

## 2.10 样品含量测定

取样品约 1.0 g, 精密称定, 按“2.2.4”项下方法配制供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积, 按内标法以峰面积计算样品中残留溶剂量。实验结果表明, 3 批样品中, 一批均未检测出 5 种残留溶剂; 一批只检测出甲醇, 残留量为 0.04%, 其他未检出; 一批检测出甲醇的残留量为 0.05%, 乙腈的残留量为 0.007%, 其他未检出。

## 2.11 耐用性试验

改变柱温起始温度( $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ )、升温速率( $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ )、载气柱流量( $\pm 0.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )、起始温度保持时间( $\pm 1\text{ min}$ )、分流比( $\pm 2:1$ ), 取对照品溶液进样分析, 考察各溶剂的理论板数及相邻溶剂间的分离度。结果各待测有机溶剂的理论板数均 $>10\ 000$ , 相邻溶剂间的分离度均 $>2.0$ , 说明方法耐用性良好, 小范围的条件波动不影响测定。

## 3 讨论

### 3.1 色谱条件的考察

对色谱柱的选择进行了考察, 甲醇、乙腈、二氯甲烷、吡啶、DMF 等 5 种有机溶剂的沸点和极性差异较大, 故尝试了不同极性与填料的毛细管气相色谱柱。DB-FFAP、DB-INNOWAX、DB-624 3 种类型的色谱柱均可将本实验的 5 种残留溶剂分离出来, 但由于前两者均为极性柱, 且温度下限均为  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 在此温度下甲醇的峰形不甚理想, 理论板数 $<10\ 000$ , 故选择 DB-624 作为分析胸腺法新种 5 种残留溶剂的色谱柱。

### 3.2 内标物的选择

理想的内标物应是待测溶剂的理化性质相

近, 响应值相差不大, 峰形对称, 性质稳定, 毒性较小, 在待测 5 种残留溶剂的保留时间的中部出峰, 且与待测残留溶剂无干扰<sup>[6]</sup>。本实验分别考察了乙醇、丙酮、正丁醇, 结果显示正丁醇出峰时间处于 5 种待测溶剂中间, 且相互无干扰, 故选择正丁醇作为测定胸腺法新中 5 种残留溶剂的内标物。

## 3.3 结论

建立了测定胸腺法新原料药中甲醇、乙腈、二氯甲烷、吡啶、DMF 5 种有机溶剂残留量的气相色谱法, 该方法简便、快速、准确。所测定的 5 种溶剂均为二类溶剂, 是限制使用的溶剂, 因此该方法的建立, 为提高胸腺法新原料药的质量控制水平和临床用药的安全性提供了依据。

## REFERENCES

- [1] GAO D M, WANG F S. Review on the characteristics and function of thymosin  $\alpha 1$  [J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志), 2007, 28(2): 136-138.
- [2] CHENG H, ZHU P, ZHU Y S. Solid-phase synthesis of thymosin  $\alpha 1$  [J]. J Nanjing Univ Tech(南京工业大学学报), 2004, 26(2): 78-80.
- [3] Ch.P(2010)Vol II (中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: Appendix 73-74.
- [4] ZHOU H J. Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Quality Section(药品注册的国际技术要求-质量部分) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000: 87.
- [5] HAO G Q, ZHU W S, LIU Y K, et al. GC-FID quantitative determination of five residual solvents in alfuzosin hydrochloride [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2009, 29(3): 498-500.
- [6] RUAN H, CHEN Y. Determination of residual solvents in azlocillin sodium by GC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(11): 1047-1050.

收稿日期: 2012-11-13

## HPLC 同时测定新疆药桑枝中 6 种成分的含量

孙莲, 孟磊, 勉强辉, 孟海强(新疆医科大学药学院化学教研室, 乌鲁木齐 830011)

**摘要:** 目的 建立 HPLC 同时测定新疆药桑枝中绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、白藜芦醇和桑色素含量的方法。方法 采用 PMC pack ODS 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 以 0.2%磷酸水溶液-0.2%磷酸乙腈溶液为流动相, 梯度洗脱, 检测波长: 360 nm, 流速: 0.6 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ 。结果 6 种成分在 45 min 内完全分离, 6 种成分的平均回收率为 97.7%~100.7%(RSD  $\leq 2.0\%$ )。结论 本方法操作简单、结果准确, 具有较好的重复性和稳定性, 为药桑枝的质量控制提供参考。  
**关键词:** 药桑枝; 紫云英苷; 白藜芦醇; 桑色素; 高效液相色谱法

