

HPLC法测定桑叶中芦丁、绿原酸和槲皮素

戴开金¹, 罗奇志², 侯连兵³ (南方医科大学¹ 产业管理处;² 分析测试中心;³ 南方医院药学部, 广州 广东 510515)

摘要:目的 建立同时测定桑叶药材中芦丁、绿原酸和槲皮素的含量测定方法。方法 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Kromasil C18 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m)柱; 流动相为乙腈: 甲醇: 0.01 mol/L 醋酸铵液(100 ml 中含 0.2 ml 三乙胺, 用冰醋酸调 pH 至 3.50±0.05); 流速 1.0 ml/min; 柱温为 25 $^{\circ}$ C; 检测波长为 350 nm。结果 芦丁线性范围为 0.196~1.960 μ g, $r=0.9998$, 样品的平均加样回收率为 97.0%, RSD 2.69%; 绿原酸线性范围为 0.158~1.580 μ g, $r=0.9995$, 样品的平均加样回收率为 96.9%, RSD 2.10%; 槲皮素线性范围为 0.0848~0.848 μ g, $r=0.9992$, 样品的平均加样回收率为 96.2%, RSD 2.90%。结论 该法简便、准确, 可作为桑叶中芦丁、绿原酸、槲皮素的含量测定。

关键词: 桑叶; HPLC; 芦丁; 绿原酸; 槲皮素

中图分类号: R971

文献标识码: A

文章编号: 1673-4254(2009)03-0579-02

桑叶是桑科桑属植物桑 *Morus alba* L. 的叶, 具有疏散风热、润肺燥、清肝明目的功效, 用于风热感冒、肺热燥咳、头晕头痛、目赤昏花等症。芦丁^[1]、绿原酸^[2]和槲皮素^[3]均为桑叶的主要有效成分。2005 版《中国药典》中只有芦丁含量测定项, 无绿原酸和槲皮素的含量测定项, 为了有效控制药材的质量, 本文建立了高效液相色谱法同时测定桑叶中芦丁、绿原酸和槲皮素的含量。该法简便、准确, 适用于桑叶药材的质量分析和控制。

1 仪器与试剂

美国安捷伦公司 Agilent 1100 高效液相色谱仪, 美国 HP8453 紫外 - 可见分光光度仪, CP 324S 型分析天平 (德国 Sartorius), TRANSSOIC DIGITALS 超声机。芦丁、绿原酸、槲皮素对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 0080-9504, 110753-200413, 100081-200406); 甲醇、冰醋酸均为分析纯, 乙腈为色谱纯; 超纯水 (自制); 桑叶 (市售)。

2 方法

2.1 测定波长的选择

各取对照品溶液在紫外上波长为 200~800 nm 处扫描, 芦丁在 210、257、359 nm 处分别有 3 个波峰; 绿原酸在 201、218、328 nm 处分别有 3 个波峰; 槲皮素在 208、255、356 nm 处分别有 3 个波峰。三者都在 350 nm 处有较强的紫外吸收, 故选择 350 nm 作为检测波长。

2.2 色谱条件^[4-7]

色谱柱为 Kromasil C18 柱 (4.6 mm×250 mm, 5

μ m); 流动相为乙腈: 甲醇: 0.01 mol/L 醋酸铵液(100 ml 中含 0.2 ml 三乙胺, 用冰醋酸调 pH 值至 3.50±0.05); 流速为 1.0 ml/min; 进样量为 10 μ l。在此色谱条件下绿原酸、芦丁和槲皮素对照品及桑叶样品的色谱见图 1。

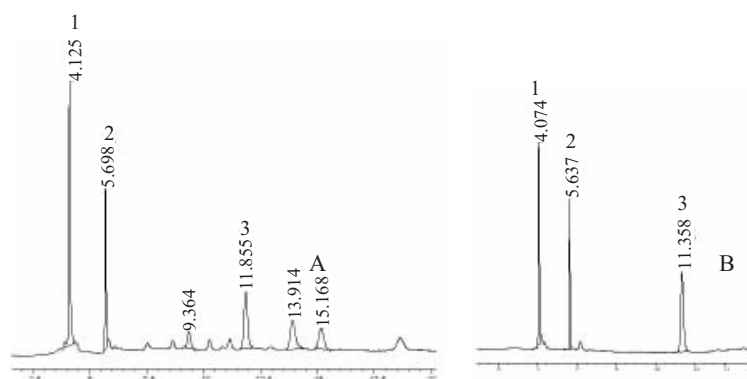


图 1 A 桑叶, B 绿原酸、槲皮素、芦丁对照品 HPLC 色谱图

1 号峰为绿原酸; 2 号峰为槲皮素; 3 号峰为芦丁

2.3 对照品溶液的制备

准确称绿原酸取对照品 3.95 mg、槲皮素取对照品 2.12 mg、芦丁取对照品 4.90 mg, 至 25.00 ml 量瓶中, 甲醇溶解, 并加至刻度, 摇匀, 分别取 1.00、2.00、4.00、6.00、8.00 ml, 至 10.00 ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.25 μ m 微孔滤膜过滤, 即得系列对照品溶液。

