

[药材资源]

桑枝化学成分鉴定及其总黄酮提取工艺优化

刘莹¹, 郭明鑫², 郭洁清¹, 吴霞¹, 冯毅凡^{1*}
(1. 广东药科大学, 广东 广州 510000; 2. 宜兴市人民医院药学部, 江苏 宜兴 214200)

摘要: **目的** 鉴定桑枝化学成分, 并优化其总黄酮提取工艺。 **方法** 采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间高分辨率质谱 (UPLC-Q-TOF-HRMS), 在正负离子模式下采集数据, 结合在线数据库和 SCIEX 工作站对桑枝醇提取物进行定性分析。在单因素试验基础上, 采用响应面法优化提取工艺。 **结果** 共鉴定出 57 种成分。最佳条件为乙醇体积分数 75%, 料液比 1 : 21, 提取时间 70 min, 提取温度 75 ℃。 **结论** UPLC-Q-TOF-HRMS、响应面法稳定可行, 可用于桑枝定性分析及工艺优化。

关键词: 桑枝; 化学成分; 总黄酮; 提取工艺; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间高分辨率质谱; 响应面法

中图分类号: R284.1; R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2023)06-1892-10

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.025

Identification of chemical constituents and optimization of total flavonoids extraction process for *Mori Ramulus*

LIU Ying¹, GUO Ming-xin², GUO Jie-qing¹, WU Xia¹, FENG Yi-fan^{1*}
(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510000, China; 2. Department of Pharmacy, Yixing Municipal People's Hospital, Yixing 214200, China)

ABSTRACT: **AIM** To identify the chemical constituents in *Mori Ramulus* and to optimize the extraction process for its total flavonoids. **METHODS** Using ultra high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-HRMS) to collect the data in positive and negative ion mode for the qualitative analysis of the alcohol extract of *Mori Ramulus*, in combination with the online database and SCIEX workstation. On the basis of single factor test, the extraction process was optimized by response surface method. **RESULTS** Totally, fifty-seven constituents were identified. The optimal conditions were determined to be 75% for ethanol concentration, 1 : 21 for solid-liquid ratio, 70 min for extraction time, and 75℃ for extraction temperature. **CONCLUSION** The stable and feasible UPLC-Q-TOF-HRMS and response surface method can be used for the qualitative analysis and process optimization of *Mori Ramulus*.

KEY WORDS: *Mori Ramulus*; chemical constituents; total flavonoids; extraction process; UPLC-Q-TOF-HRMS; response surface method

桑枝为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥嫩枝^[1], 多生于丘陵、山坡、村旁、田野等处, 也可人工栽培, 资源丰富^[1], 具有祛风湿、通经络、行水气等功效^[2], 主要含有黄酮、生物碱、芪类、萜类、香豆素、糖类、甾醇类、挥发油等多种成分^[3-5], 其中黄酮是主要活性物质^[6]。现代研究表明, 桑属植物具有降血糖血脂、免疫、抗炎^[5]、抗肿瘤^[7]等药理活性, 目前相关研究主要集中于桑白皮、桑叶、桑葚, 而对桑枝化学成分及其总黄酮提取工艺的报道较少。因此, 本实验采用 UPLC-Q-TOF-HRMS 法分析桑枝化学成分, 并采用响应面法优化其总黄酮提取工艺, 以期为今后该植物进一

收稿日期: 2022-08-19
基金项目: 广东省自然科学基金 (2018A030313907)
作者简介: 刘莹 (1994—), 女, 硕士, 从事中药成分分析研究。E-mail: ly953403517@163.com
* 通信作者: 冯毅凡 (1963—), 男, 教授, 硕士生导师, 从事新药研发工作。E-mail: yffeng@163.com

步开发利用及质量标准研究提供依据。

1 材料

UPLC-30D 超快速液相色谱仪（日本岛津公司）；X500RQTOF 质谱仪（美国 AB SCIEX 公司）；CORTECSUPLC-C₁₈ 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.6 μm，美国 Waters 公司）；DU-800 紫外可见分光光度计（美国贝克曼库尔特公司）；旋转蒸发仪（日本 EYELA 公司）；HH-4 数显恒温水浴锅（常熟澳华仪器有限公司）；BP210D 分析天平（万分之一，德国 Sartorius 公司）；YB-1500 高速粉碎机（永康市速锋工贸有限公司）。芦丁对照品（纯度≥98.5%），购自上海源叶生物科技有限公司。桑枝购于江苏海宏制药公司，经广东药科大学梁汉明鉴定为正品，粉碎后过筛，低温干燥保存。亚硝酸钠为色谱纯，购自阿拉丁试剂（上海）有限公司；无水乙醇、氢氧化钠、硝酸铝为分析纯，购自天津致远化工有限公司；水为饮用水，购自广州屈臣氏食品饮料有限公司；乙腈、甲醇、甲酸为质谱纯，购自德国 CNW 公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters CORTECS UPLC-C₁₈ 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.6 μm）；流动相 0.1% 甲酸（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0~2 min，5% B；2~6 min，5%~15% B；6~13 min，15%~20% B；13~15 min，20%~35% B；15~18 min，35%~43% B；

18~23 min，43%~55% B；23~28 min，55%~65% B；28~31 min，65%~75% B；31~33 min，75%~95% B）；体积流量 0.3 mL/min；柱温 35 ℃；进样量 2 μL。

2.2 质谱条件 ESI 离子源，正负离子模式，采用 SCIEX OS 内部校正液进行校正；采集范围 m/z 100~1 000，离子源电压-4 500 V，温度 600 ℃；锥孔气体积流量 50 L/h；雾化器体积流量500 L/h；去簇电压 80 V；扫描时间 0.52 s，累计采样时间 0.1 s。IDA 参数设定为 IDA 触发 10 个子离子扫描；碰撞能量 35 V，电压 35 eV，电压差±15 eV；扫描范围 m/z 100~1 000；去簇电压 80 V；启动动态背景扣除，二级碎裂扫描的离子强度 10 cps。

2.3 成分鉴定 药材粉碎后过 40 目筛，与石油醚按 1：3 比例进行脱脂，挥干溶剂，加入 33 倍量 75% 乙醇，在 80 ℃ 下加热回流提取 90 min，共 2 次，收集混合滤液，旋转蒸干，乙醇定容于量瓶中，进行正负离子一级全扫描，见图 1。通过查阅文献 [3，5，8-16] 及应用在线数据库检索，将相关信息进行汇总，包括分子式、物质结构、相对分子质量、质谱数据、裂解规律等，建立包含 218 个相关化合物的数据库。再利用 SCIEX 工作站对其色谱峰进行检索，获取误差范围≤5.0×10⁻⁶的分子式。结果，从桑枝中鉴定出 57 种成分，具体见表 1。

