

超高效液相色谱法测定不同产地桑叶中 4种主要黄酮含量

钟月葵*, 蔡庆群, 丘振文

(广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)测定桑叶中4种主要黄酮含量的方法, 并通过主成分和热图分析比较10个不同产地桑叶中4种黄酮含量的差异。**方法** 选择ACQUITY UPLC BEH C₁₈为色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 甲醇溶液和0.5%磷酸溶液分别作为流动相A和B进行梯度洗脱。检测波长设置为350 nm; 柱温设置为30 °C。采用TB tools软件进行主成分分析和热图分析。**结果** 4种黄酮对照品在相应浓度范围内均呈良好的线性关系($r>0.999$); 回收率为98%~102%, 相对标准偏差为1.12%~1.86%。且10个产地桑叶4种黄酮含量差异较大, 具体表现为: 安徽地区桑叶中芦丁、异槲皮苷、紫云英苷和槲皮素含量均最高, 分别为20.543、6.801、1.328、3.645 mg/g; 湖南桑叶中异槲皮苷的含量最低, 为3.902 mg/g; 其余3种黄酮化合物均在河北地区含量最低, 分别为芦丁10.021 mg/g、紫云英苷0.348 mg/g和槲皮素1.784 mg/g。主成分和聚类分析结果显示, 桑叶具有明显的地域差异性。**结论** 该方法操作简单, 分析时间短, 稳定性强, 可大大降低分析成本, 且不同产地桑叶质量差异明显, 可作为桑叶用药来源选择的参考。

关键词: 桑叶; 产地; 超高效液相色谱法; 主成分分析; 热图

Determination of 4 flavonoids in mulberry leaves from different habitats by ultra performance liquid chromatography

ZHONG Yue-Kui*, CAI Qing-Qun, QIU Zhen-Wen

(The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 4 main flavonoids in mulberry leaves by ultra performance liquid chromatography (UPLC), and to compare the content of 4 flavonoids in mulberry leaves from 10 different areas by principal component analysis and thermography. **Methods** ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) was used. Methanol solution and 0.5% phosphoric acid solution were used as mobile phases for gradient elution. The detection wavelength was set at 350 nm and the column temperature was 30 °C. TB tools software was used for principal component analysis and heat map analysis. **Results** The 4 flavonoids showed good linear relationship in the corresponding concentration ranges ($r>0.999$). The recoveries were 98%–102%, and the relative standard deviations were 1.12%–1.86%. The results showed that the content of rutin, isoquercitrin, astragaloside and quercetin in mulberry leaves from Anhui province was the highest, which was 20.543, 6.801, 1.328 and 3.645 mg/g, respectively. The content of isoquercitrin in Hunan mulberry leaves was the lowest, which was 3.902 mg/g, and the other 3 flavonoids were the lowest in Hebei, with rutin 10.021 mg/g, astragaloside

*通信作者: 钟月葵, 主管药师, 主要研究方向为药理学。E-mail: ark_99@163.com

*Corresponding author: ZHONG Yue-Kui, Pharmacist, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Courtyard, No. 16, Airport Road, Baiyun District, Guangzhou 510405, China. E-mail: ark_99@163.com

精密移取混合对照品母液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.0、2.0、5.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇至刻度处, 即得梯度混合对照品溶液。

1.2.2 供试品溶液的制备

桑叶样品充分干燥后过二号筛, 精密称取样品粉末各约 1.0 g, 置于锥形瓶中, 加入 50 mL 80% 甲醇溶液, 称定重量, 80 °C 回流提取 40 min, 放冷至室温后用 80% 甲醇补足重量, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

1.2.3 UPLC 分析条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为甲醇溶液, B 为磷酸水溶液, UPLC 梯度洗脱程序为 0~2 min, 20%~30% A; 2~5 min, 30%~60% A; 5~6 min, 60%~60% A; 6~10 min, 60%~80% A。柱温为 30 °C, 检测波长为 350 nm, 流速为 0.5 mL/min, 进样体积 4 μL。

1.2.4 不同产地桑叶样品黄酮含量的测定

取不同产地桑叶粉末适量, 制备供试品溶液, 按 UPLC 测定条件进行测定, 记录峰面积并按照标准曲线法计算各黄酮成分的含量, 平行 3 次。通过 TB tools 的 PCA 主成分分析及热图绘制选项对各产地桑叶样品进行聚类分析。

