

HPLC 测定桑叶及其炮制品中绿原酸含量

王龙虎*, 任玉珍, 梁焕, 焦聪

(中国药材集团公司, 北京 100055)

[摘要] 目的: 建立桑叶及其炮制品中绿原酸的含量测定方法, 考察桑叶炮制前后绿原酸的含量变化。方法: 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Agilent XDB-C₁₈, 流动相为甲醇-0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾 (19:81), pH=3.58, 检测波长为 328 nm, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 35℃。结果: 绿原酸进样量在 0.25~3.0 μg 呈良好线性关系, $r=0.999\ 9$, 平均回收率为 97.0%, RSD=3.32% ($n=5$)。桑叶药材与生品中绿原酸含量显著高于蜜炙品, 不同地区药材绿原酸含量高低依次为河北>安徽>浙江>江苏>湖南。结论: 本方法简单、准确, 能有效用于桑叶及其炮制品的质量控制。

[关键词] 桑叶; 炮制品; 绿原酸; 含量测定

桑叶为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶。具有疏散风热, 清肺润燥, 清肝明目功能。主要用于风热感冒, 肺热燥咳, 头晕头痛, 目赤昏花^[1]。桑叶有栽培或野生, 全国大部分地区均有产。绿原酸是桑叶中的有效成分之一, 具有消炎、抗菌等作用^[2,3]。目前关于 HPLC 测定桑叶中绿原酸含量的研究报道较少, 《中国药典》2005 年版一部桑叶项下也没有收载绿原酸的含量测定方法。而高效液相色谱法对绿原酸的分析测定在目前已得到较为广泛的应用^[4], 为此我们建立了桑叶绿原酸的含量测定方法, 其结果表明此法用于桑叶中绿原酸的含量测定, 准确可行。

1 仪器与试剂

1.1 材料

桑叶采自河北、浙江、湖南、安徽等地。经北京市卫生学校金世元教授鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶。经检验, 均符合《中国药典》2005 年版该品种项下之规定。桑叶饮片及其蜜炙品由中国药材集团公司北京华邈中药工程技术开发中心加工炮制。

1.2 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪 (美国沃特斯公司), METTLER AE₂₄₅ 型电子分析天平。

1.3 试剂

绿原酸 (中国药品及生物制品检定所, 批号 110753-200212), 甲醇为色谱纯, 水为重蒸水,

其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent XDB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾水溶液 (19:81, pH=3.58), 检测波长 328 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35℃, 进样量 10 μL。色谱图如图 1~3。

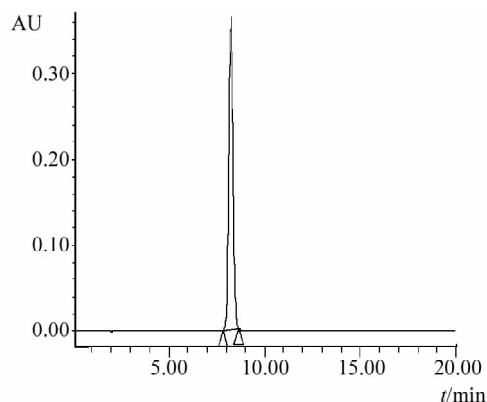


图1 绿原酸对照品 HPLC 图

2.2 溶液制备

2.2.1 供试品制备 桑叶: 取原药材, 除去杂质, 搓碎, 去柄, 过筛。若为产地加工品, 除去杂质, 过筛。

蜜桑叶: 取炼蜜, 加适量沸水稀释, 淋入桑叶中拌匀, 稍闷, 置热锅内, 文火 (100~120℃) 炒至不粘手时取出, 晾凉 (每 100 kg 桑

[通讯作者] *王龙虎, Tel: (010) 61253536, E-mail: youruoyin@yahoo.com.cn.

