

# HPLC-CL 法测定桑叶中芦丁和桑色素

刘焱, 高智席, 黄成 (1. 遵义师范学院化学系, 贵州遵义 563002; 2. 西南大学化学化工学院, 重庆 400715)

**摘要** 基于NaOH碱性介质中铁氰化钾可以直接氧化芦丁和桑色素产生化学发光, 建立了高效液相色谱分离柱, 采用化学发光法测定桑叶中芦丁和桑色素含量。结果表明, 芦丁和桑色素浓度在 $1.0 \times 10^{-2} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$ 和 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$ 范围内与化学发光强度呈良好的线性关系, 检出限(S/N=3)为 $1.0 \times 10^{-9} \text{ g/ml}$ 和 $3.4 \times 10^{-7} \text{ g/ml}$ 。该法简便、快速、有效, 灵敏度高, 首次用于桑叶中芦丁和桑色素的测定, 取得了很好的效果。

**关键词** 高效液相色谱; 化学发光; 桑叶; 芦丁; 桑色素

中图分类号 S888.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)21-09128-02

## Determination of Rutin and Morin in Mulberry Leaves by HPLC-CL Method

LIU Yan et al (Department of Chemistry, Zunyi Normal College, Zunyi, Guizhou 563002)

**Abstract** Based on the chemiluminescent generated by directly oxidation of rutin and morin hydrate by  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  in a alkaline medium. The chemiluminescence method was established by HPLC separating column to determine the content of rutin and morin hydrate in mulberry leaves. The concn. of rutin and morin in range of  $1.0 \times 10^{-2} \sim 1.0 \times 10^{-6}$  and  $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$  were linear with chemiluminescence intensity. The detection limits was  $1.0 \times 10^{-9}$  and  $3.40 \times 10^{-7} \text{ g/ml}$  (S/N=3). The method was simple, accurate, quick, effective and high sensitive, and Good effect was obtained in its first determination of rutin and morin hydrate in mulberry leaves.

**Key words** HPLC; Chemiluminescence; Mulberry leaves; Rutin; Morin hydrate

桑叶为桑科植物桑(*Morus alba* L.)的叶, 桑叶的药用历史悠久, 具有降血压、抑制血糖上升、抗菌消炎、改善血脂、延缓衰老和抗肿瘤、抗氧化等功效<sup>[1-2]</sup>。现代药理研究证明, 桑叶中的总黄酮对糖尿病大鼠小肠的双糖酶、对体外蛋白的糖基化及对LDL的氧化都具有抑制作用<sup>[3-5]</sup>。芦丁和桑色素是桑叶中黄酮类成分之一, 对桑叶中芦丁和桑色素的含量进行测定具有重要的意义。李保新等<sup>[6]</sup>研究发现, 在碱性介质中,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 直接氧化芦丁的化学发光体系; 孙莲等<sup>[7]</sup>用高效液相色谱法测定了桑叶中的芦丁。但采用HPLC-CL对桑叶中芦丁和桑色素成分进行测定尚未见报道。笔者采用反相高效液相色谱化学发光法测定遵义地区桑叶中的芦丁和桑色素含量, 旨在为相关研究提供基础数据。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

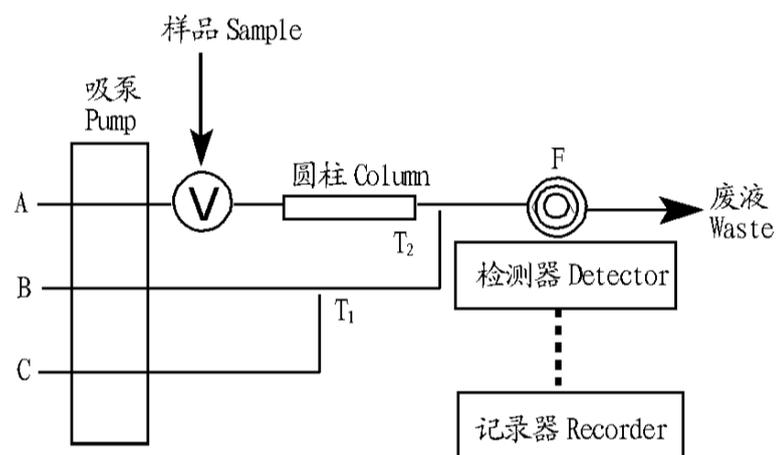
**1.1.1 仪器。**LC-6A液相色谱仪(Shimadzu, 日本), kBPCL超微弱发光测量仪(中国科学院生物物理研究所), KQ50型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), TGL-16G型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