表 1 桑枝化学成分鉴定结果

Tab. 1 Results of chemical constituent identification of *M. Ramulus*

序号	t_R /min	实测值 m/z	理论值 m/z	误差(×10 ⁻⁶)	二级碎片离子 m/z	名称	类型
1	0.49	331.065 2	331.065 9	-2.3	151.002 4,125.023 0,169.013 5,191.055 7	1-甲氧基-2-羟基二氢大叶茜草素	蒽醌衍生物
2	1.31	169.012 7	169.013 1	-2.7	151.001 8,107.012 9,125.023 8,169.013 6	2,3,4-三羟基苯甲酸	芳香酸
3	2.95	567.168 9	567.170 8	-3.4	243.061 5, 191.052 2, 405.113 1, 567.163 6, 353.083 9、85.028 0	桑皮苷 A ^[8]	二苯乙烯类
4	3.99	405.117 1	405.118 0	-2.2	243.063 5, 225.054 5, 199.075 2, 175.075 4, 159.044 6、201.054 7, 181.065 3	反式氧化白藜芦醇-4- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷 ^[8]	酚类
5	4.27	405.117 3	405.118 0	-1.7	243.063 3, 225.054 0, 175.075 3, 199.074 3, 201.054 6、181.065 2, 159.045 3	氧化白藜芦醇-2- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷 ^[3]	酚类
6	4.47	463.085 1	463.087 1	-4.3	463.083 5, 301.031 8, 300.025 2, 343.044 3, 151.002 0、163.002 8, 229.049 8, 125.023 2	异槲皮苷 ^[6]	黄酮苷类
7	5.34	303.048 6	303.049 9	-4.4	125.022 1, 149.022 8, 217.048 7, 217.048 7, 177.017 5、285.039 3	二氢槲皮素	二氢黄酮醇类
8	5.80	243.064 2	243.065 1	-4.1	159.043 1, 175.074 0, 157.063 9, 199.074 0, 225.053 6、243.063 7, 133.029 0	氧化白藜芦醇 ^[9]	二苯乙烯类
9	6.64	287.053 7	287.055 0	-4.6	125.023 6, 259.060 3, 151.003 8, 177.055 9, 133.029 4、287.055 1	5,7,2',4'-四羟基黄酮 ^[10]	二氢黄酮类
10	7.39	487.137 7	487.138 7	-2.1	243.063 4, 337.100 0, 359.091 6, 487.136 0, 225.055 1、175.075 8	桑根酮 J ^[7]	异戊二烯黄酮类

续表 1

序号	t_{R}/min	实测值 m/z	理论值 m/z	误差($\times 10^{-6}$)	二级碎片离子 m/z	名称	类型
11	8.08	301.032 9	301.034 2	-4.6	149.022 9、151.002 0、148.015 6、125.023 2、301.032 4、163.003 0、159.044 9、273.040 4、229.049 8	槲皮素 ^[11]	黄酮醇类
12	8.49	241.048 9	241.049 5	-2.6	241.049 5、199.040 2、157.029 8、167.051 1、143.050 7	桑辛素 M ^[10]	苯并呋喃类
13	8.69	487.137 2	487.138 7	-3.2	243.063 7、377.101 2、201.055 1、175.075 6、359.092 3、487.136 6、159.045 1、173.059 6、225.052 7	桑根酮 K ^[10]	异戊二烯黄酮类
14	9.02	347.038 8	347.039 7	-2.8	206.991 1、207.999 0、123.006 9、152.010 6、178.997 7、223.023 8	—	—
15	9.04	287.055 3	287.055 0	1.0	125.022 4、161.022 7、135.043 7、133.029 0、151.003 4、83.013 2	二氢山柰酚 ^[12]	二氢黄酮醇类
16	9.34	405.093 8	405.094 1	-1.0	295.059 1、243.064 2、161.023 7、109.029 5、405.096 4、283.060 9、225.056 0、225.056 0、280.039 1	氧化白藜芦醇-3'-O-β-吡喃葡萄糖苷 ^[8]	酚类
17	10.03	271.059 2	271.060 1	-3.3	119.049 3、151.002 9、135.044 8、161.024 8、271.059 9、91.055 3、177.019 3	桑辛素 J	苯并呋喃类
18	10.26	285.038 5	285.039 3	-3.0	285.037 3、185.060 5、93.034 3	山柰酚 ^[12]	黄酮醇类
19	10.73	521.178 7	521.180 6	-3.7	163.039 2、119.049 8、179.071 1、521.179 3	nigrasins G ^[13]	二氢黄酮醇类
20	11.23	329.230 7	329.232 2	-4.7	211.132 3、329.230 3、229.143 5、171.102 1、183.102 1、99.081 1、293.213 5	鸢尾甲黄素 B	黄酮类
21	11.61	455.166 4	455.164 1	4.9	193.086 1、455.168 7、367.117 8、261.075 9、219.065 8	—	—
22	11.65	469.147 1	469.149 3	-4.7	469.144 0	—	—
23	12.25	311.128 7	311.127 7	2.9	311.128 0、241.050 1、267.139 1、243.139 8、189.091 3、159.045 3、121.029 6、81.034 3	—	—
24	12.61	707.211 6	707.212 3	-1.0	707.211 6、597.176 0、555.165 3、435.145 0、369.096 0、243.067 4、191.070 7、125.024 3	桑根酮 C ^[14]	D-A 加合物
25	12.83	579.165 9	579.164 9	1.6	109.027 3、359.090 0、469.125 9、579.161 3、175.075 6、253.049 8、293.045 2、451.118 9、427.118 1	桑呋喃 C ^[7]	苯并呋喃类
26	12.91	437.158 1	437.159 4	-3.2	193.085 5、367.116 7、437.157 4、243.065 7、283.025 6、323.055 6、419.150 1、135.008 8	桑根酮醇 F ^[7]	二氢黄酮醇类
27	13.06	353.102 5	353.101 9	1.5	353.100 5、231.064 7、284.030 7、125.023 9、151.003 7、243.065 8	桑根酮 H ^[7]	二氢黄酮类
28	13.18	453.153 0	453.154 3	-3.1	453.150 6、193.084 9、421.127 3、259.060 0、219.065 7、377.102 5、367.118 1	—	—
29	13.26	435.142 3	435.143 8	-3.5	193.084 2、241.048 6、435.140 6、149.096 4	桑根酮 M ^[7]	二氢黄酮醇类
30	13.49	663.220 2	663.222 4	-3.4	663.225 3、419.150 4、243.067 6	—	—
31	13.57	435.143 3	435.143 8	-1.2	435.142 2、313.106 9、297.040 5、207.065 8、109.029 4、189.056 1、325.017 9	新环桑色烯	黄酮类
32	13.69	355.116 9	355.117 6	-2.0	355.117 5、203.106 3、325.069 2、153.018 1	绿原酸 ^[15]	苯丙素类化合物
33	13.84	437.156 3	437.156 7	-1.1	245.079 5、191.069 6、298.046 2、297.039 6、437.156 3、315.122 9、367.117 6、176.117 6、176.010 7、164.011 5、109.029 2	mornigrol E ^[13]	异戊二烯黄酮类
34	14.79	437.157 4	437.159 4	-4.8	315.118 8、437.155 2、109.027 4、121.028 1、235.058 5、257.079 7、340.092 9、368.086 9、327.122 1	mornigrol F ^[13]	异戊二烯黄酮类
35	15.09	691.217 0	691.217 3	-0.6	353.098 8、419.145 4、581.175 5、691.212 6、379.114 6、539.165 9、471.141 0、459.141 9、515.132 9、349.105 3	桑酮 G ^[15]	D-A 加合物
36	15.54	437.157 6	437.159 4	-4.9	437.160 1、191.070 8、257.079 5	morusignin L ^[13]	黄酮醇类
37	15.70	435.144 0	435.143 8	0.4	435.142 9、365.102 3、349.071 2、310.047 8、282.053 3、225.055 3	桑酮 A ^[7]	二氢黄酮醇类
38	16.14	421.162 9	421.164 5	-4.0	299.124 9、309.036 3、297.037 1、311.125 7、352.092 8、283.021 9、421.161 3、227.068 9、109.027 8	桑酮 C ^[7]	异戊二烯黄酮类
39	17.29	377.100 9	377.101 9	-2.8	255.064 4、175.002 9、109.029 0、377.101 5、308.032 4、280.037 8	—	—
40	17.80	759.278 5	759.279 9	-2.0	759.272 9、581.175 8、353.099 4、419.145 9、539.166 6、471.142 1、379.115 4	桑酮 H ^[15]	D-A 加合物
41	18.13	435.142 7	435.148 3	-2.6	435.138 9	—	—
42	18.56	421.163 7	421.164 5	-2.1	421.161 1、297.039 7、231.066 1	kuwanon D ^[7]	二氢黄酮类
43	19.22	675.219 6	675.216 6	4.4	565.181 8、675.217 1、403.152 7、455.148 2、523.174 6、269.044 6、109.028 3、321.040 2	—	—

