

# HPLC同时测定半枝莲中对香豆酸和肉桂酸的含量

付小凯, 刘勇, 李阳, 闫辉, 容蓉, 巩丽丽, 蒋海强, 吕青涛\*  
(山东中医药大学药学院, 济南 250355)

**[摘要]** 目的:建立半枝莲药材中同时测定对香豆酸和肉桂酸含量的测定方法。方法:采用 Eclipse SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.2% 磷酸水梯度洗脱, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 310, 280 nm, 柱温 26 °C。结果:对香豆酸和肉桂酸分别在 0.148 ~ 1.776 μg ( $r=0.999\ 8$ ), 0.062 ~ 0.992 μg ( $r=0.999\ 6$ ) 呈良好的线性关系, 平均加样回收率分别为 99.4% (RSD 1.5%), 99.3% (RSD 1.8%), 供试品溶液在 12 h 内稳定。通过对 8 批半枝莲药材的测定, 结果发现湖北(批号 130501) 样品中 2 种成分含量总体优于其他产地样品。结论:该含量测定方法精密度高, 准确度高, 适用于半枝莲药材中对香豆酸和肉桂酸的含量测定。

**[关键词]** 半枝莲; 对香豆酸; 肉桂酸

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0044-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030044

## Simultaneous Determination of *p*-coumaric Acid and Cinnamic Acid in *Scutellaria barbata* by HPLC

FU Xiao-kai, LIU Yong, LI Yang, YAN Hui, RONG Rong, GONG Li-li, JIANG Hai-qiang, LYU Qing-tao\*  
(School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a method for simultaneous determining *p*-coumaric acid and cinnamic acid contents in *Scutellaria barbata*. **Method:** Eclipse SB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was adopted with a mobile phase of acetonitrile-0.2% phosphoric acid at the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was set at 310 nm and 280 nm and the column temperature was 26 °C. **Result:** The good linear range was 0.148-1.776 μg ( $r=0.999\ 8$ ) for *p*-coumaric acid and 0.062-0.992 μg ( $r=0.999\ 6$ ) for cinnamic acid. The average recovery rate was 99.4% (RSD 1.5%) and 99.3% (RSD 1.8%) for *p*-coumaric acid and cinnamic acid respectively. The sample solution was steady within 12 h. Through the determination of the 8 batches of *S. barbata*, results showed that the contents of these 2 components in Hubei samples (batch number: 130501) were better than those of other areas. **Conclusion:** This method is precise and accurate for determination of *p*-coumaric acid and cinnamic acid contents in *S. barbata*.

**[Key words]** *Scutellaria barbata*; *p*-coumaric acid; cinnamic acid

半枝莲别名并头草、狭叶韩信草等<sup>[1]</sup>。我国常把半枝莲与其他中草药制成配方, 治疗肝炎和各种癌症, 如卵巢肿瘤、继发性胸膜肿瘤、鼻咽癌、肝癌、胃癌等<sup>[2-7]</sup>。半枝莲主要含黄酮类、多糖、有机酸及挥发油等化学成分, 其中有机酸类化合物主要有对

香豆酸、原儿茶酸、肉桂酸、熊果酸及半枝莲酸等<sup>[8-9]</sup>。有文献报道, 香豆酸具有抗癌和抗心脏病的作用<sup>[10-11]</sup>。肉桂酸具有抗过敏, 消炎, 杀菌, 抗氧化等多种生理活性<sup>[12]</sup>。目前, 半枝莲中对香豆酸的含量测定方法已有文献报道<sup>[13]</sup>, 但半枝莲中肉桂

**[收稿日期]** 20150505(009)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81173614)

**[第一作者]** 付小凯, 在读硕士, 从事天然药物化学成分及化学分析研究, Tel:15628858323, E-mail:fxk972660330@163.com

**[通讯作者]** \* 吕青涛, 博士, 教授, 从事天然药物化学成分及化学分析研究, Tel:13905316839, E-mail:luqingtao9@163.com

酸的含量测定方法尚未建立。本文建立了同时测定半枝莲中对香豆酸和肉桂酸含量的方法,并对 8 批半枝莲药材中 2 种成分的含量进行了测定及对比,为半枝莲中对香豆酸和肉桂酸质量控制提供了参考依据。

