

HPLC 测定桑白皮中绿原酸的含量

谢臻¹, 钟明玉², 曾海生¹

(1. 广西中医学院药学院, 南宁 530001; 2. 广西中医学院第一附属医院, 南宁 530022)

[摘要] 目的: 建立桑白皮饮片中绿原酸的含量测定方法。方法: 利用星点设计法优化供试品溶液的提取条件, 采用 HPLC 测定绿原酸的含量, Diamonsil C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.4% 磷酸 (11:89); 检测波长 327 nm; 柱温 30 °C, 流速 1 mL·min⁻¹。结果: 供试品溶液最佳的提取条件为 60% 甲醇、提取时间 15 min, 溶媒比为 10 倍; 绿原酸进样量范围在 0.045 ~ 0.45 μg, 峰面积与进样量呈良好的线性关系, 回归方程为 $Y = 2329.0289X + 8.1841$ ($r = 0.9999$), 平均回收率为 97.89%, RSD 3.14%。结论: 建立的方法简便、重复性好、准确度高, 可用于桑白皮饮片的质量控制。

[关键词] 桑白皮; 绿原酸; 高效液相色谱; 星点设计法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)13-0100-04

Content Determination of Chlorogenic Acid in Mori Cortex by HPLC

XIE Zhen¹, ZHONG Ming-Yu², ZENG Hai-Sheng¹

(1. Faculty of Pharmacy, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China;
2. The First Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530022, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the content determination of chlorogenic acid in *Mori Cortex*. **Method:** The central composite rotatable design was used to optimize extracted conditions. The content of chlorogenic acid in *Mori Cortex* was determined by HPLC on a Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) detected at the wavelength of 327 nm with acetonitrile-0.4% phosphoric acid (11:89) solution as the mobile phase, the flow rate was 1 mL·min⁻¹. **Result:** The optimum extractable conditions to obtain desirable extraction yields for chlorogenic acid were found at the methanol concentration of 60%, extraction time of 45 min and solvent quantity of 10 times, chlorogenic acid was linear in the range of 0.045-0.45 μg, regress equation was $Y = 2329.0289X + 8.1841$ ($r = 0.9999$), the average recovery was 97.89% with RSD of 3.14%. **Conclusion:** The method of HPLC determination is simple, reliable and accurate and can be used for the quality control of *Mori Cortex*.

[Key words] Mori Cortex; chlorogenic acid; HPLC; central composite rotatable design

桑白皮为桑科植物桑 *Morus alba* L. 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, 纵向剖开, 剥取根皮, 晒干^[1]。主产安徽、河南、浙江、江苏、湖南等地。历版药典均有收载, 是常用中药之一。其性味甘寒, 归肺、脾经, 具有泻肺平喘, 行水消肿的功效, 主治肺热喘咳、吐血、水肿、脚

气、小便不利等^[2]。《中国药典》2010 年版桑白皮药材项下没有含量测定项。文献报道本品总黄酮^[3]、桑辛素^[4]、东莨菪内酯^[5]、桑根酮 C^[6] 的含量测定, 但未见对其中绿原酸的含量测定报道。研究表明, 绿原酸具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、免疫调节、降糖等多种作用^[7], 应该是桑白皮发挥其功效的有效成分之一。因此, 本实验采用高效液相色谱测定桑白皮中绿原酸的含量, 旨在为桑白皮的质量控制提供方法, 为今后进一步的开发与研究提供科学依据。

[收稿日期] 20110130(004)

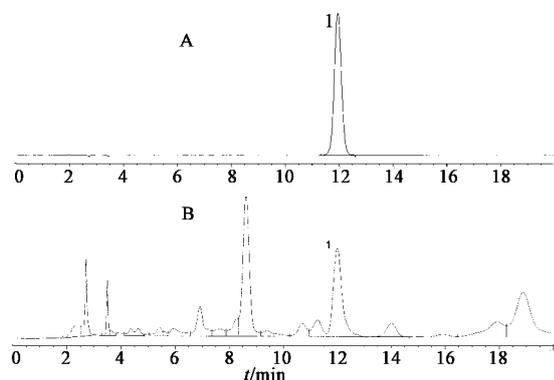
[第一作者] 谢臻, 博士, 讲师, 从事中药质量控制、复方配伍研究, Tel: 0771-3137585, E-mail: xie_zhen@126.com