**1.1.2 试剂。**芦丁和桑色素标准溶液: 准确称取一定量的芦丁和桑色素标准品(99%, 上海晶纯试剂有限公司)溶于水并用流动相定容到50 ml棕色容量瓶中, 摇匀, 作为标准溶液, 在4℃冰箱中保存, 使用时用流动相稀释至所需浓度。 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 储备液(浓度 $1 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ ); 其他试剂均为分析纯, 水为二次蒸馏水。

### 1.2 方法

**1.2.1 试验流程。**将以往用蠕动泵或恒流泵改为用高效液相色谱专用高压泵输送发光试剂, 有效地克服了蠕动泵或恒流泵脉冲大, 流速不稳定的缺陷, 可以很方便地调整流速。按图1所示流路用高压泵A输送流动相, 分别用B泵和C泵输送 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 和氢氧化钠溶液, 将芦丁和桑色素标准溶液

或样品溶液由进样阀V注入流路中, 经色谱柱分离后与发光试剂混合产生强烈的化学发光, 记录发光信号以峰面积定量。



注:A为流动相; B为 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液; C为NaOH溶液;  $T_1$ 、 $T_2$ 为T型混合管; F为CL流通池。

Note: A, mobile phase; B,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  solution; C, NaOH solution;  $T_1$  &  $T_2$ , T-type mixing tube; F, CL flow cell.

图1 测定芦丁和桑色素的HPLC-CL检测装置示意

Fig.1 The schematic diagram of HPLC-CL detecting device

### 1.2.2 样品的制备。

(1) 样品提取方法确定。以浓度50%的乙醇为提取溶剂, 分别采用超声提取、常温浸泡提取、索氏提取3种方法对桑树的叶、茎进行提取, 比较芦丁和桑色素提取率。

(2) 分析样品的制备。取桑叶干燥粉碎, 称取0.1000 g磨碎的桑叶置于具塞三角烧瓶中, 加入15 ml浓度50%乙醇, 室温放置10 h, 超声提取20 min, 过滤; 分2次加入2 ml浓度50%的乙醇超声提取5 min并过滤; 合并滤液, 定容至20 ml, 离心(2000 r/min), 取上清液, 用于HPLC-CL分析。

### 1.2.3 分析方法。

(1) 色谱条件确定。色谱柱: 填料Hypersil ODS  $5 \mu\text{m}$   $4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$ (大连依利特科学仪器有限公司)。流动相为乙醇-0.01%醋酸铵(体积比=2:1), 流速为1 ml/min。柱温为室温, 进样量为20  $\mu\text{l}$ 。绘制芦丁和桑色素的标样色谱图和样品色谱图。

(2) 流程参数的选择。在NaOH溶液浓度为0.5 mol/L,

作者简介 刘焱(1959-), 男, 贵州遵义人, 副教授, 从事色谱与化学发光的应用研究。

收稿日期 2008-03-16

$K_3Fe(CN)_6$  浓度为  $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ , 流动相为乙醇-0.01% 醋酸铵(体积比2:1), 流速为  $1 \text{ mL/min}$  时, 研究流路参数对发光强度的影响。

(3) 试验条件的选择。在酸性介质(浓度  $1 \text{ mol/L H}_2\text{SO}_4$ ) 中  $KMnO_4$ <sup>[8]</sup>、 $Ce(IV)$ <sup>[9]</sup> 和碱性介质(浓度  $0.4 \text{ mol/L NaOH}$ ) 中  $K_3Fe(CN)_6$ 、 $NaClO$ 、 $H_2O_2$  分别作氧化剂进行直接氧化芦丁和桑色素的研究, 选择适宜氧化剂, 同时研究  $K_3Fe(CN)_6$  浓度和  $NaOH$  浓度对测定结果的影响。

