

不同产地盘龙七中熊果苷含量的分析研究

王星, 赵桦*

陕西理工学院生物科学与工程学院, 汉中 723000

摘要: 本文采用高效液相色谱法, 测定了 14 个不同产地盘龙七中熊果苷的含量。色谱条件为: 色谱柱为 Inertsil ODS-3C₁₈ (4.6 × 150 mm, 5 μm) 柱, 以甲醇: 水 (8: 92) 为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 282nm, 柱温 30 °C。熊果苷在 10.3 ~ 103.0 μg/mL 范围内呈良好的线性关系, $Y = 4468.8X - 999.10$ ($R^2 = 0.9999$), 平均加样回收率 99.58%, RSD 为 1.79% ($n = 6$)。研究表明, 盘龙七中含有较丰富的熊果苷, 其含量随产地的不同而显示出一定的差异, 其变化范围在 18.32 ~ 5.34 mg/g, 甘肃省文县产盘龙七的熊果苷含量最高 (18.32 mg/g)。本研究建立的熊果苷含量测定方法简便、准确、重复性好, 可用于该药材中熊果苷含量的测定和药材质量控制。

关键词: 盘龙七; 秦岭岩白菜; 熊果苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

Determination of Arbutin in Rhizoma *Bergeniae scopulosae* from Different Areas

WANG Xing, ZHAO Hua*

College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China

Abstract: The contents of arbutin in Rhizoma *Bergeniae Scopulosae* from different areas were determined using HPLC. The chromatographic separation was carried out using Inertsil ODS-3 C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol: water (8: 92), the detection wavelength was set at 282 nm, the temperature was 30 °C, and the flow rate was 1.0 mL/min. The calibration curve was linear in the range of 10.3-103.0 μg/mL and the regression equation for arbutin was $Y = 4468.8X - 999.1$ ($R^2 = 0.9999$), the average recovery was 99.58% with RSD of 1.79% ($n = 6$). The result showed that there are some different in the content of arbutin among different origins, the contents of arbutin were range between 18.32 mg/g to 5.34 mg/g. This method is simple, efficient and accurate, which can be used for the analysis of arbutin in Rhizoma *Bergeniae Scopulosae*.

Key words: Rhizoma *Bergeniae Scopulosae*; *Bergenia scopulosa* T. P. Wang; Arbutin; HPLC

盘龙七 (Rhizoma *Bergeniae Scopulosae*), 又名石白菜、地白菜, 为虎耳草科岩白菜属秦岭岩白菜 (*Bergenia scopulosa* T. P. Wang) 的根茎。秦岭岩白菜为多年生草本, 分布于陕西秦岭西段及甘肃东南部^[1], 为我国特有种。盘龙七是陕西民间常用药, 味涩、微苦, 性平; 具有补脾健胃, 除湿活血, 清热败毒, 收涩固肠之功效。主治急慢性肠胃炎、痢疾、浮肿、淋症、白带、崩漏、黄水疮、秃疮、疥癣等^[2]。

熊果苷 (Arbutin, 对-羟基苯-β-D-吡喃葡萄糖苷), 是源于绿色植物的天然活性物质, 又名熊果甙、熊果素、熊果叶甙、熊果酚甙或杨梅甙。熊果苷源于杜鹃花科熊果属的多年生常绿小灌木植物——

熊果的叶子细胞里的皮肤脱色成份, 具有杀菌、抑制胰岛素降解、镇咳、抗氧化等多种药理作用。熊果苷能有效地抑制皮肤中的生物酪氨酸酶 (Tyrosinase) 活性, 阻断黑色素的形成, 通过自身与酪氨酸酶直接结合, 加速黑色素的分解与排泄, 从而减少皮肤色素沉积, 祛除色斑和雀斑, 自 20 世纪 90 年代以来, 熊果苷成为市场最流行的化妆品美白剂, 在高档美白化妆品领域有广泛的应用^[3,4]。

近年来, 人们对多种植物中所含熊果苷成分进行了分析研究^[5-12], 发现在岩白菜属植物中含有熊果苷成分^[8-12], 但有关岩白菜属植物中熊果苷含量的分析报道较少, 迄今为止, 对秦岭岩白菜 (盘龙七) 中熊果苷成分的分析研究尚未见报道^[10-12]。作者对不同产地盘龙七药材中熊果苷的含量进行了分析研究, 旨在了解盘龙七药材中熊果苷成分含量高的变化情况, 为秦岭岩白菜资源的开发利用提供理