续表 1

序号	t_R/min	实测值 m/z	理论值 m/z	误差($\times 10^{-6}$)	二级碎片离子 m/z	名称	类型
44	19.37	419.147 5	419.148 9	-3.4	419.145 8, 375.157 8, 293.043 6, 364.094 2, 281.045 1、219.065 9	环桑素 ^[15]	黄酮类
45	20.44	421.163 3	421.164 5	-3.0	421.161 5, 309.039 0, 297.039 4, 299.128 2, 193.086 9	kuwanon F ^[7]	二氢黄酮类
46	21.06	419.149 2	419.148 9	0.7	297.109 5, 419.145 9, 309.110 5, 350.076 7, 217.048 1、191.069 6, 109.027 9, 401.140 1	桑辛素 ^[5]	黄酮类
47	22.36	405.167 8	405.169 6	-4.6	405.166 5, 281.042 5, 293.043 2, 321.076 4, 161.024 0	kuwanon S ^[7]	黄酮类
48	22.64	391.189 8	391.190 3	-1.5	391.188 7, 307.095 9, 265.049 9, 185.060 5, 200.084 3、121.029 2	桑呋喃 A ^[7]	苯并呋喃类
49	23.04	437.193 8	437.195 8	-4.7	125.0228, 437.1961, 57.0342	里查酮 ^[16]	二氢黄酮类
50	23.99	445.235 3	445.237 3	-4.6	445.236 7, 253.051 1, 186.068 7	桑呋喃 D ^[7]	苯并呋喃类
51	24.87	417.131 5	417.133 2	-4.2	417.130 1, 373.144 2	环桑色烯 ^[12]	黄酮类
52	25.08	455.351 3	455.351 9	-1.5	455.347 5	熊果酸 ^[17]	三萜羧酸类
53	25.95	403.152 7	403.154 0	-3.2	403.151 3, 293.044 9, 282.051 3, 319.060 3, 333.076 6	桑辛素 M-6-O- β -D-吡喃葡萄糖苷	酚类
54	26.12	271.227 0	271.226 7	0.8	225.222 2, 271.227 7	α -萆黄酮	黄酮类
55	27.84	459.243 2	459.243 6	-0.9	459.250 9, 307.096 8, 200.083 5, 121.029 1	—	—
56	28.02	279.231 5	279.231 8	-1.3	279.228 6	EIC	酸
57	29.06	255.231 0	255.231 8	-3.4	255.230 4	棕榈酸	脂肪酸类

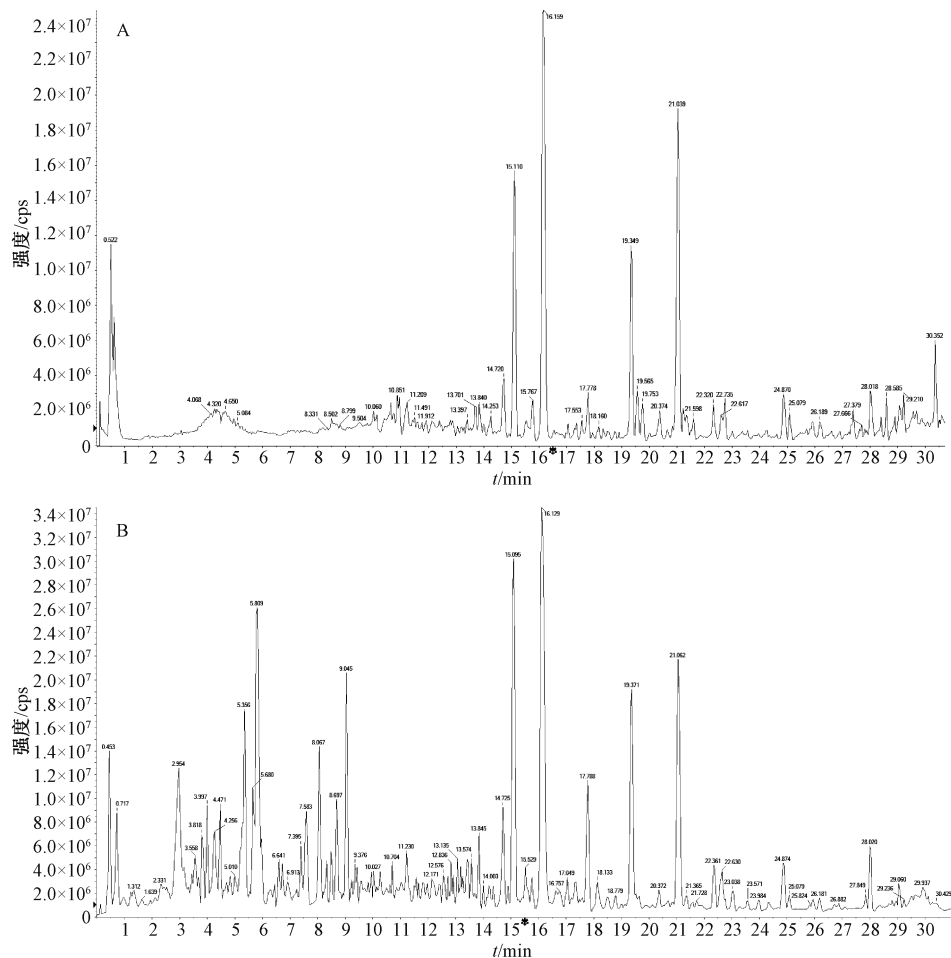


图 1 正离子 (A)、负离子 (B) 模式下 UPLC-Q-TOF-HRMS 总离子流图

Fig. 1 UPLC-Q-TOF-HRMS total ion current chromatograms in positive ion (A) and negative ion (B) modes

