

HPLC法同时测定桑枝中桑皮苷A和桑皮黄素的含量^Δ

陈倩^{1,2*}, 孙登阳¹, 邓霖芳¹, 刘江云¹, 郝丽莉^{1#}(1.苏州大学药学院, 江苏苏州 215123; 2.常州技师学院, 江苏常州 213000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)03-0364-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.03.23

摘要 目的:建立同时测定桑枝中桑皮苷A和桑皮黄素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Cosmosil C₁₈-AR-II,流动相为乙腈-1%乙酸水溶液(梯度洗脱),检测波长为303 nm,柱温为30℃,流速为1.0 ml/min,进样量为10~20 μl。结果:桑皮苷A和桑皮黄素的质量浓度分别在0.101 5~2.029、0.020 42~0.408 4 mg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系($r=0.999\ 8$ 、 $0.999\ 7$);精密度试验的RSD<2%,重复性、稳定性试验的RSD<3%;平均加样回收率分别为98.2%、97.5%,RSD分别为1.39%、1.29%($n=6$)。在早春采集的样品中桑皮苷A和桑皮黄素的含量较高。结论:该方法操作简便、结果准确,可为桑枝的合理采收和开发利用提供参考。

关键词 桑枝;桑皮苷A;桑皮黄素;含量测定;高效液相色谱法

Simultaneous Content Determination of Mulberroside A and Mulberrin in *Ramulus mori* by HPLC

CHEN Qian^{1,2}, SUN Deng-yang¹, DENG Lin-fang¹, LIU Jiang-yun¹, HAO Li-li¹(1.College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Jiangsu Suzhou 215123, China; 2.Changzhou Technician Institute, Jiangsu Changzhou 213000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of mulberroside A and mulberrin in *Ramulus mori*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Cosmosil C₁₈-AR-II column with mobile phase consisted of acetonitrile-1% acetic acid aqueous solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The sample size was 10-20 μl. The detection wavelength was set at 303 nm, and column temperature was maintained at 30℃. RESULTS: The linear range were 0.101 5-2.029 mg/ml for mulberroside A ($r=0.999\ 8$) and 0.020 42-0.408 4 mg/ml for mulberrin ($r=0.999\ 7$). RSD of precision test was lower than 2%, and RSDs of reproducibility and stability test were lower than 3%. Average recovery rates were 98.2% (RSD=1.39%, $n=6$) and 97.5% (1.29%, $n=6$), respectively. The contents of mulberroside A and mulberrin were higher in samples collected in early spring. CONCLUSIONS: The method developed is simple and accurate, and can provide reference for the utilization and development of *R. mori*.

KEYWORDS *Ramulus mori*; Mulberroside A; Mulberrin; Content determination; HPLC

桑属植物桑 *Morus alba* L. 是常见的药食两用植物,其桑叶、根皮(桑白皮)、枝、果(桑椹)均为常用中药^[1]。桑枝中含有多种功能性成分,包括多酚、生物碱、多糖类化合物等^[2-3],其中1-脱氧野尻霉素(生物碱类)具有显著降低血糖作用,桑皮苷A(二苯乙烯苷类)具有抗氧化、镇咳平喘、抗炎镇痛等作用^[4-5],桑皮黄素(黄酮类)具有抗衰老、降低血糖、抗肿瘤等生物活性^[6-7]。桑枝药用部位为桑的嫩枝,但桑树在冬末春初、夏末秋初两个季节需要砍伐除去已有旧枝条(伐条),以促进桑叶的生长。近年来有文献报道,桑伐条中也含有白藜芦醇、桑皮苷A等成分^[8-10]。目前,有关桑枝、桑白皮、桑叶中黄酮类成分的含量测定已有报道^[11],但尚未见桑枝中黄酮类指标成分的含量测定研究。本研究发现,桑皮黄素是桑枝的特征性成分,并首次建立了采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定桑枝中桑皮苷A和桑皮黄素含量的方法,并对早春、夏末两季的桑枝进行了测定,以为

桑枝的资源开发利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪(美国安捷伦公司);ME215S型电子天平(德国赛多利斯公司);MP2002型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

