

HPLC 测定不同商品规格桂枝中香豆素、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛的含量

刘威^{1,2}, 李红娟¹, 张帅¹, 萧伟^{1*}, 张振秋^{2*}

(1. 江苏康缘药业股份有限公司博士后工作站, 江苏 连云港 222001;

2. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法比较桂枝不同商品规格化学成分差别, 探讨中药材商品规格与药材化学成分的相关性。方法: 采用 Waters-Symmetry-RP-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 275 nm, 柱温 30 ℃。结果: 香豆素、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛线性范围分别为 0.001 32 ~ 0.132 μg ($r=0.999 5$), 0.001 08 ~ 0.108 μg ($r=0.999 6$), 0.002 57 ~ 0.257 μg ($r=0.999 6$), 0.141 4 ~ 1.448 μg ($r=0.999 7$); 平均加样回收率分别为 97.8% (RSD 1.5%), 97.2% (RSD 1.1%), 100.6% (RSD 1.3%), 99.6% (RSD 1.7%)。不同规格桂枝药材中香豆素、肉桂醇、肉桂酸与桂皮醛含量差别较大。结论: 方法准确, 重复性好, 简便易行, 可有效地评价桂枝药材的质量, 为桂枝药材的商品流通和开发研究提供可靠的依据。

[关键词] 桂枝; 香豆素; 肉桂醇; 肉桂酸; 桂皮醛; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0134-05

[doi] 10.11653/syfy2013180134

[收稿日期] 20130106(007)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09504-004)

[第一作者] 刘威, 博士, 高级实验师, 从事药物分析研究, Tel: 15998519256, E-mail: liuwei01@126.com

[通讯作者] * 萧伟, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中药制剂的开发研究, Tel: 0518-85521933, E-mail: wzhhz-nj@tom.com;

* 张振秋, 教授, 博士生导师, 从事药物分析研究, Tel: 0411-87586058, E-mail: zhang zhenqiu@sina.com

0.5% 三乙胺(70:30)为流动相。

[参考文献]

- [1] 沈映君. 中药药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000:382.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986:228.
- [3] 石军民. 中药乌头的合理使用[J]. 中国当代医药, 2010,12(27):92.
- [4] 许廷生, 梁秀兰, 卢壮. 乌头类药物中毒的防治[J]. 河南中医杂志, 2005,25(6):65.
- [5] 王宝琴. 中成药质量标准与标准物质研究[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994:132.
- [6] 王莉, 王华. 偏正颗粒的制备及质量控制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008,11(6):726.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:177.

- [8] 陈东安, 易进海, 黄志芳, 等. 附子煎煮过程中酯型生物碱含量的动态变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):64.
- [9] 汪星, 孙卫, 张铁军, 等. 乌头类有毒中药配伍减毒增效的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18):327.
- [10] 丘振文, 罗丹冬, 王沛坚. HPLC 法测定舒痹宁颗粒中次乌头碱、新乌头碱的含量[J]. 中药新药与临床药理杂志, 2008, 19(4):304.
- [11] 王瑞, 刘芳, 孙毅坤, 等. 不同附子炮制品中乌头碱、新乌头碱、次乌头碱含量的 HPLC 测定[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(10):1361.
- [12] 刘秀秀, 晁若冰. HPLC 控制参附注射液及附子中 3 种双酯型生物碱[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(2):153.

[责任编辑 顾雪竹]

HPLC Determination of Coumarin, Cinnamyl Alcohol, Cinnamic Acid and Cinnamaldehyde from Cinnamomi Ramulus of Different Specifications

LIU Wei^{1,2}, LI Hong-juan¹, ZHANG Shuai¹, XIAO Wei^{1*}, ZHANG Zhen-qiu^{2*}

(1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222001, China;

2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To compare different chemical composition of Cinnamomi Ramulus specifications by HPLC method and discuss the relationship between specifications and chemical compositions. **Method:** Waters-Symmetry-RP-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of solvent A (acetonitrile) and solvent B (0.1% aqueous phosphoric acid) by gradient elution. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. The wavelength was set at 275 nm. The column temperature was maintained at 30 °C. **Result:** The calibration curves of coumarin, cinnamyl alcohol, cinnamic acid and cinnamaldehyde were in good linearity over the ranges of 0.001 32-0.132 μg ($r=0.999\ 5$), 0.001 08-0.108 μg ($r=0.999\ 6$), 0.002 57-0.257 μg ($r=0.999\ 6$), 0.141 4-1.448 μg ($r=0.999\ 7$), and the average recoveries were 97.8%, 97.2%, 100.6%, 99.6% with RSD of 1.5%, 1.1%, 1.3%, 1.7% respectively. The content of coumarin, cinnamyl alcohol, cinnamic acid and cinnamaldehyde in Cinnamomi Ramulus of different specifications was different. **Conclusion:** This method is simple, sensitive and accurate, which will supply evidence for the quality control and research of Cinnamomi Ramulus.

