

· 巴西草药研究专题 ·

高效液相色谱法比较巴西桑叶与中国桑叶中芦丁含量

艾则孜江·艾尔肯 田志浩 李莉 徐文英 高山山 韩丽 赵百孝
刘春生 马长华

【摘要】 目的 通过研究不同产地桑叶中芦丁含量,为桑叶资源的开发、利用提供初步的基础。**方法** 采用 HPLC 法分别对 11 份不同产地药材样品的芦丁含量进行测定。高效液相色谱法条件为 TechMate C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm,NO. AKAD06833),以甲醇-0.5%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱,检测波长为 358 nm,柱温为 30 ℃。**结果** 8 份国产样品的芦丁含量均未能达到《中华人民共和国药典》(一部)(2010 年版)的含量标准,3 份巴西样品高于《中华人民共和国药典》(一部)(2010 年版)要求。**结论** 国内桑叶中芦丁含量普遍较低,巴西黑桑叶中芦丁含量较高。

【关键词】 桑叶; 芦丁; 含量测定

【中图分类号】 R284 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.11.001

Comparison of rutin between Brazilian and Chinese mulberry leaf by HPLC Aizezjiang Ai-er-ken, TIAN Zhi-hao, LI Li, et al. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Corresponding author: MA Chang-hua, E-mail: machanghua60@sina.com

【Abstract】 Objective Decete the content of rutin in mulberry leaves from different origins by HPLC and analyze the discrepancy for the development and utilization of mulberry leaves provide a preliminary basis. **Methods** 11 kinds of mulberry leaves samples from domestic and foreign were detected. HPLC conditions, C₁₈ TechMate (4.6 mm×250mm, 5μm, NO. AKAD06833) was used for detection. The gradient elution was carried out with methanol -0.5% phosphoric acid solution as mobile phase, the detection wavelength was 358 nm, and the column temperature was 30℃. **Results** The content of rutin in 8 kinds of domestic samples was failed to achieve the standard of Chinese Pharmacopoeia (2010 edition), the Brazilian samples were higher than the requirements of pharmacopoeia. **Conclusion** The content of rutin in domestic mulberry leaves is lower than that in Brazilian mulberry leaves, and the content in the Brazil black mulberry leaves is the most

【Key words】 Mulberry leaves; Rutin; Content determination

桑叶始载于《神农本草经》,为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶,中国大部分地区均有栽培,尤以长江中下游及四川盆地为主。市场上也以此

产地为主。桑叶性甘,苦寒,归肺、肝经,具有疏散风热,清肺润燥,清肝明目的作用,用于风热感冒,肺热燥咳,头晕头痛,目赤昏花等症,《神农本草经》称其为“神仙叶”^[1-2]。桑叶中的有效成分主要包括黄酮类、生物碱类、苯丙素类、有机酸类、甾体及三萜类等多种化合物^[3],其中黄酮类化合物是桑叶的重要活性成分之一。新疆桑叶(Mulberry Leaves)异名铁扇子,为桑科(Moraceae)植物桑 *Morus alba* L. 的树叶,产于新疆阿克苏、和田和喀什等地区古老的树种,其叶具有补血镇静等功效,是新疆独一无二的特殊稀贵资源,具有很高的药用价值。现代药

基金项目:国家国际科技合作专项(2011DFA31370)

作者单位:100102 北京中医药大学中药学院(田志浩(博士研究生)、李莉(硕士研究生)、徐文英(硕士研究生)、高山山(硕士研究生)、刘春生、马长华),针灸推拿学院(赵百孝),中医养生研究所(韩丽);新疆医科大学第一附属医院药学部(艾则孜江·艾尔肯)

作者简介:艾则孜江·艾尔肯(1986-),硕士。研究方向:药品质量控制。E-mail: aizi1009@sina.com

通讯作者:马长华(1960-),本科,教授,硕士生导师。研究方向:药品质量控制。E-mail: machanghua60@sina.com

理研究表明,桑叶具有降糖降脂^[4-5]、抗氧化^[6]、抗肿瘤^[7]等多种活性作用。巴西拥有较丰富的桑树资源,栽培品种主要为白桑,主要集中在巴拉那州的马林加等北部县。为了更好地了解目前市场上的桑叶药材质量情况及扩大桑叶药用资源,依照 2010 版《中华人民共和国药典》(一部),笔者对巴西桑叶和中国桑叶中的芦丁进行了含量测定。