桑皮苷A、桑皮黄素对照品(苏州大学药学院实验室自制,纯度均大于98%);乙腈(色谱纯,美国Fisher公司);乙酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);水为纯净水(杭州娃哈哈集团)。

1.3 药材

分别于早春(2012年3月13日)、夏末(2012年6月15日)两季在苏州大学桑园中收集桑树6个品种共12批次(早春H1-M~H6-M,夏末H1-J~H6-J)的桑枝样品,经苏州大学谈建中教授鉴定为桑科植物桑 *M. alba* L. 的枝条。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 分别精密称取桑皮苷A和桑皮黄素对照品50.73、10.21 mg,置于25 ml量瓶中,加75%乙醇溶解并定

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81274190)

* 硕士研究生。研究方向:天然产物活性成分。E-mail:qq69920@163.com

通信作者:研究员。研究方向:中医药基础与临床。电话:0512-68665580。E-mail:haolili@suda.edu.cn

容,得桑皮苷A和桑皮黄素的对照品贮备液。精密吸取上述对照品贮备液各0.5、2.5、5.0、7.5 ml,分别用75%乙醇定容于10 ml量瓶中,得5个不同质量浓度的对照品溶液(1~5号)。

2.1.2 供试品溶液 精密称取桑枝样品约4 g,精密加入75%乙醇20 ml,称定质量,超声(功率:250 W,频率:40 kHz)提取40 min,放冷,用75%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.2 色谱条件和系统适用性试验

色谱柱:Cosmosil C₁₈-AR-II (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-1%乙酸水溶液(B),梯度洗脱(0~15 min, 7% A; 15~30 min, 7%→43% A; 30~45 min, 43% A; 45~50 min, 43%→70% A; 50~55 min, 70%→7% A);检测波长:303 nm;柱温:30 ℃;流速:1.0 ml/min;进样量:10~20 μl。在此色谱条件下,桑皮苷A和桑皮黄素与相邻色谱峰之间的分离度均>1.5;理论板数分别大于4 000和11 000。色谱见图1。

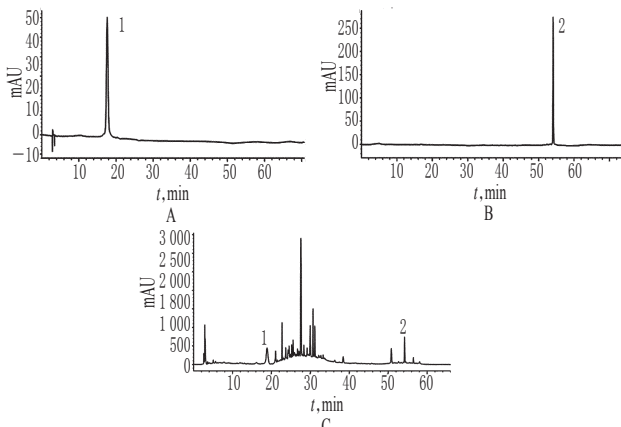


图1 高效液相色谱图

A.桑皮苷A对照品;B.桑皮黄素对照品;C.供试品;1.桑皮苷A;2.桑皮黄素

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mulberroside A control; B.mulberrin control; C. test sample; 1. mulberroside A; 2.mulberrin

2.3 线性关系考察

分别精密吸取“2.1.1”项下5个不同质量浓度的桑皮苷A和桑皮黄素对照品溶液各适量,分别按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积(y)为纵坐标,质量浓度(x,mg/ml)为横坐标,进行线性回归,得桑皮苷A的回归方程为 $y=8\ 110.3x-21.429$ ($r=0.999\ 8$),桑皮黄素的回归方程为 $y=9\ 849.3x+81.679$ ($r=0.999\ 7$)。结果表明,桑皮苷A、桑皮黄素的质量浓度分别在0.101 5~2.029、0.020 42~0.408 4 mg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系。

2.4 精密度试验

分别精密吸取“2.1.1”项下桑皮苷A和桑皮黄素对照品溶液(3号)各20 μl,按“2.2”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,桑皮苷A、桑皮黄素峰面积的RSD分别为1.86%、1.33%,表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

