

HPLC同时测定桑白皮中4种成分的含量

闫辉, 高欢, 崔清华, 容蓉, 吕青涛*
(山东中医药大学药学院, 济南 250355)

[摘要] 目的:建立桑白皮中绿原酸、东茛菪内酯、白藜芦醇、桑色素含量测定的方法。方法:采用 EclipseSB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.01% 磷酸梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 285 nm。结果:绿原酸、东茛菪内酯、白藜芦醇和桑色素分别在 6.4 ~ 76.8 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 5.15 ~ 61.8 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 6$), 1.11 ~ 13.32 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 6$), 2.76 ~ 33.12 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 7$) 线性关系良好, 平均加样回收率在 98.4% ~ 99.4% (RSD ≤ 2%), 供试品溶液在 12 h 内稳定, 且该方法重复性良好;通过对 5 批桑白皮药材的测定, 结果发现河南(批号 140401)样品中绿原酸、东茛菪内酯、桑色素含量均较高, 湖北(批号 D5090202)样品中白藜芦醇含量相对最高。结论:该含量测定方法精密度高, 准确度高, 适合桑白皮中 4 种成分的含量测定。

[关键词] 桑白皮; 绿原酸; 东茛菪内酯; 白藜芦醇; 桑色素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)05-0053-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017050053

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161207.1107.006.html>

[网络出版时间] 2016-12-07 11:07

Simultaneous Determination of Four Ingredients in Mori Cortex by HPLC

YAN Hui, GAO Huan, CUI Qing-hua, RONG Rong, LYU Qing-tao*

(School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for quantitative determination of chlorogenic acid, scopoletin, resveratrol and morin in Mori Cortex. **Method:** An Eclipse-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was adopted with acetonitrile-0.01% phosphoric acid as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 285 nm and the column temperature was 30 °C. **Result:** The calibration curves showed good linear relationship in the ranges of 6.4-76.8 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$) for chlorogenic acid, 5.15-61.8 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 6$) for scopoletin, 1.11-13.32 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 6$) for resveratrol and 2.76-33.12 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 7$) for morin. The average recoveries were between 98.4% and 99.4% (RSD ≤ 2%). The sample solution was steady within 12 h, and this method showed good repeatability. Through the determination of 5 batches of Mori Cortex samples, results showed that the contents of chlorogenic acid, scopoletin and morin were higher in Henan samples (batch number 140401); and the content of resveratrol was higher in Hubei samples (batch number D5090202). **Conclusion:** The method is precise and accurate for determination of four ingredients in Mori Cortex.

[Key words] Mori Cortex; chlorogenic acid; scopoletin; resveratrol; morin

桑白皮为桑科植物桑的干燥根皮。秋末叶落时 至次春发芽前采挖根部, 刮去黄棕色粗皮, 纵向

[收稿日期] 20160413(010)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2014ZX09509001-001);山东省高校中医药抗病毒协同创新中心(XTCX2014C01-02)

[第一作者] 闫辉, 在读硕士, 从事天然药物化学成分及化学分析研究, Tel:18765802136, E-mail:1305420728@qq.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

剖开,剥取根皮,晒干;具有泻肺平喘,利水消肿的功效;主要用于肺热咳喘,水肿胀满尿少,面目肌肤浮肿^[1]。不少研究表明桑白皮具有抗病毒、抗肿瘤活性、抗菌抗炎抗氧化、咳平喘、降糖的功效^[2-6]。近年来研究发现,桑白皮中主要含有黄酮,香豆素,2-芳基苯并呋喃类,苯丙素类,萜类等化合物^[7-9]。谢臻等^[10]测定了桑白皮中绿原酸的含量;王甫成等^[11]建立了同时测定桑白皮中绿原酸、东莨菪内酯、桑辛素的 HPLC 方法;孙莲等^[12]采用 HPLC 方法建立同时测定桑枝中 6 种成分含量的方法;研究表明绿原酸、东莨菪内酯、白藜芦醇、桑色素均具有抗癌抗病毒活性,目前为止同时测定这 4 种成分含量的相关文献未见报道。本实验采用 HPLC 方法同时测定桑白皮中绿原酸、东莨菪内酯、白藜芦醇、桑色素的含量,并对 4 个产地不同批次的桑白皮药材中 4 种成分的含量进行了测定对比,旨在为桑白皮的进一步研究提供理论依据。

