

桑白皮中总黄酮含量测定方法研究

段志涛¹, 高英², 霍文杰², 李卫民^{1*}

(1. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学新药研究开发中心, 广州 510006)

[摘要] 目的:建立一种桑白皮中总黄酮的含量测定方法。方法:以桑根酮 C 为对照品,采用盐酸-镁粉显色体系,于 481 nm 下测定桑白皮总黄酮含量。结果:桑根酮 C 在 146.8~734.0 mg·L⁻¹ 与吸光度呈良好线性关系($n=5, r=0.9998$),平均回收率为 96.74%, RSD 2.60% ($n=6$)。结论:该含量测定方法准确、简便、经济,是一种较理想的测定桑白皮中总黄酮含量的方法。

[关键词] 桑白皮; 总黄酮; 分光光度法; 桑根酮 C

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)07-0133-03

[doi] 10.11653/zgsyfyxzz2013070133

Research on Method for Determination of Total Flavonoids from *Morus alba*

DUAN Zhi-tao¹, GAO Ying², HUO Wen-jie², LI Wei-min^{1*}

(1. School of Chinese Material Medica, Guangzhou 510006, China;

2. New Drug R & D Center, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a determination method for the extraction of total flavonoids in *Morus alba*. **Method:** The sanggenon C was used as the authentic standard. The content of total flavonoids was determined by the HCl-Mg reaction colorimetry, measurement wavelength was set at 481 nm. **Result:** The sanggenon C calibration curve showed a good linear relationship in the ranger of 146.8-734.0 mg·L⁻¹ ($n=5, r=0.9998$) and the average recovery was 96.74%, RSD 2.60% ($n=6$). **Conclusion:** The method established was reliable and accurate. It can be used to determine the content of total flavonoid in *M. alba*.

[Key words] *Morus alba*; total flavonoids; UV spectrophotometry; sanggenon C

桑白皮为桑科植物桑的干燥根皮,具有泻肺平喘、利尿消肿的功效^[1]。古代本草如《名医别录》等记载其治消渴,单用即有效。药理实验证实桑白皮具有降血糖、降血压、抗病毒、利尿等作用。化学研究表明,桑白皮含有黄酮类、生物碱类、多糖类及挥发油等多种成分,其中黄酮类成分具有降血糖、降血压、抗病毒、抗癌等作用^[2]。桑白皮黄酮类成分均连有异戊烯基,包括桑酮、桑酮醇、桑根酮、桑根酮醇、桑皮根素等,其中含量较高的异戊烯基黄酮类成

分桑根酮 C、D(sanggenon C、D)具有明显降血压、抑菌^[3]等作用。2010 年版《中国药典》没有桑白皮含量测定方法。经文献检索后发现,前人报道桑白皮总黄酮的含量测定方法大多数采用芦丁为对照品,亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法来测定^[4-6]。桑白皮中芦丁含量较低并且不为其药效成分,以芦丁为对照品不能准确代表其总黄酮含量。本研究在综合比较前人研究的基础上,采用桑白皮中含量较高,药理活性较明显的桑根酮 C 为对照品,盐酸-镁粉显色法测定桑白皮总黄酮含量的分光光度法,旨在建立一种快速、经济、简便的测定桑白皮总黄酮含量的分析方法。

1 材料

AR2140 型电子分析天平(1/万、1/10 万), GKC21CR4 型可控硅恒温水浴锅(上海锦屏仪器仪

[收稿日期] 20120606(011)

[第一作者] 段志涛,在读硕士,从事新药开发研究, Tel: 13724045606, E-mail: dzt8716@163.com

[通讯作者] *李卫民,教授,博士生导师,从事新药开发研究, Tel: 020-39358290, E-mail: liweimin@gzucm.edu.cn

表有限公司), UVmini-1240 型紫外可见分光光度计(日本岛津); 桑根酮 C 对照品(≥98%) 购于广州牌牌生物科技有限公司(批号 PISA111001), 其他试剂均为分析纯。桑白皮药材来源自广州保健堂及清平药材市场, 由广州中医药大学高英主任中药师鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的根皮, 样品标本保存于本实验室。

2 方法与结果

2.1 供试液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 取桑根酮 C 对照品适量, 精密称定, 用甲醇溶解并稀释成每 1 mL 含 116 μg 桑根酮 C 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取桑白皮药材粉末(40 目) 约 0.5 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 加 50 mL 甲醇, 超声 60 min, 过滤后置 50 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 显色方法和测定波长的选择 盐酸-镁粉显色法^[7]: 精密吸取供试品溶液、对照品溶液各 1.0 mL, 分别置于加有镁粉 300 mg 的具塞刻度试管中。将试管置冷水浴中(15 ℃左右), 缓慢滴加浓盐酸 3 mL, 并不时振摇试管。加甲醇补足至 10 mL, 摇匀, 置沸水浴中加热 60 min, 迅速冷却至室温, 加甲醇补足体积至 10 mL。在 400~800 nm 扫描测定吸收光谱。

NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 显色法^[8]: 精密吸取桑根酮 C 对照品溶液 2 mL, 供试品溶液 2 mL, 分别加入 5% NaNO₂ 1.0 mL, 放置 6 min, 然后加入 10% Al(NO₃)₃ 10 mL, 混匀, 放置 6 min, 再加入 10% NaOH 10 mL, 用水稀释至 25 mL, 放置 15 min。在 400~800 nm 扫描测定吸收光谱。

AlCl₃ 显色法^[9]: 精密吸取桑根酮 C 对照品溶液 2 mL, 供试品溶液 2 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加入 10% AlCl₃ 试液 1.5 mL, 甲醇定容, 摇匀。在 400~800 nm 扫描测定吸收光谱。

比较上述 3 种显色方法, 用盐酸-镁粉反应显色后, 桑根酮 C 对照品、供试品 λ_{max} 基本一致, 均为(481 ± 1.5) nm, 而且重现性好。而用 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 和 AlCl₃ 两种显色方法显色, 桑根酮 C 对照品和供试品在显色前后, 其吸收光谱均无明显位移, 在 400~800 nm 无明显吸收峰。故选择盐酸-镁粉反应显色法, 在(481 ± 1.5) nm 波长处测定桑白皮总黄酮含量。

2.3 显色条件考察

2.3.1 加热时间考察 精密吸取桑根酮 C 对照品

溶液和供试品溶液各 5 份(桑根酮 C 对照品溶液及供试品溶液每份 2 mL), 置加有镁粉 300 mg 的具塞刻度试管中。将试管置冷水浴(15 ℃左右)中, 缓慢滴加浓 HCl 3 mL, 并不时振摇试管。最后加甲醇补足至 10 mL, 摇匀, 置沸水浴中分别加热 20, 40, 60, 80, 100 min, 取出, 迅速冷却至室温, 依法测定吸光度, 结果显示加热 60 min, 吸光度最大(表 1)。

表 1 加热时间考察

t/min	A	
	桑根酮 C	供试品
20	0.050 2	0.216 0
40	0.083 1	0.301 6
60	0.145 0	0.437 7
80	0.139 0	0.382 1
100	0.126 8	0.285 6

2.3.2 镁粉用量考察 精密吸取桑根酮 C 对照品溶液和供试品溶液各 5 份(桑根酮 C 对照品溶液及供试品溶液每份 2 mL), 分别置加有不同量镁粉的具塞刻度试管中。将试管置冷水浴(15 ℃左右)中, 缓慢滴加浓 HCl 3 mL, 并不时振摇试管。最后加甲醇补足至 10 mL, 摇匀, 置沸水浴中加热 60 min, 取出, 迅速冷却至室温, 依法测定吸光度, 结果显示镁粉用量为 300 mg 时, A 最大(表 2)。

表 2 镁粉用量考察结果

镁粉用量/mg	吸光度	
	桑根酮 C	供试品
150	0.062 2	0.125 3
200	0.103 4	0.216 7
250	0.134 2	0.355 9
300	0.145 0	0.426 1
350	0.138 9	0.415 6
400	0.135 8	0.398 6

2.4 线性关系考察 精密吸取桑根酮 C 对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 置加有镁粉 300 mg 的具塞刻度试管中。将试管置冷水浴(15 ℃左右)中, 缓慢滴加浓 HCl 3 mL, 并不时振摇试管。最后加甲醇补足至 10 mL, 摇匀, 置沸水浴中加热 60 min, 取出, 迅速冷却至室温, 于 481 nm 处测定吸光度。以桑根酮 C 对照品质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 并进行线性回归, 得到回归方程 $Y = 6.032X - 0.0318$ ($n = 5, r = 0.9998$)。结果表明桑根酮 C 在 146.8~734.0 mg·L⁻¹ 的线性关系良好。

2.5 精密度考察 精密吸取同一份供试品溶液 5

份,每份 2 mL,按盐酸-镁粉法显色后,在 481 nm 处测定吸光度,计算吸光度的 RSD 1.82%,结果表明该方法精密度良好。

2.6 重复性考察 取同一批桑白皮药材粉末(40目)5份,每份约 1.0 g,精密称定,按 2.1.2 项下制备供试品溶液。分别精密量取 2.0 mL,分别置于加有 300 mg 镁粉的具塞刻度试管中,显色后在 481 nm 处分别测定吸光度,RSD 2.41%。

