

新疆药桑叶的HPLC指纹图谱研究

孙 莲*,李 玲,姑再努尔·阿布力孜(新疆医科大学药学院化学教研室,乌鲁木齐 830011)

中图分类号 R283.6;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)39-3693-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.39.16

摘要 目的:建立新疆药桑叶的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法:采用HPLC法。色谱柱为YMC-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为0.1%磷酸水溶液-0.2%磷酸乙腈溶液(梯度洗脱),检测波长为360 nm,流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。以异槲皮苷为参照物,分析10批次不同产地的药桑叶样品,采用计算机辅助相似度评价系统进行评价。结果:药桑叶指纹图谱由11个特征峰构成,10批次样品指纹图谱的相似度均>0.90,不同产地药桑叶的主成分组成基本相同。结论:所建立的指纹图谱稳定性、重复性好,可用于新疆药桑叶的鉴别和质量控制。

关键词 药桑叶;新疆;指纹图谱;相似度;高效液相色谱

Study on HPLC Fingerprint of *Morus alba* Leaves from Xinjiang

SUN Lian, LI Ling, Guzainuer·Abulizi (Dept. of Chemistry, College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprint of *Morus alba* leaves from Xinjiang. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on YMC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of 0.1% phosphoric acid solution-0.2% phosphoric acid acetonitrile solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 360 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μl. 10 batches of sample from different origin were analyzed with isoquercitrin as the reference. Computer-aided evaluation system of similarity was used to evaluate the data. RESULTS: The fingerprints constituted by 11 characteristic peaks, and the similarity of HPLC fingerprints of 10 batches of sample were greater than 0.90. The main ingredients of *M. alba* leaves from different origin were the same basically. CONCLUSIONS: The established fingerprint is stable and reproducible, and can be used for the identification and the quality control of *M. alba* leaves.

KEYWORDS *Morus alba* leaves; Xinjiang; Fingerprint; Similarity; HPLC

桑叶为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶, 是一味常用中药材。药桑 (*Morus nigra* L.) 不但是新疆独特的药用果桑种质资源, 还是国内唯一的具有花性染色体倍数为22倍体的桑品种, 也是新疆目前桑品种分类鉴定中唯一的黑桑种, 药用价值极高。现代药理研究表明, 桑叶具有降血糖、降血压、抗菌和抗病毒等多种药理活性, 能预防和治疗糖尿病。桑叶中的芦丁、绿原酸、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素、白藜芦醇等^[1-4]是桑叶的主要功效成分, 具有很好的降血糖、降血脂、抗氧化、抗肿瘤和抗菌作用, 可作为评价桑叶质量的重要技术指标。为了更加科学地评价和控制药桑叶的药材质量, 本试验对新疆南疆地区10个不同产地药桑叶中的黄酮类成分进行指纹图谱^[5-12]分析, 旨在为新疆药桑叶资源的利用和质量控制提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱(HPLC)仪, 包括二极管阵列检测器(日本岛津公司); KQ5200DE型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司, 功率: 200 W, 频率: 40 kHz)。

1.2 药材

药桑叶分别采摘自新疆喀什和田地区各市、县, 由新疆医科大学药学院生药教研室帕丽达·阿不力孜教授鉴定为药

桑 *M. nigra* L. 的叶。

1.3 试剂

绿原酸、芦丁对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为100080-200707、0080-9504); 异槲皮苷对照品(上海晶纯医药科技发展有限公司, 批号: 27988, 纯度>98%); 紫云英苷对照品(上海融禾医药科技发展有限公司, 批号: MUST-11092001, 纯度>98%); 乙腈、磷酸为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: YMC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1%磷酸水溶液(A)-0.2%磷酸乙腈溶液(B), 梯度洗脱(0~9 min, 85%→80%A; >9~20 min, 80%→75%A; >20~30 min, 75%→65%A); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 360 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μl。色谱见图1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取芦丁、紫云英苷、绿原酸及异槲皮苷对照品各5.0 mg, 置于10 ml量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为0.5 mg/ml的芦丁、紫云英苷、绿原酸及紫云英苷对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取干燥的药桑叶粉适量, 过60目筛, 精密称取5.0 g, 置250 ml锥形瓶中, 加石油醚30 ml, 于

