

文章编号:1001-6880(2014)Suppl-0072-03

# HPLC 法测定不同产地地骨皮中肉桂酸的含量

陈向明<sup>1,2,3</sup>,孙宪臣<sup>3</sup>,索有瑞<sup>1\*</sup><sup>1</sup>中国科学院西北高原生物研究所,青海 810008; <sup>2</sup>中国科学院大学,北京 100049; <sup>3</sup>滨州医学院药学院,山东 264003

**摘要:**建立了地骨皮中肉桂酸含量的高效液相色谱(HPLC)方法。采用 ultimate-C<sub>18</sub>柱,以水-乙腈(各含 0.2% 磷酸)为流动相,采用梯度洗脱,流速为 0.5 mL/min,检测波长为 278 nm,柱温为室温。肉桂酸在 0.1~200 μg/mL 之间线性关系良好,检出限和定量限分别为 0.029 μg/mL 和 0.097 μg/mL,平均回收率大于 92%。所建立的方法简单、快速、灵敏度高,能准确测定不同地骨皮样品中肉桂酸的含量。

**关键词:**高效液相色谱;地骨皮;肉桂酸;紫外检测

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

## Determination of Cinnamic Acid in Cortex Lycii from Different Habitats by HPLC

CHEN Xiang-ming<sup>1,2,3</sup>, SUN Xian-chen<sup>3</sup>, SUO You-rui<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Qinghai 810008, China; <sup>2</sup>University of the Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China; <sup>3</sup>College of Pharmacy, Binzhou Medical University, Shandong 264003, China

**Abstract:** A HPLC method for determination of cinnamic acid in cortex lycii was developed. Separations were performed on an ultimate C<sub>18</sub> column. Mobile phase consisted of water-acetonitrile( containing 0.2% phosphoric acid) and the flow rate was 0.5 mL/min. The detection wavelength was 278 nm and the column temperature was room temperature. Calibration curve for cinnamic acid was linear in the range of 0.1-200 μg/mL, limits of detection was 0.029 μg/mL and limits of quantification was 0.097 μg/mL. The average recoveries were >92%. The proposed method was simple, fast and sensitive, and could be used for accurate determination of cinnamic acid in cortex lycii.

**Key words:** HPLC; cortex lycii; cinnamic acid; UV

地骨皮为茄科植物枸杞 *Lycium chinese* Mill. 或宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥根皮。具有凉血除蒸,清肺降火的功能,用于阴虚潮热,骨蒸盗汗,肺热咳嗽,咳血,内热消渴<sup>[1]</sup>。现代药理学研究发现地骨皮具有降血压、降血糖、调血脂、抗菌及抗病毒等活性<sup>[2,3]</sup>。其活性成分包括多种有机酸类化合物<sup>[3,4]</sup>,肉桂酸为其中一种。研究表明,肉桂酸对胃癌细胞具有良好的诱导分化作用<sup>[5]</sup>,对其它的肿瘤细胞也有一定的抑制作用<sup>[6]</sup>。肉桂酸含量的测定方法主要有毛细管电泳法<sup>[7]</sup>和高效液相色谱法<sup>[8,9]</sup>。实验建立了测定地骨皮中肉桂酸含量的高效液相色谱方法,测定了多个产地地骨皮中肉桂酸的含量。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Waters 600-2849 高效液相色谱仪(美国 waters

公司),配备四元梯度泵,紫外-可见检测器,在线脱气机,ultimate-C<sub>18</sub>柱(美国月旭公司),Mettler AE240 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),KQ-400 DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

分析纯肉桂酸(含量 >99.5%)购自国药集团化学试剂有限公司;色谱纯乙腈购自天津福晨化学试剂厂;其它试剂都是分析纯。试验用水为哇哈哈饮用纯净水;地骨皮购自烟台立健医药城、烟台医药商城,产地分别为宁夏、青海、河北、陕西和山西。

### 1.2 色谱条件

色谱柱:ultimate-C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);柱温:室温;流动相:A 为 0.2% 磷酸水溶液,B 为 0.2% 磷酸乙腈溶液,梯度洗脱(0~15 min,30% B→100% B);流速:0.5 mL/min;进样体积 20 μL;检测波长:278 nm。

### 1.3 溶液的制备

#### 1.3.1 对照品溶液 精密称取肉桂酸对照品 0.01

g,用乙腈溶解制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液作为对照品储备液,低浓度的对照品溶液用乙腈稀释而成。