[Key words] Cinnamomi Ramulus; coumarin; cinnamyl alcohol; cinnamic acid; cinnamaldehyde; HPLC

桂枝为樟科植物肉桂的干燥嫩枝,始载于《神农本草经》,列为上品。主要分布于广东、广西和云南等地,具有发汗解肌、散寒止痛、温通经脉、助阳化气、平冲降气之功效,用于风寒感冒、脘腹冷痛、血寒经闭、关节痹痛、痰饮、水肿、心悸。桂枝含挥发油较高,有效成分为肉桂酸、桂皮醛、桂皮醇、香豆素及原儿茶酸,另外还含有酚类、有机酸、多糖、苷类及鞣质等^[1-3]。陆颂规等^[4]采用GC测定不同产地桂枝中桂皮醛的含量,但采用HPLC对不同规格的桂枝中香豆素、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛的含量进行测定还未见报道。本文采用HPLC对不同规格桂枝药材中香豆素、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛进行含量测定,为评价桂枝药材质量提供一种准确可靠的分析方法,为进行商品流通和开发研究提供参考,为进行不同规格桂枝药材的药效学研究提供理论基础^[5-9]。

1 材料

Agilent 1200型高效液相色谱仪(G1322A四元梯度泵,G1367B自动进样系统,G1365D MWD检测器及G1316A柱温箱),BP 211D型电子分析天平(德国Sartorius公司0.01 mg),Mettler TOLEDO AB 204-S型电子分析天平(METTLER TOLEDO仪器有限公司0.1 mg),Millipore型(美国Millipore公

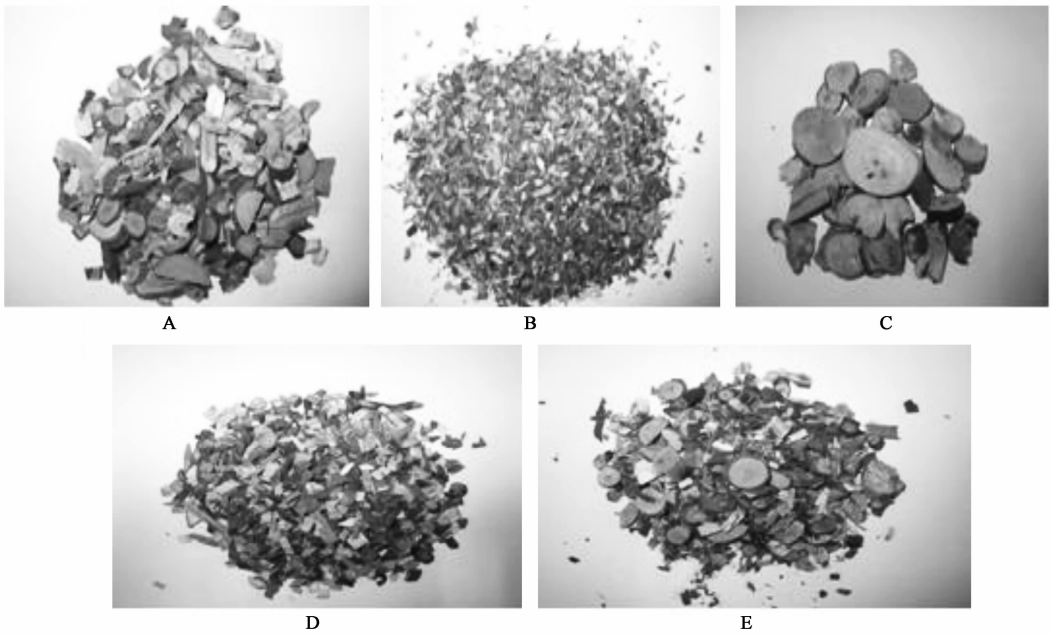
司)USA纯净水发生器,超声振荡器(昆山市超声仪器有限公司)。

对照品肉桂酸(批号110786-200503)、桂皮醛(批号110710-201016)购自中国药品生物制品检定所,对照品肉桂醇(Fluka,批号93066)购自上海雅吉生物科技有限公司,香豆素(批号12020801)购自成都曼斯特生物科技有限公司,色谱纯乙腈(美国Fisher公司),色谱纯磷酸(天津科密欧化学试剂有限公司),纯净水自制,其余试剂均为国产分析纯。

