

· 研究报告 ·

肉桂预煎液中有效成分肉桂酸的稳定性研究

李群英¹, 李盛建¹, 须添翼¹, 解李春子², 赵亮¹, 须秋萍¹ (1. 上海市宝山区罗店医院, 上海 201908; 2. 上海市宝山区大场镇祁连社区卫生服务中心, 上海 200444)

[摘要] **目的** 建立高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)法测定肉桂预煎液中有效成分肉桂酸的含量, 研究不同储存温度和时间对肉桂酸稳定性的影响。**方法** 采用 HPLC-DAD 法, 色谱柱为 Agilent Zorbax C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相: 0.1% 甲酸溶液-乙腈(60:40), 比例流速 1.0 ml/min, 柱温 25 °C; 进样量 5 μl。检测波长 275 nm; 肉桂预煎液分别置于低温(4 °C)、常温(25 °C)、高温(40 °C)条件下储存, 分别于第 0、1、3、7、14、21、30 天检测肉桂酸的含量。**结果** 肉桂酸在该条件下分离良好, 在 10.21~204.20 μg/ml 浓度范围内线性关系良好, 其精密度、重复性、稳定性和加样回收率均良好; 与储存第 0 天相比, 常温储存 21、30 d, 高温储存 14、21、30 d 测得肉桂预煎液中肉桂酸的含量均显著降低 ($P<0.01$), 其他组未发现明显变化 ($P>0.05$)。**结论** 该 HPLC-DAD 法稳定性、重复性好, 快速便捷; 肉桂代煎液冷藏 30 d 内有效成分肉桂酸比较稳定。

[关键词] 高效液相色谱法; 肉桂预煎液; 肉桂酸; 稳定性

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2020)03-0255-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202002002

Study on the stability of the effective components cinnamic acid in the decoction of cinnamon

LI Qunying¹, LI Shengjian¹, XU Tianyi¹, XIELI Chunzi², ZHAO Liang¹, XU Qiuping¹ (1. Department of Pharmacy, Luodian Hospital of Baoshan District, Shanghai 201908, China; 2. Qilian Community Health Service Center, Dachang Town, Baoshan District, Shanghai 200444, China)

[Abstract] **Objective** To develop a high-performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD) method for determination of cinnamic acid in the decoction of cinnamon, and investigate the effect of different storage temperature and time for the stability of cinnamic acid. **Methods** An HPLC-DAD method was established. Separation was performed on an Agilent Zorbax C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with 0.1% formic-acetonitrile acid water solution (60:40) as the mobile phase by isocratic elution. The flow rate was 1.0 ml/min, the temperature of column was 25 °C, the injection volume was 5 μl, the detective UV wave length was 275 nm. The decoction were stored under refrigerated temperature (4 °C) ambient temperature (25 °C) and high temperature (40 °C). The cinnamic acid was detected after 0, 1, 3, 7, 14, 21, 30 d. **Results** Cinnamic acid was successfully separated by this method, with good linear relationship between 10.21-204.20 μg/ml. The precision, repeatability, stability and recovery were good. Compared with the zero day, the content of cinnamic acid in the decoction of cinnamon decreased significantly ($P<0.01$) after 21 days and 30 days of ambient temperature storage and after 14 days, 21 days and 30 days of high temperature storage, but no significant change was found in the other groups ($P>0.05$). **Conclusion** This HPLC-DAD method had good stability and repeatability. Cinnamic acid was stable in the decoction of cinnamon for 30 days under refrigerated temperature.

