

UPLC 测定桂皮中原花青素 B-2 和原花青素 C-1 含量

徐冬冬¹, 吴喜民¹, 芦慧琴¹, 洪婷¹, 武耿媛¹, 王钊², 贾琦^{1*}, 李医明¹

(1. 上海中医药大学 中药学院, 上海 201203; 2. 河南省南阳市口腔医院, 河南 南阳 473000)

[摘要] 目的:建立 UPLC 同时测定桂皮中 2 个指标成分原花青素 B-2 和原花青素 C-1 含量的方法,并对收集的 17 批次桂皮样品进行含量测定。方法:采用资生堂 capcell pak C₁₈ 色谱柱(2.0 mm × 100 mm, 2 μm),流动相乙腈(A)-0.2% 乙酸水(B)梯度洗脱(0 ~ 8 min, 11% ~ 20% A; 8 ~ 10 min, 20% ~ 25% A; 10 ~ 12 min, 25% ~ 75% A; 12 ~ 13 min, 75% A),检测器波长 280 nm,流速 0.35 mL·min⁻¹,柱温 25 °C。结果:2 种指标成分均有较宽的线性范围和良好的线性关系。市售 17 种桂皮样品中的指标成分和用紫外-可见分光光度法测定的总多酚含量呈现一定程度的正相关。结论:该方法简单方便,准确灵敏,重复性好,可评价桂皮样品中水溶性低聚原花青素的含量。

[关键词] 桂皮多酚; 超高效液相色谱; 原花青素 B-2; 原花青素 C-1; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)23-0040-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230040

Determination of Procyanidin B-2 and Procyanidin C-1 in *Cinnamomum* with UPLC

XU Dong-dong¹, WU Xi-ming¹, LU Hui-qing¹, HONG Ting¹, WU Geng-yuan¹, WANG Zhao², JIA Qi^{1*}, LI Yi-ming¹

(1. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Nanyang Dental Hospital, Nanyang 473000, China)

[Abstract] **Objective:** To established an UPLC method for simultaneously determination of two indicative components of *Cinnamomum* (Lauraceae), namely procyanidin B-2 and procyanidin C-1, and to complete the determination of 17 batches of cinnamon bark samples by the established method. **Method:** The UPLC analysis was performed on an shiseido capcell pak C₁₈ column (2.0 mm × 100 mm, 2 μm) with acetonitrile (A) -0.2% acetic acid solution (B) as mobile phase for gradient elution (0-8 min, 11% -20% A; 8-10 min, 20% -25% A; 10-12 min, 25% -75% A; 12-13 min, 75% A). The detection wavelength was set at 280 nm. The flow rate was 0.35 mL · min⁻¹. The column temperature was set at 25 °C. **Result:** Two indicative components showed a wide linear range and a good linear relationship. The content of the two components by UPLC is moderately correlated with the content of total polyphenol by Ultraviolet-visible Spectrophotometry in the 17 batches of cinnamon bark samples from market. **Conclusion:** The established method is simple, accurate and reproducible, and can be applied to determine the content of water-soluble oligomers procyanidin in cinnamon bark.

[Key words] cinnamonpolyphenol; UPLC; procyanidin B-2; procyanidin C-1; determination

桂皮为樟科植物天竺桂、阴香、大叶清化桂、锡兰桂、肉桂或柴桂等树皮的通称,原植物比较复杂,约有数十种。肉桂是我国传统的中药材,也是食品的香料或烹饪调料。从 1985 年版《中国药典》开始

[收稿日期] 20141005(005)

[基金项目] 上海市自然科学基金项目(15ZR1441200);上海市教委预算内项目(2013JW09);上海中医药大学第五批大学生创新活动项目(201210268044)