1 材料与仪器

Waters 1525 高效液相色谱仪(配置:泵 Waters1525、检测器 Waters 2998、自动进样器 2707),旋转蒸发仪(EYEL-A, N-1001),真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司),KQ-400KDE 型高功率数控超声波清洗器(昆山舒美),水浴锅 SHW. W-600(东方精锐),SchneiderMETTLER AE 240 电子分析天平,SchneiderSARTFORUIS AG BS 电子分析天平;无水乙醇(分析纯,北京化工厂),甲醇(色谱纯 Fisher),水(去离子水);巴西桑叶(马林加、隆德里纳和乌木阿拉玛)、新疆桑叶(新疆和田市、英阿瓦提、洛普县和墨玉县)、同仁堂桑叶(浙江、江苏和四川)和自采桑叶(北京中医药大学东校区,初霜后采集,60℃烘干),所有药材经北京中医药大学刘春生教授鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* L.。

2 方法与结果

2.1 标准样品溶液的制备

取芦丁对照品适量,精密称定,用甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液,作为母液备用。

2.2 供试样品溶液的制备

取桑叶粉末(过三号筛)约 1 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加甲醇 50 mL,加热回流 30 分钟,滤过,滤渣再用甲醇 50 mL,同法提取 2 次,合并滤液,减压回收溶剂,残渣用甲醇溶解,转移至 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件

色谱柱:TechMate C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, NO. AKAD06833);流动相:以甲醇为流动相 A,以 0.5% 的磷酸溶液为流动相 B,按表 1 进行梯度洗脱;流速:1 mL/min;检测波长:358 nm;柱温:24℃,见表 1,色谱图见图 1。

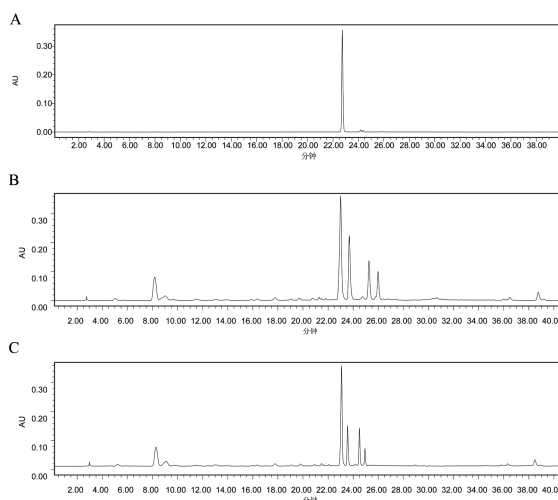
2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系 取 0.10 mg/mL 芦丁标准品溶液分别进样 2 μL、5 μL、7.5 μL、10 μL、12.5 μL、

20 μL 测定峰面积。以峰面积为纵坐标,质量为横坐标绘制标准曲线,得芦丁回归方程: $Y = 2.0E + 9X - 1.3E + 5$, $R^2 = 0.9994$ 。结果芦丁在 0.02 mg ~ 0.20 mg 质量范围内线性关系良好。

表 1 梯度洗脱条件

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0 ~ 5	30	70
5 ~ 10	30→35	70→65
10 ~ 15	35→40	65→60
15 ~ 18	40→50	60→50
18 ~ 24	50→80	50→20



A: 芦丁对照样品; B: 巴西黑桑叶供试样品; C: 中国桑叶供试样品

图 1 对照品溶液及各供试品溶液的 HPLC 图

2.4.2 精密度实验 取 0.10 mg/mL 的芦丁对照品溶液分别进样 6 针,每针 12.5 μL,以峰面积为指标计算精密度,得芦丁 RSD = 1.17%,表明精密度良好。

2.4.3 稳定性实验 取样品 2.0 g,按上述工艺提取,得供试品溶液,分别在 0 小时、2 小时、4 小时、6 小时、8 小时、10 小时进样。以峰面积为指标计算稳定性,芦丁 RSD = 1.28%,表明芦丁在 10 小时内稳定性良好。

2.4.4 重复性实验 取样品 2.0 g,按上述提取工艺提取,得供试品溶液,分别进样 6 针,每针 10 μL,以峰面积为指标计算重复性,芦丁 RSD = 0.92%,表明重复性良好。

2.4.5 加样回收率实验 精密称取药材粉末 6 份(约 1 g),加入芦丁 0.40 mg。按 2010 版《中华人民共和国药典》(一部)方法操作。以峰面积为指标计算加样回收率。芦丁 RSD = 0.79%,加样回收率平

均为 100.97%,表明加样回收率良好。

2.5 样品测定及分析

分别取巴西桑叶、新疆桑叶、同仁堂桑叶和自采桑叶,按“2.2”项下方法对药材进行处理,按“2.3”项下的色谱条件对制得的药材供试样品溶液和标准样品溶液进行测定,并分析计算供试样品芦丁含量。各产地样品测定结果见表 2,以芦丁为指标巴西桑叶中芦丁含量远远高于国内桑叶,且高于 2010 版《中华人民共和国药典》(一部)规定,本研究收集的国内桑叶芦丁含量均低于药典规定的 0.1%,其中国内桑叶中新疆黑桑芦丁含量最低。见表 3。

