

HPLC 同时测定桑叶中绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素含量

邸学,谷丽艳,王海波,许亮,包琳琳
(辽宁中医药大学,辽宁 大连 11660)

[摘要] 目的:建立桑叶中绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素含量的方法,对不同来源的桑叶药材质量进行评价。方法:HPLC 同时测定 Thermo ODS 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),柱温 35℃,流动相为磷酸乙腈溶液(0.1%,A)和磷酸(0.16%)-三乙胺(0.18%)水溶液(B)梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 360 nm。结果:桑叶中绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素 5 种活性成分在 60 min 内分离效果理想,线性范围分别为 0.32~13.73 μg ($r=0.9996$),0.05~3.13 μg ($r=0.9998$),0.03~9.50 μg ($r=0.9994$),0.03~5.60 μg ($r=0.9995$),0.001~0.05 μg ($r=0.9997$);平均加样回收率在 99.61%~106.09%,RSD≤2.8%。结论:该方法操作简单,结果准确,专属性强,可为桑叶药材的质量控制标准提高提供参考。

[关键词] 桑叶;绿原酸;芦丁;异槲皮苷;紫云英苷;槲皮素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0092-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150092

Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Rutin, Isoquercetin, Astragaloside and Quercetin in Mori Folium by HPLC

DI Xue, GU Li-yan, WANG Hai-bo, XU Liang, BAO Lin-lin

(School of Pharmaceutical Sciences, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC method for simultaneous determination of chlorogenic acid, rutin, isoquercetin and astragaloside quercetin in Mori Folium. **Method:** A HPLC equipped with a Thermo ODS

[收稿日期] 20130715(007)

[第一作者] 邸学,硕士,实验师,从事中药品种鉴定评价研究,E-mail: dix_email@163.com

[参考文献]

[1] 南京中医药大学. 中药大辞典. 下册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2006:2724.

[2] Séverine V D, Pascal G, Patrick F. Qualitative and quantitative saponin contents in five sea cucumbers from the Indian Ocean[J]. Marine Drugs, 2010, 8(1):173.

[3] 张淑瑜, 汤海峰, 刘世君, 等. 海参中海参烷型皂苷的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2008, 26(5):321.

[4] Xiaoqian Hu, Yuming Wang, Jingfeng Wang, et al. Dietary saponins of sea cucumber alleviate orotic acid-induced fatty liver in rats via PPAR α and SREBP-1c signaling[J]. Lipids in Health and Disease, 2010, 9(1):25.

[5] 廖玉麟. 中同动物志棘皮动物门海参纲[M]. 北京:科学出版社, 1997:108.

[6] 刁小琴, 田晓菊, 关海宁, 等. 以齐墩果酸为标准品测定大豆皂甙的研究[J]. 中国油脂, 2009(11):53.

[7] 张小鸿, 吴杨峥, 徐先祥. 不同显色剂对牛膝总皂苷含量测定的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21):113.

[8] 董平. 革皮氏海参皂苷化合物的分离鉴定、结构修饰及活性研究[D]. 青岛:中国海洋大学, 2008.

[9] 董平, 薛长虹, 盛文静, 等. 海参中总皂苷含量测定方法的研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2008, 27(1):28.

[责任编辑 顾雪竹]

(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column and UV detection was used. The column temperature was at 35 °C and the flow rate 1.0 mL · min⁻¹. The mobile phase was consisted of phosphoric acid in acetonitrile (0.1%, A) and phosphoric acid (0.16%) and triethylamine (0.18%) in water (B) with gradient elution. The detection wavelength was set at 360 nm. **Result:** The good separation of five flavonoids was achieved within 60 min. Linear calibration curves were obtained with 0.32-13.73 μg (*r*=0.999 6), 0.05-3.13 μg (*r*=0.999 8), 0.03-9.50 μg (*r*=0.999 4), 0.03-5.60 μg (*r*=0.999 5), 0.001-0.05 μg (*r*=0.999 7); the average recovery was 99.61%-106.09%, RSD ≤ 2.8%. **Conclusion:** The proposed method is simple, accurate, repeatable, and can be used for quality control as well as a powerful tool to evaluate the processing of Mori Folium.