[第一作者] 徐冬冬,在读硕士,从事中药学研究,Tel:021-68295727,E-mail:1013641487@qq.com

[通讯作者] *贾琦,副教授,硕士生导师,从事中药活性成分和结构修饰研究,Tel:021-51322207,E-mail:q_jia@126.com

为收载品种,并用桂皮醛为检测指标。肉桂具有补元阳、暖脾胃、除积冷、通脉止痛和止泻的功效。主要含有挥发油、多糖、倍半萜及其糖苷、二萜及其糖苷和黄烷醇及其多聚体等多种类型的化学成分^[1]。药理实验表明,桂皮小极性部位具有抗菌、抗炎、杀虫和抗肿瘤活性^[2];其水溶性部位具有内分泌系统、免疫系统、心血管系统以及中枢神经系统和消化系统明显的药理作用^[3-5]。

近年来,除了个别的研究外^[6],大量的研究均表明桂皮水溶性成分——低聚原花青素(procyanidolic oligomer,黄烷醇的低聚体)具有显著的降血糖作用^[7-8],我们前期的工作也证明了这一点^[9-11]。但到目前为止,低聚原花青素成分的含量测定方法一直采用紫外-可见分光光度法(福林酚法),该法测定的是总多酚含量,不能完全反应样品中低聚原花青素的情况,所以建立简单有效的方法测定低聚原花青素成分的含量十分必要。

本文选用桂皮中 2 个主要低聚原花青素单体成分原花青素 B-2(procyanidin B-2, PB-2)和原花青素 C-1(procyanidin C-1, PC-1)为指标成分,建立 UPLC 含量测定方法,并用该法对收集的 17 批次桂皮样品进行指标成分的含量测定,与紫外-可见分光光度法测定的总多酚含量进行比较,为客观评价桂皮提取物的质量提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂 UV765 型紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),H-class 型高效液相色谱仪(美国 waters),BT125D 型 1/10 万电子天平(塞利多斯科学仪器北京有限公司),AL104 型 1/1 万电子天平(梅特勒托利多仪器上海有限公司)。

没食子酸对照品购于上海中药标准化研究中心(纯度 >98%);福林酚试剂(BR),碳酸钠(AR),甲醇(AR),乙醇(AR),丙酮(AR)等购于上海国药集团化学试剂公司;乙腈色谱级;PB-2,PC-1 对照品为实验室自制,经 HPLC 检测,纯度均 >98%。

1.2 药材 收集了 17 批市场销售的桂皮药材,经复旦大学顾关云教授、广州中医药大学张丹雁教授和上海中医药大学李医明教授鉴定,结果见表 1。样品目前均存放于上海中医药大学中药学院中药化学教研室标本间。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取 PB-2 和 PC-1 对照品 10.01,10.00 mg,分别置 20 mL 的量瓶中,加 70% 乙醇溶解定容,取该溶液适量配制成

表 1 桂皮药材来源

Table 1 Resources of medical herbs

编号	样品名称	拉丁名	收集地
2010112201	肉桂	<i>Cinnamomun cassia</i>	云南
2012112704	肉桂	<i>C. cassia</i>	广东
2012112705	肉桂	<i>C. cassia</i>	广西
2013032101	肉桂	<i>C. cassia</i>	云南昆明
2013041004	肉桂	<i>C. cassia</i>	河北安国
2012112703	肉桂	<i>C. cassia</i>	广东
2013010502	肉桂	<i>C. cassia</i>	越南
2013010503	肉桂	<i>C. cassia</i>	广西
2013010504	肉桂	<i>C. cassia</i>	越南
2012112701	大叶清化桂	<i>C. cassia</i>	广东
2010112202	大叶清化桂	<i>C. cassia</i>	云南
2012112601	大叶清化桂	<i>C. cassia</i>	四川成都
2013041003	官桂(川桂)	<i>C. wilsonii</i>	云南昆明
2013041001	柴桂	<i>C. tamala</i>	云南昆明
2013010501	天竺桂	<i>C. japonicum</i>	浙江
2012112702	香桂	<i>C. subavenium</i>	广东
2013010505	钝叶桂	<i>C. bejolghota</i>	广西