1 仪器和试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);KQ-200VDB 型超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司);LG16-WA 型台式高速离心机(北京京立离心机有限公司);SH2-D 循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂);绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号 110753-200413),甲醇为色谱纯(Fisher Scientific 公司),水为高纯水,其余试剂为分析纯,桑白皮饮片(广西柳州市神农中药饮片厂,批号 20090907,20100525,20100128,20101026,20100705)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.4% 磷酸(11:89);检测波长 327 nm;柱温 30 °C;流速 1 mL·min⁻¹;进样量 10 μL。见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;1. 绿原酸

图 1 桑白皮 HPLC

2.2 供试品溶液提取方法优化

2.2.1 星点设计试验 根据预试验结果,采用星点设计法对桑白皮供试品溶液的甲醇超声提取方法进行优化,以绿原酸的含量为评价指标,选择甲醇体积分数、超声时间、溶媒比 3 个因素。星点设计实验因素按矩阵选择的各水平及其对应的编码值见表 1~2。

表 1 星点设计因素与水平

因素	水平				
编码值	-1.633	-1	0	1	1.633
甲醇体积分数/%	20.5	30	45	60	69.5
时间/min	13.7	20	30	40	46.3
溶媒比/倍	3.4	5	7.5	10	11.6

表 2 星点设计试验

No.	X ₁	X ₂	X ₃	Y 绿原酸/mg·g ⁻¹
1	-1	-1	-1	0.281
2	-1	1	1	0.289
3	1	-1	1	0.258
4	1	1	-1	0.246
5	0	0	0	0.345
6	0	0	0	0.334
7	-1	-1	1	0.277
8	-1	1	-1	0.197
9	1	-1	-1	0.261
10	1	1	1	0.320
11	0	0	0	0.328
12	0	0	0	0.349
13	-1.633	0	0	0.159
14	1.633	0	0	0.263
15	0	-1.633	0	0.265
16	0	1.633	0	0.251
17	0	0	-1.633	0.186
18	0	0	1.633	0.254
19	0	0	0	0.311
20	0	0	0	0.318

2.2.2 模型拟合 以绿原酸含量为因变量,对实验结果进行二项式拟合,以方程各项系数 $P < 0.05$ 作为显著标准,对方程进行优化,得二项式方程:

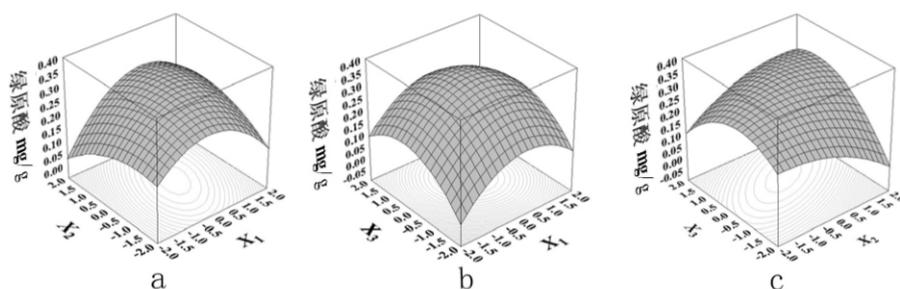
$$Y = 0.32762 + 0.015799X_1 + 0.020272X_3 - 0.03351X_1^2 - 0.01597X_2^2 - 0.03008X_3^2 + 0.01489X_1X_2 + 0.021596X_2X_3$$

($r = 0.8901$)