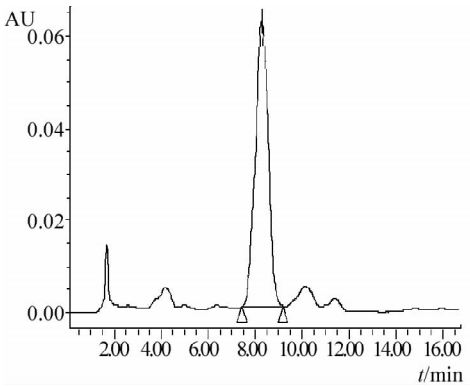


图2 桑叶药材 HPLC 图

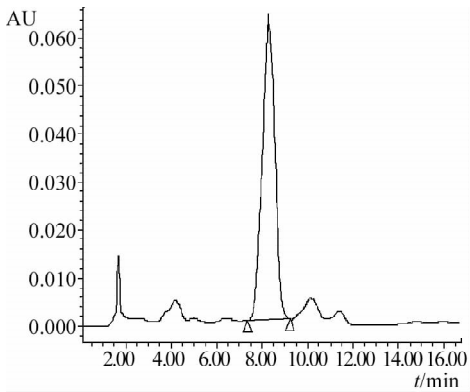


图3 桑叶饮片 HPLC 图

叶，用炼蜜 25kg)。

2.2.2 对照品溶液制备 准确称取绿原酸对照品，精密称定，用甲醇溶解制成 1mL 含 0.25mg 的溶液，即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品粉末（过三号筛）约 0.5g，精密称定，置于 25mL 的容量瓶中，加入甲醇－甲酸溶液（95:5）20mL 放置 2h，超声处理 30min，离心（4 000 r·min⁻¹，下同）5min，清液移入另一 25mL 容量瓶，在离心后的沉淀中加入甲醇－甲酸溶液（95:5）5mL 洗涤沉淀，离心 5min，清液合并于上述 25mL 容量瓶中，加甲醇－甲酸溶液（95:5）至刻度，摇匀，即得。

2.3 线性关系考察

取对照品溶液（0.25mg·mL⁻¹）在上述色谱条件下分别进样 1，2，4，6，8，10，12μL，测定峰面积，并以绿原酸峰面积的积分值为纵坐标，以绿原酸量为横坐标，绘制标准曲线，得回归方程 Y = 633 120X - 70 971，r = 0.999 9。结果表明绿原酸在 0.25 ~ 3.0μg 呈良好线性关系。

2.4 稳定性试验

取供试品溶液，按照正文所列的含量测定方法，每隔 2h 进样一次，记录峰面积，计算 RSD = 0.01%，结果表明，绿原酸在甲醇－甲酸（95:5）溶液中 12h 内是稳定的。

2.5 精密度试验

对同一供试品溶液，5 次进样测定，记录峰面积，计算 RSD = 0.02%，结果表明实验精密度良好。

2.6 重复性试验

对同一批样品按照正文拟定的含量测定方法，进行 5 次平行试验，每一供试品溶液进样 2 次，结果 RSD = 1.07%。

2.7 回收率试验

称取已测知含量（1.22%）的桑叶粉末约 0.25g，精密称定，分别加入绿原酸对照品，按供试品溶液制备方法制备，按照正文含量测定项下的方法进行测定。计算回收率，结果见表 1。

表1 绿原酸回收率试验结果

序号	称样量 /mg	样品中 含量 /mg	对照品 加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率 /%	RSD /%
1	250.7	3.059	3.09	6.108	98.7		
2	251.9	3.073	3.12	6.074	96.2		
3	258.9	3.159	3.10	6.301	101.4	97.0	3.32
4	249.1	3.039	2.97	5.882	95.7		
5	249.7	3.046	3.14	5.963	92.9		

2.8 样品测定

依法对河北等 5 批桑叶原药材及其制得的炮制品（生品、蜜炙品）进行绿原酸含量测定，同时考察了北京 5 家市售桑叶饮片的绿原酸含量，结果见表 2 ~ 3。

表2 桑叶原药材及其炮制品绿原酸含量测定结果

	产地	原药材	桑叶	蜜桑叶
	河北	1.10	1.14	0.40
	浙江	0.54	0.53	0.18
	湖南	0.36	0.35	0.14
	安徽	0.55	0.57	0.22
	江苏	0.44	0.47	0.17

