

毛细管电泳法测定桑叶中的黄酮类成分——芦丁和槲皮素

孙 莲¹, 孟 磊¹, 陈 坚¹, 马 季², 胡 瑞², 贾殿增²

(1. 新疆医科大学化学教研室, 新疆 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆大学生物系, 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要 采用高效毛细管电泳法分离测定了新疆不同地区、不同采集期、不同品种的桑叶中的黄酮类成分——芦丁、槲皮素的含量。以含有体积分数为 15% 甲醇的 10 mmol/L 的磷酸二氢钠-20 mmol/L 的硼砂溶液(pH 8.62)为电泳缓冲液, 采用压力进样方式, 在 25 °C, 20 kV 恒压下进行电泳分离, 并在 245 nm 波长处检测。结果表明, 桑叶中的两种目标组分在 12 min 内完全分离, 且有良好的线性关系; 芦丁和槲皮素的加样回收率分别为 95.64% 和 99.36%, 其 RSD 分别为 2.25% 和 1.79% (n = 6)。方法简单、准确、快速。

关键词 高效毛细管电泳; 芦丁; 槲皮素; 桑叶

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-871X(2001)05-0395-03

1 引言

桑叶为桑科植物桑(*Morus alba* L.)的叶, 桑叶的功用为祛风清热、凉血明目, 主治风温发热、头疼、目赤、口渴和肺热咳嗽等^[1]。药理研究证明桑叶能抑制血糖上升^[2], 在治疗糖尿病、高血压、高血脂^[3]及抗衰老方面^[4]都具有良好的疗效。由此可见, 桑叶不但具有药用价值, 而且还具有保健功效。药理实验还证明桑叶中的黄酮类成分具有抑制血清脂质增加和抑制动脉粥样硬化形成的作用^[5], 因此桑叶中黄酮类成分的含量测定对开发利用桑叶具有重要的意义。桑叶中黄酮类成分的测定方法有分光光度法^[6]、高效液相色谱法^[7]。本文采用高效毛细管电泳法对新疆不同地区、不同采集期、不同品种的桑叶中的黄酮类成分——芦丁、槲皮素的含量进行了全面系统的分析, 为桑叶的开发利用提供了依据。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

P/ACE MDQ 型高效毛细管电泳系统, 配有紫外检测器, 用 Gold 软件控制仪器操作和数据采集(Beckman 公司, 美国)。超声波振荡器(BRANSON SB3200-T(20 kHz), 上海)。perpHecT LogRmeter model 330 pH 计(ORION, 美国)。芦丁、槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所)。甲醇为优级纯, 磷酸二氢钠和硼砂为色谱纯, 其他试剂均为分析纯; 水为二次蒸馏水。样品为不同地区的桑叶(采自新疆南、北、东疆地区, 5 月份的嫩叶), 不同采集期的桑叶(采自新疆医科大学院内, 6~11 月份中每月的 25 日采集)和不同品种的桑叶(采自新疆地区和田

市洛浦县的黑桑树、白桑树)。

2.2 实验方法

2.2.1 对照品溶液的制备 精确称取适量的芦丁、槲皮素对照品, 用甲醇溶解, 定容, 摇匀, 使其质量浓度分别为 0.22 g/L 和 0.36 g/L。

2.2.2 供试品溶液的制备 精确称取 60 °C 下干燥恒重后并过 60 目筛的桑叶粉末 2.00 g, 置于索氏提取器中, 用 80 mL 乙醚脱脂 8 h, 挥干醚液。将残渣置于 50 mL 的容量瓶中, 加甲醇 35 mL, 放置 24 h, 超声提取 40 min, 稍凉后, 加甲醇定容, 摇匀。上清液用 45 μm 滤膜过滤, 滤液作供试液。