* 教授, 硕士。研究方向: 药物分析。电话: 0991-4362364。E-mail: sl_xyx@126.com

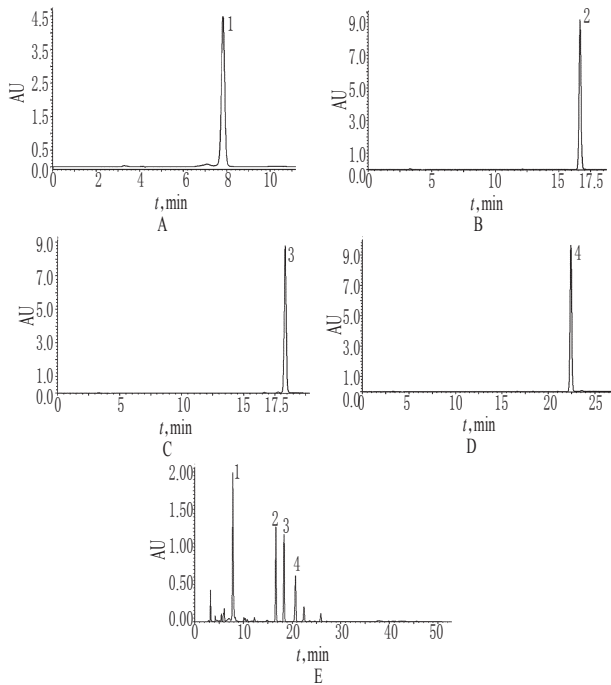


图1 高效液相色谱图

A.绿原酸;B.芦丁;C.异槲皮苷;D.紫云英苷;E.药桑叶;1.绿原酸;2.芦丁;3.异槲皮苷;4.紫云英苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A.chlorogenic acid; B.rutin; C.isoquercitrin; D.astragaloside; E.Morus alba leaves; 1.chlorogenic acid; 2. rutin; 3. isoquercitrin; 4.astragaloside

25 ℃水浴中超声处理 20 min, 滤过, 滤液蒸干, 置 50 ml 量瓶中, 加 40 ml 甲醇, 超声提取 40 min (35 ℃), 滤液移至另一 50 ml 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取药桑叶(喀什市)适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件连续进样 6 次测定。结果, 各共有峰相对保留时间的 RSD=0.24%~1.0% (n=6), 峰面积的 RSD=0.62%~2.0% (n=6)。

2.3.2 重复性试验 取药桑叶(喀什市)适量, 精密称定, 共 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件分别进样测定。结果, 各共有峰相对保留时间的 RSD<1.3% (n=6), 峰面积的 RSD<2.4% (n=6), 表明本方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取“2.2.2”项下的同一供试品溶液, 于 0、1.5、10、24 h 按上述色谱条件进样测定。结果, 各色谱峰相对保留时间的 RSD<1.8% (n=5), 峰面积的 RSD<2.3% (n=5), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。

2.4 指纹图谱的建立与分析

2.4.1 指纹图谱的测定与特征峰的确定 取 10 批次的药桑叶样品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件进样测定, 特征指纹色谱峰见图 2。将 10 批次样品的图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A 版)软件, 结果发现, 10 批次药桑叶所共有的特征峰有 11 个, 经与图 1 对照比较, 确定其中 5 号峰为绿原酸, 7 号峰为芦丁, 8 号峰为异槲皮苷, 10 号峰为紫云英苷, 选择 8 号峰(异槲皮苷)作为参照峰。

2.4.2 相似度分析 将 10 批次样品的图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A 版)软件, 经多点校正及色谱

峰匹配, 生成对照指纹图谱(见图 3); 经分析, 10 批次样品的相似程度均>0.90, 表明所建立的指纹图谱技术指标稳定, 重复性好, 不同产地药桑叶的主成分基本相同, 详见表 1。