**1.2.4 样品分析。** 从遵义采集桑叶样品, 按所确定的样品制备方法和色谱条件进行芦丁和桑色素的含量分析。

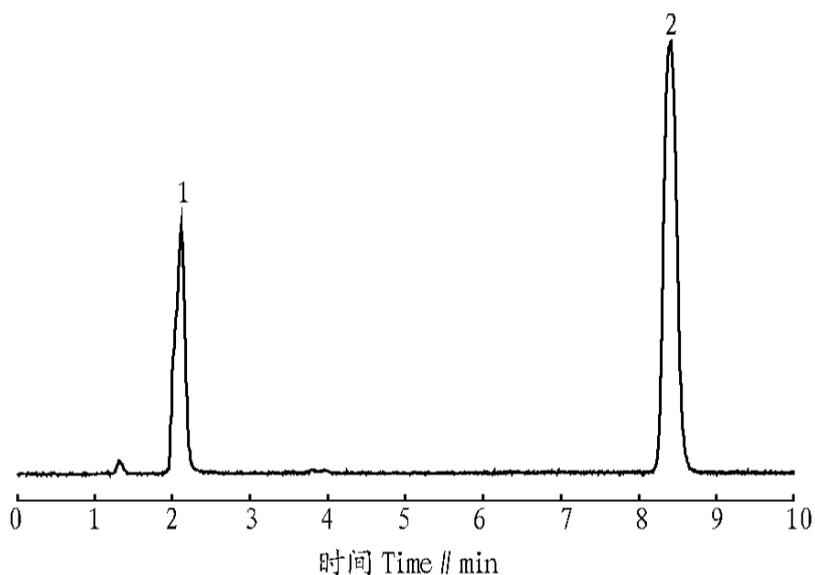
以5月份桑叶为样品, 按样品制备方法操作后, 在所选条件下进行分析。重复操作6次( $n=6$ ), 分析精密性。

在5月份桑叶中定量加入标准芦丁和桑色素溶液, 按样品制备方法操作后, 测定回收率, 重复测定5次。

## 2 结果与分析

**2.1 样品提取方法** 试验结果表明, 3种方法提取率无显著性差异, 但经优化, 先浸泡再超声辅助提取, 芦丁和桑色素提取率大大提高, 操作简单, 提取时间短, 因而采用先浸泡再超声辅助提取法作为样品的制备方法。

**2.2 色谱条件** 图2~3表明, 在试验色谱条件下, 桑叶中芦丁和桑色素均有不受干扰的吸收波峰, 因此, 在该色谱条件下可对芦丁和桑色素进行HPLC-CL分离测定。



注: 1 为芦丁, 浓度  $5.0 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$ ; 2 为桑色素, 浓度  $5.0 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$ 。下图同。

Note: 1, Rutin,  $c = 5.0 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$ ,  $t_R = 2.07 \text{ min}$ ; 2, Morin hydrate,  $c = 5.0 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$ ,  $t_R = 8.41 \text{ min}$ . The same as below.

图2 芦丁和桑色素混合物色谱图

Fig.2 Chromatogram of a mixture of rutin and morin hydrate

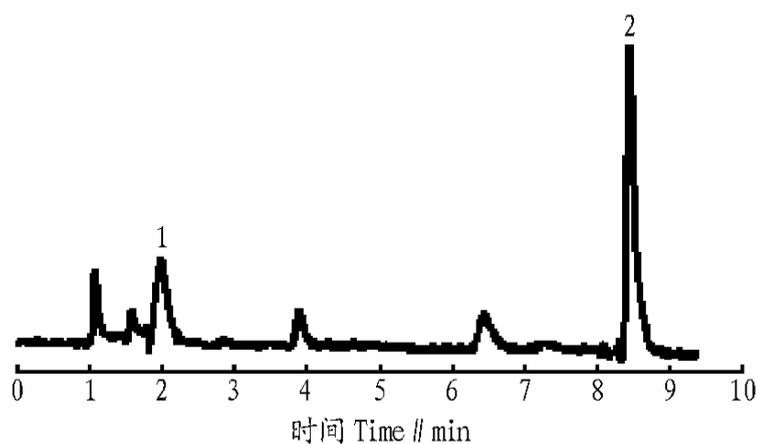


图3 芦丁和桑色素样品色谱图

Fig.3 Chromatogram of rutin and morin hydrate

**2.3 流路参数的选择结果** 试验结果表明, 当每条管路中试液流速均为  $1 \text{ mL/min}$ , 管道内径为  $0.8 \text{ mm}$ , 混合管长度为  $10 \text{ cm}$  时具有最大的信噪比。