黄酮类化合物桑辛素准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 419.149 2, 失去一分子 H_2O 产生特征离子峰 $[M-H_2O]^-$ m/z 401.140 4, 失去 B 环产生特征离子峰 $[M-C_6H_6O_2]^-$ m/z 309.110 5, 异戊烯基脱去产

生特征离子峰 $[M-C_5H_9]^-$ m/z 350.076 7, 裂解途径见图 2A。黄酮醇类化合物山柰酚准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 285.038 5, 失去 B 环及一分子 OH 产

生特征离子峰 $[M-C_6H_6O_2-OH]^-$ m/z 185.060 5, 裂解途径见图 2B。

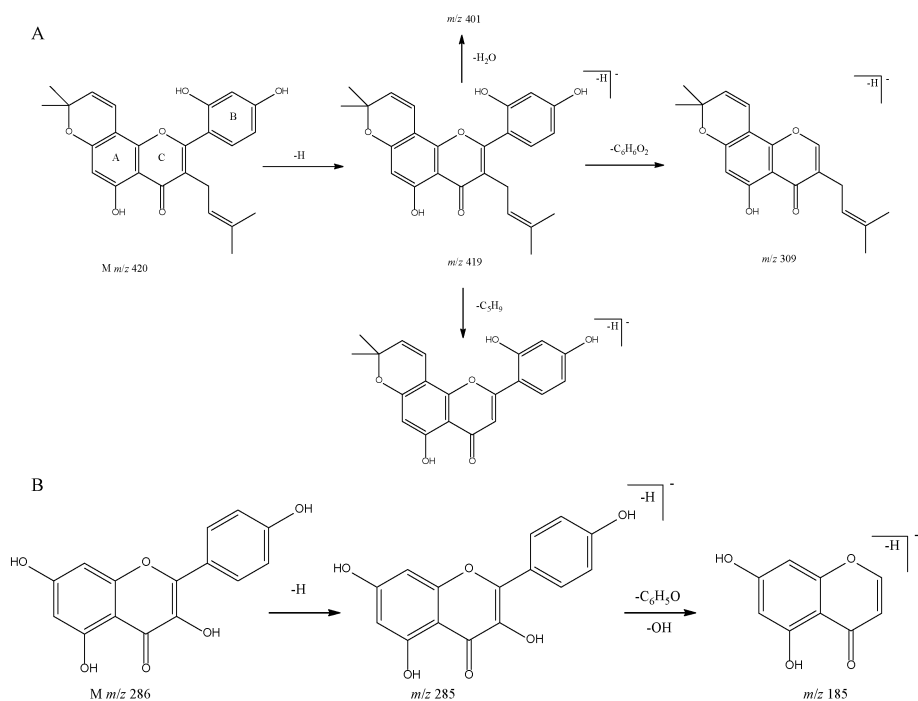


图 2 桑辛素 (A)、山柰酚 (B) 裂解途径

Fig. 2 Fragmentation pathways of morusin (A) and kaempferol (B)

二氢黄酮类化合物 5, 7, 2', 4'-四羟基黄酮准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 287.057 3, 失去 B 环产生特征离子峰 $[M-C_6H_6O_2]^-$ m/z 177.055 9, 逆-狄尔斯-阿尔德反应^[18-19]产生黄酮类特征离子 $[M-H]^-$ m/z 151.004 2、135.044 8, 裂解途径见图 3A。二氢黄酮醇类化合物二氢槲皮素准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 303.048 6, 失去一分子 H_2O 产生特征离子峰 $[M-H_2O]^-$ m/z 285.038 5, 失去 B 环产生特征离子峰 $[M-C_6H_6O_2]^-$ m/z 193.048 9, 失去 B 环及一分子 OH 产生特征离子峰 $[M-C_6H_6O_2-OH]^-$ m/z 177.016 9, RDA 反应产生特征离子 $[M-H]^-$ m/z 151.002 2, 裂解途径见图 3B。桑根酮醇 F 准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 437.158 1, 失去一分子异戊烯基及一分子 CO_2 产生特征离子峰 $[M-C_5H_9-CO_2]^-$ m/z 323.055 6, 裂解途径见图 3C。

异戊二烯黄酮类化合物桑酮 C 准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 421.162 9, 失去 B 环产生特征离子峰 $[M-C_6H_6O_2]^-$ m/z 311.125 7, 脱去一分子异戊烯基产生特征离子峰 $[M-C_5H_9]^-$ m/z 352.092 8, 脱去两分子异戊烯基产生特征离子峰 $[M-C_5H_9]^-$ m/z 283.021 9, 裂解途径见图 4A。Diels-Alder 类化合

物桑酮 G 准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 691.215 2, 失去两分子苯二酚产生特征离子峰 $[M-2C_6H_6O_2]^-$ m/z 471.143 0, 裂解途径见图 4B。

苯并呋喃类化合物桑呋喃 C 准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 579.165 9, 其特征离子峰 $[M-2C_6H_6O_2]^-$ m/z 359.090 0、 $[M-2C_6H_6O_2-CO_2-H_2O]^-$ m/z 293.045 2、 $[M-C_6H_6O_2-H_2O]^-$ m/z 451.118 9、 $[M-C_6H_6O_2-H_2O-C_2H_2]^-$ m/z 427.118 1, 裂解途径见图 5A。二苯乙烯类化合物桑皮苷 A 准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 567.170 8, 其特征离子峰 $[M-Glu]^-$ m/z 405.113 1、 $[M-2Glu]^-$ m/z 243.061 5、 $[M-Glu-H_2O]^-$ m/z 225.054 3, 裂解途径见图 5B。

综上所述, 桑枝 57 种化学成分包括 8 种黄酮及黄酮苷类 (6、20、31、45、46~47、51、54), 3 个黄酮醇类 (11、18、36), 11 个二氢黄酮及二氢黄酮醇类 (7、9、15、19、26~27、29、37、42、45、49), 5 个异戊二烯黄酮类 (10、13、33~34、38), 3 个 Diels-Alder 型加合物 (24、35、40), 2 个二苯乙烯类 (3、8), 5 个苯并呋喃类 (12、17、25、48、50), 4 个酸类 (2、52、56~

57), 3 个酚类 (4~5、16), 1 个苯丙素类, 1 个萘醌衍生物 (1), 11 个其他类。其中, 化合物 7、10、13、17、20、24~27、29、36、41、43、45、46、48、49、51~53 为首次在该植物中发现。另外, 上述成分裂解时大多脱去 B 环、H、OH、CO₂、H₂O、C₂H₂ 等中性分子, 部分会发生 RDA 裂解或脱去异戊烯基, 而其他部分化合物糖苷键断裂, 失去一分子葡萄糖。