表3 北京市售桑叶饮片绿原酸含量测定结果

药店	绿原酸含量 /%
北京同仁堂	0.35
金象大药房	0.36
嘉事堂药店	0.41
白塔寺药店	0.31
医保全新大药房	0.32

3 结论与讨论

3.1 提取方法的选定

用不同提取溶剂试验了同一样品，如甲醇、稀甲醇、甲醇-水、甲醇-甲酸（95:5）等，结果表明采用甲醇-甲酸（95:5）溶液作为提取溶剂时，峰面积最大，含量最高，经分析，可能是因为绿原酸分子具有邻苯二酚和羧酸结构，常以盐的形式存在于植物体中，提取时以含甲酸甲醇溶液为酸性提取液，使绿原酸呈分子状态而较易被提取出来^[5]。

3.2 流动相的选择

本项工作的重点是流动相的选择，比较试验了甲醇-0.01mol·L⁻¹磷酸二氢钾、乙腈-0.01mol·L⁻¹磷酸二氢钾、甲醇-不同pH值磷酸盐缓冲液等多种流动相，结果选用甲醇-0.01mol·L⁻¹磷酸二氢钾（19:81，pH=3.58）为流动相，即可在较短的保留时间内使绿原酸单峰得到分离。

3.3 检测波长的选择

绿原酸紫外吸收曲线表明，在325nm处有最大吸收。其最大吸收波长处的吸收峰峰形较为尖锐，为了增加稳定性，大多不选用325nm作为检测波

长，经试验，在328nm波长下，绿原酸色谱图分离良好。因此选择328nm为绿原酸的测定波长。

试验结果表明，桑叶原药材中绿原酸的含量为0.36%~1.10%，不同产地间含量差异较大，其高低顺序为河北>安徽>浙江>江苏>湖南；桑叶药材经加工成桑叶饮片后，绿原酸含量无显著变化，表明文中采用的桑叶制法较有利于绿原酸的含量保存，多数桑叶饮片较原药材含量略高，推测系净制后拣去绿原酸含量较低的枝梗后所引起。桑叶经蜜炙后，绿原酸含量显著降低，含量0.14%~0.40%。经调研，目前中医临床用到桑叶多习用生品，蜜炙品极少见，经对北京市5家药店的桑叶（无蜜桑叶销售，均系生品）进行质量检测，其绿原酸含量为0.31%~0.41%，从主要有效成分绿原酸的含量来看，桑叶多生用是有一定科学依据的。**TCM**

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中国药典(2005年版一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 209.
[2] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所, 等. 中药志(V)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 98.
[3] Wang P Y, Li S P, Zhen T M. Therapeutic observation of lower limbs elephantiasis using raw Morus alba tablets [J]. J Tradit Chin Med(中医杂志), 1992, 33(10): 612-613.
[4] Tang R M, Chen Z Q. Determination of chlorogenic acid in fig lozenge by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学杂志), 2001, 18(1): 65.
[5] 孙莲, 张丽静, 孟磊, 等. RP-HPLC法测定桑叶中绿原酸的含量[J]. 中草药, 2003, 34(1): 78-79.

(收稿日期 2007-05-17)

Determination of Chlorogenic Acid in Folium Mori and It's Processed by HPLC

Wang Longhu, Ren Yuzhen, Liang Huan, Jiaocong

(China National Group Corp. of Traditional & Herbal Medicine, Beijing 100055, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the contents of chlorogenic acid between folium mori and it's processed, established a HPLC method for the determination of chlorogenic acid. **Methods:** Chromatographic assay was performed on Agilent XDB-C₁₈ column with methanol-0.01mol·L⁻¹ KH₂PO₄ in water solution (19:81) at pH=3.58 as mobile phase, the flow rate was 1.0mL·min⁻¹ and the detection wavelength was set at 328nm, and the column temperature was 35°C. **Results:** The calibration curve showed linear in the range of 0.25~3.0 μg for chlorogenic acid (r=0.9999), and the average recovery was 97.0% (RSD=3.32%, n=5). It showed that the contents of chlorogenic acid in folium mori and unprocessed were much higher than the honey processed. The chlorogenic acid derived from folium mori coming from different areas has different content (Hebei>Anhui>Zhejiang>Jiangsu>Hunan). **Conclusions:** The HPLC method is simple and accurate. It can be used as a method of quality control for Mori and it's processed.

[Key words] Folium mori; Processed; Chlorogenic acid; Assay