2.2.3 电泳条件 以含体积分数为 15% 甲醇的 10 mmol/L 磷酸二氢钠-20 mmol/L 硼砂溶液(pH 8.26)为电泳缓冲液, 毛细管柱(57 cm(有效长度为 50 cm)×75 μm i. d., 美国), 于 25 °C, 20 kV 恒压下进行电泳分离, 在 245 nm 波长处检测。毛细管柱使用前用 0.10 mol/L 的 NaOH、水和电泳缓冲液分别冲洗 1 min, 2 min 和 3 min。每次电泳后, 用电泳缓冲液冲洗毛细管柱 2 min。

3 结果与讨论

3.1 电泳缓冲液的选择

缓冲液的组成、浓度和 pH 值是影响芦丁和槲皮素分离的主要因素。分别试验了以 Na₂B₄O₇ 溶液(pH 9.5), Na₂HPO₄-Na₂B₄O₇ 混合液(pH 9.0), NaH₂PO₄-Na₂B₄O₇ 混合液(pH 8.62), Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 混合液(pH 7.0)和 NaH₂PO₄-Na₂B₄O₇ 混合液(pH 8.62)作为电泳缓冲液的电泳分析, 发现以 NaH₂PO₄-Na₂B₄O₇ 混合液作为电泳缓冲液的分离效果最好。试验了 pH 值相同而 NaH₂PO₄-

Na₂B₄O₇ 浓度不同的一系列缓冲液对分离的影响, 实验证明 10 mmol/L NaH₂PO₄-20 mmol/L Na₂B₄O₇ 作为缓冲液时分离完全, 且峰形尖锐、对称性好。向缓冲液中加入适量的甲醇, 可防止其受极端 pH 环境的影响, 使电渗流降低, 分离选择性增加, 重现性良好。分别试验了在 10 mmol/L NaH₂PO₄-20 mmol/L Na₂B₄O₇ 中加入体积分数为 5%, 10%,

15% 和 20% 的甲醇对分离效果的影响, 发现加入 15% 甲醇的分离效果最佳。同时研究了不同 pH 下的 10 mmol/L NaH₂PO₄-20 mmol/L Na₂B₄O₇ (含 15% 甲醇) 缓冲液对分离的影响。实验表明, 在 pH 低时色谱峰重叠严重; pH > 6 时芦丁和槲皮素能完全分离。本实验选择缓冲液的 pH 为 8.62。图 1 为在选定的条件下得到的芦丁和槲皮素的电泳图。

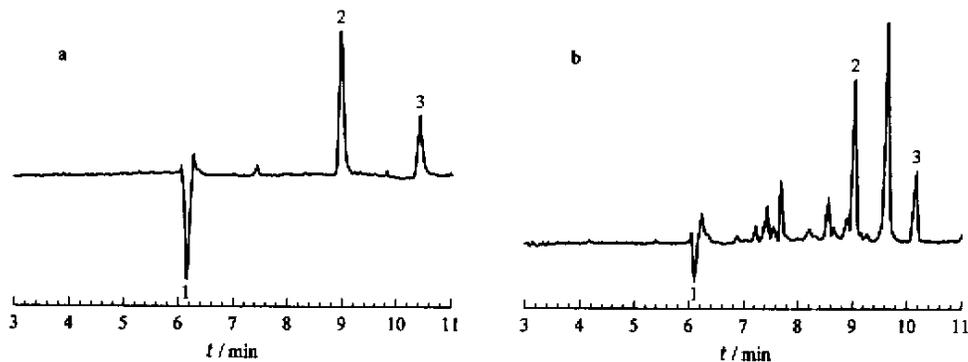


图 1 芦丁和槲皮素的毛细管电泳图

Fig.1 Electropherograms of rutin and quercetin

a. mixed standards ; b. sample.

1. methanol ; 2. rutin ; 3. quercetin.