1 材料

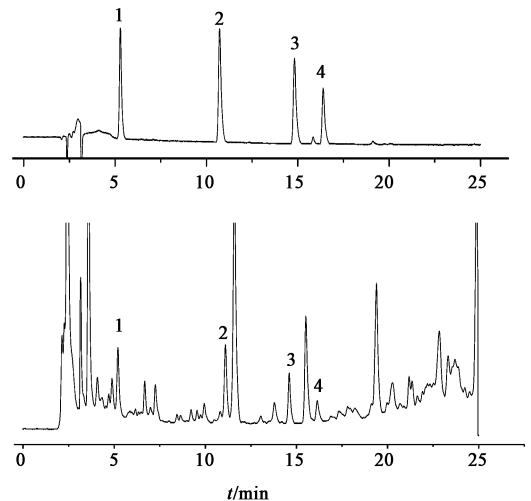
1200 型高效液相色谱仪,配有 DAD 检测器、四元泵、自动进样器、柱温箱、在线真空脱气机(美国安捷伦科技有限公司);AE240 型 1/10 万电子天平(瑞士梅特勒公司);PTF-A100 型电子分析天平(福州华志科学仪器有限公司);KQ-250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

对照品绿原酸(批号 MUST-15041814),白藜芦醇(批号 MUST-15052611),桑色素(批号 MUST-15030402)均购自成都曼斯特生物科技有限公司,东莨菪内酯(批号 D-020-140728)购自北京宝赛希望生物科技有限公司,所有对照品经 HPLC 检测纯度均 >98%。不同批次的桑白皮药材(产地及批号分别为江苏 150301;湖北 D5090202;安徽 14092305,15031401;河南 140401),经山东中医药大学药学院徐凌川教授鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* 的干燥根皮。乙腈、磷酸(色谱纯),水为超纯水,其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Eclipse SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.01% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 25 min, 15% ~ 40% B),柱温 30 °C,流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 285 nm,进样量 10 μL。混合对照品及供试品色谱见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 分别称取绿原酸、东莨菪内酯、白藜芦醇和桑色素对照品适量,精密称定,用



A. 对照品溶液; B. 桑白皮样品供试品溶液(批号 15031401); 1. 绿原酸; 2. 东莨菪内酯; 3. 白藜芦醇; 4. 桑色素

图 1 桑白皮 HPLC 色谱

Fig. 1 HPLC chromatography of Mori Cortex

甲醇溶解并定容至刻度,即得绿原酸、东莨菪内酯、白藜芦醇、桑色素分别为 1.28, 1.03, 0.222, 0.552 g · L⁻¹ 的对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取桑白皮粉末(过 40 目筛)2.0 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 100 mL,密塞,称定质量,超声 45 min(功率 200 W,频率 40 kHz),放置冷却,再次称定质量,并用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 50 mL,蒸干,残渣加甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,备用。

2.4 线性关系的考察 精密量取 2.2 项下各对照品储备液 2.5 mL 置于同一 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度摇匀,配成混合对照品溶液。分别取混合对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,按 2.1 项下色谱条件进行测定,以进样浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程、相关系数及线性范围,结果见表 1。

表 1 4 种成分的线性关系

Table 1 Linear relationship of four components

成分	回归方程	r	线性范围/mg · L ⁻¹
绿原酸	Y = 9.247X - 6.921	0.999 9	6.4 ~ 76.8
东莨菪内酯	Y = 13.028X + 10.386	0.999 6	5.15 ~ 61.8
白藜芦醇	Y = 48.853X + 7.308	0.999 6	1.11 ~ 13.32
桑色素	Y = 13.128X - 1.445	0.999 7	2.76 ~ 33.12