0.004 0,0.020,0.050,0.10,0.25,0.50 g·L⁻¹ 系列溶液,备用。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取干燥大叶清化桂(编号 2012112701)样品粉末(四号筛)约 1 g,精密加入 70% 乙醇 25 mL 后称重。于 30 ℃ 下加热搅拌 30 min 再次称重,并用 70% 乙醇补足损失的质量,过滤后备用。

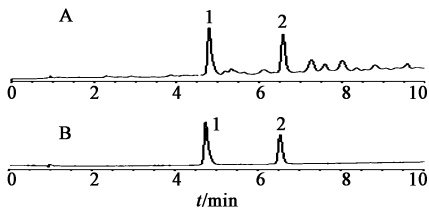
2.3 总多酚含量测定^[12] 参照《中国药典》鞣质含量测定方法,以吸光度 A 为纵坐标,浓度为横坐标(C)作图得到标准曲线 A = 12.0C - 0.300 (r = 0.999 8),线性范围 0.828 ~ 8.28 mg·L⁻¹。

按 2.2 项下方法分别制备 17 批次供试品溶液,取 5 mL(× 2 份)置 100 mL 量瓶中定容,取 1 mL 用制作标准曲线的方法进行样品总多酚含量测定。

2.4 UPLC 方法的建立

2.4.1 色谱条件及系统适用性试验 采用资生堂 Capcell pak C₁₈ 色谱柱(2.0 mm × 100 mm,2 μm),检测波长 280 nm,柱温 25 ℃,流动相乙腈(A)-0.2% 乙酸水(B)梯度洗脱(0 ~ 8 min,11% ~ 20% A; 8 ~ 10 min,20% ~ 25% A; 10 ~ 12 min,25% ~ 75% A; 12 ~ 13 min,75% A),流速 0.35 mL·min⁻¹。见图 1。结果表明,各色谱峰分离度良好。

2.4.2 线性关系考察 分别精密吸取 2.1 项下不



1. 原花青素 B-2 (PB-2); 2. 原花青素 C-1 (PC-1); A. 供试品; B. 对照品

图 1 桂皮的 UPLC

Fig. 1 UPLC chromatogram of sample

同质量浓度的对照品溶液各 5 μL , 按 2.4.1 项下色谱条件进样分析。以峰面积 Y 对进样量 X 作图, 得回归方程 $Y_{\text{PB-2}} = 1\ 886.8X - 176\ 87 (r = 0.999\ 9)$; $Y_{\text{PC-1}} = 1\ 754.4X - 15\ 548 (r = 0.999\ 9)$ 。他们均在 0.02 ~ 2.5 μg 线性关系良好。

2.4.3 检测限和限定限 PB-2 检测限 0.51 ng, 定量限 2.05 ng; PC-1 检测限 0.44 ng, 定量限 1.74 ng。

2.4.4 精密度试验 取 PB-2 和 PC-1 对照品溶液 (0.050 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 按照 2.4.1 项下色谱条件连续进样 6 次。结果 PB-2 和 PC-1 峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 0.8%, 表明仪器精密度良好。

2.4.5 重复性试验 精密称取同一批次的桂皮样品 6 份, 用 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.4.1 项下色谱条件进样分析。结果 PB-2 和 PC-1 含量的 RSD 分别为 1.0%, 1.4%, 表明方法重复性良好。

2.4.6 稳定性试验 按 2.2 项下方法制备桂皮样品, 于 0, 2, 4, 8, 12, 16 h 分别进样分析。结果表明样品在 16 h 内稳定, PB-2 和 PC-1 的 RSD 分别为 2.7%, 2.0%。

2.4.7 加样回收试验 精密称取桂皮药材约 0.5 g 共 9 份, 分为高、中、低 3 组, 分别加入含量 50%, 100%, 150% 的对照品溶液, 结果见表 2。