3.2 线性范围

配制一系列芦丁和槲皮素对照品的混合液, 在确定的电泳条件下进行分离分析, 芦丁和槲皮素的校正峰面积 Y 与其质量浓度 ρ (mg/L) 分别在 4.4 mg/L ~ 28.8 mg/L 和 1.8 mg/L ~ 145.8 mg/L 范围内有良好的线性关系, 线性回归方程分别为: 芦丁, $Y = 71.60\rho + 30.51$, $r = 0.9991$; 槲皮素, $Y = 315.17\rho - 929.70$, $r = 0.9949$ 。

3.3 精密度试验

分别精确吸取芦丁对照品溶液 30 μ L, 100 μ L 和 270 μ L 以及槲皮素对照品溶液 10 μ L, 80 μ L 和 270 μ L 各 6 份, 连续进样 6 次, 测定芦丁和槲皮素校正峰面积的 RSD, 结果分别为: 芦丁, 2.87%, 2.25% 和 1.98%; 槲皮素, 2.78%, 1.79% 和 2.05%。迁移时间的 RSD 分别为: 芦丁, 0.46%; 槲皮素 0.74%。

3.4 加样回收率试验

在已知含量的样品中, 分别加入一定量的芦丁和槲皮素对照品进行加样回收试验, 结果见表 1。

表 1 回收试验结果 ($n = 5$)

Table 1 Results of recovery ($n = 5$)

Component	Original (mg/L)	Added (mg/L)	Found (mg/L)	Recovery (%)
Rutin	2.93 ± 0.90	62.86	63.05 ± 2.10	95.64 ± 2.04
Quercetin	5.01 ± 1.20	28.00	32.79 ± 1.10	99.36 ± 1.89

3.5 样品的测定

3.5.1 样品中芦丁和槲皮素的测定 取供试液 90 μ L 加电泳缓冲液 110 μ L, 在确定的电泳条件下进行测定, 由线性回归方程计算各样品中芦丁和槲皮素的含量, 结果见表 2 及表 3。

表 2 乌鲁木齐地区不同时期的桑叶中芦丁、槲皮素的含量

Table 2 Contents of rutin and quercetin in mulberry leaves

collected from different periods in Wulumuqi area mg/g

Month	Rutin	Quercetin
June	0.26	0.21
July	0.39	0.23
August	0.34	0.25
September	0.49	0.58
October	N. D. *	N. D.
November	N. D.	N. D.

* N. D. : undetected.

表 3 新疆 6 个产地、两个品种的桑叶中芦丁、槲皮素的含量¹⁾

Table 3 Contents of rutin and quercetin in mulberry

leaves of six places and two kinds in Xinjiang¹⁾ mg/g

Place	Kind	Rutin	Quercetin
Wulumuqi	<i>Morus alba</i> L.	0.09	0.31
Tulufan	<i>Morus alba</i> L.	1.54	0.28
Hami	<i>Morus alba</i> L.	0.16	N. D. ²⁾
Arkesu	<i>Morus alba</i> L.	0.98	N. D.
Kashi	<i>Morus alba</i> L.	1.06	0.23
Hetian	<i>Morus alba</i> L.	1.21	0.29
Luopu ,Hetian	<i>Morus nigra</i> L.	1.20	0.17
Luopu ,Hetian	<i>Morus alba</i> L.	0.83	0.12

1) The mulberry leaves were collected in May ;

2) N. D. : undetected.

3.5.2 采集期、产地和品种对桑叶中芦丁、槲皮素含量的影响 从表2可以看出,在同一产地不同采集期,6月份的桑叶中芦丁、槲皮素的含量较低,7月、8月份的逐渐升高,9月份的桑叶中两种成分的含量最高,10月份和11月份的桑叶中两种成分均检测不到。据《中药大词典》记载,传统习惯认为桑叶“以老而霜为佳,欲其气之全,力之厚也,故入药用冬桑叶,亦曰霜桑叶。”现代中药学也要求桑叶在10~11月份经霜后采集,新疆10月中旬开始霜降,10月底和11月初桑树开始落叶,按传统习惯应在10月底采集为佳。但以上实验结果表明,霜前(9月份)桑叶中芦丁和槲皮素的含量最高,而霜后(10月底和11月初)的桑叶中芦丁和槲皮素的含量骤然下降,落叶中二者的含量几乎为零,故应采集霜前桑叶入药。另外,从表3可以看出,新疆不同产地的桑叶中芦丁、槲皮素含量较高的为吐鲁番地区的桑叶(芦丁为1.54 mg/g,槲皮素为0.28 mg/g),原因可能是吐鲁番地处盆地,气候干燥,夏季炎热,日照时间长。而阿克苏、哈密地区桑叶中两者含量较低,显示出极大的地区差异性,说明新疆地域辽阔,南、北、东疆地理环境、气候条件不同造成了桑叶中有效成分含量的不同。黑桑(*Morus nigra* L.)和白桑(*Morus alba* L.)两个品种中,黑桑中两种成分的含量比白桑

