

RP-HPLC法测定桑叶中绿原酸的含量

孙 莲¹, 张丽静², 孟 磊¹, 王瑞英², 陈 坚¹, 贾殿增^{2*}

(1. 新疆医科大学 化学教研室, 新疆 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆大学 理化测试中心, 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要: 目的 采用反相高效液相色谱法测定新疆不同地区、不同采集期、不同品种桑叶中的绿原酸的含量。方法 色谱柱为 ZORBAX- ODS (5 μ m 250mm $\times$ 4.6mm i. d.) 柱, 甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢钾 (25: 75 pH= 3.58) 为流动相, 检测波长为 328 nm。结果 在上述色谱条件下绿原酸的峰面积与其质量在 0.052~ 2.58 μ g 呈良好的线性关系, 回归方程为: $Y=2770.51X-18.07$, $r=0.9999$, 平均回归率为 97.5%, $RSD=1.8\%$ ($n=6$)。结论 方法简单、快速, 结果准确。

关键词: RP-HPLC; 桑叶; 绿原酸

中图分类号: R282.6 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2003)01-0078-02

Determination of chlorogenic acid in mulberry leaves by RP-HPLC

SUN Lian¹, ZHANG Li-jing², MENG Lei¹, WANG Rui-ying²,
CHEN Jian¹, JIA Dian-zeng²

(1. Department of Chemistry, Xinjiang University of Medical Sciences, Wulumuqi 830054, China;

2. Analysis Center of Xinjiang University, Wulumuqi 830054, China)

Key words RP-HPLC; mulberry leaves; chlorogenic acid

桑叶为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的叶, 桑叶的药用历史悠久, 可除寒热、出汗、治劳热咳嗽、明目长发。现代药理研究证明桑叶具有抑制血糖上升, 降低胆固醇, 治疗丝虫病性象皮肿和乳糜尿等疾病。绿原酸是桑叶中的有效成分之一, 具有消炎、抗菌等作用^[1,2], 对桑叶中绿原酸的含量进行测定具有重要的意义, HPLC对绿原酸的分析测定已得到广泛的应用^[3], 但对桑叶中绿原酸的分析测定未见报道, 本实验采用 RP-HPLC测定新疆不同地区、不同采集期和不同品种桑叶中的绿原酸含量, 该方法简便、重现性好。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂: HP1100型高效液相色谱仪 (美国惠普公司), DAD二级管阵列紫外检测器, 绿原酸对照品 (中国药品生物制品检定所), 甲醇 (优级纯), 磷酸二氢钾、磷酸、甲酸均为 AR级, 桑叶 (不同采集期—采自新疆医学院院内一棵白桑, 5月~11月份, 不同地区—采自新疆南疆、北疆和东疆各地, 均为5月份, 不同品种—采自和田洛浦县, 为5月份)。

1.2 色谱条件: 色谱柱为 Zorbax ODS (5 μ m, 250mm $\times$ 4.6mm), 流动相为甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢钾 (25: 75, pH= 3.58), 检测波长为 328 nm, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 35 $^{\circ}$ C, 进样量为 10 μ L, 色谱图见图 1

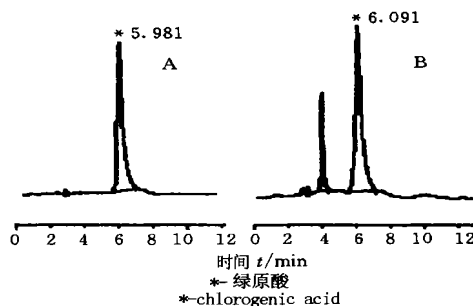


图 1 对照品 (A) 和样品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of reference substance (A) and sample (B)

1.3 对照品溶液的制备: 准确称取适量的绿原酸, 用甲醇定容于 10 mL 的容量瓶中, 配成浓度为 0.260 mg/mL 的对照品溶液。

1.4 线性关系: 精确量取对照品溶液 2 mL, 用甲醇定容于 5 mL 的容器瓶中, 摇匀, 配成质量浓度为 0.104 mg/mL 的溶液, 在上述色谱条件下, 分别进样 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 μ L, 测定峰面积, 以峰面积 (Y) 为纵坐标, 以对应的绿原酸的质量 (X) 为横坐标, 绘制标准曲线, 回归方程为: $Y=2770.51X-18.07$, $r=0.9999$ 线性范围为 0.052~ 2.58 μ g

1.5 精密度和稳定性试验:精密吸取对照品溶液 10 μ L,在上述选定的色谱条件下,连续进样 6次,测得峰面积的 *RSD* 为 1.81% ($n=6$) 取上述对照品溶液,每隔 2 h,进样 10 μ L,连续测定 12 h,结果表明在 12 h 内峰面积值基本稳定,峰面积的 *RSD* 为 1.40%。

