

# HPLC法同时测定桑叶药材及其炮制品中绿原酸、芦丁和异槲皮苷的含量

程聪梅<sup>1\*</sup>, 毛菊华<sup>2</sup>, 余乐<sup>2</sup>(1.龙泉市中医院, 浙江龙泉 323700; 2.丽水市食品药品检验所, 浙江丽水 323000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)21-2990-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.21.36

**摘要** 目的:建立同时测定桑叶药材及其炮制品炒桑叶、蜜桑叶中绿原酸、芦丁和异槲皮苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.2%磷酸(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为350 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:绿原酸、芦丁、异槲皮苷的检测质量浓度线性范围分别为8.20~82.01 μg/ml( $r=0.999\ 9$ )、2.76~27.60 μg/ml( $r=0.999\ 9$ )、4.74~47.39 μg/ml( $r=0.999\ 9$ );精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率分别为98.58%~100.91%(RSD=1.02%, $n=6$ )、99.19%~101.00%(RSD=0.82%, $n=6$ )、98.41%~101.51%(RSD=1.08%, $n=6$ )。结论:该方法操作简便,稳定性、重复性好,可用于桑叶药材及其炮制品中绿原酸、芦丁和异槲皮苷含量的同时测定。

**关键词** 桑叶;炮制品;绿原酸;芦丁;异槲皮苷;高效液相色谱法

## Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Rutin and Isoquercitrin in *Morus alba* and Its Processed Products by HPLC

CHENG Congmei<sup>1</sup>, MAO Juhua<sup>2</sup>, YU Le<sup>2</sup>(1.Longquan Hospital of TCM, Zhejiang Longquan 323700, China; 2. Lishui Institute for Food and Drug Control, Zhejiang Lishui 323000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous contents determination of chlorogenic acid, rutin and isoquercitrin in *Morus alba*, fried *M. alba* and honeyed *M. alba*. METHODS: HPLC was performed on the column of Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> with mobile phase of acetonitrile -0.2% phosphoric acid (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 350 nm, the column temperature was 30 ℃, and injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 8.20-82.01 μg/ml for chlorogenic acid ( $r=0.999\ 9$ ), 2.76-27.60 μg/ml for rutin ( $r=0.999\ 9$ ) and 4.74-47.39 μg/ml for isoquercitrin ( $r=0.999\ 9$ ); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 98.58%-100.91% (RSD=1.02%, $n=6$ ), 99.19%-101.00% (RSD=0.82%, $n=6$ ) and 98.41%-101.51% (RSD=1.08%, $n=6$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple with good stability and reproducibility, and can be used for the simultaneous determination of chlorogenic acid, rutin and isoquercitrin in different processed drugs of *M. alba*.

**KEYWORDS** *Morus alba*; Processed products; Chlorogenic acid; Rutin; Isoquercitrin; HPLC

桑叶为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶,性味甘、苦、寒,归肺、肝经,具疏散风热、清肺润燥、清肝明目的功效,主要

用于风热感冒、肺热燥咳、头晕头痛、目赤昏花等证的治疗<sup>[1]</sup>。桑叶中含多种类型的化学成分<sup>[2-3]</sup>,其中黄酮类为其重要活性

于DB-WAX更适用于分析挥发性的有机酸,故本研究最终选择了DB-FFAP色谱柱。

氟比洛芬酯易溶于乙腈,且乙腈不干扰1,1-乙二醇二乙酸酯与乙酸的分离,因此本研究选用乙腈作为溶剂。

综上所述,本方法简便、灵敏、可靠,可用于氟比洛芬酯原料药中1,1-乙二醇二乙酸酯和乙酸的残留量测定。

### 参考文献

- [1] 韩斌,赵国胜.氟比洛芬酯的临床应用进展[J].中国误诊学杂志,2011,11(7):1 529.
- [2] 常潘,张瑞芹.氟比洛芬酯抗炎及免疫保护研究进展[J].中华实用诊断与治疗杂志,2013,27(10): 937.
- [3] 丁冬,屠伟峰.氟比洛芬酯注射液用于术后镇痛的研究进展[J].实用医学杂志,2007,23(11):1 603.