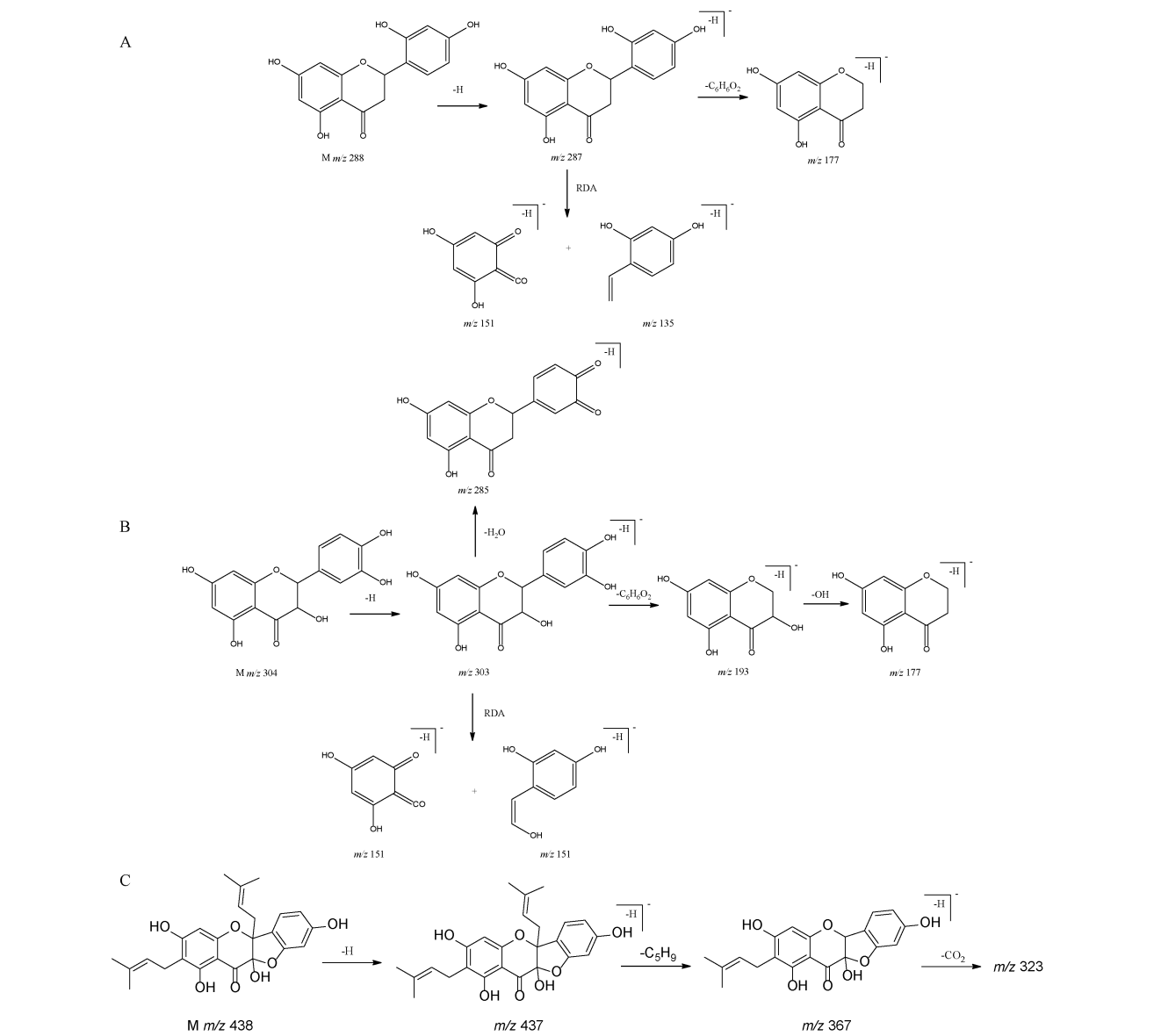


图 3 5, 7, 2', 4'-四羟基黄酮 (A)、二氢槲皮素 (B)、桑根酮醇 F (C) 裂解途径

Fig. 3 Fragmentation pathways of 5, 7, 2', 4'-tetrahydroxyflavone (A), dihydroquercetin (B) and sangenol F (C)

2.4 线性关系考察 精密称取芦丁对照品 20.00 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 甲醇超声溶解并定容至刻度, 即得 0.20 mg/mL 对照品溶液, 精密量取 0.20、0.48、0.96、1.44、1.92、2.40、2.88、3.36、3.84、4.32 mL 至 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 得到质量浓度分别为 4.00、9.60、19.20、28.80、38.40、48.00、57.60、67.20、76.80、86.40 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 取适量进行全波长扫描, 发现在 510 nm 处有最大吸收, 故在该处采

用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_2)_3\text{-NaOH}$ 显色法测定吸光度。以吸光度为纵坐标 (A), 对照品质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 得方程为 $A=10.717X-0.009\ 8$ ($r=0.999\ 5$), 在 4.00~86.40 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.5 总黄酮提取 准确称取药材粉末 2 g, 置于圆底烧瓶中, 加入 33 倍量 75% 乙醇, 在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下加热回流提取 90 min, 共 2 次, 收集滤液, 旋转蒸干, 70% 乙醇复溶并定容至 10 mL 量瓶中, 按 “2.4”

