

· 中药工业 ·

HPLC 测定不同地区桑椹饮片中七种成分含量[△]

常艳旭¹, 王涛², 李晋¹, 何俊¹, 金华², 马琳², 杨雪晶^{1,3*}

1. 天津中医药大学/天津市现代中药重点实验室, 天津 300193; 2. 天津中医药大学 中药学院, 天津 300193;
3. 哈尔滨商业大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

[摘要] 目的: 建立同时测定桑椹饮片中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷和槲皮素 7 种成分含量的高效液相色谱(HPLC)测定方法, 为评价中国不同地区桑椹饮片的质量提供技术手段。方法: 采用 ODS-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 水(含 0.2% 甲酸)-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1 mL·min⁻¹, 检测波长为 360 nm。结果: 新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷和槲皮素 7 种成分线性关系良好, 加样回收率在 95.0% ~ 105%。不同地区使用的桑椹饮片中 7 种成分含量差异较大。结论: 本研究建立了一种稳定、可靠的桑椹饮片中 7 种成分含量同时测定的高效液相色谱方法, 为桑椹饮片质量研究提供参考。

[关键词] 桑椹; 高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R286 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)10-1411-04

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190302001

Simultaneous Determination of Seven Components in Mori Fructus Slice from Different Areas of China by HPLC

CHANG Yan-xu¹, WANG Tao², LI Jin¹, HE Jun¹, JIN Hua², MA Lin², YANG Xue-jing^{1,3*}

1. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China;
2. College of Chinese Materia Medica, Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China;
3. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC-UV method for simultaneous determination of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, rutin, quercetin, astragaline and quercetin for quality evaluation of Mori Fructus slice. **Methods:** The analysis was carried out on an ODS-2 column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with water(containing 0.2% formic acid)-acetonitrile as the mobile phase by RP-HPLC method. The detection wavelength was 360 nm and flow rate was 1 mL·min⁻¹. **Results:** Seven components showed respectively a good linear relationship. The recoveries were 95.0% ~ 105%. The contents of seven components in Mori Fructus slice from different areas was quite different. **Conclusion:** The simple and accurate HPLC-UV method was established and validated to determine the contents of seven components for quality evaluation of Mori Fructus.

[Keywords] Mori Fructus; HPLC; determination

桑椹为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥果穗。现代研究表明, 桑椹具有抗氧化、延缓衰老、抗疲劳、增强免疫力、降血脂、降血糖等药理作用^[1]。生物碱、黄酮类和有机酸为桑椹的主要化学成分, 如芦丁有祛脂的效果、具有抗氧化能力^[2], 绿原酸具有抑菌、抗炎、调节脂质代谢等功效^[3,4]。

2015 版《中华人民共和国药典》尚未规定桑椹

的含量测定项中指标成分, 仅对其浸出物、水分、总灰分进行检查^[5]。本研究选择了桑椹饮片中 7 种成分(新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷和槲皮素)为指标性成分, 采用高效液相色谱法(HPLC), 建立桑椹饮片中 7 种成分同时测定方法, 并对国内不同地区、不同批次的桑椹饮片进行测定, 拟为桑椹饮片质量控制指标选择和质量

[△] [基金项目] 中央本级重大增减支项目(2060302); 大学生创新创业训练计划项目(201510063026)

* [通信作者] 杨雪晶, 博士, 研究方向: 中药药效物质基础及质量评价; Tel: (0451)84838207, E-mail: yangxuejing@hrbcu.edu.cn

评价提供参考,为桑椹药用价值进一步开发利用提供质量评价手段。

1 材料与方法

1.1 仪器

粉碎机(吉首市中诚制药机械厂);离心机(Sigma);天平(德国 Sartorius 公司, BP121S); Mill-Q II 型超纯水器(Millipore 公司); XW-80A 涡旋混合器(上海沪西分析仪器厂); SHB-111 循环水式多用真空泵(西安太康生物科技有限公司); Agilent 1260 型高效液相色谱仪; SB-1000YDTD 超声清洗槽(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试药

紫云英苷对照品(批号: MUST-13092001)、绿原酸对照品(批号: MUST-14091701)、隐绿原酸对照品(批号: MUST-13013002)、芦丁对照品(批号: MUST-11040302)、槲皮素对照品(批号: MUST-13072505)、异槲皮苷对照品(批号: A0439)和新绿原酸对照品(批号: 12031401)均购自成都曼思特生物科技股份有限公司,其纯度均 >98%。

