

桑不同药用部位中黄酮类成分的定量检测

杨晶*,刘嘉琪,王宝昌,史丽颖,唐玲,王永奇[#](大连大学药物研究所,辽宁大连 116622)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)27-2550-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.27.18

摘要 目的:测定桑叶、桑椹、桑枝、桑白皮中总黄酮的含量。方法:以桑辛素为对照品,采用分光光度法测定桑叶、桑椹、桑枝、桑白皮95%乙醇提取物及乙醇提取后水提取物中总黄酮的含量。结果:桑辛素的质量浓度在0.025~0.050 mg/ml范围内与吸光度呈良好的线性关系($r=0.9998$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD $<1\%$ 。桑叶、桑椹、桑枝、桑白皮95%乙醇提取物中总黄酮的质量分数分别为13.60%、7.19%、10.53%、18.38%,乙醇提取后水提取物中总黄酮的质量分数分别为0.26%、0.60%、0.40%、0.01%。结论:桑白皮中黄酮类成分质量分数最高,有效部分为乙醇提取物。

关键词 桑;不同部位;总黄酮;含量测定;桑辛素;桑白皮

Quantitative Analysis of Flavonoids in Different Medicinal Parts of *Morus alba*

YANG Jing, LIU Jia-qi, WANG Bao-chang, SHI Li-ying, TANG Ling, WANG Yong-qi (Institute of Materia Medica, Dalian University, Liaoning Dalian 116622, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine the contents of total flavonoids in leaves, fruit, branch and root bark of *Morus alba*. METHODS: With moracin as substance control, the contents of total flavonoids in 95% ethanol extract, water extract after ethanol extraction from the leaves, fruit, branch and root bark of *M. alba* were measured by spectrophotometry. RESULTS: The linear range of moracin were 0.025-0.050 mg/ml ($r=0.9998$). RSD of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1%. The mass fraction of total flavonoids in 95% ethanol extract from the leaves, fruit, branch and root bark of *M. alba* were 13.60%, 7.19%, 10.53% and 18.38%. The mass fraction of total flavonoids in water extract after ethanol extraction from the leaves, fruit, branch and root bark of *M. alba* were 0.26%, 0.60%, 0.40% and 0.01%. CONCLUSIONS: The content of total flavonoids in root bark of *M. alba* is the highest, ethanol extract of it is effective.

KEYWORDS *Morus alba*; Different parts; Total flavonoids; Content determination; Moracin; Root bark of *M. alba*

桑 *Morus alba* L.系桑科植物,其药用可追溯到《神农本草经》,为历代本草及历版《中国药典》所收载^[1-3]。桑的药用部位为叶、果实、枝条和根皮,分别称为桑叶、桑椹、桑枝、桑白皮。近年来,对桑药理及应用的报道渐多^[4]。桑的药用部位及提取物有降血糖、降血脂、降血压、抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抑菌及抑制心脑血管疾病等作用,其主要有效成分为黄酮、生物碱、呋喃及香豆素。其中,黄酮类成分具有显著的降血压作用^[4]。到目前为止,尚未见有关黄酮类成分在这四大药用部位中分布

的报道。本研究以桑辛素(桑根素, Morusin)为对照品,采用分光光度法测定桑叶、桑椹、桑枝、桑白皮95%乙醇提取物及乙醇提取后水提取物中总黄酮的含量,以期为更好地开发利用桑的不同药用部位提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

Unico7200可见分光光度计、UV-2102C型紫外-可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司];Laborata 4000型旋转蒸

(27):2532.

- [4] 陈新玉,李健和,黎银波,等.地榆、地榆片、地榆炭的质量标准研究[J].中国医药导报,2011,8(17):64.
- [5] 曹爱民,张东方,沙明,等.地榆中皂苷类化合物分离、鉴定及其含量测定[J].中草药,2003,34(5):397.
- [6] 程东亮,曹小平,邹佩秀,等.中药地榆黄酮等成分的分离与鉴定[J].中草药,1995,26(11):570.