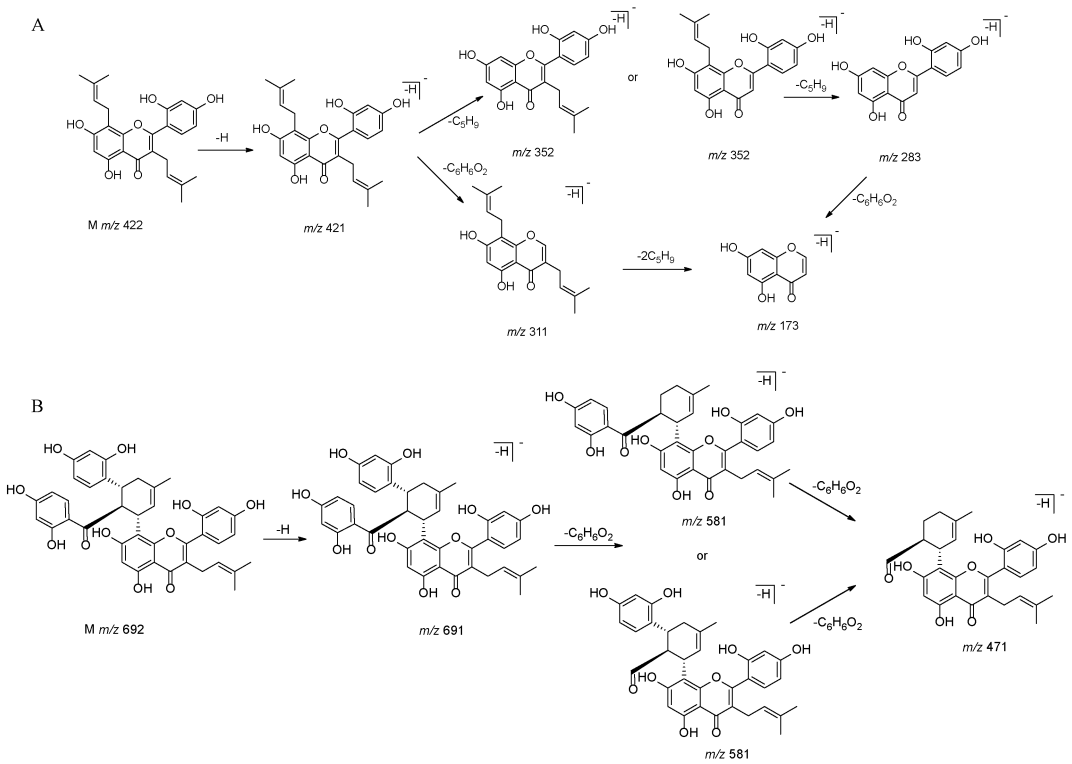


图 4 桑酮 C (A)、桑酮 G (B) 裂解途径
Fig. 4 Fragmentation pathways of kuwanon C (A) and kuwanon G (B)

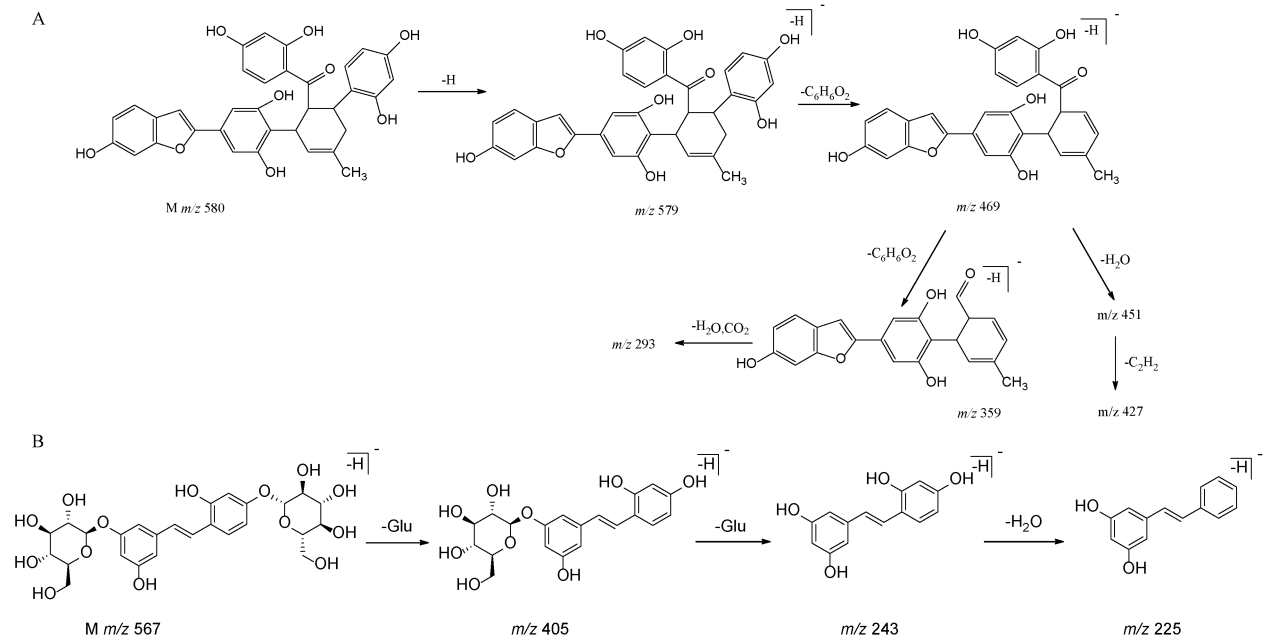


图 5 桑味喃 C (A)、桑皮苷 A (B) 裂解途径
Fig. 5 Fragmentation pathways of mulberry C (A) and morusin A (B)

项下方法测定吸光度，平行 3 份。

2.6 单因素试验 考察不同乙醇体积分数（60%、70%、80%、90%，图 6A）、料液比（1：10、1：15、1：20、1：25，图 6B）、提取时间（30、60、90、120 min，图 6C）、提取温度（60、70、80、90 ℃，图 6D）对总黄酮含量的影响，结果见图 6。由此可知，在乙醇体积分数为 80% 时总黄酮含量较高；随着提取温度、料液比增加，总黄酮含量呈先升后降的趋势，在 70 ℃、料液比 1：20 时达到最大值；随着提取时间延长，总黄酮含量有不同程

1898

度的升高，但在提取时间超过 80 min 后开始降低。

表 3 试验设计与结果

Tab. 3 Design and results of tests

试验号	A	B	C	D	Y 总黄酮/%
1	-1	-1	0	0	0.281 8
2	1	-1	0	0	0.257 6
3	-1	1	0	0	0.307 6
4	1	1	0	0	0.246 0
5	0	0	-1	-1	0.151 6
6	0	0	1	-1	0.196 5
7	0	0	-1	1	0.204 3
8	0	0	1	1	0.231 7
9	-1	0	0	-1	0.233 2
10	1	0	0	-1	0.197 5
11	-1	0	0	1	0.251 0
12	1	0	0	1	0.208 1
13	0	-1	-1	0	0.210 6
14	0	1	-1	0	0.214 3
15	0	-1	1	0	0.231 8
16	0	1	1	0	0.251 6
17	-1	0	-1	0	0.228 3
18	1	0	-1	0	0.181 4
19	-1	0	1	0	0.255 3
20	1	0	1	0	0.191 9
21	0	-1	0	-1	0.172 3
22	0	1	0	-1	0.186 9
23	0	-1	0	1	0.233 8
24	0	1	0	1	0.240 5
25	0	0	0	0	0.224 8
26	0	0	0	0	0.239 2
27	0	0	0	0	0.211 9
28	0	0	0	0	0.232 3
29	0	0	0	0	0.218 6

表 4 方差分析

Tab. 4 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.026 0	14	0.001 86	6.59	0.000 6
A	0.006 3	1	0.006 29	22.29	0.000 3
B	0.000 3	1	0.000 29	1.03	0.327 7
C	0.002 4	1	0.002 36	8.37	0.011 8
D	0.004 5	1	0.004 46	15.82	0.001 4
AB	0.000 3	1	0.000 35	1.24	0.284 3
AC	0.000 1	1	0.000 07	0.24	0.630 9
AD	0.000 0	1	0.000 01	0.05	0.833 4
BC	0.000 1	1	0.000 06	0.23	0.639 1
BD	0.000 0	1	0.000 02	0.06	0.817 5
CD	0.000 1	1	0.000 08	0.27	0.610 5
A ²	0.002 3	1	0.002 27	8.05	0.013 2
B ²	0.002 1	1	0.002 13	7.54	0.015 8
C ²	0.002 0	1	0.002 01	7.11	0.018 4
D ²	0.003 4	1	0.003 38	11.98	0.003 8
残差	0.003 9	14	0.000 28	—	—
失拟项	0.003 5	10	0.000 35	2.98	0.151 8
纯误差	0.000 5	4	0.000 12	—	—
总离差	0.030 0	28	—	—	—