表 2 芦丁加样回收率结果

成分	称样量 /g	样品量 /mg	加入量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
芦丁	0.1003	0.42	0.40	100.02	100.97	0.79
	0.9996	0.42	0.40	101.08		
	0.1010	0.42	0.40	100.02		
	0.1002	0.42	0.40	101.98		
	0.1003	0.42	0.40	101.45		
	0.9998	0.42	0.40	101.28		

表 3 不同产地桑叶中的芦丁含量

产地	含量(%)
巴西马林加	0.136
巴西隆德里纳	0.124
巴西和乌木阿拉玛	0.134
新疆和田市	0.036
新疆英阿瓦提	0.008
新疆洛普县	0.013
新疆墨玉县	0.014
浙江	0.071
江苏	0.028
四川	0.081
北京中医药大学东校区	0.057

3 讨论

通过本实验结果可以发现国内市售桑叶药材中芦丁含量普遍偏低,并且低于 2010 版《中华人民共和国药典》(一部)规定,而巴西桑叶高于 2010 版《中华人民共和国药典》(一部)规定,究其原因可能是由于采收季节不同。桑叶采收季节按照传统用药习惯确定,以霜桑叶为最佳。《中华人民共和国药典》(一部)也规定桑叶要初霜后采收。杨普香等^[9]的研究表明,9 月底以后,桑叶中黄酮类化合物含量一直上升,霜后总黄酮含量,约为春夏秋桑叶

的 2 倍,这为初霜后采收桑叶提供了科学依据。但是孟磊等^[10]对新疆地区的桑叶中总黄酮含量进行测定,结果表明新疆地区的桑叶霜前(9 月)总黄酮含量高于霜后,这可能与新疆地区特殊的生态环境有关。中国桑资源丰富,全国各地都有栽培,现有标准中规定的采收季节是否普遍适用,还需要做进一步的考察。单一质量控制指标不能全面地代替药材的疗效,桑叶中含有生物碱、多糖、黄酮、酚类等多种化合物,具有不同的药理活性,用单一成分测定的方法来对药材进行质量控制,合理性有待商榷。中药指纹图谱不失为一种控制中药质量的有效方法之一。目前,英国、印度以及世界卫生组织等都采用指纹图谱技术对植物药、草药质量进行评价^[11]。有关桑叶指纹图谱的研究还处于探索阶段,有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010;279.

[2] 江苏新医学院. 中药大辞典(下册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1985;1963.

[3] 刘利,潘一乐. 不同桑种桑叶总黄酮含量分析[J]. 农业工程科学,2008,24(1):488-491.

[4] Andallu B, Suryakantham V, Lakshmi Srikanthi B, et al. Effect of mulberry (Morus indica L.) therapy on plasma and erythrocyte membrane lipids in patients with type 2 diabetes [J]. Clin Chim Acta, 2001, 314(1-2):47-53.

[5] Andallu B, Varadacharyulu NCh. Control of hyperglycemia and re-tardation of cataract by mulberry (Morus indica L.) leaves in streptozotocin diabetic rats [J]. Indian J Exp Biol, 2002, 40(7):791-795.

[6] Doi K, Kojima T, Fujimoto Y. Mulberry leaf extract inhibits the oxidative modification of rabbit and human low density lipoprotein [J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23(9):1066-1071.

[7] Kim SY, Gao JJ, Kang HK. Two flavonoids from the leaves of Morus alba induce differentiation of the human promyelocytic leukemia (HL-60) cell line [J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23(4):451-455.

[8] 郭小补, 廖森泰, 邹宇晓, 等. 不同桑品种的桑叶总黄酮含量与体外抗氧化活性的相关性[J]. 蚕业科学, 2008, 34(3):381-386.

[9] 杨普香, 管帮福, 黎小萍, 等. 桑叶中黄酮类化合物、氨基酸、桑多酚的含量变化探讨[J]. 蚕桑茶叶通讯, 2003, (112):2-3.

[10] 孟磊, 孙莲, 张丽静, 等. 新疆桑叶中总黄酮含量的测定[J]. 中国民族民间医药杂志, 2002, (86):176-177.

[11] 江蔚欣, 钦浩, 何文顺. 中药指纹图谱研究的重要性及注意事项[J]. 黑龙江医药, 2008, 21(3):25-27.

(收稿日期: 2015-08-22)

(本文编辑: 董历华)