

HPLC法同时测定桑白皮中6种活性成分的含量^Δ

陈志永^{1*}, 蒙麦侠¹, 杨媛媛², 杜霞¹, 杨智峰¹, 任慧¹(1.陕西省中医药研究院, 西安 710003; 2.西安市食品药品检验所, 西安 710054)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)07-0911-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.07.11

摘要 目的:建立同时测定桑白皮中新绿原酸、桑皮苷A、绿原酸、紫云英苷、桑根酮C和桑辛素等6种活性成分含量的方法,为完善桑白皮的质量控制标准提供参考。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent 5 TC-C₁₈,流动相为乙腈-0.1%甲酸(梯度洗脱),流速为1 mL/min,检测波长为280 nm。结果:新绿原酸、桑皮苷A、绿原酸、紫云英苷、桑根酮C和桑辛素检测质量浓度的线性范围分别为0.001 06~0.042 4、0.001 67~0.066 8、0.007 95~0.318、0.001 65~0.066 0、0.005 00~0.200和0.001 24~0.049 6 mg/mL(r 均 \geq 0.999 6),定量限分别为0.11、0.14、0.81、0.17、0.45和0.12 μ g/mL,检测限分别为0.04、0.05、0.41、0.07、0.18和0.04 μ g/mL,精密密度试验的RSD分别为0.26%、0.31%、0.24%、0.27%、0.36%和0.44%($n=6$),稳定性试验的RSD分别为0.68%、0.54%、0.62%、0.53%、0.41%和0.73%($n=6$),平均方法回收率为99.1%、98.8%、98.8%、98.4%、98.5%和99.9%(RSD为0.5%~1.5%, $n=9$)。结论:该法简便、准确,可用于桑白皮中6种活性成分的同时测定。
关键词 桑白皮;高效液相色谱法;新绿原酸;桑皮苷A;绿原酸;紫云英苷;桑根酮C;桑辛素;含量测定

Content Determination of 6 Active Components in *Morus alba* by HPLC

CHEN Zhiyong¹, MENG Maixia¹, YANG Yuanyuan², DU Xia¹, YANG Zhifeng¹, REN Hui¹(1.Shaanxi Academy of TCM, Xi'an 710003, China; 2.Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710054, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the simultaneous determination of content of 6 active components as neochlorogenic acid, mulberroside A, chlorogenic acid, astragaloside, sanggenon C and morusin in *Morus alba*, and to provide reference for improving quality control standard of *M. alba*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent 5 TC-C₁₈ with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid (gradient elution) at the flow rate of 1 mL/min. The detection wavelength of 280 nm. RESULTS: The mass concentration linear range of neochlorogenic acid, mulberroside A, chlorogenic acid, astragaloside, sanggenon C and morusin were 0.001 06-0.042 4, 0.001 67-0.066 8, 0.007 95-0.318, 0.001 65-0.066 0, 0.005 00-0.200 and 0.001 24-0.049 6 mg/mL, respectively (all $r \geq 0.999 6$); the limits of quantitation were 0.11, 0.14, 0.81, 0.17, 0.45 and 0.12 μ g/mL, respectively; the limits of detection were 0.04, 0.05, 0.41, 0.07, 0.18 and 0.04 μ g/mL, respectively; RSDs of precision test were 0.26%, 0.31%, 0.24%, 0.27%, 0.36% and 0.44% ($n=6$), respectively; RSDs of stability test were 0.68%, 0.54%, 0.62%, 0.53%, 0.41% and 0.73% ($n=6$), respectively; average method recovery rates were 99.1%, 98.8%, 98.8%, 98.4%, 98.5% and 99.9% (RSDs were 0.5%-1.5%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, and can be used for simultaneous determination of 6 active components in *M. alba*.

KEYWORDS *Morus alba*; HPLC; Neochlorogenic acid; Mulberroside A; Chlorogenic acid; Astragaloside; Sanggenon C; Morusin; Content determination

桑白皮是桑科植物桑(*Morus alba* L.)的干燥根皮,始载于《神农本草经》,具有泻肺平喘、利水消肿之功效^[1]。现代药理学研究表明,桑白皮具有降血糖、降血压、利尿等作用^[2]。桑白皮中主要含有黄酮类、酚酸类、生物碱类等成分,其中异戊烯基黄酮类、黄酮醇类、酚酸类成分含量较高^[2]。但2015年版《中国药典》(一部)中未对桑白皮含量测定项进行规定。段志涛等^[2]报道了桑白皮中桑根酮C、桑根酮D及1-脱氧野尻霉素含量的测定方法;闫辉等^[3]建立了桑白皮中绿原酸、东莨菪内酯、白藜芦醇和桑色素含量测定的方法。但上述方法存在质控指标性