## 2.4 试验条件

**2.4.1 氧化剂。** 试验结果表明, 仅有  $KMnO_4$  和  $K_3Fe(CN)_6$  作氧化剂时, 产生化学发光, 而  $K_3Fe(CN)_6$  在该体系中表现出最好的发光特性。故笔者选择碱性的  $K_3Fe(CN)_6$  作为氧化剂来测定芦丁和桑色素。

**2.4.2  $K_3Fe(CN)_6$  浓度。**  $K_3Fe(CN)_6$  浓度不仅影响测定的灵敏度, 而且还影响测定的线性范围。随  $K_3Fe(CN)_6$  浓度的增大, 发光强度也增强。但当其浓度达到一定值后发光强度反而减小。根据试验, 选用  $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  的  $K_3Fe(CN)_6$  浓度。

**2.4.3  $NaOH$  浓度。**  $K_3Fe(CN)_6$  只有在碱性介质中, 才能氧化芦丁和桑色素产生化学发光。不同浓度  $NaOH$  对该化学发光反应的影响试验结果表明, 其最佳浓度为  $0.5 \text{ mol/L}$ 。

**2.5 标准工作曲线和检出限** 在所选的试验条件下, 芦丁和桑色素浓度在  $1.0 \times 10^{-2} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$  和  $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$  范围内与化学发光强度呈良好的线性关系, 标准曲线为  $Y = 1.33 \times 10^4 X(\text{g/mL}) - 4.024$ ,  $r = 0.9990$ ;  $Y = 1.27 \times 10^4 X(\text{g/mL}) + 35$ ,  $r = 0.9998$ , 检出限 ( $S/N=3$ ) 为  $1.0 \times 10^{-9} \text{ g/mL}$  和  $3.4 \times 10^{-7} \text{ g/mL}$ 。对浓度为  $5.0 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$  的芦丁和桑色素溶液进行6次平行测定, 相对标准偏差(RSD) 为1.4%和2.3%。

**2.6 样品分析结果** 表1表明, 以5月份采集的桑叶中芦丁和桑色素的含量最高, 9月采集的桑叶芦丁含量最低, 而桑色素含量最低的是8月采集的桑叶。

表1 不同采集期桑叶中芦丁和桑色素的含量  $\text{ng/g}$

Table 1 The contents of rutin and morin hydrate in mulberry leaves at different collecting stages

采集期 Collecting time	芦丁 Rutin	桑色素 Morin hydrate
5月	1.65(0.78)	4.62(1.25)
6月	1.31(0.51)	1.34(1.32)
7月	0.98(0.62)	1.21(0.71)
8月	0.38(1.24)	1.01(1.14)
9月	0.29(1.23)	1.81(1.22)
10月	0.97(1.12)	2.98(0.68)

注: 括号内为 RSD 值(%) ;  $n=3$ 。

Note: RSD(%) in the parenthesis;  $n=3$ 。

**2.7 精密度和回收率** 精密性试验结果表明, 芦丁和桑色素测定的相对标准偏差(RSD) 分别为2.07%和1.29%, 表明该测定方法精密性好; 其平均回收率分别为101.23%和97.71%; 回收率测定的 RSD 分别为1.37%和2.56%, 表明回收率高。

## 3 结论

试验结果表明, 以乙醇-0.01% 醋酸铵(体积比=2:1) 为流动相, 在 Hypersil ODS 色谱柱上实现了对芦丁和桑色素的 HPLC-CL 分离测定。该法检出限低、重现性好、精密度高, 并且操作简便、快速, 可用于桑叶中芦丁和桑色素的测定。

(下转第9156页)

部着丝点的为第5、8对,其核型公式为  $K(2n) = 16 = 12m + 4sm$  (图1)。甘西鼠尾的16对染色体中具中部着丝点的为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、16对,近中部着丝点的为第15对,其核型公式为  $K(2n) = 32 = 30m + 2sm$  (图2)。

表1 丹参的核型分析

Table 1 Karyotype analysis of *Salvia miltiorrhiza* Bge.

