

## 桑叶药材 HPLC 指纹图谱研究

姚江雄<sup>1</sup>, 李春<sup>2</sup>, 廖端芳<sup>3</sup>, 何迎春<sup>3</sup>, 刘菊妍<sup>4</sup>, 许招懂<sup>1</sup>, 林丽美<sup>3,4\*</sup>

(1. 广州星群(药业)股份有限公司, 广州 510288; 3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;  
2. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 4. 广州医药集团有限公司, 广州 510130)

[摘要] 目的: 建立桑叶药材的指纹图谱, 为桑叶药材的质量控制提供依据。方法: 采用 HPLC 法, Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-1.0% 醋酸水为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 290 nm, 柱温 30 °C, 进样 10 μL。结果: 建立了 13 批桑叶药材的指纹图谱。桑叶合格药材有 16 个共有峰, 多数峰可以达到较好分离, 具有较高的相似度。结论: 建立的高效液相指纹图谱有较好的精密度、重复性和稳定性, 可作为桑叶质量评价参考。

[关键词] 桑叶; 高效液相色谱; 指纹图谱; 质量控制

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)10-0119-03

[doi] 10.11653/syfy2013100119

## Study on HPLC Fingerprint of *Morus alba*

YAO Jiang-xiong<sup>1</sup>, LI Chun<sup>2</sup>, LIAO Duan-fang<sup>3</sup>, HE Ying-chun<sup>3</sup>,  
LIU Ju-yan<sup>4</sup>, XU Zhao-dong<sup>1</sup>, LIN Li-mei<sup>3,4\*</sup>

(1. Guangzhou Xingqun Pharmaceutical Co. Ltd., Guangzhou 510288, China;  
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;  
3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;  
4. Guangzhou Pharmaceutical Holdings Co. Ltd., Guangzhou 510130, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC fingerprint of *Morus alba*, which was expected to be standards of quality control and identification of the Chinese crude drug. **Method:** The HPLC method was used, chromatography conditions were Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with gradient mobile phase of acetonitrile-0.1% acetic acid, UV detection wavelength was 290 nm and the column temperature was 30 °C with the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the sample injection was 10 μL. **Result:** HPLC fingerprints of 13 samples of *M. alba* were established. 16 mutual peaks were selected as the fingerprint peaks in 11 samples. Among the obtained fingerprints, most of the detected peaks were separated effectively. 11 samples had high similarities. **Conclusion:** The established HPLC fingerprint has desirable accuracy, repeatability and stability, which can be used for one of the quality control of *M. alba*.

[Key words] *Morus alba*; fingerprints; HPLC; quality control

桑叶为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的叶, 初露后采收, 除去杂质, 晒干, 具有疏散风热、清肺润燥、清肝明目功能, 用于风热感冒、肺热燥咳、头晕头痛、目赤昏花<sup>[1]</sup>。现代药理研究发现桑叶具有降血糖、降

血压、降血脂、抗炎、抗衰老、抗肿瘤等功效<sup>[2-4]</sup>, 对其活性成分的研究主要集中在生物碱类<sup>[5-7]</sup>、黄酮类<sup>[8-10]</sup>、挥发油类<sup>[11]</sup>、有机酸类<sup>[12]</sup>、多糖类<sup>[13]</sup>等。目前, 桑叶的保健品市场也急剧加大, 国内外市场对

[收稿日期] 20120611(396)

[基金项目] 湖南省科技厅项目(2011FJ7008); 湖南省教育厅项目(11C0958); 湖南省十二五重点学科药理学学科项目

[第一作者] 姚江雄, 工程师, 从事中药新药及质量标准化研究, Tel: 020-84051890, E-mail: rekeyy@vip.163.com

[通讯作者] \* 林丽美, 副教授, 博士, 从事中药药效物质基础及质量标准化研究, Tel: 0731-88458232, E-mail: lizasmile@163.com

桑叶的需求愈来愈大,为了进一步控制桑叶质量,本研究采用 RP-HPLC 方法,对从全国收集的桑叶药材进行全面的指纹图谱研究。

### 1 材料

KQ-100B 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司),BPZ11D 型电子分析天平(Sartorius 公司),Waters2695-2996 型高效液相色谱系统,含四元溶剂管理系统、自动进样器,Empower2 色谱工作站,(美国 Waters 公司)。

