

# HPLC 测定桑叶配方颗粒中原儿茶酸、绿原酸和咖啡酸

韦建华<sup>1</sup>, 李耀华<sup>1</sup>, 梁臣艳<sup>1</sup>, 曾万河<sup>2</sup>, 黄杰芳<sup>1</sup>, 甄汉深<sup>1\*</sup>

(1. 广西中医学院, 南宁 530001; 2. 广西方略集团制药有限公司, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 建立桑叶配方颗粒中原儿茶酸、绿原酸和咖啡酸的高效液相测定方法。方法: 采用 Hypersil ODS2 C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1% 磷酸为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 20℃, 检测波长 258, 327 nm。结果: 原儿茶酸、绿原酸和咖啡酸分别在 0.032 2 ~ 0.161 0 μg, 0.125 6 ~ 1.256 μg 和 0.035 1 ~ 0.351 μg 呈良好线性关系; 平均回收率分别为 102.1%、101.1% 和 101.5%。结论: 该法操作简便, 分离效果理想, 可用于测定桑叶配方颗粒中原儿茶酸、绿原酸和咖啡酸的测定。

[关键词] 桑叶配方颗粒, 高效液相色谱法, 原儿茶酸, 绿原酸, 咖啡酸

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0093-03

## Determination of Protocatechuic Acid, Chlorogenic Acid and Caffeic Acid in Sangye Dispensing Granules by HPLC

WEI Jian-hua<sup>1</sup>, LI Yao-hua<sup>1</sup>, LIANG Chen-yan<sup>1</sup>, ZENG Wan-he<sup>2</sup>, HUANG Jie-fang<sup>1</sup>,  
ZHEN Han-shen<sup>1\*</sup>

(1. Guangxi University of Traditional Chinese Medical, Nanning 530001, China;

2. Guangxi Fanglue Pharmaceutical Group of Co. Ltd., Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the methods for determining protocatechuic acid, chlorogenic acid and caffeic acid in Sangye dispensing granules by HPLC. **Method:** The column of Hypersil ODS2 C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was at 20℃, the detection wavelength was at 258 nm, 328 nm. **Result:** The average recovery of protocatechuic acid, chlorogenic acid and caffeic acid was 102.1%, 101.1% and 101.5% respectively. Protocatechuic acid, chlorogenic acid and caffeic acid were linear in the range of 0.032 2-0.161 0 μg, 0.125 6-1.256 μg and 0.035 1-0.351 μg respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate and can used to determine the content of the protocatechuic acid in mulberry formula granules.

[Key words] Sangye dispensing granules; HPLC; protocatechuic acid; chlorogenic acid; caffeic acid

桑叶是桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶。性甘、苦, 寒。具有疏散风热, 清肺润燥, 清肝明目等作用, 用于风热感冒, 肺热燥咳, 头晕头痛, 目赤昏花

等症<sup>[1]</sup>。现代研究表明, 桑叶中含有原儿茶酸、咖啡酸、绿原酸等多种酸<sup>[2]</sup>, 绿原酸、咖啡酸、原儿茶酸具有抗氧化、降血糖、降血压、抗菌、抗病毒等多种药理活性<sup>[3-7]</sup>。桑叶配方颗粒由桑叶药材水提取后, 添加适量的辅料喷雾干燥后制成的单味中药配方颗粒剂, 桑叶配方颗粒为《中国药典》2005年版一部收载品种, 只有芦丁含量测定项。本实验选择桑叶药材中 3 种有效成分绿原酸、咖啡酸和原儿茶酸为指标成分, 建立了相应的高效液相色谱方法, 为全面控制桑叶配方颗粒制剂提供了科学依据。

[收稿日期] 20101011(011)

[作者简介] 韦建华, 硕士, 讲师, 从事中药、民族药有效成分和质量标准研究, Tel: 13977166476, E-mail: weijianhua607@tom.com

[通讯作者] \* 甄汉深, 教授, 博士生导师, 主要从事中药有效成分与质量标准研究, Tel: 0771-2219867, E-mail: 8zhen@163.com