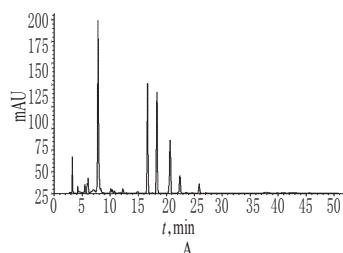


图2 特征指纹色谱峰

Fig 2 Characteristic fingerprint peaks

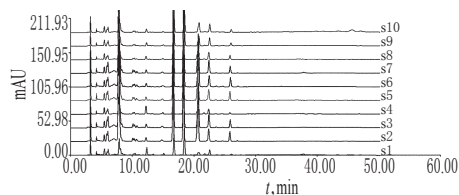


图3 10批药桑叶药材的HPLC指纹图谱

Fig 3 HPLC fingerprint for 10 batches of *M. alba* leaves

表1 药桑叶的相似度分析

Tab 1 Similarity analysis of *M. alba* leaves

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1.000	0.992	0.994	0.996	0.998	0.983	0.981	0.995	0.997	0.994	0.998
S2	0.992	1.000	0.989	0.990	0.990	0.993	0.992	0.986	0.991	0.989	0.997
S3	0.994	0.989	1.000	0.989	0.989	0.976	0.975	0.995	0.987	0.986	0.992
S4	0.996	0.990	0.989	1.000	0.998	0.981	0.980	0.995	0.997	0.998	0.997
S5	0.998	0.990	0.989	0.998	1.000	0.979	0.979	0.994	0.999	0.996	0.997
S6	0.983	0.993	0.976	0.981	0.979	1.000	0.998	0.974	0.981	0.979	0.991
S7	0.981	0.992	0.975	0.980	0.979	0.998	1.000	0.973	0.98	0.978	0.99
S8	0.995	0.986	0.995	0.995	0.994	0.974	0.973	1.000	0.992	0.992	0.994
S9	0.997	0.991	0.987	0.997	0.999	0.981	0.98	0.992	1.000	0.996	0.997
S10	0.994	0.989	0.986	0.998	0.996	0.979	0.978	0.992	0.996	1.000	0.995
对照指纹图谱	0.998	0.997	0.992	0.997	0.997	0.991	0.990	0.994	0.997	0.995	1.000

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的考察

预试验中, 笔者对供试品溶液的制备方法进行了考察, 以提取率为指标, 分别考察了提取溶剂(水, 60%、70%、80%、90%、100%的甲醇)、提取方法(超声提取、索式提取、回流提取)、提取温度(25、30、35、40、45、50 ℃)和提取时间(20、30、40、50 min)的提取率。结果发现, 用 100% 甲醇于 35 ℃ 的水浴中超声提取 40 min 时提取率最高。

3.2 流动相的选择

笔者分别考察了磷酸-甲醇和磷酸-乙腈流动相系统, 发现后者柱压较低, 梯度洗脱时, 改变流动相的比例对基线影响较小, 分离度较好; 又考察了不同浓度的磷酸(0.1%、0.2%、0.4%)及甲醇水溶液为流动相的 A 相, 乙腈及不同浓度的磷酸-乙腈溶液为流动相的 B 相。结果发现, 以 0.1% 的磷酸水溶液为 A 相、0.2% 的磷酸-乙腈溶液为 B 相梯度洗脱时, 各成分分离度好, 峰形对称, 重现性好。

3.3 检测波长的选择

取芦丁、异槲皮苷、绿原酸和紫云英苷的对照品溶液在波长 200~400 nm 范围内扫描, 发现芦丁、异槲皮苷和紫云英苷

益气健肝颗粒的质量标准研究

鞠楷*, 陈华, 金伟华, 蒲志强(成都军区总医院药学部, 成都 610083)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)39-3695-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.39.17

摘要 目的:建立益气健肝颗粒的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对益气健肝颗粒中的栀子、陈皮、五味子进行定性鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)法测定陈皮中橙皮苷的含量:色谱柱为 Eclipse XDB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(17:83, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为283 nm,柱温为30 ℃。结果:TLC图中,供试品在对照品、对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点。橙皮苷的质量浓度在0.016~0.160 mg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.9997$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;平均加样回收率为100.42%,RSD=1.79%($n=9$)。结论:所建标准用于益气健肝颗粒的质量控制。