作者简介: 孙莲, 女, 硕士, 教授 Tel: (0991)4362364 E-mail: sl\_yxy@126.com

## Simultaneous Determination of Six Ingredients in Xingjiang Ramulus Mori by HPLC

SUN Lian, MENG Lie, MIAN Qianghui, MENG Haiqiang(Department of Chemistry, Pharmacy College of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish an HPLC method for simultaneous determination of chlorogenic acid, rutin, isoquercitrin, astragaloside, resveratrol and morin in Ramulus Mori. **METHODS** The separation was carried out on a PMC-pack ODS(4.6 mm×250 mm, 5 μm) column with 0.2% phosphoric acid-0.2% phosphoric acid in acetonitrile as a mobile phase at a flow rate of 0.6 mL·min<sup>-1</sup> with a gradient program. The detection wavelength was 360 nm. **RESULTS** Six ingredients were completely separated within 45 min. The average recoveries were between 97.7% and 100.7%(RSD≤2.0%). **CONCLUSION** The method is simple, rapid, reproducibility, accurate and reliable which can be used as the reference for the quality control of Ramulus Mori.

**KEY WORDS:** Ramulus Mori; astragaloside; resveratrol; morin; HPLC

桑枝(Ramulus Mori)是桑科桑属植物桑 *Morus alba* L.的一年生干燥嫩枝, 是中医常用的传统药物, 具有祛风活络、通利关节、燥湿利水之功效<sup>[1]</sup>。桑枝中的主要功效成分为黄酮类和生物碱类, 现代药理研究证明, 桑枝黄酮具有抗炎抗氧化、抗溃疡、解痉、抗菌、提高机体免疫功能以及降糖降脂等多种功能<sup>[2-5]</sup>。建立桑枝中黄酮类等物质分析方法对桑枝的质量控制十分必要。本实验采用HPLC同时测定新疆药桑枝中6种成分(绿原酸、芦丁、异槲皮苷<sup>[6]</sup>、紫云英苷<sup>[7]</sup>、白藜芦醇<sup>[8]</sup>和桑色素<sup>[9]</sup>含量, 为新疆药桑枝中黄酮类等成分的进一步研究和对新疆药桑枝的开发利用提供参考数据。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

LC-20 高效液相色谱仪(日本岛津公司)。

#### 1.2 试剂

绿原酸(中国药品生物制品检定所, 批号: 100080-200707, 供含量测定用), 芦丁对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 0080-9504, 供含量测定用), 异槲皮苷对照品(上海晶纯医药科技发展有限公司, 批号: 27988, 含量>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, 含量>98%), 白藜芦醇(上海源叶生物科技有限公司, 含量>98%), 桑色素对照品(上海源叶生物科技有限公司, 批号: 20110524, 含量>99%); 乙腈、磷酸为色谱纯; 甲醇等均为分析纯。桑枝采自新疆喀什, 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桑科植物桑的嫩枝。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

YMC-Pack ODS-A 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 柱温: 40 °C; 流动相 A 为 0.2%的磷酸水溶液, B 为 0.2%磷酸乙腈溶液, 梯度洗脱: 0 min, A : B=85 : 15; 9 min, A : B=80 : 20; 20 min, A : B=75 : 25; 30 min, A : B=65 : 35; 40 min, A : B=60 : 40; 检测波长: 360 nm; 流速: 0.6 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量: 20 μL。上述色谱条件下6种成分的色谱图见图1。

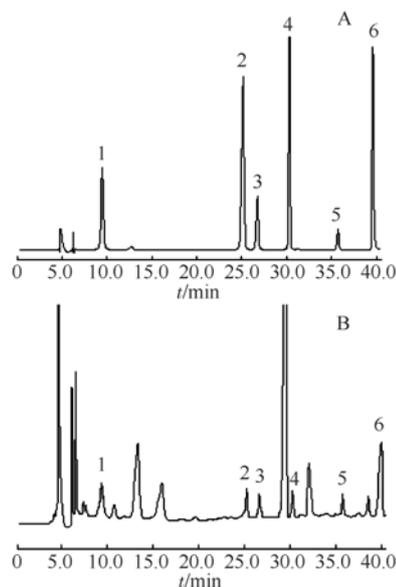


图1 高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-桑枝样品; 1-绿原酸; 2-芦丁; 3-异槲皮苷; 4-紫云英苷; 5-白藜芦醇; 6-桑色素

### Fig 1 HPLC chromatograms

A-reference substances; B-sample; 1-chlorogenic acid; 2-rutin; 3-isoquercitrin; 4-astragaloside; 5-resveratrol; 6-morin