精密吸取同一批次(H1-M)样品,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液20 μl,分别于制备后0、2、4、6、8 h时按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,桑皮苷A、桑皮黄素峰面积的RSD分别为2.44%、1.08%,表明供试品溶液在8 h内稳

定性良好。

2.6 重复性试验

精密称取同一批次(H1-M)的样品各适量,共6份,精密称定,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,桑皮苷A、桑皮黄素峰面积的RSD分别为1.42%、1.73%,表明该方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

精密称取已知含量的同一批(H1-M)样品共6份,每份约2 g,分别精密加入“2.1.1”项下桑皮苷A(质量浓度为0.619 1 mg/ml)和桑皮黄素(质量浓度为0.089 08 mg/ml)的混合对照品溶液2 ml,精密加入18 ml 75%乙醇,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	已知含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
桑皮苷A	1.243	1.238	2.479	99.8	98.2	1.39
	1.240	1.238	2.443	97.2		
	1.241	1.238	2.455	98.1		
	1.246	1.238	2.467	98.6		
	1.240	1.238	2.472	99.5		
	1.245	1.238	2.436	96.2		
桑皮黄素	0.179 1	0.178 2	0.351 4	96.7	97.5	1.29
	0.178 7	0.178 2	0.348 9	95.5		
	0.178 8	0.178 2	0.352 8	97.6		
	0.179 6	0.178 2	0.356 1	99.0		
	0.178 7	0.178 2	0.352 3	97.4		
	0.179 4	0.178 2	0.355 2	98.7		

2.8 样品含量测定

分别取早春、夏末两季6个品种共12批次的桑枝,分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品中桑皮苷A和桑皮黄素的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=2,mg/g)

Tab 2 Results of content determination of samples (n=2, mg/g)

样品(早春)	桑皮苷A	桑皮黄素	样品(夏末)	桑皮苷A	桑皮黄素
H1-M	0.619	0.089 2	H1-J	0.148	-
H2-M	0.576	0.064 2	H2-J	-	0.074 2
H3-M	0.677	0.061 4	H3-J	0.355	0.014 1
H4-M	0.293	0.021 1	H4-J	0.031	-
H5-M	0.342	0.027 5	H5-J	-	0.019 6
H6-M	0.565	0.043 3	H6-J	0.059	0.021 6

注:“-”表示未检出

Note:“-”means wrdetected

3 讨论

桑枝中的黄酮、二苯乙烯苷类等多酚类成分组成复杂^[7],2010年版《中国药典》中尚未记载其含量测定成分及方法。朱祥瑞等^[8]采用HPLC法测定了桑椹和桑枝中白藜芦醇的含量;罗隽等^[9]和方婧等^[10]报道了HPLC法测定桑枝、桑叶和桑白皮及各配方颗粒中桑皮苷A的含量,并发现不同产地药材中的桑皮苷A含量差别较大。本研究表明,除桑皮苷A外,桑皮黄素也是桑枝中的代表性成分之一,可作为黄酮类成分的指标成分进行质量分析。

由表2可知,桑皮苷A和桑皮黄素在两个季节桑枝中的含

HPLC法测定不同生长年限的葛根不同部位中葛根素的含量^Δ

刘计权*, 宋 强, 杨文珍, 任剑锋, 宋晓春(山西中医学院中药学院, 太原 030024)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)03-0366-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.03.24

摘要 目的:建立测定不同生长年限的葛根不同部位中葛根素含量的方法。方法:采用高相液相色谱法。色谱柱为Dikma Diamonsil C₁₈,流动相为甲醇-水(25:75, V/V),流速为1.0 ml/min,柱温为室温,检测波长为250 nm。结果:葛根素的进样量在0.18~1.98 μg范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系($r=0.999\ 8$);精密性、稳定性试验的RSD<2%,重复性试验的RSD<3%;平均加样回收率为97.01%,RSD=1.71%($n=6$)。葛根木质部与韧皮部的葛根素含量相近,茎部最少,且三年生葛根的葛根素含量最高。结论:葛根素含量与生长年限及不同部位有关。该方法操作简单、结果可靠,适用于葛根药材的质量控制。