从广东太平镇、肇庆、德庆及广西等地收集不同规格的桂枝样品5批,市场流通的桂枝商品分为桂枝小粒、桂枝中粒、桂枝大粒、桂枝统货、桂糠5个规格,见图1。所有样品均经辽宁中医药大学鉴定教研室李峰教授鉴定为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝,其同号样品保存于江苏康缘药业股份有限公司标本室。

2 方法与结果

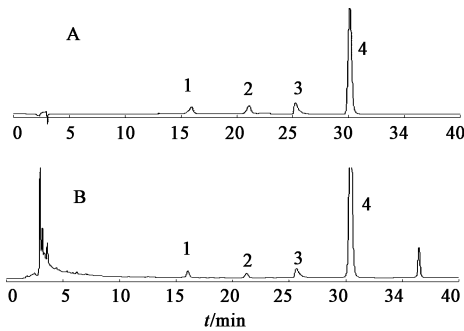
2.1 色谱条件及系统适用性试验 Waters-Symmetry-RP-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~15 min, 24% A; 15~30 min, 33% A; 30~40 min, 58% A),流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 275



A. 桂枝中粒; B. 桂糠; C. 桂枝大粒; D. 桂枝小粒; E. 桂枝统货

图 1 不同规格桂枝药材

nm, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL。在上述色谱条件下, 香豆素、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛色谱峰能够与其他色谱峰达到基线分离, 混合对照品、桂枝样品色谱见图 2。



A. 混合对照品; B. 桂枝样品

1. 香豆素; 2. 肉桂醇; 3. 肉桂酸; 4. 桂皮醛

图 2 对照品和桂枝样品 HPLC

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别取香豆素、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛对照品, 精密称定, 分别置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 分别制成香豆素为 $0.264 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、肉桂醇为 $0.216 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、肉桂酸为 $0.514 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、桂皮醛为 $0.5792 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品储备液, 分别精密吸取适量, 配制成香豆素为 $26.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、肉桂醇为 $21.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、肉桂酸为 $51.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、桂皮醛为 $289.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 混合对照品储备液。再用甲醇逐级稀释成一系列质量浓度的混合对照品溶

液(质量浓度分别为香豆素 1.32, 2.64, 5.28, 7.92, 10.56, 13.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、肉桂醇 1.08, 2.16, 4.32, 6.48, 8.64, 10.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、肉桂酸 2.57, 5.14, 10.28, 15.42, 20.56, 25.7 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、桂皮醛 14.48, 28.96, 57.92, 86.88, 115.84, 144.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

2.2.2 供试品溶液的制备 取桂枝样品, 在 80 ℃ 减压干燥, 粉碎, 取粉末(过 20 目筛)约 0.5 g, 精密称定, 置具塞三角瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(300 W, 25 kHz)40 min, 取出, 放置至室温再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀。过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 分别精密吸取 2.2.1 项下各浓度的混合对照品溶液 10 μL, 按 2.1 项下色谱条件进行测定, 记录峰面积, 以峰面积积分值 Y 为纵坐标, 对应的对照品量 X 为横坐标, 进行回归分析, 得回归方程、相关系数(r)及线性范围, 结果表明, 各成分峰在检测的浓度范围内均显示了良好的线性关系。将各对照品色谱峰以信噪比为 3:1 及 10:1 时各对照品的浓度分别确定为该方法的检测限和定量限(表 1)。

2.3.2 精密度试验 取混合对照品溶液, 按 2.1 项下色谱条件, 重复进样 6 次, 测定峰面积。香豆素、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛峰面积的 RSD 分别为 2.7%, 1.5%, 1.4%, 0.5%, 符合方法学验证要求, 表明仪器的精密度良好。

表1 峰面积与浓度的线性关系、检测限和定量限

化合物	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg	LOQ/ μg	LOD/ μg
香豆素	$Y = 19.981X + 32.277$	0.999 5	0.0132 ~ 0.132	0.006 7	0.002 3
肉桂醇	$Y = 23.085X + 23.521$	0.999 6	0.010 8 ~ 0.108	0.005 2	0.001 8
肉桂酸	$Y = 36.207X + 4.301 5$	0.999 6	0.025 7 ~ 0.257	0.007 8	0.002 8
桂皮醛	$Y = 51.185X - 115.56$	0.999 7	0.141 4 ~ 1.448	0.009 9	0.003 3