2.5 样品测定 用 2.3 项下的条件测定总多酚吸光度, 按 2.4.1 项下的色谱条件测定峰面积, 计算总多酚和 PB-2, PC-1 的质量分数, 结果见表 3。

3 讨论

3.1 样品的最佳制备工艺选择 采用大叶清化桂 (编号 2012112701) 样品约 1 g, 用总多酚提取率为指标, 在进行单因素 (提取方法、提取温度、提取次数、提取时间、提取溶剂和料液比) 考察的基础上, 选用 4 因素 (提取温度、料液比、提取时间和乙醇浓度) 3 水平进行了样品提取工艺多因素考察, 最终确定最佳提取工艺为 70% 乙醇、按料液比 1:25, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌提取 30 min。

表 2 PB-2 和 PC-1 加样回收率

Table 2 Sample recovery rate of PB-2 and PC-1

	称样量 /g	样品 中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
PB-2	0.500 4	1.16	0.63	1.78	98.41	104.02	2.4
	0.500 5	1.16	0.63	1.81	103.17		
	0.498 7	1.16	0.63	1.82	104.76		
	0.499 4	1.16	1.25	2.45	103.20		
	0.500 2	1.16	1.25	2.48	105.60		
	0.500 8	1.16	1.25	2.50	107.20		
	0.499 4	1.16	1.88	3.12	104.26		
	0.500 6	1.16	1.88	3.12	104.26		
	0.500 8	1.16	1.88	3.14	105.32		
	PC-1	0.500 4	1.05	0.49	1.53	97.96	101.17
0.500 5		1.05	0.49	1.53	97.96		
0.498 7		1.04	0.49	1.53	100.00		
0.499 4		1.04	0.98	2.05	103.06		
0.500 2		1.05	0.98	2.08	105.10		
0.500 8		1.05	0.98	2.08	105.10		
0.499 4		1.04	1.48	2.53	100.68		
0.500 6		1.05	1.48	2.53	100.00		
0.500 8		1.05	1.48	2.54	100.68		

3.2 UPLC 色谱的流动相选择 预实验时发现, 用资生堂 Capcell pak C_{18} 色谱柱 (2.0 mm \times 100 mm, 2 μm), 流动相乙腈-水体系在展开低聚原花青素时峰形会出现不对称, 水相中加入乙酸至含量达 0.2% 时峰形明显改善, 这与低聚原花青素结构上含有酚羟基吻合。该色谱柱用甲醇-水体系分离时会出现出峰较晚、峰形较宽及拖尾严重等现象, 即使加酸仍然不理想的情况, 因此甲醇-水体系不宜作为该条件下分离低聚原花青素的流动相, 综合考虑后选用乙腈 (A)-0.2% 乙酸水 (B) 作流动相体系梯度洗脱。

3.3 含量测定方法比较 采用文中建立的 UPLC 测定方法对 17 批次的桂皮药材中 2 个指标成分同时进行含量测定, 并与紫外-可见测得的总多酚含量进行比较 (表 3) 可以看出, 17 批桂皮中均含有这 2 个指标成分; 同一样品中总多酚含量与低聚原花青素 (PB-2 和 PC-1) 含量呈现一定程度的正相关, 即总多酚含量高的样品 PB-2 和 PC-1 的含量也较高, 但总多酚含量最高的样品 PB-2 和 PC-1 的含量不一定最高。从指标成分合计看, 编号为 2013041001 的云

表 3 样品中指标成分和总多酚质量分数 (n=2)