- [7] 于蓓蓓,钟方晓,董学.地榆化学成分研究进展[J].中国中医药信息杂志,2009,16(S1):103.
- [8] 竺叶青,施大文,李自力,等.中药地榆的药源调查及商品鉴定[J].上海医科大学学报,1995,22(1):62.
- [9] 谢培山.中药色谱指纹图谱鉴别的概念、属性、技术与应用[J].中国中药杂志,2001,26(10):653.
- [10] 沙明,张东方,孟宪生,等.DNA指纹谱与HPLC指纹谱对中药地榆质量评价研究[J].中国药学杂志,2002,37(11):15.

* 硕士研究生。研究方向:天然活性物质。电话:0411-87403834。E-mail: dldxyjing@126.com

[#]通信作者:教授,博士。研究方向:天然活性物质。电话:0411-87403834。E-mail: dalianwyq@163.com

(收稿日期:2013-07-25 修回日期:2013-09-22)

发仪(德国Heidolph公司);BP210S十万分之一电子天平(德国Sartorius公司)。

1.2 试剂

桑辛素对照品(成都曼思特生物科技有限公司,纯度:98%);所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 药材

桑叶、桑椹、桑枝、桑白皮均购自安徽省本草国药饮片有限公司,均经笔者鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 提取物的制备

分别称取桑叶、桑椹、桑枝、桑白皮1.0、1.6、2.0、3.0 kg,加入95%乙醇回流提取3次,每次3 h,合并提取液,减压浓缩,干燥后所得桑叶、桑椹、桑枝、桑白皮95%乙醇提取物分别为227、600、95、177 g。

将桑叶、桑椹、桑枝、桑白皮乙醇提取后的残渣用蒸馏水回流提取3次,每次3 h,合并提取液,减压浓缩,干燥后称得桑叶、桑椹、桑枝、桑白皮乙醇提取后水提取物分别为149、317、64、90 g。

2.2 总黄酮的含量测定^[5-9]

2.2.1 对照品溶液的制备 精确称取干燥至恒质量的桑辛素对照品5 mg,置50 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为0.1 mg/ml的对照品溶液,备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 分别精确称取桑叶、桑椹、桑枝、桑白皮95%乙醇提取物的干浸膏0.50、0.55、0.54、0.54 g及乙醇提取后水提取物的干浸膏1.03、0.50、0.53、1.13 g,置50 ml棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度分别为10.00、11.00、10.80、10.80 mg/ml和20.70、10.00、10.60、22.60 mg/ml的供试品溶液,备用。

2.2.3 测定波长的选择 取桑辛素对照品溶液、供试品溶液各1.5 ml,加0.1 mol/L氯化铝溶液2.0 ml和0.1 mol/L醋酸钠-醋酸溶液3.0 ml,用甲醇稀释至刻度,摇匀,放置10 min显色,显色后立刻在紫外-可见分光光度计不同检测波长下测定吸光度。结果发现,在400 nm波长处有强吸收。因此,选定总黄酮的检测波长为400 nm。

2.2.4 线性关系考察 精确吸取2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 ml桑辛素对照品溶液,分别置于10 ml量瓶中,按“2.2.3”项下方法处理并显色,于400 nm波长处测定吸光度。以吸光度(x)为横坐标,质量浓度(y , mg/ml)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $y=0.0787x-0.0009$ ($r=0.9998$, $n=6$),线性范围为0.025~0.050 mg/ml。

2.2.5 精密度的试验 取4.0 ml桑辛素对照品溶液适量,按“2.2.3”项下方法操作,测定吸光度,平行测定5次。结果, $RSD=0.54\%$ ($n=5$),表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一提取物供试品溶液适量,按“2.2.3”项下方法操作,在45 min内,从起始时间开始,每隔5 min测定一次吸光度。结果, $RSD=0.35\%$ ($n=10$),表明供试品溶液在45 min内基本稳定。

2.2.7 重复性试验 取同一提取物适量,共6份,按“2.2.2”项下方法配制供试品溶液,按“2.2.3”项下方法处理并显色,在

400 nm波长处测定吸光度。结果, $RSD=0.36\%$ ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精确吸取已知总黄酮含量的乙醇提取物供试品溶液各0.2 ml和乙醇提取后水提取物供试品溶液各4.0 ml,置于10 ml量瓶中,分别加入不同量的0.1 mg/ml的桑辛素对照品溶液,余下部分按“2.2.4”项下方法操作,平行测定6次,计算加样回收率,结果见表1、表2。