桑椹饮片购自国内不同省市的药店,经天津中医药大学马琳教授鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥果穗,样品保存于天津中医药大学中医药研究院。桑椹样品粉碎,过 60 目筛,备用。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件 江苏汉邦科技有限公司 ODS-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以水(含 0.2% 甲酸)为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱程序为 0 ~ 36 min, 7.6% ~ 7.6% B; 40 ~ 45 min, 12% ~ 13% B; 55 ~ 70 min, 17% ~ 28% B; 72 ~ 74 min, 31% ~ 32% B; 76 ~ 96 min, 38.2% ~ 7.6% B; 平衡时间为 5 min; 柱温为 35 °C; 流速为 1 mL · min⁻¹; 进样量

为 15 μL; 吸收波长 360 nm。

1.3.2 样品的制备 精密称取桑椹粉末 0.5 g, 置于 10 mL 具塞锥形瓶中, 加入 80% 甲醇 10 mL, 称质量, 超声提取 40 min, 静置放冷, 补足质量, 14 000 r · min⁻¹ 离心 10 min 后, 取上清液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即为样品溶液。

1.3.3 标准曲线及线性范围 将对照品储备液配制成含有新绿原酸(250 μg · mL⁻¹)、绿原酸(1.4 mg · mL⁻¹)、隐绿原酸(1 mg · mL⁻¹)、芦丁(800 μg · mL⁻¹)、异槲皮苷(150 μg · mL⁻¹)、紫云英苷(100 μg · mL⁻¹)、槲皮素(100 μg · mL⁻¹) 的混合对照品储备液。精密移取该混合对照品储备液, 用甲醇稀释成一系列浓度, 记录各浓度下的峰面积, 并制作标准曲线。

1.3.4 精密度、稳定性、重复性试验 精密度分为日间精密度和日内精密度。日内精密度为同一份样品溶液在 1 d 内连续进样 6 次, 日间精密度为连续 3 d 内每天连续进样 6 次。稳定性试验为一份样品溶液分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 内进样。重复性试验为平行制备 6 份桑椹样品溶液, 连续进样。

1.3.5 加样回收率 精密称定已知含量的桑椹药材粉末 0.250 g (平行操作 6 份), 分别按所含 7 种成分的 50% 加入对照品, 按照样品处理方法进行处理, 测定加样后 7 种成分的含量, 计算加样回收率。

2 结果

2.1 高效液相色谱法方法学验证

2.1.1 标准曲线的绘制 以对照品质量浓度为横坐标(μg · mL⁻¹), 峰面积为纵坐标制作标准曲线, 并得出回归方程、相关系数(见表 1)。分别以信噪比(S:N)3:1 和 10:1 作为检测限(LOD)和最低定量限(LOQ)。从表 1 中可以得知, 7 个化合物在线性范围内相关系数均大于 0.998 0, 表明 7 个化合物在各自的线性范围内线性关系良好。

表 1 7 种成分标准曲线、线性范围、LOD 和 LOQ

成分	回归方程	线性范围/μg · mL ⁻¹	r	LOD/μg · mL ⁻¹	LOQ/μg · mL ⁻¹
槲皮素	$Y = 78.761X - 43.498$	0.625 ~ 100	0.998 0	0.04	0.20
紫云英苷	$Y = 36.817X - 14.762$	0.625 ~ 100	0.998 6	0.06	0.20
异槲皮苷	$Y = 58.227X - 22.646$	0.625 ~ 150	0.998 8	0.05	0.12
芦丁	$Y = 21.715X + 6.396 7$	1.2 ~ 800	0.999 2	0.08	0.24
隐绿原酸	$Y = 7.933 1X + 15.509$	2.5 ~ 1000	0.998 8	0.80	2.50
绿原酸	$Y = 9.15X + 17.036$	2.5 ~ 1400	0.998 9	0.80	2.50
新绿原酸	$Y = 8.250 2X + 13.98$	1.6 ~ 250	0.998 4	0.60	1.60

2.1.2 精密性、稳定性、重复性试验 桑椹中各成分的精密性、重复性和稳定性结果见表2。结果发现7种成分日内、日间精密性RSD < 4.9%，表明该方法精密性良好；重复性RSD < 2.4%，表明该方法重复性良好；稳定性RSD < 3.0%，表明该方法稳定性良好。