## 1 材料

**1.1 仪器** 1200 系列高效液相色谱仪(包括 DAD 检测器、四元泵、自动进样器、柱温箱、在线真空脱气机,美国安捷伦公司),AE240 型 1/10 万电子天平(瑞士梅特勒公司)。

**1.2 试药** 对香豆酸、肉桂酸对照品(均购于上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 20130915, AA0806LB14,经 HPLC 检测对香豆酸和肉桂酸纯度均 >98%)。不同批次的半枝莲药材购自济南市漱玉平民大药房、七星大药房和康之源大药房等,经山东中医药大学药学院李峰教授鉴定为唇形科植物半枝莲 *Scutellaria barbata* 的干燥全草。乙腈、磷酸(色谱纯),其他试剂分析纯,纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

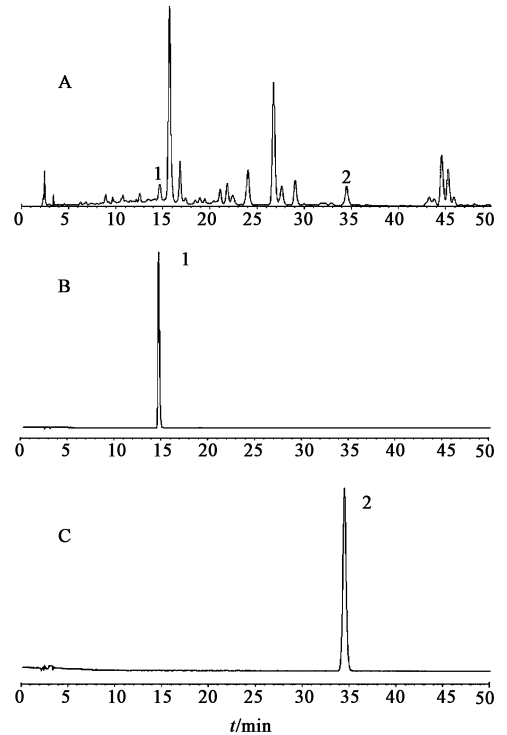
## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Eclipse SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.2% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~8 min, 10%~20% B; 8~40 min, 20%~30% B; 40~60 min, 30%~50% B),柱温 26 °C,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 310 nm(对香豆酸),280 nm(肉桂酸),进样量 20 μL。供试品及对照品色谱见图 1。

**2.2 对照品溶液的制备** 分别精密称取对香豆酸和肉桂酸对照品适量,置棕色瓶中,加甲醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中,摇匀,配成质量浓度分别为 148,124 mg·L<sup>-1</sup> 的对香豆酸和肉桂酸对照品储备液。

**2.3 供试品溶液的制备** 精密称取半枝莲粉末(过 40 目筛)3 g,置于 250 mL 圆底烧瓶中,加入无水乙醇溶液 60 mL,95 °C 水浴回流提取 2.0 h,共提取 3 次,过滤,合并滤液,减压干燥蒸干,以甲醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中,摇匀,作为供试品溶液。进样前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

**2.4 线性关系的考察** 精密吸取 2.2 项下对香豆酸对照品储备液 0.1,0.2,0.4,0.8,1.2 mL 置 2 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制得质量浓度分别为 7.4,14.8,29.6,59.2,88.8 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,以对香豆酸质量  $X$  为横坐标,峰面积  $Y$  为纵坐标,得对香豆酸回归方



A. 供试品;B,C. 对照品;1. 对香豆酸;2. 肉桂酸

图 1 半枝莲 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatography of *Scutellaria barbata*

程为  $Y = 5\,419.8X + 33.322$  ( $r = 0.999\,8$ )。精密吸取 2.2 项下肉桂酸对照品储备液 0.05,0.1,0.2,0.4,0.8 mL 置 2 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制得质量浓度分别为 3.1,6.2,12.4,24.8,49.6 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,以肉桂酸质量  $X$  为横坐标,峰面积  $Y$  为纵坐标,得肉桂酸回归方程为  $Y = 6\,653.5X + 11.75$  ( $r = 0.999\,6$ )。结果表明对香豆酸在 0.148~1.776 μg,肉桂酸在 0.062~0.992 μg,质量与峰面积呈现良好的线性关系。