成分较少,或无法兼顾桑白皮中不同极性活性成分等问题。鉴于此,本研究拟建立同时测定桑白皮中6种主要活性成分——新绿原酸、桑皮苷A、绿原酸、紫云英苷、桑根酮C和桑辛素含量的方法,为桑白皮的质量控制提供一定参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-2010A 高效液相色谱(HPLC)仪,包含紫外检测器(日本岛津公司);BS210S 电子分析天平(北京赛多利斯天平有限公司, $d=0.1$ mg);KQ5200DE 超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 对照品与试剂

新绿原酸(批号:12113001)、桑皮苷A(批号:

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81603264)

* 助理研究员,博士。研究方向:中药质量控制与活性成分研究。电话:029-88462938。E-mail:chenzhiyong0612@sina.com

161112)、绿原酸(批号:151217)、紫云英苷(批号:140712)、桑根酮C(批号:16092105)、桑辛素(批号:161109)对照品(上海圻明生物有限公司,纯度:均>98%);乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

不同批次桑白皮药材的采收地、采收时间和批号等信息详见表1。所有样品经陕西省中医药研究院陈志永博士鉴定均为真品,标本存放于陕西省中医药研究院中药研究所。

表1 桑白皮样品信息

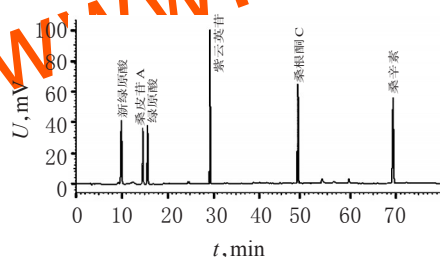
Tab 1 Information of *M. alba* samples

样品编号	品名	采收地	采收时间	批号
1	桑白皮	安徽亳州	2016-04	160410
2	桑白皮	山东济宁	2016-03	160306
3	桑白皮	河北保定	2016-05	160525
4	桑白皮	山西运城	2016-05	160526
5	桑白皮	河北保定	2017-07	170710
6	桑白皮	广东普宁	2017-07	170715

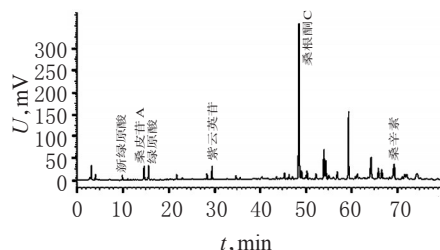
2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent 5 TC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~5 min, 9%B; 5~13 min, 9%~13%B; 13~22 min, 13%~22%B; 22~31 min, 22%~34%B; 31~44 min, 34%~48%B; 44~54 min, 48%~53%B; 54~59 min, 53%~65%B; 59~75 min, 65%B; 75~80 min, 65%~79%B);检测波长:280 nm;流速:1 mL/min;柱温:30 °C;进样量:10 μL。取“2.2.1”项下混合对照品溶液、“2.2.2”项下供试品溶液适量,按此色谱条件进样测定。结果表明,理论板数按新绿原酸、桑皮苷A、绿原酸、紫云英苷、桑根酮C和桑辛素峰计均>4 000,相邻峰间分离度均>1.5,各成分基线分离良好,色谱图见图1。



A.混合对照品溶液



B.供试品溶液

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取一定量的新绿原酸、桑皮苷A、绿原酸、紫云英苷、桑根酮C和桑辛素对照品,加入80%甲醇溶液制备成各成分质量浓度分别为0.042 4、0.066 8、0.318、0.066 0、0.200、0.049 6 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取桑白皮样品粉末(过50目筛)0.5 g,置于100 mL圆底烧瓶中,精密加入80%甲醇溶液25 mL,称质量。加热回流提取1 h,放冷,再称质量,用80%甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液过0.45 μm微孔滤膜,即得。

2.3 线性关系考察

吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,再用80%甲醇溶液分别稀释0、2、4、20、40倍,按照“2.1”项下色谱条件进样测定,以混合对照品溶液的质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)绘制标准曲线,结果各成分在相应质量浓度检测范围内线性关系均良好(r 均 $\geq 0.999 6$),各成分的回归方程和线性范围详见表2。

表2 6种活性成分检测的回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equation and linear range of 6 active components