[4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:通则0861 105-109.

[5] 周海钧.药品注册的国际技术要求:质量部分[M].北京:人民卫生出版社,2000:82-89.

[6] 于生,单鸣秋,邵霞,等.毛细管气相色谱法测定甲磺酸伊马替尼原料药中有机溶剂残留量[J].中国药房,2013,24(9):838.

[7] 刘瑞萍,邢军,刘文娟,等.毛细管气相色谱法测定盐酸头孢卡品酯原料药中残留溶剂[J].药学研究,2014,33(6): 339.

[8] 李园,于捷飞,徐箐,等.毛细管气相色谱法测定盐酸吉西他滨中5种有机溶剂残留量[J].中国医院药学杂志,2013,33(14):1 199.

(收稿日期:2015-12-09 修回日期:2016-06-06)

(编辑:周 箐)

\*主管中药师。研究方向:中成药、中药材(饮片)质量。电话:0578-7220537。E-mail: 659633482@qq.com

成分<sup>[4]</sup>。2015年版《中国药典》对桑叶中芦丁的含量进行了规定,但相关研究表明药典方法存在一定不足,测得的芦丁含量实为芦丁和异槲皮苷含量的总和<sup>[5]</sup>。另有研究表明,桑叶中含有大量的绿原酸<sup>[6-7]</sup>,而绿原酸具有保肝利胆、抗菌、抗病毒、降血压、抗氧化及抗癌等作用<sup>[8-10]</sup>,与桑叶的功效相似。在浙江省习用药材中除桑叶外还有炒桑叶和蜜桑叶等炮制品,应用亦较为广泛。故本研究建立高效液相色谱法(HPLC)对桑叶药材与其炮制品(炒桑叶、蜜桑叶)中的绿原酸、芦丁和异槲皮苷的含量进行测定和对比研究,以期更好地控制该药材的质量。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括G4212B型二极管阵列检测器(美国Agilent公司);XS104型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);水浴锅(上海梅香仪器公司)。

### 1.2 试剂

绿原酸对照品(批号:110753-201314,纯度:96.6%)、芦丁对照品(批号:100080-200707,纯度:90.5%)、异槲皮苷对照品(批号:111809-201403,纯度:92.9%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、磷酸均为色谱纯,甲醇为分析纯,水为纯化水。

### 1.3 药材

试验用桑叶、炒桑叶、蜜桑叶均为浙江省各厂家生产(样品来源见表1),产地均为浙江,经龙泉市中医院副主任中药师谢琦敏鉴定为真品(水分采用烘干法测得)。

表1 样品来源

Tab 1 Origin of samples

待测样品	编号	批号	水分, %	
桑叶	1	141210	8.7	
	2	140521	8.4	
	3	130820	8.6	
	4	1310064	8.9	
	5	140601	9.6	
	6	140802	9.2	
	7	1212230	10.4	
	8	140221	9.2	
炒桑叶	9	143072	3.8	
	10	130525	6.6	
	11	140210	2.3	
	12	20131202	3.9	
	13	20131203	4.6	
	14	150429	3.9	
	15	20140424	6.4	
	16	20140425	4.2	
	蜜桑叶	17	1211087	3.2
		18	20140425	4.5
19		1305054	7.3	
20		20140428	6.8	
21		20140157	4.5	
22		1405079	4.2	
23		1407023	4.4	
24		20140424	5.7	

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.2%磷酸(B),梯度洗脱(0~10 min, 12%→14% A; 10~11 min, 14%→16% A; 11~28 min, 16% A);流速:1.0 ml/min;检测波长:350 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

## 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取绿原酸、芦丁、异槲皮苷对照品适量,置于同一量瓶中,加甲醇溶解并制备成绿原酸、芦丁、异槲皮苷质量浓度分别为82.01、27.60、47.39 μg/ml的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取样品粉末(过3号筛)0.5 g,加入50%甲醇25 ml,称定质量,加热回流提取0.5 h,取出放冷,以50%甲醇补足减失的质量,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