醋酸(分析纯,北京化工厂),甲醇(色谱纯, TEDIA 公司),乙腈(色谱纯, Fisher 公司),水为娃哈哈纯净水。

不同产地的桑叶药材,经湖南中医药大学药室刘塔斯教授鉴定为桑料植物桑 *Morus alba* L. 的叶。13 批桑叶药材的具体来源见表 1。

表 1 桑叶药材来源

No.	批号	称样量/g	来源
1	无	1.002 8	广东阳春
2	无	1.001 3	清远
3	20080305	1.001 1	清远
4	无	1.000 4	阳西
5	7714	1.003 2	广东
6	080701	1.000 8	广东
7	080501	1.001 0	广东
8	08080901	1.002 9	广东
9	无	1.002 1	广西柳州
10	20080505	1.002 0	玉林
11	01	1.000 7	河南
12	20080305	1.000 5	湖南蓝山
13	080306	1.001 5	河北

### 2 方法

**2.1 色谱条件**<sup>[14]</sup> Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈(A)-1.0% 醋酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0 ~ 10 min, 5% A; 10 ~ 70 min, 5% ~ 25% A),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 290 nm,柱温 30 °C,进样 10 μL。见色谱图 1,2。

**2.2 供试品溶液制备** 取桑叶粉(80 目)约 1 g,置 50 mL 锥形瓶中,精密称定,加甲醇 10 mL,称定质量,超声处理 30 min(功率 250 W,频率 40 kHz),取出,静置,放凉,再称定质量,用甲醇补足缺失的质量。

**2.3 对照品溶液制备** 精密称取芦丁对照品适量,加甲醇溶解,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

**2.4 精密度试验** 取同一供试品溶液(广东清远,

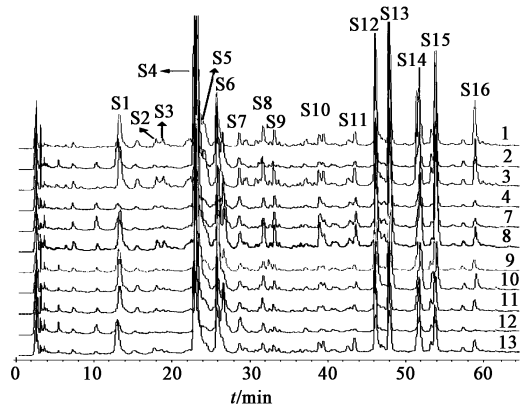


图 1 桑叶标准药材样品 HPLC 图谱

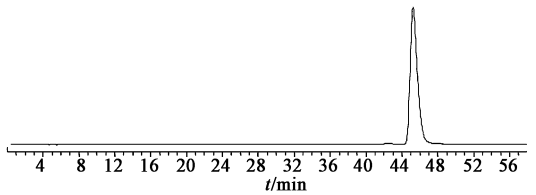


图 2 芦丁对照品 HPLC 图谱

批号 20080305),按上述色谱条件,连续进样 6 次,计算各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积的精密密度,结果表明,相对保留时间的 RSD < 0.5%; 相对峰面积 RSD < 5%。

**2.5 重复性试验** 取同一批号桑叶样品(广东清远,批号 20080305),按 2.2 项下方法,平行制备 6 份供试品溶液进行 HPLC 分析,考察主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积,结果其的 RSD < 5%,表明方法的重复性在误差范围内。

**2.6 稳定性试验** 取同一份供试品(广东清远,批号 20080305)溶液后,在室温下放置不同时间进行 HPLC 分析,考察主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积,结果其在 48h 内 RSD < 5%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

### 3 结果

**3.1 指纹峰的确定** 桑叶高效液相色谱可分离出 20 多个峰,比较所测定的 11 个合格药材的色谱图,从中选定了 16 个共有峰作为桑叶指纹图谱的指纹峰。其中 12 号色谱峰是桑叶药材中的主要指标性成分芦丁,且保留时间恰当,作为对照峰。

**3.2 对照图谱的建立** 以 11 个桑叶合格药材的色谱指纹图谱为基础,通过药典会颁布的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 软件,选择色谱图中 16 个主要峰为校正点,建立桑叶药材的对照图谱,见图 3。

**3.3 系统聚类分析** 应用 SPSS 软件,采用组间均

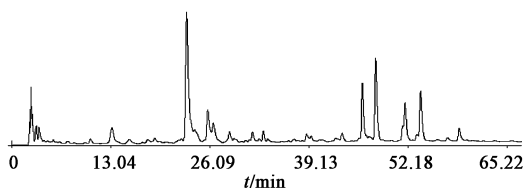


图3 桑叶药材对照图谱

联法 (between-groups linkage), 选用夹角余弦 (cosine) 为测度, 上述 13 个测试样品聚类分析结果见图 4。聚类分析将 13 批样品分为 2 大类, 其中 5, 6 号为第一类; 其他均为第二类。