[Key words] HPLC; decoction of cinnamon; cinnamic acid; stability

中药代煎使用自动煎药机, 机械化生产效率高, 加水量、煎药时间容易控制, 能做到煎药规范化、标准化、数字化管理^[1-2]。中药处方中经常有

“先煎”、“后下”的药材, 需要特殊煎法时特别处理, 一般先按要求煎好, 分装后保存, 用时加入到复方中混合。提取液的放置环境温度及时间长短都会影响到有效成分的稳定性从而降低复方汤剂的药效。目前中药“后下”品种预煎液尚无完整的质量控制过程, 缺少有效的质量监管措施, 难以保证中药代煎液临床疗效的一致性。

肉桂为樟科(Lauraceae)樟属植物肉桂

[基金项目] 宝山区科技创新资金(19-E-55); 宝山区罗店医院院级课题(19-A-1)

[作者简介] 李群英, 主管药师, Email: ldyyjk2015@sina.com

[通讯作者] 须秋萍, 主管中药师, Email: 277278962@qq.com

(*Cinnamomum cassia* Presl)的干燥树皮,因含有丰富的芳香族、萜类、脂肪族等挥发油化合物,长时间煎煮会导致药性损失,故中药传统煎煮方法将其作为“后下”品种。肉桂酸作为肉桂主要的药效成分,具有抗菌、抗癌、发汗等作用^[3-5]。本研究以“后下”品种肉桂预煎液为例,以有效成分含量变化作为观察指标,采用 HPLC 法测定有效成分肉桂酸的含量,研究不同储存温度及时间对肉桂袋装预煮液质量稳定性的影响,并为今后制订“后下”中药预煎液储存规范提供一定的科学依据。肉桂酸有多种含量测定方法,包括 HPLC 法^[6]、近红外定量校正法^[7]、液相色谱串联质谱法^[8]等,其中, HPLC 法具有较多优点,如速度快、分辨率高等^[9]。因此,笔者首先考虑使用 HPLC 法测定肉桂预煎液中有效成分肉桂酸的含量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

美国 Agilent 公司 1100 系列 HPLC 仪(在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器);瑞士梅特勒-托利多公司 METTLER AE240 型十万分之一电子天平;上海科导超声仪器公司 SB 3200-T 超声发生器。

1.2 试剂

肉桂酸对照品(批号:6648,上海诗丹德生物科技有限公司);甲醇和乙腈均为色谱纯(美国 Merck 公司),甲酸为色谱纯(SIGMA 公司),水为超纯水;肉桂预煎液(批号:191213,上海同济堂药业)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相:0.1% 甲酸溶液-乙腈(60:40),比例流速 1.0 ml/min,柱温 25 °C;进样量 5 μl;检测波长:275 nm,分析时间:16 min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液

精密称取肉桂酸对照品 10.21 mg,置于 10 ml 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度为 1.021 mg/ml 的肉桂酸对照品储备液,置冰箱 4 °C 保存。

2.2.2 供试品溶液

取适量肉桂预煎液,12 000×g 离心 5 min,取上清液滤过,取续滤液,即得。

2.3 系统适用性试验

取供试品和对照品溶液,按“2.1 色谱条件”项下进样分析,得液相色谱图,见图 1,肉桂酸的保留时间为 13.8 min,色谱峰分离度均大于 1.5,理论塔板数大于 5 000。结果表明,肉桂酸色谱峰与其他成分色谱峰得到较好的分离。

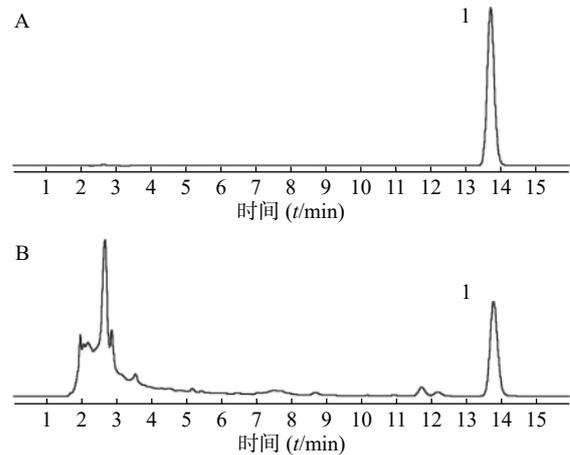


图 1 肉桂酸 HPLC 色谱图

A. 肉桂酸对照品; B. 肉桂预煎液样品; 1. 肉桂酸

2.4 线性关系考察

采用逐级稀释法,精密量取适量对照品溶液,置于 10 ml 容量瓶中,加入甲醇定容,得到肉桂酸的浓度分别为 10.21、20.42、51.05、102.10、204.20 μg/ml 系列的对照品溶液,按“2.1”项下进样。以浓度为横坐标(X),色谱峰面积值为纵坐标(Y)进行线性回归,得到线性回归方程: $Y=48.32X+8.819$, $r=0.9999$ 。结果表明肉桂酸在 10.21~204.20 μg/ml 范围内线性良好。