### 1 仪器与试药

美国安捷伦公司 Agilent1100 高效液相色谱仪, 上海 BRANSON B3500S-MT 超声机, LG16-W 离心机 (北京医用离心机厂)。赛多利斯 BP211D 电子天平 (德国赛多利斯); 原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110809-200604, 110753-200413, 110885-200102, 均为含量测定用); 甲醇 (色谱纯, 分析纯), 磷酸为分析纯, 乙腈为色谱纯; 超纯水; 桑叶配方颗粒 (江明天江药业有限公司 批号 0812051, 0902045, 1001087)。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 大连依利特 Hypersil ODS2 C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈 (A) 和 0.1% 磷酸 (B), 按表 1 规定进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量 10 μL; 柱温 20 °C; 检测波长 0 ~ 20 min, 258 nm; 20 ~ 40 min, 327 nm。

表 1 流动相梯度洗脱程序

| 时间 /min | 流动相 A /% | 流动相 B /% |
|---------|----------|----------|
| 0       | 6        | 94       |
| 15      | 7        | 93       |
| 40      | 8        | 92       |

**2.2 对照品溶液的制备** 分别精密称取原儿茶酸、绿原酸和咖啡酸对照品适量, 用色谱纯甲醇溶解并制备得 0.322 g·L<sup>-1</sup> 原儿茶酸对照品储备液、0.125 6 g·L<sup>-1</sup> 绿原酸对照品储备液和 0.351 g·L<sup>-1</sup> 咖啡酸对照品储备液。

**2.3 供试品溶液的制备** 取桑叶配方颗粒约 1.0 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 25 mL, 称定质量, 超声提取 1 h, 放冷, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 取续滤液于 10 000 r·min<sup>-1</sup> 条件下离心 10 min, 即得供试液。

**2.4 线性关系的考察** 分别精密吸取原儿茶酸对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 色谱甲醇定容至刻度, 摇匀。分别精密吸取绿原酸对照品溶液 1, 2, 4, 8, 10 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 色谱甲醇定容至刻度。以浓度 0.351 g·L<sup>-1</sup> 咖啡酸对照品溶液为原液, 稀释成 0.0351 g·L<sup>-1</sup> 浓度。分别精密吸取 1, 2, 4, 8, 10 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 色谱甲醇定容至刻度, 摇匀。各进样量为 10 μL。以峰面积值 (A) 为纵坐标 (Y), 进样量 (μg) 为横坐标 (X) 绘制标准曲线。原儿茶酸标准曲线方程为  $Y=4\ 215.8X+1.80$ ,  $r=0.999\ 97$  ( $n=5$ ),

绿原酸标准曲线方程为  $Y=2\ 337.1X+18.4$ ,  $r=0.999\ 70$  ( $n=5$ ), 咖啡酸标准曲线方程为  $Y=4\ 168.1X-6.68$ ,  $r=0.999\ 57$  ( $n=5$ )。结果表明原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸进样量分别在 0.032 2 ~ 0.161 0 μg, 0.125 6 ~ 1.256 0 μg, 0.035 1 ~ 0.351 0 μg 线性关系良好。

**2.5 精密度试验** 精密吸取同一桑叶配方颗粒供试溶液, 重复进样 6 次, 测定峰面积, 结果原儿茶酸、绿原酸和咖啡酸峰面积的 RSD 分别为 1.8%, 1.6%, 1.3% ( $n=5$ )。结果表明精密度良好。

**2.6 稳定性试验** 取同一桑叶配方颗粒供试溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 测定峰面积, 测定 6 次。以峰面积计算, 测得原儿茶酸峰面积 RSD 为 2.5%, 绿原酸峰面积 RSD 为 1.1%, 咖啡酸峰面积 RSD 为 1.2%。结果证明待测成分至少在 24 h 内是稳定性的。

**2.7 重复性试验** 取同一批号 (0812051) 的桑叶配方颗粒, 按 2.3 方法制备样品溶液, 平行 6 份, 按 2.1 色谱条件进样测定, 结果原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸的平均含量分别为 0.207 6 mg·g<sup>-1</sup>, 2.142 mg·g<sup>-1</sup> 和 0.386 4 mg·g<sup>-1</sup>; RSD 分别为 2.7%, 1.0% 和 1.2%。结果表明, 本方法重复性良好。