2.3.3 重复性试验 取桂枝小粒(广东肇庆)6份,每份约0.5 g,精密称定,按2.2.2项下供试品溶液制备方法制成供试品溶液,按2.1项下色谱条件进行测定,香豆素、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛含量的RSD分别为2.7%,1.7%,1.6%,1.5%,符合方法学验证要求,表明方法的重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取供试品溶液,在室温下放置,按2.1项下色谱条件,分别在0,2,4,8,12,24,48 h进样,测定峰面积,香豆素、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛在不同时间点峰面积的RSD分别为1.8%,

1.6%,1.2%,0.6%,符合方法学验证要求,表明供试品溶液在室温下48 h内稳定。

2.3.5 加样回收率试验 取已知含量的桂枝小粒粗粉(广东肇庆)6份,每份约0.25 g,精密称定,分别精密加入与样品含量相当的混合对照品溶液,按2.2.2项下方法制成供试品溶液,按2.1项下色谱条件进行测定,计算各成分的加样回收率和RSD,香豆素、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛的加样回收率分别为97.8%,97.2%,100.6%,99.6%。RSD分别为1.5%,1.1%,1.3%,1.7%。见表2。

表2 桂枝中4种成分的加样回收率试验

成分	样品称样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
香豆素	0.250 4	0.065 1	0.066	0.130 8	99.6	97.8	1.5
	0.251 6	0.065 4	0.066	0.130 4	98.5		
	0.249 6	0.064 9	0.066	0.127 9	95.6		
	0.257 8	0.067 0	0.066	0.131 4	97.6		
	0.251 3	0.065 3	0.066	0.130 6	98.9		
	0.253 4	0.065 9	0.066	0.129 8	96.8		
肉桂醇	0.250 4	0.042 6	0.043 2	0.084 3	96.7	97.2	1.1
	0.251 6	0.042 7	0.043 2	0.084 1	95.7		
	0.249 6	0.042 4	0.043 2	0.085 0	98.6		
	0.257 8	0.043 8	0.043 2	0.085 9	97.5		
	0.251 3	0.042 7	0.043 2	0.084 6	96.9		
	0.253 4	0.043 1	0.043 2	0.085 3	97.8		
肉桂酸	0.250 4	0.122 6	0.128 5	0.250 9	99.8	100.6	1.3
	0.251 6	0.123 2	0.128 5	0.253 3	101.2		
	0.249 6	0.122 3	0.128 5	0.250 5	99.8		
	0.257 8	0.126 3	0.128 5	0.253 1	98.7		
	0.251 3	0.123 1	0.128 5	0.254 1	101.9		
	0.253 4	0.124 1	0.128 5	0.255 4	102.1		
桂皮醛	0.250 4	1.682 6	1.737 6	3.397 7	98.7	99.6	1.7
	0.251 6	1.690 7	1.737 6	3.421 4	99.6		
	0.249 6	1.677 3	1.737 6	3.366 2	97.2		
	0.257 8	1.732 4	1.737 6	3.482 2	100.7		
	0.251 3	1.688 7	1.737 6	3.415 9	99.4		
	0.253 4	1.702 8	1.737 6	3.476 9	102.1		

2.4 样品的测定 取不同商品规格桂枝样品, 80 ℃ 减压干燥, 粉碎, 过 20 目筛, 取样品粉末约 0.5 g, 精密称定, 按 2.2.2 项下供试品溶液制备方法制成样品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进行测定, 计算不同规格桂枝样品中香豆素、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛的含量, 每个样品平行 3 份, 含量取平均值, 测定结果见表 3。

表 3 不同商品规格桂枝中的香豆素、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛的含量(n=3) mg·g⁻¹