2.2.3 提取条件优化和验证 根据二项式方程绘制响应曲面图,结果见图 2。对二项式方程进行求导,可得:当提取条件为 60.7% 甲醇、提取时间为 45.5 min,溶媒比为 11.6 倍时, Y 有预测的最大值 0.335。本实验最终选取桑白皮的最佳提取条件为 60% 甲醇、提取时间为 15 min,溶媒比为 10 倍。取桑白皮饮片粉末约 5 g,精密称定,共取 3 份,根据确定的最佳提取条件制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定。结果绿原酸质量分数平均值为 $0.365 \pm 0.0079 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结果表明,本法的提取效果较好。

2.3 溶液制备

2.3.1 供试品溶液的制备 取药材粉末 5.0 g,精密称定,加 60% 甲醇 50 mL,称重,超声 45 min,放



a. 甲醇体积分数和提取时间; b. 甲醇体积分数和溶媒比; c. 提取时间和溶媒比
图 2 响应曲面图

冷, 补足质量, 滤过, 取续滤液, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜滤过, 即得。

2.3.2 对照品溶液的制备 取绿原酸对照品适量, 精密称定, 加 60% 甲醇制成每 1 mL 含绿原酸 $45 \mu\text{g}$ 对照品溶液, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜滤过, 即得。

2.4 线性关系的考察 分别精密吸取对照品溶液 $1, 2, 4, 6, 8, 10 \mu\text{L}$, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件进行测定, 以峰面积积分值 Y 为纵坐标, 对照品量 $X (\mu\text{g})$ 为横坐标, 绘制标准曲线得绿原酸的回归方程 $Y = 2329.0289X + 8.1841 (r = 0.9999)$ 。绿原酸在 $0.045 \sim 0.45 \mu\text{g}$, 峰面积与进样量呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液, 重复进样 6 次, 按 2.1 项下色谱条件进行分析, 测定绿原酸峰面积。结果绿原酸峰面积 RSD 0.57% , 表明该方法精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液, 分别于 $0, 4, 8, 12, 16, 24 \text{ h}$ 进样 $10 \mu\text{L}$, 按 2.1 项下色谱条件进行分析, 测定绿原酸的峰面积。结果绿原酸峰面积 RSD 1.26% , 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一批样品 6 份, 按 2.3.1 项下制备供试品溶液, 依 2.1 项下色谱条件进行分析, 测定绿原酸的峰面积并计算含量。结果桑白皮中绿原酸的平均质量分数为 $0.402 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 2.02% , 表明该方法的重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取已测知含量的样品 6 份, 每份 2.5 g , 精密称定, 分别精密加入绿原酸对照品溶液 ($0.45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 2 mL , 按供试品溶液的制备方法制备, 进样 $10 \mu\text{L}$, 记录色谱图, 计算加样回收率, 结果见表 3。

2.9 样品测定 按 2.3.1 项供试品溶液的制备方法 2.1 项下的色谱条件对 5 批桑白皮饮片进行测

定, 结果见表 4。

表 3 绿原酸加样回收率测定 ($n = 6$)

No.	样品中含 量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率 /%	RSD /%
1	0.922	0.900	1.803	97.92		
2	0.923	0.900	1.812	98.78		
3	0.917	0.900	1.803	98.46	97.89	3.14
4	0.921	0.900	1.818	99.64		
5	0.919	0.900	1.828	100.95		
6	0.924	0.900	1.825	100.13		

表 4 桑白皮中绿原酸的含量测定 ($n = 3$) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

批号	绿原酸
20090907	0.396
20100525	0.368
20100128	0.404
20101026	0.391
20100705	0.371

3 讨论

在预试验中, 供试品溶液的制备方法考察了超声提取和回流提取 2 种方法, 结果超声提取含量较高, 处理过程较简便, 所以本实验选择超声提取为供试品溶液的制备方法。