表1 桑不同药用部位95%乙醇提取物中总黄酮的加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests of total flavonoids in 95% ethanol extract from different parts of *M. alba* ($n=6$)

样品	序号	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
桑叶	1	0.273	0.350	0.627	101.14	99.73	2.22
	2	0.273	0.350	0.621	99.54		
	3	0.273	0.350	0.630	102.00		
	4	0.273	0.350	0.618	98.57		
	5	0.273	0.350	0.627	101.14		
	6	0.273	0.350	0.609	96.00		
桑椹	1	0.159	0.200	0.365	102.00	100.25	4.68
	2	0.159	0.200	0.371	106.00		
	3	0.159	0.200	0.368	104.50		
	4	0.159	0.200	0.356	98.50		
	5	0.159	0.200	0.347	94.00		
	6	0.159	0.200	0.352	96.50		
桑枝	1	0.228	0.300	0.538	103.33	99.45	4.23
	2	0.228	0.300	0.545	105.67		
	3	0.228	0.300	0.512	94.67		
	4	0.228	0.300	0.507	93.00		
	5	0.228	0.300	0.531	101.00		
	6	0.228	0.300	0.525	99.00		
桑白皮	1	0.397	0.400	0.821	106.00	102.46	3.16
	2	0.397	0.400	0.798	100.25		
	3	0.397	0.400	0.805	102.00		
	4	0.397	0.400	0.794	99.01		
	5	0.397	0.400	0.818	105.25		
	6	0.397	0.400	0.806	102.25		

2.2.9 样品中总黄酮的测定 精确吸取桑叶、桑椹、桑枝、桑白皮95%乙醇提取物供试品溶液各0.2 ml和乙醇提取后水提取物供试品溶液各4.0 ml,分别置于10 ml量瓶中,按“2.2.4”项下方法操作,于400 nm波长处测定吸光度,各平行测定6次,计算样品中总黄酮的含量,结果见表3、表4。

3 讨论

硝酸铝-亚硝酸钠法^[7-8]是目前测定中草药黄酮含量时使用最多的方法之一,而对照品多选择芦丁。该法显色发生在芦丁B环的3',4'-邻二-OH部位,但具有邻二-OH结构的原儿茶醛、原儿茶酸、咖啡酸、绿原酸、羟基苯甲酸类非黄酮类多酚也可发生此显色反应,显然会对黄酮的测定造成干扰,导致测定结果偏高。故此,笔者选择了测定环境为酸性的氯化铝法。但是从氯化铝法显色机制看,此法仍受包括B环为3',4'-邻二-OH黄酮的酚性成分的影响。因为桑不同植物部位中所含的黄酮类成分B环大都为2',4'-间二-OH或4'-OH,况且C₃位为异戊烯基。为增强测定结果的准确性,笔者选择了在桑中含量较高的桑辛素为对照品。此法操作简便、稳定性强、重现性好。

表2 桑不同药用部位乙醇提取后水提取物中总黄酮的加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery tests of total flavonoids in water extract after ethanol extraction from different parts of *M. alba*(n=6)

样品	序号	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
桑叶	1	0.215	0.220	0.433	99.09	99.54	2.86
	2	0.215	0.220	0.436	100.45		
	3	0.215	0.220	0.441	102.73		
	4	0.215	0.220	0.425	95.45		
	5	0.215	0.220	0.429	97.27		
	6	0.215	0.220	0.440	102.27		
桑椹	1	0.241	0.260	0.498	98.85	100.90	2.94
	2	0.241	0.260	0.489	95.38		
	3	0.241	0.260	0.509	103.08		
	4	0.241	0.260	0.507	102.31		
	5	0.241	0.260	0.512	104.23		
	6	0.241	0.260	0.505	101.54		
桑枝	1	0.170	0.200	0.381	105.50	101.50	2.70
	2	0.170	0.200	0.374	102.00		
	3	0.170	0.200	0.369	99.50		
	4	0.170	0.200	0.371	100.50		
	5	0.170	0.200	0.377	103.50		
	6	0.170	0.200	0.366	98.00		
桑白皮	1	0.007	0.010	0.017	100.00	95.00	5.76
	2	0.007	0.010	0.017	100.00		
	3	0.007	0.010	0.016	90.00		
	4	0.007	0.010	0.016	90.00		
	5	0.007	0.010	0.016	90.00		
	6	0.007	0.010	0.017	100.00		