**2.8 加样回收试验** 取桑叶配方颗粒约 0.5 g, 精密称定, 平行 6 份, 置 25 mL 量瓶中, 精密加入稀释后的混合对照品 25 mL (原儿茶酸 0.004 2 g·L<sup>-1</sup>, 绿原酸 0.042 84 g·L<sup>-1</sup>, 咖啡酸 0.007752 g·L<sup>-1</sup>, 按供试品溶液制备项下操作, 按 2.1 色谱条件测定供试液中的原儿茶酸、绿原酸和咖啡酸的含量, 计算得原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸加样回收率分别为 102.1%, 101.1% 和 101.5%, RSD 分别为 2.2%, 2.1%, 2.0%。结果见表 2。

**2.9 空白干扰试验** 按处方比例称取糊精辅料, 按供试品溶液的制备方法制备空白辅料溶液, 进行色谱分析, 结果见图 1。

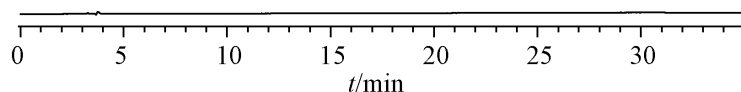


图 1 空白干扰试验图

**2.10 样品的测定** 将 3 批不同批号的桑叶配方颗粒按 2.3 方法制备, 每批平行 3 份, 按 2.1 色谱条件进样, 测定峰面积, 按外标法计算原儿茶酸, 绿原酸和咖啡酸的含量。结果见图 2, 表 3。

表 2 原儿茶酸、咖啡酸和绿原酸加样回收测定

| 成分   | 取样量<br>/g | 样品中<br>量/mg | 加入量<br>/mg | 测得量<br>/mg | 回收率<br>/g | 平均值<br>/% | RSD<br>/% |
|------|-----------|-------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 原儿茶酸 | 0.508 6   | 0.105 6     | 0.105 0    | 0.213 0    | 102.3     | 102.1     | 2.2       |
|      | 0.505 6   | 0.105 0     | 0.105 0    | 0.212 2    | 102.2     |           |           |
|      | 0.501 0   | 0.104 0     | 0.105 0    | 0.206 7    | 97.8      |           |           |
|      | 0.503 9   | 0.104 6     | 0.105 0    | 0.213 6    | 103.8     |           |           |
|      | 0.505 6   | 0.105       | 0.105 0    | 0.213 5    | 103.3     |           |           |
|      | 0.503 5   | 0.104 6     | 0.105 0    | 0.212 5    | 102.9     |           |           |
| 绿原酸  | 0.508 6   | 1.090 0     | 1.071 0    | 2.187 0    | 102.5     | 101.1     | 2.1       |
|      | 0.505 6   | 1.083 0     | 1.071 0    | 2.183 0    | 102.7     |           |           |
|      | 0.501 0   | 1.073 1     | 1.071 0    | 2.141 0    | 99.7      |           |           |
|      | 0.503 9   | 1.080 0     | 1.071 0    | 2.152 0    | 100.2     |           |           |
|      | 0.505 6   | 1.083 0     | 1.071 0    | 2.187 0    | 103.1     |           |           |
|      | 0.503 5   | 1.079 0     | 1.071 0    | 2.128 0    | 97.99     |           |           |
| 咖啡酸  | 0.508 6   | 0.196 6     | 0.193 8    | 0.388 5    | 99.02     | 101.5     | 2.0       |
|      | 0.505 6   | 0.195 4     | 0.193 8    | 0.395 8    | 103.4     |           |           |
|      | 0.501 0   | 0.193 6     | 0.193 8    | 0.393 7    | 103.3     |           |           |
|      | 0.503 9   | 0.194 8     | 0.193 8    | 0.386 5    | 98.94     |           |           |
|      | 0.505 6   | 0.195 4     | 0.193 8    | 0.394 1    | 102.6     |           |           |
|      | 0.503 5   | 0.194 6     | 0.193 8    | 0.391 5    | 101.7     |           |           |