1.2.5 10 个产地桑叶样品的聚类分析

为了直观地分析 4 种黄酮在 10 个不同产地的含量变化^[14-15], 采用 TB tools 软件进行主成分和热图分析, 其中纵向聚类反映样品的关系, 颜色的深浅反映样品中相应成分含量的大小。

2 结果与分析

2.1 条件优化

本研究前期通过对乙腈-磷酸水溶液、甲醇-磷酸水溶液、甲醇-甲酸水溶液、乙腈-甲酸水溶液等按不同比例组成的流动相进行考察, 最终选择甲醇-0.5% 磷酸溶液为该研究的流动相, 用此流动相洗脱后各峰的峰形对称、分离度较好。通过对不同柱温 (25、30、35 °C) 的考察, 发现选择柱温 30 °C 可达到预期的分离度、峰形正常, 故选择色谱柱温度为 30 °C。此外, 检测波长选择 350 nm 时 4 种黄酮成分均有较好的吸收。

优化条件后, 经过考察, 桑叶中 4 种黄酮类成分能够达到基线分离, 分离度良好 (见图 1), 且 10 min 之内就可以

得到分析结果, 大大提高了分析的效率。

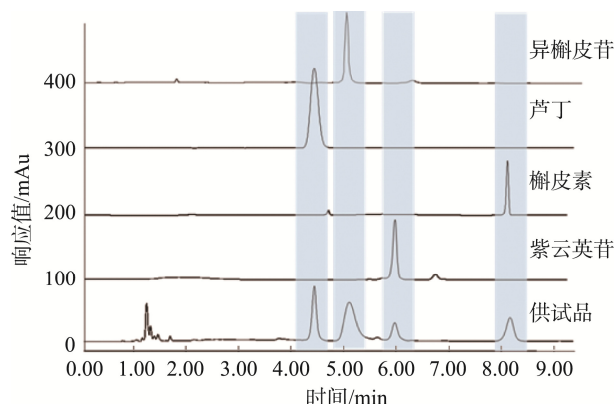


图 1 桑叶黄酮成分 UPLC 色谱图

Fig.1 UPLC Chromatogram of flavonoids in mulberry leaves

2.2 方法学考察

2.2.1 标准曲线和检出限

分别将 3 梯度混合对照品溶液依次注入超高速液相色谱仪, 测定峰面积, 以各对照样品浓度为 (X) 横坐标, 峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线。结果如表 1 所示, 4 种桑叶黄酮类成分在相应的线性范围内均呈良好的线性关系。

3 倍信噪比 (S/N) 所对应的浓度为检出限, 10 倍信噪比 (S/N) 所对应的浓度为定量限。如表 2, 检出限的范围为 0.3~1.2 μg/kg, 测定下限的范围为 1.0~4.0 μg/kg。表明该分析方法的灵敏度较高。

2.2.2 精密度实验

精密吸取混合对照品溶液 1 mL, 连续进样 6 次, 进样量 4 μL, 记录峰面积, 计算其峰面积的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD)。实验测得芦丁、异槲皮苷、紫云英苷及槲皮素的 RSD 分别为 1.32%、0.89%、1.84%、1.12%, 表明方法精密度较高。

2.2.3 重复性实验

平行制备桑叶样品粉末 6 份, 每份 0.5 g 进行测定, 记录峰面积并计算样品中各黄酮成分的含量, 以 6 份样品的 RSD 评估方法的重复性。实验求得芦丁、异槲皮苷、紫云英苷及槲皮素的 RSD 分别为 1.62%、0.96%、1.54%、2.02%, 表明实验的重复性良好。

表 2 桑叶 4 种成分的线性关系

Table 2 Linear relationship of 4 mulberry leaves components

成分	回归方程	r ²	线性范围/(mg/mL)	检出限/(μg/kg)	测定下限/(μg/kg)
芦丁	Y=62,535X-723,528	0.9990	0.5~8.5	0.3	1.0
异槲皮苷	Y=56,588X-720,987	0.9990	0.1~2.0	0.8	2.7
紫云英苷	Y=52,275X-370,351	0.9995	0.25~2.25	1.2	4.0
槲皮素	Y=54,442X-387,825	0.9997	0.075~1.45	1.2	4.0

2.2.4 稳定性实验

精密吸取供试品溶液 1 μL , 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 测定 1 次, 记录峰面积, 计算样品中芦丁、异槲皮苷、紫云英苷及槲皮素的 RSD 分别为 1.68%、1.86%、2.05%、1.42%, 表明实验具有良好的稳定性。