### 2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果,该色谱条件下,绿原酸、芦丁、异槲皮苷与其他成分可达到基线分离,分离度>1.5,理论板数以上述3种成分峰计均>10 000。

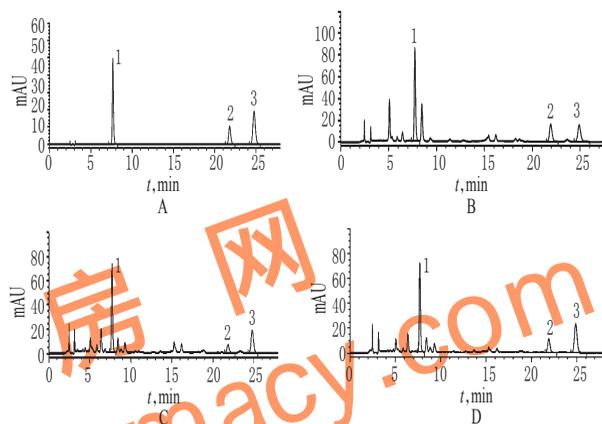


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.桑叶供试品;C.炒桑叶供试品;D.蜜桑叶供试品;1.绿原酸;2.芦丁;3.异槲皮苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance; B.test sample of *M. allba*; C.test sample of fried *M. allba*; D.test sample of honey *M. allba*; 1.chlorogenic acid; 2.rutin; 3.isoquercitrin

### 2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液1、2、4、6、8、10 ml,分别置于10 ml量瓶中,加甲醇定容,制成系列混合对照品溶液。精密量取上述系列混合对照品溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以绿原酸、芦丁、异槲皮苷质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程分别为 $y=14.217 4x+9.129 6$ ( $r=0.999 9$ )、 $y=16.376 4x+4.103 1$ ( $r=0.999 9$ )、 $y=21.052 6x+6.602 6$ ( $r=0.999 9$ )。结果表明,绿原酸、芦丁、异槲皮苷检测质量浓度线性范围分别为8.20~82.01、2.76~27.60、4.74~47.39 μg/ml。

### 2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,绿原酸、芦丁、异槲皮苷峰面积的RSD分别为0.86%、1.02%、0.98%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:2)适量,分别于室温下放置0、4、8、12、24、36 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸、芦丁、异槲皮苷峰面积的RSD分别为1.26%、1.08%、1.02%( $n=6$ ),表明供试品溶液在室温放置36 h内基本稳定。

### 2.7 重复性试验

精密称取同一批样品(编号:2)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸、芦丁、异槲皮苷峰面积的RSD分别为1.20%、1.05%、0.99%( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

## 2.8 加样回收率试验

取已知含量样品(编号:2)适量,共6份,分别加一定质量的绿原酸、芦丁、异槲皮苷对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 2 Results of recovery test( $n=6$ )

待测成分	称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
绿原酸	0.250 1	0.511 9	0.512 5	1.018 9	98.92	99.76	1.02
	0.250 3	0.512 3	0.512 5	1.029 5	100.91		
	0.251 2	0.514 2	0.512 5	1.029 6	100.57		
	0.250 8	0.513 4	0.512 5	1.021 1	99.07		
	0.250 7	0.513 1	0.512 5	1.028 3	100.52		
	0.251 6	0.515 0	0.512 5	1.020 2	98.58		
芦丁	0.250 1	0.147 2	0.146 8	0.294 9	100.60	100.26	0.82
	0.250 3	0.147 3	0.146 8	0.295 6	101.00		
	0.251 2	0.147 9	0.146 8	0.295 7	100.71		
	0.250 8	0.147 6	0.146 8	0.293 3	99.23		
	0.250 7	0.147 6	0.146 8	0.295 6	100.84		
	0.251 6	0.148 1	0.146 8	0.293 7	99.19		
异槲皮苷	0.250 1	0.216 2	0.217 9	0.430 6	98.41	100.41	1.08
	0.250 3	0.216 3	0.217 9	0.434 9	100.31		
	0.251 2	0.217 1	0.217 9	0.438 3	101.51		
	0.250 8	0.216 8	0.217 9	0.435 3	100.29		
	0.250 7	0.216 7	0.217 9	0.436 8	101.02		
	0.251 6	0.217 5	0.217 9	0.437 3	100.89		