2.5 精密度试验 取 2.2 项下对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件,连续测定 6 次,记录 4 种成分的峰

面积, RSD 分别为 0.3%, 1.1%, 0.3%, 0.4%, 表明该方法精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 10, 12 h 进样分析, 记录 4 种成分的峰面积, 其 RSD 分别为 1.5%, 1.9%, 1.2%, 0.3%, 表明供试品在 12 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一批号(15031401)的桑白皮粉末(过 40 目筛)约 2 g, 精密称定 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, 4 种成分的平均质量分数为 94.2, 83.3, 13.1, 27.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.2%, 0.8%, 0.5%, 0.4%, 说明该方法重复性良好。

2.8 加样回收试验 取已知含量同一批号(15031401)的桑白皮粉末(过 40 目筛)约 1 g, 精密称定 6 份, 分别精密加入 4 种对照品溶液, 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, 计算回收率。结果显示 4 种成分的平均回收率分别为 99.4%, 99.2%, 98.4%, 99.4%, RSD 分别为 0.9%, 1.4%, 1.5%, 1.1%, 表明该方法准确, 见表 2。

表 2 桑白皮中 4 种成分的加样回收试验

Table 2 Recovery tests of four components of Mori Cortex

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 /%
绿原酸	1.004	95.0	96.0	189.1	98.0	99.4	0.9
	1.002	94.8	96.0	190.1	99.2		
	0.998	94.4	96.0	190.8	100.4		
	1.007	95.3	96.0	190.2	98.9		
	1.001	94.7	96.0	190.9	100.2		
	0.998	94.4	96.0	189.8	99.4		
东莨菪内酯	1.004	82.5	82.4	162.6	97.2	99.2	1.4
	1.002	82.4	82.4	164.5	99.6		
	0.998	82.0	82.4	164.2	99.7		
	1.007	82.8	82.4	163.9	98.4		
	1.001	82.3	82.4	165.8	101.3		
	0.998	82.0	82.4	163.6	99.0		
白藜芦醇	1.004	13.1	13.3	26.0	97.0	98.4	1.5
	1.002	13.0	13.3	26.1	98.5		
	0.998	13.0	13.3	26.0	97.7		
	1.007	13.1	13.3	26.5	100.8		
	1.001	13.0	13.3	25.9	97.0		
	0.998	13.0	13.3	26.2	99.2		
桑色素	1.004	42.1	41.4	82.8	98.3	99.4	1.1
	1.002	42.0	41.4	83.6	100.5		
	0.998	41.8	41.4	82.8	99.0		
	1.007	42.2	41.4	83.5	99.8		
	1.001	42.0	41.4	83.6	100.5		
	0.998	41.8	41.4	82.5	98.3		

2.9 含量测定 取 5 批桑白皮粉末(过 40 目筛)各 3 份, 每份约 2 g, 精密称定, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样分析, 测定峰面积, 计算样品中的含量, 结果见表 3。

表 3 5 批桑白皮药材中 4 种成分质量分数的测定

Table 3 Content determination results of four components in 5 batches Mori Cortex

批号	产地	绿原酸	东莨菪内酯	白藜芦醇	桑色素
150301	江苏	124.2	96.5	9.7	33.0
D5090202	湖北	48.1	74.9	24.9	22.9
14092305	安徽	253.0	99.3	19.6	38.6
15031401	安徽	94.6	82.2	13.0	41.9
140401	河南	370.7	268.7	9.2	53.9

3 分析与讨论

3.1 提取溶剂的选择 本实验进行了桑白皮的提取溶剂考察, 分别选择甲醇, 无水乙醇, 50% 甲醇, 80% 甲醇, 50% 乙醇和 80% 乙醇作为提取溶剂, 比较了回流提取和超声提取, 发现甲醇超声提取测得的 4 种成分的含量最高, 其次对超声的时间进行考察, 分别选取 30, 45, 60, 90 min, 结果显示最佳提取时间为 45 min。