## 2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取绿原酸 2.30 mg, 芦丁 2.30 mg, 异槲皮苷 1.20 mg, 紫云英苷 2.30 mg, 白藜芦醇 2.40 mg, 桑色素 2.50 mg, 置 5 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 即得绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、白藜芦醇及桑色素分别为 0.46, 0.46, 0.24, 0.46, 0.48, 0.50 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品贮备液。

## 2.3 供试品溶液的制备

精密称取桑枝粉末(过 60 目筛) 5.000 g, 置 100 mL 三角瓶中, 加甲醇 40 mL, 超声 60 min, 过滤, 滤液浓缩后, 用甲醇定容于 5 mL 的量瓶中, 用时过 0.22 μm 微孔滤膜。

## 2.4 线性关系的考察

精密吸取上述绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、白藜芦醇及桑色素对照品溶液各 1.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇配成对照品混合液, 分别精密吸取对照品混合液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释成系列浓度的混合对照品溶液, 进样 20 μL, 以峰面积(Y)为纵坐标, 以对照品质量浓度(X, mg·L<sup>-1</sup>)为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程、相关系数及线性范围, 结果见表 1。

表 1 6 种成分的线性关系

Tab 1 Linear relationship of six components

化合物	回归方程	r	线性范围/μg·L <sup>-1</sup>
绿原酸	Y=152.0X+1.340	0.999 8	4.6~27.6
芦丁	Y=599.9X-1.125	0.999 9	4.6~27.6
异槲皮苷	Y=316.0X+0.478	0.999 5	2.4~14.4
紫云英苷	Y=519.5X-0.592	0.999 3	4.6~27.6
白藜芦醇	Y=21.00X+0.029	0.999 0	4.8~28.8
桑色素	Y=1036X+2.073	0.999 8	5.0~30.0

## 2.5 精密度试验

精密吸取“2.2”项下绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、白藜芦醇、桑色素对照品储备液各 300 μL, 混匀, 进样量 20 μL, 连续进样 6 次, 求得绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、桑色素峰面积的 RSD(n=6)分别为 2.4%, 1.6%, 1.9%, 2.9%, 3.0%及 2.1%。连续 2 d 进以上浓度的混合对照品溶液, 每天进 3 次, 每次 20 μL, 其日间峰面积的 RSD (n=6)分别为 2.6%, 2.5%, 1.9%, 2.6%, 2.3%, 2.8%。日内、日间精密度 RSD≤3.0%, 表明该方法的日内和日间精密度均良好。

## 2.6 重复性试验

按“2.3”项下供试品溶液制备方法, 平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样 20 μL, 测定峰面积, 计算桑枝中绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、白藜芦醇及桑色素含量的 RSD 分别为 1.6%, 1.1%, 0.89%, 2.4%, 1.8%, 2.6%, 表明该实验的重复性良好。

## 2.7 稳定性试验

将重复性试验中制备的供试品溶液, 分别于 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12, 18, 24 h 进样 20 μL, 记录峰面积, 计算样品中绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、白藜芦醇、桑色素含量的 RSD 分别为 1.6%, 1.8%, 2.6%, 1.7%, 2.7%, 1.4%, 供试品溶液在 24 h 内稳定。

## 2.8 加样回收率试验

精密称取已知绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、白藜芦醇及桑色素含量的药桑枝粉 1 g, 置 100 mL 三角瓶中, 共 6 份, 每份中加入绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、白藜芦醇及桑色素对照品溶液适量, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样 20 μL, 计算各对照品的加样回收率和 RSD, 结果见表 2。

## 2.8 样品测定

由保留时间及在样品中加标峰增高法定性以及查阅文献可知, 新疆药桑枝中含有绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、白藜芦醇及桑色素。精密称取 5 份的药桑枝样品 5 g, 按“2.3”项下方法制备供试溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样 20 μL, 记录峰面积, 代入回归方程计算得药桑枝中绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、白藜芦醇及桑色素含量分别为 0.069, 0.061, 0.052, 0.031, 0.367, 0.173 mg·g<sup>-1</sup>。

## 3 讨论

### 3.1 流动相的选择

试验了甲醇-0.01 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵、甲醇-0.4% 磷酸水溶液、乙腈-0.4%磷酸水溶液、0.2%磷酸水溶液-乙腈、0.2%磷酸水溶液-0.2%磷酸乙腈溶液为流动相, 选用乙腈-0.01 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵水溶液、甲醇-0.4%磷酸水溶液、乙腈-0.4%磷酸水溶液及 0.2%磷酸水溶液-乙腈为流动相, 在不同梯度时, 芦丁、异槲皮苷和紫云英苷三者的分离效果不好, 选用 0.2%磷酸水溶液-0.2%磷酸乙腈溶液为流动相, 不同梯度时, 混合对照品和样品中 6 个成分