染色体序号 Chromosome No.	绝对长度 $\mu\text{m}$ Absolute length		相对长度 $\mu\text{m}$ Relative length		臂比 Arm ratio	染色体类型 Chromosome type
	长臂+短臂=总长 Long arm+short arm=total length					
1	2.50+1.81=4.31	9.52+6.90=16.43	1.38			m
2	2.13+1.44=3.57	8.10+5.48=13.57	1.48			m
3	2.31+1.44=3.75	8.81+5.48=14.29	1.61			m
4	2.00+1.50=3.50	7.62+5.71=13.33	1.33			m
5	2.06+1.19=3.25	7.86+4.52=12.38	1.74			sm
6	1.75+1.06=2.81	6.67+4.05=10.71	1.65			m
7	1.31+1.19=2.50	5.00+4.52=9.52	1.11			m
8	1.63+0.94=2.57	6.19+3.57=9.76	1.73			sm

表2 甘西鼠尾的核型分析

Table 2 Analysis of karyotypes of *Salvia przewalskii* Maxim

染色体序号 Chromosome No.	绝对长度 $\mu\text{m}$ Absolute length		相对长度 $\mu\text{m}$ Relative length		臂比 Arm ratio	染色体类型 Chromosome type
	长臂+短臂=总长 Long arm+short arm=total length					
1	2.19+1.50=3.69	5.10+3.50=8.60	1.46			m
2	2.06+1.25=3.31	4.81+2.92=7.73	1.65			m
3	1.56+1.38=2.94	3.64+3.21=6.85	1.14			m
4	1.81+1.25=3.06	4.23+2.92=7.15	1.45			m
5	1.81+1.13=2.94	4.23+2.62=6.85	1.61			m
6	1.63+1.31=2.94	3.79+3.06=6.85	1.24			m
7	1.63+1.25=2.88	3.79+2.92=6.71	1.30			m
8	1.31+1.19=2.50	3.06+2.77=5.83	1.11			m
9	1.63+1.25=2.88	3.79+2.92=6.71	1.30			m
10	1.38+0.94=2.32	3.21+2.19=5.40	1.47			m
11	1.44+1.00=2.44	3.35+2.33=5.68	1.44			m
12	1.44+1.13=2.56	3.35+2.62=5.97	1.28			m
13	1.38+1.19=2.56	3.21+2.77=5.98	1.16			m
14	1.13+1.06=2.19	2.62+2.48=5.10	1.06			m
15	1.25+0.69=1.94	2.92+1.60=4.52	1.82			sm
16	1.06+0.69=1.75	2.48+1.60=4.08	1.55			m

2.2 染色体长度和变异 丹参的染色体总长度为26.25  $\mu\text{m}$ ,8对染色体的长度变化在2.50~4.31  $\mu\text{m}$ ,最长染色体与

最短染色体之比为1.72 1,臂比值变化范围为1.11~1.74,甘西鼠尾的染色体总长度为42.88  $\mu\text{m}$ ,16对染色体的长度变化在2.31~3.69  $\mu\text{m}$ ,最长染色体与最短染色体之比为1.60 1,臂比值变化范围为1.06~1.82。

2.3 染色体数据 由表1可知,丹参全组染色体总长度为26.25  $\mu\text{m}$ 。由表2可知,甘西鼠尾全组染色体总长度为42.88  $\mu\text{m}$ 。

### 3 结论与讨论

(1) 种子类中药无土萌发,根尖体细胞分裂时,染色质螺旋化形成染色体,染色体是细胞中最重要的遗传结构,各种生物其染色体数目及形态结构是恒定的<sup>[5]</sup>,反映了物种外在性状的内在本质。近年来,对药材的染色体的研究多有报道,利用根尖染色体鉴别茺蔚子、荆芥子、青箱子、鸡冠花子、反枝苋、牛蒡子、牵牛子的中药种子,种子类中药显微鉴定渗透应用细胞学理论方法,能反映不同物种外在性状差异的内在本质,准确鉴别真伪<sup>[6]</sup>。