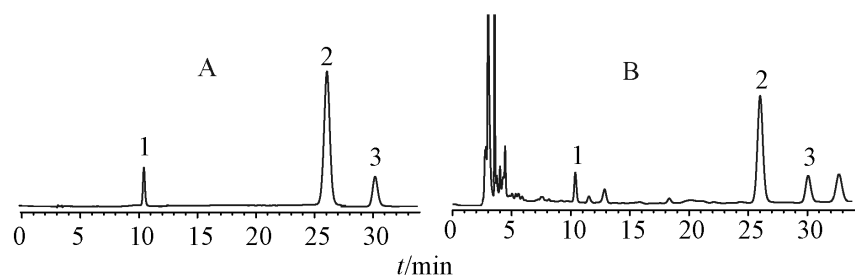


图 2 混合对照品(A)和桑叶配方颗粒样品(B) HPLC 色谱图

1. 原儿茶酸; 2. 绿原酸; 3. 咖啡酸

表 3 桑叶配方颗粒原儿茶酸、绿原酸和咖啡酸的含量测定

| 批号      | 原儿茶酸                | RSD  | 绿原酸                 | RSD  | 咖啡酸                 | RSD  |
|---------|---------------------|------|---------------------|------|---------------------|------|
|         | /mg·g <sup>-1</sup> | /%   | /mg·g <sup>-1</sup> | /%   | /mg·g <sup>-1</sup> | /%   |
| 0812051 | 0.207 2             | 1.20 | 2.127               | 0.83 | 0.383 3             | 0.98 |
| 0902045 | 0.216 8             | 0.63 | 2.097               | 0.74 | 0.370 4             | 1.6  |
| 1001087 | 0.129 8             | 2.20 | 1.209               | 2.30 | 0.273 6             | 2.7  |

### 3 讨论

经全波长紫外扫描分析原儿茶酸、绿原酸和咖啡酸对照品混合溶液,它们的最大吸收波长分别为 258 nm 和 327 nm。考虑到 3 个含量测定指标的最大吸收波长不同,因此测定 3 个组分含量时,采用转换波长法作为液相色谱图检测手段,参数为 0 ~ 20 min 检测波长为 258 nm, 20 ~ 40 min 检测波长为 327 nm。

本实验对提取溶剂水,甲醇、50% 甲醇,乙醇等进行考察,结果表明,水、甲醇提取得到原儿茶酸、绿原酸和咖啡酸每种含量最低,50% 甲醇提取含量最高,乙醇提取得到的 3 种成分与 50% 甲醇相差不大,但绿原酸和咖啡酸峰形都不好。故选用 50% 甲醇作为提取溶剂。

本实验对流动相甲醇-0.1% 磷酸溶液、乙腈-0.1% 磷酸溶液两种系统及不同比例进行比较,结果表明,采用乙腈-0.1% 磷酸为流动相,梯度洗脱(6 94 7 93 8 92),分离效果好。

#### [参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005: 209.
- [2] 陈路,蓝鸣生. 特优 2 号桑叶化学成分研究[J]. 中药材, 2010, 33(3): 380.
- [3] 张鞍灵,马琼,高锦明. 绿原酸及其类似物与生理作用[J]. 中草药, 2001, 32(2): 173.
- [4] 王峰,刘敏,杨连春,等. 咖啡酸阿魏酸对高血压大鼠的降压作用[J]. 解放军药学学报, 1999, 15(5): 01.
- [5] 熊丹,严奉祥,欧和生. 咖啡酸抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡及机制探讨[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12(12): 1367.
- [6] 张遵义,韩鹏飞,梁满达,等. 原儿茶酸衍生物的化学结构与冠脉流量、心肌耗氧量关系的探讨[J]. 药学学报, 1980, 15(11): 641.
- [7] 杨东明,苏世文,李先,等. 五灵脂活性成分的研究[J]. 药学学报, 1987, 22(10): 765.

[责任编辑 顾雪竹]