2.5 精密度试验

取低、中、高 3 个浓度(20.42、51.05、102.10 μg/ml)对照品溶液,按“2.1”项下进样分析,1 d 内重复测定 3 次,连续 3 d 测定,记录色谱峰面积,考察日内和日间精密度,结果肉桂酸日内精密度 RSD 值分别为 0.36%、0.96%、0.81%($n=3$),日间精密度 RSD 值分别为 1.67%、1.20%、1.10%;结果显示该方法精密度符合方法学要求,仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一批次肉桂预煎液,共 6 份,按“2.2.2”项下方法操作制备供试品溶液,按“2.1”项下进样分析,记录峰面积,结果肉桂酸预煎液中肉桂酸峰面积的 RSD 为 1.12%,表明该方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验

按“2.2.2”项下方法操作制备供试品溶液,分别

在 0、4、8、12、24、48 h 测定供试品溶液中肉桂酸的含量, 考察供试品常温下放置稳定性, 肉桂酸 RSD 为 1.13%, 结果表明样品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验

精密吸取 1 ml 肉桂预煎液, 置于含 51.05 μg 肉桂酸(氮气挥干)离心管中, 涡旋 30 s, 平行操作 5 份, 按“2.2.2”项下方法操作制备供试品溶液, 按“2.1”项下进样分析, 计算加样回收率, 结果如表 1 所示, 肉桂酸的平均加样回收率为 98.9%(RSD=1.9%, $n=5$), 结果表明该方法回收率良好。

2.9 肉桂酸长期稳定性试验

取 3 袋肉桂预煎液于当日(第 0 天)测定肉桂酸的含量, 按“2.2.2”项下方法操作制备溶液, 按“2.1”项下进样分析, 以峰面积外标法计算含量。剩余袋装药液分组保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ (冷藏组)、25 $^{\circ}\text{C}$ (常温组)、40 $^{\circ}\text{C}$ (高温组)恒温条件下, 1、3、7、14、21、30 d 后重复上述步骤, 检测肉桂酸的含量。应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 数据以($\bar{x} \pm s$)表示。多组间差异比较采用单因素方差分析, 两组间差异比较采用 LSD 法, 检验水准(α)为 0.05。结果如表 2 所示, 与储存第 0 天相比, 常温储存 21、30 d, 高温温储存 14、21、30 d 测得的肉桂酸含量均显著降低($P < 0.01$), 其他组未发现明显变化($P > 0.05$)。

3 讨论

中药材从固体饮片变为液体煎剂, 质量处于不

稳定状态, 其后期的质控和管理显得尤为重要^[10]。本实验以本院常用“后下”品种肉桂为例, 建立有效成分肉桂酸的 HPLC 含量测定方法, 在所确定的实验条件下, 该分析方法快速、准确、方便; 应用该方法对其不同放置条件和时间的稳定性进行系统考察, 为制订本院“后下”品种预煎液内部质量控制标准提供了实验依据。

预实验中比较了水、甲醇、乙腈、甲酸、铵盐溶液等不同的流动相体系, 最终选择 0.1% 甲酸-乙腈(60:40)作为流动相进行等度洗脱, 样品中肉桂酸的待测成分峰形较好, 与其他成分可达到基线分离。通过 DAD 进行全波长扫描分析肉桂酸的紫外光谱, 275 nm 波长下肉桂酸有较高吸收峰, 出峰处无干扰成分, 因此选用 275 nm 作为检测波长。