2.2.5 加样回收率

精密称取桑叶样品 6 份, 每份约 0.5 g, 于每份中加入 4 种黄酮对照品适量, 进样 4 μL , UPLC 测定, 记录峰面积, 计算各黄酮成分的平均加样回收率和 RSD, 结果见表 3。如表 3 所示, 桑叶 4 种黄酮成分加样回收率为 98%~102%, 相对标准偏差为 1.12%~1.86%, 表明实验的准确度良好。

2.3 不同产地桑叶样品黄酮含量的测定结果

2.3.1 不同产地桑叶中 4 种黄酮成分含量的比较

由表 4 可知, 不同产地桑叶样品的 4 种黄酮类成分具有较大的差异, 芦丁含量为 10.021~20.543 mg/g, 异槲皮苷的含量在 3.902~6.801 mg/g 之间, 紫云英苷的含量在 0.348~1.328 mg/g 之间, 而槲皮素的含量在 1.784~3.645 mg/g 之间。总的来说, 不同产地桑叶样品中 4 种黄酮成分的含量高低均为芦丁>异槲皮苷>槲皮素>紫云英苷。此外, 来自于 10 个不同桑叶产地中, 安徽地区的桑叶总黄酮含量最高, 广西次之, 而河南地区桑叶总黄酮含量最低。

表 3 桑叶 4 种黄酮成分加样回收率测定结果
Table 3 The results of the sample recovery rates of 4 flavones in mulberry leaves

化合物	试样量/mg	加样量/mg	测定值/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
芦丁	0.9209	0.9522	1.8710	99.78	99.69	1.25
	0.9211		1.8683	99.47		
	0.9203		1.8705	99.79		
	0.9210		1.8702	99.68		
	0.9208		1.8697	99.65		
	0.9207		1.8705	99.75		
	0.6564		1.3536	99.57		
异槲皮苷	0.6526	0.7002	1.3505	99.67	99.94	1.41
	0.6505		1.3457	99.29		
	0.6498		1.3610	101.57		
	0.6509		1.3488	99.67		
	0.6512		1.3504	99.86		
	0.1040		0.2530	99.20		
	0.1100		0.2622	101.33		
紫云英苷	0.1068	0.1502	0.2545	98.34	99.75	1.86
	0.1021		0.2508	99.00		
	0.1089		0.2605	100.93		
	0.1125		0.2622	99.67		
	0.2540		0.5545	99.34		
	0.2485		0.5518	100.26		
	0.2561		0.5558	99.07		
槲皮素	0.2601	0.3025	0.5614	99.60	99.57	1.12
	0.2525		0.5530	99.34		
	0.2409		0.5428	99.80		

表 4 20 批桑叶样品含量测定结果(mg/g, n=3)
Table 4 Content results of 20 batches of mulberry leaves samples(mg/g, n=3)

产地	芦丁	异槲皮苷	紫云英苷	槲皮素
AH_1	20.543±0.135	6.719±0.125	1.324±0.000	3.618±0.022
AH_2	20.385±0.713	6.801±0.026	1.328±0.102	3.645±0.107
HK_1	12.485±0.209	4.197±0.000	0.548±0.105	2.064±0.136
HK_2	12.479±0.735	4.155±0.023	0.529±0.054	2.056±0.116
JS_1	16.835±1.058	5.002±0.034	1.055±0.065	3.392±0.114
JS_2	16.655±1.026	5.012±0.141	1.061±0.105	3.395±0.103
HB_1	10.021±0.719	4.233±0.028	0.348±0.105	1.784±0.136
HB_2	10.053±0.908	4.245±0.031	0.359±0.054	1.826±0.126
SD_1	13.425±0.319	4.395±0.015	0.658±0.115	2.564±0.056
SD_2	13.521±0.523	4.408±0.011	0.649±0.096	2.506±0.116
ZJ_1	16.023±0.359	4.991±0.031	1.035±0.201	3.258±0.104
ZJ_2	16.004±1.738	4.985±0.082	1.047±0.108	3.263±0.162
SC_1	15.689±0.188	4.532±0.135	0.988±0.104	3.102±0.102
SC_2	15.747±0.997	4.488±0.000	0.975±0.201	3.115±0.105
JX_1	15.092±0.918	4.457±0.121	0.905±0.101	2.936±0.035
JX_2	15.089±1.216	4.449±0.143	0.912±0.000	2.928±0.106
GX_1	17.254±2.019	5.082±0.131	1.232±0.059	3.518±0.129
GX_2	17.055±1.358	5.121±0.094	1.236±0.108	3.558±0.214
HN_1	13.273±1.234	3.902±0.067	0.718±0.105	2.764±0.156
HN_2	13.321±1.285	3.923±0.061	0.719±0.056	2.806±0.116

