

· 化学与分析 ·

桑叶总酚成分的提取纯化及成分定性

朱成¹, 彭国平^{1,2*}, 李存玉^{1,2}, 郑云枫^{1,2}

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210023;

2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 南京 210023)

[摘要] **目的:**研究桑叶总酚类化合物的提取纯化及成分鉴定,为桑叶总酚的降血糖作用机制研究提供理论依据。**方法:**以芦丁提取率为考察指标,通过正交实验确定最佳乙醇提取工艺,优选纯化工艺路线及大孔树脂纯化工艺的技术参数,包括树脂用量,pH,洗脱剂浓度等,并通过UPLC-MS对总酚部位中主要化学成分进行分析鉴定。**结果:**最佳提取工艺为加入10,8倍量70%乙醇,每次提取1.5h。采用两次大孔树脂纯化,第一次用1%Na₂CO₃洗脱,第二次用60%乙醇洗脱。通过UPLC-MS鉴定出8个酚类化合物。**结论:**该工艺简单,周期短,成本低,成分含量大于50%,达到了有效部位的要求,适合工业化生产,该方法可为开展桑叶总酚的降血糖作用研究提供理想的实验药物。

[关键词] 桑叶总酚; 提取; 纯化; 定性分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)06-0029-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015060029

Purification and Qualitative Analysis of Total Phenolics from *Morus alba* Leaves ZHU Cheng¹, PENG Guo-ping^{1,2*}, LI Cun-yu^{1,2}, ZHENG Yun-feng^{1,2} (1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** The extraction and purification methods for phenolics in *Morus alba* leaves were studied and the constituents of phenolic were identified, provided suitable experimental drug specimen for exploring the hypoglycemic effect of *M. alba* leaves. **Method:** The optimum extraction condition was investigated by orthogonal design and the extraction quantity was regarded as the investigated index. The factors affecting separation, such as resin dosage, pH and concentration of eluting agent were considerate. The chemical components of phenolic extracted from *M. alba* were analyzed and identified by UPLC-MS. **Result:** The optimized extracting conditions were as follows: extracted two times with 70% alcohol, each 1.5 h. The ratio of solvent to material 10:1 and 8:1, respectively; and the purification process with macroporous resin HPD-826 was using 1% Na₂CO₃, 60% ethanol to wash out phenolics; eight phenolics compounds were identified by UPLC-MS. **Conclusion:** This method is simple, short cycle, low cost, high content and suitable for industrialized production. This purification technology could be used to extract phenolics of *M. alba* leaves for studies on its hypoglycemic effect.

[Key words] *Morus alba* leaves total phenolic; extraction; purification; qualitative analysis

桑叶是一种重要的药食两用植物原料^[1],具有疏散风热、益肝通气、降压利尿等功效^[2]。桑叶中含有多种功能活性成分^[3],尤其富含酚类化合

物^[4-5]。研究发现桑叶酚类具有降血糖的作用^[6-7]。为了进一步开发利用桑叶,本实验采用醇提水沉、大孔树脂纯化得到桑叶总酚部位,该工艺适合于工业

[收稿日期] 20140615(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072985,81373980)

[第一作者] 朱成,在读硕士,从事中药有效部位分离方面的研究,Tel:18252066797,E-mail:zhucheng.0615@163.com

[通讯作者] *彭国平,博士,研究员,博士生导师,从事中药化学成分的分离与分析研究,Tel:025-86798186,E-mail:guopingpeng@sohu.com

化生产,并对其中的主要成分进行 UPLC-MS 分析,为进一步研究其降血糖作用机制提供实验依据^[8]。

1 材料

ACQUITY™ 型 UPLC (包括 PDA 检测器), Synapt™ 型 Q-TOF 质谱仪(配有 Lock-spray 接口),电喷雾离子源(ESI),Masslynx 4.1 质谱工作站软件(Waters 公司);HBROR AEL-40SM 型 1/10 万电子天平(日本岛津),JCS-1000 型 1/10 万电子天平。

桑叶采自广西,晾干,经南京中医药大学吴启南教授鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* 的干燥叶;HPD826 型大孔树脂(河北沧州宝恩化工有限公司),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 总黄酮含量测定方法^[9]

2.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品(纯度 99%)10 mg 于 10 mL 量瓶中,加 60% 乙醇至刻度,摇匀,得 1 g·L⁻¹ 芦丁对照品溶液。

2.2 测定方法 取样品 0.05 g 用 60% 乙醇溶解,取 2 份样品各 4 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,1 份加 30% 乙醇定容至 10 mL 作空白溶液;1 份精密加入 5% NaNO₂ 溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,再精密吸取 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,然后加入 1 mol·L⁻¹ NaOH 4 mL,用 30% 乙醇定容至刻度,摇匀,放置 10 min,做供试品溶液。利用分光光度法,分别取空白溶液和供试品溶液在 510 nm 处测定吸光度。