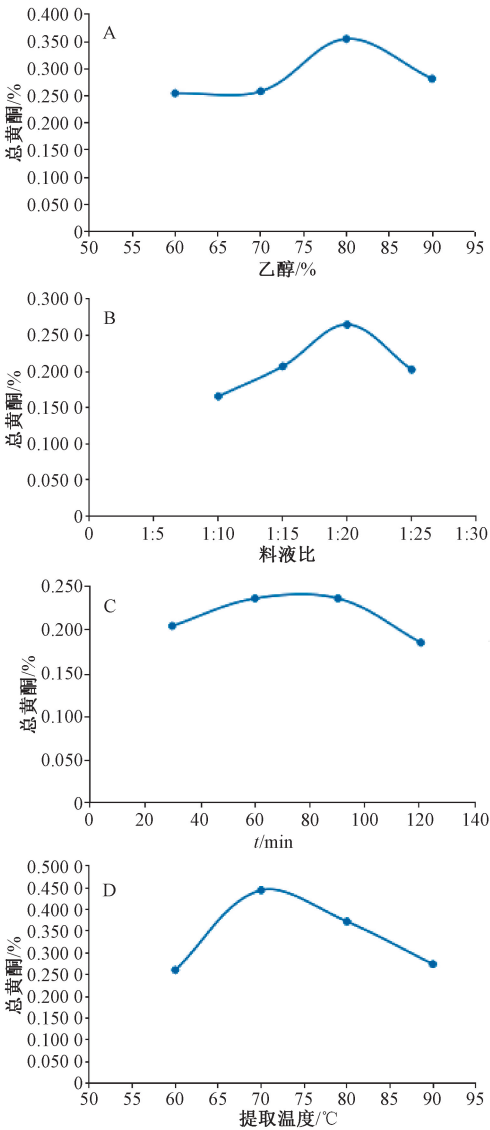


图 6 单因素试验结果

Fig. 6 Results of single factor tests

2.7 响应面法 在单因素试验基础上，选择乙醇体积分数 (A)、提取温度 (B)、提取时间 (C)、料液比 (D) 作为影响因素，总黄酮含量 (Y) 作为评价指标，采用 Design-Expert 8.0.6 软件设计四因素三水平中心组合^[20]，具体见表 2，结果见表 3。

表 2 因素水平

Tab. 2 Factors and levels

水平	A 乙醇/%	B 提取温度/°C	C 提取时间/h	D 料液比
-1	75	65	0.5	1 : 15
0	80	70	1.0	1 : 20
1	85	75	1.5	1 : 25

方差分析见表 4，可知模型的 $P<0.01$ ，具有高度显著性；失拟项 $P>0.05$ ，表明模型成功建立；

因素 D、B₂、D₂、A、C、A²、C² 对总黄酮含量有显著影响 ($P<0.05$, $P<0.01$)；各因素影响程度依次为乙醇体积分数 (A) >液料比 (D) >提取时

间 (C) > 提取温度 (B)。响应面分析^[18] 见图 7, 可知在乙醇体积分数、液料比、提取时间所选范围内均存在最高点, 而提取温度未发现。最终确定, 最优工艺为乙醇体积分数 75%, 料液比 1 : 21.12, 提取时间 70.79 min, 提取温度 74.99 ℃, 考虑到

实际可操作性, 将其修正为乙醇体积分数 75%, 料液比 1 : 21, 提取时间 70 min, 提取温度 75 ℃。按上述优化工艺进行 3 批验证试验, 测得总黄酮平均含量为 0.309 0%, 与预测值相似, 表明方程拟合良好, 工艺稳定可行。

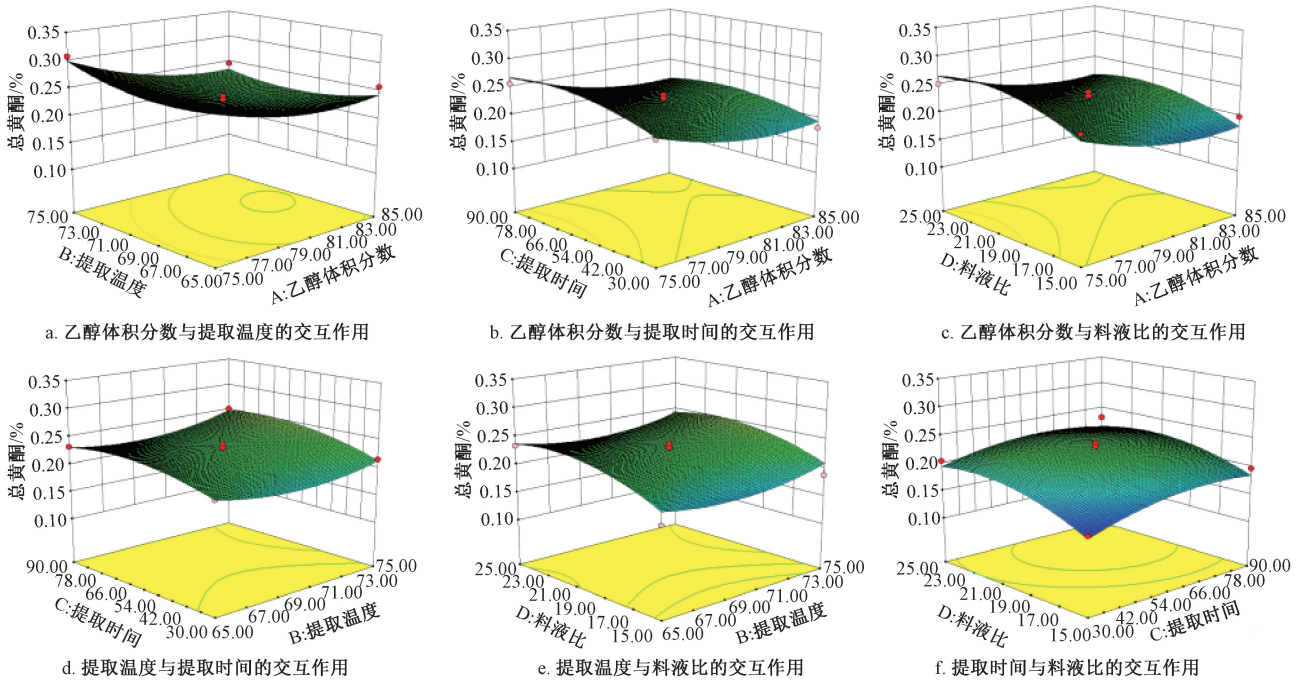


图 7 各因素响应面图
Fig. 7 Response surface plots for various factors

3 讨论与结论

本实验采用 UPLC-Q-TOF-HRMS 法及在线数据库、SCIEX 工作站分析一级精确质荷比、二级碎片信息数据, 再结合文献资料、SciFinder、TCMSP 等在线质谱化学数据库, 从桑枝中鉴定出 57 种成分, 包括 8 种黄酮及黄酮苷类, 3 种黄酮醇类, 11 种二氢黄酮及二氢黄酮醇类, 5 种异戊二烯黄酮类, 3 种 Diels-Alder 型加合物, 2 种二苯乙烯类, 5 种苯并呋喃类, 4 种酸类, 3 种酚类, 1 种苯丙素类, 1 种萘醌衍生物, 11 种其他类, 其中确定具体分子结构的有 46 种, 另外 10 种只能确定到分子式, 具体结构有待进一步研究。在单因素试验基础上采用响应面法优化总黄酮提取工艺, 得到最优工艺为乙醇体积分数 75%, 料液比 1 : 21, 提取时间 70 min, 提取温度 75 ℃, 总黄酮含量与预测值接近, 表明该工艺简便、准确、可行。