**2.5 精密度试验** 取同一供试品溶液(批号 140101),按 2.1 项下色谱条件进行测定,连续进样 6 次测定,结果对香豆酸和肉桂酸峰面积的 RSD 分别为 1.1%,1.2%,表明该方法精密度良好。

**2.6 稳定性试验** 取同一供试品溶液(批号 140101),分别在 0,2,4,8,12 h,按 2.1 项下色谱条件进行测定,结果对香豆酸和肉桂酸峰面积的 RSD 分别为 1.4%,1.1%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

**2.7 重复性试验** 精密称取同一批号半枝莲粉末(批号 140101,过 40 目筛)约 3 g,共 6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算对香豆酸和肉桂酸的含量。结果显示对香豆酸

和肉桂酸含量的 RSD 分别为 1.0% , 1.3% , 表明该方法重复性良好。

**2.8 加样回收试验** 精密称取已知含量的同一批号半枝莲粉末(批号 140101, 过 40 目筛)各约 3.0 g, 共 9 份, 按照样品中各成分含量的低、中、高 3 个水平, 分别精密加入一定量的对香豆酸、肉桂酸对照品溶液(香豆酸 414 mg · L<sup>-1</sup>, 肉桂酸 274 mg · L<sup>-1</sup>), 按 2.3 项下操作方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进行测定, 计算对香豆酸和肉桂酸的回收率。结果显示对香豆酸和肉桂酸的平均回收率分别为 99.4% , 99.3% , RSD 分别为 1.5% , 1.8% , 表明该方法准确可靠。见表 1。

表 1 半枝莲中对香豆酸和肉桂酸的加样回收试验

Table 1 Recovery tests of *p*-coumaric acid and cinnamic acid in *Scutellaria barbata*

成分	称样量 /g	样品中量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
对香豆酸	3.009	415.9	207.0	618.3	97.8	99.4	1.5
	3.004	415.2	207.0	620.3	99.1		
	3.011	416.1	207.0	617.5	97.3		
	2.994	413.8	414.0	834.1	101.5		
	3.008	415.7	414.0	825.1	98.9		
	2.998	414.3	414.0	832.9	101.1		
	3.005	415.3	621.0	1041.3	100.8		
	3.001	414.7	621.0	1027.0	98.6		
	3.009	415.9	621.0	1034.4	99.6		
	肉桂酸	3.014	278.5	137.0	413.2	98.3	
3.006		277.8	137.0	410.8	97.1		
3.010		278.1	137.0	413.2	98.6		
2.989		276.2	274.0	553.8	101.3		
3.012		278.3	274.0	545.7	97.6		
3.008		277.9	274.0	547.0	98.2		
2.995		276.7	411.0	695.1	101.8		
3.013		278.4	411.0	686.1	99.2		
3.006		277.8	411.0	695.4	101.6		

**2.9 含量测定** 精密称取 8 批半枝莲粉末(过 40 目筛)各 3 份, 每份 3 g, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进行测定, 计算样品中 2 个成分的含量, 结果见表 2。

### 3 讨论和小结

**3.1 提取条件的优化** 以对香豆酸与肉桂酸的含量为指标, 进行了半枝莲的提取溶剂考察, 考察了乙醇、甲醇作为提取溶剂的提取效率, 结果乙醇的提取

表 2 8 批半枝莲药材中对香豆酸和肉桂酸的含量测定

Table 2 Content determination results of *p*-coumaric acid and cinnamic acid in 8 batches *Scutellaria barbata*

产地	批号	对香豆酸	肉桂酸
河北	131202	174.5	42.0
湖北	100920	159.2	47.5
湖北	130501	197.5	74.6
江苏	140101	138.2	92.4
江苏	141001	99.3	37.9
山东	140801	126.1	42.2
河南	140319	99.5	41.2
安徽	121010	194.5	66.2

效率高。其次, 比较了一系列不同体积分数的乙醇提取物中二者的含量差异, 最终选择无水乙醇对二者的同时提取较为适宜。本研究对半枝莲含量测定有一定的参考价值。

**3.2 检测波长的考察** 采用 DAD 检测器在 190 ~ 400 nm 波长下进行全波长扫描, 采集光谱图, 结果发现对香豆酸和肉桂酸分别在 310 nm 处和 280 nm 处有最大吸收, 故对二者分别选 310 nm 和 280 nm 作为检测波长。

当采用 DAD 检测器时, 可以同时采集多个波长下的色谱图, 因此可以一次完成 2 个组分不同波长下的同时检测。当采用普通紫外检测器时, 可以在工作站软件中设置波长时间表, 在两组分的出峰时间分别采用不同波长检测, 实现 2 个组分不同波长下的同时测定。