## 2.9 样品含量测定

取各批样品适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算样品含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果( $n=3$ )

Tab 3 Results of content determination of samples( $n=3$ )

待测成分	编号	桑叶, %	炒桑叶, %	蜜桑叶, %	
绿原酸	1	0.129	0.223	0.135	
	2	0.226	0.127	0.143	
	3	0.147	0.204	0.221	
	4	0.123	0.255	0.256	
	5	0.093	0.245	0.202	
	6	0.160	0.236	0.086	
	7	0.099	0.324	0.084	
	8	0.114	0.238	0.249	
	芦丁	9	0.029	0.027	0.031
		10	0.065	0.030	0.028
		11	0.031	0.036	0.051
		12	0.031	0.054	0.080
		13	0.020	0.057	0.036
		14	0.034	0.036	0.015
		15	0.020	0.073	0.016
		16	0.044	0.032	0.061
异槲皮苷	17	0.086	0.075	0.049	
	18	0.095	0.076	0.053	
	19	0.056	0.068	0.060	
	20	0.052	0.068	0.159	
	21	0.025	0.070	0.101	

续表3

Continued tab 3

待测成分	编号	桑叶, %	炒桑叶, %	蜜桑叶, %
异槲皮苷	22	0.038	0.098	0.028
	23	0.040	0.145	0.030
	24	0.048	0.089	0.121

## 3 讨论

本试验选用加热回流提取法,考察了50%甲醇、75%甲醇、甲醇等溶剂对样品中绿原酸、芦丁、异槲皮苷的提取效果,发现50%甲醇和75%甲醇的提取效果相当,而甲醇的提取效果最差,因此本研究选用50%甲醇为提取溶剂。此外,经扫描绿原酸的最大吸收波长为327 nm,芦丁和异槲皮苷的最大吸收波长为354 nm,进而笔者考察了330、340、350 nm波长处的响应值。结果显示,350 nm波长处3个成分的响应值均较高,峰形较好,故选用350 nm为检测波长。

由含量测定结果可见,桑叶、炒桑叶、蜜桑叶中绿原酸、芦丁、异槲皮苷的含量差异均较大,且3种成分的平均含量由高到低为炒桑叶>蜜桑叶>桑叶,由于蜜桑叶中还添加了大量的蜂蜜,因此其等量桑叶原药材中3种成分的含量应更高。该结果可能与炒桑叶和蜜桑叶在炮制过程中需要加热炒制,使药材中有关成分更易被提取出来有关。

本研究建立的HPLC法操作简便,稳定性、重复性好,可同时测定桑叶药材及其炮制品中绿原酸、芦丁和异槲皮苷的含量,并可为其质量控制提供方法和依据。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 297.
- [2] 邱进, 王晓静, 王元书, 等. 桑叶化学成分的研究[J]. 中成药, 2008, 30(9): 370.
- [3] 郑雪, 夏旭. 桑叶化学成分及其药用保健功的研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19(12): 2 210.
- [4] 廖兴林, 杨定乾. 桑叶药理活性及功能成分的研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2008(4): 47.
- [5] 张丽丽, 白永亮, 宿树兰, 等. 中国药典中国桑叶含量测定项下色谱条件的优化[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(4): 717.
- [6] 戴开金, 罗奇志, 侯连兵, 等. HPLC法测定桑叶中芦丁、绿原酸和槲皮素[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(3): 579.
- [7] 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.
- [8] 汪启炉, 温家根, 陈玉祥. 超声法提取抱石莲中绿原酸[J]. 中南药学, 2013, 11(1): 19.
- [9] 滕建北, 谢凤凤, 梁雁, 等. HPLC法测定瑶药鸢尾中绿原酸的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(6): 797.
- [10] 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.

(收稿日期:2015-08-10 修回日期:2015-11-25)

(编辑:张 静)