2.7 稳定性考察 精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 2.0 mL,依法显色后放置 0,20,40,60,80,100,120 min 测定吸光度。结果表明桑根酮 C 和供试品溶液显色后 1 h 内基本稳定,吸光度的 RSD 1.54%,1.76%。

2.8 回收率试验 取已知含量桑白皮药材粉末(40目)约 0.2 g,精密称定,加入 $3.9211\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的桑根酮 C 对照品溶液 1.0 mL,按 2.1.2 项下操作制备供试品溶液。精密吸取 2 mL,按样品含量测定项下方法测定含量,计算平均回收率,结果见表 3。

表 3 加样回收率试验

称样量 /g	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.2010	3.9195	3.9211	7.8503	100.25		
0.2005	3.9098	3.9211	7.6312	94.91		
0.2012	3.9234	3.9211	7.7315	97.12	96.74	2.60
0.2002	3.9039	3.9211	7.5921	94.06		
0.2015	3.9293	3.9211	7.8146	99.09		
0.2011	3.9215	3.9211	7.6457	94.98		

2.9 样品含量测定 分别取 10 批样品,按 2.1.2 项下制备供试品溶液,分别精密量取 2.0 mL,按 2.4 项下显色后测定,测得桑白皮中总黄酮的平均含量 $(3.3 \pm 0.12)\%$ 。

表 4 不同产地总黄酮含量测定

No.	产地	采集时间	总黄酮/%
1	广东	2012-03	4.07
2	广东	2011-10	3.74
3	四川	2011-11	4.55
4	四川	2010-11	4.15
5	安徽	2011-10	3.06
6	安徽	2009-08	2.84
7	浙江	2011-08	3.06
8	湖北	2010-10	1.62
9	湖南	2010-10	2.12
10	广西	2011-11	3.74

3 讨论

桑白皮的黄酮类化合物结构中均存在异戊烯基侧链^[3,10]。测定结果与近年研究成果相比,总黄酮量偏高,可能是测定方法不同所致。本研究采用盐酸-镁粉显色体系,以桑白皮中含量较高、药效成分且结构中同样存在异戊烯基的桑根酮 C 为对照品,盐酸-镁粉显色法获得了与样品一致的紫外可见光扫描图,提高了检测的准确度。

黄酮、黄酮醇、二氢黄酮、二氢黄酮醇均易在盐酸-镁粉作用下被还原,生成橙红到红紫色物质,该反应宜在 15 ℃ 左右水浴中进行,浓盐酸要逐渐滴加,目的是减缓盐酸与镁粉反应的剧烈程度,使产生的氢原子与黄酮类物质充分反应。在滴加浓盐酸的过程中,一定要不时振摇试管,使显色剂与样品充分接触,充分显色。

10 批不同产地不同采集时间的桑白皮样品中总黄酮含量在 1.62% ~ 4.55%,不同采集时间的桑白皮总黄酮含量差异较大。采集时间越早,贮存时间越长的桑白皮总黄酮含量越低,所以在临床或生产中,为确保药效,应选用新鲜药材,贮存过程应注意低温保存,以防止桑白皮药效成分的过快丧失。

[参考文献]

- [1] 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,2010:280.
- [2] 周吉银,王稳,周世文. 桑药用资源的降糖作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(11):204.
- [3] 张庆建. 鸡桑、华桑化学成分及生物活性研究[D]. 北京:中国协和医科大学,2007:9.
- [4] 杨方明. 蜜炙桑白皮总黄酮的含量测定方法[J]. 亚太传统医药,2011,7(6):22.
- [5] 杨方明,韦史利,邬文力. 蜜炙桑白皮总黄酮的含量测定方法[J]. 亚太传统医药,2011,6:22.
- [6] 李洪娟,孙居锋,代现平,等. 桑白皮总黄酮超声波提取法研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(3):1188.
- [7] 刘斌,石任兵,周素蓉. 苦参汤有效部位总黄酮含量测定方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2004,10(6):24.
- [8] 陈君,韦建华,李兵,等. UV 测定广西不同产地倒地铃中总黄酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):106.
- [9] 张进祥,段吉平. 紫外分光光度法测定金莲花中总黄酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,15(10):36.
- [10] 孙胜国,陈若芸. 桑属植物化学成分和生物活性研究述评[J]. 中医药学刊,2005,23(2):332.

[责任编辑 顾雪竹]