成分	回归方程	r	线性范围 mg/mL
新绿原酸	$y=40.286x+6.505.1$	0.999 8	0.001 06~0.042 4
桑皮苷A	$y=11.596x+313.46$	0.999 8	0.001 67~0.066 8
绿原酸	$y=14.438x-540.26$	0.999 9	0.007 95~0.318
紫云英苷	$y=17.284x-192.47$	0.999 6	0.001 65~0.066 0
桑根酮C	$y=31.973x-101.98$	0.999 8	0.005 00~0.200
桑辛素	$y=34.228x+131.75$	0.999 6	0.001 24~0.049 6

2.4 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,等倍逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时得定量限(LOQ),当信噪比为3:1时得检测限(LOD)。结果,新绿原酸、桑皮苷A、绿原酸、紫云英苷、桑根酮C和桑辛素的LOQ分别为0.11、0.14、0.81、0.17、0.45和0.12 μg/mL,LOD分别为0.04、0.05、0.41、0.07、0.18和0.04 μg/mL。

2.5 精密度试验

取制备好的分别含新绿原酸0.007 07 mg/mL、桑皮苷A 0.011 1 mg/mL、绿原酸0.053 0 mg/mL、紫云英苷0.011 0 mg/mL、桑根酮C 0.033 3 mg/mL和桑辛素0.008 27 mg/mL的混合对照品溶液,按照“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,新绿原酸、桑皮苷A、绿原酸、紫云英苷、桑根酮C和桑辛素峰面积的RSD分别为0.26%、0.31%、0.24%、0.27%、0.36%和0.44%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一桑白皮供试品(编号1)溶液,室温下分别放置0、4、8、12、24、48 h后按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,新绿原酸、桑皮苷A、绿原酸、紫云英苷、桑根酮C和桑辛素峰面积的RSD分别为0.68%、0.54%、0.62%、0.53%、0.41%和0.73%($n=6$),表明供

试品溶液在室温条件下48 h内稳定。

2.7 重复性试验

取同一桑白皮样品(编号1),按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,然后按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,新绿原酸、桑皮苷A、绿原酸、紫云英苷、桑根酮C和桑辛素峰面积的RSD分别为1.52%、1.63%、1.14%、1.27%、0.74%和2.15%(n=6),表明所建立含量测定方法重复性良好。

2.8 准确度试验

精密称取已知新绿原酸、桑皮苷A、绿原酸、紫云英苷、桑根酮C和桑辛素含量的桑白皮样品(编号1)0.25 g,分别精密加入已知桑白皮中6个化合物含量80%、100%、120%的对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,每一质量浓度制备3份样品,然后按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果,6种成分的平均加样回收率在98.4%~99.9%之间,RSD均<1.5%(n=9),表明该方法准确度较好,结果见表3。

2.9 样品含量测定

精密称取不同批次桑白皮药材样品0.5 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,每批样品同时制备3份。按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积。采用外标法计算样品中新绿原酸、桑皮苷A、绿原酸、紫云英苷、桑根酮C和桑辛素的含量。结果,不同批次桑白皮药材中桑根酮C含量较高,新绿原酸含量较低,部分药材中未检测到新绿原酸,结果见表4。

3 讨论

3.1 桑白皮的应用前景

桑白皮在我国具有悠久的药用历史,常用于治疗肺热喘咳、水肿胀满尿少和面目肌肤浮肿等^[4-7]。有学者对266种生药提取物进行了葡萄糖苷酶II抑制活性测试,发现桑白皮提取物具有显著的葡萄糖苷酶II抑制活性^[5]。近年来的研究证实,桑白皮中多种成分具有显著的降血糖作用^[8]。相比同样来自桑树的中药桑叶,桑白皮富含大量具有显著降糖作用的异戊烯基黄酮类成分,这使得桑白皮在降血糖方面具有更加广泛的应用前景^[9]。

3.2 测定指标的选择

本研究结合桑白皮的临床药效,最终确定对桑白皮中的新绿原酸、桑皮苷A、绿原酸、紫云英苷、桑根酮C和桑辛素进行含量测定。其中,绿原酸、新绿原酸具有抗氧化、保肝等活性^[10-12];桑皮苷A在大鼠体内约有50%转化为氧化白藜芦醇后被吸收进入血液循环,而氧化白藜芦醇可通过提高β细胞分泌能力和抑制β细胞凋亡发挥其降糖作用^[5,13];紫云英苷具有抗炎、抗氧化、抗病毒、镇痛、抗菌、抗过敏和抗肝毒等作用^[14-15];桑根酮C和桑辛素在笔者前期筛选研究中表现出较好的α-葡萄糖苷酶抑制活性。