星点设计是多因素五水平的优化方法, 首先利用二项式非线性回归进行分析和计算, 得到应变量和自变量之间的函数关系, 再利用此函数关系来求出最优的自变量值。所以, 相对于正交设计, 星点设计-响应面优化法能更准备地找到所考察因素的最佳条件, 且在最低要求下, 只是比正交设计多 6 个实验号。因此, 本实验采用星点设计-响应面优化法对提取条件进行优化, 该方法有专用的统计软件可以设计实验矩阵和处理数据, 操作方便, 结果能比较精确地找到各考察因素在较佳条件下因变量的最大值。

西升麻中三萜皂苷类分离鉴定及药材质量标准研究

靳波^{1,2}, 刘友平^{1,2*}, 陈鸿平^{1,2}, 赵祎姗^{1,2}, 彭月^{1,2}

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137;

2. 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] 目的:完善西升麻药材质量标准。方法:首次以分离的三萜皂苷类结合酚酸类建立定性及定量测定方法。结果:鉴定分离出的三萜皂苷类为升麻苷 H-1;测定阿魏酸、异阿魏酸和咖啡酸含量之和为 0.22% ~ 1.90%, 升麻苷 H-1 含量为 0.10% ~ 1.28%。结论:本试验结果能全面的反映西升麻药材内在质量,且稳定、简单、可行,为西升麻药材质量标准的完善提供参考。

[关键词] 西升麻;升麻苷 H-1;总酚酸;质量标准

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)13-0103-04

Isolation and Identification of Triterpenoid Saponins and Quality Standards of Cimicifugae Rhizome

JIN Bo^{1,2}, LIU You-ping^{1,2*}, CHEN Hong-ping^{1,2}, ZHAO Yi-shan^{1,2}, PENG Yue^{1,2}

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine Pharmacy, Chengdu 611137, China;

2. Laboratory of Resource System Research and Development Utilization of Traditional Chinese Medicine Constructioned by PRC and Sichuan Province, Chengdu 611137, China)

[收稿日期] 20101030(004)

[基金项目] 质检公益性行业科研专项(2007GYB075-2);校学生科研实践创新课题(013-011-39)

[第一作者] 靳波, 硕士研究生, 研究方向:中药化学成分与质量标准化研究, Tel:15882061845, E-mail:jinboliuyuan@126.com

[通讯作者] * 刘友平, 研究员, 博士生导师, 研究方向:中药质量标准化及药效物质基础研究, Tel:028-61800235, E-mail:yxjxsy@cdutcm.edu.cn

在选择色谱条件时,流动相考察了不同比例下乙腈与 0.4% 磷酸的测定效果,结果以乙腈-0.4% 磷酸(11:89)时的保留时间和分离度最佳。如增大乙腈比例,保留时间太小,分离度达不到药典规定的要求;减小乙腈比例,分离度较好,但保留时间太长,耗时又耗溶剂;实验还考察同等色谱条件下依利特 C₁₈ 和 Diamonsil C₁₈ 2 种色谱柱的分离效果,结果 Diamonsil C₁₈ 的柱效较高,分离度较依利特柱好,柱压较稳定,所以最终选 Diamonsil C₁₈ 为本实验所用色谱柱。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010:280.

- [2] 张敦,陈曼,张涵庆,等.桑白皮的化学成分研究[J].天然产物研究与开发.2010,22:416.
- [3] 徐世义,张国刚,张洪霞.桑白皮药材质量控制研究[J].中药材.2006,29(2):184.
- [4] 宗玉英,叶兆波,黄婷霞,等.桑白皮中桑辛素的含量测定[J].中国中药杂志.2007,32(11):1038.
- [5] 孙静芸,周羽琪,李洪玉,等.不同来源桑白皮东莨菪内酯含量测定[J].中草药.2003,34(3):266.
- [6] 李洪玉,孙静芸,吴素香.不同来源桑白皮降压成分桑根酮 C 含量测定[J].中成药.2002,24(2):104.
- [7] 吴卫华,康楨,欧阳冬生,等.绿原酸的药理学研究进展[J].天然产物研究与开发.2006,18:691.

[责任编辑] 蔡仲德