[**Key words**] Mori Folium; chlorogenic acid; rutin; isoquercetin; astragalgin; quercetin

桑叶始载于《神农本草经》,为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶。性寒、味甘苦,具有疏散风热、清肺润燥、清肝明目的功能。在2010年版《中国药典》中,规定了芦丁的含量限量。桑叶中对芦丁、异槲皮苷或槲皮素等指标的含量测定已有报道^[1-5]。桑叶含有黄酮、生物碱、多糖、维生素以及多种人体所需的氨基酸等成分^[6-9],其中黄酮类成分如芦丁、槲皮素、异槲皮苷等具有降血糖、降血脂、抗氧化、抗肿瘤和抗菌等药理作用。紫云英苷和绿原酸也是桑叶中的主要活性成分。

本文采用 HPLC 测定桑叶中绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素 5 种活性成分的含量。不仅可用于桑叶药材质量控制标准的提高,也可为含桑叶的成药制剂质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器 1100 系列高效液相色谱仪(安捷伦仪器有限公司),RPL-D2000 型柱温箱(大连日普利科技仪器有限公司),ACCULAB ALC-110.4 型 1/万天平 and CP225D 型 1/10 万天平(Sartorius),KQ5200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),圣叶 RE-3000 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

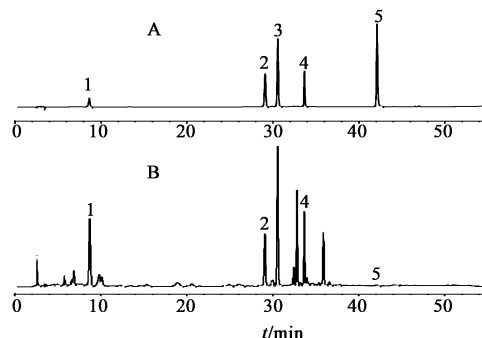
1.2 试剂 绿原酸(MUST-12031401)、芦丁(MUST-10060)、异槲皮苷(MUST-11121801)、紫云英苷(MUST-11092001)、槲皮素(MUST-100081)对照品均购于成都曼思特生物科技有限公司,经检验纯度均超过 98.5%;试验中所用甲醇、乙腈为色谱纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。药材来源见表 1。见图 1。

表 1 桑叶药材来源

No.	购买地	产地	No.	购买地	产地
1	安徽亳州药材市场	安徽	4	大连药房Ⅲ	山西
2	大连药房 I	河南	5	沈阳药房	安徽
3	大连药房 II	四川	6	大连药房 IV	山西

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Thermo ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 35 °C,流动相 0.1% 磷酸乙腈溶液(A)与磷酸(0.16%)-三乙胺(0.18%)-水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 12% ~ 13% A, 22 ~ 40 min, 15% ~ 35% A, 50 ~ 55 min, 55% A),检测波长 360 nm,流速 1.0 mL · min⁻¹,进样量 10 μL。



1. 绿原酸; 2. 芦丁; 3. 异槲皮苷; 4. 紫云英苷; 5. 槲皮素

A. 对照品; B. 桑叶供试品

图 1 桑叶样品 HPLC

2.2 对照品溶液配制 分别精密称取对照品绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素适量,甲醇溶解并定容,分别配成各含 2 g · L⁻¹ 的对照品储备溶液。再分别精密量取适量的对照品溶液,置 5 mL 量瓶中,混合均匀,即得到不同浓度的混合对照品溶液,备用。

2.3 供试品溶液制备 将桑叶药材粉碎,过 40 目筛。称取桑叶粗粉 1.0 g,精密称定,置于锥形瓶中,加入 75% 乙醇 25 mL,超声提取 2 次,每次 30 min。提取液过滤,合并,石油醚(30 ~ 60 °C)萃取 2 次,50 mL/次,弃去石油醚层,乙醇层溶液减压浓缩,再用甲醇溶解,转移至 2 mL 量瓶中,甲醇定容,即得。

2.4 线性关系考察 将 2.2 项下混合对照品溶液,用甲醇逐级稀释成系列浓度的混合对照品溶液,分别进样 10 μL,以峰面积为纵坐标,以相应的对照品质量为横坐标,绘制标准曲线。绿原酸线性范围