高,显示出品种之间的差异性。

参考文献:

- [1] New Medical Jiangsu College. Chinese traditional medicine dictionary, the first volume. Shanghai:Shanghai People's Press, 1977. 1963
江苏新医学院. 中药大词典(上册). 上海:上海人民出版社, 1977. 1963
- [2] Kim S H, Kim K S, Lee J H, et al. Sanop Misaengmul Hakhoechi, 1997, 25(4): 391-395
- [3] Doi K, Kojima T, Harada M, et al. Nippon Eiyo, Shokuryo Gakkaishi, 1994, 47(1): 15-22
- [4] TANG Fa-di, WANG Yan. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2000, 31(9): 685-688
唐法娣, 王 砚. 中草药, 2000, 31(9): 685-688
- [5] WANG Qian. Foreign Medical Science. Chinese Traditional Medicine and Chinese Traditional Drugs, 1997, 19(6): 50
王 谦. 国外医学·中医中药分册, 1997, 19(6): 50
- [6] MEI Quan-xi, XU Jian-zhong. Chinese Pharmaceutical Bulletin, 1988, 23(11): 660-661
梅全喜, 徐建中. 药学通报, 1988, 23(11): 660-661
- [7] JIA Zhi-shen, WU Jian-min, TANG Meng-cheng. Chinese Journal of Chromatography, 1996, 14(6): 486-487
贾之慎, 郇建敏, 唐孟成. 色谱, 1996, 14(6): 486-487

Determination of Rutin and Quercetin in Mulberry Leaves by High Performance Capillary Electrophoresis

SUN Lian¹, MENG Lei¹, CHEN Jian¹, MA Ji², HU Rui², JIA Dian-zeng²

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

2. Department of Biology, Xinjiang University, Wulumuqi 830054, China)

Abstract: Rutin and quercetin are the main effective components of mulberry leaves with the functions of controlling the increase of fat in serum and controlling the formation of arterio-sclerosis. In this article a high performance capillary electrophoretic (HPCE) method was used to separate and determine rutin and quercetin in mulberry leaves collected from different periods, different places and different kinds in Xinjiang. Electrophoretic conditions were as follows: a capillary tube (75 μ m i. d. \times 57 cm (effective length 50 cm)), with 10 mmol/L dihydrogen sodium phosphate-20 mmol/L sodium borate containing 15% methanol as the running buffer (pH 8.62) and an applied voltage of 20 kV, at 25 $^{\circ}$ C, detected at a wavelength of 245 nm. Under the optimum conditions, rutin and quercetin were separated successfully from other components within 12 minutes. The corrected peak areas of rutin and quercetin increased linearly with the increase of their concentrations in the range of 4.4 mg/L-28.8 mg/L and 1.8 mg/L-145.8 mg/L respectively. The corresponding regression equations for rutin and quercetin were $Y = 71.60\rho + 30.51$ ($r = 0.9991$) and $Y = 315.17\rho - 929.70$ ($r = 0.9949$) respectively, and the recoveries were 95.64% and 99.36%. The analytical results demonstrate the method is simple, quick and well reproducible, and can be used as a reliable tool for the quality control of mulberry leaves.

Key words: high performance capillary electrophoresis; rutin; quercetin; mulberry leaf