2.3.2 10 个产地桑叶样品的聚类分析结果

由图 2 所示, 基于桑叶中 4 种黄酮成分的主成分分析表明, 10 个产地桑叶均可以明显区分开, 说明不同产地对桑叶质量影响较大; 图 3 的热图分析也同样表明, 不同产地均可聚为单独的一簇, 说明桑叶具有明显的产地聚类特性。

3 结论与讨论

本研究建立了 UPLC 同时测定药食同源桑叶中 4 种黄酮类成分(芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素)的含量测定方法。结果显示, 芦丁含量最高, 是中药桑叶的主要成分。但桑叶成分复杂, 且本研究发现异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素的含量虽然较低, 但不同产地存在一定的差异性, 故以芦丁作为单一指标, 不能全面反映桑叶的质量, 可通过建立该 4 种主要黄酮成分的含量测定方法以准确控制桑叶药材的质量。

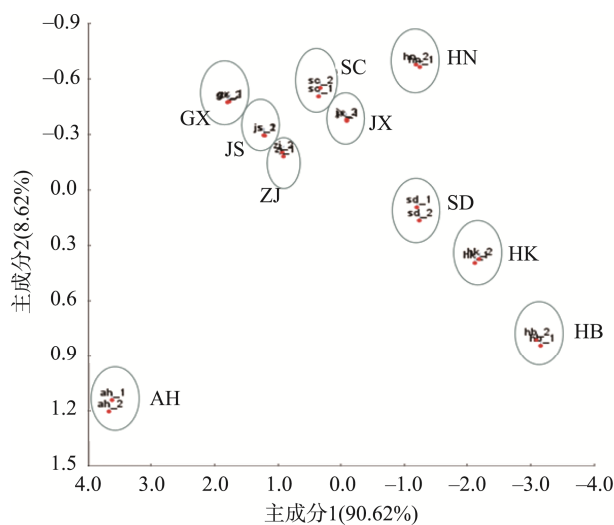


图 2 主成分分析结果
Fig.2 Results of principal component analysis

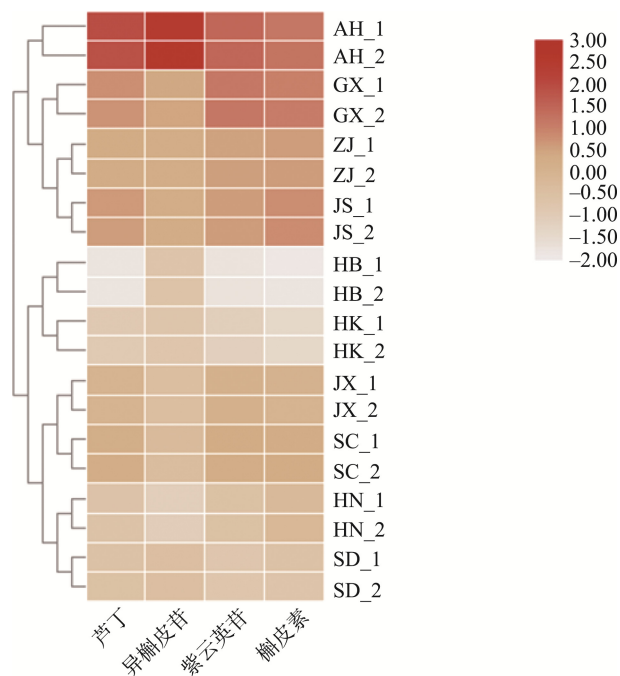


图 3 不同产地桑叶的热图分析

Fig.3 Heatmap of mulberry leaf from different producing areas

此外,本研究建立的方法简便,稳定性和专属性强,可知 10 min 内得到分析结果,因而大大降低了分析成本。同时本研究对 20 批来源于 10 个不同产地的桑叶中 4 种黄酮类成分进行比较分析,结果表明,不同产地桑叶中 4 种黄酮类成分具有显著差异,且具有明显的产地聚类特性,此研究结果可为提高桑叶质量标准及其优质来源的选择提供参考。