3.3 检测波长的选择

综合各化合物紫外吸收特征和相关文献报道,在前期研究中笔者重点考察了桑白皮提取物在紫外254、

表3 加样回收率测定结果

Tab 3 Determination results of recovery rates

成分	取用量, g	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
新绿原酸	0.241	38.801	30.000	69.627	101.2	99.1	1.1
	0.249	40.089	30.000	68.617	97.9		
	0.263	42.343	30.000	71.113	98.3		
	0.252	40.572	40.000	80.089	99.4		
	0.247	39.767	40.000	78.012	97.8		
	0.271	43.631	40.000	83.296	99.6		
	0.239	38.479	50.000	88.656	100.2		
	0.262	42.182	50.000	90.799	98.5		
	0.257	41.377	50.000	90.189	98.7		
	0.241	24.341	20.000	44.164	99.6		
0.249	25.149	20.000	44.336	98.2			
0.263	26.563	20.000	46.330	99.5			
0.252	25.452	25.000	50.603	100.3			
0.247	24.947	25.000	48.798	97.7			
0.271	27.371	25.000	51.533	98.4			
0.239	24.139	30.000	53.381	98.6			
0.262	26.462	30.000	56.067	99.3			
0.257	25.957	30.000	54.782	97.9			
0.241	205.091	160.000	365.821	100.2	98.8	0.8	
0.249	211.899	160.000	366.692	98.6			
0.263	223.813	160.000	377.288	98.3			
0.252	214.452	200.000	411.965	99.4			
0.247	210.197	200.000	406.915	99.2			
0.271	230.621	200.000	424.592	98.6			
0.239	203.389	240.000	432.304	97.5			
0.262	222.962	240.000	458.795	99.1			
0.257	218.707	240.000	449.074	97.9			
0.241	128.212	100.000	224.789	98.5			98.4
0.249	132.468	100.000	230.608	99.2			
0.263	139.916	100.000	236.557	98.6			
0.252	134.064	130.000	258.519	97.9			
0.247	131.404	130.000	259.051	99.1			
0.271	144.172	130.000	268.140	97.8			
0.239	127.148	150.000	273.268	98.6			
0.262	139.384	150.000	284.175	98.2			
0.257	136.724	150.000	280.990	98.0			
0.241	1419.490	1200.000	2595.915	99.1	98.5	0.5	
0.249	1466.610	1200.000	2629.277	98.6			
0.263	1549.070	1200.000	2696.838	98.1			
0.252	1484.280	1500.000	2921.610	97.9			
0.247	1454.830	1500.000	2907.553	98.4			
0.271	1596.190	1500.000	3071.420	99.2			
0.239	1407.710	1800.000	3175.633	99.0			
0.262	1543.180	1800.000	3293.032	98.5			
0.257	1513.730	1800.000	3237.514	97.7			
0.241	194.728	160.000	351.890	99.2			99.9
0.249	201.192	160.000	357.941	99.1			
0.263	212.504	160.000	380.327	102.1			
0.252	203.616	200.000	409.670	101.5			
0.247	199.576	200.000	404.770	101.3			
0.271	218.968	200.000	410.170	97.9			
0.239	193.112	240.000	427.048	98.6			
0.262	211.696	240.000	447.631	99.1			
0.257	207.656	240.000	448.104	100.1			

280、350、360 nm波长下的样品信息采集情况。结果,在紫外280 nm波长下检测可获得较高的检测灵敏度和较

阿利维A酸原料药的微粉化工艺研究^Δ

杨玉金*,唐舒棠,王绍辉(重庆华邦制药有限公司研发中心,重庆 401121)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)07-0914-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.07.12

摘要 目的:筛选阿利维A酸原料药的微粉化工艺。方法:以原料药粉碎后的粒径分布特征值 $d(0.9)$ 和杂质A含量为指标,筛选阿利维A酸原料药的粉碎方式(万能粉碎机、球磨机、气流粉碎机)、粉碎气源(压缩空气、高压氮气)、粉碎压力(0.2、0.4、0.6 MPa),并进行验证试验。结果:最优工艺为采用气流粉碎机以高压氮气作为气源在0.4 MPa下粉碎;验证试验中3批原料药粉碎后的粒径分别为8.57、8.55、8.54 μm (均小于10 μm , RSD=0.15%, $n=3$),杂质A的含量与未粉碎前比较未见增加(均为0.07%)。结论:筛选的阿利维A酸原料药的微粉化工艺操作可行、质量稳定。