**1.3.2 供试品溶液** 地骨皮研磨成细粉末。准确称取地骨皮粉末 1.0 g,加入无水乙醇 10 mL,超声提取 30 min 后过滤,收集滤液,重复上述操作,合并滤液并定溶至 25 mL,得供试品溶液。进样前用 0.45 μm 滤膜过滤。

## 2 实验结果

### 2.1 线性关系

取对照品储备液适量,用乙腈稀释制得浓度为 0.1、0.2、0.5、2、5、20、50、200 μg/mL 的系列对照品溶液,分别进样测定,得肉桂酸标准溶液的色谱图见图 1。以浓度为横坐标 X,峰面积为纵坐标 Y,绘制标准曲线,并进行回归分析得标准曲线方程为  $Y = 5.3 \times 10^{10} X + 43345$ ,相关系数  $r = 0.999$ ,线性范围为 0.2 ~ 200 μg/mL。

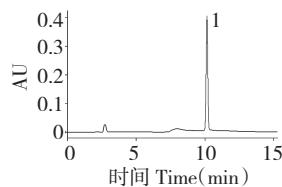


图 1 肉桂酸对照品溶液色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of reference solution

### 2.2 检出限和定量限

按照信噪比为 3:1 计算检出限为 0.029 μg/mL,按照信噪比为 10:1 计算定量限为 0.097 μg/mL。

### 2.3 精密度和重复性

取肉桂酸对照品溶液一份,连续进样测定 6 次,测得肉桂酸的峰面积精密度 RSD 为 1.8%。取地骨皮样品,平行制备 6 份供试品溶液并进样测定,计算样品中肉桂酸含量的 RSD,得重复性为 3.1%。

### 2.4 稳定性

取地骨皮供试品溶液一份,分别于 0、2、4、8、16、24 h 进样测定,测得肉桂酸峰面积 RSD 为 2.9%。表明地骨皮中肉桂酸在 24 h 内稳定。

### 2.5 回收率

精密称取已知含量的宁夏地骨皮样品,分别加入高、中、低三水平的肉桂酸对照品溶液,按照“2.2.2”项下的方法,每个浓度水平平行制备三份加标回收溶液,进行测定。回收率结果见表 1。

表 1 回收率试验结果( $n=3$ )

Table 1 Results of recovery test( $n=3$ )

样品含量 Content (μg)	加入量 Added (μg)	回收率 Recovery (%)	平均值 Average (%)	RSD (%)
5.07	4	92.3	94.2	1.4
5.07	4	95.6		
5.07	4	94.1		
5.07	5	91.5	93.7	2.7
5.07	5	96.4		
5.07	5	93.1		
5.07	6	90.8	92.9	3.3
5.07	6	91.6		
5.07	6	96.4		

### 2.6 样品测定

取地骨皮样品粉末,按照“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液,按照“2.1”项下的色谱条件进行测定,样品色谱图见图 2,样品中肉桂酸含量结果见表 2。

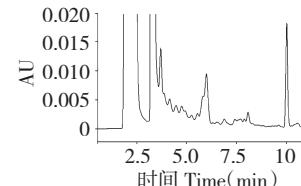


图 2 供试品溶液色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of sample solution

### 表 2 不同产地地骨皮中肉桂酸的含量

Table 2 Content of cinnamic acid in cortex lycii from different producing area

产地 Producing area	含量 Content(μg/g)
宁夏	5.07
青海	6.78
河北	2.31
陕西	3.15
山西	1.98

## 3 讨论

### 3.1 色谱条件的优化

肉桂酸分子结构中有羧基,在水溶液中容易发生电离而导致峰的形状变差,为抑制其电离,需调节流动相为弱酸性。实验采用在流动相中加入磷酸的

方法调节流动相 pH 值, 尝试了磷酸的浓度为 0.01%、0.05%、0.1%、0.2%, 发现随磷酸的添加比例的增加, 色谱峰的形状逐步改善。磷酸的添加量在 0.2% 时, 肉桂酸峰形最佳。样品中成分比较复杂, 因此采用梯度洗脱来分离供试品溶液, 在水相和乙腈相中各添加 0.2% 的磷酸。

### 3.2 提取条件的选择

实验采用超声的方法来提取地骨皮中的肉桂酸。考察了水、甲醇、乙醇、乙腈等溶剂的提取效率, 发现乙醇提取液进样分析, 肉桂酸色谱峰面积最大, 因此选用乙醇为提取溶剂。对超声提取时间进行考察, 发现 30 min 时峰面积达到最大, 继续增加超声时间, 肉桂酸峰面积没有明显增大。