收稿日期: 2014-07-28 接受日期: 2014-10-29

基金项目: 陕西省教育厅重点实验室项目 (14JS017); 陕西理工学院研究生创新基金 (SLGYCX1312)

* 通讯作者 E-mail: zhaohuahz@126.com

论依据。

1 材料与仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪(包括四元泵,真空脱气机,自动进样器,柱温箱,2489 紫外检测器),Empower 色谱工作站;UV-2550 紫外分光光度计 日本岛津;AB204-S 电子分析天平 瑞士 Mettler Toledo 公司;KQ-300DE 型数控超声波清洗机 昆山市超声仪器有限公司,UPH-II-20T 优普超纯水机 成都优普净化科技有限公司。

14 个不同产地实验用药材分别购自陕西汉中 等盘龙七产地药材市场,经陕西理工学院植物学教授赵桦鉴定为秦岭岩白菜干燥根茎,即盘龙七药材。

熊果苷对照品购自上海雅吉生物科技有限公司,批号(MUST-13020210)。流动相用甲醇为色谱纯,样品制备用甲醇为分析纯,水为自制超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Inertsil ODS-3C₁₈ (4.6 × 150 mm, 5 μm) 柱,以甲醇-水(8:92)为流动相,流速 1.0 mL/min,检测波长 282 nm,柱温 30 °C。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取熊果苷对照品 10.3 mg,用无水甲醇定容至 100 mL 棕色容量瓶中,配制成母液为 103 μg/mL 的对照品溶液。放于 4 °C 冰箱中,备用。

2.3 供试品溶液的制备

取盘龙七药材,在 50 °C 条件下烘干,粉碎过 60 目筛。称取约 1.0 g,精密称定,置于具塞 100 mL 锥形瓶中,加 50 mL 的无水甲醇,在超声功率为 240 W,超声频率为 40 KHz,温度为 60 °C 条件下,超声提取 30 min/次(超声前浸泡 30 min),超声提取两次,过滤两次,将两次的滤液用无水甲醇定容至 100 mL 容量瓶中,进样前用 0.45 μm 的滤膜再过滤。

2.4 系统适用性试验

用对照品及供试品溶液进样,每次进样 10 μL,在 2.1 项色谱条件下测定。熊果苷色谱峰与相邻组分达到基线分离,理论塔板数以熊果苷计不低于 1246.5。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系的考察

准确量取熊果苷标准品母液 1、2、4、6、8 mL,分别用无水甲醇定容至 10 mL 的棕色容量瓶中,配制

成浓度分别为 10.3、20.6、41.2、61.8、82.4 μg/mL 的熊果苷标准品溶液,加上熊果苷标准品母液(103.0 μg/mL)共六种不同浓度的溶液分别进样,每个浓度分别进样三次,每次进样 10 μL,进样前用 0.45 μm 的滤膜过滤,测定峰面积。以熊果苷标准品溶液浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线得熊果苷的回归方程为 $Y = 4468.8X - 999.1$ ($R^2 = 0.9999$),在 10.3 ~ 103.0 μg/mL 范围内呈现良好的线性关系,见图 1,标准品色谱图见图 2。

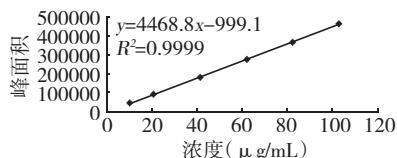


图 1 熊果苷标准曲线

Fig. 1 The calibration curve of arbutin standards

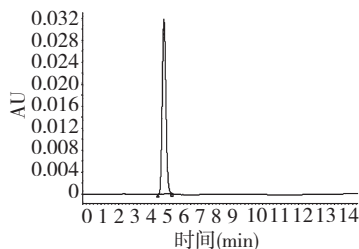


图 2 熊果苷对照品 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of standard of arbutin

2.5.2 精密度试验

用熊果苷对照品溶液重复进样 6 次,每次进样 10 μL,其峰面积分别为 465744、463502、464886、466208、465048、467094,峰面积 RSD 为 0.27%。