Table 3 Content of indicative components and total polyphenol in sample (n=2) %

编号	PB-2	PC-1	指标成分 合计	总多酚
2010112201	0.049	0.054	0.10	3.53
2012112704	0.187	0.166	0.35	4.93
2012112705	0.169	0.144	0.31	4.81
2013032101	0.173	0.147	0.32	4.58
2013041004	0.095	0.088	0.18	3.18
2012112703	0.288	0.234	0.52	4.60
2013010502	0.104	0.095	0.20	3.88
2013010503	0.054	0.051	0.11	2.57
2013010504	0.050	0.047	0.10	3.08
2012112701	0.230	0.209	0.44	6.82
2010112202	0.209	0.204	0.41	5.03
2012112601	0.176	0.200	0.38	4.74
2013041003	0.050	0.058	0.11	2.60
2013041001	0.287	0.328	0.62	4.85
2013010501	0.183	0.153	0.34	4.94
2012112702	0.191	0.189	0.38	4.79
2013010505	0.289	0.307	0.60	5.67

南产柴桂质量分数最高达 0.62%，而编号为 2010112201 的云南产肉桂、编号为 2013010503 的广西产肉桂、编号为 2013010504 的越南产肉桂及编号为 2013041003 的云南产昆明官桂(川桂)质量分数均较低,仅为 0.10% 左右。从总多酚含量看编号为 2012112701 的广东产大叶清化桂质量分数最高达到 6.82%，编号 2013010503 广西产肉桂和编号为 2013041003 云南昆明产官桂(川桂)质量分数最低,分别为 2.57% 和 2.60%。

对 17 批次桂皮药材含量测试结果表明,不同样品间多酚含量存在明显差异(指标成分合计相差 6 倍,总多酚含量相差 1 倍),这可能与样品的品种、生长环境以及生长年限等因素有关。要比较出不同桂皮品种中指标成分含量的差别,需要我们后期收集更多的样品,进行更深入系统的研究。

[参考文献]

[1] 刘江云,杨世林,徐丽珍.樟属植物的化学和药理

研究概况[J].国际中医中药杂志,2001,23(1):7-12.

[2] 张荣发.桂皮醛的药理作用研究进展[J].中国药业,2008,17(10):75-76.

[3] 张明发,沈雅琴.肉桂的药理作用及温里功效[J].陕西中医,1995,16(1):39-43.

[4] Lee H S, Kim B S, Kim M K. Suppression effect of *Cinnamomum cassia* bark-derived component on nitric oxide synthase[J]. J Agr Food Chem, 2002, 50 (26): 7700-7703.

[5] Eugen J, Verspohl J, Katrin Bauer, et al. Antidiabetic effect of *Cinnamomum cassia* and *Cinnamomum zeylanicum* in vivo and in vitro[J]. Phytother Res, 2005, 19 (3):203-206.

[6] Kristof V, Thomassen B J W, Senden J M, et al. Cinnamon supplementation does not improve glycemic control in postmenopausal type 2 diabetes patients[J]. J Nutr, 2006, 136 (4):977-980.

[7] Joanna H, Gassan D, Ola B, et al. Effect of cinnamon on postprandial blood glucose, gastric emptying, and satiety in healthy subjects[J]. Am J Clin Nutr, 2007, 85 (6):1552-1556.

[8] Kim S H, Hyun S H, Choung S Y. Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice[J]. J Ethnopharma Col, 2006,104 (1/2):119-123.

[9] Jia Q, Liu X, Wu X, et al. Hypoglycemic activity of a polyphenolic oligomer-rich extract of *Cinnamomum parthenoxylon* bark in normal and streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Phytomedicine, 2009, 16 (8): 744-750.

[10] Lu Z L, Jia Q, Wang R, et al. Hypoglycemic activity of A-type and B-type procyanidin oligomer-rich extracts from different *Cinnamon* barks [J]. Phytomedicine, 2011, 18 (4):298-302.

[11] Chen L, Sun P, Wang T, et al. Diverse mechanisms of antidiabetic effects of the different procyanidin oligomer types of two different cinnamon species on db/db mice [J]. J Agr Food Chem, 2012, 60 (36):9144-9150.

[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录 62.

[责任编辑 顾雪竹]