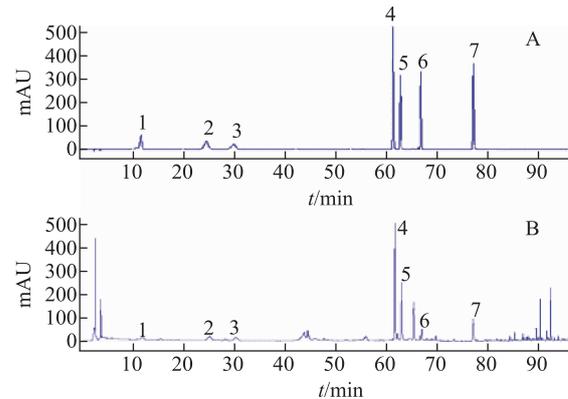
表2 7种成分精密性、重复性、稳定性和回收率结果

成分	%					
	精密性RSD		重复性RSD	稳定性RSD	回收率	
	日内	日间			平均值	RSD
新绿原酸	0.40	1.7	1.60	1.8	104.0	2.20
绿原酸	1.5	4.9	1.50	0.4	105.0	1.50
隐绿原酸	1.8	2.0	1.90	0.3	103.0	2.30
芦丁	2.3	4.5	0.60	1.5	95.0	2.60
异槲皮苷	2.4	3.3	2.00	2.4	98.3	4.40
紫云英苷	2.8	3.6	2.40	3.0	96.0	2.10
槲皮素	2.4	3.5	1.10	1.7	103.0	0.32

2.1.3 加样回收率 由表2结果可知，7种成分的平均回收率均在95.0%~105%，且RSD < 4.4%，表明该方法对桑椹中7种成分的含量测定的准确度较高。

2.2 桑椹饮片中7种化学成分含量

桑椹饮片样品中7种成分以及对照品溶液的色谱图见图1。由表3可知，桑椹饮片中各成分质量分数：新绿原酸10.96~478.82 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ；绿原酸5.82~2619.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ；隐绿原酸9.56~1657.58 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ；芦丁26.8~1307.58 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ；异槲皮苷7.78~253.48 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ；紫云英苷8.02~62.72 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ；槲皮素11.04~68.64 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。



注：A. 混合对照品溶液；B. 桑椹饮片样品溶液；1. 新绿原酸；2. 绿原酸；3. 隐绿原酸；4. 芦丁；5. 异槲皮苷；6. 紫云英苷；7. 槲皮素。

图1 混合对照品和桑椹饮片的HPLC图

表3 不同地区的桑椹饮片7种化合物含量测定结果(n=3)

地区	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$						
	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	芦丁	异槲皮苷	紫云英苷	槲皮素
河北	—	68.56	—	95.98	36.18	16.82	25.42
湖北	—	—	—	107.58	29.96	14.80	15.94
四川	—	63.52	—	—	—	—	—
河北	141.86	458.06	276.04	683.50	61.12	34.74	20.50
湖南	281.26	728.00	408.64	1307.58	106.42	38.28	29.12
河北	81.74	123.42	104.86	615.06	40.40	22.42	23.18
河北	—	—	—	100.94	27.60	14.76	16.26
河北	73.50	159.70	129.30	373.30	55.62	24.70	24.64
广东	478.82	2619.60	1657.58	600.88	253.48	62.72	46.72
四川	—	—	—	31.50	25.30	15.84	27.44
陕西	—	—	—	157.68	56.66	22.14	25.16
河北	52.90	130.86	86.70	470.74	81.90	30.68	24.58
河北	—	—	—	—	—	—	—
福建	36.66	105.50	85.70	265.34	79.40	28.88	39.58
湖北	43.20	86.04	101.32	370.62	82.94	34.90	34.92
云南	53.14	115.54	89.98	275.02	73.72	28.06	36.94
四川	36.90	93.48	64.52	241.12	68.64	24.86	26.78
四川	—	111.40	51.66	106.20	45.70	19.04	24.58
山东	—	—	—	78.20	33.92	20.68	22.34
广西	—	—	—	56.00	27.84	18.06	23.94
河南	40.78	119.92	89.72	323.10	100.66	33.44	29.60
安徽	—	—	—	26.80	21.96	16.50	31.36
甘肃	139.20	232.48	223.60	512.10	106.94	45.12	32.38
四川	40.54	132.16	136.62	205.76	79.92	34.36	68.64