2.5.3 重复性试验

称取盘龙七样品 5 份,每份约 1.0 g,均精密称定。按照 2.3 项下方法制备供试液,按照 2.1 项下方法测定,每份进样 3 次,每次进样 10 μL。5 份样品中熊果苷的平均峰面积分别为:371413、364611、366758、366375、373497,RSD 为 1.02%。说明本文方法有较好的重现性。

2.5.4 稳定性试验

用某一份盘龙七样品制备供试液,供试液分别于提取后 0、2、4、8、12、24 h 进样。其峰面积分别为 334908、338650、339392、335421、333892、332987,熊果苷峰面积 RSD 为 0.77%。说明盘龙七中熊果苷供试液在 24 h 内稳定。

2.5.5 加样回收试验

精密称取盘龙七样品 6 份,各约 0.5 g。向 6 份样品中分别加入 2.480 mg 熊果苷对照品,按本文方法制备供试液和测定熊果苷含量,并计算回收率。结果见表 1。

2.6 不同产地盘龙七样品中熊果苷含量测定

称取 14 个不同产地盘龙七样品,每个产地样品各 5 份,每份约 1.0 g,均精密称定。按照 2.3 项下方法制备供试液,按照 2.1 项下方法测定,每份进样 3 次,每次进样 10 μ L。样品含量测定色谱图见图 3,

其熊果苷含量和 RSD 如表 2 所示。

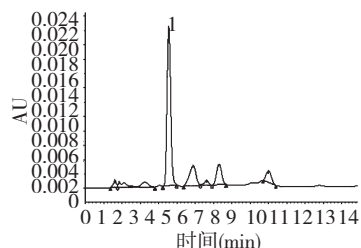


图 3 盘龙七药材供试液中熊果苷 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of arbutin of tested sample

表 1 熊果苷加样回收率实验 ($n=6$)

Table 1 Spiked recovery of arbutin ($n=6$)

样品序号 No.	取样量 Sample amount (g)	样品中含量 Original content of arbutin in sample (mg)	加入标品量 Added amount (mg)	测得量 Total amount (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
1	0.4998	4.131	2.480	6.511	98.48		
2	0.4995	4.128	2.480	6.675	101.01		
3	0.5002	4.134	2.480	6.630	100.23		
4	0.5005	4.137	2.480	6.545	98.91	99.58	1.79
5	0.5007	4.138	2.480	6.419	97.00		
6	0.5011	4.142	2.480	6.743	101.83		

表 2 不同产地盘龙七中熊果苷含量 ($n=5$)

Table 2 The content of arbutin in *Bergenia scopulosa* ($n=5$)

产地来源 Sources	含量 Content (mg/g)	RSD (%)	产地来源 Sources	含量 Content (mg/g)	RSD (%)	产地来源 Sources	含量 Content (mg/g)	RSD (%)
文县	18.32	1.89	宕昌县	17.36	1.83	礼县	14.53	1.78
青川县	12.41	1.68	九寨沟县	9.62	1.75	太白县	16.20	1.79
眉县	15.38	1.76	凤县	13.67	1.81	户县	8.94	1.49
洋县	10.79	1.72	留坝县	8.27	1.04	勉县	6.43	1.51
洛南县	7.09	1.56	镇安县	5.34	1.47			

由表 2 可知,14 个不同产地盘龙七中熊果苷的含量有一定差异,其变化范围为 18.32 mg/g ~ 5.34 mg/g。相比之下,甘肃省文县产盘龙七中熊果苷含量最高(18.32 mg/g),陕西镇安县产盘龙七中熊果苷含量最低(5.34 mg/g)。

3 讨论

3.1 不同产地盘龙七中熊果苷含量的比较

在本实验中所测定的 14 个不同产地盘龙七中熊果苷的含量差异较大,其变化范围为 18.32 ~

5.34 mg/g。相比之下,甘肃省文县产盘龙七中熊果苷含量最高(18.32 mg/g),陕西镇安县产盘龙七中熊果苷含量最低(5.34 mg/g)。

据现有文献报道,岩白菜属植物所含熊果苷在地上部分叶片中的含量较高,根及根状茎中的含量较低^[10-12]。同时,不同种类根及根状茎中熊果苷的含量也有较大的差别,岩白菜含量为 0.74%^[10],厚叶岩白菜为 3.06%^[10],滇产岩白菜的含量在 1.72% ~ 0.40% 之间^[11]。本研究所用实验材料盘龙七为秦岭岩白菜根状茎,熊果苷含量在 1.832% ~