1.6 重现性实验:精密称取阿克苏 (5月份)桑叶样品 5份,按样品制备方法制备供试品,进样 30 μ L,测定峰面积,计算得峰面积 *RSD*= 1.06%。

1.7 回收率试验:精确称取已知含量的乌鲁木齐 (10月份)桑叶粉 9份,分别加入绿原酸对照品 0.5, 1.5, 3 mL (各样 3份),按样品含量测定方法制备供试品溶液,根据回归方程计算回收率,结果平均回收率为 97.5%,*RSD* 为 2.06% ($n=9$)

1.8 样品的测定:准确称取经 60℃ 干燥 3 h 并过 60目筛的桑叶粉末 0.5 g,置于 25 mL 的容量瓶中,加入甲醇-甲酸溶液 (95:5) 20 mL 放置 2 h,超声提取 30 min,离心 (4 000 r/min) 5 min,清液移入另一 25 mL 容量瓶,在离心后的沉淀中加入甲醇-甲酸溶液 5 mL 洗涤沉淀,离心 5 min,清液合并于上述 25 mL 容量瓶中,再加甲醇-甲酸溶液至刻线,摇匀,过 0.45 μ m 滤膜,用作供试液,在选定的色谱条件下测定新疆不同地区、不同采集期 and 不同品种桑叶中的绿原酸,并由回归方程计算其绿原酸的含量见表 1,2

表 1 新疆不同地区桑叶 (5月份) 中绿原酸的含量 ($n=4$)

Table 1 Content of chlorogenic acid in <i>M. alba</i> from different areas of Xinjiang ($n=4$)		
地 区	绿原酸 / (mg $\cdot$ g ⁻¹)	<i>RSD</i> %
乌鲁木齐	10.2	1.23
吐鲁番	24.6	0.40
哈密	18.2	0.54
喀什	10.2	0.26
和田洛浦 (白桑)	6.89	0.41
和田洛浦 (黑桑)	12.8	0.28

表 2 乌鲁木齐地区不同采集期桑叶中绿原酸的含量 ($n=4$)

Table 2 Content of chlorogenic acid in <i>M. alba</i> of different collecting time ($n=4$)		
采集月份	绿原酸 / (mg $\cdot$ g ⁻¹)	<i>RSD</i> %
5	10.2	1.23
6	3.89	1.23
7	3.30	1.64
8	3.21	1.11
9	3.19	1.22
10	0.210	0.53
11	0.052	0.68

2 结果与讨论

2.1 检测波长的确定:用二级管阵列检测器分析比较了绿原酸对照品色谱峰和样品所测成分相应色谱峰的紫外光谱,试验证明,两者的紫外光谱基本一致,均在 328 nm 处有一最大吸收峰,故选择检测波长为 328 nm

2.2 流动相 pH 值的选择:实验了 pH= 1~ 7 的甲醇-0.01mol/L 磷酸二氢钾 (25:75) 溶液做流动相,发现流动相的 pH 值较小时,保留时间太长,当流动相 pH 值增大时,保留时间缩短,样品峰严重重叠,分离效果不好,当流动相的 pH= 3.5~ 3.6 时,保留时间在 7 min 左右,分离效果最好,本实验选择 pH= 3.58

2.3 提取方法的选择:试验了同一样品用不同的提取溶剂,如甲醇-50% 甲醇和甲醇-甲酸 (95:5),实验证明,用甲醇-甲酸 (95:5) 溶液作为提取剂时,峰面积最大,含量最高,这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被提取出来。

2.4 采集期、产地和品种对桑叶中绿原酸含量的影响:从表 2 可以看出,在年周期中,桑叶中绿原酸的含量以 5 月份嫩叶中含量最高 (10.2 mg/g),6 月、7 月、8 月、9 月桑叶中绿原酸的含量基本相同,降为 5 月份的 1/3,9 月份以后桑叶中绿原酸的含量急剧下降,降为 5 月份 1/200,降霜后 (10 月、11 月) 的桑叶中绿原酸的含量最低。不同品种桑叶中绿原酸的含量有较大的差异,黑桑中绿原酸的含量 (12.8 mg/g) 是白桑 (6.89 mg/g) 中的 2 倍。从表 1 可以看出,不同产地桑叶中绿原酸的含量差异显著,东疆的吐鲁番地区和哈密地区桑叶中绿原酸的含量很高 (24.6 和 18.2 mg/g),南疆的和田洛浦白桑中绿原酸的含量最低 (6.89 mg/g),显示出极大的地区差异性,这可能是吐鲁番地处盆地,日照时间长,出产优质桑叶。

References

[1] 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.
[2] Wang P Y, Li S P, Zhen T M. Therapeutic observation of chyluria using *Morus alba* extract capsules [J]. *Chin J Parasit Prevent Cure* (中国寄生虫防治杂志), 1995, 8(1): 49.
[3] 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.