注：—为对应化合物的含量在检测限下或该批次饮片中不含有该种成分。

3 讨论

3.1 流动相选择

在选择流动相过程中,因为桑椹中化合物的极性范围分布较广,且化合物种类繁多,在色谱分离时不易得到理想的峰形,参考相关文献^[6],考察了0.1%甲酸水-乙腈、0.1%甲酸水-0.1%甲酸乙腈、0.1%磷酸水-乙腈、0.1%磷酸水-甲醇、0.1%磷酸水-甲醇乙腈(1:1:1)和0.2%甲酸水-乙腈等流动相组成,发现水相为磷酸水的效果要优于甲酸水,峰形较好,且分离度良好,同时整体的色谱分离检测时间稍短。有机相乙腈的效果好于甲醇-乙腈(1:1)、甲醇,其中加了甲酸的乙腈的色谱图基线较不加甲酸的更加平稳,但无明显影响,因此选择了0.2%甲酸水-乙腈为流动相。

3.2 提取条件的选择

采用饮片粉碎后用超声波提取,该方法具有简便、安全、有效等特点。在单因素提取条件下,以提取效果为指标,提取时间结果为:40 min > 20 min > 30 min > 10 min;溶剂浓度:60% > 80% > 100% > 40%;料液比:1:20 > 1:15 > 1:10 > 1:5。运用正交优化试验法,选取甲醇浓度、提取时间、料液比3个因素,每个因素为3水平,以桑椹中新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷和槲皮素7种成分的总含量为指标,选用L₉(3⁴)正交设计,对桑椹中7种成分最佳超声提取条件的优化,发现甲醇浓度是最关键的影响因素,其次为料液比

和提取时间;确定最佳提取条件为0.50 g桑椹粉末采用10 mL 80%甲醇溶液超声提取40 min。

4 结论

本研究建立了一种稳定、可靠的桑椹中7种黄酮类成分(新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷和槲皮素)含量同时测定的高效液相色谱(HPLC)方法,经方法学验证,符合分析要求,并对不同地区、不同批次的桑椹饮片中7种成分的含量进行测定,结果表明,芦丁为平均含量最高成分,而异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素平均含量较低,国内不同地区所用桑椹饮片质量存在较大差异,需要对其生产产地、加工方法、质量评价指标进行深入研究,确保其临床有效性。

参考文献

- [1] 黄勇,张林,赵卫国,等.桑椹的化学成分及药理作用研究进展[J].广西蚕业,2006,43(3):15-19.
- [2] 耿旦,马雯芳,甄汉深,等.RP-HPLC测定桑椹中芦丁的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(14):63-65.
- [3] 赵金娟,戴雪梅,曲永胜,等.绿原酸药理学研究进展[J].中国野生植物资源,2013,32(4):1-5.
- [4] ARAMWIT P, BANG N, SRICHANA T. The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits [J]. Food Research International, 2010, 43(4):1093-1097.
- [5] 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,2015:300.
- [6] 游元元,万德光,杨文字,等.桑椹药材 HPLC 图谱研究[J].食品科学,2010,31(2):141-144.

(收稿日期:2019-03-02 编辑:王笑辉)

(上接第1410页)

- [6] 关松荫,张德生,张志明.土壤酶及其研究法[M].北京:农业出版社,1986:1-339.
- [7] 孟立君,吴凤芝.土壤酶研究进展[J].东北农业大学学报,2004,35(5):622-626.
- [8] 闵长莉,汪学军.蛇足石杉产石杉碱甲内生真菌的分离鉴定[J].天然产物研究与开发,2013,25:590-593.
- [9] 马英姿,刘江海,许欢,等.蛇足石杉的离体培养[J].植

物生理学报,2015,51(4):465-470.

- [10] 孟立君,吴凤芝.土壤酶研究进展[J].东北农业大学学报,2004,35(5):622-626.
- [11] HERIBER I. Development in soil microbiology since the mid1960s[J]. Geoderma, 2001, 100(3):389-402.
- [12] 张焱华,吴敏,何鹏,等.土壤酶活性与土壤肥力关系的研究进展[J].安徽农业科学,2007,35(34):11139-11142.

(收稿日期:2019-02-27 编辑:王笑辉)