3 桑叶总酚提取精制工艺

3.1 正交试验法优化乙醇提取条件 取桑叶 100 g,9 份。按照正交试验法对桑叶提取工艺进行优化,以乙醇体积分数 A、加醇量 B(提取 2 次)、提取时间 C 3 个因素作为考察因素,设计正交因素水平表。以芦丁含量作为考察指标,选用 L₉(3⁴) 正交表进行试验,结果见表 1。

正交试验结果得出:乙醇体积分数(A)和加醇量(B)对芦丁含量的影响较高,提取时间(C)的影响较小。最优提取工艺为加入 10,8 倍量 70% 乙醇,每次提取 1.5 h。

3.2 纯化工艺路线选择 醇提回收液调 pH 后经过两步 HPD-826 型大孔树脂纯化处理,第一步用 Na₂CO₃ 洗脱,调 pH 后,第二步用 60% 乙醇洗脱,即得到总酚部位。

3.2.1 大孔树脂预处理 用 95% 乙醇浸泡过夜,湿法装柱,水洗至无醇味,用 3 BV(树脂体积)的 5% NaOH 溶液洗脱至无色,后用水洗脱至中性;再用 3 BV 的 5% HCl 洗脱至无色,用水洗脱至中性,备用。

表 1 桑叶总酚提取条件正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of extraction process of Mori Folinm

No.	体积分数 A/%	乙醇量 B/倍	提取时间 C/h	芦丁 /%
1	50	12 + 10	1	0.167
2	50	10 + 8	1.5	0.164
3	50	8 + 6	2	0.150
4	60	12 + 10	1.5	0.195
5	60	10 + 8	2	0.178
6	60	8 + 6	1	0.172
7	70	12 + 10	2	0.210
8	70	10 + 8	1	0.214
9	70	8 + 6	1.5	0.198

表 2 芦丁含量方差分析

Table 2 Variance analysis of rutin content

方差来源	离差平方和	均方差	F	P
A	1.11 × 10 ⁻³	5.54 × 10 ⁻⁴	68.91	<0.05
B	1.58 × 10 ⁻⁴	7.88 × 10 ⁻⁵	9.81	<0.1
C	2.23 × 10 ⁻⁵	1.12 × 10 ⁻⁵	1.39	
D(误差)	1.61 × 10 ⁻⁵	8.04 × 10 ⁻⁶		

注: F_{0.05}(2,2) = 19.00, F_{0.01}(2,2) = 9.00

3.2.2 第一步纯化树脂用量考察 取经过预处理的混合大孔树脂 250 mL,将供试液加到装有树脂的色谱柱中,进行动态吸附,控制体积流量 8 mL·min⁻¹,按 20 g 作为一个上样量,并跟踪测定流出液中总黄酮质量浓度,记录上样量,并以流出液中总黄酮质量浓度对上样体积作图,绘制泄露曲线。结果见图 1。当生药量超过 180 g 时,出现明显泄露,因此在保证总酚的同时又能增大上样量,故选择 160 g 生药量作为上样量。

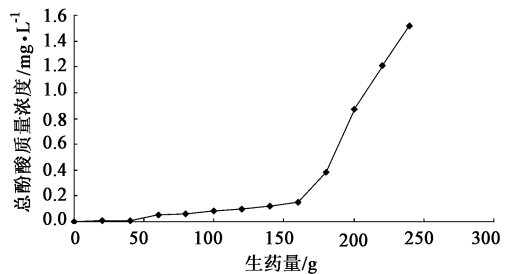


图 1 树脂用量与总酚泄露关系

Fig. 1 Adsorption leak curve of phenolic of *Morus alba* by HPD-826 macroporous resin

3.2.3 Na₂CO₃ 溶液浓度的考察 取经过吸附的大孔树脂柱,3 份,分别用 0.5%,1%,2% Na₂CO₃ 溶液 200 mL 进行洗脱,后用水续洗,合并水洗液和 Na₂CO₃ 洗脱液,测得总酚的含量。最终选择 1%

Na₂CO₃ 溶液作为洗脱溶剂。

3.2.4 第二步树脂纯化 pH 的选择 第一次吸附洗脱的碱洗液的 pH 在 9 以上,碱洗液调不同的 pH 上大孔树脂柱二次吸附,分别用 70% 乙醇洗脱,洗脱液测得总酚质量,比较调不同 pH 对大孔树脂二次吸附的影响。最终选用调 pH 3~4 上大孔树脂。

3.2.5 第二步树脂纯化乙醇浓度的选择 取经过二次吸附的大孔树脂柱,4 份,分别用 40%,50%,60%,70% 乙醇溶液各 200 mL 进行洗脱,后用水续洗,合并水洗液和醇洗脱液,测得总酚的含量,最终选择 60% 乙醇溶液作为二次洗脱溶剂。