0.534%之间。其中含量在1.0%以上的有8个产地,含量在1.0%~0.5%之间的有6个产地。研究表明,盘龙七药材中熊果苷成分比较丰富,同时也发现,不同产地盘龙七药材中其熊果苷的含量也存在一定的变化。这种变化可能与药材原植物生长环境有一定的关系,也可能与生长时间和药材采收时间有关,具体原因有待进一步观察研究。

3.2 流动相比例的选择

文献报道中,HPLC法检测熊果苷含量时所用的流动相甲醇-水的比例有所不同,多数文献中为20:80^[5,10]和15:85^[5,11,12],也有6:94^[6]的报道。本实验比较过不同比例甲醇-水混合的流动相(25:75、22:78、20:80、15:85、13:87、11:89、9:91、8:92),当流动相比例为8:92时,其出峰状况和出峰时间相对于其它流动相比例为最佳,故选择8:92(甲醇-水)为该实验的流动相比例。本研究建立的盘龙七药材中熊果苷含量测定方法简便、准确、重复性好,可用于该药材中熊果苷含量的测定和药材质量控制。

参考文献

- 1 The editorial board of Flora of China of Chinese Academy of Sciences (中国科学院中国植物志编委会). *Flora of China* (中国植物志). Beijing: Science Press, 1992. Vol. 34 (2), 27.
- 2 Nanjing University of Chinese Medicine (南京中医药大学主编). *A Dictionary of Traditional Chinese Medicine* (中药大辞典). Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2006. 3048
- 3 Fang J (房军), Du SJ (杜顺晶). Research progress on the application of arbutin in Cosmetics. *J Hyg Res* (卫生研究), 2009, 38: 111-113.

- 4 Su H (苏华), Qiao LY (乔立业), Neng J (冷静) *et al.* Determination of arbutin in fukang freckle -removing gel by HPLC. *Anhui Med Pha J* (安徽医药), 2013, 17: 397-398.
- 5 Zhang (张海丰), Sun J (孙健), Teng K (滕坤). Determination of arbutin in sedum purpureum by HPLC. *Chinese J Pha* (中国药物警戒), 2011, 8: 321-323.
- 6 Li Y (李媛), Qiao JC (乔进春), Zhang YX (张玉星) *et al.* Quantification of arbutin from Pear Blossoms by HPLC. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 76-78, 83.
- 7 Wang XY (王鑫宇), Huo YX (郝银霞), Zhang J (张军). Determination of arbutin in *Sedum Purpureum* by HPLC. *Adv Mea Lab Man* (现代测量与实验室管理), 2012, 6: 20-21, 61.
- 8 Lv XM (吕修梅), Wang JX (王军宪). Studies on the chemical constituents of *Bergenia scopulosa* T. P. Wang (I). *J Chin Med Mat* (中药材), 2003, 26: 791-792.
- 9 Chui Y (崔莹). Chemical constituents from *Bergenia scopulosa* (I). *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2011, 33: 1546-1549.
- 10 Sun XG (孙欣光), Huang WH (黄文华), Ma M (马森) *et al.* Comparative studies on content of arbutin, bergenin and catechin in different part of *Bergenia purpurascens* and *B. crassifolia*. *China J Chinese Mat Med* (中国中药杂志), 2010, 35: 2079 -2082.
- 11 Jiang HJ (姜洪君), Guo FG (郭凤根), Zhang LM (张丽梅), *et al.* Comparison of arbutin contents from *Bergenia purpurascens* in Yunnan. *China J Chinese Mat Med* (中国中药杂志), 2010, 35: 1812 -1814.
- 12 Liu M (刘敏), Wang XJ (王晓军), Liu LH (刘力厚) *et al.* Determination of arbutin in tissue cultured regeneration seedlings of *Bergenia crassifolia*. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2013, 35: 800-803.