表3 桑不同药用部位95%乙醇提取物中总黄酮含量测定结果(n=6)

Tab 3 Results of content determination of total flavonoids in 95% ethanol extract from different parts of *M. alba*(n=6)

样品	序号	吸光度	总黄酮含量,%	\bar{x} ,%
桑叶	1	0.360	13.72	13.60
	2	0.358	13.64	
	3	0.357	13.60	
	4	0.359	13.65	
	5	0.351	13.36	
	6	0.358	13.64	
桑椹	1	0.207	7.00	7.19
	2	0.210	7.10	
	3	0.209	7.07	
	4	0.218	7.39	
	5	0.211	7.14	
	6	0.219	7.42	
桑枝	1	0.312	10.95	10.53
	2	0.299	10.48	
	3	0.302	10.59	
	4	0.293	10.26	
	5	0.302	10.59	
	6	0.294	10.30	
桑白皮	1	0.514	18.31	18.38
	2	0.519	18.49	
	3	0.515	18.35	
	4	0.516	18.38	
	5	0.520	18.53	
	6	0.513	18.27	

表4 桑不同药用部位乙醇提取后水提取物中总黄酮含量测定结果(n=6)

Tab 4 Results of content determination of total flavonoids in water extract after ethanol extraction from different parts of *M. alba*(n=6)

样品	序号	吸光度	总黄酮含量,%	\bar{x} ,%
桑叶	1	0.281	0.26	0.26
	2	0.276	0.25	
	3	0.289	0.27	
	4	0.293	0.27	
	5	0.283	0.26	
	6	0.280	0.26	
桑椹	1	0.322	0.61	0.60
	2	0.318	0.60	
	3	0.312	0.59	
	4	0.323	0.61	
	5	0.314	0.60	
	6	0.317	0.60	
桑枝	1	0.230	0.41	0.40
	2	0.223	0.39	
	3	0.227	0.40	
	4	0.228	0.40	
	5	0.234	0.41	
	6	0.228	0.40	
桑白皮	1	0.019	0.01	0.01
	2	0.015	0.00	
	3	0.026	0.01	
	4	0.016	0.00	
	5	0.026	0.01	
	6	0.023	0.01	

本研究结果显示,黄酮类成分在桑四大药用部位中的分布差异较大,根皮高达18.38%,而在果实中仅7.19%,且主要存在于乙醇提取物中。黄酮类成分是桑属植物降压作用的有效成分^[9],其药用植物部位是桑白皮,而有效部分为乙醇提取物。

参考文献

- [1] 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, 2008: 1963.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 520.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 279.
- [4] 周吉银, 王稳, 周世文. 桑的不同药用部位药理作用研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2009, 28(12): 895.
- [5] 旷春桃, 李湘洲, 洪玉霞, 等. 大叶冬青叶中总黄酮测定方法的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(6): 49.
- [6] 史丽颖, 于大永, 冯宝民, 等. 葫芦茶根和叶中化学成分定量分析[J]. 中草药, 2009, 40(S1): 289.
- [7] 毕和平, 韩长日, 廖家旺, 等. 穿心莲中总黄酮含量的测定[J]. 光谱实验室, 2006, 23(2): 356.
- [8] 吴小娟, 林红景, 唐玲, 等. 山茶种子抗骨质疏松有效部位群化学成分的含量测定[J]. 中草药, 2007, 38(2): 107.
- [9] 黎琼红, 张国刚, 董淑华. 桑属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(5): 386.

(收稿日期: 2013-07-08 修回日期: 2013-09-09)