最佳纯化条件:70% 乙醇提取 2 次,加醇量为 10,8 倍,每次 1.5 h,醇提回收液调 pH 后经过两步 HPD-826 大孔树脂纯化处理,第一步用 1% Na₂CO₃ 洗脱,树脂使用量为生药量 1.6 倍,碱洗液调 pH 3~4 后,第二步用 60% 乙醇洗脱,即得到总酚部位。

3.3 桑叶总酚测定 桑叶药材按优选工艺制备 3 批中试产品,结果 3 批样品中总酚平均含量为 89.6%,平均得率 203 g(10 kg 桑叶)。

4 UPLC/Q-TOFMS/MS 分析总酚部位

4.1 UPLC 色谱条件 Aequity UPLC BE-HC₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm,1.7 μm),流动相 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B),进行梯度洗脱(0~7.5 min,95%~50% A;7.5~8.0 min,50%~10% A;8.0~9.0 min,10%~10% A;9.0~10.0 min,10%~95% A);流速 0.4 mL·min⁻¹,进样量 2 μL,检测波长 200~400 nm,柱温 35 ℃。

4.2 MS 条件 ESI 源,负离子检测,离子源温度 120 ℃,毛细管电压 3 kV,脱溶剂气流速 600 L·h⁻¹,雾化温度 350 ℃,锥孔反吹气流量 50 L·h⁻¹,锥孔电压 30 kV,扫描范围 *m/z* 200~1 500。质谱数据采用 MassLynx 4.1 软件进行处理。

4.3 UPLC/Q-TOF/MS 分析 按照上述色谱、质谱条件获得桑叶总酚部位总离子流图,通过外标一点法对已知成分的含量进行测定,结果成分含量相加大于 50%,符合有效部位的要求。见图 2,表 3。

5 结论

桑叶经乙醇提取,经过两次大孔树脂纯化处理,得到总酚含量超过 85%(液相检测超过 50%),并经过 3 批中试产品验证工艺可靠,通过液质分析,鉴定出总酚中 8 个成分,3 个绿原酸类成分,5 个黄酮类成分,其中 7 个化合物经过了对照品比对。本工艺操作简单,大孔树脂可重复使用,适合工业化生产。

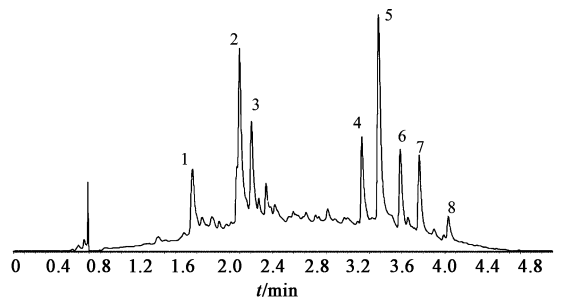


图 2 桑叶总酚部位总负离子流

Fig. 2 TIC chromatograms of phenolics in *Morus alba* leaf

表 3 桑叶总酚类化合物分析鉴定

Table 3 Phenolic constituents in *Morus alba* leaf extracts and their characteristic spectrometric data (HPLC-ESI-MS)

峰号	化学名称	分子式	特征离子
1*	neochlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353[M-H] ⁻ , 191, 179
2*	chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353[M-H] ⁻ , 707, 191
3*	cryptochlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353[M-H] ⁻ , 707, 191, 173
4*	rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609[M-H] ⁻
5*	isoquercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463[M-H] ⁻
6*	kaempferol-3-rutinoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593[M-H] ⁻
7*	kaempferol-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447[M-H] ⁻
8	kaempferol-(6'- <i>O</i> -acetyl)-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	489[M-H] ⁻

注:标*的成分为已经过对照品确证,相应色谱峰位置见图 2。

[参考文献]

[1] 朱文政,魏晓蕊,鞠美玲,等. 桑叶类食品的研究与开发[J]. 中国食物与营养, 2010(7):26-28.

[2] 原爱红,黄哲,马骏,等. 桑叶黄酮的提取及其降糖作用的研究[J]. 中草药, 2004, 35(11):1242-1243.

[3] 贺伟强,向天勇,陶昆. 桑叶活性成分药理作用研究进展[J]. 北方园艺, 2011(23):184-186.

[4] 王芳,励建荣. 桑叶的化学成分、生理功能及应用研究进展[J]. 食品科学, 2005, 26(Z1):111-117.

[5] 沈维治,廖森泰,邹宇晓,等. 桑叶酚类物质的变化规律研究[J]. 中草药, 2010, 41(11):1890-1892.

[6] 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):204-206.

[7] 李明聪,杨丹,郭英,等. 桑叶中黄酮类化学成分及药理作用研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(2):377-380.

[8] 何羨霞,苏楠,吴新荣. 桑叶降糖有效部位及其降糖活性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(7):245-248.

[9] 孙敏耀,唐文照,卢霞,等. 分光光度法测定不同采收时间桑叶中总黄酮[J]. 中草药, 2004, 35(10):1190-1191.

[责任编辑 顾雪竹]