0.32 ~ 15.0 μg, 回归方程 $Y = 314.56X + 101.43$ ($r = 0.9998$); 芦丁线性范围 0.05 ~ 3.13 μg, 回归方程 $Y = 1219.7X + 81.636$ ($r = 0.9999$); 异槲皮苷线性范围 0.03 ~ 9.50 μg, 回归方程 $Y = 1404.6X + 112.73$ ($r = 0.9997$); 紫云英苷线性范围 0.03 ~ 5.60 μg, 回归方程 $Y = 1190.3X + 102.81$ ($r = 0.9997$); 槲皮素线性范围 0.001 ~ 0.05 μg, 回归方程 $Y = 5015.1X - 1.3548$ ($r = 0.9998$)。

2.5 精密度试验 精密吸取供试品溶液, 重复进样 6 次, 测定峰面积。结果绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素峰面积的 RSD 分别为 2.2%, 1.4%, 1.3%, 1.5%, 2.6%。结果表明精密度良好。

2.6 稳定性试验 取桑叶供试品溶液分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 测定峰面积。根据峰面积, 计算各成分含量。样品中绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素含量的 RSD 分别为 2.1%, 1.9%, 1.7%, 2.1%,

1.6%, 表明样品溶液在 8 h 内基本稳定。

2.7 重复性试验 取桑叶粉末 1.0 g, 按照 2.3 项方法平行制备供试品溶液 6 份, 按 2.1 项色谱条件进样测定, 结果绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素含量的 RSD 分别为 1.4%, 1.5%, 1.6%, 2.1%, 2.7%。结果表明, 本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取桑叶粉末约 0.5 g, 精密称定, 平行 6 份, 分别加入一定量的绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素对照品溶液适量, 按 2.3 项下桑叶供试品制备方法制备, 再按 2.1 项色谱条件测定其成分含量, 计算其平均加样回收率和 RSD, 见表 2。

2.9 样品含量测定 分别精密称取不同来源的桑叶粗粉, 按照 2.3 方法制备供试品溶液, 平行 3 份, 按 2.1 项色谱条件进样, 测定峰面积, 计算绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素的含量。结果见表 3。

表 2 桑叶药材中 5 种成分加样回收率

成分	称样量/g	样品量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
绿原酸	0.524 1	0.627 2	0.500 0	1.147 9	104.14	106.09	1.3
	0.500 9	0.599 4	0.500 0	1.133 9	106.90		
	0.530 1	0.634 4	0.500 0	1.172 3	107.58		
	0.503 4	0.602 4	0.500 0	1.136 9	106.90		
	0.526 8	0.630 4	0.500 0	1.163 2	106.55		
	0.523 8	0.626 8	0.500 0	1.149 2	104.48		
芦丁	0.524 1	0.123 5	0.120 0	0.248 7	104.33	101.55	2.8
	0.500 9	0.118 0	0.120 0	0.235 6	98.00		
	0.530 1	0.124 9	0.120 0	0.247 7	102.33		
	0.503 4	0.118 6	0.120 0	0.236 2	98.00		
	0.526 8	0.124 1	0.120 0	0.246 9	102.33		
	0.524 6	0.123 6	0.120 0	0.248 8	104.33		
异槲皮苷	0.524 1	0.194 8	0.200 0	0.392 3	98.74	99.61	2.8
	0.500 9	0.186 2	0.200 0	0.377 0	95.42		
	0.530 1	0.197 0	0.200 0	0.401 1	102.05		
	0.503 4	0.187 1	0.200 0	0.388 5	100.68		
	0.526 8	0.195 8	0.200 0	0.399 9	102.05		
	0.521 6	0.193 9	0.200 0	0.391 4	98.74		
紫云英苷	0.524 1	0.123 3	0.120 0	0.248 5	104.33	101.55	2.6
	0.500 9	0.117 9	0.120 0	0.235 5	98.00		
	0.530 1	0.124 7	0.120 0	0.247 5	102.33		
	0.503 4	0.118 5	0.120 0	0.243 6	104.33		
	0.526 8	0.124 0	0.120 0	0.246 8	102.33		
	0.522 1	0.122 9	0.120 0	0.240 5	98.00		
槲皮素	0.524 1	0.006 9	0.008 0	0.015 1	103.43	103.43	1.5
	0.500 9	0.006 6	0.008 0	0.014 7	101.57		
	0.530 1	0.006 9	0.008 0	0.015 4	105.29		
	0.503 4	0.006 6	0.008 0	0.014 9	103.43		
	0.526 8	0.006 9	0.008 0	0.015 0	101.57		
	0.521 4	0.006 8	0.008 0	0.015 3	105.29		