将有效成分含量变化作为观察指标, 兼顾普通患者家庭环境温度, 分析考察放置环境和时间对肉桂预煎液稳定性的影响。结果发现冷藏(4 $^{\circ}\text{C}$)储存的药液在 30 d 内基本稳定; 常温(25 $^{\circ}\text{C}$)储存 21、30 d 后, 肉桂酸的浓度显著下降, 分别降到最初浓度的 89.9% 和 80.4%; 高温(40 $^{\circ}\text{C}$)储存 14、21、30 d 后, 肉桂酸的浓度分别降到最初浓度的 93.7%、82.3% 和 70.5%。由此可见, 低温保存肉桂酸较稳定, 冷藏有利于肉桂预煎液的稳定性。

综上, 本实验建立的分析方法为肉桂预煎液的质量控制提供了一种可靠的方法, 为后续制订含量的质量控制范围奠定了基础, 并为今后制订“后下”中药预煎液储存规范提供了一定的科学依据。

表 1 加样回收试验结果

样品含量($m/\mu\text{g}$)	对照液加入量($m/\mu\text{g}$)	测得量($m/\mu\text{g}$)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
47.68	51.05	97.02	96.7	98.9	1.9
47.68	51.05	97.64	97.9		
47.68	51.05	97.89	98.4		
47.68	51.05	99.09	100.7		
47.68	51.05	99.30	101.1		

表 2 不同储存条件下肉桂预煎液中肉桂酸含量的变化($\bar{x} \pm s$, $n=3$, $\mu\text{g}/\text{ml}$)

组别	储存时间(t/d)						
	0	1	3	7	14	21	30
冷藏组(4 $^{\circ}\text{C}$)	47.27 \pm 0.66	47.09 \pm 0.73	47.64 \pm 1.08	46.51 \pm 0.65	46.13 \pm 0.73	46.33 \pm 0.68	46.28 \pm 1.14
常温组(25 $^{\circ}\text{C}$)	47.27 \pm 0.66	47.66 \pm 0.27	47.54 \pm 1.14	47.62 \pm 0.63	47.15 \pm 0.69	42.49 \pm 0.54**	38.02 \pm 0.60**
高温组(40 $^{\circ}\text{C}$)	47.27 \pm 0.66	47.30 \pm 0.22	47.18 \pm 0.61	47.07 \pm 0.69	44.38 \pm 0.66**	38.90 \pm 0.41**	33.31 \pm 0.56**

** $P < 0.01$, 与第 0 天比较。

【参考文献】

[1] 王文祎, 杨瑶琨, 李梦, 等. 煎药机与传统煎煮法比较研究进展[J]. *西部中医药*, 2016, 29(2): 143-145.
 [2] 张玲. 中药煎药机与传统煎药方法的效果对比分析[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2019, 6(77): 167.
 [3] 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.
 [4] 陈旭, 刘畅, 马宁辉, 等. 肉桂的化学成分、药理作用及综合应用研究进展[J]. *中国药房*, 2018, 29(18): 2581-2584.
 [5] 杨宽. 肉桂酸类衍生物的结构修饰及活性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2019.

[6] 杨羽君, 鄂秀辉. HPLC法测定不同外观形态的桂枝中肉桂酸的含量[J]. *天津药学*, 2019, 31(1): 4-8.
 [7] 解育静, 张家楠, 朱冬宁, 等. 肉桂中4种成分近红外定量分析模型的建立[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(2): 119-123.
 [8] 熊德庆. LC-MS测定黄芪桂枝五物汤中3种活性成分的含量[J]. *贵州医药*, 2018, 42(11): 1396-1397.
 [9] 李盛建, 钱跣, 周瑾, 等. HPLC法测定扶正平消胶囊中吴茱萸次碱的含量研究[J]. *药学实践杂志*, 2018, 36(3): 274-276.
 [10] 许盈, 韦曦, 覃洁, 等. 不同贮存条件下中药煎煮液的微生物限度及pH值变化[J]. *广西医学*, 2018, 40(10): 1139-1140.