表2 加样回收率(n=6)

Tab 2 Recoveries test(n=6)

化合物	样品量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
绿原酸	0.332 0	0.325 0	0.644 2	96.1	97.7	0.79
	0.332 8		0.651 2	98.0		
	0.329 0		0.648 9	98.4		
	0.331 8		0.650 6	98.1		
	0.332 5		0.649 1	97.4		
	0.333 1		0.652 7	98.3		
芦丁	0.339 4	0.321 5	0.657 2	97.4	99.6	1.3
	0.339 1		0.665 4	101.4		
	0.338 9		0.658 1	99.3		
	0.339 8		0.660 2	99.6		
	0.338 8		0.661 5	100.4		
	0.338 7		0.659 3	99.7		
异槲皮苷	0.356 5	0.376 2	0.742 6	102.6	100.6	1.4
	0.356 2		0.740 4	102.1		
	0.355 5		0.732 9	100.3		
	0.356 7		0.731 0	99.5		
	0.355 9		0.728 7	99.1		
	0.356 1		0.731 1	99.7		
紫云英苷	0.283 6	0.294 2	0.588 6	103.7	100.7	1.8
	0.286 5		0.581 8	100.4		
	0.284 4		0.583 4	101.6		
	0.285 9		0.579 5	99.8		
	0.285 7		0.574 2	98.1		
	0.286 9		0.582 7	100.5		
白藜芦醇	0.554 3	0.540 3	1.099 4	100.9	99.2	1.3
	0.553 1		1.089 3	99.2		
	0.556 4		1.088 0	98.4		
	0.554 2		1.095 8	100.2		
	0.552 1		1.087 3	99.1		
	0.553 1		1.078 5	97.2		
桑色素	0.034 4	0.035 2	0.068 8	97.7	98.6	1.8
	0.032 4		0.068 2	101.7		
	0.035 5		0.069 5	96.6		
	0.034 1		0.069 1	99.4		
	0.034 9		0.069 2	97.4		
	0.035 1		0.069 9	98.9		

均达到了基线分离,且分离度  $R>1.5$ ,同时梯度洗脱中随着 0.2%磷酸乙腈溶液比例的增加,色谱峰的对称性增强,峰的拖尾现象减少。故本实验选

择 0.2%磷酸水溶液-0.2%磷酸乙腈溶液为流动相,梯度洗脱。

### 3.2 检测波长的选择

对 6 种对照品溶液进行了 200~400 nm 紫外扫描,发现检测波长为 360 nm 时,6 个成分的峰形较好,基线较平稳,分离度较高,故本实验检测波长定为 360 nm。

### 3.3 提取条件的选择

分别选择甲醇、乙醇、50%甲醇、80%甲醇、50%乙醇及 80%乙醇为提取溶剂,用回流提取、索氏提取及超声提取 3 种方法各提取 1 h,发现以甲醇为溶剂用超声法提取效率较高。试验了超声法提取 30, 60, 90, 120 min,结果表明,最佳时间为 60 min。故本实验的提取条件:以甲醇为提取溶剂,超声提取 60 min。

### REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: Appendix 280.
- [2] GU G Y. Research progress of the chemical composition and biological activity of Mulberry leaves [J]. World Notes Plant Med(国外医药: 植物药分册), 2007, 22(1): 12-16.
- [3] ZHANG D D, LING X, ZHANG H P. Effects of total flavones from *Morus alba* L. on inflammatory reaction of macrophages [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2010, 21(11): 2787-2790.
- [4] ZHANG D D, GAO Y H, JESSICA TAO LI. Antioxidation properties of total flavones from *Mori Ramulus* [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2011, 33 (6): 943-946.
- [5] XING D J, LI G Y, SUN Y Q. Study on the effects of Mulberry falconoid extract on rats with type 2 diabetes [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报), 2010, 12(7): 57-58.
- [6] ZHOU L. Extraction, separation and study of antioxidant activity of flavones in Mulberry wigs [D]. Chongqing: Southwestem University, 2011.
- [7] SUN L, YAN L, SHI X N. Determination of contents of Quercetin and Kaempferol in Mulberry leaves, wigs and flowers by RP-HPLC [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2005, 25(10):1230-1233.
- [8] LUO J, SUN P W, LIU S. Separation of phenol from *Ramulus mori* by high-speed counter-current chromatography [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2012, (4): 486-489.
- [9] ZHOU L, XU L, YU M D. Extraction, purification and characterization of Morin from Xinjiang Black Mulberry (*Morus nigra* L.) tree [J]. Food Sci(食品科学), 2011, 32(2): 76-78.

收稿日期: 2012-09-14