表3 桑叶药材中5种成分含量

mg·g⁻¹

No.	商品药材来源	绿原酸	芦丁	异槲皮苷	紫云英苷	槲皮素	成分总量
1	亳州药材市场	0.457 4	0.067 8	0.084 2	0.072 7	0.004 6	0.686 7
2	大连药房 I	0.798 5	0.128 1	0.187 0	0.121 5	0.008 6	1.243 7
3	大连药房 II	0.508 1	0.046 6	0.057 4	0.029 5	0.005 0	0.646 6
4	大连药房 III	0.739 7	0.117 9	0.121 9	0.050 1	0.013 4	1.043 0
5	沈阳药房	0.896 2	0.161 7	0.327 3	0.194 6	0.014 3	1.594 1
6	大连药房 IV	1.196 7	0.235 6	0.371 7	0.235 3	0.013 1	2.052 4

3 讨论

3.1 提取方法的选择 根据文献记载,桑叶中黄酮类成分为主要活性成分,提取方法多采用超声法或回流法,本实验采用超声法提取,该方法操作简便,提取效率高。桑叶中含色素等极性杂质较多,为降低检测基线信号,避免污染色谱柱,本实验采用石油醚(30~60℃)对其进行萃取消除。

3.2 流动相与检测波长的选择 芦丁、异槲皮苷的苷元均为槲皮素,极性非常相近。首先选用了甲醇-0.4%磷酸水溶液(v/v)作为流动相,芦丁、异槲皮苷无法达到基线分离,后流动相改用磷酸乙腈溶液(0.1%,A)和磷酸(0.16%)-三乙胺(0.18%)-水溶液(B)(v/v),梯度洗脱,混合对照品和样品中5种成分均达到了基线分离。经5种成分紫外光谱扫描,选择256,360nm两个吸收峰分别进行检测,检测结果显示,在360nm下基线平稳,各色谱峰峰形良好,故检测波长定为360nm。

采用HPLC法同时测定桑叶中绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素5种成分含量,方法的精密度,重复性,稳定性良好,且具有良好的线性关系。方法具有很好的适用性,结果准确,可以实现桑叶中多指标成分的含量测定,为桑叶药材的质量控制标准提高提供参考。

在实验测定的6批样品中,不同药材间5种成分含量差别很大,结果表明6号样品的桑叶5种成分含量最高,3号样品的各成分含量较低。对比分析发现芦丁成分的含量与其余4种成分的相关性较差,其含量差别在5倍,其含量变化不能全面反映其

余4种成分的含量变化情况。建立起含有5种成分的药材多指标含量测定方法,对保证药物质量,维护临床用药安全具有良好的意义。

[参考文献]

[1] 孙莲,张丽静,孟磊,等. 高效液相色谱法测定桑叶中的芦丁[J]. 内蒙古中医药,2004,23(2):27.

[2] 宋秀荣,杨更亮,李杰,等. 毛细管电泳法测定桑叶中的有效成分[J]. 中成药,2000,22(2):158.

[3] 严安定,袁野,吴亮,等. HPLC法同时测定桑叶中芦丁、异槲皮苷、紫云英苷的含量[J]. 安徽医药,2011,15(3):296.

[4] 贾冬冬,李淑芬,杨鸿玲. RP-HPLC法测定桑叶中的芦丁和异槲皮苷含量[J]. 食品科学,2008,29(8):499.

[5] 熊丽,陈晓辉,梁健,等. RP-HPLC同时测定田基黄药材中异槲皮苷、槲皮苷和槲皮素的含量[J]. 药物分析杂志,2008,28(10):1619.

[6] Doi K, Kojima T, Makino M, et al. Studies on the constituents of the leaves of *Morus alba* L[J]. Chemical & pharmaceutical bulletin,2001,49(2):151.

[7] 邹盛勤. 桑叶的化学成分、药理活性及应用研究进展[J]. 宜春学院学报,2002,24(4):52.

[8] 陈福君,卢军,张永煜. 桑的药理研究(I)—桑叶降血糖有效组分对糖尿病动物糖代谢的影响[J]. 沈阳药科大学学报,1996,13(1):24.

[9] 李玉山. 绿原酸在天然植物中的分布和提取纯化工艺研究进展[J]. 解放军药科学学报,2012,28(4):355.

[责任编辑 顾雪竹]