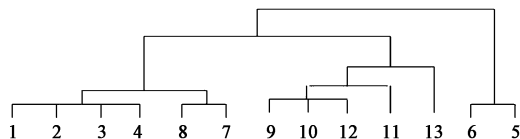


图4 桑叶药材系统聚类分析树状图

**3.4 相似度分析** 按照《中国药典》及传统中医对桑叶用药的要求, 根据形态学鉴定和芦丁含量测定结果, 选择 11 批代表性药材, 依据其色谱指纹图谱建立共有模式。采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件, 计算各样品与共有模式间的相似度, 见表 3。除 5, 6, 13 号外, 其他样品与共有模式之间相似度均 > 0.9。相似度分析结果与系统聚类结果基本一致。

表3 桑叶药材的相似度

No.	相似度	No.	相似度
1	0.987	8	0.961
2	0.984	9	0.994
3	0.975	10	0.986
4	0.987	11	0.981
5	0.693	12	0.987
6	0.869	13	0.825
7	0.942		

## 4 讨论

比较了不同提取溶剂如甲醇、95% 甲醇、75% 甲醇、30% 甲醇, 不同提取方法如浸泡提取、回流提取、超声提取的提取效果, 结果发现以甲醇超声提取的总体效果最佳, 且方法稳定、重复性好。

分别以乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸、乙腈-1.0% 磷酸; 乙腈-1.0% 醋酸、乙腈-0.5% 醋酸; 甲醇-水、甲醇-0.1% 磷酸、乙腈-甲醇-0.1% 磷酸等不同体积分数、不同比例的流动相系统进行等度和梯度洗脱试验。结果表明, 乙腈-1.0% 醋酸水进行梯度洗脱为佳, 在调整好流动相的不同时间洗脱比例之后, 各峰的保留时间适中, 且基线平稳, 不易漂移, 有利于指纹图谱的分析。

不同产地的桑叶药材样品, 除 5, 6 号外, 其余样

品的 HPLC 指纹图谱均具有 16 个指纹峰, 特征峰相对保留时间基本一致 (RSD < 1.0%)。将样品色谱图与标准品色谱图的保留时间和 UV 信息进行比对, 可以确定 12 号峰为芦丁, 《中国药典》2010 年版以芦丁作为桑叶药材含量测定的指标性化合物。因此, 以芦丁作为桑叶 HPLC 特征指纹图谱的参照峰是合理的。

采用 2 种统计学方法进行分析, 结果基本一致。聚类分析结果并不能完全体现产地分布的结果, 这可能与样品的采收季节、种植环境均有密切关系; 色谱峰的有无和峰面积大小是影响相似度结果的主要原因, 而面积的有无和大小也与采收季节、炮制、产地等密切关系。

## [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: 279.
- [2] 罗存敏. 桑叶提取物对小鼠血糖的影响及其有效成份测定[J]. 蚕业科学, 2005, 31(4): 418.
- [3] 原爱红, 马骏, 蒋晓峰, 等. 桑叶中糖苷酶抑制活性组分的筛选[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(3): 223.
- [4] 李超, 潘建明, 罗新根, 等. 桑叶消渴胶囊对 II 型糖尿病大鼠的影响[J]. 海南医学, 2012, 23(2): 18.
- [5] 邓伟杰, 孙智平, 罗新根, 等. 正交试验设计优化桑叶总生物碱提取工艺[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(3): 608.
- [6] 李凡, 裘雅渔, 钱文春, 等. 桑叶中总生物碱和 1-脱氧野尻霉素的含量考察[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(3): 176.
- [7] 鲁战会, 吴生文, 唐健, 等. 桑叶功效成分含量与产地关联性研究[J]. 食品科技, 2007, 1: 75.
- [8] 李明聪, 杨丹, 郭英, 等. 桑叶中黄酮类化学成分及药理作用研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(2): 377.
- [9] 王萍. 桑叶总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 185.
- [10] 吴好好, 李凡, 钱文春, 等. 浙江湖州桑叶 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(3): 390.
- [11] 孙莲, 杨文菊, 刘龙. 桑叶挥发油气相色谱-质谱指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(7): 879.
- [12] 韦建华, 李耀华, 梁臣艳, 等. HPLC 测定桑叶配方颗粒中原儿茶酸、绿原酸和咖啡酸[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 93.
- [13] 陈敏, 林淑芳, 邵爱娟, 等. 桑叶、茶叶及枸杞叶粗多糖样品的含量分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(8): 6.
- [14] 许招懂, 林丽美, 蒋莉娟, 等. 一种夏桑菊颗粒的质量控制方法[P]. 中国: 201010201062, 2010-10-20.

[责任编辑 顾雪竹]