### 3.3 小结

本研究采用高效液相色谱梯度洗脱分析测定了不同产地地骨皮中肉桂酸的含量, 所建立的方法具有分析速度快, 灵敏度高的优点。方法在地骨皮质量控制方面具有一定的应用价值。对于其它样品, 只要选择合适的前处理操作, 本方法也可用于其它样品中肉桂酸含量的测定。

## 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2005, Vol I . 82.

(上接第 62 页)

- 8 Fu QS(傅秋生), Xu XH(许小红). Determination of ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub> and Sanchinoside R<sub>1</sub> in the *Panax notoginseng* saponins extracts by HPLC. *Pharm J Chin PLA* (解放军药学学报), 2009, 25: 84-86.
- 9 Huang YP(黄媛平). Dissolution test of Xuesaitong dispersible tablets. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2011, 17(3) :36-39.
- 10 Bai CC(白长财), Chai XY(柴兴云), Wang HL(王海龙), et al. Analysis of the HPLC fingerprints of *Panax notoginseng* by CAD. *Chin J Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2009, 40: 54-58.
- 11 Zhang HJ(张海江), Yuan RQ(袁日琴), Hu JY(胡静雅). Determination of Saponins in Formulated Danshen Tablets by SPE-HPLC-ESI-MSn Technique. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2011, 22: 2174-2176.

- 2 Wei ZQ(魏智清), Yu HC(于洪川), Fan RJ(樊瑞军). The Effective Components from Cortex Lycii for Reduction of Blood Sugar. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2009, 20: 848-850.
- 3 Ning N(宁娜), Han JJ(韩建军). Chemical constituents and pharmacological activities of *Lycium Cortex*. *Drugs & Clinic* (现代药物与临床), 2010, 25: 172-176.
- 4 Wei XL(魏秀丽), Liang JY(梁敬钰). Chemical study on the root Barks of *Lycium chinense* Mill. *J China Pharm U* (中国药科大学学报), 2002, 33: 271-273.
- 5 Lu J(卢娟), Wang H(汪晖), Lu FA(卢方安). Effects of cinnamic acid on differentiation of MGC-803 cells. *Chin Pharm Bul* (中国药理学通报), 2007, 23: 237-240.
- 6 Jin G(金戈), Zhang T(张婷), Wang T(王涛), et al. Effects of cinnamic acid on differentiation of MGC-803 cells. *Chin J Cancer* (癌症), 2002, 21: 860-862.
- 7 Li LJ(李利军), Huang WY(黄文艺), Feng J(冯军), et al. Determination of cinnamaldehyde and cinnamic acid in cinnamomum by non-aqueous capillary electrophoresis with UV detection. *J Instrum Anal* (分析测试学报), 2007, 26: 274-276.
- 8 Zhou J(周军), Sun Y(孙艳), Zhang J(张晶), et al. RP-HPLC analysis of paeoniflorin, ferulaic acid, cinnamic acid and glycyrrhetic acid in Shiquan Dabu syrups. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2009, 29: 1501-1503.
- 9 Guo YL(郭永利), Xiang JL(向金莲). HPLC determination of cinnamaldehyde in Wen-wei Yao jiu. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2009, 29: 1870-1872.
- 12 Qiu MM(丘明月). Determination of notoginsenoside R<sub>1</sub>, ginsenoside Rg<sub>1</sub> and ginsenoside Rb<sub>1</sub> in Sanqixueshangning powder by HPLC. *Cent South Pharm* (中南药学), 2010, 8: 27-30.
- 13 Zheng JB(郑继标), Chen LL(陈丽莲). Determination of ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub> and notoginsenoside R<sub>1</sub> in Fufang Xiaozhi Capsule by HPLC. *Asia-pacific tradit med* (亚太传统医药), 2011, 7(11) :29-32.
- 14 Liu B(刘波), Nie Y(聂阳), Shen JY(沈嘉茵), et al. Determination of notoginsenoside R<sub>1</sub>, ginsenoside Rg<sub>1</sub>, ginsenoside Re and ginsenoside Rb<sub>1</sub> in compound Sanqi sustained-release tablets by HPLC. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2008, 19: 1048-1049.
- 15 Di F(邸峰), Sun YK(孙毅坤). Determination of notoginsenoside R<sub>1</sub> in compound Danshen tablet by HPLC. *Chin New Drug J* (中国中药杂志), 1996, 21: 672-673.