关键词 阿利维A酸;微粉化工艺;粉碎工艺; $d(0.9)$;杂质A

少的干扰,故最终以此为检测波长。

表4 桑白皮中6种活性成分的含量测定结果(mg/g, $n=3$)

Tab 4 Results of content determination of 6 active components in *M. alba* (mg/g, $n=3$)

样品编号	新绿原酸	桑皮苷A	绿原酸	紫云英苷	桑根酮C	桑辛素
1	0.161 0	0.101	0.851	0.532	5.89	0.808
2	-	0.209	0.380	0.430	9.05	1.360
3	-	1.320	1.430	0.723	5.96	0.912
4	0.032 5	1.390	0.430	2.150	3.21	0.566
5	-	2.470	0.368	0.872	3.24	0.750
6	0.095 2	1.820	0.322	0.715	4.81	0.524

注:“-”表示未检测到

Note:“-”means not determined

3.4 提取方法的选择

在前期研究中,笔者比较了60%甲醇、80%甲醇、无水甲醇、无水乙醇和乙酸乙酯5种溶剂对6种成分提取效率的影响。结果显示,80%甲醇能兼顾不同极性化合物提取效率,提取效果最佳。同时,笔者还考察了超声提取法和热回流提取法两种方法对桑白皮样品提取的影响。结果显示,热回流提取法效率较高,并以提取1 h效果最佳。不同批次桑白皮药材的含量测定结果表明,桑白皮中含有大量的桑皮苷A、绿原酸、紫云英苷、桑根酮C和桑辛素,而新绿原酸含量较低。经方法学考察,本研究建立的联合含量测定方法简单可行、重现性好,可为桑白皮药材的质量控制,尤其是含有桑白皮或其活性组分降糖药物的质量控制提供参考。

参考文献

- [1] 王瑾,张会敏,石俊英.桑白皮黄酮类化学成分研究进展[J].药学研究,2012,31(7):420-422.
- [2] 段志涛,高英,周刚.桑白皮药材的质量标准研究[J].中药材,2013,36(4):553-557.

^Δ 基金项目:重庆市科技计划项目(No.cstc2014kjrc-qnrc10002)

* 高级工程师。研究方向:药物合成、杂质控制。电话:023-67886946。E-mail:yjyang1979@126.com

- [3] 闫辉,高欢,崔清华,等. HPLC同时测定桑白皮中4种成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(5):53-56.
- [4] 李墨灵,张哈,夏庆梅.桑白皮的化学、药理与药代动力学研究进展[J].西部中医药,2017,30(2):137-139.
- [5] 景王慧,吴文进,燕茹.归肺经中药桑白皮的化学、药理与药代动力学研究进展[J].世界中医药,2014,9(1):109-112.
- [6] 杨乐,陈立.桑白皮研究进展[J].江西中医药大学学报,2007,19(3):98-100.
- [7] 董德刚,张秀英,刘小雪.桑白皮有效成分分离纯化的工艺研究[J].中国药房,2015,26(28):3960-3963.
- [8] 宋小池,翟西峰,冯家星,等.桑白皮和桑叶中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的虚拟筛选[J].中国药房,2017,28(4):508-511.
- [9] ZHANG M, CHEN M, ZHANG HQ, et al. In vivo hypoglycemic effects of phenolics from the root bark of *Morus alba*[J]. *Fitoterapia*, 2009, 80(8):475-477.
- [10] CHEN Z, TAO H, LIAO L, et al. Quick identification of xanthine oxidase inhibitor and antioxidant from *Erycibe obtusifolia* by a drug discovery platform composed of multiple mass spectrometric platforms and thin-layer chromatography bioautography[J]. *J Sep Sci*, 2014, 37(16):2253-2259.
- [11] 徐小昆,陈志永,廖立平,等.丁公藤属植物中东莨菪苷、绿原酸、东莨菪素、异绿原酸A、异绿原酸B和异绿原酸C的含量测定[J].中国中药杂志,2015,40(6):1119-1122.
- [12] 王欣,王洪庆,康洁,等.桑葚的化学成分研究[J].药学学报,2014,49(4):504-506.
- [13] 郑云翀.桑活性成分促胰岛素分泌效果和机制的比较研究[D].上海:华东理工大学,2017.
- [14] 陈金川.紫云英苷的酶法合成及其抗氧化活性[D].扬州:扬州大学,2016.
- [15] 夏伯候,周亚敏,皮胜玲,等. UPLC测定桑叶中抗氧化活性成分异槲皮苷、芦丁和紫云英苷的含量[J].中药材,2016,39(3):586-589.

(收稿日期:2017-10-23 修回日期:2017-12-15)

(编辑:林静)