参考文献

- 白华.《神农本草经》桑叶考证[J]. 内蒙古中医药, 2016, 35(1): 102–103. BAI H. Textual research on mulberry leaves in *Shennong herbal classic* [J]. Inner Mongolia J Tradit Chin Med, 2016, 35(1): 102–103.
- 于小凤. 经霜对桑叶黄酮类成分积累影响的分子机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2018. YU XF. Molecular mechanism of the effect of Jingshuang on the accumulation of flavonoids in mulberry leaves [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2018.
- 张月, 唐钦悦, 代娟, 等. 桑叶黄酮提取物制备及其体外抗氧化作用研究[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(9): 47–52. ZHANG Y, TANG QY, DAI J, *et al.* Study on the preparation of flavonoids extract from mulberry leaves and its antioxidant activity *in vitro* [J]. China Food Addit, 2020, 31(9): 47–52.
- MOHADDESE M. *Morus alba* (mulberry), a natural potent compound in management of obesity [J]. Pharmacol Res, 2019, (146): 104341.
- 尹志亮, 管帮富, 董忠飞, 等. 桑叶的食用化开发研究进展[J]. 蚕桑茶叶通讯, 2012, (3): 10–11. YIN ZL, GUAN BF, TONG ZF, *et al.* Research progress on edible development of mulberry leaves [J]. Sericul Tea Commun, 2012, (3): 10–11.
- 纪迅, 李金贵. 桑叶及其提取物在家畜养殖中的研究进展[J]. 饲料研究, 2020, 43(9): 132–135.

- JI X, LI JG. Research progress of mulberry leaf and its extract in livestock breeding [J]. Feed Res, 2020, 43(9): 132–135.
- 张倩, 张立华. 桑叶的化学成分及开发利用进展[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(15): 16–19. ZHANG Q, ZHANG LH. Chemical constituents and development and utilization of mulberry leaves [J]. Hubei Agric Sci, 2020, 59(15): 16–19.
- 胡婷婷, 李金洋, 安凤霞, 等. 桑叶化学成分及药理作用研究进展[J]. 医学研究, 2020, 2(1): 147. HU TT, LI JY, AN FX, *et al.* Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of mulberry leaves [J]. Med Res, 2020, 2(1): 147.
- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药出版社, 2020. Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the people's Republic of China (1st section) [M]. Beijing: China Pharmaceutical Press, 2020.
- 程聪梅, 毛菊华, 余乐. HPLC 法同时测定桑叶药材及其炮制品中绿原酸、芦丁和异槲皮苷的含量[J]. 中国药房, 2016, 27(21): 2990–2992. CHENG CM, MAO JH, YU L. Simultaneous determination of chlorogenic acid, rutin and Isoquercitrin in mulberry leaf and its processed products by HPLC [J]. Chin Pharm, 2016, 27(21): 2990–2992.
- POLUMACKANYCZ M, SLEDZINSKI T, GOYKE E, *et al.* A comparative study on the phenolic composition and biological activities of *Morus alba* L. commercial samples [J]. Molecules, 2019, 24(17): 3082–3100.
- 孙莲, 严寒信, 姑再努尔·阿不力孜. 桑枝中黄酮类的 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 新疆医科大学学报, 2014, 37(3): 312–314. SUN L, YAN HX, GUZAINUR A. Study on HPLC fingerprint of flavonoids in *Morus alba* [J]. J Xinjiang Med Univ, 2014, 37(3): 312–314.
- 于小蓉, 孙莲, 孟磊. HPLC 测定新疆药桑叶中绿原酸、芦丁、异槲皮苷和槲皮素[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(11): 1051–1054. YU XR, SUN L, MENG L. Determination of chlorogenic acid, rutin, isoquercitrin and quercetin in mulberry leaves of Xinjiang by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2011, 28(11): 1051–1054.
- WANG L, TIAN XF, WEI WH, *et al.* Fingerprint analysis and quality consistency evaluation of flavonoid compounds for fermented guava leaf by combining high-performance liquid chromatography time-of-flight electrospray ionization mass spectrometry and chemometric methods [J]. J Sep Sci, 2016, 39(20): 3906–3916.
- 石延榜, 林秀敏, 王胜超, 等. 基于主成分分析-聚类分析法的不同商品规格白芍饮片中 5 种成分比较及质量评价研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(22): 2708–2714. SHI YB, LIN XM, WANG SC, *et al.* Comparison and quality evaluation of five components in *Radix paeoniae* Alba pieces with different specifications based on principal component analysis and cluster analysis [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2020, 37(22): 2708–2714.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

钟月葵, 主管药师, 主要研究方向为药学。
E-mail: ark_99@163.com