 999 9	0. 001 148 ~ 0. 114 8

2.3.3 重复性试验 取同一批麝香保心丸样品，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液6份，在“2.1”项色谱条件下测定，测得苯甲酸、苯甲酸苄酯、肉桂酸苄酯和肉桂酸苯乙酯峰面积RSD值分别为2.21%、1.41%、1.54%和2.22%，表明该方法重复性良好。

2.3.4 精密度试验 取“2.2.2”项下混合对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下连续进样6次，测得苯甲酸、苯甲酸苄酯、肉桂酸苄酯和肉桂酸苯乙酯峰面积RSD值分别为2.61%、1.05%、1.05%和1.12%，表明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取同一批麝香保心丸样品，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，于0、6、12、18、24 h在“2.1”项色谱条件下进样分析，测得苯甲酸、苯甲酸苄酯、肉桂酸苄酯和肉桂酸苯乙酯峰面积RSD值分别为1.29%、1.16%、1.25%和1.24%，表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取含有量已知的同一批麝香保心丸0.5 g，平行9份，按低、中、高(80%、100%、120%)比例精密加入对照品溶液，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定，结果见表2。

2.4 样品含有量测定 取麝香保心丸3批，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定，结果见表3。

### 3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法考察 课题组在实验过程中，对提取溶剂和方式进行考察。结果显示，采用无水乙醇，超声30 min制备时，分离效果最好，色谱峰响应最大，故采用该方法制备供试品溶液。

3.2 检测波长选择 苯甲酸和苯甲酸苄酯在232 nm波长处有最大吸收峰，肉桂酸苄酯在280 nm处有最大吸收峰，肉桂酸苯乙酯在254 nm

表2 加样回收率试验结果 (n=9)  
Tab.2 Results of recovery tests (n=9)

成分	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
苯甲酸	0.461 0	0.549 9	0.994 7	97.05	99.51	1.99
	0.461 0	0.549 9	1.028 8	103.25		
	0.453 0	0.549 9	0.997 2	98.95		
	0.505 6	0.476 6	0.996 8	99.45		
	0.509 8	0.476 6	0.973 5	97.30		
	0.510 0	0.476 6	0.976 9	97.97		
	0.565 7	0.403 3	0.972 5	100.88		
	0.565 7	0.403 3	0.968 9	99.98		
	0.564 5	0.403 3	0.970 8	100.77		
	苯甲酸苄酯	1.362 7	1.502 4	2.845 1		
1.362 7		1.502 4	2.918 1	103.53		
1.339 3		1.502 4	2.850 0	100.55		
1.494 3		1.302 1	2.840 3	100.15		
1.506 9		1.302 1	2.791 8	98.68		
1.507 5		1.302 1	2.789 0	98.41		
1.672 1		1.101 8	2.774 8	100.09		
1.672 1		1.101 8	2.766 4	99.32		
1.668 5		1.101 8	2.771 1	100.07		
肉桂酸苄酯		0.461 7	0.545 1	0.988 3	96.59	98.52
	0.461 7	0.545 1	1.017 9	102.02		
	0.453 8	0.545 1	0.991 0	98.54		
	0.506 4	0.472 4	0.983 8	101.07		
	0.510 6	0.472 4	0.967 7	96.76		
	0.510 8	0.472 4	0.966 2	96.38		
	0.566 6	0.399 7	0.962 8	99.12		
	0.566 6	0.399 7	0.957 5	97.80		
	0.565 4	0.399 7	0.958 7	98.40		
	肉桂酸苯乙酯	0.028 7	0.034 4	0.061 5	98.02	
0.028 7		0.034 4	0.063 6	101.44		
0.028 2		0.034 4	0.061 7	97.27		
0.031 4		0.029 8	0.061 6	101.03		
0.031 7		0.029 8	0.060 5	96.62		
0.031 7		0.029 8	0.060 6	96.84		
0.035 2		0.025 3	0.060 5	100.33		
0.035 2		0.025 3	0.060 4	99.82		
0.035 1		0.025 3	0.060 2	99.47		

处有较好的吸收。若检测波长选取280 nm，则肉桂酸苯乙酯由于含有量较低，不能在色谱图上找到该峰。综合考虑4个指标成分的吸收强度，最终选取254 nm作为检测波长。

表 3 含有量测定结果 (n=3)

Tab. 3 Results of content determination (n=3)

批号	苯甲酸/ (mg·g <sup>-1</sup> )	苯甲酸苄酯/ (mg·g <sup>-1</sup> )	肉桂酸苄酯/ (mg·g <sup>-1</sup> )	肉桂酸苯乙酯/ (mg·g <sup>-1</sup> )
20140214	2.021 3	0.050 12	0.018 6	0.001 1
20140318	1.890 7	0.049 33	0.015 4	0.000 9
20140627	2.135 8	0.049 62	0.020 1	0.001 3

3.3 色谱柱选择 课题组考察了 Agilent Zorbax Extend-C<sub>18</sub>柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm)、Agilent Eclipse PAH-C<sub>18</sub>柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)、Agilent Zorbax Eclipse Plus-C<sub>18</sub>柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)、Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)、Waters XBridge BEH C<sub>18</sub>柱 (2.1 mm × 100 mm, 2.5 μm) 和 Waters Acquity UPHC C<sub>18</sub>柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 发现 Waters XBridge BEH C<sub>18</sub>柱 (2.1 mm × 100 mm, 2.5 μm) 分离效果最好。

#### 4 结论

本实验建立了同时测定麝香保心丸中苯甲酸、苯甲酸苄酯、肉桂酸苄酯和肉桂酸苯乙酯含有量的 HPLC 法, 其简便易行, 重复性好, 准确度高, 为该药物的质量控制提供方法与依据。

#### 参考文献:

[ 1 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1738-1740.

[ 2 ] 罗光明, 要蓉修. 高效液相法测定苏合香及原植物中桂皮酸的含量[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(12): 744-745.

[ 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): 201-203.

[ 4 ] 赵 艳, 初东君. 高效液相法测定苏合香中肉桂酸的含量 [J]. 中药研究与信息, 2004, 6(7): 18-19, 32.

[ 5 ] 张宏伟, 贺 丰, 晁 志. 高效液相色谱法测定广东引种苏合香中桂皮酸的含量 [J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(6): 682-683.

[ 6 ] 张宏伟, 莫志贤, 贺 丰. 广东产苏合香的质量与药理作用研究[J]. 中药药理与临床, 2006, 22(3): 114-116.

[ 7 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 164-165.

[ 8 ] 姚发业, 邱 琴, 崔兆杰, 等. 苏合香挥发油的化学成分 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(7): 859-862.

[ 9 ] 姚发业, 朱文彩, 邱 琴, 等. 超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取和水蒸气蒸馏法提取苏合香挥发油化学成分的研究 [J]. 中草药, 2008, 39(8): 1151-1153.

[ 10 ] 彭 颖, 夏厚林, 周 颖, 等. 苏合香不同提取方法的气相色谱-质谱研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23 (7): 1675-1677.

[ 11 ] 郭 安, 邹 云, 王新宏, 等. 麝香保心丸中苏合香脂的含量测定方法 [J]. 中成药, 2007, 22(7): 479-481.

[ 12 ] 张薇薇, 龚 韬, 朱 青, 等. 以高效液相色谱法测定苏合香中 3 个成分的含量 [J]. 北京中医药, 2009, 28(4): 294-296.

[ 13 ] 艾则孜·莫合买提, 陈冬云, 王伟萍, 等. 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 [J]. 中国药师, 2014, 17(4): 692-694.