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 4 种成分在 285 nm 左右均有较好吸收, 以此作为检测波长, 色谱峰形和分离度良好, 基线平稳, 故选 285 nm 作为检测波长。

3.3 流动相的选择 采用梯度洗脱的方式, 可以对 4 种成分进行很好的分离, 并且可以在较短时间内出峰。实验过程比较了乙腈-水、乙腈-0.01% 磷酸、乙腈-0.02% 磷酸、甲醇-水、甲醇-0.01% 磷酸、甲醇-0.02% 磷酸 5 种流动相系统, 结果发现采用乙腈-0.01% 磷酸溶液梯度洗脱时, 4 种成分的分离度均 > 1.5, 各指标峰峰形良好, 基线平稳, 分离度高。

3.4 结果分析 本实验建立了 HPLC 法同时测定桑白皮中 4 种成分含量的方法, 该方法精密度良好, 为桑白皮药材活性成分含量测定奠定了实验基础。实验结果表明不同产地及批号桑白皮中 4 种成分含量差异较大, 其中河南产桑白皮中绿原酸、东莨菪内酯、桑色素含量均较高。安徽产桑白皮中绿原酸、桑色素相对较高, 但不同批次的药材相差较大, 这与已有的文献报道^[11] 相一致。湖北产桑白皮中白藜芦醇含量较高。《中药大辞典》^[13] 中提到桑白皮主产安徽、河南、浙江、江苏等地, 以河南、安徽省产量

最大,并以安徽产桑皮质量最佳,本实验研究亦显示,河南及安徽产桑白皮的活性成分含量较高。研究提示不同产地桑白皮活性成分具有较大的差异,临床用药上应更加注重道地药材的使用,发挥其突出的疗效。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:280.
- [2] DU J, HE Z D, JIANG R W, et al. Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(8): 1235-1238.
- [3] Nam S Y, Yi H K, Lee J C, et al. Cortex Mori extract induces cancer cell apoptosis through inhibition of microtubule assembly [J]. *Arch Pharm Res*, 2002, 25(2):191-196.
- [4] 王元成,伍春,陈虎,等. 桑白皮中白藜芦醇、氧化白藜芦醇和桑皮苷的抗氧化活性 [J]. *食品科学*, 2011,32(15):135-138.
- [5] Kim H J, Hai J L, Jeong S J, et al. Mori Cortex radiceis extract exerts antiasthmatic effects via enhancement of CD⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells and inhibition of Th2 cytokines in a mouse asthma model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 138(1):40-46.
- [6] 张静,高英,罗娇艳,等. 桑白皮不同部位对实验性高脂糖尿病小鼠的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2014,25(2):159-164.
- [7] 张国刚,黎琼红,叶英子博,等. 桑白皮黄酮化学成分的研究 [J]. *中国药物化学杂志*, 2005, 15(2): 109-112.
- [8] 桂春华. 桑白皮化学成分的研究 [D]. 长春:吉林大学,2012.
- [9] 冯卫生,曹彦刚,李方,等. 桑白皮各化学拆分组分化学成分研究 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2015,17(3):492-498.
- [10] 谢臻,钟明玉,曾海生. HPLC测定桑白皮中绿原酸的含量 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(13): 100-103.
- [11] 王甫成,时维静,杨清月. HPLC程序可变波长法同时测定桑白皮中绿原酸、东莨菪内酯和桑辛素 [J]. *中成药*,2013,35(3):564-567.
- [12] 孙莲,孟磊,勉强辉,等. HPLC同时测定新疆药桑枝中6种成分的含量 [J]. *中国现代应用药学*,2013(6): 660-663.
- [13] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 2版. 上海:上海科学技术出版社,2006:2786-2787.

【责任编辑 顾雪竹】