**3.3 流动相的选择** 本实验首先采用等度洗脱的方式, 结果发现目标成分很难与干扰峰有效的分离, 而采用梯度洗脱的方式, 可以对二者达到很好的分离, 并且在较短时间内同时出峰。但是采用梯度洗脱的方式, 条件控制不好会导致重复性差, 解决办法是延长每次进样前的平衡时间, 每次采用相同的条件平衡色谱柱, 会达到很好的分离效果。

实验过程中比较了乙腈-水、乙腈-0.05% 甲酸、乙腈-0.2% 磷酸、甲醇-2% 冰乙酸、甲醇-水 5 种流动相系统, 结果发现采用乙腈-0.2% 磷酸溶液梯度洗脱时, 对香豆酸和肉桂酸二者分离度均 > 1.5, 各指标峰峰形良好, 基线平稳, 分离度高。

本研究建立了 HPLC 同时测定半枝莲中对香豆酸和肉桂酸 2 种化合物含量的方法, 该方法精密度良好, 为半枝莲含量测定奠定了实验基础。结果表明不同产地及批号的半枝莲中二者的含量差异较

大,湖北(批号 130501)样品中 2 种成分含量总体优于其他产地样品。

[参考文献]

[1] 宋岷. 回回药方考释[M]. 北京:中华书局, 2000: 214-446.

[2] 廖月霞. 半枝莲黄酮活性成分双向调节肿瘤免疫作用及机制[D]. 扬州:扬州大学, 2014.

[3] 杨文文, 胡金芳, 杨帅, 等. 正交试验优选半枝莲超临界二氧化碳萃取条件及 GC/MS 分析[J]. 现代仪器, 2012, 18(5): 11-14, 24.

[4] 陈柳萌. 半枝莲、白花蛇舌草药对提取浸膏中抗氧化活性成分研究[D]. 南昌:南昌大学, 2010.

[5] 黄敏. 半枝莲抗肿瘤活性成分的研究[D]. 武汉:湖北中医学院, 2006.

[6] 方晓阳, 盛伟. 诱导肿瘤细胞凋亡的中药研究[J]. 中草药, 2004, 34(4): 471-474.

[7] 王刚, 董玫, 刘秀书, 等. 半枝莲醇提物抗肿瘤活性的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(9):

1141-1142.

[8] 孔明礼, 张静. 半枝莲多糖的提取分离及初步结构研究[J]. 中成药, 2008, 30(11): 1694-1697.

[9] 李园园. 半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don 化学成分及生物活性研究[D]. 青岛:中国海洋大学, 2012.

[10] Ferguson L R, Shu S T, Harris J P. Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxyl cinnamic acids in cultured HT-29 cells[J]. Mol Nutr Food Res, 2005, 49(6): 585-593.

[11] W Wallerath T, Li H G, Forstermann U, et al. A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase [J]. Nitric Oxide, 2005, 12(2): 97-104.

[12] 杨阳. 肉桂酸和香豆素类衍生物的合成及其抗氧化性能的研究[D]. 长春:吉林大学, 2014.

[13] 刘小莉, 刘晓星, 温普红, 等. 高效液相色谱法测定半枝莲药材中 3 种化合物的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(1): 24-27.

[责任编辑 顾雪竹]

---

## 《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD(E)

经过中国科学院“中国科学引文数据库(Chinese Science Citation Database, 简称 CSCD)”定量遴选、专家定性评估,《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD(E)。

2015—2016 年度 CSCD 收录来源期刊 1200 种,其中中国出版的英文期刊 194 种,中文期刊 1006 种。CSCD 来源期刊分为核心库和扩展库两部分,其中核心库 872 种(以备注栏中 C 为标记);扩展库 328 种(以备注栏中 E 为标记)。

CSCD 具有建库历史最为悠久、专业性强、数据准确规范、检索方式多样、完整、方便等特点,自提供使用以来,深受用户好评,被誉为“中国的 SCI”。CSCD 是我国第一个引文数据库,曾获中国科学院科技进步二等奖。该数据库已在我国科研院所、高等学校的课题查新、基金资助、项目评估、成果申报、人才选拔以及文献计量与评价研究等多方面作为权威文献检索工具获得广泛应用。