关键词 益气健肝颗粒;质量标准;栀子;陈皮;五味子;橙皮苷;薄层色谱法;高效液相色谱法

Study on Quality Standard of Yiqi Jiangan Granules

JU Kai, CHEN Hua, JIN Wei-hua, PU Zhi-qiang(Dept. of Pharmacy, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of Yiqi jiangan granules. METHODS: *Gardenia jasminoides*, *Citrus reticulata* and *Schisandra chinensis* were qualitatively identified by TLC. The content of hesperidin was determined by HPLC. The determination was performed on Eclipse XDB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphate buffer (17:83, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 30 ℃ and the detection wavelength was set at 283 nm. RESULTS: TLC spots of test sample had same color and chromatogram position to substance control and reference substance. The linear range of hesperidin were 0.016-0.160 mg/ml ($r=0.9997$) with an average recovery of 100.42% (RSD=1.79%, $n=9$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. CONCLUSIONS: The standard is suitable for the quality control of Yiqi jiangan granules.

KEYWORDS Yiqi jiangan granules; Quality standard; *Gardenia jasminoides*; *Citrus reticulata*; *Schisandra chinensis*; Hesperidin; TLC; HPLC

益气健肝颗粒来源于我院用于治疗乙型肝炎的经验方,主要由茵陈、栀子、五味子、陈皮、柴胡、黄芩、甘草等多味中药

组成,具有疏肝理气、利胆退黄、清利湿热等功效。其原剂型为煎剂,为方便患者使用,我院将其研究开发制成颗粒剂。为

在254、360 nm处有最大吸收,绿原酸在330 nm处有最大吸收,故最终选择360 nm为检测波长时,峰数较多,分离较好,信号响应强度适当。

综上所述,本试验建立的指纹图谱稳定性、重复性好,适用于新疆药桑叶的鉴别和质量控制。

参考文献

- [1] 严安定,袁野,吴亮,等.HPLC法同时测定桑叶中芦丁、异槲皮苷、紫云英苷的含量[J].安徽医药,2011,15(3):296.
- [2] 孙莲,严雷,石绕呢,等.RP-HPLC测定桑叶、桑枝和桑花中槲皮素和山奈酚的含量[J].药物分析杂志,2005,25(10):1230.
- [3] 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.
- [4] 孙莲,张丽静,孟磊,等.RP-HPLC法测定桑叶中绿原酸

的含量[J].中成药,2003,34(1):78.

- [5] 蒋立娣,宣贵达,吴好好,等.桑叶提取物中槲皮素和山奈酚的含量测定[J].浙江大学学报:理学版,2009,36(6):705.
- [6] 李钟,胡海容.桑叶药材HPLC指纹图谱的研究[J].世界中西医结合杂志,2008,2(5):280.
- [7] 吴好好,李凡,钱文春,等.浙江湖州桑叶HPLC指纹图谱的研究[J].药物分析杂志,2008,28(3):390.
- [8] 游元元,万德光,裴瑾,等.不同品种桑叶高效液相指纹图谱的聚类分析[J].时珍国医国药,2008,19(11):2662.
- [9] 王巍,鞠成国,赵焕君,等.急性子中黄酮类成分HPLC指纹图谱的初步研究[J].中成药,2011,33(2):199.
- [10] 陈志红,徐美奕,龚先玲.紫荆花黄酮类化合物的HPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2010,21(31):2928.
- [11] 杨立勇,李雨生,王祥培,等.菝葜药材HPLC指纹图谱的鉴别[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(8):104.
- [12] 孔昭琰,胡煜雯,巢建国,等.凤丹皮HPLC指纹图谱研究[J].南京中医药大学学报,2011,27(1):66.

(收稿日期:2013-07-29 修回日期:2014-01-09)

* 药师。研究方向:药物分析。电话:028-86570427。E-mail: jukai2012@sina.com