关键词 葛根;葛根素;高效液相色谱法;年限;木质部;韧皮部;茎部

Content Determination of Puerarin in Different Parts of *Pueraria lobata* with Different Growth Periods by HPLC

LIU Ji-quan, SONG Qiang, YANG Wen-zhen, REN Jian-feng, SONG Xiao-chun(College of TCM, Shanxi University of TCM, Taiyuan 030024, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of puerarin in different parts of *Pueraria lobata* with different growth periods. METHODS: The sample was determined by HPLC. The determination was performed on Dikma Diamonsil C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-water (25:75, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was ambient temperature and the detection wavelength was 250 nm. RESULTS: The linear range of puerarin was 0.18-1.98 μg with an average recovery ($r=0.999\ 8$) of 97.01% (RSD=1.71%, $n=6$). RSDs of precision, stability tests were lower than 2%, and that of reproducibility test was lower than 3%. The content of puerarin in xylem of *P. lobata* was similar to that in phloem of *P. lobata*. The content of puerarin was the highest in triennial *P. lobata*. CONCLUSIONS: The content of puerarin is affected by different growth periods and different parts. The method is simple and reliable, and can provide reference for standard cultivation and utilization of *P. lobata*.

KEYWORDS *Pueraria lobata*; Puerarin; HPLC; Growth periods; Xylem; Phloem; Stem

量差异显著:在早春采集的样品中含量较高,在夏末时含量普遍较低(除H2-J中的桑皮黄素外);不同品种间的含量也有较大差异:H1~H3品种早春采集的样品中的两种成分含量较高。分析过程还发现,桑皮苷A等白藜芦醇苷类成分作为一种强抗氧化剂,在日照和长期保存中容易氧化降解,这与文献报道^[8-10]相符,因而药材采集后应阴干、低温保存。

综上所述,该方法操作简便、结果准确,可为桑枝的合理采收和开发利用提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:279-280.
- [2] 顾关云. 桑的化学成分和生物活性研究进展[J]. 国外医药植物药分册, 2007, 22(1):12.
- [3] 姜乃珍, 薄铭, 吴志平. 中药桑枝化学成分及药理活性研究进展[J]. 江苏蚕业, 2006, 34(2):4.
- [4] 阚启明, 康宁, 田海涛, 等. 桑皮苷的镇咳平喘作用[J]. 沈

阳药科大学学报, 2006, 23(6):388.

- [5] 王元成, 伍春, 陈虎, 等. 桑白皮中白藜芦醇、氧化白藜芦醇和桑皮苷的抗氧化活性[J]. 食品科学, 2011, 32(15):135.
- [6] 周吉银, 王稳, 周世文. 桑药用资源的降糖作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11):204.
- [7] Zheng ZP, Cheng KW, Zhu Q, et al. Tyrosinase inhibitory constituents from the roots of *Morus nigra*: a structure-activity relationship study[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(9):5 368.
- [8] 朱祥瑞, 费建明, 杨逸文, 等. 桑椹和桑枝中白藜芦醇的提取及含量测定[J]. 蚕业科学, 2007, 33(1):110.
- [9] 罗隽, 刘韶, 李新中. 高效液相色谱法测定桑树各部位及其配方颗粒中桑皮苷A的含量[J]. 中南药学, 2011, 9(1):11.
- [10] 方婧, 高霏, 吴宏伟, 等. 桑枝中桑皮苷A的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5):80.
- [11] 周林, 徐立, 伍春, 等. 桑枝皮总黄酮提取工艺条件的优化试验[J]. 蚕业科学, 2010, 36(3):491.

(收稿日期:2014-07-18 修回日期:2014-10-17)

(编辑:孙 冰)

^Δ 基金项目:国家科技支撑计划项目(No.2011BAI07B05);山西省卫生厅科技攻关计划项目(No.20100223);山西省中药材、中药饮片地方标准研究项目(No.2011003B)

* 副教授, 博士。研究方向:中药材规范化种植和质量控制。电话:0351-2272269。E-mail: Liujiqian2008@163.com