(2) 该项目在对丹参、甘西鼠尾种子的根尖染色体片显微观察的发现: 根据 Levan 等的染色体分类标准。丹参的核型公式为  $K(2n) = 16 = 12m + 4sm$ 。甘西鼠尾的核型公式为  $K(2n) = 32 = 30m + 2sm$ ,有本质的区别,可以作为一个鉴别点。丹参的染色体总长度为26.25  $\mu\text{m}$ ,8对染色体的长度变化在2.50~4.31  $\mu\text{m}$ ,最长染色体与最短染色体之比为1.72 1,臂比值变化范围为1.11~1.74,甘西鼠尾的染色体总长度为42.88  $\mu\text{m}$ ,16对染色体的长度变化在2.31~3.69  $\mu\text{m}$ ,最长染色体与最短染色体之比为1.60 1,臂比值变化范围为1.06~1.82,这些亦可以作为一个鉴别点。采用冰箱4~24 h的预处理方法,染色体出现的较好而且不用化学试剂,较之文献上8-羟基 喹啉和秋水仙碱的处理方法,既降低了成本又减小了对身体的伤害。根尖细胞解离时间一定要视解离程度而定,待根尖透明为止,这一点对得到良好的分散的染色体片起很重要的作用。

### 参考文献

- [1] 李秀兰,宋文芹,安悦平,等.中国含笑属核型分析[J].植物分类学报,1998,36(2):145-149.
- [2] 景望春,许介眉,杨蕾.葱属宽叶组植物细胞分类学研究[J].植物分类学报,1999,37(1):20-34.
- [3] 中国医学科学院药物研究所.中药志第一册[M].北京:人民卫生出版社,1982:347.
- [4] LEVAN A, FREDGA K, SANDBERG A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964, 52: 201.
- [5] 杨抚华.医学细胞生物学概论[M].3版.成都:四川科学技术出版社,1996:205.
- [6] 聂凤,李连怀,董兰凤,等.利用根尖体细胞染色体鉴定种子类中药的研究[J].中国中医基础医学杂志,2002,8(4):316-318.
- [7] 李保新,刘伟,章竹君.铁氰化钾发光体系测定芦丁[J].分析化学,2001,29(4):428-430.
- [8] 孙莲,张丽静,孟磊.高效液相色谱法测定桑叶中的芦丁[J].内蒙古中医药,2004(2):27-28.
- [9] 瞿鹏,徐茂田.流动注射化学发光测定芦丁[J].商丘师范学院学报,2004,20(2):106-108.
- [10] 郑学钦,胡春.用化学发光法检测芦丁等物质清除超氧阴离子自由基的作用[J].中国药理学杂志,1997,22(3):140-142.
- [11] 李秀兰,宋文芹,安悦平,等.中国含笑属核型分析[J].植物分类学报,1998,36(2):145-149.
- [12] 景望春,许介眉,杨蕾.葱属宽叶组植物细胞分类学研究[J].植物分类学报,1999,37(1):20-34.
- [13] 中国医学科学院药物研究所.中药志第一册[M].北京:人民卫生出版社,1982:347.
- [14] LEVAN A, FREDGA K, SANDBERG A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964, 52: 201.
- [15] 杨抚华.医学细胞生物学概论[M].3版.成都:四川科学技术出版社,1996:205.
- [16] 聂凤,李连怀,董兰凤,等.利用根尖体细胞染色体鉴定种子类中药的研究[J].中国中医基础医学杂志,2002,8(4):316-318.
- [17] 李保新,刘伟,章竹君.铁氰化钾发光体系测定芦丁[J].分析化学,2001,29(4):428-430.
- [18] 孙莲,张丽静,孟磊.高效液相色谱法测定桑叶中的芦丁[J].内蒙古中医药,2004(2):27-28.
- [19] 瞿鹏,徐茂田.流动注射化学发光测定芦丁[J].商丘师范学院学报,2004,20(2):106-108.
- [20] 郑学钦,胡春.用化学发光法检测芦丁等物质清除超氧阴离子自由基的作用[J].中国药理学杂志,1997,22(3):140-142.

(上接第9129页)

### 参考文献

- [1] DOI KAYO, KOI MA TAKASHI. Effect of various fraction extracted from mulberry leaves on lipid metabolism in rabbits fed a cholesterol diet[J]. Nippon Eyo Shokuryo Gakkaishi, 1999, 52(2): 85-89.
- [2] LEE LUSEON, CHI, MYUNG HYUN. Blood glucose lowering effects of morifidum[J]. Yakhak Hechi, 1995, 39(4): 367-371.
- [3] 俞灵莺,李向荣,方晓.桑叶总黄酮对糖尿病大鼠小肠双糖酶的抑制作用[J].中华内分泌代谢杂志,2002,18(4):313-315.
- [4] 俞灵莺,李向荣,沈建根.桑叶总黄酮对体外蛋白糖基化的抑制作用