2.4 桑叶样品溶液的制备

取桑叶 3.00 g 桑叶粗粉 (另取少量样品进行水分测定) 置于锥形瓶中, 加 40 ml 甲醇, 超声提取 40 min, 置于通风橱中用 0.45 μ m 微孔滤膜抽滤, 滤渣再加 40 ml 甲醇进行超声提取 40 min, 同法操作。合并两次滤液移至 100.00 ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.25 μ m 微孔滤膜滤过, 备用。

2.5 标准曲线的绘制

收稿日期: 2008-10-07

作者简介: 戴开金 (1973-), 男, 博士, 讲师, 电话: 020-61648168, E-mail: daikaijin12@126.com

通讯作者: 罗奇志, 电话: 020-62789061, E-mail: luoqizhi@fimmu.com

在上述色谱条件下,芦丁、绿原酸和槲皮素分别进样,测定峰面积,以峰面积为纵坐标,以对应的芦丁、绿原酸和槲皮素的质量(μg)为横坐标,绘制标准曲线,并计算回归方程:

绿原酸: $y=666.44x+6.8989$, $R^2=0.9995$

槲皮素: $y=741.92x+2.3408$, $R^2=0.9992$

芦丁: $y=507.15x+23.364$, $R^2=0.9998$

3 方法学考察

3.1 精密度实验

取同一样品溶液,按上述色谱条件,连续进样 6 次,进样量 $10\ \mu\text{l}$,以峰面积积分值计算,芦丁峰面积 RSD 为 1.02%,绿原酸峰面积 RSD 为 1.72%,槲皮素峰面积 RSD 为 1.72%,表明该方法精密度良好。

3.2 重复性实验

取同一批样品,按样品的制备方法制备 6 份样品溶液,分别进样 $10\ \mu\text{l}$,以峰面积积分值计算,芦丁峰面积 RSD 为 1.12%,绿原酸峰面积 RSD 为 1.91%,槲皮素峰面积 RSD 为 2.11%,表明该方法重复性良好。

3.3 稳定性试验

取同一样品溶液,按上述色谱条件,在 24 h 内测定 7 次,测得芦丁峰面积 RSD 为 1.22%,绿原酸峰面积 RSD 为 2.09%,槲皮素峰面积 RSD 为 2.34%,表明样品在 24 h 内稳定。

3.4 加样回收率实验

样品的配置:取 $10\ \text{ml}$ 量瓶 6 个,分别加入样品溶液 $5\ \text{ml}$,对照品溶液 $3\ \text{ml}$,定容至 $10\ \text{ml}$, $10\ \mu\text{l}$ 进样,测得芦丁、绿原酸和槲皮素的平均加样回收率分别为 97.0%、96.9%和 97.2%,RSD 分别为 2.69%、2.10%和 2.90%($n=6$)。

4 样品测定

按“2.4”所述方法制备样品溶注入高效液相色谱仪,测定了 3 批桑叶样品中绿原酸、芦丁和槲皮素的含量,结果见表 1,结果表明三批桑叶中芦丁的含量相对较为稳定,但绿原酸、槲皮素的含量差异较大,由于绿原酸和槲皮素是桑叶的主要活性成分之一,因此为控制药材的质量,应增加桑叶中绿原酸和槲皮素的含量测定。

表 1 桑叶中绿原酸、芦丁及槲皮素的含量测定结果($n=3$)

样品	绿原酸($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/%	芦丁($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/%	槲皮素($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/%
1	1.894	2.13	1.533	2.43	0.465	2.41
2	1.253	1.98	1.421	2.91	0.731	2.58
3	2.045	2.64	1.662	2.11	0.345	1.86

5 讨论

以甲醇为提取剂,考察了索氏回流提取和超声提取对桑叶的提取效果,结果表明,40 min 超声提取 2 次与索氏回流提取 8 h,结果无显著性差异。故采用超声提取 2 次,每次 40 min,样品溶液经 $0.25\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后可直接进样分析,组分峰分离良好,对色谱柱未产生污染。

采用梯度洗脱的方法来同时测定中药中多个有效成分,目前在国内研究已有一定的研究,但梯度洗脱对色谱柱和设备要求极高,重复性较差,本方法不用采用梯度洗脱即能同时测定桑叶中的芦丁、绿原酸和槲皮素含量,方法简单,重复性好,目前尚未见文献报道。

2005 版《中国药典》中桑叶的含量测定只有芦丁项,无绿原酸和槲皮素的含量测定项,由于绿原酸和槲皮素是桑叶的主要活性成分之一,为了有效控制桑

叶药材的质量,建议建立桑叶中绿原酸和槲皮素的含量测定方法。

参考文献:

- [1] 吴卫华,康 桢,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(4): 691-4.
- [2] 崔山凤. 槲皮素的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2006, 21(6): 279-81.
- [3] 韩英华,秦元璋. 芦丁研究现状[J]. 山东中医杂志, 2003, 22(10): 635-7.
- [4] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 209.
- [5] 贾之慎,邬建敏,唐孟成. 反相高效液相色谱法同时测定桑叶提取物中芸香甙和槲皮素的含量[J]. 色谱, 1996, 14(6): 489-91.
- [6] 林 玳,吴晓薇,顾卓君. 高效液相色谱法测定胺碘酮血药浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(12): 1138-9.
- [7] 贾冬冬,李淑芬,杨鸿玲. RP-HPLC 法测定桑叶中的芦丁和异槲皮苷含量[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 499-501.