产地	桂枝样品	香豆素	肉桂醇	肉桂酸	桂皮醛
广东肇庆	桂枝小粒	0.26	0.17	0.49	6.72
	桂枝中粒	0.15	0.14	0.33	5.07
	桂枝大粒	0.06	0.05	0.09	2.28
	桂枝统货	0.23	0.14	0.34	5.84
	桂糠	0.24	0.34	0.92	5.64
广东德庆	桂枝小粒	0.25	0.15	0.48	6.29
	桂枝中粒	0.17	0.13	0.28	4.98
	桂枝大粒	0.04	0.05	0.07	2.19
	桂枝统货	0.22	0.15	0.32	5.79
	桂糠	0.23	0.35	0.86	6.19
广东太平镇	桂枝小粒	0.24	0.14	0.48	6.27
	桂枝中粒	0.19	0.12	0.29	5.01
	桂枝大粒	0.06	0.07	0.08	2.20
	桂枝统货	0.21	0.12	0.28	5.24
	桂糠	0.23	0.31	0.87	5.68
广西桂平市	桂枝小粒	0.29	0.21	0.61	8.38
	桂枝中粒	0.19	0.16	0.43	6.21
	桂枝大粒	0.07	0.08	0.07	2.22
	桂枝统货	0.24	0.14	0.33	6.18
	桂糠	0.27	0.31	0.91	7.23
广西东兴市	桂枝小粒	0.31	0.21	0.62	8.51
	桂枝中粒	0.18	0.15	0.45	5.98
	桂枝大粒	0.05	0.09	0.07	2.19
	桂枝统货	0.26	0.15	0.35	6.07
	桂糠	0.27	0.33	0.96	7.71

3 讨论

桂枝小粒、桂枝中粒、桂枝大粒、桂枝统货、桂糠 5 个规格样品的典型色谱图色谱峰峰数及峰形一致, 但峰面积有差别。林佳等^[10]报道同一桂枝中皮部中桂皮醛、桂皮酸含量高于木质部, 桂枝大粒的木质部占大部分, 4 个成分的含量均低于其他规格的桂枝, 药理作用是否也低于其他规格的桂枝, 药效学等实验有待进行。

桂枝入药为樟科植物肉桂的嫩枝, 市场流通按其大小将商品药材分为 5 个不同规格, 桂枝小粒在商品流通中价格最贵, 也是入药首选, 从广东等地 5 批桂枝测定结果来看, 桂枝小粒中香豆素、肉桂醇、

肉桂酸、桂皮醛的含量明显高于其他规格桂枝, 随着桂枝直径的增大 4 个活性的含量逐渐降低, 活性成分含量的差异将会影响到药材的质量, 因此, 对桂枝生药不同规格进行质量分析和控制是必要的。

从 5 批不同规格桂枝样品结果分析中, 得出桂糠中 4 个活性成分的含量均 ≥ 桂枝小粒, 肉桂酸、肉桂醇的含量 > 桂枝小粒的含量, 这可能是由于桂糠大部分是桂枝皮, 而 4 个活性成分均存在于皮部, 故其含量较高, 由此我们得出评价一个药材质量的好坏^[11], 不能单单从化学层面上来评价, 要从外观性状、入药部位、浸出物等各方面综合考虑进行评价。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 259.

[2] 秦泗涟, 马利华, 贾晓斌, 等. 桂枝茯苓方物质基础及其制剂质量控制模式研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 270.

[3] 吴修红, 刘丽佳, 王喜军. 桂枝茯苓丸及组成中药化学成分研究进展[J]. 中医药学报, 2010, 38(6): 102.

[4] 陆颂规, 王岩, 彭红英, 等. 不同产地桂枝中桂皮醛的 GC 含量测定[J]. 中药材, 2007, 30(2): 174.

[5] 任守利, 刘塔斯, 林丽美, 等. HPLC 测定不同商品规格天麻中天麻苷与天麻昔元的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 55.

[6] 王宏洁, 赵海誉, 司南, 等. HPLC 测定不同种蟾皮药材中不同部位蟾蜍噻啉的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 66.

[7] 孟夏, 王延年, 庄贺飞, 等. HPLC 同时测定千金子不同部位中 4 种有效成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18): 91.

[8] 梁可, 崔思娇, 张琦, 等. UPLC 同时测定桂枝中 5 种活性成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(23): 3298.

[9] 陈行敏, 吴春敏, 谢敏. HPLC 同时测定肉桂中香豆素、桂皮醇、桂皮酸、桂皮醛的含量[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(21): 1664.

[10] 林佳, 徐丽珍, 刘江云, 等. 桂枝中桂皮醛、肉桂酸的含量与分布研究[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(33): 1784.

[11] 施学骄, 陈林, 彭成. 川芎不同商品规格化学成分比较研究[J]. 四川中医, 2011, 29(4): 58.

[责任编辑 顾雪竹]