目前, 已发现有 15 个桑种和 5 个变种, 使得桑枝质量评价需要考虑的因素更复杂。另外, 在 2020 年版《中国药典》中仅记载桑枝性状描述和显微鉴别项目, 没有相关成分的质量控制内容, 故

对该植物的质量控制研究尚不完善。本实验采用 UPLC-Q-TOF-HRMS 法鉴定桑枝化学成分, 并采用响应面法优化总黄酮提取工艺, 可为今后该植物进一步开发利用及质量标准研究提供依据。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1600.
[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.
[3] 佟亚楠. 桑枝化学成分的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2013.
[4] 刘 涛, 付春梅, 唐 玉, 等. 不同干燥方式对桑枝提取物物理指纹图谱及其总黄酮含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 34-38.
[5] 姜乃珍, 薄 铭, 吴志平, 等. 中药桑枝化学成分及药理活性研究进展 [J]. 江苏蚕业, 2006(2): 4-7.
[6] 张丹丹. 桑枝化学成分黄酮的药理作用及其应用研究进展 [J]. 中医临床研究, 2017, 9(30): 146-147.
[7] 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(5): 386-390.
[8] 艾 文, 何厚洪, 杜 昕, 等. 桑枝化学成分的研究 [J]. 中成药, 2017, 39(9): 1861-1866.

[9]

Thomas P S, Eilstein J, Prasad A, *et al.* Comprehensive characterization of naturally occurring antioxidants from the twigs of mulberry (*Morus alba*) using on-line high-performance liquid chromatography coupled with chemical detection and high-resolution mass spectrometry[J]. *Phytochem Anal*, 2022, 33 (1): 105-114.

[10]

金 鑫. 桑枝的化学成分及活性研究[D]. 延边: 延边大学, 2011.

[11]

刘胜胜, 喻 艳, 成希飞, 等. 桑枝提取物中 3 种代表性黄酮的含量测定及抗氧化活性评价[J]. *蚕学通讯*, 2018, 38(4): 7-14.

[12]

钟 熙, 杨 鹤, 柯晓雪, 等. 桑树化学成分及药理活性研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(9): 2373-2391.

[13]

李 明. 桑叶和桑枝的化学成分及生物活性研究[D]. 济南: 山东大学, 2017.

[14]

丁嘉华, 冯毅凡, 李卫民, 等. UPLC-Q-TOF-MS 对桑白皮总黄酮提取物的快速分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(6): 78-84.

[15]

赵婷婷, 魏 华, 陈两绵, 等. 桑不同药用部位 HPLC 指纹图谱比较研究[J]. *中国药学杂志*, 2017, 52(7): 560-566.

[16]

向 伟, 喻 艳, 刘 静, 等. 新疆药桑枝条中抗氧化活性成分 sanggenon A[C] //第十二届家(柞)蚕遗传育种暨良种繁育学术研讨会论文集(摘要汇编). 重庆: 中国蚕学会, 2016; 216.

[17]

Chan E W, Lye P Y, Wong S K. Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*[J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(1): 17-30.

[18]

林宏英, 黄建梅, 段天璇, 等. 电喷雾-质谱研究 A 环不同取代基对黄酮类化合物裂解途径的影响[J]. *中国测试*, 2013, 39(5): 59-61; 64.

[19]

Liu J, Mu Y, Xiong S, *et al.* A UPLC-MS/MS method for comparative pharmacokinetics study of morusin and morin in normal and diabetic rats[J]. *Biomed Chromatogr*, 2019, 33 (7): e4516.

[20]

郭明鑫, 吴 霞, 冯毅凡. 刺糖总黄酮的提取工艺优化及其成分的快速分析[J]. *中药新药与临床药理*, 2020, 31 (9): 1110-1116.

红背丝绸质量标准研究

黄秋燕^{1,2}, 莫小莹³, 陈晓春³, 谢洁兰³, 蒋 贝³, 李耀华^{3*}, 罗 威^{1,2}, 梁 平^{1,2}, 潘小姣^{3*}, 梁建丽³
(1. 梧州市中医医院, 广西 梧州 543003; 2. 国际生物毒素研究中心, 广西 梧州 543003; 3. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200)

摘要: **目的** 建立红背丝绸的质量标准。**方法** 显微鉴别法对粉末及药材横切面进行鉴别, TLC 法定性鉴别岩白菜素、白藜芦醇, HPLC 法测定岩白菜素、白藜芦醇含量。**结果** 红背丝绸显微鉴别特征为草酸钙针晶、簇晶、石细胞及淀粉粒较多, 木栓层中有大量棕色块散在, 韧皮射线顶端呈喇叭状。TLC 斑点清晰, 分离度良好。岩白菜素、白藜芦醇分别在 0.050 3~1.006 4、0.020 3~0.406 5 mg/mL 范围内线性关系良好 ($r>0.999\ 4$), 平均加样回收率分别为 101.70%、96.48%, RSD 分别为 1.28%、1.08%, 含量分别为 10.992 4、1.083 3 mg/g。**结论** 该方法操作简便可靠, 具有较好的重现性, 可以用于红背丝绸的质量控制。

关键词: 红背丝绸; 岩白菜素; 白藜芦醇; 显微鉴别; TLC; HPLC

中图分类号: R282 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2023)06-1901-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.026

Quality standard for *Cissus assamica*

HUANG Qiu-yan^{1,2}, MO Xiao-ying³, CHEN Xiao-chun³, XIE Jie-lan³, JIANG Bei³, LI Yao-hua^{3*}, LUO Wei^{1,2}, LIANG Ping^{1,2}, PAN Xiao-jiao^{3*}, LIANG Jian-li³

收稿日期: 2023-03-02
基金项目: 广西壮族自治区中医药管理局资助项目 (GZZJ202029, GZZJ202030); 广西壮族自治区中医药管理局资助项目 (GXZYZ20210230)
作者简介: 黄秋燕 (1979—), 女, 副主任药师, 从事医院中药制剂研发及医院药事管理研究。E-mail: 24494426@qq.com
*** 通信作者:** 李耀华 (1978—), 男, 高级实验师, 从事中药、民族药质量标准研究。E-mail: yaohual@163.com
潘小姣 (1975—), 女, 教授, 从事中药药效物质基础及质量控制研究。E-mail: 275811455@qq.com