[收稿日期] 2020-02-03 [修回日期] 2020-03-09
 [本文编辑] 李睿旻

(上接第 231 页)

三者混合物进行鉴定。综上, SERS 在对结构类似物进行定性鉴别等方面具有巨大优势。

【参考文献】

[1] 兰燕娜, 周玲. 表面增强拉曼光谱[J]. *南通工学院学报(自然科学版)*, 2004, 3(2): 21-23.
 [2] 王明栋, 王宗廷, 王凤英. 表面增强拉曼光谱技术研究进展[J]. *化学分析计量*, 2016, 25(1): 104-107.
 [3] 白敏. 表面增强拉曼光谱技术在环境污染检测中的应用[J]. *中国资源综合利用*, 2019, 37(8): 191-193.
 [4] 应方, 梁苗苗, 李剑锋. 有机磷农药残留的表面增强拉曼光谱快速检测[J]. *光散射学报*, 2019, 31(2): 131-135.
 [5] 王海波. 表面增强拉曼光谱用于食品检测的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(15): 322-329.
 [6] 罗丹, 周光明, 陈蓉, 等. 表面增强拉曼光谱法分析软饮料中的阿斯巴甜[J]. *分析测试学报*, 2019, 38(3): 328-333.
 [7] 张晨曦, 孙波, 刘佳佳, 等. 表面增强拉曼光谱在肿瘤实验室诊断中的应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(12): 1502-1505, 1525.
 [8] ZONG C, XU M X, XU L J, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy for bioanalysis: reliability and challenges[J]. *Chem Rev*, 2018, 118(10): 4946-4980.
 [9] ZHANG Y, ZHAO S J, ZHENG J K, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) combined techniques for high-performance detection and characterization[J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2017, 90: 1-13.
 [10] WU M R, LI H, LV D, et al. Dynamic-SERS spectroscopy for the *in situ* discrimination of xanthine analogues in ternary mixture[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(23): 5569-5579.

[11] 翟剑凤. 氨茶碱在支气管炎治疗中的临床效果研究[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2019, 6(59): 152-153.
 [12] 郭晓玲, 崔继文, 李锦莲, 等. 聚苏氨酸修饰铅芯电极同时测定尿酸、黄嘌呤和次黄嘌呤[J]. *佳木斯大学学报(自然科学版)*, 2019, 37(4): 621-623.
 [13] 张先平. 己酮可可碱联合治疗急性脑梗死的临床疗效[J]. *中国现代医生*, 2007, 45(6): 44-45.
 [14] 周绪云. 一测多评法测定水蛭中尿酸、次黄嘌呤、黄嘌呤和尿苷的含量[J]. *中国药品标准*, 2019, 20(4): 339-345.
 [15] LEE P C, MEISEL D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols[J]. *J Phys Chem*, 1982, 86(17): 3391-3395.
 [16] XU L J, LEI Z C, LI J X, et al. Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy detection of DNA with single-base sensitivity[J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(15): 5149-5154.
 [17] BIAO L H, TAN S N, WANG Y L, et al. Synthesis, characterization and antibacterial study on the chitosan-functionalized Ag nanoparticles[J]. *Mater Sci Eng: C*, 2017, 76: 73-80.
 [18] LO T H, SHIH P Y, WU C H. The response of UV/blue light and ozone sensing using Ag-TiO₂ planar nanocomposite thin film[J]. *Sensors (Basel)*, 2019, 19(23): E5061.
 [19] 王存, 孟丽, 惠俊敏. 聚咪唑/氮化碳新型纳米复合材料修饰电极对尿酸、黄嘌呤和次黄嘌呤的同时检测[J]. *高等学校化学学报*, 2019, 40(3): 431-438.
 [20] 聂吉语, 李荣, 王颖, 等. 可可碱、茶碱和咖啡碱的快速测定及其色谱保留行为[J]. *食品科学*, 2019, 40(20): 318-324.
 [21] 唐喆, 管静. RP-HPLC同时测定万古霉素和茶碱的血清药物浓度[J]. *中国执业药师*, 2015, 12(10): 7-10.

[收稿日期] 2020-01-03 [修回日期] 2020-02-24
 [本文编辑] 李睿旻